



# **Étude de la spécificité fonctionnelle des protéines adaptatrices NCK1 et NCK2**

**Thèse**

**Kevin Jacquet**

**Doctorat en biologie cellulaire et moléculaire**  
Philosophiæ doctor (Ph. D.)

Québec, Canada

# **Étude de la spécificité fonctionnelle des protéines adaptatrices NCK1 et NCK2**

**Thèse**

**Kévin Jacquet**

Sous la direction de :

Nicolas Bisson, directeur de recherche

## Résumé

Plusieurs réponses cellulaires aux stimuli extracellulaires sont transmises par des voies de signalisation qui agissent en aval de récepteurs membranaires tels les récepteurs tyrosine kinase (RTK). Les signaux provenant des RTK sont souvent relayés via des protéines adaptatrices comme NCK1 (Non-Catalytic region of tyrosine Kinase 1) et NCK2 dont les fonctions sont considérées redondantes et indissociables. Toutefois, certaines études suggèrent que chacune de ces deux protéines pourraient avoir des cibles cellulaires spécifiques et des fonctions uniques.

L'objectif de mon projet de doctorat était d'analyser la spécificité des protéines NCK1/2, c'est-à-dire d'identifier pour chacune des cibles uniques, pour ensuite caractériser ce qui génère cette spécificité tout en définissant la fonction de ces interactions.

En premier lieu, j'ai utilisé deux techniques complémentaires de protéomique, soit (i) des purifications d'affinité (AP) et (ii) du marquage de proximité *in vivo* (BioID) suivies d'analyses en spectrométrie de masse (MS) afin de caractériser les interactomes respectifs de NCK1/2. La combinaison de ces deux approches m'a permis d'identifier plus d'une centaine d'interactions spécifiques pour chaque NCK. Des analyses bio-informatiques basées sur ces résultats m'ont permises de mettre en évidence que NCK2 semble plus spécifiquement impliquée que NCK1 dans la régulation de l'organisation du cytosquelette d'actine, structure essentielle lors de la division et de la cytokinèse. En comparant simultanément des cellules fibroblastiques murines (MEF) déplétées soit pour NCK1, soit pour NCK2, j'ai remarqué que les cellules *Nck2*<sup>-/-</sup>, à l'inverse des cellules *Nck1*<sup>-/-</sup> étaient plus multinucléées et présentent un *midbody* altéré en longueur. Également, j'ai remarqué une altération dans la composition du *midbody* des cellules *Nck2*<sup>-/-</sup> tel que suggéré par l'absence dans cette structure des protéines *Polo-like kinase 1* (PLK1), *Epithelial cell transforming 2* (ECT2) ou encore Aurora B (AURKB), régulateurs clefs de la cytokinèse. Finalement, j'ai montré que la fonction de NCK2 durant la cytokinèse repose principalement sur son domaine SH2.

Dans un deuxième temps, j'ai sélectionné 27 partenaires identifiés en MS et confirmé par une méthode orthogonale leurs interactions respectives avec NCK1 et/ou NCK2. Grâce à des tests de liaison *in vitro*, j'ai déterminé que plusieurs protéines dont la Plakophiline 4 (PKP4), un régulateur de la cytokinèse, lient directement et spécifiquement NCK2. Par

différentes expériences *in vitro*, j'ai pu déterminer que NCK2 lie les portions N-terminale et centrale de PKP4 grâce à son domaine *Src Homology* (SH) 2 et que la spécificité de NCK2 envers PKP4 ne semble pas dépendre seulement des propriétés intrinsèques du SH2. L'association résulte plutôt de la combinaison d'une partie ou de l'ensemble des propriétés des domaines et régions interdomaines constituant les protéines NCK1/2.

En conclusion, bien que les fonctions de NCK1/2 soient généralement considérées comme redondantes, mes résultats démontrent que ces protéines sont capables de lier des partenaires différents pour réguler des fonctions biologiques distinctes. Ainsi, mes travaux suggèrent que NCK2 semble spécifiquement requise lors du processus de cytokinèse. De plus, l'ensemble de mes expériences *in vitro* apporte une première idée du mécanisme de spécificité des protéines NCK1/2 en suggérant que leur spécificité ne semble pas entièrement provenir des propriétés intrinsèques de leurs domaines individuels, mais plutôt d'une combinaison des propriétés de leurs domaines et/ou régions interdomaines respectives.

## Abstract

Signals from cell surface receptors are often relayed via adaptor proteins that can serve as hubs to recruit appropriate target signaling molecules and guide signals along specific pathways. Among these, adaptor proteins NCK1 (Non-Catalytic region of tyrosine Kinase 1) and NCK2 have functions that are often considered redundant and/or indistinguishable.

The main goal of my work was to demonstrate that NCK1 and NCK2 are not fully redundant and may each display functional specificity. To achieve this, I delineated NCK1- and NCK2-specific signalling networks, identified for each unique target, then characterized what generates this specificity and obtained the function of these interactions.

First, to identify the complement of interaction partners for NCK1 and NCK2, I used two unbiased mass spectrometry (MS)-based approaches: (i) epitope-tagged protein affinity purification (AP) followed by MS analysis and (ii) *in vivo* proximity labelling (BioID). The combination of these two approaches allowed me to identify more than one hundred specific interactions for each NCK. Bioinformatics analyzes based on the specific partners identified in MS enabled me to highlight that NCK2 was more specifically involved in the regulation of the actin cytoskeleton organization, structure essential for cell division and cytokinesis. By simultaneously comparing mouse embryo fibroblasts (MEF) depleted either for NCK1 or NCK2, I noticed that *Nck2*<sup>-/-</sup>, but not *Nck1*<sup>-/-</sup> cells are multi-nucleated and display extended protrusions reminiscent of intercellular bridges, which correlate with an extended time spent in cytokinesis as well as a failure of a significant proportion of cells to complete abscission. Further analysis of this phenotype revealed that the midbody of NCK2-deficient cells is not only increased in length, but also altered in composition, as judged by the mislocalization of the Polo-like kinase 1 (PLK1), Epithelial cell transforming 2 (ECT2) and Aurora B (AURKB) proteins. Moreover, I showed that NCK2 function during cytokinesis requires its SH2 domain.

Second, to underline the molecular mechanism of specific protein complex formation, I selected based on my MS results 27 partners to confirm by an orthogonal method their respective interactions with NCK1 and/or NCK2. By using *in vitro* binding assays, I was able to determine that several proteins including Plakophilin 4 (PKP4), a key regulator of the

cytokinesis process, were able to bind directly and specifically to NCK2. Through various *in vitro* experiments, I was able to determine that NCK2 binds the N-terminal and central portions of PKP4 through its SH2 domain and that the specificity of PKP4 toward NCK2 does not appear to result from the intrinsic properties of its SH2 alone. This association seems to result from the combination of some or all of the properties of the individual domains and inter-regions constituting the NCK1/2 proteins.

In conclusion, despite what is generally accepted, I showed that both NCK1 and NCK2 may form specific protein complexes, thus reflecting the functional specificity of these two adaptor proteins. I further demonstrated that NCK1 and NCK2 are not completely redundant. I also shed light on a previously uncharacterized function for the NCK2 adaptor protein in cell division. Finally, my *in vitro* experiments provide an explanation for the specificity mechanism of NCK1/2 adaptor proteins by suggesting that their specificity come from the combination of the properties of their respective domains and/or interdomain regions.

# Table des matières

<i>Résumé</i>	<i>iii</i>
<i>Abstract</i>	<i>v</i>
<i>Table des matières</i>	<i>vii</i>
<i>Liste des figures</i>	<i>xi</i>
<i>Liste des tableaux</i>	<i>xiii</i>
<i>Liste des abréviations</i>	<i>xiv</i>
<i>Remerciements</i>	<i>xvii</i>
<i>Avant-propos</i>	<i>xix</i>
<i>Introduction</i>	<i>1</i>
<b>1.1 La transmission des signaux cellulaires repose sur l'assemblage réversible de complexes signalétiques</b>	<b>1</b>
1.1.1 'Écrivain-lecteur-effaceur', un système dynamique permettant la formation réversible de complexes signalétiques et la transmission contrôlée de l'information	2
1.1.2 Protéines adaptatrices : un type particulier de lecteur impliqué dans la formation de complexes signalétiques	3
1.1.2.1 Les protéines adaptatrices, un groupe de protéines unique au cœur de la signalisation cellulaire	3
1.1.2.1.1 Découverte des protéines adaptatrices	3
1.1.2.1.2 Définition des protéines adaptatrices	4
<b>1.2 Les protéines adaptatrices NCK1 et NCK2 sont au cœur de la signalisation cellulaire</b>	<b>7</b>
1.2.1 Découverte et caractérisation initiale des protéines adaptatrices NCK1/2, deux adaptateurs aux architectures modulaires conservées	7
1.2.2 NCK1 et NCK2, deux protéines considérées comme redondantes dans leurs fonctions	9
1.2.3 Les protéines adaptatrices NCK1/2 sont impliquées dans de nombreuses fonctions biologiques	10
1.2.3.1 NCK1/2 : Des adaptateurs faisant le lien entre des récepteurs membranaires et le cytosquelette d'actine	10
1.2.3.1.1 NCK1/2 membres, du complexe WASP-WIP-ARP2/3	10
1.2.3.1.2 NCK1/2 localisent la kinase PAK1 à la membrane et favorisent la polymérisation d'actine	11
1.2.3.1.3 NCK1/2 contrôlent aussi l'état d'activation du complexe WAVE1	12
1.2.3.1.4 NCK1/2 couplent un récepteur activé à la machinerie de polymérisation d'actine	13
1.2.3.2 Les protéines adaptatrices NCK1/2 régulent plusieurs fonctions dépendantes de la polymérisation d'actine telles l'adhésion et la migration	15
1.2.3.2.1 NCK1/2 contrôlent l'adhésion en régulant les complexes des intégrines	15
1.2.3.2.2 NCK1/2 contrôlent l'organisation des jonctions adhérentes	17
1.2.3.2.3 NCK1 et NCK2 modulent la guidance axonale	17
1.2.3.3 NCK1/2, des adaptateurs essentiels au contrôle de la traduction et impliqués dans les réponses au stress du réticulum endoplasmique	19

