

**ANALYSE ONTOGÉNIQUE DE L'EXPRESSION  
DU GÈNE CODANT LA PROTÉINE KINASE ZPK**

par

**André Nadeau**

mémoire présenté au Département de biologie en vue  
de l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.)

**FACULTÉ DES SCIENCES  
UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE**

Sherbrooke, Québec, Canada, juin 1996



National Library  
of Canada

Bibliothèque nationale  
du Canada

Acquisitions and  
Bibliographic Services Branch

Direction des acquisitions et  
des services bibliographiques

395 Wellington Street  
Ottawa, Ontario  
K1A 0N4

395, rue Wellington  
Ottawa (Ontario)  
K1A 0N4

*Your file* *Votre référence*

*Our file* *Notre référence*

**The author has granted an irrevocable non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of his/her thesis by any means and in any form or format, making this thesis available to interested persons.**

**L'auteur a accordé une licence irrévocable et non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de sa thèse de quelque manière et sous quelque forme que ce soit pour mettre des exemplaires de cette thèse à la disposition des personnes intéressées.**

**The author retains ownership of the copyright in his/her thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without his/her permission.**

**L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège sa thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.**

ISBN 0-612-15467-X

**Canada**

## SOMMAIRE

ZPK est une nouvelle protéine sérine/thréonine kinase cytoplasmique dont la fonction cellulaire n'est pas encore établie. Dans le but d'élucider son rôle potentiel au cours du développement embryonnaire, nous avons effectué une analyse spatiale et temporelle de l'expression de l'ARNm de ZPK par hybridation *in situ* sur des embryons de souris entre les jours 11.5 et 17.5 de la période de gestation. La première expression de ZPK est détectée dans les cellules neuroépithéliales du cerveau dès le jour 11 du développement embryonnaire. Avec le temps, on observe une expression de ZPK dans la couche granulaire de la peau, dans les cellules épithéliales des villosités intestinales, dans les cellules acineuses du pancréas ainsi que dans les cellules épithéliales des tubules rénaux. Cette expression survient uniquement dans ces organes au moment où ces populations de cellules entament des événements morphogénétiques associés au processus de différenciation terminale. Dans l'ensemble, les résultats démontrent que ZPK est préférentiellement exprimé dans des populations de cellules différenciées ou en voie de différenciation terminale. Les résultats obtenus dans cette étude suggèrent que ZPK jouerait possiblement un rôle dans l'induction ou le maintien de l'état différencié de certaines populations de cellules.

## **REMERCIEMENTS**

Je tiens à adresser mes plus sincères remerciements à mon directeur de recherche, le docteur Richard Blouin, pour sa disponibilité, sa confiance, son support moral et financier et son encadrement qui ont été bénéfiques au cours de ces années.

Je tiens à remercier aussi mes conseillers, les docteurs Jean Morisset et Denis LeBel pour leur collaboration ainsi que le docteur Adrien Beaudoin pour ses bons conseils. Aussi, je veux remercier mes collègues de travail et tout particulièrement Jude Beaudoin pour ses conseils techniques ainsi que Gilles G. Grondin pour sa collaboration.

Je veux remercier aussi ma famille et mes amis, Claudia Boucher, Vicky Toussaint, Isabelle Boucher et May West pour leurs encouragements et leur soutien pendant toute la durée de la réalisation de ce travail.



## TABLE DES MATIÈRES

<b>SOMMAIRE</b> .....	ii
<b>REMERCIEMENTS</b> .....	iii
<b>TABLE DES MATIÈRES</b> .....	iv
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS</b> .....	viii
<b>LISTE DES TABLEAUX</b> .....	x
<b>LISTE DES FIGURES</b> .....	xi
<b>INTRODUCTION</b> .....	1
La superfamille des protéines kinases .....	3
Les protéines kinases et le développement .....	8
Récepteurs transmembranaires .....	9
<i>c-kit</i> .....	9
EGF-R : récepteur de EGF et TGF $\alpha$ .....	10
<i>c-met</i> : récepteur de HGF .....	11
PDGF $\beta$ r .....	12
<i>RET</i> et <i>c-ros</i> .....	13

Transducteurs cytoplasmiques .....	13
Protéines de la famille de Src .....	13
<i>Sik</i> .....	14
Sak .....	14
Présentation du projet de recherche .....	15
ZPK murin .....	16
<b>CHAPITRE 1 - MATÉRIEL ET MÉTHODES .....</b>	<b>22</b>
1.1 Embryons de souris .....	22
1.2 Synthèse des ribosondes .....	22
1.3 Hybridation <i>in situ</i> .....	23
1.3.1 Prétraitement des lames .....	23
1.3.2 Hybridation .....	24
1.3.3 Lavages et détection .....	24
<b>CHAPITRE 2 - RÉSULTATS .....</b>	<b>26</b>
2.1 Développement embryonnaire de la souris .....	26
2.2 Localisation tissulaire de l'ARNm de <i>ZPK</i> dans un embryon de souris de 17,5 jours .....	27
2.3 Expression de <i>ZPK</i> dans le cerveau embryonnaire .....	27
2.3.1 Développement du cerveau embryonnaire .....	27
2.3.2 Localisation de l'expression de l'ARNm de <i>ZPK</i> dans les structures nerveuses embryonnaires .....	29

2.4	Expression de <i>ZPK</i> dans la peau embryonnaire .....	32
2.4.1	Développement de la peau embryonnaire .....	32
2.4.2	Localisation de l'expression de l'ARNm de <i>ZPK</i> dans la peau embryonnaire .....	34
2.5	Expression de <i>ZPK</i> dans les vibrisses embryonnaires .....	34
2.5.1	Structure des follicules des vibrisses embryonnaires .....	34
2.5.2	Localisation de l'expression de l'ARNm de <i>ZPK</i> dans les follicules des vibrisses .....	38
2.6	Expression de <i>ZPK</i> dans l'intestin embryonnaire .....	38
2.6.1	Développement de l'intestin embryonnaire .....	38
2.6.2	Localisation de l'expression de l'ARNm de <i>ZPK</i> dans l'intestin embryonnaire .....	41
2.7	Expression de <i>ZPK</i> dans le pancréas embryonnaire .....	41
2.7.1	Développement du pancréas embryonnaire .....	41
2.7.2	Localisation de l'expression de l'ARNm de <i>ZPK</i> dans le pancréas embryonnaire .....	44
2.8	Expression de <i>ZPK</i> dans les reins embryonnaires .....	44
2.8.1	Développement du rein embryonnaire .....	44
2.8.2	Localisation de l'expression de l'ARNm de <i>ZPK</i> dans les reins embryonnaires .....	44
<b>CHAPITRE 3 - DISCUSSION .....</b>		<b>51</b>
3.1	Préambule .....	51

3.2	Expression de <i>ZPK</i> dans les structures nerveuses .....	54
3.3	Expression de <i>ZPK</i> dans la peau et les follicules des vibrisses .....	54
3.4	Expression de <i>ZPK</i> dans l'intestin .....	55
3.5	Expression de <i>ZPK</i> dans le pancréas .....	56
3.6	Expression de <i>ZPK</i> dans les reins .....	57
3.7	Discussion générale .....	57
<b>CONCLUSION</b> .....		<b>63</b>
<b>ANNEXE</b> .....		<b>67</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....		<b>68</b>

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

### Unité de mesure :

min :	minute
h :	heure(s)
M :	molaire
mM :	millimolaire
µg :	microgramme
ng :	nanogramme
mg :	milligramme
g :	gramme
µl :	microlitre
ml :	millilitre
L :	litre
U :	unité
µm :	micromètre (micron)

### Divers :

ADN :	acide désoxyribonucléique
ADNc :	ADN complémentaire
ARN :	acide ribonucléique
ARNm :	ARN messenger
ATP :	adénosine triphosphate
BSA :	albumine sérique de boeuf
CTP :	cytosine triphosphate
DIG :	digoxigénine

EGF :	“epidermal growth factor”
EGF-R :	“epidermal growth factor receptor”
GTP :	guanosine triphosphate
HGF :	“hepatocyte growth factor”
JNK :	“Jun nuclear kinase”
MAPK :	“mitogen-activated protein kinase”
MAPKKK :	“mitogen-activated protein kinase kinase kinase”
MLK :	“mixed lineage kinase”
nt :	nucléotide
pb :	paires de bases
PDGFβr :	“platelet-derived growth factor β receptor”
SAPK :	“stress-activated protein kinase”
SH2 :	“Src homology 2”
SH3 :	“Src homology 3”
TGFα :	“transforming growth factor α”
TGFβ :	“transforming growth factor β”
TGFβRII :	“transforming growth factor β receptor type II”
TNFα :	“tumor necrosis factor α”
UTP :	uracil triphosphate
ZPK :	la protéine ZPK
ZPK :	le gène de la protéine ZPK

## **LISTE DES TABLEAUX**

### **ANNEXE**

1. Les acides aminés et leurs symboles ..... 67

## LISTE DES FIGURES

### INTRODUCTION

1. Localisation cellulaire des protéines codées par les proto-oncogènes ..... 2
2. Spécificité d'interactions des domaines SH2 ..... 5
3. Séquence en nucléotides et en acides aminés de l'ADNc de ZPK murin ..... 17
4. Représentation schématique de la structure primaire de ZPK murin ..... 18
5. Comparaison de la séquence en acides aminés de ZPK murin  
et ZPK humain ..... 20

### CHAPITRE 2

6. Localisation de l'expression de l'ARNm de ZPK  
dans un embryon de souris de 17.5 jours ..... 28
- 7.1. Localisation de l'expression de l'ARNm de ZPK  
dans le cerveau embryonnaire ..... 30
- 7.2. Localisation de l'expression de l'ARNm de ZPK  
dans les ganglions spinaux ..... 31



8.	Microphotographies de coupes de peau d'embryons de souris de 14, 17 et 19 jours de gestation .....	33
9.1.	Localisation de l'expression de l'ARNm de ZPK dans la peau embryonnaire de souris .....	35
9.2.	Localisation de l'expression de l'ARNm de ZPK dans la peau d'un embryon de 16 jours .....	36
10.	Coupe transversale schématique d'un follicule d'une vibrisse de souris .....	37
11.	Localisation de l'expression de l'ARNm de ZPK dans les follicules des vibrisses .....	39
12.	Schéma du développement embryonnaire de l'intestin .....	40
13.	Localisation de l'expression de l'ARNm de ZPK dans l'intestin embryonnaire .....	42
14.	Schéma du développement embryonnaire du pancréas .....	43
15.1.	Localisation de l'expression de l'ARNm de ZPK dans le pancréas embryonnaire .....	46
15.2.	Localisation de l'expression de l'ARNm de ZPK dans le pancréas d'un embryon de 16 jours .....	47

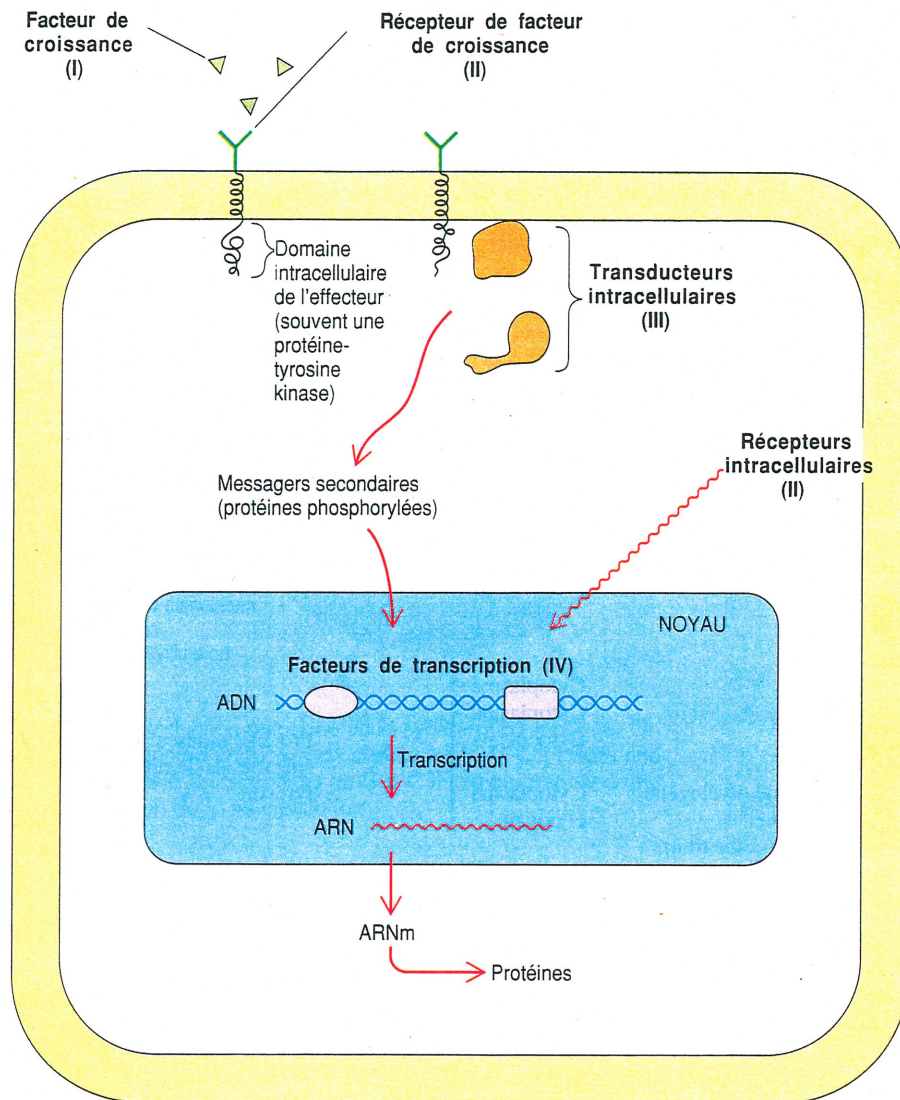
16.	Schéma du développement embryonnaire du rein .....	48
17.1.	Localisation de l'expression de l'ARNm de ZPK dans le rein embryonnaire .....	49
17.2.	Localisation de l'expression de l'ARNm de ZPK dans le rein d'un embryon de 16 jours .....	50

### **CHAPITRE 3**

18.	Représentation du cycle cellulaire .....	53
19.	Voies d'activation des protéines de la famille des SAPK/JNK .....	62

## INTRODUCTION

L'environnement dans lequel une cellule se retrouve joue un rôle primordial dans la régulation de ses activités intrinsèques. En fait, c'est en partie par le milieu que les cellules s'envoient ou s'échangent des signaux de communication. Ces signaux peuvent être reçus par la cellule sous la forme de molécules qui établiront des interactions avec des récepteurs ancrés à la membrane cytoplasmique de la cellule réceptrice. Ces récepteurs protéiques permettront de faire passer leur signal à travers la membrane. Ensuite ces signaux seront acheminés jusqu'au noyau via des transducteurs cytoplasmiques qui sont de nature chimique ou bien protéique. Ceci est une description simpliste d'une cascade de signaux intracellulaires. En réalité, ces cascades nécessitent plusieurs étapes supplémentaires. Plusieurs activités cellulaires sont contrôlées par ce type de mécanisme et tout particulièrement le contrôle de la prolifération et de la différenciation cellulaire. Il existe des protéines qui ont un rôle bien déterminé dans les mécanismes de prolifération et de différenciation cellulaire. Les gènes qui codent pour ces protéines forment un groupe que l'on appelle les proto-oncogènes. Ils sont présents dans toutes les cellules mais lorsque déréglés, ils entraînent l'apparition d'un cancer. C'est pourquoi une défense efficace contre le cancer demande une bonne connaissance des systèmes normaux (Meeting review, 1995). Les protéines codées par les proto-oncogènes sont présentes dans la cellule sous quatre formes différentes (Figure 1). Elles peuvent être retrouvées à l'extérieur de la cellule sous la forme de facteurs de croissance (I), sur la cellule sous la forme de récepteurs de facteurs de croissance (II) et dans la cellule en tant que transducteurs de signaux cytoplasmiques (III) et de facteurs de transcription (IV). Ces protéines peuvent faire partie d'une même cascade de signaux (Pawson and Hunter, 1994). La fixation d'un facteur de croissance à son récepteur est l'événement déclencheur d'une cascade de signaux intracellulaires. Une fois activé, la cascade de signaux va se poursuivre en activant des transducteurs cytoplasmiques qui ont pour fonction de transmettre le signal jusqu'au noyau. Dans le noyau, les transducteurs cytoplasmiques vont signaler aux facteurs de transcription d'activer la transcription des gènes cibles via la phosphorylation du facteur de transcription. Les



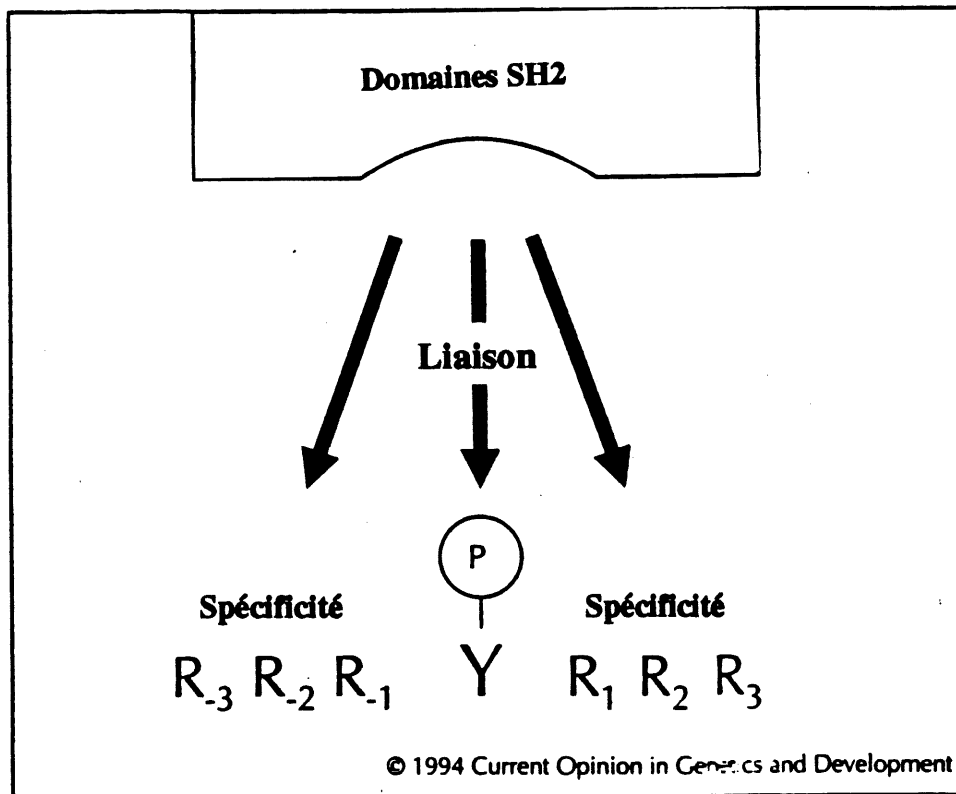
**Figure 1. Localisation cellulaire des protéines codées par les proto-oncogènes.** Le contrôle de la prolifération cellulaire fait appel à quatre types de protéines dont les gènes peuvent se transformer en oncogènes. Ces types sont des facteurs de croissance (I), des récepteurs (II), des transducteurs (III) ou des facteurs intranucléaires (IV). (Tiré de Darnell *et al.*, 1993)

cascades de signaux intracellulaires jouent un rôle primordial dans les mécanismes de régulation cellulaire. Une grande famille de protéines utilise ce mécanisme pour agir dans la cellule. Leur mécanisme d'activation et de répression dans les cascades de signaux est basé sur la phosphorylation de résidus d'acides aminés. On parle ici de la superfamille des protéines kinases. On lui donne le nom de superfamille pour la distinguer des autres familles qui sont composées de beaucoup moins de membres (Hanks et Hunter, 1995).

## **LA SUPERFAMILLE DES PROTÉINES KINASES**

La superfamille des protéines kinases compte actuellement près de 400 membres regroupées en plus de 50 groupes, familles ou sous-familles classées ainsi selon des homologies entre elles (Hanks et Hunter, 1995). La plupart de ces protéines ont une origine eucaryote quoiqu'un nombre sans cesse grandissant de protéines kinases sont isolées chez d'autres organismes (Hanks et Hunter, 1995). Il existe deux grands groupes principaux de kinases. Ils se différencient par leur spécificité de phosphorylation de résidus d'acides aminés. On retrouve les kinases qui ont une spécificité pour les résidus tyrosine et d'autres pour les résidus sérine et/ou thréonine (Pawson, 1994). Il existe aussi une classe intermédiaire qui a une spécificité pour les trois types de résidus d'acides aminés. On les nomme protéines kinases à double spécificité de phosphorylation (Douville *et al.*, 1994). La spécificité de phosphorylation des résidus d'acides aminés repose sur des motifs très spécifiques ainsi que du positionnement adéquat de la protéine qui sera phosphorylée. En fait, les protéines qui acceptent le phosphate sur les résidus tyrosine seront incapable d'accéder au site catalytique de la protéine kinase qui a une spécificité pour les résidus sérine/thréonine. Le contraire est aussi valide. De plus, le positionnement de l'ATP (GTP) dans le site catalytique empêche une phosphorylation non-spécifique (Taylor *et al.*, 1995). On peut classer les protéines kinases en deux autres groupes selon certains éléments de leur séquence qui influencent directement leur localisation cellulaire. Les kinases peuvent être soit des récepteurs transmembranaires possédant un domaine transmembranaire hydrophobe, ou soit des transducteurs cytoplasmiques libres dans le cytoplasme (Hanks et Hunter, 1995).

Toutes les protéines kinases ont des caractéristiques communes. C'est sur la base de ces caractéristiques communes que les kinases ont été classées. On estime que le nombre de gènes codant des protéines kinases varie entre 1000 et 2000 selon différentes sources (Hanks et Hunter, 1995; Van Der Geer *et al.*, 1994). Toutes les familles de kinases contiennent un certain nombre de domaines qui leurs sont caractéristiques. Un premier domaine est le domaine catalytique. C'est à partir de ce domaine que l'on obtient la plus grande majorité des informations pour l'identification d'une kinase. En fait, il nous renseigne sur la spécificité de phosphorylation de la kinase et aussi sur son appartenance à l'une ou l'autre des familles. On peut subdiviser le domaine catalytique en 11 sous-domaines (I-XI) qui sont hautement conservés entre toutes les kinases (Van Der Geer *et al.*, 1994 ; Yarden et Ullrich, 1988). On assigne trois rôles principaux au domaine catalytique. Il sert à la liaison et au bon positionnement de l'ATP (GTP) ; à la liaison et au bon positionnement du substrat (protéines) ; au transfert du  $\gamma$ -phosphate de l'ATP (GTP) sur les résidus d'acides aminés sérine et/ou thréonine et/ou tyrosine (Van Der Geer *et al.*, 1994). Dans plusieurs cas, certains domaines vont préciser la localisation cellulaire de la protéine qui est codée par le gène. On retrouve parfois des domaines très hydrophobes qui correspondent à des domaines transmembranaires de récepteurs cellulaires. Ceci correspond souvent à des séquences-signal de localisation membranaire (cytoplasmique, nucléaire). On retrouve aussi des domaines qui sont associés au rôle ou à la fonction de la protéine. On parle ici de domaines qui peuvent favoriser les interactions protéine/protéine lors d'une cascade de signaux intracellulaires. Un premier de ces domaines est le domaine SH2 (Src homology 2) (Schlessinger, 1994). Les domaines SH2 sont constitués de 100 acides aminés. Leur rôle est de reconnaître une séquence spécifique d'acides aminés sur une ou des protéine(s) cible(s). Le domaine SH2 reconnaît uniquement une séquence très spécifique qui contient une tyrosine phosphorylée (Figure 2). Un autre domaine, est le domaine SH3 (Src homology 3) (Schlessinger, 1994). Sa fonction est la même que pour SH2. Cependant, le domaine SH3 qui est constitué de 50 acides aminés, reconnaît une séquence d'acides aminés riche en proline et



**Figure 2. Spécificité d'interactions des domaines SH2.** La tyrosine phosphorylée sert d'ancre. Les acides aminés identifiés par R représentent la spécificité de la liaison. (Tiré et traduit de Schlessinger, 1994)

en résidus hydrophobes (Schlessinger, 1994). Ces deux types de domaine sont retrouvés dans une multitude de protéines qui sont impliquées dans divers mécanismes cellulaires. Ils sont retrouvés souvent ensemble dans les mêmes protéines et dans des combinaisons différentes. La présence des domaines SH2 et SH3 a permis d'établir une classification secondaire des protéines impliquées dans des cascades intracellulaires. En fait, dans une cascade de transduction, il y a des protéines possédant des domaines SH2 et SH3 qui ont une activité kinase intrinsèque et d'autres qui n'en ont pas. Ces dernières sont des protéines adaptateurs constituées uniquement de domaines de liaison à d'autres protéines de la cascade comme par exemple GRB2 (Van Der Geer *et al.*, 1994). Les sites de liaison des domaines SH2 et SH3 sont retrouvés uniquement dans la partie cytoplasmique des récepteurs transmembranaires et dans les protéines cytoplasmiques (transducteurs cytoplasmiques) (Schlessinger, 1994). Il existe d'autres domaines qui peuvent favoriser des interactions protéiques. Par exemple, les motifs leucine-zipper qui étaient auparavant retrouvés presque uniquement dans des facteurs de transcription comme c-jun et c-fos (Holt, 1992), sont maintenant identifiés dans des protéines kinases (famille des MLK) (Dorow, 1993). Ensuite, certaines familles de kinases possèdent des domaines très particuliers, comme par exemple, des domaines de type "Ig like" et des domaines de reconnaissance des cadhérines et des fibronectines. Ces domaines sont impliqués généralement dans la reconnaissance du récepteur et de son ligand, mais aussi peuvent servir d'ancrage pour les interactions cellulaires. Ces derniers types de domaines se retrouvent plus particulièrement dans les récepteurs transmembranaires (portion extracellulaire) et quelquefois dans des protéines cytoplasmiques (Van Der Geer *et al.*, 1994).

Plusieurs études ont permis de démontrer l'implication des kinases dans plusieurs processus cellulaires. En fait, les kinases sont impliquées dans la régulation de l'expression des gènes (Hunter et Karin, 1992), dans la transduction de signaux (Hunter, 1995), dans le cycle cellulaire (Philipson et Sorrentino, 1991), dans la différenciation (Philipson et Sorrentino, 1991) et dans le développement (Pawson et Bernstein, 1990). L'étendue des implications des kinases dans la cellule démontre à quel point elles sont nécessaires. Un autre fait peut démontrer cette



importance, c'est la comparaison de la séquence de protéines kinases homologues entre différents organismes qui démontre une forte conservation de la protéine malgré l'évolution des espèces (Yarden et Ullrich, 1988). Le fait que les kinases soient conservées au cours de l'évolution tend à démontrer que ces protéines jouent des rôles importants dans la régulation de différentes activités cellulaires. Récemment, des protéines kinases procaryotes homologues à des protéines kinases eucaryotes ont été isolées. Chez *Yersinia pseudotuberculosis*, la protéine YpkA est codée dans un plasmide qui assure la virulence du microorganisme (Hanks et Hunter, 1995). De plus, ce plasmide code pour deux autres protéines qui présentent de fortes similitudes avec des protéines eucaryotes. Un autre exemple est celui de *Mixococcus xanthus*. *Mixococcus xanthus* est probablement le procaryote le plus intéressant à ce niveau. On a, en effet, dénombré huit gènes qui codent pour des protéines ayant des homologies avec des membres de la superfamille des kinases. *Mixococcus xanthus* est un microorganisme peu ordinaire. Son cycle de développement est très complexe lors d'un épuisement nutritif comme ce qui est retrouvé chez les eucaryotes du genre *Dictyostelium*. Dans ce dernier genre, les kinases sont impliquées dans le choix du cycle asexué ou sexué ainsi que dans la croissance et la différenciation cellulaire (Munoz-Dorado *et al.*, 1993). Sachant que la protéine Pkn1 de *M. xanthus* est impliquée dans la transformation cellulaire, il est facile de spéculer que les kinases retrouvées chez *M. xanthus* sont impliquées dans la régulation de son cycle de développement. La recherche de protéines kinases chez des microorganismes qui n'ont pas de cycle particulier comme *Escherichia coli*, n'a donné aucun résultat. D'autres résultats cités par Hanks et Hunter (1995) suggèrent que ce type de gènes est largement répandu chez beaucoup de procaryotes et que ces mêmes gènes représentent les ancêtres de la superfamille des protéines kinases eucaryotes.

Comme il a été mentionné précédemment, les kinases sont impliquées dans plusieurs mécanismes cellulaires. Leur rôle général est de transmettre, jusqu'au noyau, un signal extracellulaire via la phosphorylation dans le but d'obtenir la réponse désirée. Pour donner la bonne réponse physiologique, une cellule doit recevoir une combinaison de signaux

extracellulaires. Par la suite, il y aura activation de plusieurs cascades cellulaires. Par ce fait, on peut parler de coopération entre les différentes protéines impliquées dans les voies de transduction (Hunter, 1991). C'est cette combinaison de facteurs qui induira la cellule vers la bonne réponse (Kazlauskas, 1994 ; Van Der Geer, 1994). Il n'y a pas seulement que des cascades d'activation. Dans certains cas, la phosphorylation des protéines aura un rôle d'inactivation, comme pour la glycogène synthétase, enzyme impliquée dans le métabolisme du glycogène. On ne peut parler des kinases sans parler des phosphatases, car à chaque kinase, il doit y avoir une phosphatase qui va déphosphoryler (Wera et Hemmings, 1995 ; Mourey et Dixon, 1994). Les phosphatases ont une importance capitale dans la transduction des signaux intracellulaire. En fait, elles sont nécessaires pour réguler une cascade qui a été activée. Les kinases et les phosphatases sont intimement liées. Certaines phosphatases (PP1) nécessitent une phosphorylation de leur sous-unité inhibitrice pour être activées. Donc comme on peut le constater les kinases et les phosphatases sont nécessaires pour le bon fonctionnement des cascades de signaux intracellulaires (Wera et Hemmings, 1995).

## **LES PROTÉINES KINASES ET LE DÉVELOPPEMENT**

Les organismes multicellulaires ne commencent pas leur cycle de vie complètement formés. En fait, ils se forment relativement lentement par un processus de changements progressifs que l'on appelle le développement (Gilbert, 1994). Le développement embryonnaire des organismes multicellulaires débute par une cellule originale, l'oeuf fécondé, qui se divise pour éventuellement produire toutes les cellules de l'organisme. Un fait intéressant est que la première cellule va produire et organiser tous les types cellulaires qui forment l'organisme. Cette cellule est qualifiée de cellule pluripotente. Plus tard au cours du développement, certaines cellules vont subir des changements autoreproductifs qu'elles passeront à leur descendance. On parle à ce moment que les cellules sont déterminées, qu'elles ont fait leur choix de développement (Alberts et al., 1990). La génération de cette diversité cellulaire est appelée la différenciation cellulaire. Chabot *et al.* ont été les premiers, en 1988, à mettre en

évidence l'implication des kinases dans le développement embryonnaire. Ils se sont rendu compte que le gène *c-kit* codant la protéine kinase Kit était localisé au niveau du locus *W* de la souris (Chabot *et al.*, 1988). Par la suite, de multiples études ont permis d'identifier plusieurs autres kinases qui ont une implication dans le développement embryonnaire. À cette époque, on savait déjà que les kinases étaient de potentiels oncogènes (Rodrigues et Park, 1994). Par la suite, des études ont démontré l'expression spécifique de certaines kinases dans des organes embryonnaires. Les mêmes études ont été réalisées chez l'adulte. Aucune expression de ces gènes n'a été détectée. Ce qui est intéressant, c'est lors de l'analyse des gènes exprimés dans les cellules tumorales d'un organe. On retrouve des gènes qui n'étaient exprimés qu'au stade embryonnaire. Les multiples études réalisées à ce sujet ont démontré de grandes similitudes entre les cellules embryonnaires et les cellules tumorales tant au niveau de l'expression génétique que de certaines caractéristiques morphologiques. Il est fondamental d'avoir une très bonne connaissance du système cellulaire normal, dans le but de bien comprendre les causes des dérèglements qui peuvent survenir dans certaines circonstances (cancer) (Chabot *et al.*, 1988 ; Meeting review, 1995).

Tel que mentionné précédemment, il existe des protéines kinases qui sont des récepteurs transmembranaires et d'autres qui sont des transducteurs cytoplasmiques. Dans ce qui suit, nous donnerons des exemples de protéines kinases de chacun des types et les évidences expérimentales de leur implication dans certains processus du développement embryonnaire.

## **RÉCEPTEURS TRANSMEMBRANAIRES**

### ***c-kit***

La première évidence de la participation des kinases dans le développement embryonnaire a été réalisée par Chabot *et al.* (1988). Cette étude a été réalisée sur le gène *c-kit* qui code pour un récepteur tyrosine kinase. Ils ont mis en évidence que la mutation *W<sup>19H</sup>* (white-spotting) et le

gène *c-kit* sont situés sur le même locus *W*. En fait, le locus *W* code la protéine Kit et le locus *Sl* code la protéine Steel (Keshet *et al.*, 1991). Le rôle de Kit dans le développement se fait au niveau des cellules souches sanguines, pigmentaires et germinales. En fait, il est important dans la régulation de la différenciation de ces cellules souches. Une mutation de ces gènes entraîne une perte de pigmentation, une fertilité réduite et l'anémie. Grâce à ces résultats, il était maintenant possible d'impliquer le produit d'un proto-oncogène dans le processus du développement (Morello et Babinet, 1989) et par cet exemple, il était possible de croire que d'autres proto-oncogènes de la famille des kinases pouvaient être impliqués dans le processus du développement.

### **EGF-R : récepteur de EGF et TGF $\alpha$**

Une autre de ces protéines kinases qui a une implication dans le développement est le récepteur à EGF (EGF-R). Ce récepteur possède une activité tyrosine kinase. Il fait partie de la famille de "epidermal growth factor receptor" (Hanks et Hunter, 1995). Le rôle principal conféré à ce récepteur lors du développement embryonnaire est un rôle mitogénique (Johnson *et al.*, 1994). Le meilleur exemple de ce rôle est dans la régénération hépatique chez l'adulte. Il semble, en effet, que si on enlève toutes sources d'EGF chez un animal partiellement hépatectomisé, il n'y a aucune régénération de l'organe (Michalopoulos, 1991 ; Fausto *et al.*, 1995). Donc l'action de EGF stimule la multiplication cellulaire dans les cellules où EGF-R est exprimé. Dans certains cas, EGF-R et ses ligands (EGF et TGF $\alpha$ ) jouent un rôle mitogénique (stimulation de la motilité cellulaire) et morphogénique. Une évidence de cette affirmation est qu'autant *in vitro* qu'*in vivo*, EGF-R activé stimule la production de fibronectine, de collagène et d'acide hyaluronique, qui sont des composés indispensables de la matrice extracellulaire et nécessaires dans les mécanismes mitogéniques et morphogéniques (Adamson, 1990). L'implication de EGF-R dans le développement embryonnaire commence à un stade très précoce. Récemment, une étude a démontré que EGF-R et ses ligands, sont nécessaires pour le développement qui se produit avant l'implantation utérine de l'ovule fécondé (Chia *et al.*, 1995). Une désactivation

totale du gène entraîne immédiatement le rejet de l'oeuf car il n'est plus apte à s'implanter dans l'utérus. Donc on peut constater l'importance de EGF-R dans le développement embryonnaire précoce. Dans le développement tardif, EGF va généralement avoir une action mitogénique tandis que TGF $\alpha$  aura une action morphogénique (Adamson, 1990). Ce qui est intéressant, c'est la réponse de l'EGF-R qui dépend du ligand qui s'y attache. De plus, il est important de savoir, dans le cas de l'EGF-R, que les deux ligands, EGF et TGF $\alpha$ , n'agissent pas sur les mêmes populations de cellules. Donc, EGF-R joue un rôle important dans le développement de plusieurs populations de cellules.

#### ***c-met* : récepteur de HGF**

Un autre récepteur qui a une activité tyrosine kinase est le récepteur du HGF (hepatocyte growth factor), le *c-met*. Le potentiel oncogénique de ce récepteur a été démontré lorsqu'il est muté (Bronner-Fraser, 1995). C'est sa localisation chromosomique qui en fait un proto-oncogène puissant car il est fréquemment impliqué lors de translocations chromosomiques. Un exemple concret est la translocation de *c-met* avec le gène *tpv* que l'on rencontre dans la plupart des cancers gastriques humains (Sonnenberg *et al.*, 1993 ; Soman *et al.*, 1991). Ce récepteur a aussi son rôle à jouer lors du développement embryonnaire. Sa première implication dans le développement se fait à un stade assez précoce lors de l'organogénèse (Bronner-Fraser, 1995). C'est par un mécanisme d'interactions épithélio-mésenchymateuses que le HGF et son récepteur *c-met* agissent dans le développement (Sonnenberg *et al.*, 1993; Rosen *et al.*, 1994). La distribution spécifique de l'expression de ce récepteur et de son ligand indique un mode d'action paracrine pour HGF. Il a été démontré que *c-met* est retrouvé dans des cellules épithéliales de plusieurs organes en formation chez l'embryon de souris, tandis que HGF se retrouve dans le tissu mésenchymateux environnant. Le meilleur exemple pour ce mécanisme, est celui du rein embryonnaire (Sonnenberg *et al.*, 1993). Le rein embryonnaire (métanéphros) se développe vers le jour 11 du développement. Au début, un signal qui provient de l'uretère induit la transformation du mésenchyme en cellules épithéliales qui vont à leur tour se différencier en

tubules proximaux, distaux et en glomérules. Durant tout le développement du rein, *c-met* est exprimé dans les cellules épithéliales de tous les tubules nouvellement formés mais pas dans les glomérules. Dans la même période, HGF est exprimé dans tout le mésenchyme. Ceci n'est pas observé uniquement dans le rein. En fait, l'intestin, le pancréas, les poumons et les glandes salivaires qui sont constitués en grande partie de cellules épithéliales, expriment, lors du développement, le *c-met* et l'HGF de façon comparable au rein (Sonnenberg *et al.*, 1993). Donc en résumé, *c-met* et son ligand agissent lors du développement de plusieurs organes en échangeant, entre les cellules épithéliales et les cellules mésenchymateuses, un signal qui gouverne les mécanismes de morphogénèse et de différenciation des cellules (Sonnenberg *et al.*, 1993).

### **PDGF $\beta$ r**

Le récepteur de PDGF (PDGF $\beta$ r) possède une activité tyrosine kinase. Son rôle dans le développement est bien connu. Ce récepteur agit par des interactions épithélio-mésenchymateuses pour la formation de plusieurs organes comme la trachée, les intestins et le système circulatoire (Shinbrot *et al.*, 1994). L'expression du récepteur se retrouve uniquement dans le mésenchyme non-différencié. Dès que le mésenchyme est transformé en muscle lisse autour de l'intestin, les cellules cessent d'exprimer le récepteur de PDGF. Il en est tout autrement pour la formation des vaisseaux sanguins. Le récepteur de PDGF est exprimé dans les cellules endothéliales ce qui suggère une implication de PDGF $\beta$ r dans la croissance et le développement des vaisseaux sanguins. Dans les plus gros vaisseaux, PDGF $\beta$ r est exprimé dans le mésenchyme entourant l'endothélium jusqu'à la formation des muscles comme dans le cas de l'intestin (Shinbrot *et al.*, 1994).

## **RET et c-ros**

Deux autres protéines attirent l'attention quant aux types d'expériences réalisées pour étudier le rôle potentiel d'un gène dans le développement embryonnaire. C'est le cas de *RET* (Avantaggiato *et al.*, 1994; Pachnis *et al.*, 1993) et de *c-ros* (Tessarollo *et al.*, 1992). Ces deux gènes codent pour des récepteurs tyrosine kinase. Les groupes travaillant sur ces protéines ont étudié le rôle potentiel de leur protéine dans le développement embryonnaire en utilisant l'hybridation *in situ*. Cette technique permet de localiser et d'identifier les populations de cellules qui expriment le gène de la protéine. Ainsi, ils ont déterminé que *RET* a un rôle potentiel dans la différenciation de structures nerveuses et dans la formation du rein par un mécanisme d'interactions épithélio-mésenchymateuses (Avantaggiato *et al.*, 1994; Pachnis *et al.*, 1993). Pour *c-ros*, son expression est détectée au moment de l'induction et de la prolifération des cellules épithéliales de l'intestin et du rein. Dès que les cellules épithéliales sont différenciées, *c-ros* n'est plus exprimé (Tessarollo *et al.*, 1992). Donc ces observations confèrent à *c-ros* un rôle dans les processus de prolifération cellulaire.

## **TRANSDUCTEURS CYTOPLASMIQUES**

### **Protéines de la famille de Src**

Jusqu'à maintenant, on a décrit l'implication de récepteurs membranaires dans le développement embryonnaire. Pour faire passer leur signal, ces récepteurs ont besoin de protéines cytoplasmiques qui vont transduire le message jusqu'au noyau (Kazlauskas, 1994; Marshall, 1995; Imamoto *et al.*, 1994). Les protéines de la famille de Src sont sans aucun doute les transducteurs cytoplasmiques les mieux caractérisés dans les cascades intracellulaires (Kazlauskas, 1994). Elles sont la clé de la réussite d'une grande majorité de cascades (Meeting review, 1995). Ces protéines n'ont pas de rôle direct dans le développement car elles ne reçoivent pas le signal primaire. Cependant, il est bien connu que ces protéines sont impliquées

dans les cascades des récepteurs présentés précédemment. Donc il est vrai de penser que toutes les protéines qui sont impliquées dans la cascade d'un récepteur exprimé lors du développement participe, elles aussi, dans ce développement embryonnaire. De bons exemples, sont les protéines c-src, Fyn et Yes (Stein *et al.*, 1994). Ces trois protéines ont une activité tyrosine kinase et sont toutes trois largement exprimées dans l'embryon. La création de mutants a permis de conclure qu'elles sont indispensables pour un bon développement. La combinaison de leurs mutations est létale. Individuellement, les mutations de c-src et Yes ne semblent pas avoir d'effet tandis que la mutation de Fyn provoque des malformations de certaines régions du cerveau. Ceci s'explique par le fait que les protéines non-mutées de la même famille peuvent compenser pour les protéines perdues (Stein *et al.*, 1994).

### ***Sik***

Une nouvelle protéine tyrosine kinase cytoplasmique, *sik*, a récemment été identifiée par le groupe de Vasioukhin *et al.* (1995). Les résultats qu'ils ont obtenus démontrent une expression dans les zones qui bordent immédiatement les zones de prolifération de la peau et du tube digestif (estomac et intestin). La première expression est détectée dans la peau vers le jour 15.5 de la gestation ce qui correspond au moment de la différenciation de la peau (Vasioukhin *et al.*, 1995). La restriction du patron d'expression de *sik* dans des cellules épithéliales qui ont entamées leur processus de différenciation terminale suggèrent que *sik* peut jouer un rôle spécifique dans la régulation de certains aspect de ce processus.

### **Sak**

Le groupe de Fode *et al.* (1994) ont isolé une nouvelle protéine sérine/thréonine kinase cytoplasmique désignée Sak. Leurs résultats suggèrent une implication de la protéine Sak dans les mécanismes de prolifération de certaines populations de cellules. Leurs résultats montrent



un patron d'expression chez l'embryon dans les compartiments cellulaires où il y a une forte activité mitotique tel que les cellules de la crypte de Lieberkühn de l'intestin, ainsi que dans la région de prolifération du cerveau embryonnaire (Fode *et al.*, 1994). Cette protéine est un bon exemple de protéine kinase impliquée dans un processus biologique important lors du développement embryonnaire, la prolifération cellulaire.

## **PRÉSENTATION DU PROJET DE RECHERCHE**

L'objectif du programme de recherche de notre laboratoire est de définir le rôle biologique des protéines kinases dans la prolifération et la différenciation des tissus épithéliaux. Ceci revêt une grande importance, car on sait que 90% des cancers sont des carcinomes originant d'une prolifération anarchique des cellules épithéliales. Le modèle expérimental utilisé initialement à mon arrivée était celui du pancréas de souris embryonnaire. Ce système offre plusieurs avantages pour l'étude du développement des épithéliums, car il est possible d'induire la différenciation autant morphologique que biochimique de l'organe *in vitro*. On sait aussi que le pancréas nécessite une interaction épithélio-mésenchymateuse pour se différencier (Golosow et Grobstein, 1962). Grobstein (1964) a aussi mis en évidence que cette interaction peut se produire sans contact direct entre les cellules prouvant qu'un facteur soluble induit la différenciation. On sait que les facteurs qui induisent la prolifération et la différenciation sont généralement des facteurs de croissance qui se fixent aux cellules via des récepteurs qui ont une activité kinase intrinsèque (Wilks, 1993). Ceci indique que les protéines kinases sont impliquées dans la croissance et la différenciation du tissu épithélial au cours de l'embryogénèse.

Pour initier cette étude, la recherche de nouveaux gènes codant pour des protéines kinases a été réalisée. Récemment, plusieurs gènes de protéines kinases ont été découverts en utilisant une procédure de clonage basée sur l'utilisation de la technique de polymérisation en cascade (PCR) avec un mélange d'oligonucléotides dégénérés (PTK1, PTK2; Wilks, 1989) correspondant aux séquences hautement conservées du domaine catalytique des protéines kinases. Dans un même

but, nous avons donc utilisé cette technique de PCR sur un extrait d'ARN de pancréas embryonnaire. Cette approche a permis de cloner une nouvelle protéine kinase chez la souris. L'analyse de la séquence du gène de la protéine a permis d'établir que la séquence clonée était l'homologue murin de la nouvelle protéine kinase humaine, ZPK (Reddy et Pleasure, 1994). Reddy et Pleasure (1994) ont déterminé que ZPK est une protéine sérine/thréonine kinase cytoplasmique de 859 acides aminés. De plus, elle a la particularité de contenir dans sa portion carboxy-terminale un domaine qui contient deux motifs de dimérisation de type leucine zipper. Ils ont aussi déterminé que l'ARNm de ZPK est exprimé dans le cerveau, les reins, les muscles ainsi que dans les poumons (Reddy et Pleasure, 1994).