1.2.3.3.1	NCK1/2 régulent la traduction en modulant l'état de phosphorylation de la kinase PERK	20
1.2.3.3.2	NCK1/2 régulent la réponse UPR via la kinase IRE1	20
1.2.3.3.3	La protéine adaptatrice NCK1 participe aux réponses lors d'un stress hépatique en modulant la sécrétion d'insuline	22
1.2.3.4	NCK1/2, des protéines adaptatrices aussi présentes au noyau	22
1.2.3.4.1	Observations initiales suggérant que les adaptateurs NCK1/2 puissent réguler certaines fonctions nucléaires	22
1.2.3.4.2	Découverte des premières fonctions nucléaires de NCK1/2	23
1.2.4	Régulation des protéines adaptatrices NCK1/2	26
1.2.4.1.1	L'activité de NCK1/2 est régulée par phosphorylation	26
1.2.4.1.2	Les protéines NCK1/2 sont régulées par ubiquitination	27
<b>1.3</b>	<b>Les protéines adaptatrices NCK1 et NCK2 : deux protéines uniques pouvant chacune assurer des fonctions spécifiques</b>	<b>29</b>
1.3.1	Les adaptateurs NCK1 et NCK2 : deux paralogues conservés au cours de l'évolution	29
1.3.2	NCK1 et NCK2 sont exprimées différemment dans plusieurs tissus	32
1.3.3	Des partenaires spécifiques ainsi que des fonctions uniques ont été identifiées pour chaque NCK	33
1.3.3.1	NCK1 et NCK2 assurent chacune des fonctions spécifiques via leurs interactions avec le récepteur PDGFR et les GTPases de la famille Rho	33
1.3.3.2	NCK2 régule spécifiquement la croissance et l'extension de cellules neuronales	34
1.3.3.3	Exemples isolés de spécificité pour les protéines adaptatrices NCK1 et NCK2	35
1.3.4	Conclusion	36
<b>1.4</b>	<b>Fonctions et spécificité des domaines SH2 et SH3, composantes clefs des protéines NCK1 et NCK2</b>	<b>38</b>
1.4.1	Découverte, structure, fonctions et spécificités des domaines SH2	38
1.4.1.1	Découverte et caractérisation initiale des domaines SH2	38
1.4.1.2	Caractérisation de la structure et du mode de liaison des domaines SH2	39
1.4.1.2.1	Caractérisation de la structure consensus des domaines SH2	39
1.4.1.2.2	Caractérisation du mode de liaison d'un domaine SH2 sur une tyrosine phosphorylée	41
1.4.1.2.3	Découverte de fonctions atypiques assurées par les domaines SH2	41
1.4.1.3	Étude de la spécificité des domaines SH2	42
1.4.1.3.1	Caractérisation initiale de la spécificité des domaines SH2	42
1.4.1.3.2	Découverte de l'implication des boucles EF et BG dans la spécificité des domaines SH2	44
1.4.2	Découverte, structure, fonctions et spécificité des domaines SH3	46
1.4.2.1	Découverte et caractérisation initiale des domaines SH3	46
1.4.2.2	Caractérisation de la structure des domaines SH3	47
1.4.2.2.1	Caractérisation de la structure consensus d'un domaine SH3	47
1.4.2.2.2	Caractérisation du mode de liaison d'un domaine SH3	49
1.4.2.3	Étude de la spécificité des domaines SH3	49
1.4.2.3.1	Caractérisation initiale de la spécificité des domaines SH3	49
1.4.2.3.2	La spécificité des domaines SH3 s'étend au-delà des motifs initialement envisagés	51
	Conclusion	56
<b>1.5</b>	<b>Hypothèses et objectifs</b>	<b>62</b>



**Chapitre 2 : Proteomic analysis of NCK1/2 adaptors uncovers paralog-specific interactions that reveal a new role for NCK2 in cell abscission during cytokinesis** \_\_\_\_\_ **63**

<b>2.1</b>	<b>Résumé</b> _____	<b>64</b>
<b>2.2</b>	<b>Abstract</b> _____	<b>66</b>
<b>2.3</b>	<b>Introduction</b> _____	<b>67</b>
<b>2.4</b>	<b>Results</b> _____	<b>69</b>
2.4.1	AP-MS and BioID proximity labelling delineate NCK1/2 adaptor proteins interactomes and identify specific partners for each NCK1 and NCK2 _____	69
2.4.2	<i>Nck2</i> <sup>-/-</sup> cells are multi-nucleated and display long intercellular bridges _____	71
2.4.3	NCK2, but not NCK1, localizes to the midbody during cytokinesis _____	73
2.4.4	NCK2 is required to complete cytokinesis and abscission _____	73
<b>2.5</b>	<b>Discussion</b> _____	<b>79</b>
<b>2.6</b>	<b>Experimental procedures</b> _____	<b>81</b>
2.6.1	Constructs and sequences _____	81
2.6.2	Cell culture, transfections and virus infection _____	82
2.6.3	Cell lysis and Western blotting _____	83
2.6.4	Immunofluorescence, cell labeling and microscopy _____	83
2.6.5	Experimental Design and Statistical Rationale _____	84
2.6.6	Mass spectrometry analyses _____	85
2.6.7	Network modelling and clustering analysis _____	87
2.6.8	Data availability _____	87
<b>2.7</b>	<b>Footnotes</b> _____	<b>87</b>
<b>2.8</b>	<b>References</b> _____	<b>88</b>
<b>2.9</b>	<b>Supplementary information</b> _____	<b>94</b>

**Chapitre 3 : Étude de la spécificité biochimique des protéines adaptatrices NCK1 et NCK2** \_\_\_\_\_ **100**

<b>3.1</b>	<b>Création d'un réseau d'interaction pour les protéines adaptatrices NCK1 et NCK2</b> _____	<b>100</b>
<b>3.2</b>	<b>Validation et identification de partenaires directs pour chaque protéine NCK</b> _____	<b>104</b>
3.2.1	Validation par une méthode orthogonale des interactions spécifiques ou communes identifiées en MS _____	104
3.2.2	Identification d'interacteurs directs et spécifiques pour NCK1 et NCK2 _____	107
<b>3.3</b>	<b>Caractérisation des interactions spécifiques de NCK2 avec PKP4 et CPSF6</b> _____	<b>110</b>
3.3.1	Étude de l'interaction NCK2-CPSF6 _____	110
3.3.1.1	La protéine CPSF6 _____	110
3.3.1.2	Caractérisation de l'interaction spécifique NCK2-CPSF6 _____	111
3.3.2	Étude de l'interaction NCK2-PKP4 _____	113
3.3.2.1	La protéine PKP4 _____	113
3.3.2.2	Caractérisation de l'interaction spécifique NCK2-PKP4 _____	115
3.3.2.3	Validation de l'interaction directe et spécifique entre NCK2 et PKP4 _____	115
3.3.3	Une surexpression de PKP4 abolit la spécificité pour NCK2 _____	116
3.3.4	Identification d'une région de PKP4 interagissant avec le domaine SH2 de NCK2 _____	118

<b>3.4</b>	<b>Étude des déterminants moléculaires responsables de la spécificité des protéines adaptatrices NCK1 et NCK2</b>	<b>124</b>
3.4.1	Identification de résidus clefs importants pour la spécificité du domaine SH2 de NCK2	124
3.4.2	Étude de l'implication des régions interdomaines dans la spécificité des protéines adaptatrices NCK1/2	130
<b>3.5</b>	<b>Discussion</b>	<b>133</b>
3.5.1	NCK1 et NCK2 interagissent chacun avec des partenaires spécifiques	134
3.5.2	Le mécanisme d'interaction entre NCK2 et PKP4 reste à déterminer	135
3.5.3	Influence des régions interdomaines de NCK1/2 dans leur spécificité respective	137
<b>3.6</b>	<b>Matériel et méthodes</b>	<b>142</b>
3.6.1	Constructions et clonage	142
3.6.2	Culture cellulaire	143
3.6.3	Immunoprécipitations	143
3.6.4	Immunobuvardages et anticorps	144
3.6.5	Traduction <i>in vitro</i>	144
3.6.6	Essais de liaison	145
3.6.7	Essai de liaison direct ( <i>Far western</i> )	145
3.6.8	Essai phosphatase	145
3.6.9	Réseau peptidique ( <i>Peptide array</i> )	146
3.6.10	Spectrométrie de masse	146
3.6.11	Analyses informatiques	146
	<b>Chapitre 4 : Discussion générale</b>	<b>147</b>
<b>4.1</b>	<b>NCK1 et NCK2, deux protéines adaptatrices capables de lier des partenaires spécifiques à travers certains mécanismes de spécificité impliquant plus que leurs domaines individuels</b>	<b>147</b>
4.1.1	NCK2 lie PKP4 via un mécanisme complexe	147
4.1.1.1	L'oligomérisation de PKP4 pourrait expliquer son interaction avec NCK2	149
4.1.2	Les domaines SH2 : le classique, l'atypique et le versatile	149
4.1.3	NCK1 et NCK2 interagissent avec des partenaires spécifiques tel PKP4 via un mécanisme de spécificité impliquant les régions interdomaines	151
4.1.4	Les régions interdomaines de NCK1/2 pourraient moduler la spécificité de leurs différents domaines SH2 et SH3	152
<b>4.2</b>	<b>NCK2, un régulateur inattendu de la cytokinèse</b>	<b>154</b>
<b>4.3</b>	<b>NCK2, régulateur inconnu des jonctions serrées?</b>	<b>156</b>
	<b>Conclusion générale</b>	<b>160</b>
	<b>Bibliographie des chapitres 1,2 et 4</b>	<b>161</b>
	<b>Annexe 1 : Ensemble des peptides utilisés pour l'approche de peptide array</b>	<b>181</b>
	<b>Annexe 2 : Couverture du journal MOLECULAR &amp; CELLULAR PROTEOMICS, Vol. 17, Issue 10, 1 Oct. 2018</b>	<b>182</b>

## Liste des figures

<b>Figure 1. 1</b> : L'assemblage réversible de complexes signalétiques repose sur un système d'écrivain-effaceur-lecteur. _____	2
<b>Figure 1. 2</b> : L'organisation et la nucléation de réseaux de signalisation reposent sur trois grands types de protéines aux propriétés différentes : les protéines adaptatrices, les protéines d'échafaudage et les protéines d'arrimage. _____	5
<b>Figure 1. 3</b> : Chaque protéine adaptatrice présente une architecture modulaire unique. _____	6
<b>Figure 1. 4</b> : Les domaines SH2 et SH3 des protéines adaptatrices NCK1/2 sont similaires. _____	8
<b>Figure 1. 5</b> : NCK1/2 contrôlent l'organisation du cytosquelette d'actine de nombreuses manières. _____	14
<b>Figure 1. 6</b> : NCK1/2 sont au cœur des complexes protéiques impliqués dans la migration cellulaire. _____	16
<b>Figure 1. 7</b> : NCK1/2, des adaptateurs impliqués dans le contrôle du stress du réticulum endoplasmique. _____	21
<b>Figure 1. 8</b> : Les protéines adaptatrices NCK1 et NCK2 sont impliquées dans la régulation des dommages à l'ADN. _____	25
<b>Figure 1. 9</b> : Les protéines adaptatrices NCK1 et NCK2 sont régulées par phosphorylation et/ou ubiquitination. _____	27
<b>Figure 1. 10</b> : La duplication du gène NCK serait survenue à la base des vertébrés. _____	31
<b>Figure 1. 11</b> : Les protéines adaptatrices NCK1 et NCK2 sont exprimées de façon différentielle chez l'humain et la souris. _____	32
<b>Figure 1. 12</b> : NCK1 et NCK2 assurent simultanément des fonctions redondantes et spécifiques. _____	37
<b>Figure 1. 13</b> : L'ensemble des domaines SH2 présente une structure secondaire et tertiaire conservée. _____	40
<b>Figure 1. 14</b> : Représentation schématique des différents mécanismes de spécificité SH2-dépendant. _____	45
<b>Figure 1. 15</b> : L'ensemble des domaines SH3 présente une structure secondaire et tertiaire similaire. _____	48
<b>Figure 1. 16</b> : Représentation schématique de l'organisation de la surface d'un domaine SH3. _____	51
<b>Figure 1. 17</b> : Exemples de mécanismes de spécificité utilisés par les domaines SH3 de CRK et NCK2. _____	52
<b>Figure 1. 18</b> : Représentation schématique des différents mécanismes expliquant la sélectivité des domaines SH3. _____	54
<b>Figure 2. 1</b> : NCK adaptor proteins AP-MS and BioID interactome reveals targets specifically associated with NCK1 or NCK2. _____	70
<b>Figure 2. 2</b> : <i>Nck2</i> <sup>-/-</sup> cells are multi-nucleated and display long protrusions. _____	72
<b>Figure 2. 3</b> : NCK2 but not NCK1 localizes to the midbody during cytokinesis. _____	75
<b>Figure 2. 4</b> : NCK2 is required to complete cytokinesis and abscission. _____	76
<b>Figure 2. 5</b> : NCK2 regulation of cytokinesis is dependent on its SH2 domain. _____	78

<b>Figure 2.S. 1</b> : Validation of the expression and localisation of Flag-NCK1/2 or Flag-BirA*- NCK1/2 in HEK293 cells. _____	95
<b>Figure 2.S. 2</b> : NCK2-depleted HEK293T cells are multi-nucleated and display long protrusions. _____	96
<b>Figure 2.S. 3</b> : Cytokinesis delay and abscission failure in <i>Nck2</i> <sup>-/-</sup> cells. _____	97
<b>Figure 2.S. 4</b> : NCK2-depleted 293T cells fail to complete abscission. _____	98
<b>Figure 2.S. 5</b> : ECT2 cytokinesis localization is altered in <i>Nck2</i> <sup>-/-</sup> cells. _____	99
<b>Figure 3. 1</b> : La caractérisation des interactomes des protéines NCK1 et NCK2 a révélé des interacteurs spécifiques pour chacun de ces adaptateurs. _____	102
<b>Figure 3. 2</b> : Expression des partenaires sélectionnés. _____	106
<b>Figure 3. 3</b> : Chaque NCK interagit avec un ou plusieurs partenaires spécifiques. _____	107
<b>Figure 3. 4</b> : CPSF6, PXN et PKP4 interagissent directement et spécifiquement avec NCK2. _____	109
<b>Figure 3. 5</b> : Représentation schématique de la protéine CPSF6 et validation de son anticorps spécifique. _____	111
<b>Figure 3. 6</b> : PKP4 interagit directement avec le domaine SH2 de NCK2. _____	112
<b>Figure 3. 7</b> : Représentation schématique de la protéine PKP4 et validation de son anticorps spécifique. _____	114
<b>Figure 3. 8</b> : Une surexpression de PKP4 abolit sa liaison spécifique avec NCK2. _____	117
<b>Figure 3. 9</b> : La région centrale de PKP4 permet l'interaction directe avec NCK2. _____	121
<b>Figure 3. 10</b> : La portion N-terminale de PKP4 ne lie pas NCK2 d'une manière phosphotyrosine dépendante. _____	122
<b>Figure 3. 11</b> : 17 acides aminés varient entre les domaines SH2 de NCK1 et NCK2. _____	125
<b>Figure 3. 12</b> : Les acides aminés différents entre les domaines SH2 de NCK1/2 ne sont pas situés proche de l'interface de liaison au peptide. _____	127
<b>Figure 3. 13</b> : Une inversion des domaines SH2 entre NCK1/2 n'est pas suffisante pour commuter la spécificité de ces protéines envers PKP4. _____	128
<b>Figure 3. 14</b> : La spécificité des protéines adaptatrices NCK1/2 est modulée par leurs régions interdomaines. _____	132
<b>Figure 3. 15</b> : PKP4 déphosphorylé conserve sa capacité à lier NCK2. _____	137
<b>Figure 3. 16</b> : La spécificité des domaines SH2 de NCK1/2 pourrait être régulée par le contexte dans lesquels ils se trouvent. _____	138
<b>Figure 3. 17</b> : Les régions interdomaines de NCK1 sont plus conservées que celles de NCK2. _____	140
<b>Figure 3. 18</b> : La spécificité des domaines SH2/SH3 des protéines NCK1/2 pourrait être modulée par les contextes dans lesquels ils se trouvent. _____	141
<b>Figure 4. 1</b> : Données complémentaires permettant d'envisager les rôles de NCK2 durant l'étape de cytokinèse. _____	156
<b>Figure 4. 2</b> : Modèle détaillant les fonctions possibles de NCK2 durant la cytokinèse. _____	158

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1. 1 :</b> Implications respectives des protéines adaptatrices NCK1 et NCK2 dans la régulation des kinases régulant dans la réponse UPR. _____	19
<b>Tableau 1. 2 :</b> Classification en 3 grands groupes des domaines SH2 basée sur leurs séquences primaires et motifs OPAL préférentiellement liés. _____	43
<b>Tableau 1. 3 :</b> Tableau récapitulatif des différents groupes de domaines SH3 ainsi que les motifs qu'ils reconnaissent. _____	55
<b>Tableau 1. 4 :</b> Récapitulatif des partenaires de NCK1/2 recensés dans la littérature. _____	57
<b>Tableau 3. 1 :</b> Récapitulatif de l'ensemble des partenaires de NCK1 et NCK2 identifiés par AP-MS et BioID. _____	103
<b>Tableau 3. 2 :</b> Tableau cataloguant les 37 partenaires initialement sélectionnés pour le suivi. _____	105

## Liste des abréviations

ABI1/2: *Abl Interactor 1/2*  
Abl: Abelson  
ADF: *Actin depolymerizing factors*  
ADNc: ADN complémentaire  
ADP: Adénosine diphosphate  
AP: Purification d'affinité  
AP-MS: Purifications d'affinité suivies d'analyses en spectrométrie de masse  
ARM: Armadillo  
ARNi: ARN interférant  
ARP2/3: *Actin-related protein-2/3*  
ATF4: *Activating transcription factor 4*  
ATM: *Ataxia telangiectasia mutated*  
ATP: Adénosine triphosphate  
ATR: *Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein*  
AURKB: Aurora B  
BCR: *Breakpoint cluster region protein*  
BioID: Marquage de proximité *in vivo*  
BSA: *Bovine serum albumin*  
c-AMP: *Cyclic adenosine monophosphate*  
*C. Elegans*: *Caenorhabditis elegans*  
CBL: *Casitas B-lineage Lymphoma*  
CHK2: *Checkpoint kinase 2*  
CIT: *CITRON Kinase*  
CPSF6: *Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 6*  
CRISPR: *Clustered regularly interspaced short palindromic repeats*  
CRK: *CT10 Regulator of Kinase*  
*D. melanogaster*: *Drosophila melanogaster*  
DD: *Death domain*  
DED: *Death effector domain*  
DLC-1: *Deleted in liver cancer 1*  
DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle's medium*  
Dock: *Dreadlock*  
DOCK1: *Dedicator of cytokinesis protein 1*  
DOK1: *Docking Protein 1*  
DOK2: *Docking Protein 2*  
ECT: Extrait cellulaire total  
ECT2: *Epithelial cell transforming 2*  
EGFR: *Epidermal growth factor receptor*  
EIF2: Facteur eucaryotique d'initiation de la traduction 2  
EML1: *Echinoderm microtubule-associated protein-like 1*  
EPH: *Erythropoietin-producing human hepatocellular*  
FADD: *Fas-associated protein with death domain*  
FSC: Virus de sarcome de Fujinami  
FP: Fluorescence polarisée

GAB1: *GRB2-associated-binding protein 1*  
 GAP: *GTPase-activating proteins*  
 GEF: *Guanine nucleotide exchange factors*  
 GIT1: *ARF GTPase-activating protein GIT1*  
 GK : *Guanylate kinase*  
 GRB: *Growth factor Receptor-Bound*  
 GST: *Glutathione S-transferase*  
 HCK: *Hematopoietic cell kinase*  
 HEK293T: *Human embryonic kidney cells 293*  
 HL60: *Human Leukemia 60*  
 HnRNPK: *Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K*  
 HRI: *Heme-regulated eIF2 $\alpha$  kinase*  
 ILE: *Isoleucine*  
 ILK: *Integrin-linked protein kinase*  
 IP: *Immunoprécipitation*  
 IPP: *Interaction protéine-protéine*  
 IRE1: *Inositol-requiring enzyme 1*  
 ITC: *Titration calorimétrique isotherme*  
 kDa: *kilodaltons*  
 LIMK1: *Kinase à domaine LIM 1*  
 LIMS1: *LIM and senescent cell antigen-like-containing domain protein 1*  
 MBP : *Maltose-binding protein*  
 MDCK: *Madin-Darby Canine Kidney cells*  
 MINK: *Misshapen-like kinase*  
 MS: *Mass spectrometry*  
 MuLV: *Virus de la leucémie murine*  
 LCK: *Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase (LCK)*  
 MEF: *Mouse embryo fibroblasts*  
 N: *Asparagine*  
 NCK: *Non-catalytic region of tyrosine kinase*  
 NES: *Nuclear export signal*  
 NIK: *Nck-interacting kinase*  
 NLS: *Nuclear localisation signal*  
 NPF: *Nucleation Promoting Factors*  
 NXF1: *Nuclear RNA export factor 1*  
 OPAL: *Oriented Peptide Array Library*  
 P53: *Tumor protein 53*  
 PAK1: *p21-activated Kinase*  
 PXN : *Paxilline*  
 PDB: *Protein Data Bank*  
 PDGFR: *Platelet-derived growth factor receptor*  
 PDZ : *PSD-95-Dlg1-ZO-1*  
 PEI: *Polyethylenimine*  
 PH: *Plekstrin homology*  
 PI(3)K: *Phosphatidylinositol-3-OH kinase*  
 PIP2: *Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*  
 PERK: *PKR-like endoplasmic reticulum kinase*

PKP4: *Plakophilin 4*  
PKR: *Protein kinase R*  
PLC $\gamma$ : Phospholipase C gamma  
PLK1: *Polo-like kinase 1*  
PPII: Hélice polyproline-2  
PRC1: *Protein required for cytokinesis 1*  
PTB: *Phosphotyrosine-binding domain*  
PTP1B: Protéine phosphatase non-récepteur 1B  
PV: Pervanadate  
PXN: Paxilline  
PxxP: Poly-proline  
PxxR: Proline-Arginine  
pY: Phosphotyrosine ou tyrosine phosphorylée  
R: Arginine  
RCPG: Récepteur couplé aux protéines G  
RE: Réticulum endoplasmique  
RING : *Really Interesting New Gene*  
ROBO: *Roundabout homolog*  
RSV: Virus de sarcome de Roux  
RT: *Room temperature*  
RTK: Récepteur tyrosine kinase  
*S. cerevisiae*: *Saccharomyces cerevisiae*  
SAM : *Sterile alpha motif*  
SAM68: *SRC-Associated substrate in Mitosis of 68 kDa*  
SBP: *Streptavidin-Binding Peptide*  
SH2: *SRC homology 2*  
SH3: *SRC homology 3*  
SOCS7: *Suppressor of Cytokine Signaling-7*  
TCR: *T-cell receptor*  
TJP1: *Tight junction protein ZO-1*  
UPR: *Unfolded protein response*  
VAL: Valine  
W: Tryptophane  
WASF1/WAVE1: *Wiskott-Aldrich syndrome protein family member 1*  
WASP: *Wiskott–Aldrich Syndrome protein*  
WIP: *Wiskott-Aldrich Syndrome Protein-interacting Protein*  
XBP1: *X-box binding protein 1*



## Remerciements

La réalisation de ce projet de doctorat fût pour moi une longue aventure parsemée de défis mais aussi remplie de rencontres et de succès. Il est l'aboutissement d'un chapitre important de ma vie pour lequel je ne remercierai jamais assez tous les acteurs qui y ont participé.

En premier lieu, je tiens à remercier le Dr Nicolas Bisson pour avoir accepté de diriger mes travaux. Le Dr Bisson m'a, dès le début de mon doctorat, accordé sa confiance en m'octroyant beaucoup de liberté que j'ai utilisée pour développer mon autonomie, ma réflexion et mon esprit critique. Un grand merci pour toutes les opportunités qui m'ont été offertes, tant expérimentales que professionnelles. Je souhaite également le remercier pour son soutien, ses conseils mais aussi, pour sa disponibilité. Il a toujours su trouver le temps pour me rencontrer et me conseiller, quelle que soit la situation.

J'aimerais ensuite chaleureusement remercier mes collègues et amis. Merci François pour ta bonne humeur, ton soutien et tes sacres si caractéristiques! Merci JC, Ugo, Noémie, Stéphanie, Pascale, Niraj pour les très bons moments passés au lab, mais aussi à l'extérieur. Du zoo Saint-Félicien aux ailes de poulet du pub en passant par les discussions philosophiques arrosées de bonne bière québécoise, je n'oublierai jamais ces moments en votre compagnie.