### **ZPK murin**

L'ADNc de ZPK murin (Figure 3) code pour une protéine de 888 acides aminés avec un poids moléculaire de 95 957 daltons et un point isoélectrique de 6,05. On remarque que ZPK murin est constituée de plus d'acides aminés que son homologue humain. Ceci est dû au fait que l'on retrouve dans la portion amino-terminale de ZPK murin une séquence d'acides aminés supplémentaire que l'on ne retrouve pas chez son homologue humain. Cependant, on ne peut actuellement attribuer de fonction particulière à cet insert. ZPK murin a aussi la particularité de contenir, dans sa portion carboxy-terminale, un domaine qui contient deux motifs de dimérisation de type leucine zipper similaire à ceux rencontrés dans les facteurs de transcription. ZPK contient aussi des domaines riches en résidus hydrophobes glycine (G), sérine (S) et proline (P) (Figure 4). La comparaison de la séquence en acides aminés de ZPK avec d'autres protéines kinases révèle une forte homologie avec les membres de la famille des MLK (mixed lineage kinase). Tous les membres de cette famille contiennent un domaine avec deux motifs leucine zipper. Il y a actuellement trois membres dans cette famille; *Mlk1* (Dorow *et al.*, 1993), *Mlk2/MST* (Dorow *et al.*, 1993 ; Katoh *et al.*, 1995), *Mlk3/SPRK/PTK1* (Ing *et al.*, 1994 ; Gallo *et al.*, 1994 ; Ezeo *et al.*, 1994). Avec cette homologie, ZPK est peut-être le quatrième membre de cette famille. La protéine ZPK murine partage 95% d'homologie avec son homologue

gacagcagggcccgctgctcagcacacctggctccagagcc 41

atggcctgctccatgaaacccgaacacctccccttcccttgggggctttgctctactcctaaagtgggcttctatcgaaacgtggatccagacacttcagactgcaaccccgagaaa 161  
M A C L H E T R T P S P S F G G F A S T L S E A S M R N V D P D T S D C T P E K 40

gacctgaogcccaaccaatgtgtacttcgagatgttgctcctcgttggcagggaggagggagcccccaggtggagagcctccccagagcctttgccaatagtgtc 281  
D L T P T Q C V L R D V V P L G G Q G G G P S P S P G G E P P P E P F A N S V 80

ctccagctacatgagcaggtacaggtggggcaggggagccactgggtcacctgagagtcagagatcagagttcgagctgatgaggtacgtctgacgtgcccagagtgccagtgcttc 401  
L Q L H E Q D T G G P G G A T G S P E S R A S R V R A D E V R L Q C Q S G S G F 120

cttgaaggtcttttggctgctgcccctgtctggacaatgattggcaaacctactccacagaacacaagcaggaagaccttgggaagctccccttggagaaatcctggac 521  
L E G L F G C L R P V W T M I G K A Y S T E H K Q Q Q E D L W E V P F E E I L D 160

ctgcagtggttagctcagggctcagggctgttttccgggagccttccacggggagggaggtagctgtgaagaaggttcgagatcacaagagactgacatcaagcatcttcgaaag 641  
L Q W V G S G A Q G A V F L G R F H G E E V A V K K V R D L K E T D I K H L R K 200

ctgaagcaccaccaatcatcacttcaaggggtttgcaacagggccccctgctactgcatcctatggaattctgogctcaagacagctatagaggtgctcagagccggccgct 761  
L K H P N I I T F K G V C T T Q A P C Y C I L M E F C A Q G Q L Y E V L R A G R P 240

gtcaccocctccttctgctggtgactgggtccatgggcatgctggtggcatgaattacctgcaactgcacaagatataccacagagacctaagtcaccaacatgtaacacatagac 881  
V T P S L L V D W S M G I A G G M N Y L H L H K I I H R D L K S P N M L I T Y D 280

gatgtgggaagatcagatcttggcacttccaaggagctgagtgacaagagcacaagaagctccttgcaggaacagtagcctgagtgctcagaatgcaacccctgtg 1001  
D V V K I S D F G T S K E L S D K S T K M S F A G T V A W M A P E V I R N E P V 320

ctgagaaggtgacatctggtccttgggggtgctatgggaactactgactggagagattccctacaaagatgtagattcctcagccatcatctgggggtgggaagcaacagctc 1121  
L K H P N I I T F K G V C T T Q A P C Y C I L M E F C A Q G Q L Y E V L R A G R P 360

ccctgctgtaacctccagctgcccagatgttttaaaatctacttcgacagtgctgggaacagaacaaagaaatccgccatcctccagagatcttctgcaactggacatccgc 1241  
H L P V P S S C P D G F K I L L R Q C W N T K P R N R P S F R Q I L L H L D I A 400

ctcgtgatgtctctacaccccagggacttactttagtccagggcaggtggcgaagaagtaaaactgcaacttggaaagattagtcagaagggagcctgtctgcaaccccta 1361  
S A D V L S T P Q E T Y F K S Q A E W R E E V K L H F E K I K S E G T C L H R L 440

gaagaggaactggtgatgctgggagaagggagagctcagacatgcccctggacatcagggagcactatgaacgaagttggagagagcaacaacctgtacatggaactgaatgccctcatg 1481  
E E E L V M R E L R H A L D I R E H Y E R K L E R A N N L Y M E L N A L M 480

ctgcaactagaactcaagagaggaatgtcgaagcagagagggctttgaaagggcgtctcctgctactaaagtacacacctctcggggcctcctcagggagacactatggag 1601  
L Q L E L K E R E L L R R D E A L E R C P G L L K S H P S R G L L H G D T M E 520

aaactcacaagaaaggaactgcccacagaactgtcggccacagcaaaagccagatattctcaagacagagctcgttctacctaactagatgagcctcaagtggggtgggctt 1721  
K L I K K R N V P Q K L S P H S K R P D I L K T E S L L P K L D A A L S G V G L 560

ctgggtgctcaagggccccctcactggaagggagctggcgtggcaagaccctcaccgaagggcagtgcaagggcagctgtggagacctgctgggctctgctgagctttgcca 1841  
P G C P K G P P S P G R S R R G K T R H R K A S A K G S C G D L P G L R A A L P 600

ccccatgagctggaggactggaagcccaggggcttaggagtggtgctcagctgggagcttgcacctcctcctggaactccacatgaccttactccgaaagatgca 1961  
P H E P D G L G S F G V L G V G P S A W D A C P P A L R G L H H D L L L R K M S 640

tcacatccccagacctgctatcagcagcgtgggagccgagggcagctacaggggagctcgggctcgggctcaccacctccacccagggcactcctcacaagtgagggga 2081  
S S S P D L L S A A L G A R G R G A T G G A R D P G S P P P P Q G D T P P S E G 680

tcagctcctggttccaccagcccagattcgcctgggggagctaaaggggaaccccctccaccagtagggcctggagaaggtgtgggctgctgggaactggaagggagggactgagcc 2201  
S A P G S T S P D S P G G A K G E P P P P V G P G E G V G L L G T G R E G T A G 720

cggggagaaacccggctgggtcccagcacttgaccccctgctgctgtacagggctgctgactcgaagtcagaacgtggtatctcatggaagaagaagagagaggtgagc 2321  
R G G N R A G R S Q H L T P A A L D I R E H Y E R K L E R A N N L Y M E L N A L M 760

agtgaagtagactacccccaaagtcaaaaggtgctcagggcccgaaacatgctcagtcactatctacattcagctcagagaacccatcagatgtggaagggaggtacagctagtgacct 2441  
S E V E L P P S Q R W P Q G P N M R Q S L S T F S S E N P S D V E G G T A S E P 800

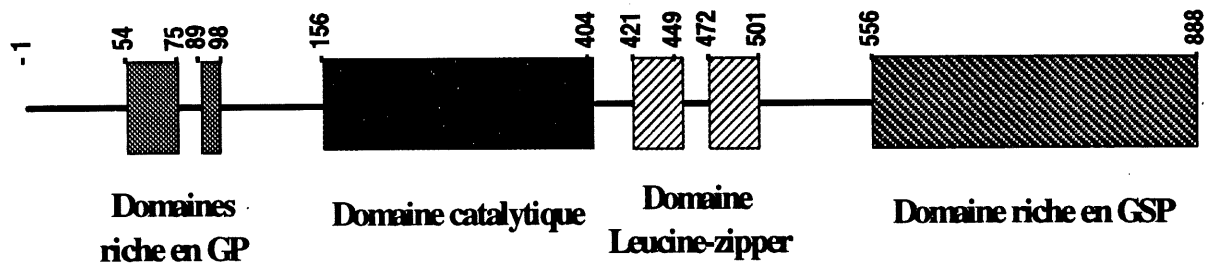
tccccagtgccacaccagaagtggcagtagcaacactgatgagcggccagatgaacgatctgatgacatgctcacagggctcagaatccactggacctacctctcagaggtg 2561  
P S G T P E V G S T N T D E R P D E R S D D M C S Q G S E I P L D L P T S E V 840

gtcctgaaactgaaagcagctccttgcctatgcaacaccaggtgcccagggcccaactcctgaagactcagactgtgacagcactgaattggaacaactcaacagcattgatgcttg 2681  
V P E R E A S S L P M Q H Q D G Q G P N P E D S D C D S T E L D N S N S I D A L 880

cgccccagctccttccatgcaaaagcactcttattcctgtacatagagaatatttatataataatataatgcccacataatcaacagatagatggggctttcttagcct 2801  
R P P A S L P P \* 888

taagcaggtctgaggtgaaacagcggccccctgaccaattaccgaataagttctggggcactggcagctgtggaatgaatgactccagtagctataaagaaaggaag 2921  
ctggccccctctgctccaccatctctatgttgaacaagcaagtaggcaatagaaagccagggcttctctctactgtctatccctgaaacactggaggggaggtgagaggtcac 3041  
ttaaactgcaacttttttctcgtttactgtttacacatcttgcacttgggaggggaaactaagggctgggtcatcctctgaggttctcaggtggcaatgttaactcaattcttctgt 3161  
tccctgtctcggccaaacccctggcttggccagacgactaacagatgctgctcaggtcgaagaactgggtgctgttagtccccactgttattctgtgctggttaggggtgg 3281  
ggactgcatattgtaacctgtgaacaacctggaatataaccactccatgagggccaactgtgaggggtttctgtggaatgagtagagtggtataacatggttccaacttgg 3401  
attaagattttatctgagaaaaaa 3427

**Figure 3. Séquence en nucléotides et en acides aminés de l'ADNc de ZPK murin. La position du codon stop est indiquée par un astérisque (\*). Les acides aminés sont indiqués par la convention d'identification à une lettre (voir annexe) (Blouin *et al.*, 1996).**



**Figure 4.** Représentation schématique de la structure primaire de ZPK murin. Les chiffres indiquent la position relative des domaines. G : Glycine, S : Sérine, P : Proline

humain (Figure 5) (Blouin *et al.*, 1996). Récemment, le groupe de Hirai *et al.* ont cloné l'homologue de ZPK chez le rat. Cette protéine, MUK, partage 99% d'homologie avec son homologue murin. Sur une base comparative, l'analyse des séquences de ZPK des différentes espèces indique que ZPK a été très conservée au cours de l'évolution.

Suite à la découverte de la protéine kinase ZPK chez la souris, nous avons axé nos travaux de recherche sur l'étude de la fonction de cette nouvelle protéine kinase qui possèdent des particularités structurales intéressantes. Comme approche expérimentale pour tenter d'apporter des éclaircissements sur la fonction potentielle de ZPK murin, nous avons déterminé la localisation cellulaire de l'ARNm de la protéine ZPK dans une très grande variété de tissus adultes par hybridation *in situ*. Les résultats ont permis de déterminer que ZPK est exprimé dans l'hippocampe et le cortex cérébral, dans les cellules de Purkinje du cervelet, dans l'épithélium stratifié et les glandes gastriques de l'estomac, dans les cellules épithéliales des villosités intestinales, dans les cellules acineuses du pancréas ainsi que dans les spermatozoïdes des testicules (Blouin *et al.*, 1996). Ainsi, le patron d'expression de ZPK dans les tissus adultes se limite exclusivement à des populations de cellules différenciées ou en voie de différenciation terminale.

Sur la base de ces observations, nous avons donc émis l'hypothèse que ZPK pourrait exercer un rôle potentiel dans le développement, la fonction et la maintenance de certaines populations de cellules spécialisées. Pour nous permettre d'approfondir davantage cet aspect, on s'est donné comme objectif d'analyser le patron de la localisation de l'expression de l'ARNm de ZPK dans l'embryon de souris au cours de son développement afin de vérifier sa participation dans les processus qui ont cours lors du développement embryonnaire. Pour se faire, nous allons analyser le patron de la localisation cellulaire des ARNm de ZPK, par hybridation *in situ* sur des embryons de souris entre les jours 11.5 et 17.5 de la période de gestation. On a choisi ces temps de gestation car c'est dans cette période que survient le plus grand nombre d'événements morphogénétiques au cours du développement embryonnaire de la souris. L'hybridation *in situ*

```

souris 1 MACLHETRTTPSPSPGGFASTLSEASMRNVDPTSDCTPEKDLTPQCCLRDRVPLGGQGG 60
humain 1 MACLHETRTTPSPSPGGFVSTLSEASMRKLDPTSDCTPEKDLTPH..... 46

souris 61 GGPSPPSGGEPPEPFANSVLQLEODTGGPGGATGSPESRASRVRADEVRLQCQSGSGF 120
humain 47 .....VLQLEODAGGPGGAAGSPESRASRVRADEVRLQCQSGSGF 87

souris 121 LEGLFGCLRVPWVTMIGKAYSTEHKQQEDLWEVPEEILDLOWVSGAOGAVFLGRFHGE 180
humain 88 LEGLFGCLRVPWVTMIGKAYSTEHKQQEDLWEVPEEILDLOWVSGAOGAVFLGRFHGE 147
I

souris 181 EVAVKKVRDLKETDIKHLRKLKHPNIIITFKGVCTQAPCYCILMEFCAQQOLYEVLRAGRP 240
humain 148 EVAVKKVRDLKETDIKHLRKLKHPNIIITFKGVCTQAPCYCILMEFCAQQOLYEVLRAGRP 207
II III IV V

souris 241 VTPSLLVDWSMGIAGGMNYLHLHKIHRDLKSPNMLITYDDVVKISDFGTSKELSDKSTK 300
humain 208 VTPSLLVDWSMGIAGGMNYLHLHKIHRDLKSPNMLITYDDVVKISDFGTSKELSDKSTK 267
VIA VIB VII

souris 301 MSFAGTVAWMAPEVIRNEPVSEKVDIWSFGVVLWELLTGEIPIYKDVDSAIIWGVGNSL 360
humain 268 MSFAGTVAWMAPEVIRNEPVSEKVDIWSFGVVLWELLTGEIPIYKDVDSAIIWGVGNSL 327
VIII IX X

souris 361 HLPVPSSCPDGFKILLRQCWNTPRNRPSFRQILLHLDIASADVLSTPOETYFKSQAERW 420
humain 328 HLPVPSSCPDGFKILLRQCWNTPRNRPSFRQILLHLDIASADVLSTPOETYFKSQAERW 387
XI

souris 421 EEVKLHFEKIKSEGTCLHRLEELVMRRREELRHALDIREHYERKLERANNLYMELNALM 480
humain 388 EEVKLHFEKIKSEGTCLHRLEELVMRRREELRHALDIREHYERKLERANNLYMELNALM 447

souris 481 LQLELKERELLRREALEERRCPGLLKSHPSRGLLHGDTMEKLIKKRNVPQKLSPHSKRPD 540
humain 448 LQLELKERELLRREALEERRCPGLLKSHPSRGLLHGDTMEKLIKKRNVPQKLSPHSQRPD 507

souris 541 ILKTESLLPKLDAALSGVGLPGCPKPPSPGRSRRGKTRHRKASAKGSCGDLPGLRRAALP 600
humain 508 ILKAESLLPKLDAALSGVGLPGCPKAPPSPGRSRRGKTRHRKASAKGSCGDLPGLRRTAVP 567

souris 601 PHEPGGLSGPGLGVGPSAWDACPPALRGLHHDLLLRKMSSSPDLLSAALGARGRGATG 660
humain 568 PHEPGPGSPGGLGGGPSAWEACPPALRGLHHDLLLRKMSSSPDLLSAALGSRGRGATG 627

souris 661 GARDPGSPPPPQGDTPPSEGSAPGSTSPDPSGGAKGEPPIPVGPGEGVLLGTGREGTAG 720
humain 628 GAGDPGSPPPARGDTPPSEGSPPGSTSPDPSGGAKGEPPIPVGPGEGVLLGTGREGTSG 687

souris 721 RGGNRAGSQHLTPAALLYRAAVTRSQKRGISSEEEEEGEVDSEVELPPSQRWPQGNMRQS 780
humain 688 RGGSRAGSQHLTPAALLYRAAVTRSQKRGISSEEEEEGEVDSEVELTSSQRWPQSLNMRQS 747

souris 781 LSTFSSENPSDVEGGTASEPSPSGTPEVGSINTDERPDRSDDMCQSGSEIPLDLPTSEV 840
humain 748 LSTFSSENPSDVEGGTASEPSPSGTPEVGSINTDERPDRSDDMCQSGSEIPLDPPPSEV 807

souris 841 VPEREASSLPMQHQ...DGQGNPEDSDCDSTELDNSNSIDALRPPASLPP 888
humain 808 IPGPEPSSLFIHQELLRERGPPNSEDSDCDSTELDNSNSVDALRPPASLPP 859

```

**Figure 5. Comparaison de la séquence en acides aminés de ZPK murin et ZPK humain.** Les résidus identiques sont identifiés par une ligne verticale. Les sous-domaines I-XI des protéines kinases sont indiqués. Les deux domaines leucine-zipper sont soulignés avec, en gras, les acides aminés responsables des interactions (Blouin *et al.*, 1996).

a été retenue pour sa grande fiabilité et pour la grande précision des résultats qu'elle permet d'obtenir. Ce projet de recherche est important car il va permettre d'améliorer nos connaissances sur l'implication des protéines kinases dans les mécanismes de contrôle de la prolifération et de la différenciation cellulaire.

## CHAPITRE 1

### MATÉRIEL ET MÉTHODES

#### 1.1 Embryons de souris

Les embryons de souris ont été prélevés aux jours 11.5, 13.5, 15.5 et 17.5 de la période de gestation. Les embryons sont le résultat d'un croisement  $F_1$  entre des souris CD-1 (Charles River, St-Constant, Québec, Canada). Le jour où l'on observe un bouchon vaginal chez la femelle est considéré comme le jour 0.5. Les embryons sont fixés 16 hres à 4°C dans 4% paraformaldéhyde/0,1M cacodylate de sodium et 0,1M de tampon sodium phosphate (PBS). Les embryons fixés sont ensuite déshydratés dans des concentrations à teneur d'éthanol croissante et enrobés dans de la paraffine.

#### 1.2 Synthèse des ribosondes

Les ribosondes sont obtenues à partir du plasmide linéarisé pBluescript KS+ (Stratagene, La Jolla, CA) qui contient un fragment de 192 paires de bases (correspondant aux nucléotides 837 à 1028) de l'ADNc de ZPK. Les sondes antisens et sens sont obtenues en utilisant l'ARN polymérase T3 et T7 (Pharmacia) respectivement. La réaction de transcription se fait en présence d'UTP marqué à la digoxigénine [digoxigénin-11-UTP, (Boehringer Mannheim, Laval, Québec, Canada)]. Pour réaliser la réaction de transcription, on utilise 1 µg d'ADN linéarisé, 2 µl de mélange de marquage des sondes (10 mM ATP, 10 mM CTP, 10 mM GTP, 6.5 mM UTP et 3,5 mM DIG-UTP). Ensuite, on ajoute 2 µl de tampon de transcription 10X [400 mM Tris-HCl pH 8.0, 60 mM  $MgCl_2$ , 100mM Dithiothreitol (DTT), 20 mM spermidine, 100 mM NaCl et 1 U/µl d'inhibiteur de ARNase (RNA guard, Pharmacia)]. Le volume est complété à 18 µl et l'ARN polymérase est ajoutée (40 U).



### 1.3 Hybridation *in situ*

Utiliser uniquement du matériel stérile pour éviter les contaminations avec les ARNases.

Toutes les solutions utilisées doivent obligatoirement être traitées avec 0,1% de diéthylpyrocarbonate (DEPC) ou préparées directement avec de l'eau- 0,1% DEPC. Le DEPC est un agent inhibiteur des ARNases.

#### 1.3.1 Prétraitement des lames

Les coupes de tissus enrobés dans la paraffine sont d'une épaisseur de 4 µm et sont montées sur des lames polyionisées (Superfrost Plus, Fisher, Montréal, Québec, Canada). Les coupes sont déparaffinées avec du xylène (3X 2 min et 1X 2 min 50% xylène-50% éthanol) et les tissus sont ensuite réhydratés dans des bains à teneur décroissante en éthanol (EtOH)(3X 2 min 100% EtOH, 1X 2 min 90% EtOH, 1X 2 min 70% EtOH et 1X 2 min 50% EtOH) jusqu'au PBS (8 g/L de NaCl, 0,2 g/L de KCl, 1,44 g/L de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,24 g/L de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>). Les coupes traitées 10 min dans l'HCl 0,2N à température de la pièce, sont lavées deux fois 2 min dans le PBS avant d'être immergées dans 0,3% Triton X-100/PBS pour 15 min. Après deux lavages de 2 min, les coupes sont traitées 5 min dans 20 % d'acide acétique à 4°C pour réduire les réactions non-spécifiques (phosphatases alcalines endogènes). Les coupes sont lavées deux fois 2 min dans le PBS pour ensuite être traitées à la protéinase K (2 µg/ml dans 0,1M Tris-HCl pH 8.0, 50 mM EDTA pH 8.0) pour 30 min à 37°C. Ce traitement est suivi par deux lavages de 2 min dans le PBS. Les coupes sont ensuite traitées à la paraformaldéhyde 4% (8 g de paraformaldéhyde, 200 ml de PBS, 80 µl de NaOH 10N, chauffée à 55°C, refroidie, ajustée à pH 7.0, filtrée et placée à 4°C) pour 10 min. Suite à deux lavages de 2 min, les coupes sont plongées dans un bain de glycine 0,2%/PBS pour une période de 10 min. Les coupes sont lavées deux fois 2 min dans le PBS pour ensuite être acétylées 15 min avec de la triéthanolamine (2,4 ml de triéthanolamine dans 160 ml d'eau, ajuster le pH à 7.5 et compléter à 200 ml. À la dernière minute, ajouter 500

µl d'anhydride acétique). Ce traitement est suivi d'un dernier lavage de 2 min dans le PBS.

### 1.3.2 Hybridation

Les coupes sont ensuite préhybridées avec 5X SSC (20X SSC : 3 M NaCl, 0,3 M citrate de sodium), 5X solution de Denhardt [50X Denhardt : 10 g/L de Ficoll (type 400), 10 g/L de polyvinylpyrrolidone, 10 g/L de BSA (fraction V)], 50% formamide, 250 µg/ml ARN-t, 250 µg/ml ADN de sperme de saumon dénaturé, et 4 mM EDTA à 42°C pour 3 h. Les coupes sont hybridées toute la nuit dans la même solution sans ADN de sperme de saumon à 42°C en présence soit d'une ribosonde antisens ou d'une ribosonde sens à une concentration de 10 ng/µl.

### 1.3.3 Lavages et détection

Suite à l'hybridation, les coupes sont lavées une fois dans 2X SSC pour 15 min à la température de la pièce, incubées 10 min dans 2X SSC avec ARNase A (1 µg/ml) à la température de la pièce, lavées deux fois 15 min dans 2X SSC à la température de la pièce et finalement lavées deux fois 15 min dans le 1X SSC 37°C. Les coupes sont ensuite plongées 1 min dans un bain de Tris-HCl 0,1 M pH 7.9 avec 150 mM NaCl (Tris 7.9), pour ensuite être bloquées pour 60 min à la température de la pièce dans 0,5% d'agent bloquant (Blocking reagent, Boehringer Mannheim, Laval, Québec, Canada)/Tris 7.9. Les coupes sont lavées une fois 1 min dans le tampon Tris 7.9. Ensuite, les coupes sont incubées pour une période de 2 h avec un anticorps antidigoxigénine couplé à la phosphatase alcaline (1:500). Suite à l'incubation, les coupes sont lavées trois fois 15 min dans le tampon Tris 7.9. Le dernier lavage est de 10 min dans 0,1 M Tris-HCl pH 9.5 avec 0,1 M NaCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub> et 1 mM levamisole (Tris 9.5). Après les lavages, on visualise les résultats avec une réaction chromogénique de phosphatase alcaline avec le "nitroblue tetrazolium chloride" (NBT) et le "5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate" (X-Phosphate) comme substrat (Boehringer Mannheim, Laval, Québec, Canada). On laisse réagir jusqu'à l'obtention d'un marquage satisfaisant. Les réactions sont arrêtées en plongeant les

coupes deux fois 5 min dans 0,1 M Tris pH 8.0/ 2,5 mM EDTA. Les coupes sont ensuite contre-colorées 2 min avec l'hématoxyline de Mayer's (Sigma) et montées avec une solution de 90% glycérol/PBS et 0,1% azide de sodium. Les photographies sont prises sur film T-MAX 100 à l'aide d'un photomicroscope Zeiss.

## CHAPITRE 2

### RÉSULTATS

#### 2.1 Développement embryonnaire de la souris.

Comme on le sait, les organismes multicellulaires se forment relativement lentement par un processus de changements progressifs que l'on appelle développement. La souris (*Mus musculus*) n'échappe pas à cette définition. La période de gestation de la souris est de 19 jours (21 jours dans certains cas) ce qui en fait le mammifère idéal pour étudier le développement à cause de sa courte période de gestation. Dans les premières heures après la fertilisation, l'oeuf fécondé se divise (clivage) pour atteindre le stade morula (32 cellules) et former ensuite le blastocyste. Au jour 6, l'implantation du blastocyste est complète et c'est à ce moment que débute la gastrulation. La gastrulation est le processus de migration des cellules qui va orienter les différents feuillet cellulaires à leur place respective pour assurer un bon développement. Ensuite, vers le jour 7.5 - 8, il y a formation du tube neural (neurulation). C'est le premier système à se former. Lors de la gastrulation, le feuillet endodermique pénètre à l'intérieur du feuillet ectodermique pour former le tube digestif primitif. À partir du jour 8, on parle d'organogénèse. Les somites se différencient. On assiste aux bourgeonnements du tube digestif qui vont donner naissance aux poumons, à l'estomac, au foie et au pancréas. Le foie se forme au jour 9, les poumons au jour 9.5, l'estomac et l'intestin au jour 10 et le pancréas au jour 11. Au jour 11, le métanéphros est dans ses premiers stades de formation. Au jour 13, on assiste à la céphalisation la plus forte (différenciation du cerveau) et à la formation des ganglions spinaux. Au jour 14, les reins (métanéphros) commencent à être fonctionnels et il y a formation des villosités intestinales. Au jour 15, il y a la formation du *stratum granulosum* de la peau donc différenciation de la peau et le développement des follicules pileux. À ce stade, on assiste aussi à la cytodifférenciation du pancréas. Pendant les jours qui suivent, le foetus complète sa formation.