Également, je tiens à remercier ma compagne Sara dont le rôle dans la réalisation de ce projet de thèse a été plus que précieux. Je la remercie pour son soutien, ses conseils et sa compagnie lors des longues soirées passées au lab.

Je voudrais aussi remercier les différentes personnes que j'ai côtoyées au centre de recherche et au-delà pour leurs conseils et leur support. Je remercie le Dr Sabine Elowe, Mike, Carl, le Dr Louise Larose, le Dr Mathieu Laplante, le Dr Stephane Anger et aussi les membres de la plateforme de protéomique du CHUL.

Merci également aux Dr Patrick Laprise et Dr Carl Seguin pour m'avoir temporairement accueilli dans leurs laboratoires respectifs. Grâce à ces différentes

opportunités, j'ai pu découvrir de nouveaux sujets et ainsi élargir mes connaissances scientifiques.

Un grand merci à mes parents et à mon frère pour leur soutien tout au long de ces années. Merci pour les nombreux colis qui m'ont permis d'avoir un petit coin de France ici à Québec. Merci pour les virées à La Rochelle, les nombreuses parties de pêche et sorties en bateau grâce auxquelles, j'ai pu me vider la tête, me ressourcer et entamer une nouvelle année de doctorat plein d'énergie.

Finalement, je souhaiterais remercier l'ensemble des membres de mon jury pour avoir accepté d'évaluer mon travail.

## Avant-propos

Les protéines NCK1 (Non-Catalytic region of tyrosine Kinase 1) et NCK2 sont deux protéines impliquées dans la transmission du signal un aval de RTK activés. Les fonctions de ces deux adaptateurs sont souvent considérées redondantes et indissociables (Labelle-Côté and Larose, 2011).

Toutefois, un certain nombre d'études isolées ont suggéré que contrairement à ce qui est admis, les protéines adaptatrices NCK1 et NCK2 ne seraient pas complètement redondantes dans leurs fonctions et pourraient chacune s'associer avec des partenaires uniques afin de réguler des fonctions distinctes (Cowan and Henkemeyer, 2001; Guan *et al.*, 2009; Buvall *et al.*, 2013). Ainsi, l'origine de la spécificité de chacune de ces protéines ainsi que les partenaires spécifiques et processus biologiques distincts que chacune de ces protéines régule restent à ce jour incompris.

J'ai initié mon projet de doctorat en utilisant deux approches complémentaires de MS afin de caractériser les interactomes des protéines adaptatrices NCK1 et NCK2. J'ai ainsi constaté que NCK1 et NCK2 interagissent chacun avec des partenaires spécifiques. Ces différences m'ont permis de bâtir les deux grands axes directeurs de mon projet de doctorat à savoir i) étudier la spécificité fonctionnelle de NCK1/2 et ii) identifier des éléments à l'origine de cette spécificité.

Pour l'étude de la spécificité fonctionnelle de NCK1/2 (chapitre 2), différentes analyses bioinformatiques m'ont permis de suggérer que contrairement à NCK1, NCK2 serait plus impliqué dans le remodelage du cytosquelette d'actine. J'ai ensuite choisi de comparer des cellules murines déplétées soit pour NCK1 soit pour NCK2 afin d'identifier des différences entre ces deux lignées. L'observation dans la condition *Nck2*<sup>-/-</sup> d'un nombre important de cellules multinucléés ou toujours connectées par des ponts cytoplasmiques m'a poussé à caractériser un rôle NCK2 spécifique lors de la cytokinèse, processus hautement dépendant du remodelage du cytosquelette d'actine. Ces travaux ont non seulement permis pour la première fois la caractérisation des interactomes des protéines NCK1/2, mais ont aussi mis en évidence un phénotype NCK2 spécifique. Ainsi, mes résultats démontrent que contrairement à ce qui est admis, les protéines adaptatrices NCK1 et NCK2 ne sont pas complètement redondantes dans leurs fonctions.

Ces études ont été réalisées avec l'aide de l'étudiante Sara Banerjee, mais aussi grâce à l'assistance du Dr François Chartier. Ce projet a fait l'objet d'un article publié en juillet 2018 dans le journal *Molecular & Cellular Proteomics*. J'ai contribué à l'intégralité des figures avec l'aide de mes collègues, effectué toutes les analyses et aidé le Dr Nicolas Bisson et le Dr Elowe dans la rédaction de cet article. Ma contribution à cet ouvrage est évaluée à 80%.

Le second axe de ma thèse (chapitre 3) regroupe un certain nombre de résultats non publiés permettant une analyse approfondie des éléments pouvant conférer aux protéines NCK1/2 leurs spécificités. Ces études ont été réalisées avec l'aide du Dr François Chartier. J'ai effectué la majorité des analyses et ma contribution à cette partie est évaluée à 90%.

# Introduction

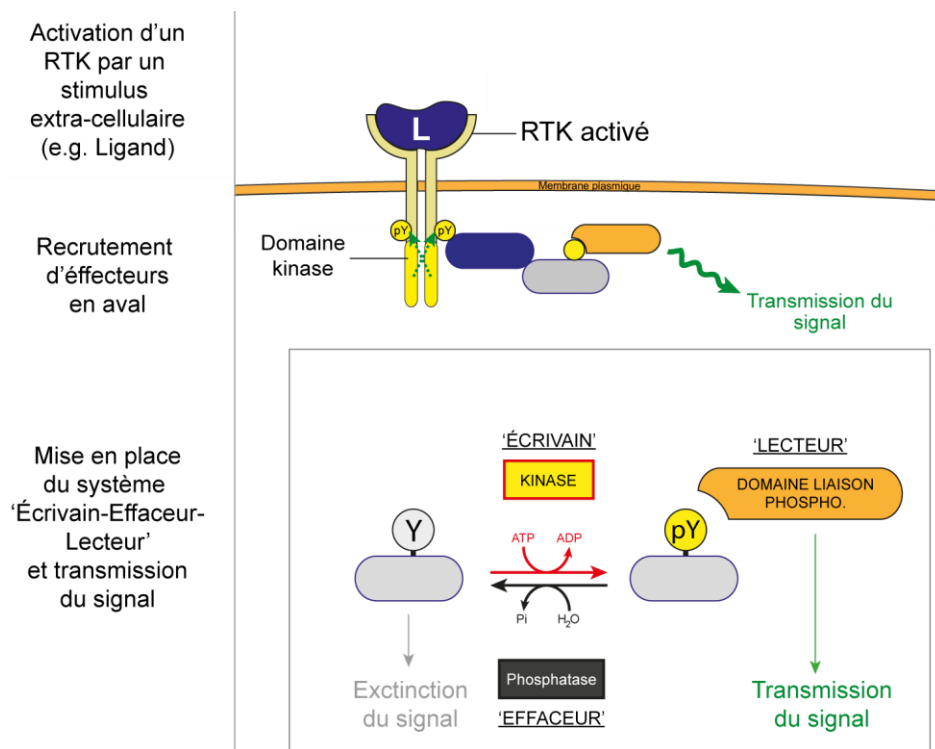
Mon projet de doctorat s'est concentré sur l'étude de la spécificité fonctionnelle des protéines adaptatrices NCK1 et NCK2 pour démontrer que contrairement à ce qui était largement accepté, chacune de ces protéines peut interagir avec des partenaires spécifiques pour réguler des fonctions distinctes. Afin d'aborder ce sujet, l'introduction sera divisée en 4 grandes parties : i) l'organisation des réseaux de signalisation et le rôle des protéines adaptatrices dans ceux-ci, ii) les adaptateurs NCK1 et NCK2 et leur redondance dans les différentes fonctions biologiques qu'ils exercent, iii) les évidences qui soutiennent que NCK1 et NCK2 peuvent chacun interagir avec des partenaires uniques pour assurer des fonctions distinctes et iv) la description des modules d'interaction protéiques constituant NCK1/2 soit, les domaines *SRC homology* (SH) 2 et SH3 et les différences entre ceux qu'arborent NCK1 et NCK2.

## 1.1 La transmission des signaux cellulaires repose sur l'assemblage réversible de complexes signalétiques

Les cellules s'adaptent à leur environnement grâce à leur capacité à répondre à des stimuli extracellulaires. Ces réponses spécifiques et appropriées à un stimulus précis passent par une détection efficace de ce signal notamment grâce à des récepteurs membranaires tels les récepteurs tyrosine kinase (RTK) (Lemmon and Schlessinger, 2010). Ces derniers transmettent ensuite l'information au niveau intracellulaire le long de voies de signalisation agissant de façon coordonnée afin de permettre une intégration précise et optimale du signal. Ces voies de signalisation peuvent être décomposées en sous-ensembles de complexes protéiques interagissant de façon réversible et contrôlée les uns avec les autres. Ces complexes assurent la transmission de l'information jusqu'à des effecteurs terminaux tels des facteurs de transcription permettant l'initiation d'une réponse cellulaire adéquate (Zhang, Liu and Tu, 2002).

### 1.1.1 'Écrivain-lecteur-effaceur', un système dynamique permettant la formation réversible de complexes signalétiques et la transmission contrôlée de l'information

Différents types de protéines interviennent au sein des complexes précédemment décrits et participent activement à la dynamique signalétique. Premièrement, des protéines 'écrivains' telles les kinases sont spécialisées dans la mise en place ou l'écriture de modifications transitoires dites post-traductionnelles telle la phosphorylation. Ces modifications permettent le recrutement spatiotemporel de partenaires d'interaction, dit lecteurs, car capables de lire ces modifications. Ces lecteurs permettent la formation afférente de sous-ensembles protéiques discrets et participent à la propagation du message (Pawson, 2004). Une fois l'information transmise, des protéines phosphatases ou 'effaceurs' dotées d'une action antagoniste aux kinases sont chargées d'éliminer ces modifications et favorisent ainsi l'extinction du signal (Fig. 1.1).



**Figure 1. 1 : L'assemblage réversible de complexes signalétiques repose sur un système d'écrivain-effaceur-lecteur.**

Une fois un RTK activé par un stimulus extracellulaire telle la liaison d'un ligand (noté L) sur sa portion extracellulaire, ce dernier pourra s'autophosphoryler (indiqué par des flèches pointillées vertes) grâce à son domaine kinase. Une ou plusieurs de ces phosphorylations

permettront l'assemblage de complexes signalétiques impliquant le système d'écrivain-lecteur-effaceur. Comme représentée dans la partie inférieure, une protéine écrivain telle une kinase pourra phosphoryler un membre du complexe sur une tyrosine (notée Y) par hydrolyse d'adénosine triphosphate (ATP) en adénosine diphosphate (ADP). Cette modification post-traductionnelle pourra ensuite être reconnue par lecteur en aval qui, à son tour, assurera le recrutement d'effecteurs et la transmission du signal. À l'inverse, la transmission de l'information pourra être abolie par un effaceur telle une phosphatase spécialisée dans la déphosphorylation du résidu reconnu par le lecteur.

L'organisation spatiotemporelle des différents réseaux de signalisation régulés de façon fine, spécifique et réversible repose en grande partie sur ce type de système 'écrivain, lecteur et effaceur' (Jin and Pawson, 2012). Selon leurs compositions et les fonctions qu'elles exercent, plusieurs grandes classes de protéines lecteurs telles les protéines adaptatrices participent à l'organisation des réseaux de signalisation.

### **1.1.2 Protéines adaptatrices : un type particulier de lecteur impliqué dans la formation de complexes signalétiques**

Parmi les huit milliards de molécules protéiques individuelles présentes au sein d'une cellule de mammifère (Milo *et al.*, 2009), 10% assurent la fonction de lecteur et participent à la formation des complexes signalétiques précédemment décrits (Sims and Allbritton, 2007; Milo *et al.*, 2009). Parmi celles-ci, plusieurs catégories de protéines aux fonctions proches telles les protéines d'échafaudage, d'arrimage ou encore les protéines adaptatrices jouent un rôle clef dans la transmission du signal et l'orientation de l'information dans la voie cellulaire appropriée. Mes travaux se sont concentrés sur les protéines adaptatrices.

#### **1.1.2.1 Les protéines adaptatrices, un groupe de protéines unique au cœur de la signalisation cellulaire**

##### **1.1.2.1.1 Découverte des protéines adaptatrices**

Le groupe des protéines adaptatrices a été envisagé suite à la découverte en 1988 de la protéine *CT10 Regulator of Kinase* (CRK), une petite protéine sans activité suffisante pour

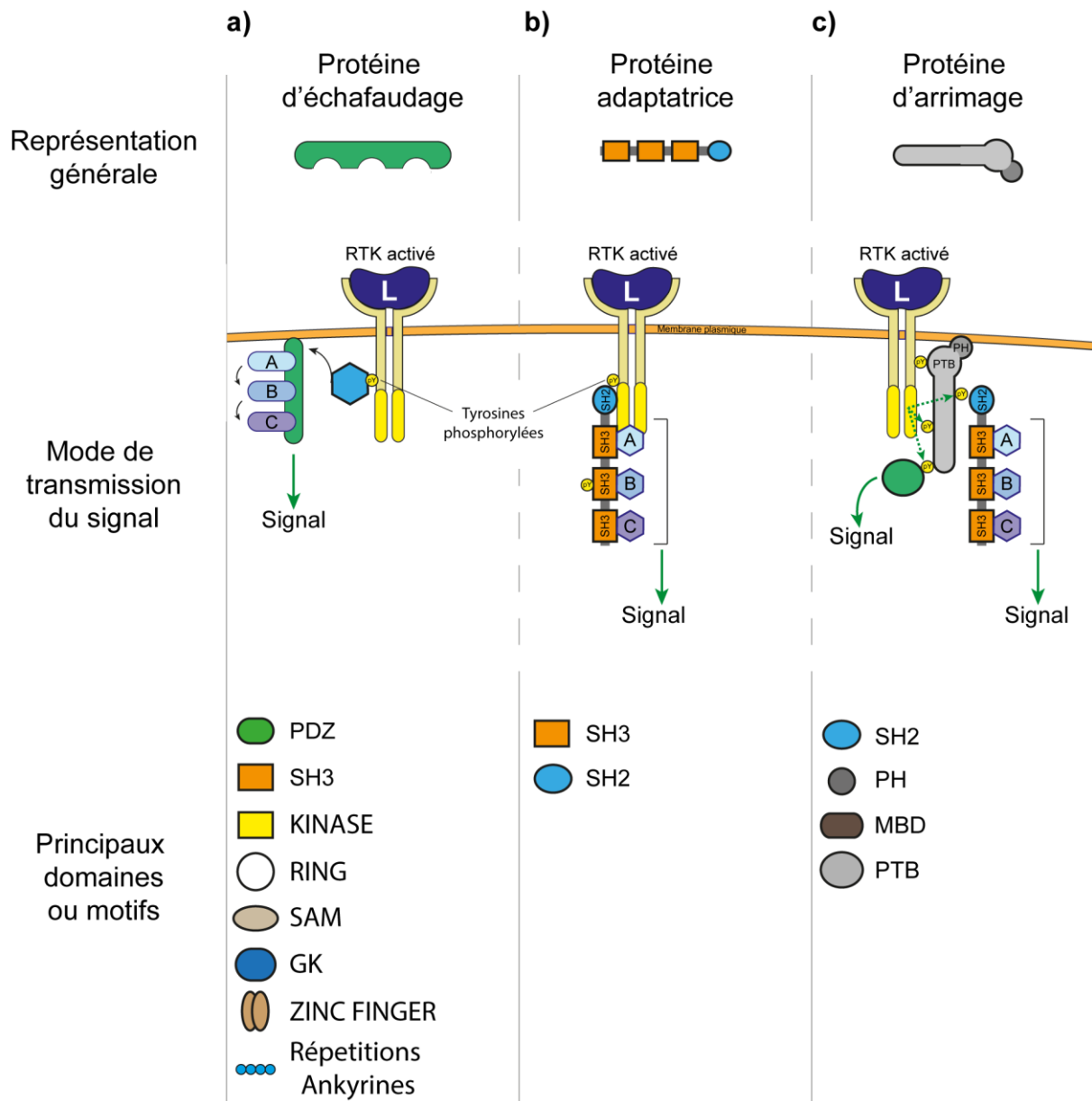
induire la transformation cellulaire (B. J. Mayer, Hamaguchi and Hanafusa, 1988). Par la suite, la découverte de protéines similaires telles NCK1 (Lehmann, Riethmüller and Johnson, 1990), NCK2 (Margolis *et al.*, 1992) ou encore la protéine *Growth factor Receptor-Bound 2* (GRB2) (Matuoka *et al.*, 1992), a engendré la création d'une nouvelle classe de protéines dites adaptatrices.

#### 1.1.2.1.2 Définition des protéines adaptatrices

Une protéine adaptatrice a été initialement définie comme une protéine composée uniquement de domaines d'interaction de type SH2 et SH3 séparés ou non par des régions interdomaines, ayant pour fonction principale d'assurer la formation de complexes signalétiques en promouvant les interactions protéine-protéine (Koch *et al.*, 1991). Ces protéines se distinguent des protéines d'échafaudage ou d'arrimage principalement par l'absence d'activité catalytique et l'absence de séquences spécifiques dans des régions désordonnées telles des séquences de ciblage à la membrane (Fig. 1.2).

Leur fonction principale consiste à, suite à l'activation d'un récepteur donné, lier et rassembler des effecteurs cytoplasmiques proximaux fondamentalement requis dans la mise en place de la réponse cellulaire au niveau du récepteur activé (Flynn, 2001). La première partie de cette fonction est assurée par leur domaine SH2 spécialisé dans la reconnaissance des tyrosines phosphorylées (pY), par exemple celles présentes sur un récepteur activé. Deuxièmement, grâce à leurs domaines SH3 capables de lier des motifs poly-proline (PxxP) ou proline-arginine (PxxR) présents dans un grand nombre de protéines cytoplasmiques, les protéines adaptatrices permettent le recrutement des effecteurs requis au niveau du récepteur activé (Feng *et al.*, 1994). Ainsi, les protéines adaptatrices assurent le couplage entre effecteurs cytoplasmiques et récepteur activé permettant la conversion efficace et régulée d'un signal de phosphorylation issu de l'activation d'un récepteur en signal afférent spécifique (Fig. 1.2b). Parmi les exemples les plus cités, nous pouvons mentionner l'interaction des protéines adaptatrices NCK1 et NCK2 avec le RTK *Platelet-derived growth factor receptor* (PDGFR) pour réguler le remodelage du cytosquelette d'actine (Buday, Wunderlich and Tamás, 2002; Rivera *et al.*, 2006).



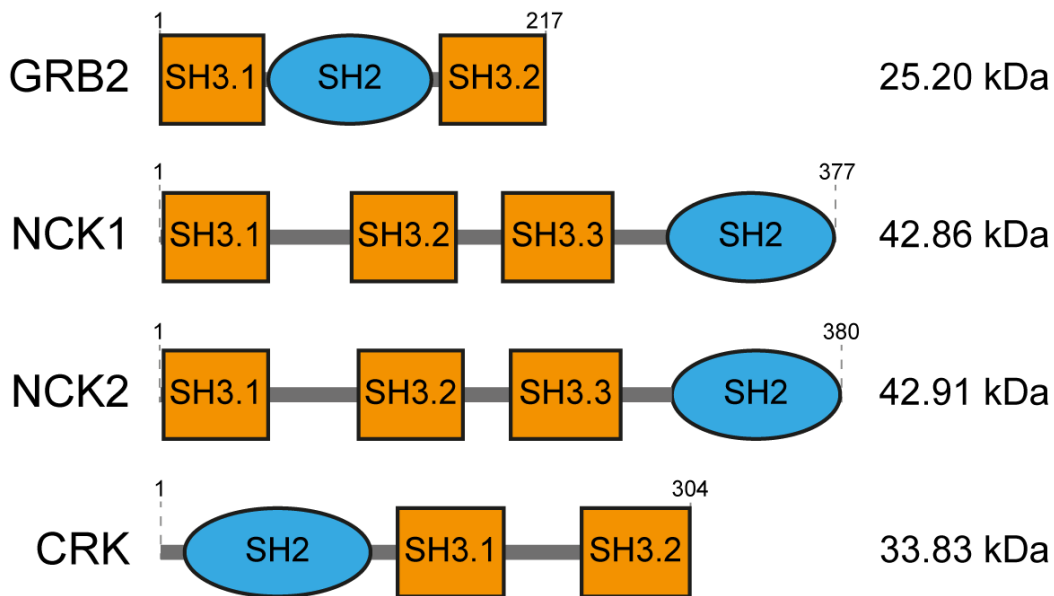


**Figure 1. 2 : L'organisation et la nucléation de réseaux de signalisation reposent sur trois grands types de protéines aux propriétés différentes : les protéines adaptatrices, les protéines d'échafaudage et les protéines d'arrimage.**

a) Les protéines d'échafaudage se distinguent des protéines adaptatrices par leur taille plus importante ainsi que par la diversité de domaines pouvant les composer. Celles-ci peuvent présenter ou non une activité catalytique et constituent des plateformes d'assemblage en aval d'un récepteur activé ; PSD-95-Dlg1-ZO-1 (PDZ), *Really Interesting New Gene* (RING), *Sterile alpha motif* (SAM), *Guanylate kinase* (GK). b) Contrairement aux protéines d'échafaudage, les protéines adaptatrices sont uniquement composées de domaines de type SH2 et SH3 et ne présentent aucune activité catalytique. Grâce à leurs domaines SH3, ces dernières peuvent lier une grande diversité d'effecteurs cytoplasmiques et par la suite reconnaître un RTK activé via leur domaine SH2. Elles rassemblent ainsi activateurs et effecteurs et sont donc au cœur de la nucléation des réseaux de signalisation suite à l'activation d'un ou plusieurs récepteurs donnés.

c) À l'inverse de ces deux précédents groupes, les protéines d'arrimage contiennent un signal d'adressage à la membrane tel un domaine PH. Comme les protéines adaptatrices, elles peuvent reconnaître directement un RTK activé via leur domaine SH2 ou PTB. Cependant, ces protéines sont classiquement phosphorylées par le domaine kinase du RTK activé permettant ainsi le recrutement de protéines effectrices et l'amplification du signal ; *Pleckstrin homology domain* (PH), *Maltose-binding protein* (MBP), *Phosphotyrosine-binding domain* (PTB).

Toutefois, il est important de mentionner que le groupe des protéines adaptatrices au sens large inclut aussi des membres composés de domaines autres que SH2 et SH3. Par exemple, l'adaptateur FADD (*Fas-associated protein with death domain*) via ses domaines DD (*death domain*) et DED (*death effector domain*) respectivement similaires à des domaines SH3 et SH2 est spécialisé dans le couplage entre récepteur *Tumor necrosis factor receptor* (TNFR) activé et effecteurs cytoplasmiques tels des caspases afin d'initier l'apoptose cellulaire (Chinnaiyan *et al.*, 1995). Cependant, les exemples d'adaptateurs particuliers contenant des domaines autres que SH2 et SH3 étant très limités et sporadiques dans la littérature, il est généralement accepté et considéré qu'une protéine adaptatrice est uniquement composée de domaines de type SH2 et SH3.