## **2.2 Localisation tissulaire de l'ARNm de ZPK dans un embryon de souris de 17,5 jours.**

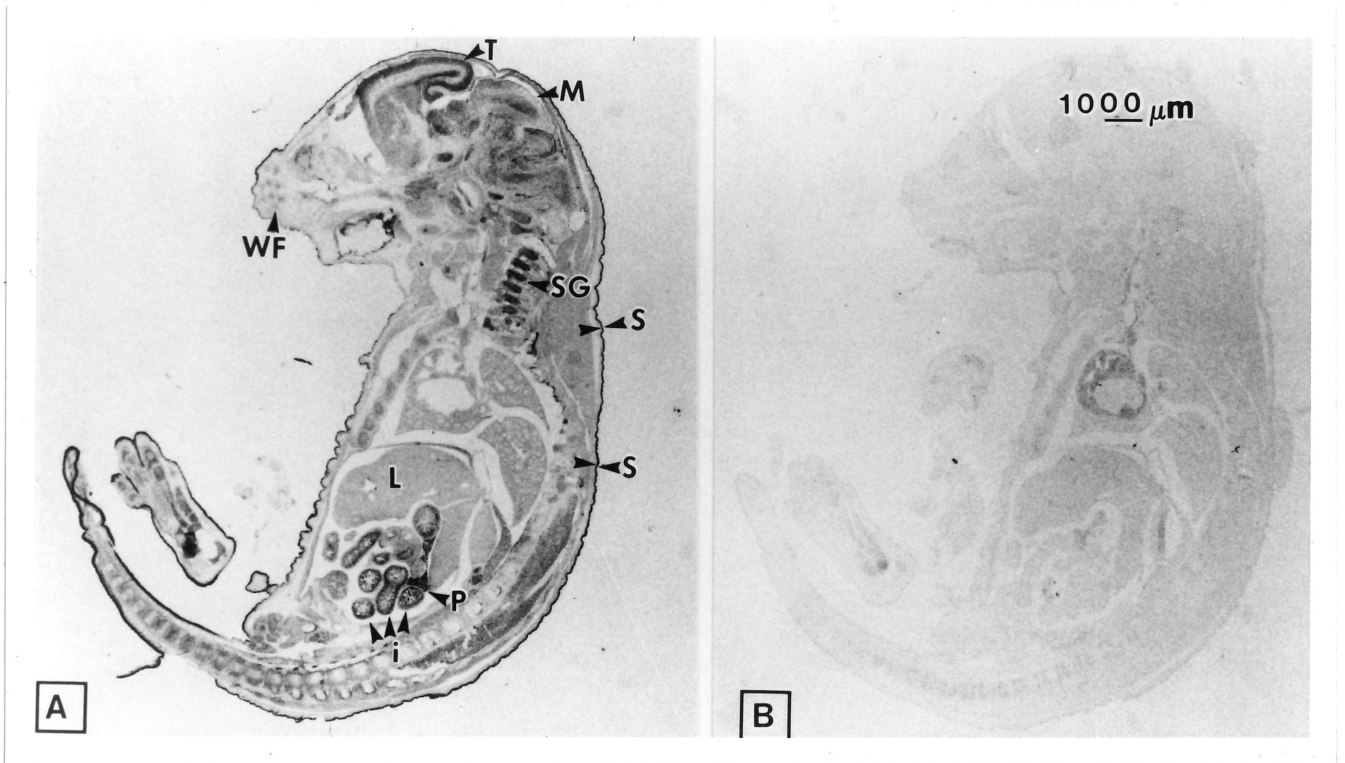
Des coupes du même embryon de souris de 17,5 jours ont été analysées par hybridation *in situ* pour identifier les tissus qui expriment ZPK (Figure 6). À ce stade du développement, les organes sont bien formés et fonctionnels et cela permet de bien identifier les tissus qui présentent une expression du transcrit de ZPK. La figure 6A indique que ZPK est exprimé dans les structures nerveuses, telles le cerveau (télencéphale (T)) et les ganglions spinaux (SG). ZPK est aussi détectée dans la peau (S), les intestins (i), le pancréas (P) et les reins (non-visibles). La figure 6B sert de contrôle négatif et révèle aucun signal non-spécifique.

Dans les points qui suivent, les organes ci-haut mentionnés seront analysés séparément au cours de leur développement respectif. Les expériences ont été réalisées sur des coupes d'embryons de souris à quatre stades de gestation, soit 11.5, 13.5, 15.5 et 17.5 jours.

## **2.3 Expression de ZPK dans le cerveau embryonnaire.**

### **2.3.1 Développement du cerveau embryonnaire.**

Originnaire du feuillet ectodermique, le système nerveux embryonnaire est le premier système à se former. Le système nerveux a une dynamique de formation très intéressante. Au niveau anatomique, le tube neural va former les ventricules et la colonne vertébrale par des divisions cellulaires latérales. Au niveau tissulaire, des populations de cellules de la paroi du tube neural vont se réarranger pour former les différentes régions fonctionnelles du cerveau. Au niveau cellulaire, les cellules neuroépithéliales qui forment la couche de cellules la plus externe du tube neural vont amorcer leur cytodifférenciation pour devenir les différents types de neurones. Cette cytodifférenciation s'effectue de façon ordonnée en partant de la région antérieure qui deviendra le télencéphale. Au début, le tube neural embryonnaire est constitué d'une seule couche de cellules non-différenciées. Au cours du cycle cellulaire de ces cellules, le noyau se déplace.

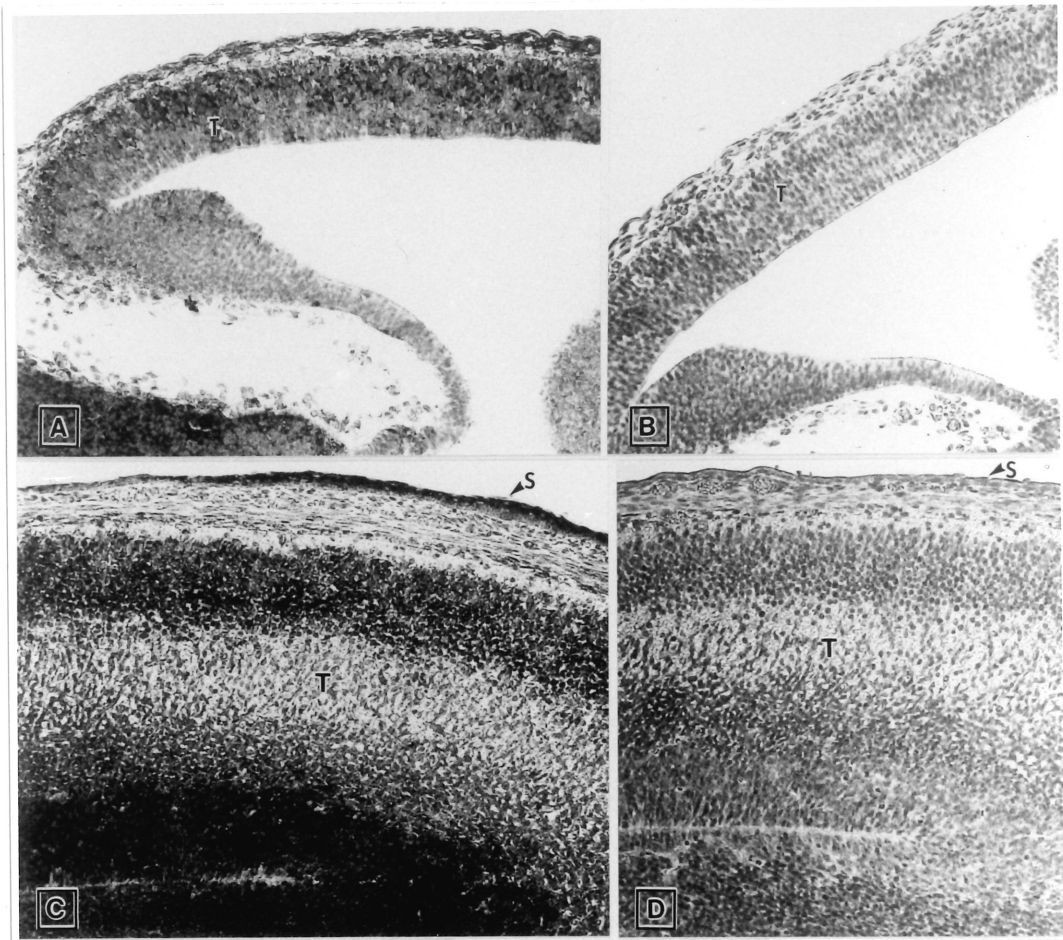


**Figure 6.** Localisation de l'expression de l'ARNm de *ZPK* dans un embryon de souris de 17.5 jours. Des coupes sagittales d'embryons ont été hybridées avec une ribosonde antisens (A) ou sens (B) de l'ARNm de *ZPK* et colorées par une réaction chromogénique de la phosphatase alcaline (voir chapitre 2). Les sites anatomiques identifiés pour fin de légende sont: i, intestin; L, foie; M, mésencéphale; P, pancréas; S, peau; SG, ganglion spinal; T, télencéphale. Grossissement original : x 24

Après un certains temps, c'est la position du noyau qui indique à la cellule son devenir. Ainsi, les cellules dont le noyau est le plus vers l'extérieur, feront partie des cellules neuroépithéliales. Du côté de la lumière du tube, les autres cellules qui bordent la lumière sont germinales, c'est-à-dire qu'elles vont poursuivre leur action mitotique. Ainsi, c'est vers l'intérieur des ventricules que le cerveau va se développer. C'est entre les jours 11 et 13 que les différentes régions du cerveau se différencient. À ce moment, on ne parle plus de tube neural mais bien de cerveau (Gilbert, 1994; Oppenheimer et Lefevre, 1989).

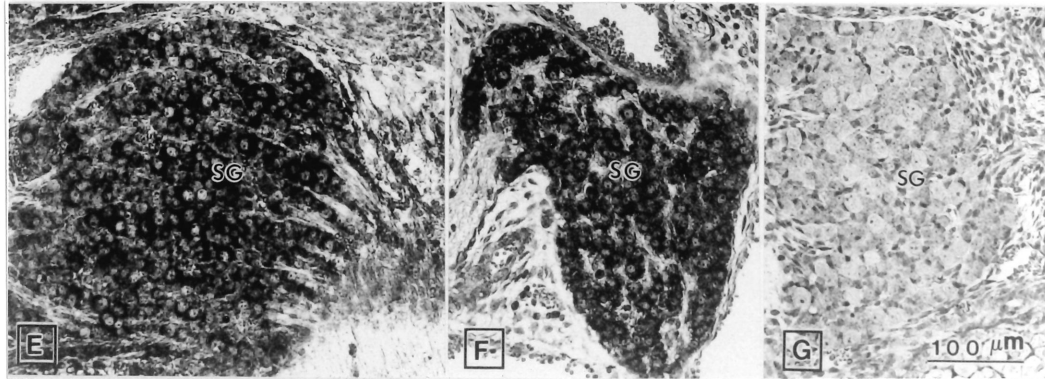
### **2.3.2 Localisation de l'expression de l'ARNm de *ZPK* dans les structures nerveuses embryonnaires.**

L'expression de l'ARNm de *ZPK* est détectée dans plusieurs régions du cerveau embryonnaire. Toutefois, la plus grande partie de l'expression se retrouve au niveau de la couche de cellules neuroépithéliales de la vésicule télencéphalique. La figure 7.1A présente l'expression de *ZPK* dans un cerveau de 11.5 jours. Dans ce cas-ci, l'ARNm de *ZPK* est localisé principalement dans les cellules neuronales qui vont donner naissance au télencéphale. À 15.5 jours (Figure 7.1C), on remarque que le nombre de cellules qui expriment *ZPK* a beaucoup augmenté. De plus, la figure démontre bien que l'expression est régionalisée dans la portion neuroépithéliale (zone marginale) qui est constituée de cellules différenciées. Les figures 7.1B-D sont des contrôles négatifs présentant aucun signal non-spécifique. La figure 7.2E présente les résultats obtenus sur des structures nerveuses que l'on appelle les ganglions spinaux. On remarque qu'à 15.5 jours (Figure 7.2E) et 17.5 jours (Figure 7.2F), l'expression de *ZPK* dans les ganglions spinaux est très forte. Un contrôle négatif a été effectué sur une coupe adjacente de ce même tissu et aucun signal non-spécifique n'a pu être détecté (Figure 7.2G).



**Figure 7.1.** Localisation de l'expression de l'ARNm de *ZPK* dans le cerveau embryonnaire. Pour la légende, voir à la figure 7.2.



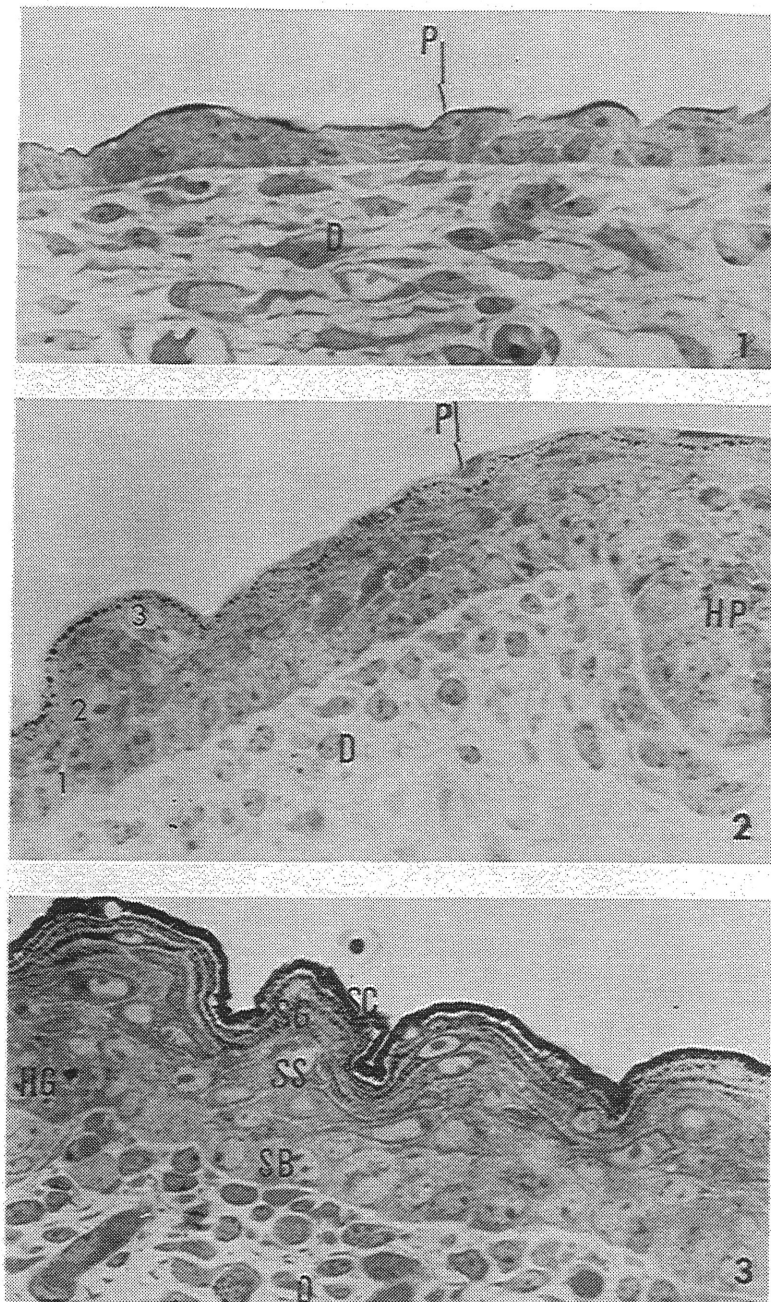


**Figure 7.2. Localisation de l'expression de l'ARNm de ZPK dans les ganglions spinaux.** Les coupes sagittales d'embryons ont été hybridées avec une ribosonde antisens (7.1A-7.1C-7.2E-7.2F) ou sens (7.1B-7.1D-7.2G) de l'ARNm de ZPK. (7.1A) Expression de ZPK dans le cerveau en développement d'un embryon de 11.5 jours. (7.1B) Même que 7.1A sauf qu'une sonde sens a été hybridée à une coupe sériée du même embryon. (7.1C) Expression de ZPK dans le cerveau en développement d'un embryon de 15.5 jours. (7.1D) Même que 7.1C sauf qu'une sonde sens a été hybridée à une coupe sériée du même embryon. (7.2E) Expression de ZPK dans un ganglion spinal d'un embryon de 15.5 jours. (7.2F) Expression de ZPK dans un ganglion spinal d'un embryon de 17.5 jours. (7.2G) Même que 7.2E sauf qu'une sonde sens a été hybridée à une coupe sériée du même embryon. S, peau; SG, ganglion spinal; T, télencéphale. Grossissement original : x 160.

## **2.4 Expression de ZPK dans la peau embryonnaire.**

### **2.4.1 Développement de la peau embryonnaire.**

L'épiderme est un organe qui origine du feuillet ectodermique. La peau embryonnaire à 14 jours (Figure 8) se compose d'une couche de quelques cellules non différenciées qui ont la possibilité de se diviser. Par la suite, le nombre de couche de cellules augmente. À partir de ce moment, on peut identifier les différentes couches de cellules qui s'y retrouvent. À la base de la peau, on trouve le *stratum germinativum* qui représente la couche de cellules basales. Cette couche constitue les cellules souches et non-différenciées de la peau. C'est à partir des divisions cellulaires de cette couche que les couches supérieures de cellules vont se former. Juste au-dessus, on retrouve le *stratum granulosum*. C'est la couche différenciée de la peau qui est complètement formée vers le jour 15 du développement embryonnaire. La différenciation des cellules de la peau correspond au moment où les cellules amorcent l'accumulation de kératines. Elles deviennent ainsi des kératinocytes. Après un certain temps, les cellules ont emmagasiné une grande quantité de kératines ce qui cause une perte importante de cytoplasme et du métabolisme, ce qui les entraînent indubitablement vers leur état de différenciation terminale qui est en fait la mort cellulaire. Les cellules mortes constituent la dernière couche de cellules de la peau, le *stratum corneum* qui est la couche cornée et protectrice de la peau (Fuchs et Byrne, 1994). Un autre fait intéressant, c'est la cytodifférenciation des kératinocytes qui est en corrélation avec l'induction de la transcription des gènes des kératines par les dermamyotomes. Les dermamyotomes correspondent à la portion des somites qui est située du côté de l'épiderme. Ces derniers induisent, par des facteurs solubles, la transcription des gènes des kératines de structure et l'apparition des granules de kératines vers le jour 15 du développement (Fuchs et Byrne, 1994). La figure 8 présente la morphologie de la peau de souris au cours du développement embryonnaire.



**Figure 8.** Microphotographies de coupes de peau d'embryons de souris de 14, 17 et 19 jours de gestation.

1. Coupe de peau d'embryon de 14 jours. 2. Coupe de peau d'embryon de 17 jours. On voit bien les trois couches qui composent la peau. 1. *Stratum germinativum*, 2. *Stratum spinosum* et 3. *Stratum granulosum*. 3. Coupe de peau d'embryon de 19 jours. D, derme; HG, follicule pileux en développement; HP, follicule pileux; P, périderme; SC, *stratum corneum*; SB, *stratum germinativum*; SG, *stratum granulosum*; SS, *stratum spinosum*. Grossissement original : x 650 (Tiré de DuBRUL, 1972)

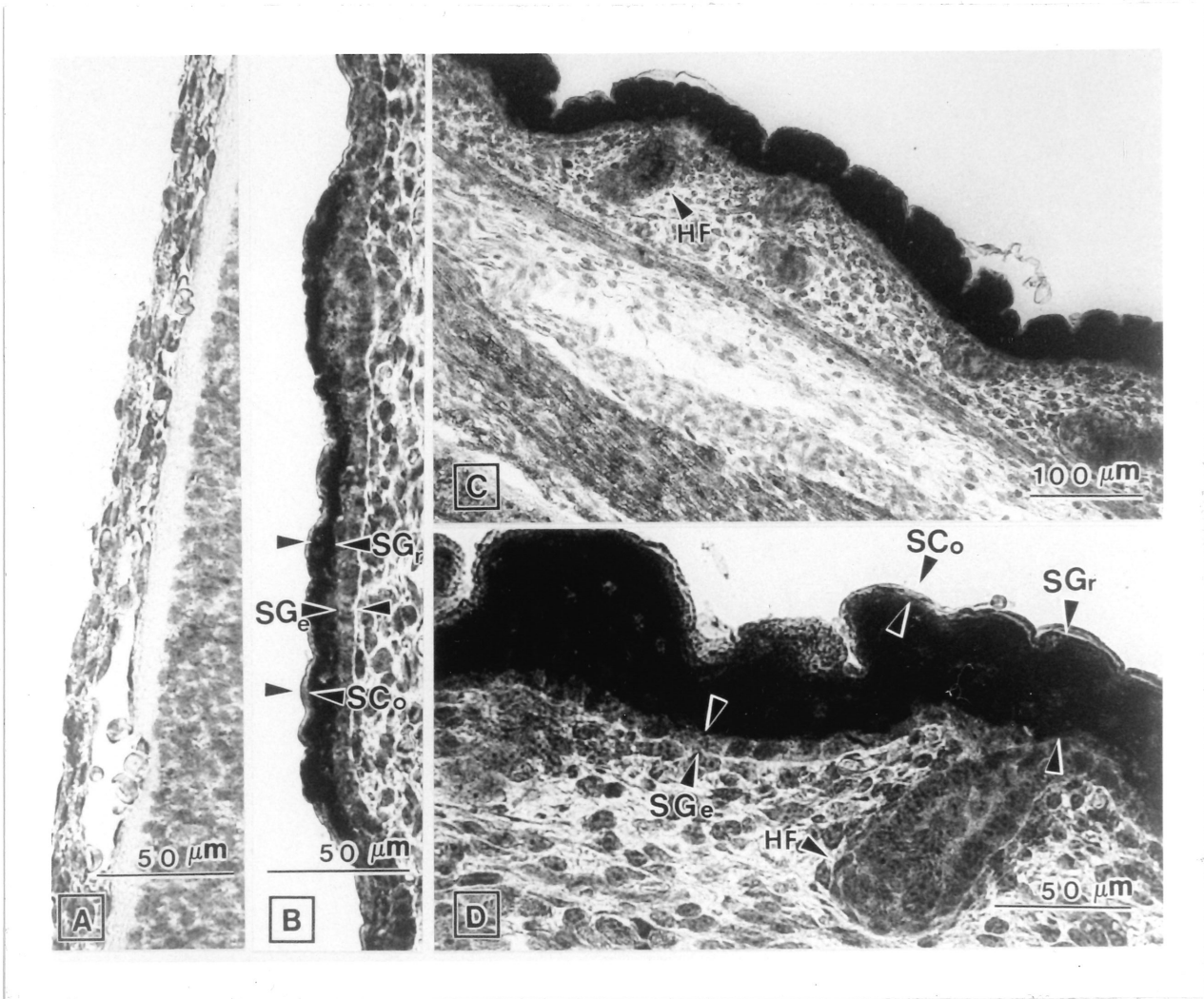
## **2.4.2 Localisation de l'expression de l'ARNm de *ZPK* dans la peau embryonnaire.**

Aucune expression du transcrite de *ZPK* est détectée dans les deux à trois couches de cellules qui constituent l'épiderme non-différencié d'un embryon de 13.5 jours (Figure 9.1A). À 15.5 jours (Figure 9.1B), on observe une expression de *ZPK* de façon ponctuelle dans la peau, tandis qu'à 17.5 jours (Figure 9.1C), on détecte l'expression de *ZPK* de façon continue dans toute la peau. Un agrandissement d'une portion de peau d'embryon de 17.5 jours (Figure 9.1D), nous renseigne sur la localisation précise de l'expression du transcrite de *ZPK*. En fait, *ZPK* est exprimée uniquement dans le *stratum granulosum* qui est la couche de cellules différenciées de la peau. Par opposition, le *stratum germinativum* qui contient les cellules souches de la peau (cellules non-différenciées) exprime en aucun temps le transcrite de *ZPK*. La figure 9.2 présente une coupe de peau d'un embryon de 16 jours. On remarque bien le *stratum granulosum* marqué et le *stratum germinativum*, en bleu, qui n'est pas marqué.