**Figure 1. 3 : Chaque protéine adaptatrice présente une architecture modulaire unique.** Les protéines adaptatrices GRB2, NCK1, NCK2 et CRK sont composées d'un unique domaine SH2 (bleu) associé à une combinaison variable de domaines SH3 (orange) annotés selon leurs

positions relatives. Le nombre d'acides aminés ainsi que la masse moléculaire en kilodaltons (kDa) est indiquée pour chaque protéine.

## **1.2 Les protéines adaptatrices NCK1 et NCK2 sont au cœur de la signalisation cellulaire**

### **1.2.1 Découverte et caractérisation initiale des protéines adaptatrices NCK1/2, deux adaptateurs aux architectures modulaires conservées**

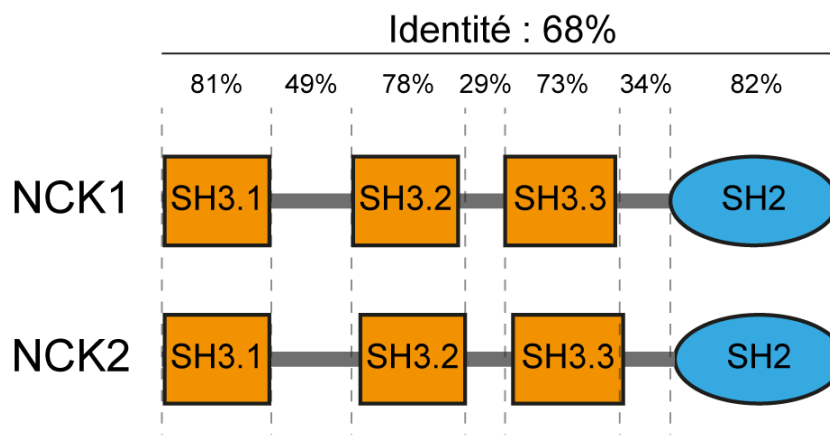
Le produit du gène *NCK1* a initialement été mis en évidence par l'équipe du Dr J.P. Johnson en 1990 lors d'un criblage d'une banque de protéines à l'aide d'un anticorps supposé reconnaître la glycoprotéine membranaire MUC18 (Lehmann, Riethmüller and Johnson, 1990). L'analyse ultérieure du clone positif a permis de définir la séquence de la protéine nouvellement identifiée ainsi que sa composition. Cette dernière, constituée de 3 domaines SH3 suivis d'un domaine SH2, principalement identifiés dans des protéines cytoplasmiques de type 'non-récepteur', a amené les auteurs à nommer cette nouvelle protéine 'NCK', pour *non-catalytic region of tyrosine kinase*.

Deux ans plus tard, lors d'un criblage réalisé par l'équipe de Dr J. Schlessinger visant à déterminer les potentiels interacteurs de la partie cytoplasmique du récepteur *Epidermal growth factor receptor* (EGFR) à l'aide d'une banque d'expression d'ADNc murine, une seconde protéine également composée de trois domaines SH3 suivis d'un domaine SH2 a été identifiée (Margolis *et al.*, 1992). Initialement appelée GRB4, sa similarité avec la protéine NCK identifiée deux ans plus tôt a très vite été remarquée. Cette ressemblance a par ailleurs amené les auteurs à classer cette nouvelle protéine potentielle dans la catégorie '*NCK-like*'. Cependant, la librairie utilisée dans cette étude étant partielle et d'origine murine, il n'était pas clair à l'époque si GRB4 était l'orthologue murin de NCK ou une toute nouvelle protéine.

Par la suite, d'autres études utilisant des techniques de criblage à grande échelle ont aussi identifié de manière récurrente cette protéine de type NCK sans cependant chercher à mieux la caractériser (Tu, Li and Wu, 1998). Toutefois, une étude publiée en 1998 par l'équipe du Dr W. Li a permis de confirmer que tant chez l'humain et la souris, NCK et GRB4 sont bien deux

protéines différentes, issues de 2 gènes distincts situés sur 2 chromosomes indépendants (3q21 pour NCK et 2q12 pour NCK2) (Chen *et al.*, 1998). En parallèle, le criblage d'une banque d'ADNc humain avec des amorces spécialement créées pour amplifier l'hypothétique GRB4/NCK2 a permis de confirmer l'existence de cette protéine et sa similarité avec NCK (Braverman and Quilliam, 1999).

Finalement, les études menées à cette époque ont mis en évidence que les 2 protéines partagent 68% d'identité, que les régions les plus variables se situent entre leurs domaines (Fig. 1.4), mais surtout, que la conservation des protéines murines et humaines est très élevée, de l'ordre de 98%. L'ensemble de ces facteurs a amené les auteurs à adopter la nomenclature précédemment proposée et renommer respectivement ces protéines NCK1 (ou NCK $\alpha$ ) et NCK2 (aussi annoté NCK $\beta$  ou GRB4) (Tu, Li and Wu, 1998).



**Figure 1. 4 : Les domaines SH2 et SH3 des protéines adaptatrices NCK1/2 sont similaires.** Représentation et comparaison de la structure des protéines adaptatrices NCK1/2. Le pourcentage d'identité entre chaque domaine ou région interdomaine est indiqué.

Ainsi, NCK1 et NCK2 sont deux protéines très similaires, présentant une forte conservation de leurs domaines SH2 et SH3 suggérant une forte redondance au sein de leurs fonctions.

## 1.2.2 NCK1 et NCK2, deux protéines considérées comme redondantes dans leurs fonctions

Suite à la découverte des protéines NCK1 et NCK2, plusieurs études se sont concentrées à mieux caractériser chacune de ces protéines et leurs rôles respectifs. Ainsi, la création et l'utilisation d'anticorps spécifiques contre chaque NCK a permis de mettre en évidence que les 2 protéines exhibent une masse moléculaire identique (47 kDa) et présentent une expression tissulaire souvent redondante, mais parfois restreinte (Braverman and Quilliam, 1999). Cependant, l'absence évidente de fonctions spécifiquement régulées par chaque NCK couplée au manque d'outils disponibles à l'époque pour étudier en détail le rôle de chacune a empêché les auteurs de conclure sur l'existence d'une quelconque spécificité. Ainsi, l'ensemble de ces facteurs combiné à la similarité élevée entre NCK1 et NCK2 a naturellement imposé l'idée que ces deux adaptateurs sont majoritairement redondants dans leurs fonctions.

En 2003, des expériences réalisées chez la souris ont démontré que les animaux dans lesquels les gènes de *Nck1* ou *Nck2* ont été individuellement invalidés ne présentent aucun phénotype apparent et sont parfaitement viables. En revanche, l'invalidation simultanée des 2 gènes *Nck* entraîne de profonds défauts dans différents tissus dérivés du mésoderme telle la notocorde, aboutissant à une létalité embryonnaire au stade E9.5 (Bladt *et al.*, 2003). Les auteurs ont alors conclu que NCK1 et NCK2 assurent des fonctions cruciales lors de l'embryogenèse, et que leurs fonctions sont redondantes étant donné que chaque NCK semble pleinement capable de compenser l'absence de son paralogue. L'ensemble de ces résultats a fortement consolidé le concept de redondance des protéines NCK1 et NCK2 suggérant que ces dernières sont identiques et indissociables dans leurs fonctions. Finalement une étude destinée à étudier la spécificité des domaines SH2 de NCK1 et NCK2 a mis en évidence que les propriétés de liaison de ces deux domaines isolés sont identiques et virtuellement indistinguables (Frese *et al.*, 2006).

Cette redondance est considérée telle que de nombreuses équipes, dans leurs publications, rassemblent simplement ces deux adaptateurs sous le nom générique 'NCK' utilisant ainsi de façon plus ou moins arbitraire NCK1 ou NCK2 sans apporter de réelle justification. Cette confusion omniprésente dans la littérature est fortement répandue et renforcée par la découverte d'un nombre important de fonctions biologiques dans lesquelles ces protéines ont été impliquées.

### **1.2.3 Les protéines adaptatrices NCK1/2 sont impliquées dans de nombreuses fonctions biologiques**

De nombreuses études ont démontré que les protéines NCK1 et NCK2 interagissent avec une grande variété de partenaires cytoplasmiques ou nucléaires afin de réguler de nombreuses fonctions biologiques. Les sections suivantes s'attarderont à décrire ces principales fonctions tout en soulignant les approximations reportées dans la littérature notamment par un manque de discernement entre NCK1 et NCK2 ou par l'utilisation aléatoire d'une seule de ces protéines.

#### **1.2.3.1 NCK1/2 : Des adaptateurs faisant le lien entre des récepteurs membranaires et le cytosquelette d'actine**

Les premiers interacteurs directs identifiés pour les protéines adaptatrices NCK1/2 furent des protéines membres de complexes impliqués dans la régulation du cytosquelette d'actine. Ces découvertes ont fortement suggéré que le rôle principal de ces adaptateurs serait d'assurer la liaison entre récepteurs membranaires et cytosquelette d'actine. De nombreuses études ont permis de mettre en évidence les mécanismes de régulation de cette fonction par NCK1/2 en soulignant leur polyvalence dans ce processus.

##### **1.2.3.1.1 NCK1/2 membres, du complexe WASP-WIP-ARP2/3**

Les premiers interacteurs directs des domaines SH3 de NCK1/2 identifiés furent les protéines *Wiskott–Aldrich Syndrome protein* (WASP) et *Wiskott-Aldrich Syndrome Protein-interacting Protein* (WIP) (Rivero-Lezcano *et al.*, 1995; Antón *et al.*, 1998), membres du complexe WASP et impliquées dans la polymérisation d'actine (Buday, Wunderlich and Tamás, 2002). Ces protéines de type *Nucleation Promoting Factors* (NPF) sont indispensables dans le processus de nucléation des filaments d'actine par leurs interactions avec le complexe *actin-related protein-2/3* (ARP2/3) qu'elles activent et alimentent en actine globulaire (Takenawa and Suetsugu, 2007). Des études menées *in vitro* ont démontré que NCK1 en combinaison avec WASP, le complexe ARP2/3 et le phospholipide membranaire phosphatidylinositol 4,5-

bisphosphate (PIP<sub>2</sub>) pouvaient augmenter de façon drastique le taux de nucléation des filaments d'actine (Rohatgi *et al.*, 2001). Un des facteurs critiques dans la polymérisation d'un filament d'actine est le taux d'apport et de renouvellement de WASP et WIP au site de nucléation, une variable qui contrôle l'activité du complexe ARP2/3 et l'efficacité de polymérisation (Weisswange *et al.*, 2009). Cependant, les protéines de la famille WASP sont naturellement repliées dans une conformation d'autoinhibition qui peut être abolie soit indirectement par l'assemblage du complexe WASP-WIP-NCK1/2 avec WIP faisant le lien entre WASP et NCK1/2 (Takenawa and Suetsugu, 2007; Donnelly *et al.*, 2013), soit directement par la première région interdomaine de NCK1/2 capable de lier WASP et de l'activer (Okrut *et al.*, 2015) (Fig. 1.5). Ainsi, la quantité de protéines NCK1/2 au cœur de ces complexes favorise l'agrégation et le renouvellement en NPF au site de nucléation d'actine et réside comme facteur clef régulant ce processus (Ditlev *et al.*, 2012). Finalement, une autre série d'études a suggéré que NCK1/2 via le recrutement de kinases telles *Nck-interacting kinase* (NIK) pourraient indirectement activer le complexe ARP2/3 (Su *et al.*, 1997; LeClaire *et al.*, 2015) qui, si non phosphorylé reste inactif (LeClaire *et al.*, 2008; Narayanan *et al.*, 2011).

Ainsi, l'abondance élevée en protéines NCK au site de nucléation d'actine combinée à leur architecture modulaire permet d'une part le recrutement, l'activation et l'agrégation des différents acteurs requis dans la polymérisation d'actine et d'autre part leur renouvellement efficace. Cependant, un nombre important de ces partenaires tel WIPF2 n'ont jamais été testés de manière systématique avec NCK1 et NCK2 (Aspenström, 2002)(Tableau 1.4), rendant impossible l'identification de rôle précis pour chaque NCK dans ces processus.

#### 1.2.3.1.2 NCK1/2 localisent la kinase PAK1 à la membrane et favorisent la polymérisation d'actine

En parallèle de ces travaux menés sur le complexe WASP, une série d'études conduite sur la kinase *p21-activated Kinase* (PAK1) identifiée comme interacteur de NCK1 en 1996 a permis de mettre en évidence que NCK1, via son deuxième domaine SH3, médie la relocalisation membranaire de PAK1 et sa subséquente activation par les petites GTPases RAC/CDC42 (Bokoch *et al.*, 1996; Lu *et al.*, 1997; Li, Fan and Woodley, 2001) (Fig.1.5). PAK1 ainsi activée peut exercer son influence sur de nombreuses protéines afférentes notamment sur

la kinase à domaine LIM 1 (LIMK1) spécialisée dans la régulation négative des inhibiteurs de la polymérisation d'actine telles les protéines de la famille *Actin depolymerizing factors* (ADF) /Cofiline (Zhao and Manser, 2012) (Fig. 1.5). Cette interaction serait régulée négativement par la protéine PAK1, elle-même capable de s'autophosphoryler et prévenir la liaison de NCK1/2 sur sa portion N-terminale (Zhao, Manser and Lim, 2000). Ce mécanisme autoriserait ainsi une régulation dynamique de cette interaction selon le contexte biologique (Howe, 2001).

L'ensemble de ces résultats suggère donc que NCK1/2, en plus de leurs rôles et influences sur les protéines du complexe WASP, participent aussi à la localisation membranaire et à l'activation d'autres facteurs clefs impliqués dans la polymérisation d'actine telle la kinase PAK1.

#### 1.2.3.1.3 NCK1/2 contrôlent aussi l'état d'activation du complexe WAVE1

Simultanément à la découverte des mécanismes précédemment décrits, plusieurs autres interacteurs de type NPF interagissant avec NCK1/2 furent identifiés, telles les protéines *Nck-associated protein 1* (NCKAP1) et *Wiskott-Aldrich syndrome protein family member 1* (WASF1) (Kitamura *et al.*, 1996; Eden *et al.*, 2002), deux membres du complexe WAVE1 aussi impliqué dans la polymérisation d'actine. Ces études ont notamment démontré que le complexe WAVE1, inactif lorsque cytoplasmique (Fig. 1.5), peut être relocalisé à la membrane par NCK1/2 suite à l'activation d'un récepteur donné (Eden *et al.*, 2002). Cette relocalisation membranaire lui confère une proximité avec les protéines de la famille RAC qui vont favoriser sa dissociation puis la libération et l'activation subséquente de la protéine WASF1 (Pils *et al.*, 2012). Ce NPF activé pourra alors interagir avec ARP2/3 et contribuer au processus de polymérisation d'actine (Lebensohn and Kirschner, 2009; Pils *et al.*, 2012) (Fig. 1.5).

Ainsi, en plus de leurs actions sur la kinase PAK1 et le complexe WASP, NCK1/2 régulent le complexe WAVE1 et participent donc de multiples façons à la régulation du processus de polymérisation d'actine.

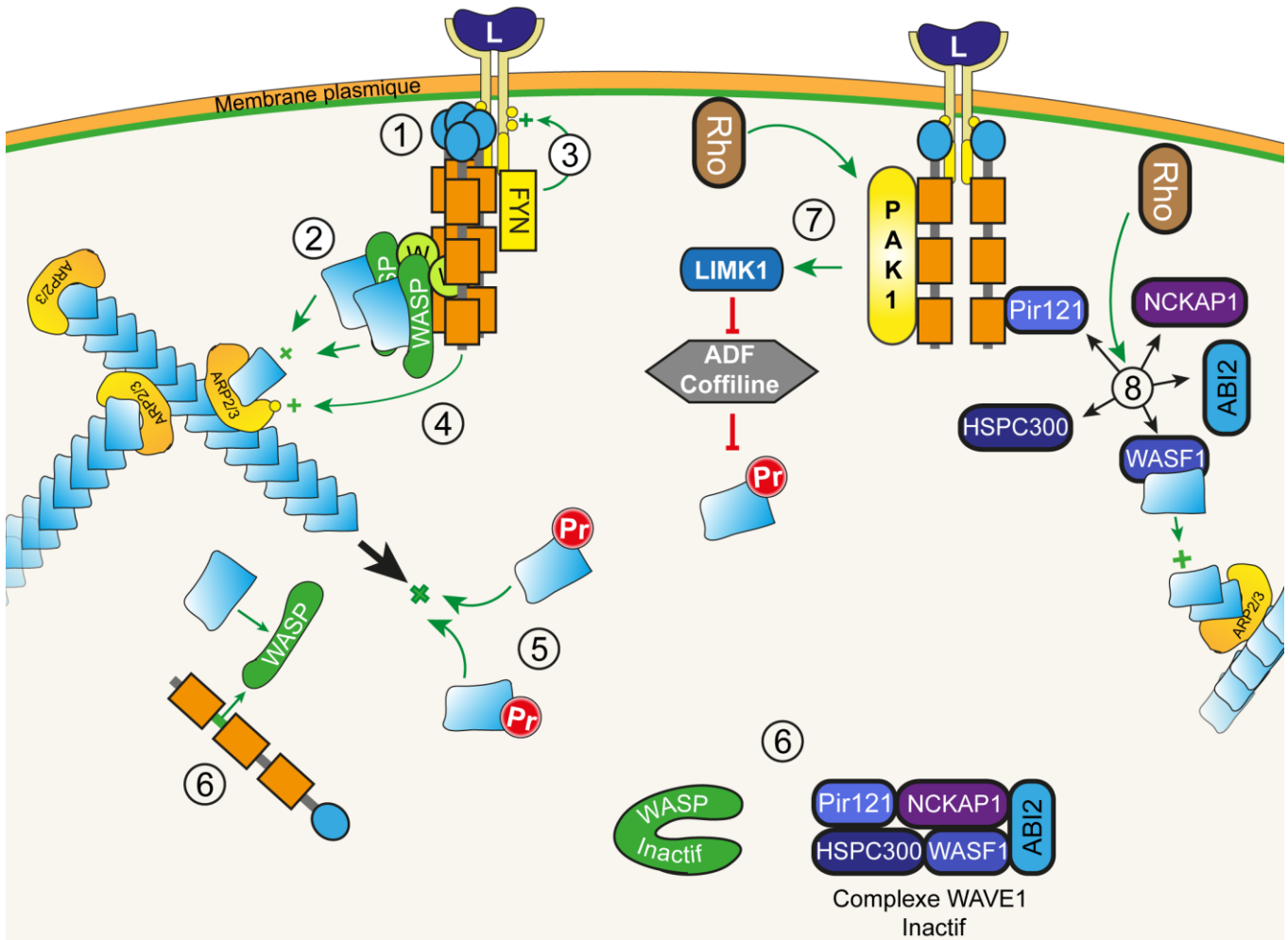


#### 1.2.3.1.4 NCK1/2 couplent un récepteur activé à la machinerie de polymérisation d'actine

Il a été remarqué qu'une agrégation membranaire de NCK1/2 et WASP était suffisante pour déclencher le processus de polymérisation d'actine directement au site d'agrégation membranaire (Frischknecht *et al.*, 1999; Rivera *et al.*, 2004). Ultérieurement, des expériences menées chez la souris dans des cellules rénales appelées podocytes ont mis en évidence que suite à la phosphorylation du récepteur néphrine par des kinases de la famille SRC, NCK1/2 sont directement recrutés au récepteur phosphorylé via leur domaine SH2. Ces adaptateurs déclenchent ensuite la polymérisation d'actine, la modification subséquente de la morphologie des podocytes et contribuent ainsi à la filtration glomérulaire (Jones *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2006; Verma *et al.*, 2006).

L'ensemble de ces résultats compilé dans plusieurs revues publiées entre 2006 et 2015 suggère qu'un récepteur activé pourrait s'autophosphoryler ou recruter certaines kinases telle SRC afin de maximiser sa phosphorylation et le recrutement subséquent de NCK1/2 via leurs domaines SH2 (Blasutig *et al.*, 2008) (Fig.1.5). NCK1/2 recrutés pourraient, via leurs domaines SH3, recruter certaines kinases supplémentaires telle la kinase FYN afin d'induire une phosphorylation élevée et soutenue du récepteur et favoriser leurs propres recrutements (New, Chahi and Jones, 2013). Ainsi, la forte concentration en protéines NCK1/2 au niveau du récepteur activé déclencherait l'agrégation massive de NPF au niveau du récepteur activé et la polymérisation subséquente d'un filament d'actine (Fig. 1.5). Finalement, plusieurs études indépendantes ont démontré que dans un contexte neuronal, NCK1/2 pourraient assurer ce type de fonctions de manière atypique en interagissant via leurs domaines SH3 avec un récepteur activé tel le récepteur *Deleted in colorectal cancer* (DCC) afin d'induire la réorganisation du cytosquelette d'actine et la croissance neuritique (Li *et al.*, 2002; Round and Sun, 2011).

En somme, les protéines NCK1/2 sont spécialisées dans le couplage entre récepteur activé et effecteurs cytoplasmiques afin d'induire la réorganisation du cytosquelette d'actine. Ces adaptateurs interagissent avec de nombreux acteurs afin de favoriser de multiples façons l'assemblage d'unités de signalisation supramoléculaires régulatrices de la dynamique de polymérisation d'actine. Toutefois, aucune de ces études ne s'est réellement intéressée à la spécificité des protéines adaptatrices NCK1 ou NCK2 ou aux rôles respectivement joués par chacune de ces adaptateurs dans cette fonction.



**Figure 1. 5 : NCK1/2 contrôlent l'organisation du cytosquelette d'actine de nombreuses manières.**

**1-** Un RTK activé va présenter de nombreux sites phosphorylés (indiqués par des cercles jaunes) permettant le recrutement de plusieurs molécules de NCK1/2 par récepteur. **2-** NCK1/2 grâce à leur interaction avec WIP vont pouvoir lever l'autoinhibition de la protéine WASP et permettre à cette dernière d'alimenter le complexe ARP2/3 en monomères actine. **3-** NCK1/2 peuvent aussi recruter au récepteur certaines kinases tel FYN afin d'augmenter la phosphorylation de ce dernier, leur propre recrutement et le recrutement subséquent de NPF. **4-** NCK1/2 pourraient en plus recruter certaines kinases telle NIK au site de polymérisation afin de favoriser la phosphorylation du complexe ARP2/3 et son activation. **5-** La protéine Profiline (indiquée par une sphère rouge annotée Pr) peut favoriser la polymérisation d'actine par différents mécanismes telle la régulation d'actine monomérique active disponible. **6-** Les protéines WASP ainsi que le complexe WAVE1 sont initialement inactifs. Une association avec NCK1/2 est requise pour lever cette autoinhibition. **7-** NCK1/2 peuvent recruter à la membrane la kinase PAK1 qui peut ensuite être activé par les GTPases de la famille Rho conduisant à l'inhibition d'ADF/Cofiline, un complexe antagoniste de la Profiline. **8-** NCK1/2 peuvent promouvoir la localisation membranaire du complexe WAVE1 déclenchant sa dissociation par les GTPases de la famille Rho, l'activation de la sous-unité WASF1 et sa participation dans le processus de polymérisation d'actine.