## **2.5 Expression de *ZPK* dans les vibrisses embryonnaires.**

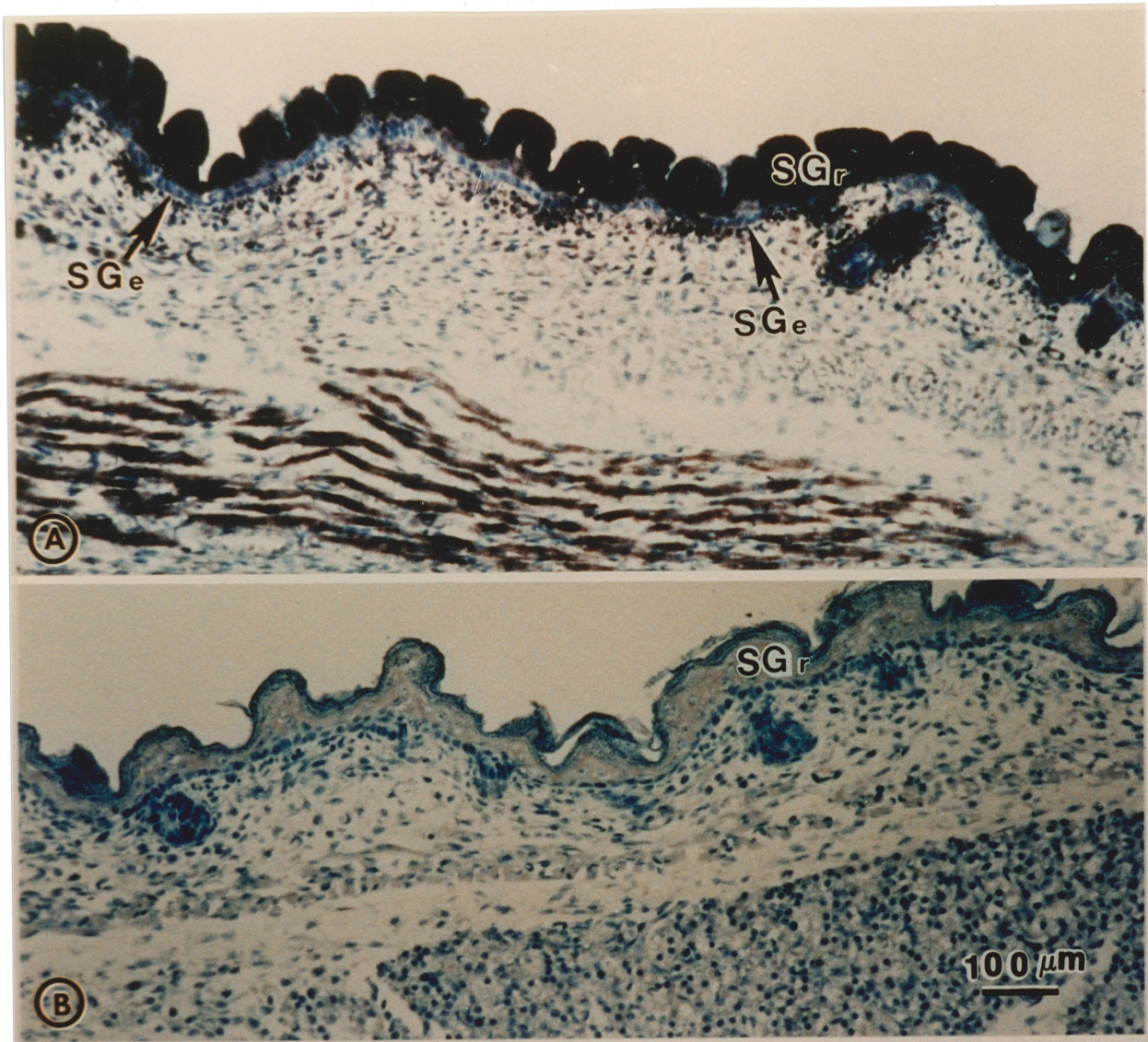
### **2.5.1 Structure des follicules des vibrisses embryonnaires.**

Provenant d'une interaction entre le derme et l'épiderme, les follicules pileux sont formés à partir de la couche suprabasale de la peau. Il en est de même pour les follicules des vibrisses. Une différence intéressante que l'on peut faire entre ces deux types de follicules est que les follicules des vibrisses sont fonctionnels beaucoup plus tôt que les follicules pileux, ce qui implique une différenciation précoce (Fuchs et Byrne, 1994). Le follicule des vibrisses est constitué de plusieurs couches de cellules. Au centre, on trouve la vibrisse qui est entourée par la gaine de cellules internes. La gaine de cellules internes est formée de deux couches de cellules. La couche de Huxley et la couche de Henle. Ensuite, le tout est entouré par la gaine de cellules externes (Figure 10).

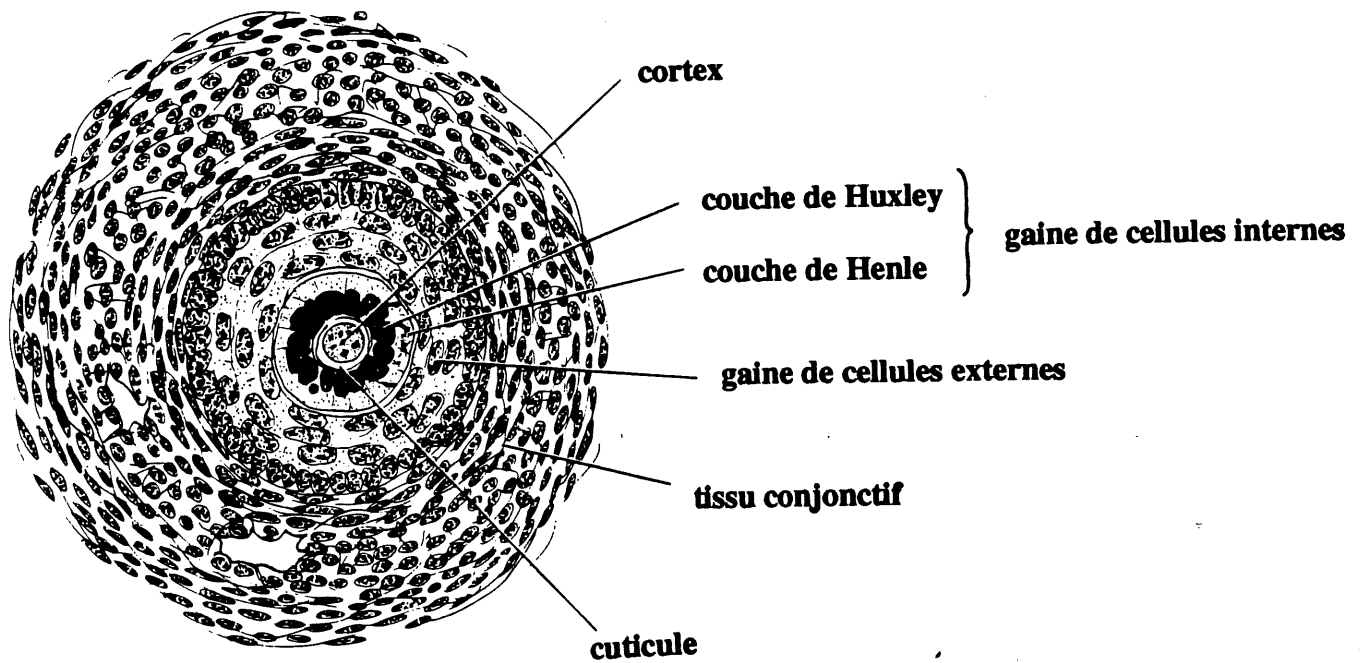


**Figure 9.1.** Localisation de l'expression de l'ARNm de *ZPK* dans la peau embryonnaire de souris. Pour la légende, voir la figure 9.2.





**Figure 9.2.** Localisation de l'expression de l'ARNm de *ZPK* dans la peau d'un embryon de 16 jours. Coupe de peau d'un embryon de 13.5- (9.1A), 15.5- (9.1B), 17.5- (9.1C-D) et 16 (9.2A-B) jours de développement. (9.1D) est un agrandissement de la peau d'un embryon de 17.5 jours. Toutes les coupes ont été hybridées avec une ribosonde antisens à l'ARNm de *ZPK*. La figure 9.2A a été hybridée avec une ribosonde antisens et 9.2B avec une ribosonde sens. HF, follicule pileux; SCo, *stratum corneum*; SGe, *stratum germinativum*; SGr, *stratum granulosum*. Les têtes de flèches délimitent les couches de cellules identifiées. Grossissement original : 9.1A,B,D x 400; 9.1C x 160; 9.2A,B x 180



**Figure 10.** Coupe transversale schématique d'un follicule d'une vibrisse de souris. Le cortex et la cuticule forment le poil. Les cellules de la gaine de cellules internes produisent les kératines pour former le poil. (Tiré et traduit de Rugh, 1968)

## **2.5.2 Localisation de l'expression de l'ARNm de ZPK dans les follicules des vibrisses.**

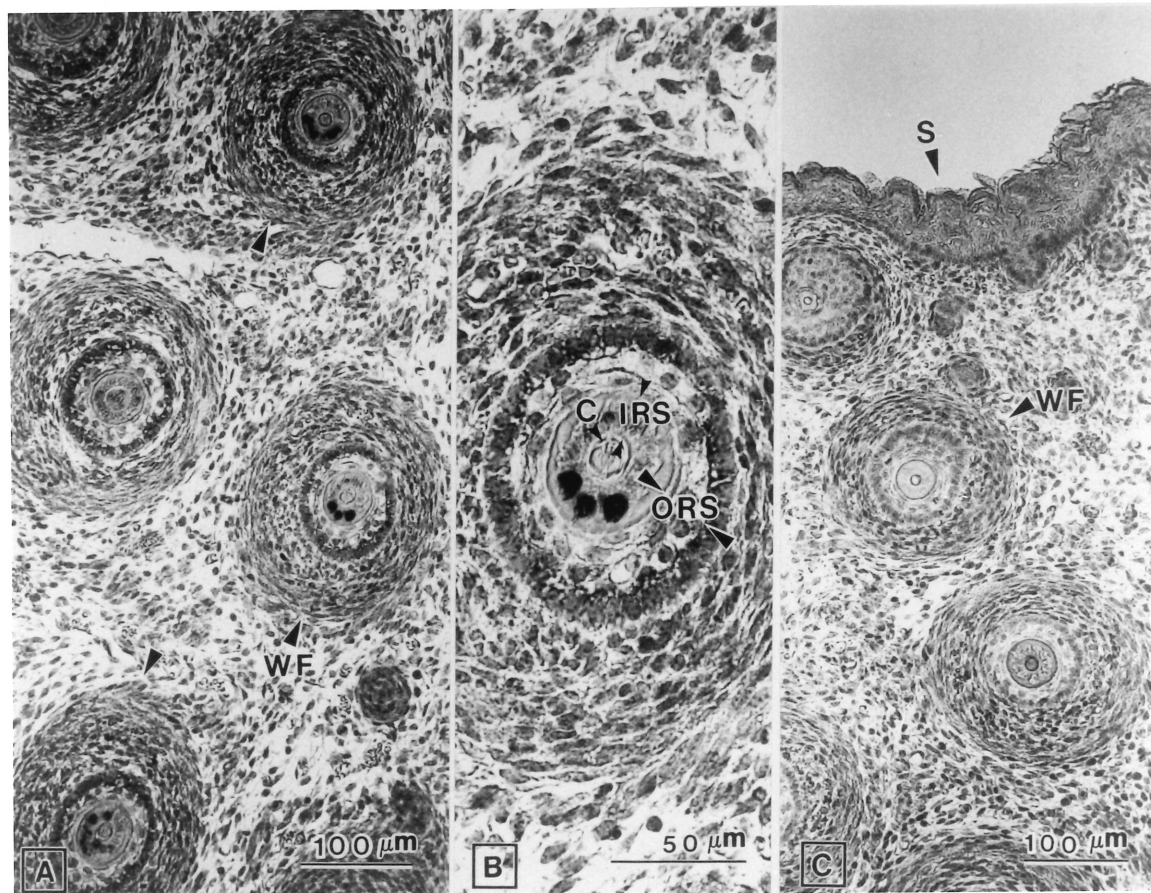
L'expression détectée dans les follicules des vibrisses se localise dans la gaine de cellules internes (inner root sheath, (IRS)) qui est le prolongement du *stratum granulosum* de la peau, là où on retrouve déjà l'expression du transcrite de ZPK (Figure 11A). Un agrandissement d'un follicule confirme cette localisation (Figure 11B). La figure 11C est un contrôle négatif qui permet de vérifier l'absence de signaux artéfactuels ou non-spécifiques dans la peau et les follicules des vibrisses.

## **2.6 Expression de ZPK dans l'intestin embryonnaire.**

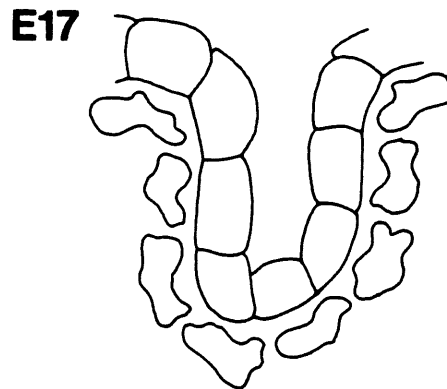
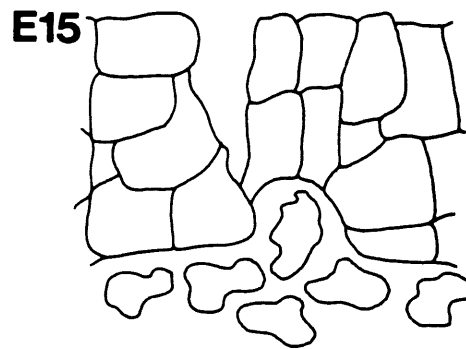
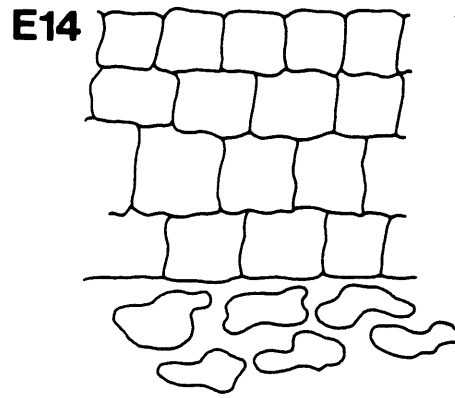
### **2.6.1 Développement de l'intestin embryonnaire.**

L'intestin est le premier tissu d'origine endodermique à se former. Même s'il n'est pas fonctionnel, c'est lui qui est à la base de tout le système digestif. Sa mécanique de formation est assez simple. Il se forme en grande partie au moment de la gastrulation quand l'endoderme pénètre à l'intérieur des autres feuillets. C'est un mécanisme apoptotique induit par des facteurs présents dans le liquide amniotique qui va permettre la formation de la lumière intestinale et par un processus invasif des cellules de mésenchyme dans les cellules épithéliales qui va former les villosités (Figure 12)(Gilbert, 1994). Ensuite, le mésenchyme environnant va induire la différenciation des cellules épithéliales des villosités. Cette différenciation s'effectue selon un patron non-spécifique et aléatoire dans l'intestin, c'est à dire que ce ne sont pas toutes les cellules qui subissent cette différenciation en même temps. Durant la dernière semaine de gestation, les cellules épithéliales de l'intestin vont passer d'un épithélium stratifié à un épithélium simple, signe de l'évolution de leur différenciation (Vasioukhin *et al.*, 1995). De plus, ce n'est pas avant la troisième semaine après la naissance que l'intestin murin ne devient complètement mature (Calvert et Pothier, 1990; Simon et Gordon, 1995).





**Figure 11. Localisation de l'expression de l'ARNm de ZPK dans les follicules des vibrisses.** Les coupes sagittales d'embryons ont été hybridées soit avec une ribosonde antisens (11A-11B) ou sens (11C) de l'ARNm de ZPK. (11A) Coupe transversale d'un follicule de vibrisse présentant une expression de ZPK dans la gaine de cellules internes. (11B) Agrandissement du follicule présenté en 11A. (11C) Même qu'en 11A sauf qu'une sonde sens a été hybridée à une coupe sériée du même embryon. C, cortex; IRS, gaine de cellules internes; ORS, gaine de cellules externes; S, peau; WF, follicule de vibrisse. Grossissement original : A,C x 160; B x 400.



**Figure 12. Schéma du développement embryonnaire de l'intestin.**

E14, jour 14 du développement embryonnaire; E15, jour 15 du développement; E17, jour 17 du développement. Les cellules cuboïdales et les cellules irrégulières représentent respectivement les cellules épithéliales et les cellules de mésenchyme. On voit qu'au jour 15, les cellules du mésenchyme envahissent les cellules épithéliales pour donner naissance aux villosités. (Tiré de Sonnenberg *et al.*, 1993)

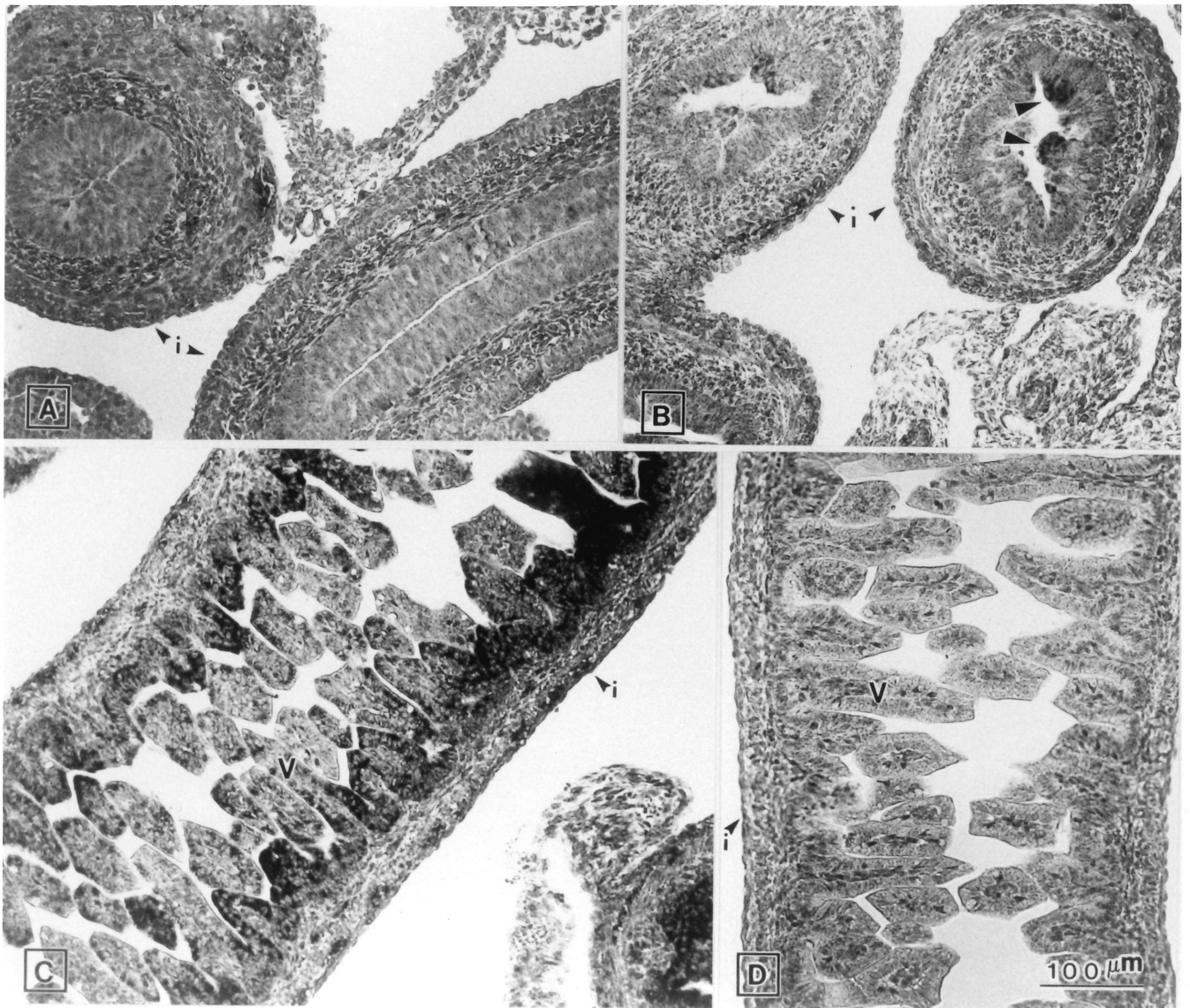
## **2.6.2 Localisation de l'expression de l'ARNm de ZPK dans l'intestin embryonnaire.**

À 13.5 jours, l'intestin embryonnaire non-différencié ne présente aucune trace de l'expression de ZPK (Figure 13A). À 15.5 jours, au moment où les villosités intestinales commencent à se former, on observe certaines cellules épithéliales qui expriment ZPK (Figure 13B). À 17.5 jours, les villosités sont complètes et on observe une expression aléatoire de ZPK dans les cellules épithéliales le long des villosités de même que dans les cryptes (Figure 13C). Finalement, aucune expression est détectée dans les cellules mésenchymateuses et dans les couches musculaires qui forment l'intestin. La figure 13D est un contrôle négatif qui présente aucune réaction non-spécifique.

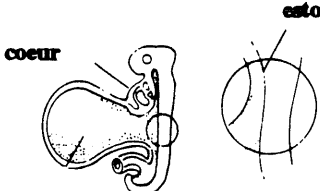
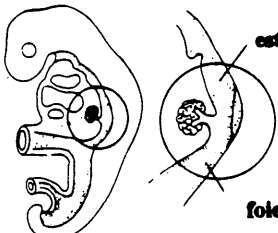
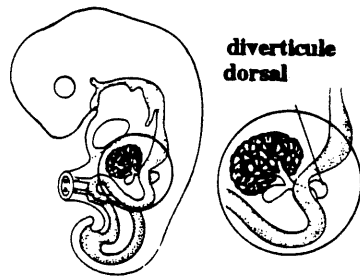
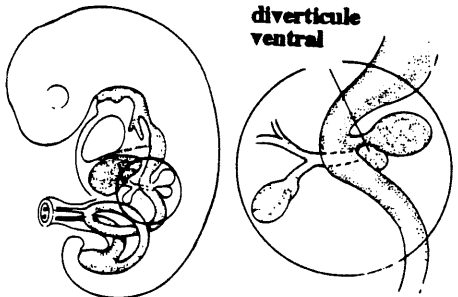
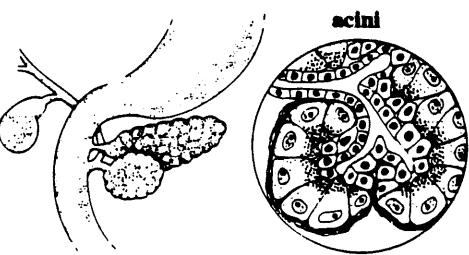
## **2.7 Expression de ZPK dans le pancréas embryonnaire.**

### **2.7.1 Développement du pancréas embryonnaire.**

Le pancréas a une origine endodermique. Il est formé à partir de la paroi intestinale. Le pancréas se développe à partir de la fusion de deux diverticules distincts; le ventral et le dorsal (Figure 14). Par la suite, le pancréas subira une série de mitoses très rapides en gardant un taux basal d'hormones et d'enzymes digestives. À 15 jours, les cellules du pancréas, vont subir une cytodifférenciation. C'est à dire que les populations de cellules qui composent le pancréas vont acquérir leur fonction respective. Une population va donner naissance aux cellules acineuses qui constituent la voie de sécrétion exocrine (sécrétion des enzymes digestives). Cette différenciation s'observe facilement par le développement d'un important réticulum endoplasmique, d'un appareil de Golgi et de l'accumulation de granules de zymogènes. La seconde population va former les îlots de Langerhans qui constituent la voie de sécrétion endocrine (sécrétion d'hormones: insuline, glucagon). C'est le compartiment de cellules endocrines qui se différencie le plus rapidement (Slack, 1995).



**Figure 13.** Localisation de l'expression de l'ARNm de *ZPK* dans l'intestin embryonnaire. Coupes d'intestin d'embryons de 13.5- (A), 15.5- (B) et 17.5- (C-D) jours de développement. Les coupes sagittales d'embryons ont été hybridées avec une ribsonde antisens (A-B-C) ou sens (D) de l'ARNm de *ZPK*. Les têtes de flèche en (B), montrent la position des cellules qui expriment *ZPK* dans l'intestin d'un embryon de 15.5 jours. i, intestin; V, villosité. Grossissement original : x 160.

Jours après conception	Morphogénèse
~8	 <p>coeur      estomac</p>
~9	 <p>estomac foie</p>
~10	 <p>diverticule dorsal</p>
~10.5	 <p>diverticule ventral</p>
~12	 <p>acini</p>

**Figure 14.** Schéma du développement embryonnaire du pancréas. Le pancréas est formé à partir de la fusion de deux diverticules; le dorsal et le ventral. (Tiré et traduit de Gittes et Rutter, 1992)

### **2.7.2 Localisation de l'expression de l'ARNm de ZPK dans le pancréas embryonnaire.**

Le premier pancréas dans lequel on a détecté une expression de *ZPK*, est celui de 15.5 jours (Figure 15.1A). On peut voir sur la figure qu'un seul acini (flèche) présente une expression de *ZPK*. À 17.5 jours, ce sont tous les acini qui présentent une forte expression de *ZPK* (Figure 15.1B). Aucun signal non-spécifique est observé dans le contrôle négatif (Figure 15.1C). Sur la figure 15.2A, on peut observer des îlots de Langerhans, au centre, qui ne présentent aucune expression de *ZPK*.

## **2.8 Expression de ZPK dans les reins embryonnaires.**

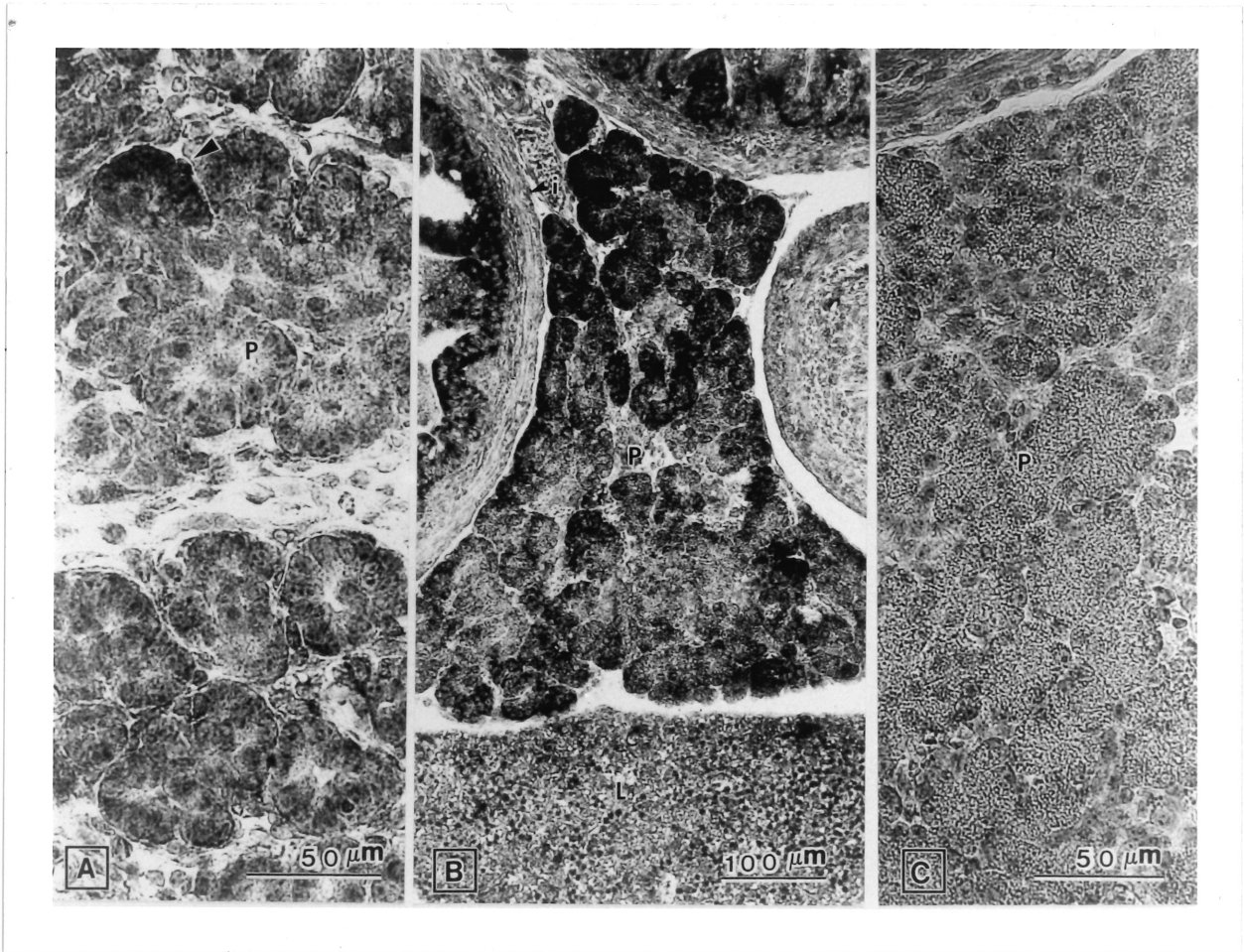
### **2.8.1 Développement du rein embryonnaire.**

Le rein est un organe d'origine mésodermique. La base de son développement repose, comme pour la plupart des organes, sur des interactions épithélio-mésenchymateuses. Le rein embryonnaire (métanéphros) se développe vers le jour 11 du développement. Au début, un signal qui provient de l'uretère induit la transformation du mésenchyme, qui est la zone présomptive du métanéphros, en cellules épithéliales qui vont à leur tour se différencier en tubules proximaux, distaux et en glomérules. Ensuite, les cellules à l'extrémité des tubes nouvellement formés, vont induire la formation des tubules rénaux et des glomérules (Figure 16). Dès le jour 15 du développement, le rein est fonctionnel, et les cellules des tubules sont donc différenciées (Bard *et al.*, 1994).

### **2.8.2 Localisation de l'expression de l'ARNm de ZPK dans les reins embryonnaires.**

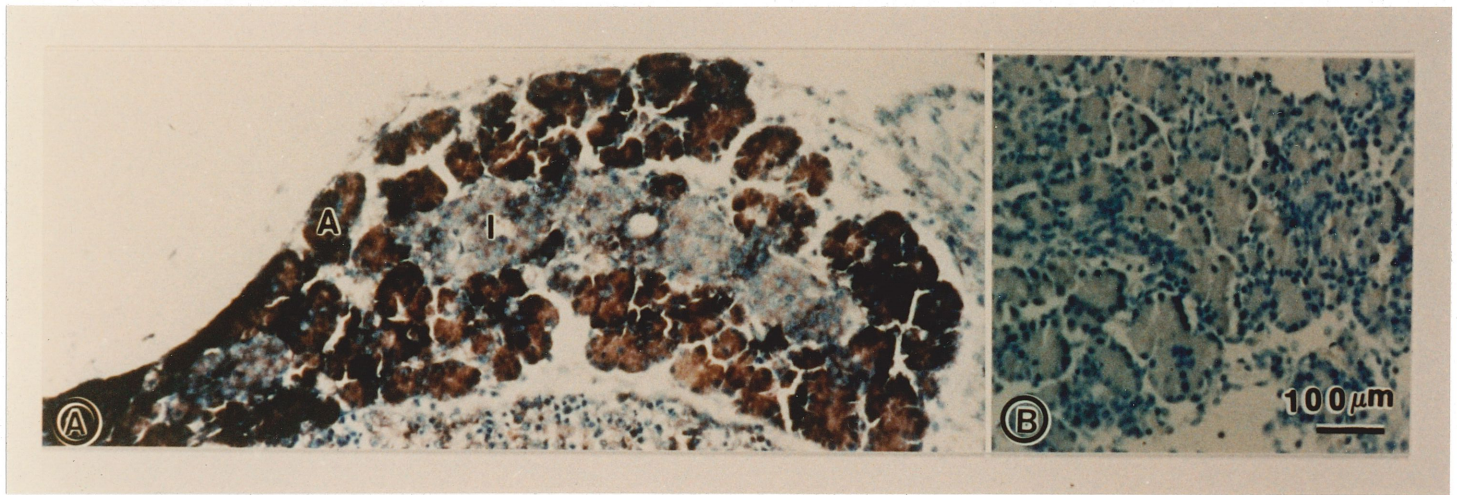
À 13.5 jours, aucun signal est détecté dans le tissu rénal (Figure 17.1A). À 15.5 jours (Figure 17.1B) et 17.5 jours (Figure 17.1C), l'expression de *ZPK* est détectée de façon croissante dans les cellules épithéliales des tubules rénaux. Aucune expression n'est détectée dans le tissu

mésenchymateux et les cellules endothéliales qui composent les reins. La figure 17C montre la glande surrénale où l'expression de *ZPK* est détectée dans la zone corticale de la glande plus précisément dans la *zona fasciculata*. Sur la figure 17.2A, on peut observer la localisation de *ZPK* dans un rein d'embryon de 16 jours. On remarque que l'expression de *ZPK* se limite aux cellules des tubules collecteurs.



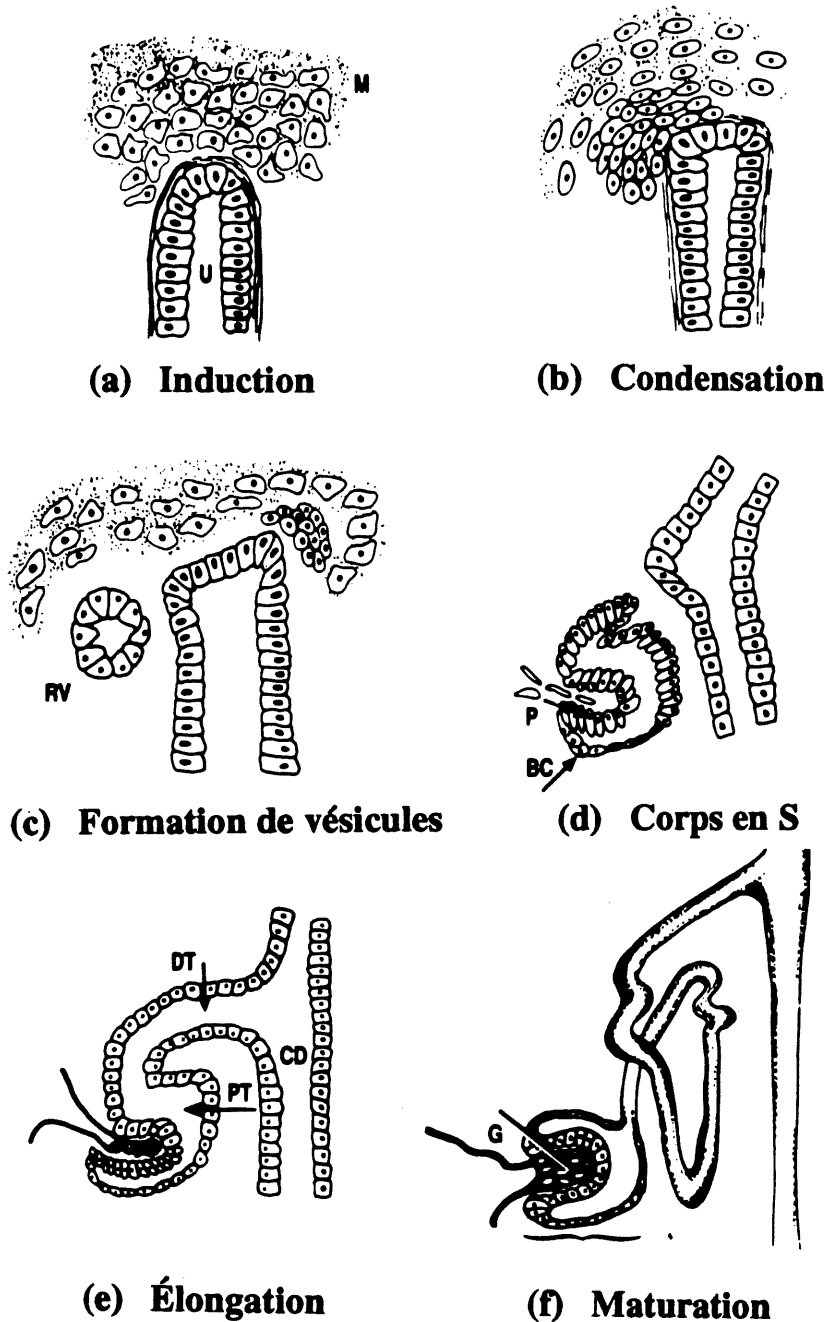
**Figure 15.1.** Localisation de l'expression de l'ARNm de *ZPK* dans le pancréas embryonnaire. Pour la légende, voir figure 15.2.





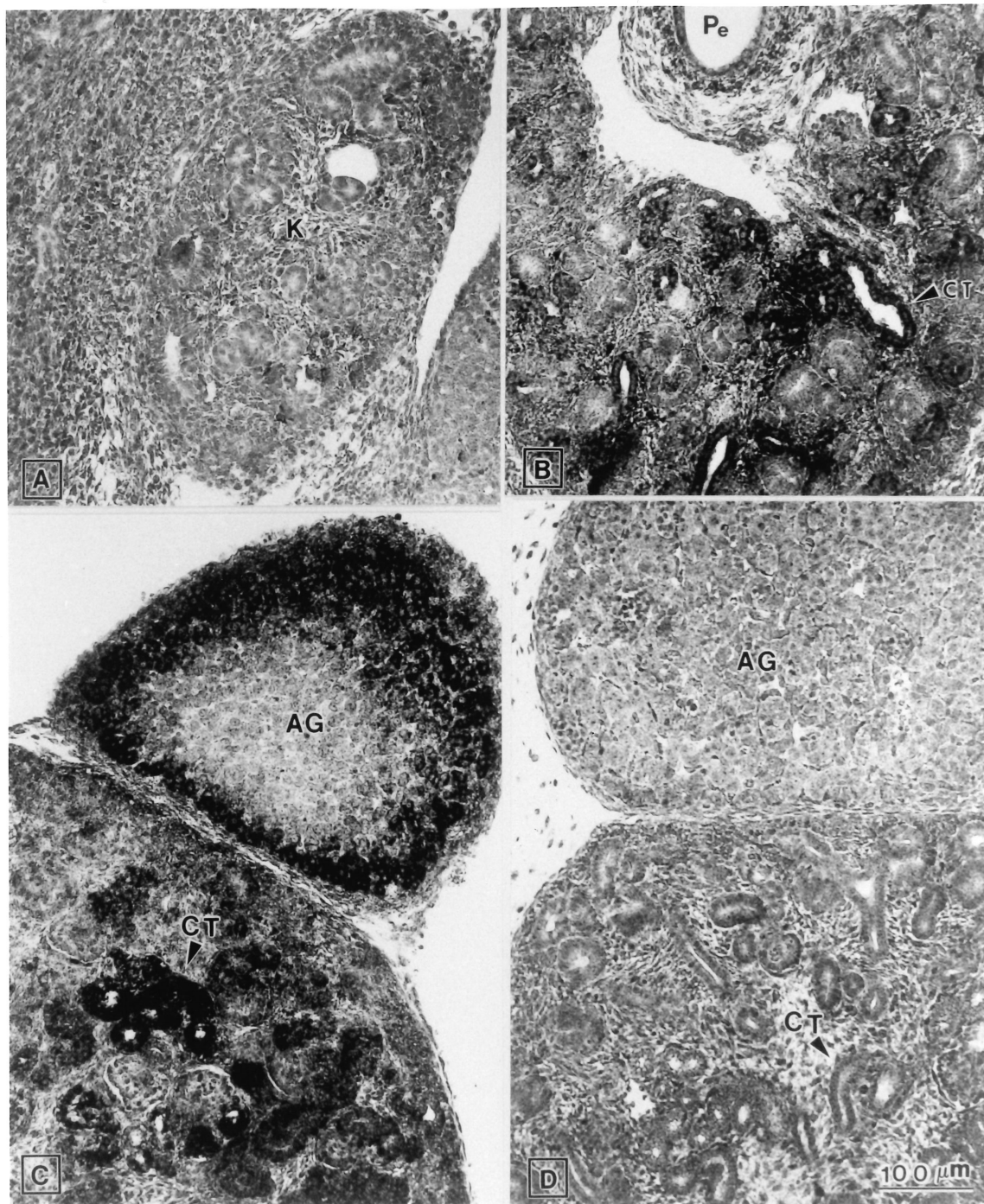
**Figure 15.2. Localisation de l'expression de l'ARNm de ZPK dans un pancréas d'embryon de 16 jours.**

Coupes de pancréas d'embryons de 15.5- (15.1A), 17.5- (15.1B-C) et 16 (15.2 A-B) jours de développement. Les coupes sagittales d'embryons ont été hybridées avec une ribosonde antisens (15.1A-15.1B-15.2A) ou sens (15.1C-15.2B) de l'ARNm de ZPK. i, intestin; L, foie; P, pancréas; I, îlots de Langerhans. Grossissement original : 15.1A,C x 400; B x 160; 15.2A,B x 180.



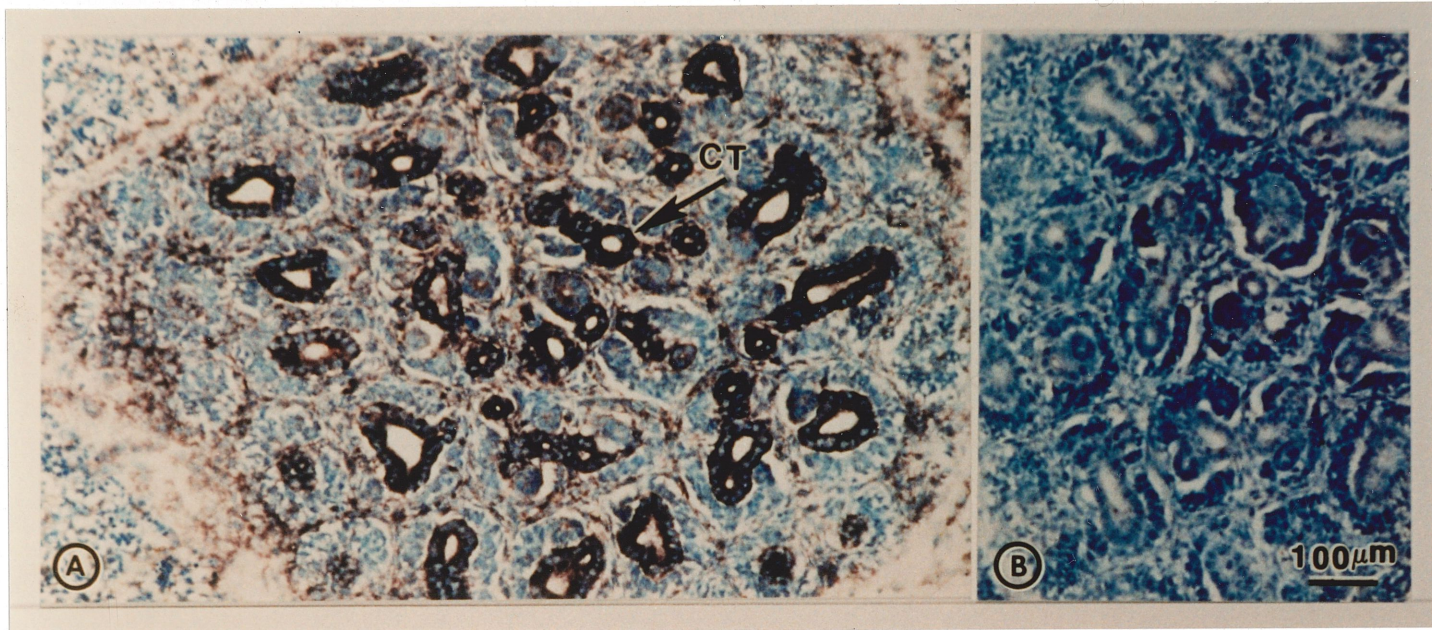
**Figure 16. Schéma du développement embryonnaire du rein.**

(a) Le bourgeonnement de l'urètre (U) est induit et il induit le mésenchyme (M) à se condenser. (b) Condensation du mésenchyme. (c) Le mésenchyme condensé forme des vésicules pour former les corps en S (d). (E) Le corps en S s'allonge pour former les tubules proximaux (PT) et distal (DT). Le tout fusionne avec le tube collecteur (CD). (F) Les tubules continuent de s'allonger lors de la maturation. (Tiré et traduit de Bard *et al.*, 1994)



**Figure 17.1.** Localisation de l'expression de l'ARNm de *ZPK* dans le rein embryonnaire. Pour la légende, voir figure 17.2.





**Figure 17.2. Localisation de l'expression de l'ARNm de ZPK dans le rein d'un embryon de 16 jours.**

Coupes de rein d'embryons de 13.5- (17.1A), 15.5- (17.1B), 17.5- (17.1C-D) et 16- (17.2A-B) jours de développement. Les coupes sagittales d'embryons ont été hybridées avec une ribosonde antisens (17.1A-B-C, 17.2A) ou sens (17.1D, 17.2B) de l'ARNm de ZPK. AG. Glande surrénale; CT, tubules collecteurs; K, rein; Pe, pavillon. Grossissement original : 17.1 x 160; 17.2 x 180

## CHAPITRE 3

### DISCUSSION

#### 3.1 Préambule

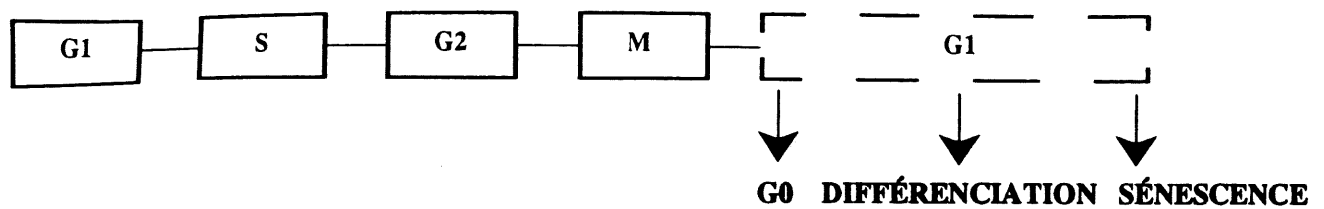
Les informations obtenues dans cette étude ont permis d'éclaircir nos connaissances sur les rôles potentiels de la protéine ZPK dans la cellule au cours du développement embryonnaire. On sait que ZPK est une protéine sérine/thréonine kinase cytoplasmique (Blouin *et al.*, 1996; Reddy et Pleasure, 1994). Il est donc probable que ZPK joue le rôle d'un transducteur cytoplasmique pour une ou des cascades de signaux intracellulaires initiées par un ou des facteurs de croissance ou hormones peptidiques et leurs récepteurs. Le fait que ZPK se retrouve dans des populations de cellules spécifiques de certains organes, peut laisser croire à la participation de ZPK dans plus d'un programme morphogénétique responsable du développement normal de ces organes.

L'étude réalisée dans le cadre de mes travaux de maîtrise, a permis d'établir que l'expression de l'ARNm du gène *ZPK* est préférentiellement localisée dans les cellules épithéliales différenciées de différents organes et ce, à partir d'une période au cours du développement qui correspond à l'apparition d'un phénotype différencié. On parle ici, entre autres, de la couche granulaire de la peau, des cellules épithéliales des villosités intestinales, des cellules acineuses du pancréas et des cellules épithéliales des tubules rénaux. On retrouve également une expression de *ZPK* dans les cellules neuroépithéliales différenciées du cerveau en développement. Donc toutes les populations de cellules qui expriment *ZPK* ont un point en commun. Ce sont toutes des populations de cellules qui entament un processus biologique associé à la différenciation terminale et qui va permettre à l'organe de devenir fonctionnel.

La différenciation des cellules est la génération de la diversité cellulaire qui est contenue dans un organisme (Gilbert, 1994). Quand on parle de différenciation terminale, on parle du devenir

ultime des cellules différenciées. En fait, les cellules, selon leur provenance, vont entrer dans un processus biologique qui va les mener vers trois voies possibles. Elles pourront soit acquérir leurs fonctions biologiques définitives (différenciation), soit se diriger vers la mort cellulaire préprogrammée qui est l'apoptose, soit enfin vers un état de latence qui est la phase G0 du cycle cellulaire (Figure 18). Cette dernière possibilité n'est pas un processus biologique menant vers la différenciation terminale des cellules qui y accèdent et son rôle n'est pas encore très clair (Philipson et Sorrentino, 1991). Dans chacun des cas, plusieurs paramètres peuvent être responsables du chemin que la cellule va suivre. Parmi ces derniers, on peut mentionner la disponibilité des nutriments, la grandeur et la densité des cellules, l'adhésion cellulaire et la présence de facteur de croissance qui peuvent influencer le cycle cellulaire. Ces paramètres auront un effet direct sur la transcription des gènes impliqués dans le bon devenir de la cellule (Philipson et Sorrentino, 1991). Donc, la différenciation terminale de populations spécifiques de cellules est différente d'une population à une autre.

Le cerveau et la peau sont de bons exemples pour comprendre les différents processus biologiques associés à la différenciation terminale. Dans un premier temps, une cellule qui entame un processus de différenciation ne doit généralement plus avoir d'action mitotique donc son cycle cellulaire est bloqué en G1. C'est à partir de la phase G1 que la cellule va être orientée pour son devenir (Figure 18) (Philipson et Sorrentino, 1991). Dans le cerveau, l'état de différenciation terminale des cellules est atteint lors de l'acquisition des fonctions neuronales des cellules du cerveau. Pour la peau, c'est complètement différent. En fait, la peau est un organe qui est en renouvellement cellulaire continu à partir d'une couche de cellules basales non-différenciées. La différenciation des cellules souches en kératinocytes se fait avec l'accumulation de granules de kératines. La différenciation terminale des kératinocytes les conduit vers l'apoptose, par une trop grande accumulation de kératine, pour donner naissance à la couche cornée de la peau (Fuchs et Byrne, 1994).



**Figure 18. Représentation du cycle cellulaire.** Après la mitose (M), la cellule entre dans la phase G1. Durant cette phase plusieurs événements vont être responsable de l'entrée de la cellule vers, un état de latence (G0), sa différenciation ou vers la mort cellulaire. (Tiré et traduit de Philipson et Sorrentino, 1991)

### **3.2 Expression de ZPK dans les structures nerveuses.**

Le patron d'expression de *ZPK* dans le système nerveux central en développement suggère une implication de *ZPK* dans la différenciation des neurones. En fait, l'expression de *ZPK* est observée dans la région des cellules neuroépithéliales du télencéphale. Les cellules neuroépithéliales du télencéphale sont les premières cellules du cerveau à se différencier vers le jour 10 (Gilbert, 1994; Oppenheimer et Lefevre, 1989). Au jour 9 du développement, aucune expression de *ZPK* est détectée dans le tube neural (résultats non-présentés) et au jour 11 les cellules neuroépithéliales du cerveau présentent un début d'expression de *ZPK*. Par la suite, cette expression s'intensifie avec l'augmentation du nombre de cellules différenciées dans le cortex cérébral. De plus, l'expression de *ZPK* semble donc être en corrélation avec la différenciation des cellules nerveuses. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus chez l'adulte puisque l'expression de *ZPK* se situe dans des populations de neurones qui ont atteint leur niveau de spécialisation maximale comme les cellules de l'hippocampe et les cellules du cortex cérébral qui sont des cellules d'origine neuroépithéliale (Blouin *et al.*, 1996). Les ganglions spinaux qui sont des structures nerveuses expriment aussi *ZPK*. Ils sont entièrement différenciés au jour 13. Les résultats que nous avons obtenus sur les ganglions semblent corrélés avec la différenciation du tissu. Comme on peut le constater, les cellules entrent en fonction au moment où la différenciation terminale des cellules nerveuses se produit.

### **3.3 Expression de ZPK dans la peau et les follicules des vibrisses.**

Le patron d'expression de *ZPK* dans la peau embryonnaire qui se situe exclusivement dans la région du *stratum granulosum*, suggère une implication de *ZPK* dans le processus biologique qui mène les cellules vers leur état de différenciation terminale. Le *stratum granulosum* correspond aux cellules en différenciation. Cette différenciation débute vers le jour 14 et est complète vers le jour 15 (Fuchs et Byrne, 1994). Les résultats obtenus corréleront très bien dans le temps avec la différenciation de la peau car on assiste à une augmentation de l'expression de



*ZPK* à mesure que la peau se différencie. Dans la peau adulte (résultats non-présentés) le patron d'expression de *ZPK* se situe exclusivement dans le *stratum granulosum*. On sait que la peau est continuellement en renouvellement. Ceci dit, il y a toujours de nouvelles cellules qui se différencient pour atteindre leur état de différenciation terminale. Dans le cas de la peau, la différenciation terminale mène à la mort cellulaire provoquée par une grande accumulation de kératines (Fuchs et Byrne, 1994). L'analyse des résultats obtenus sur les follicules pileux et les follicules des vibrisses appuie l'hypothèse de la participation de *ZPK* dans un processus biologique menant à la différenciation terminale. En fait, les follicules pileux et les follicules des vibrisses sont formés par le *stratum granulosum*. La différenciation de ces cellules se traduit par la production de kératine à l'extérieur de la cellule pour former le poil ou la vibrisse (Kopan et Weintraub, 1993). C'est la présence du cuticule d'un poil qui indique l'état de différenciation du follicule. Les follicules pileux de la peau ne sont pas actifs avant la naissance contrairement aux follicules des vibrisses qui sont déjà productifs dès le jour 16 du développement embryonnaire de la souris. Donc ces résultats suggèrent la participation de *ZPK* dans les processus de différenciation terminale de la peau et des structures qui la composent.

### **3.4 Expression de *ZPK* dans l'intestin.**

Dans l'intestin embryonnaire, on observe une expression de *ZPK* dans les cellules épithéliales des villosités intestinales selon un patron irrégulier. Au début, l'intestin est formé de populations de cellules stratifiées peu différenciées. Ensuite, ces cellules vont être induites en cellules épithéliales intestinales vers le jour 10. Leur différenciation terminale, qui constitue leur entrée en fonction, débute vers le jour 14 et se terminera seulement trois semaines après la naissance. Donc les cellules épithéliales ne se différencient pas toutes en même temps. Elles le font selon un patron aléatoire (Calvert et Pothier, 1990). Si l'on compare ces informations avec les résultats de l'expression de *ZPK* on se rend compte que tout corrèle avec le processus de différenciation des cellules épithéliales des villosités intestinales. Les résultats observés dans l'intestin adulte (Blouin *et al.*, 1996) sont en accord avec les observations faites chez l'embryon.

Les cellules épithéliales des villosités intestinales adultes sont continuellement en renouvellement à partir de cellules souches. Ces cellules souches sont en fait les cellules de la crypte de Lieberkühn. Elles donnent naissance aux cellules épithéliales des villosités qui sont éliminées à la pointe de la villosité et aux cellules de Paneth qui sont éliminées par phagocytose (Dauça *et al.*, 1990). Donc il y a toujours des cellules qui sont dans un processus de différenciation tout le long des villosités. Le patron d'expression de *ZPK* chez l'adulte est confiné aux cellules épithéliales de la villosité et aux cellules de Paneth. Ces résultats peuvent nous faire penser à un rôle de *ZPK* dans le processus qui entraîne les cellules vers leur différenciation terminale qui est l'apoptose.

### **3.5 Expression de *ZPK* dans le pancréas.**

Dans le pancréas, la première expression de *ZPK* a été détectée dans la portion exocrine au moment où l'organe subit de profonds changements morphogénétiques qui entraîneront ce dernier vers un état de cytodifférenciation complet. Pour les cellules sécrétrices comme les cellules acineuses, la cytodifférenciation s'observe par le développement d'un important réticulum endoplasmique, d'un appareil de Golgi ainsi que l'accumulation de granules de zymogènes (Slack, 1995). Les résultats de la localisation de l'expression de *ZPK* suggèrent un rôle pour la protéine dans le processus biologique qui entraîne les cellules acineuses dans l'acquisition de leurs fonctions biologiques donc vers leur état de différenciation terminale. Les résultats d'expression obtenus chez l'adulte sont en accord avec les résultats embryonnaires. L'expression chez l'adulte est localisée uniquement dans les cellules acineuses (Blouin *et al.*, 1996). Ce résultat est très intéressant, car le pancréas est constitué de deux populations de cellules différenciées importantes et seulement les cellules acineuses et non les cellules des îlots de Langerhans expriment *ZPK*. Cette observation suggère une participation de *ZPK* dans le maintien de l'état différencié des cellules acineuses. Pour ce qui est des cellules ductales, il n'a pas été possible de les identifier adéquatement à cause du fort marquage observé dans l'organe.

### 3.6 Expression de *ZPK* dans les reins.

L'entrée en fonction du rein embryonnaire (métanéphros) se fait assez tard au cours du développement (jour 14). C'est au jour 15 que l'on observe la première expression de *ZPK* dans ces cellules. Le patron d'expression de *ZPK* dans les cellules épithéliales des tubules rénaux est en corrélation avec la différenciation de ces cellules. La fonction de ces cellules est de réabsorber les bons nutriments qui ont été enlevés du sang. Les résultats obtenus chez l'adulte sont en accord avec les résultats embryonnaires. Chez l'adulte, *ZPK* se retrouve dans la même population de cellules (résultats non-présentés). Un autre résultat intéressant, c'est la détection de *ZPK* dans la *zona fasciculata* de la glande surrénale. Cette zone est responsable de la sécrétion des glucocorticoïdes qui sont nécessaires au cours du développement embryonnaire (Gilbert, 1994). En fait, ils interviennent dans la régulation de la transcription des gènes (Gilbert, 1994). Les cellules de la *zona fasciculata* sont des cellules qui se différencient très tôt dans le développement (jour 12-13). Ceci peut s'expliquer par le fait que les glucocorticoïdes sont nécessaires pour stimuler des événements morphogénétiques ultérieures. Tous ces résultats suggèrent une fois de plus l'implication de *ZPK* dans des processus liés à la différenciation terminale de populations spécifiques de cellules.

### 3.7 Discussion générale

Tous les organes dans lesquels le gène *ZPK* est exprimé, à l'exception du cerveau, ont un point en commun, celui que leur développement repose sur des interactions entre un épithélium et le mésenchyme environnant. Il existe trois types possibles d'interactions (Gilbert, 1994). Le premier type est une interaction impliquant un contact cellule-cellule. Ce type d'interaction est important pour le développement des tubules rénaux (Lehtonen, 1975). Le second implique un contact entre la cellule et une matrice extracellulaire. Les composants de la matrice vont induire la différenciation cellulaire. Par exemple, les cellules de Sertoli mises en culture sur une surface non-recouverte d'éléments de la matrice extracellulaire perdent leur état différencié. Si on les

met en présence d'une membrane basale, elles reprennent une morphologie identique aux cellules de Sertoli dans les testicules (Hadley *et al.*, 1985). Le dernier type d'induction nécessite aucun contact direct entre les cellules. En fait l'induction se fait par l'entremise de facteurs solubles. Ces facteurs sont très souvent des facteurs de croissance. Si l'on parle de facteurs de croissance, on parle aussi de récepteurs qui possèdent une activité kinase intrinsèque. On sait que le signal est médié via la phosphorylation de protéines cytoplasmiques. Dans cet ordre d'idée, il est possible d'imaginer que ZPK peut être activée en réponse à la fixation d'un facteur de croissance à son récepteur. Des protéines kinases sont reconnues pour agir dans ce type d'induction. Le récepteur tyrosine kinase, *c-met*, qui est le récepteur de l'"hepatocyte growth factor/scatter factor" (HGF/SF) utilise ce type d'induction. Ce qui rend cette protéine intéressante c'est son patron d'expression au cours du développement embryonnaire (Sonnenberg *et al.*, 1993). En fait, celui-ci est très similaire à celui de ZPK. On retrouve le récepteur *c-met* dans les cellules épithéliales des villosités intestinales, dans les cellules épithéliales des tubules rénaux, dans le pancréas, dans le cerveau (Sonnenberg *et al.*, 1993), et dans la peau (Rosen *et al.*, 1994). De plus, ce récepteur et son ligand sont eux aussi bien conservés au cours de l'évolution. Les actions cellulaires du HGF/SF sont bien connues. Il peut servir comme agent mitogénique (Nakamura *et al.*, 1987), motogénique (Stoker *et al.*, 1987; Gherardi *et al.*, 1989) et morphogénique (Santos *et al.*, 1993) sur plusieurs populations de cellules épithéliales (Gherardi *et al.*, 1993; Furlong, 1992; Birchmeier, 1993). L'étroite relation qui existe entre le patron d'expression de *c-met* et de ZPK dans les mêmes populations de cellules permet de suggérer un rôle potentiel de ZPK dans la cascade intracellulaire activée par le récepteur *c-met*. Aucune information n'étant disponible sur les protéines interagissant dans la cascade activée par *c-met*, il est possible d'imaginer que ZPK est un substrat de ce récepteur. Un autre fait est intéressant. Il est bien connu que HGF et *c-met* sont grandement impliqués dans la régénération hépatique (Nakamura *et al.*, 1984). Par cette étroite relation dans le patron d'expression du récepteur du HGF et de ZPK, il est possible de suggérer que ZPK soit impliqué dans la cascade activée par HGF.

La protéine RET est un autre bon exemple de protéine kinase où l'on a une démonstration de son implication dans les processus biologiques liés à la différenciation de populations spécifiques de cellules. Les zones d'expression de *RET* dans l'embryon suggèrent sa participation dans la différenciation de populations spécifiques de cellules neuronales et dans les cellules épithéliales polarisées des tubules rénaux. On peut comparer cet expression avec l'expression de *ZPK* dans ces mêmes organes. Avec ces résultats, Pachnis *et al.* (1993) et Avantaggiato *et al.* (1994) ont postulé que RET peut être impliqué dans différents programmes morphogénétiques (Davidson, 1990). Une mise en évidence de l'implication de RET dans le développement embryonnaire est décrite dans l'étude de Schuchardt *et al.* (1994) qui ont réalisé une inactivation complète du gène (knockout). Le résultat du knockout est un embryon mort-né qui n'a pas de développement normal des reins et du système nerveux entérique. Ces résultats, en analogie avec *ZPK*, permettent d'imaginer un rôle de *ZPK* dans le processus de différenciation cellulaire.

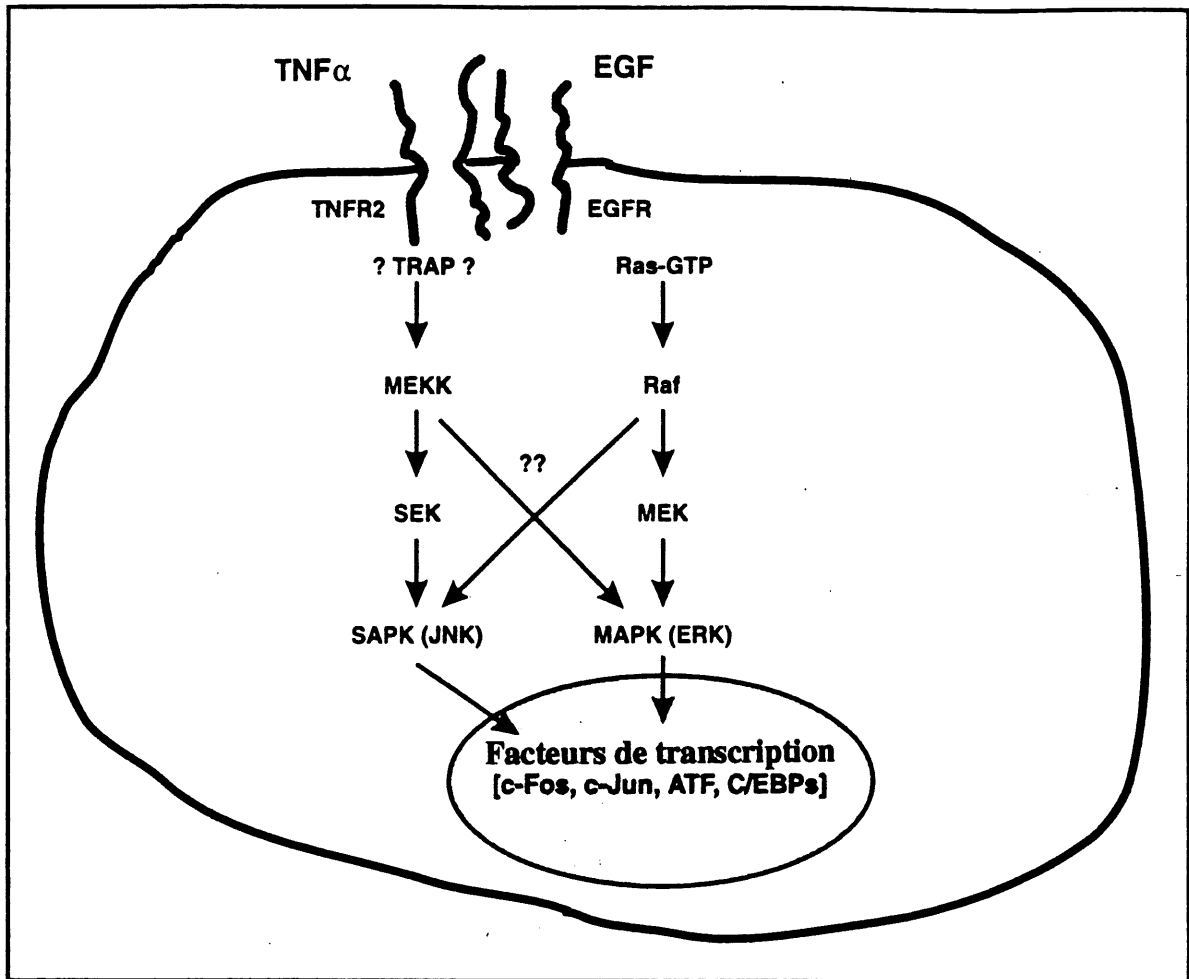
Le récepteur tyrosine kinase c-ros est un autre exemple de protéine qui agit sous l'influence d'une interaction de type épithélio-mésenchymateuse. La localisation de l'expression de c-ros se restreint au compartiment de prolifération cellulaire de l'intestin (crypte) de l'embryon et de l'adulte ainsi que dans les zones de prolifération des reins embryonnaires (Tessarollo *et al.*, 1992). Cet exemple en comparaison avec *ZPK* vient confirmer que les zones d'expression de *ZPK* sont des zones de différenciation. Donc, une fois de plus, il est possible de suggérer un rôle pour *ZPK* dans la différenciation cellulaire, soit dans l'induction ou le maintien de l'état différencié.

Comme on peut le constater, il est possible d'imaginer un rôle potentiel pour *ZPK* dans les processus biologiques associés à la différenciation cellulaire. Avec ces observations, on peut aussi suggérer que *ZPK* a un rôle dans la différenciation terminale en exerçant un effet négatif sur la prolifération. En fait, la différenciation terminale s'accompagne toujours d'un arrêt de la croissance cellulaire. L'effet négatif sur la prolifération pourrait s'exercer à deux niveaux

différents. Dans un premier temps, on peut imaginer que la protéine ZPK provoque un arrêt de la progression du cycle cellulaire lorsque les cellules atteignent un état de différenciation terminale. Le passage à travers le cycle cellulaire requiert l'activation successive de plusieurs protéines kinases de la famille des protéines kinases dépendantes de la cycline (CDK, cyclin-dependent kinase). Les CDK sont la clé de la régulation du cycle cellulaire (Morgan, 1995). Leur rôle est de se fixer aux sous-unités des cyclines et de les activer (Elledge et Harper, 1994). L'activation des cyclines dans le cycle cellulaire se fait uniquement par les CDK. Le complexe cycline-CDK peut à son tour être inactivé par une phosphorylation effectuée par la protéine kinase Wee1. Comme chaque kinase a sa phosphatase, la protéine phosphatase Cdc25 va jouer le rôle opposé à Wee1. Une protéine CDK, cdc2, est responsable de la régulation de ces deux protéines. En fait, cette kinase est capable de phosphoryler Wee1 et Cdc25 avec comme conséquence d'inactiver Wee1 et d'activer Cdc25. (Draetta, 1993; Solomon, 1993; Morgan, 1995).

Dans un deuxième temps, on peut suggérer que ZPK exerce un effet négatif sur la prolifération cellulaire en provoquant l'induction d'une réponse apoptotique dans les cellules différenciées. L'apoptose est un processus physiologique cellulaire qui joue un rôle important au cours du développement embryonnaire et aussi lors d'un stress physiologique (White, 1996). Au cours de l'embryogénèse, l'apoptose intervient dans la morphogénèse des membres et dans l'organisation du système nerveux central. En fait, lors de la synaptogénèse, plus de la moitié des neurones meurent par apoptose (Bousquet et Sarthou, 1995). Une cellule apoptotique est facile à identifier. On remarque au début une condensation de son cytoplasme et de sa chromatine, suivi de la fragmentation de l'ADN nucléaire condensée. La cellule ne décide pas elle-même de mourir. En fait, elle reçoit des signaux activateurs ou inhibiteurs des cellules voisines (Bousquet et Sarthou, 1995). Parmi ces facteurs, on retrouve des facteurs de croissance comme TGF $\beta$  et des cytokines telles que TNF $\alpha$ . Ces facteurs sont associés, dans la cellule, à des cascades de transduction de signaux qui impliquent des protéines kinases. Donc on peut en conclure que certaines protéines kinases sont impliquées dans l'apoptose.

Récemment, le groupe de Hirai *et al.* (1996) a isolé, de façon indépendante, l'homologue de ZPK chez le rat. Cette protéine, MUK, démontre une forte homologie avec le groupe des MAPKKK. Ils ont isolé cette nouvelle protéine avec une procédure de clonage basée sur l'utilisation de la technique de polymérisation en cascade (PCR) avec des oligonucléotides dégénérés correspondant aux sous-domaines II et VIII de la famille des MAPKKK. Les résultats qu'ils ont obtenus associent MUK/ZPK à la voie d'activation de JNK/SAPK (Hirai *et al.*, 1996). Ils ont observé que lorsqu'ils transfectent MUK et JNK1 dans la même cellule et qu'ils surexpriment MUK, le résultat est une activation de JNK1 visible par une hyperphosphorylation du facteur de transcription c-Jun. Il est important de noter que ces expériences ont été réalisées en transfectant les deux gènes dans des cellules qui ne les expriment pas. Donc, *in vivo*, il peut y avoir des différences. La famille de JNK/SAPK sont des protéines kinases appartenant à la grande famille des MAP kinases (MAPK) (Seger et Krebs, 1995). Les cascades intracellulaires qui incluent les protéines de la famille des JNK peuvent être activées par des facteurs de croissance (EGF), des cytokines (TNF $\alpha$ ) et par des stress extracellulaires tels que l'irradiation aux ultraviolets, les chocs thermiques ainsi que l'hépatectomie partielle (Figure 19). Les protéines de la famille des JNK ont un rôle reconnu dans les processus d'arrêt de la prolifération et de la différenciation ainsi que dans la prolifération cellulaire (Diehl et Rai, 1996). Le résultat de ces cascades est d'activer c-Jun. Dans l'exemple de l'hépatectomie partielle, les facteurs de transcription peuvent être activés par deux voies parallèles qui vont donner des résultats cellulaires similaires. La réponse via l'activation de JNK/SAPK par TNF $\alpha$  et EGF est la synthèse d'ADN par les hépatocytes d'un foie hépatectomisé. Par le fait que JNK1 a un lien avec ZPK/MUK et que JNK1 est impliqué dans la régénération hépatique, on peut suggérer une implication de ZPK/MUK dans la régénération hépatique.



**Figure 19. Voies d'activation des protéines de la famille des SAPK/JNK.**

Facteurs de croissance (EGF) et les cytokines (TNF $\alpha$ ) se lient aux récepteurs kinases qui initient la cascade des kinases qui activent les MAPK et les SAPK respectivement. Ces deux voies sont parallèles et certains éléments sont homologues ce qui laisse présager des actions concomitantes (Tirée et traduit de Diehl et Rai, 1996).



## CONCLUSION

Les résultats de cette étude démontrent un patron d'expression de l'ARNm de *ZPK* très spécifique à certaines populations de cellules. Dans tous les tissus étudiés, l'expression de *ZPK* est localisée dans les populations de cellules différenciées. En fait, le début de l'expression de *ZPK* est observée à partir du moment où s'initient des processus morphogénétiques conduisant des populations spécifiques de cellules vers leur différenciation terminale.

Jusqu'à présent, aucun des groupes travaillant sur *ZPK* et ses homologues a démontré que la protéine était synthétisée *in vivo*. Donc il devient impératif de déterminer si cette protéine est synthétisée dans les cellules. Pour ce faire, il faudrait obtenir un anticorps spécifique à *ZPK* et utiliser ce dernier dans des techniques d'immunodétection tels que l'immunohistochimie et le Western blot.

Comme la prolifération et la différenciation cellulaire sont généralement des processus biologiques mutuellement exclusifs, il est plausible de penser que toutes les cellules exprimant *ZPK* devraient voir son processus de prolifération arrêté. Pour vérifier cette hypothèse, on pourrait simplement introduire le gène *ZPK* avec un promoteur inductible à l'intérieur de cellules en culture et examiner l'effet de son expression sur la prolifération et aussi possiblement sur l'état de différenciation des cellules. Les meilleures lignées cellulaires devraient être des cellules pluripotentes, comme par exemple les P19 dont on peut induire la différenciation en cellules nerveuses ou musculaires. L'expression de *ZPK* dans ces cellules permettrait de vérifier si la protéine *ZPK* a un effet sur le contrôle de la prolifération et sur la différenciation de ces cellules.

Il serait aussi intéressant de vérifier le niveau d'expression du gène *ZPK* et de la protéine dans des cellules transformées proliférant de façon anarchique afin de déterminer s'il existe une corrélation entre l'expression et la prolifération. En fait, si les lignées de cellules proliférant de

façon anarchique n'expriment plus *ZPK*, il serait intéressant de vérifier si l'introduction du gène *ZPK* aura un effet négatif sur la prolifération cellulaire et aussi un effet sur le phénotype des cellules utilisées. Cette information indiquerait aussi si *ZPK* a un rôle potentiel dans le contrôle de la prolifération et de la différenciation cellulaire. Les résultats de ces expériences permettraient d'envisager un rôle de suppresseur de tumeurs pour *ZPK*.

Toutes les expériences proposées précédemment ont pour but de vérifier l'effet de l'introduction du gène *ZPK* dans des lignées de cellules n'exprimant pas *ZPK*. L'inverse est aussi réalisable. On pourrait utiliser un système qui permettrait d'exprimer un messager anti-sens à *ZPK* afin d'empêcher toute traduction du messager en protéine. On peut aussi introduire des oligonucléotides anti-sens qui vont se fixer à l'ARNm de *ZPK* et qui aura aussi un effet négatif sur la traduction. Une autre expérience qui donnerait le meilleur résultat, serait de produire un knockout du gène. Par cette technique, nous serions en mesure de déterminer à quel niveau *ZPK* joue son rôle, soit dans le développement embryonnaire ou soit dans le maintien des tissus adultes. Ces expériences permettraient non seulement d'éclaircir nos connaissances sur le rôle potentiel de *ZPK* dans la cellule mais donneraient les informations capitales sur la participation de *ZPK* dans les processus cellulaires associés à la prolifération et à la différenciation cellulaire.

Précédemment, nous avons traité de l'implication de *ZPK* (*MUK*) dans la phosphorylation de *JNK1*. Nous avons aussi présenté l'implication des protéines de la famille des *JNK* dans le processus de la régénération hépatique. Un autre fait intéressant, c'est l'homologie des patrons d'expression de *ZPK* (Blouin *et al.*, 1996) et du *c-met*, le récepteur du HGF (Wang, *et al.*, 1994). Nous savons aussi que le HGF et son récepteur sont directement impliqués dans le processus de régénération hépatique. Des résultats obtenus par hybridation *in situ* (Blouin *et al.*, 1996) de l'expression de *ZPK* dans le foie adulte ont permis de déterminer que *ZPK* est exprimé dans des hépatocytes matures qui présentent une activité mitotique. Donc il est possible de croire au rôle de *ZPK* au cours de la régénération hépatique. Pour vérifier cette hypothèse il faudrait mesurer les niveaux d'expression de *ZPK* à plusieurs temps après l'hépatectomie ainsi

que vérifier, par hybridation *in situ*, si le nombre de cellules exprimant ZPK augmentent. Avec la mise en culture d'hépatocytes, il serait possible de mesurer les niveaux de phosphorylation de ZPK lors d'une stimulation par différents agents impliqués dans la régénération hépatique, cela permettant d'identifier du même coup, des partenaires cellulaires de ZPK. Il serait aussi possible de vérifier si ZPK a un rôle dans la prolifération des cellules hépatiques par l'introduction, dans les cellules en culture, d'un système permettant d'obtenir l'expression d'un messenger anti-sens à ZPK.

Des résultats récents ont permis d'établir que HGF et son récepteur sont impliqués dans la régénération pancréatique (Calvo *et al.*, 1995). Il serait intéressant de vérifier les niveaux d'expression de ZPK ainsi que sa phosphorylation au cours de la régénération pancréatique. On sait que l'expression de ZPK se limite aux cellules acineuses, donc il faudrait vérifier si, lors de la pancréatectomie ou la pancréatite, ZPK est exprimée et sa protéine est phosphorylée dans les cellules acineuses différenciées qui se divisent. En fait, il serait intéressant de reproduire cette expérience à tous les types cellulaires, car dans le pancréas, les cellules acineuses et les cellules des Ilôts de Langerhans vont se diviser pour donner naissance à d'autres cellules acineuses et à d'autres cellules des Ilôts de Langerhans respectivement (Bonner-Weir *et al.*, 1993). Il sera aussi important d'identifier les types cellulaires qui expriment ZPK lors de la régénération de l'organe principalement dans les cellules ductales qui donnent les deux types cellulaires. Les informations pouvant être obtenues grâce à ces expériences sont capitales. En fait, elles permettront de nous renseigner sur un partenariat entre ZPK et HGF et aussi sur un rôle important dans la régénération de populations de cellules spécifiques du pancréas.

Pour vérifier le lien possible de *c-met* (HGF) et ZPK dans une même cascade de signaux intracellulaires, il s'agirait d'utiliser une lignée cellulaire qui exprime le récepteur *c-met* et ZPK simultanément. Par la suite, il faudrait placer les cellules en culture sans sérum en présence de HGF. Donc si les deux protéines sont impliquées dans une cascade commune, nous devrions observer une phosphorylation de ZPK avec une stimulation par le HGF. Puisque les cellules

seraient cultivées en l'absence de tout autre facteur de croissance, les résultats permettraient d'identifier une cascade qui implique ZPK lors de la transduction de son signal.

Toutes les expériences présentées précédemment, vont permettre d'améliorer nos connaissances sur ZPK. En fait, nous serons en mesure de conclure sur la participation de ZPK dans les processus biologiques du contrôle de la prolifération ainsi que de la différenciation cellulaire. À cause des multiples implications cellulaires des protéines kinases, il est de plus en plus important de bien comprendre leur fonctionnement normal dans le but d'agir adéquatement lors de leur dérèglement.

## ANNEXE

**Tableau 1. Les acides aminés et leurs symboles.**

ACIDES AMINÉS			CODONS							
A	Ala	Alanine	GCA	GCC	GCG	GCT				
C	Cys	Cystéine	TGC	TGT						
D	Asp	Acide aspartique	GAC	GAT						
E	Glu	Acide glutamique	GAA	GAG						
F	Phe	Phénylalanine	TTC	TTT						
G	Gly	Glycine	GGA	GGC	GGG	GGT				
H	His	Histidine	CAC	CAT						
I	Ile	Isoleucine	ATA	ATC	ATT					
K	Lys	Lysine	AAA	AAG						
L	Leu	Leucine	TTA	TTG	CTA	CTC	CTG	CTT		
M	Met	Méthionine	ATG							
N	Asn	Asparagine	AAC	AAT						
P	Pro	Proline	CCA	CCC	CCG	CCT				
Q	Gln	Glutamine	CAA	CAG						
R	Arg	Arginine	AGA	AGG	CGA	CGC	CGG	CGT		
S	Ser	Sérine	AGC	AGT	TCA	TCC	TCG	TCT		
T	Thr	Thréonine	ACA	ACC	ACG	ACT				
V	Val	Valine	GTA	GTC	GTG	GTT				
W	Trp	Tryptophane	TGG							
Y	Tyr	Tyrosine	TAC	TAT						

## BIBLIOGRAPHIE

- ADAMSON, E.D. 1990. Developmental activities of the epidermal growth factor receptor. *Curr. Top. Dev. Biol.* 24 : 1-29.
- ALBERTS, B., D. BRAY, J. LEWIS, M. RAFF, K. ROBERTS et J.D. WATSON. 1990. *Biologie moléculaire de la cellule*. Flammarion. France. 1270 p.
- AVANTAGGIATO, V., N.A. DATHAN, M. GRIECO, N. FABIEN, D. LAZZARO, A. FUSCO, A. SIMEONE et M. SANTORO. 1994. Developmental expression of the *RET* protooncogene. *Cell Growth & Differ.* 5: 305-311.
- BARD, J.B.L., J.E. MCCONNELL et J.A. DAVIES. 1994. Towards a genetic basis for kidney development. *Mech. Devel.* 48 : 3-11.
- BIRCHMEIER, C., E. SONNENBERG, K.M. WEIDNER et B. WALTER. 1993. Tyrosine kinase receptors in the control of epithelial growth and morphogenesis during development. *BioEssays.* 15 : 185-190.
- BLOUIN, R., J. BEAUDOIN, P. BERGERON, A. NADEAU et G.GRONDIN. 1996. Cell-specific expression of the ZPK gene in adult mouse tissues. *DNA Cell Biol.* 15 : 631-642.
- BONNER-WEIR, S., L.A. BAXTER, G.T. SCHUPPIN et F.E. SMITH. 1993. A second pathway for regeneration of adult exocrine and endocrine pancreas. A possible recapitulation of embryonic development. *Diabetes.* 42 : 1715-1720.
- BOUSQUET, I. et P. SARTHOU. 1995. L'apoptose : un programme de mort. *Biofutur.* 147 : 15-27.
- BRONNER-FRASER, M. 1995. Hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF) in early development: evidence for a role in neural induction. *Trends Genet.* 11: 423-425.
- CALVERT, R. et P. POTHIER. 1990. Migration of fetal intestinal intervillous cells in neonatal mice. *Anatomical Record.* 227 : 199-206.
- CALVO, E., G. PELLETIER, C. BOUCHER et J. MORISSET. 1995. C-met proto-oncogène in rat pancreas. Gene expression during ontogeny and regeneration after acute pancreatitis induced by caerulein. *Gastroenterology.* 108 : A955 (résumé)

- CHABOT, B., D.A. STEPHENSON, V.M. CHAPMAN, P. BESMER et A. BERNSTEIN. 1988. The proto-oncogene *c-kit* encoding a transmembrane tyrosine kinase receptor maps to the *W* locus. *Nature*. 335 : 88-89.
- CHIA, C.M., R.M.L. WINSTON et A.H. HANDYSIDE. 1995. EGF, TGF $\alpha$  and EGFR expression in human preimplantation embryos. *Development*. 121 : 299-307.
- DARNELL, J., H. LODISH et D. BALTIMORE. 1993. *Biologie moléculaire de la cellule*. De Boeck-Wesmael. Bruxelles. 1102 p.
- DAUÇA, M., F. BOUZIGES, C. COLLIN, M. KEDINGER, J.M. KELLER, J. SCHILT, P. SIMON-ASSMAN et K. HAFFEN. 1990. Development of the vertebrate small intestine and mechanisms of cell differentiation. *Int. J. Dev. Biol.* 34 : 205-218.
- DAVIDSON, E.H. 1990. How embryos work : a comparative view of diverse modes of cell fate specification. *Development*. 108 : 365-389.
- DIEHL, A.M. et R.M. RAI. 1996. Regulation of signal transduction during liver regeneration. *FASEB j.* 10 : 215-227.
- DOROW, D.S., L. DEVEREUX, E. DIETZSCH et T. DE KRETZER. 1993. Identification of a new family of human epithelial protein kinases containing two leucine/isoleucine-zipper domains. *Eur. J. Biochem.* 213 : 701-710.
- DOUVILLE, E., P. DUNCAN, N. ABRAHAM, et J.C. BELL. 1994. Dual specificity kinases : a new family of signal transducers. *Cancer Metastasis Rev.* 13: 1-7.
- DRAETTA, G. 1993. Cdc2 activation: the interplay of cyclin binding and Thr 161 phosphorylation. *Trends Cell Biol.* 3 : 287-289.
- DUBRUL, E.F. 1972. Fine structure of epidermal differentiation in the mouse. *J. Exp. Zool.* 181 : 145-158.
- ELLEDGE, S.J. et J.W. HARPER. 1994. Cdk inhibitors: on the threshold of checkpoints and development. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 6 : 847-852.
- EZEO, K., S.-T. LEE, K.M. STRUNK et R. SPRITZ. 1994. PTK1, a novel protein kinase required for proliferation of human melanocytes. *Oncogene*. 9 : 935-938.
- FAUSTO, N., A.D. LAIRD et E.M. WEBBER. 1995. Role of growth factors and cytokines in hepatic regeneration. *FASEB J.* 9 : 1527-1536.

- FODE, C., B. MOTRO, S. YOUSEFI, M. HEFFERNAN et J.W. DENNIS. 1994. Sak, a murine protein-serine/threonine kinase that is related to the *Drosophila* polo kinase and involved in cell proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91 : 6388-6392.
- FUCHS, E. et C. BYRNE. 1994. The epidermis: rising to the surface. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 4 : 725-736.
- FURLONG, R.A. 1992. The biology of hepatocyte growth factor/scatter factor. *BioEssays.* 14 : 613-617.
- GALLO, K.A., M.R. MARK, D.T. SCADDEN, Z. WANG, Z. GU et P.J. GODOWSKI. 1994. Identification and characterization of SPRK, a novel *src*-homology 3 domain- containing proline-rich kinase with serine/threonine kinase activity. *J. Biol. Chem.* 269 : 15092-15100.
- GHERARDI, E., J. GRAY, M. STOKER, M. PERRYMAN et R. FURLONG. 1989. Purification of scatter factor a fibroblast-derived basic protein that modulates epithelial interactions and movement. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86 : 5844-5848.
- GHERARDI, E., M. SHARPE, K. LANE, A. SIRULNIK et M. STOKER. 1993. Hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF), the c-met receptor and the behaviour of epithelial cells. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 47 : 163-181.
- GILBERT, S.F. 1994. *Developmental Biology.* Sinauer Associates. Massachusetts. USA. 894 p.
- GITTES, G.K. et W.J. RUTTER. 1992. Onset of cell-specific gene expression in the developing mouse pancreas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89 : 1128-1132.
- GOLOSOW, N. et C. GROBSTEIN. 1962. Epitheliomesenchymal interaction in pancreatic morphogenesis. *Dev. Biol.* 4 : 242-255.
- GROBSTEIN, C. 1964. Cytodifferentiation and its controls. *Science.* 143 : 643-650.
- HADLEY, M.A., S.W. BYERS, C.A. SUAREZ-QUIAN, H.K. KLEINMAN et M. DYM. 1985. Extracellular matrix regulates Sertoli cell differentiation, testicular formation, and germ cell development in vitro. *J. Cell. Biol.* 101 : 1511-1522.
- HANKS, S.K. et T. HUNTER. 1995. The eucaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J.* 9: 576-596.
- HIRAI, S., M. IZAWA, S. OSADA, G. SPYROU et S. OHNO. 1996. Activation of the JNK pathway by distantly related protein kinases, MEKK and MUK. *Oncogene.* 12 : 641-650.



- HOLT, J. 1992. Fos and Jun: inducible transcription factors regulating growth of normal and transformed cells. *Cancer Treatment & Research*. 63 : 301-311.
- HOLZMAN, L.B., S.E. MERRITT et G. FAN. 1994. Identification, molecular cloning, and characterization of a dual leucine zipper bearing kinase. *J. Biol. Chem.* 269 : 30808-30817.
- HUNTER, T. 1991. Cooperation between oncogenes. *Cell*. 64 : 249-270.
- HUNTER, T. 1995. Protein kinases and phosphatases : the yin and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell*. 80 : 225-236.
- HUNTER, T. et M. KARIN. 1992. The regulation of transcription by phosphorylation. *Cell*. 70 : 375-387.
- IMAMOTO, A., P. SORIANO et P.L. STEIN. 1994. Genetics of signal transduction : tales from the mouse. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 4 : 40-46.
- ING, Y.L., I.W.L. LEUNG, H.H.Q. HENG, L.-C. TSUI et N.J. LASSAM. 1994. *Mlk-3*: identification of a widely-expressed protein kinase bearing an SH3 domain and a leucine zipper-basic region domain. *Oncogene*. 9 : 1745-1750.
- JOHNSON, S.E., J.L. ROTHSTEIN et B.B. KNOWLES. 1994. Expression of epidermal growth factor family gene members in early mouse development. *Dev. Dynam.* 201 : 216-226.
- KATOH, M., M. HIRAI, T. SUGIMURA et M. TERADA. 1995. Cloning and characterization of MST, a novel (putative) serine/threonine kinase with SH3 domain. *Oncogene*. 10 : 1447-1451.
- KAZLAUSKA, A. 1994. Receptor tyrosine kinases and their targets. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 4 : 5-14.
- KESHET, E., S.D. LYMAN, D.E. WILLIAMS, D.M. ANDERSON, N.A. JENKINS, N.G. COPELAND et L.F. PARADA. 1991. Embryonic RNA expression patterns of the *c-kit* receptor and its cognate ligand suggest multiple functional roles in mouse development. *EMBO J.* 10 : 2425-2435.
- KOPAN, R. et H. WEINTRAUB. 1993. Mouse notch: expression in hair follicles correlates with cell fate determination. *J. Cell. Biol.* 121 : 631-641.
- LEHTONEN, E. 1975. Epithelio-mesenchymal interface during mouse kidney tubule induction in vivo. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 34 : 695-705.

MARSHALL, C.J. 1995. Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell*. 80 : 179-185.

MEETING REVIEW (Keystone Symposium). 1995. *Oncogenes: 20 years later*. *Genes & Dev.* 9 : 1289-1301.

MICHALOPOULOS, G.K. 1991. Liver regeneration : molecular mechanisms of growth control. *FASEB J.* 4 : 176-187.

MORELLO, D. et C. BABINET. 1989. *Oncogènes et développement*. *Médecine/Sciences*. 5 : 16-23.

MORGAN, D.O. 1995. Principles of CDK regulation. *Nature*. 374 : 131-134.

MOTRO, B., D. VAN DER KOOY, J. ROSSANT, A. REITH et A. BERNSTEIN. 1991. Contiguous patterns of *c-kit* and *steel* expression : analysis of mutations at the *W* and *Sl* loci. *Development*. 113 : 1207-1221.

MOUREY, R.J. et J.E. DIXON. 1994. Protein tyrosine phosphatase : characterization of extracellular and intracellular domains. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 4 : 31-39.

MUNOZ-DORADO, J., S. INOUE et M. INOUE. 1993. Eucaryotic-like protein serine/threonine kinases in *Myxococcus xanthus*, a developmental bacterium exhibiting social behavior. *J. Cell. Biochem.* 51 : 29-33.

NAKAMURA, T., K. NAWA, A. ISHIHARA. 1984. Partial purification and characterization of hepatocyte growth factor from serum of hepatectomized rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 122 : 1450-1459.

NAKAMURA, T., K. NAWA, A. ISHIHARA, N. KAISE et T. NISHINO. 1987. Purification and subunit structure of hepatocyte growth factor from rat platelets. *FEBS Lett.* 224 : 311-316.

OPPENHEIMER, S.B. et G. LEFEVRE JR. 1989. *Introduction to embryonic development*. Allyn and Bacon. Massachusetts. USA. 534 p.

PACHNIS, V., B. BALJINDER et F. COSTANTINI. 1993. Expression of the *c-ret* proto-oncogene during mouse embryogenesis. *Development*. 119 : 1005-1017.

PARTANEN, A.-M. 1990. Epidermal growth factor and transforming growth factor- $\alpha$  in the development of epithelial-mesenchymal organs of the mouse. *Curr. Top. Dev. Biol.* 24 : 31-55.

- PAWSON, T. 1994. Introduction : Protein kinases. *FASEB J.* 8 : 1112-1113.
- PAWSON, T. et A. BERNSTEIN. 1990. Receptor tyrosine kinases : genetic evidence for their role in *Drosophila* and mouse development. *Trends Genet.* 6: 350-356.
- PAWSON, T. et T. HUNTER. 1994. Oncogenes and cell proliferation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 4 : 1-4.
- PHILIPSON, L. et V. SORRENTINO. 1991. From growth arrest to growth suppression. *J. Cell. Biochem.* 46: 95-101.
- REDDY, U.R. et D. PLEASURE. 1994. Cloning of a novel putative protein kinase having a leucine zipper domain from human brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 202 : 613-620.
- RODRIGUES, G.A. et M. PARK. 1994. Oncogenic activation of tyrosine kinases. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 4: 15-24.
- ROSEN, E.M., S.K. NIGAM et I.D. GOLDBERG. 1994. Scatter factor and the c-met receptor : a paradigm for mesenchymal/epithelial interaction. *J. Cell. Biol.* 127 : 1783-1787.
- RUGH, R. 1968. The mouse, its reproduction and development. Burgess Publishing Company. Minneapolis. USA. 430 p.
- SANTOS, O.F.P., L.A. MOURA, E.M. ROSEN et S.K. NIGAM. 1993. Modulation of HGF-induced tubulogenesis and branching by multiple phosphorylation mechanisms. *Developmental Biol.* 159 : 535-548.
- SCHLESSINGER, J. 1994. SH2/SH3 signaling proteins. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 4 : 25-30.
- SCHUCHARDT, A., V. D'AGATI, B.L. LARSSON, F. COSTANTINI et V. PACHNIS. 1994. Defects in the kidney and enteric nervous system of mice lacking the tyrosine kinase receptor Ret. *Nature.* 367 : 380-383.
- SEGER, R. et E.G. KREBS. 1995. The MAPK signaling cascade. *FASEB J.* 9 : 726-735.
- SHINBROT, E., K.G. PETERS et L.T. WILLIAMS. 1994. Expression of the platelet-derived growth factor  $\beta$  receptor during organogenesis and tissue differentiation in the mouse embryo. *Developmental dynam.* 199 : 169-175.
- SIMON, T.C. et J.I. GORDON. 1995. Intestinal epithelial cell differentiation: new insights from mice, flies and nematodes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 5 : 577-586.

- SLACK, J.M.W. 1995. Developmental biology of the pancreas. *Development*. 121 : 1569-1580.
- SOLOMON, M.J. 1993. Activation of the various cyclin/cdc2 protein kinases. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 5 : 180-186.
- SOMAN, N., P. CORRERA, B. RUIZ et G. WOGAN. 1991. The TRP-MET oncogenic rearrangement is present and expressed in human gastric carcinoma and precursor lesions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 88 : 4892-4896.
- SONNENBERG, E., D. MEYER, K.M. WEIDNER et C. BIRCHMEIER. 1993. Scatter factor/hepatocyte growth factor and its receptor, the c-met tyrosine kinase, can mediate a signal exchange between mesenchyme and epithelia during mouse development. *J. Cell Biol.* 123: 223-235.
- STEIN, P.L. H. VOGEL et P. SORIANO. 1994. Combined deficiencies of Src, Fyn and Yes tyrosine kinases in mutant mice. *Genes & Dev.* 8 : 1999-2007.
- STOKER, M., E. GHERARDI, M. PERRYMAN et J. GRAY. 1987. Scatter factor is a fibroblast-derived modulator of epithelial cell motility. *Nature*. 327 : 239-242.
- TAYLOR, S.S., E. RADZIO-ANDZELM et T. HUNTER. 1995. How do protein kinases discriminate between serine/threonine and tyrosine ? Structural insights from the insulin receptor protein-tyrosine kinase. *FASEB J.* 9 : 1255-1266.
- TESSAROLLO, L., L. NAGARAJAN et L. F. PARADA. 1992. c-ros: the vertebrate homolog of the sevenless tyrosine kinase receptor is tightly regulated during organogenesis in mouse embryonic development. *Development*. 115: 11-20.
- VAN DER GEER, P., T. HUNTER et R.A. LINDBERG. 1994. Receptor protein-tyrosine kinases and their signal transduction pathways. *Annu. Rev. Cell. Biol.* 10 : 251-337.
- VASIOUKHIN, V., M.S. SERFAS, E.Y. SIYANOVA, M. POLONSKAIA, V.J. COSTIGAN, B. LIU, A. THOMASON et A.L. TYNER. 1995. A novel intracellular epithelial cell tyrosine kinase is expressed in the skin and gastrointestinal tract. *Oncogene*. 10 : 349-357.
- WANG, Y., C. SELDEN, S. FARNAUD, D. CALNAN et H.J.F. HODGSON. 1994. Hepatocyte growth factor (HGF/SF) is expressed in human epithelial cells during embryonic development; studies by in situ hybridisation and Northern blot analysis. *J. Anat.* 185 : 543-551.
- WERA, S. et B.A. HEMMINGS. 1995. Serine/threonine protein phosphatases. *Biochem. J.* 311 : 17-29.

WHITE, E. 1996. Life, death, and the pursuit of apoptosis. *Gene & Dev.* 10 : 1-15.

WILKS, A.F. 1989. Two putative protein-tyrosine kinases identified by application of the polymerase chain reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86 : 1603-1607.

WILKS, A.F. 1993. Protein tyrosine kinase growth factor receptors and their ligands in development, differentiation, and cancer. *Advances in Cancer Research.* 60 : 43-73.

YARDEN, Y. et A. ULLRICH. 1988. Growth factor receptor tyrosine kinases. *Ann. Rev. Biochem.* 57 : 443-478.