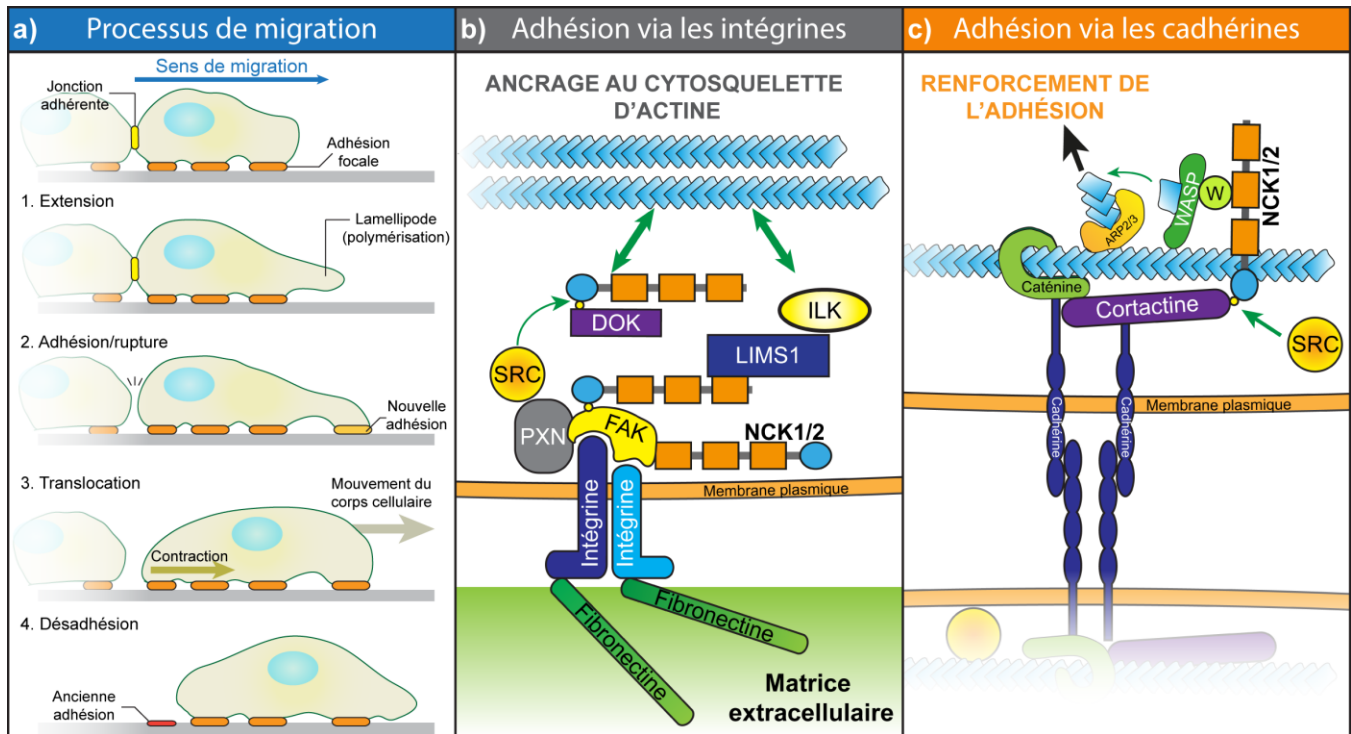
### 1.2.3.2 Les protéines adaptatrices NCK1/2 régulent plusieurs fonctions dépendantes de la polymérisation d'actine telles l'adhésion et la migration

L'omniprésence de NCK1/2 dans la régulation de la polymérisation d'actine a conduit à l'identification de fonctions biologiques particulières, régulées par ces adaptateurs et liées à la dynamique de l'actine. Une de ces fonctions est la migration cellulaire, processus dépendant de l'adhésion et de la polymérisation d'actine (Fig. 1.6a).

#### 1.2.3.2.1 NCK1/2 contrôlent l'adhésion en régulant les complexes des intégrines

Dès 1999, plusieurs équipes ont identifié que NCK1 et/ou NCK2 grâce à leurs domaines SH2 étaient capables d'interagir avec les protéines *Docking Protein 1* et 2 (DOK1 et DOK2) (Lock, Casagrande and Dunn, 1999; Noguchi *et al.*, 1999), des protéines d'échafaudage agissant en aval des intégrines (Oxley *et al.*, 2008). Ces études ont notamment démontré que l'adhésion d'une cellule à la matrice extracellulaire engendre la phosphorylation de DOK1 par des kinases de la famille SRC, son association avec NCK1 et l'augmentation de l'adhésion cellulaire. À l'inverse, une inhibition de l'interaction DOK1-NCK1 promeut la migration. Par la suite, de nombreuses autres composantes appartenant aux complexes des intégrines ont été identifiées comme interagissant avec les différents domaines de NCK1 et/ou NCK2 telles les protéines PXN (Cowan and Henkemeyer, 2001; Hashimoto *et al.*, 2001), la *Integrin-linked protein kinase* (ILK) (Tu, Li and Wu, 1998; Xu *et al.*, 2005) ou encore la kinase *Focal adhesion kinase* (FAK), kinase clef agissant en aval des intégrines et contrôlant l'adhésion et la motilité cellulaires (Choudhury, Marra and Abboud, 1996; Schlaepfer, Broome and Hunter, 1997) (Fig. 1.6b). Cette interaction NCK2-FAK a par la suite été suggérée comme favorisant l'adhésion et diminuant la motilité cellulaire (Goicoechea *et al.*, 2002).

Ce mécanisme de régulation de l'adhésion via les intégrines par NCK1/2 a été observé dans de nombreux types cellulaires distincts. Par exemple suite à la détection de signaux proangiogéniques par des cellules endothéliales, NCK1/2 sont recrutés de façon SH2-dépendante au niveau d'un récepteur *vascular endothelial growth factor* (VEGF-R) activé et favorisent le recrutement de kinases régulatrices de l'adhésion et de la migration telle SRC (Stoletov *et al.*, 2001; Lamalice, Houle and Huot, 2006; Chaki, Barhoumi and Rivera, 2015).



**Figure 1. 6 : NCK1/2 sont au cœur des complexes protéiques impliqués dans la migration cellulaire.**

**a)** La migration cellulaire repose sur une régulation fine de la polymérisation d'actine permettant la coordination entre la mise en place de structures assurant l'extension frontale, la régulation de l'adhésion et la rétraction latérale. **b)** NCK1/2 régulent l'adhésion à la matrice extracellulaire via leur interaction avec les composantes du complexe intégrines. Ces interactions permettent d'ancrer le cytosquelette d'actine au niveau d'un point d'adhésion focal et de le renforcer. **c)** Les adaptateurs NCK1/2 peuvent aussi réguler les jonctions adhérentes. Ces dernières peuvent être recrutées au niveau d'un complexe cadhérine via la cortactine afin d'induire la polymérisation d'actine et renforcer l'adhésion.

Cette régulation des points focaux d'adhésion par NCK1/2, permettant dans le contexte endothélial la polarisation apico-basale et la formation subséquente de vaisseaux sanguins, est aussi retrouvée dans d'autres types cellulaires. Il a été ainsi suggéré que les cellules immunitaires de type T peuvent, lors d'une réponse immunitaire donnée, moduler leur adhésion grâce à des procédés similaires. Ce processus dépendant de NCK1/2 permet notamment d'induire la formation d'une synapse immunologique active et ainsi de déclencher une réponse immunitaire efficace (Lettau, Pieper and Janssen, 2009; Lettau *et al.*, 2014).

Ainsi, NCK1/2 par leurs interactions avec la machinerie de polymérisation d'actine et les membres du complexe intégrines participent activement à la régulation de l'adhésion et de la migration cellulaire.

#### 1.2.3.2.2 NCK1/2 contrôlent l'organisation des jonctions adhérentes

En parallèle aux travaux menés sur l'adhésion via les intégrines, il a été mis de l'avant que NCK1 pouvait aussi réguler activement le processus d'adhésion via son interaction avec des protéines des jonctions adhérentes telle la cortactine (Okamura and Resh, 1995), une protéine favorisant le recrutement du complexe ARP2/3 au niveau de la *zonula adherens* et assurant la cohésion de cette structure (Kourtidis, Ngok and Anastasiadis, 2013; Han *et al.*, 2014). Cette interaction, engendrée par la kinase SRC capable de phosphoryler la cortactine, permet le recrutement subséquent de NCK1 de manière SH2-dépendante (Tehrani *et al.*, 2007) et la mobilisation du complexe de polymérisation WASP-ARP2/3-WIP au niveau des jonctions adhérentes (Ren *et al.*, 2009) (Fig. 1.6c). Certaines études suggèrent par ailleurs que NCK1/2 sont indispensables à l'intégrité de ces structures étant donné que leur suppression dans des cellules endothéliales polarisées est suffisante pour déstabiliser les jonctions adhérentes, entraver la localisation de nombreuses protéines de polarité aboutissant à une perte de polarité généralisée (Chaki, Barhoumi and Rivera, 2015).

Ainsi, via son interaction avec la cortactine, NCK1 facilite l'assemblage de complexes protéiques au niveau des jonctions adhérentes et permet l'ancrage de ces dernières au cytosquelette d'actine. Cependant, l'utilisation exclusive de NCK1 dans la quasi-totalité des études mentionnées ci-dessus empêche toute conclusion sur l'implication potentielle de NCK2 dans ce processus.

#### 1.2.3.2.3 NCK1 et NCK2 modulent la guidance axonale

Le fait que NCK1/2 régulent les processus de polymérisation d'actine et l'adhésion cellulaire suggère que ces protéines participent activement la migration cellulaire dans un contexte neuronal. De nombreuses études *in vivo* réalisées principalement chez la drosophile ont démontré que l'inactivation de l'unique orthologue de NCK1/2 chez cette espèce (nommé

Dreadlocks ou Dock) entrave grandement la migration et la guidance axonale (Garrity *et al.*, 1996; Rao and Zipursky, 1998). Dock ferait alors le lien entre récepteur activé et certaines kinases telles les kinases de la famille PAK ou *Misshapen-like kinase* (MINK) favorisant la localisation et l'activation à la membrane de ces dernières tel qu'évoqué précédemment (Fig. 1.5) (Hing *et al.*, 1999; Ruan, Pang and Yong, 1999).

Chez l'humain, il a été suggéré que grâce à son domaine SH2, NCK1 enrichi dans les cônes de croissance agirait en aval des récepteurs de la famille *Erythropoietin-producing human hepatocellular* (EPH) (Holland *et al.*, 1997), un groupe de récepteurs spécialisés dans la navigation et la fasciculation axonale. Ces résultats ont ensuite été confirmés par l'identification de NCK1 comme substrat des récepteurs EPHA3 et EPHB1 ainsi que son rôle dans la régulation de la polymérisation d'actine et le contrôle subséquent de la migration et de la guidance axonales (Stein *et al.*, 1998; Hu *et al.*, 2009). Ces données rejoignent certaines études démontrant que des cellules fibroblastiques extraites de souris chez lesquelles les gènes *Nck1/2* ont été invalidés présentent de sévères défauts de migration et de formation de lamellipodes (Bladt *et al.*, 2003). Finalement, NCK1/2 participeraient aussi activement à la mise en place des filopodes et fibres de stress (Guan *et al.*, 2009), structures indispensables dans l'extension frontale et la rétraction latérale lors de la migration cellulaire.

Ainsi NCK1 et NCK2 s'imposent comme des régulateurs clefs de la migration cellulaire notamment dans un contexte neuronal. Généralement, le fait que la grande majorité des interacteurs identifiés pour NCK1/2 sont des protéines impliquées dans la dynamique et le remodelage du cytosquelette d'actine témoigne des rôles prépondérants joués par chacune de ces protéines dans la régulation de cette fonction et des sous-fonctions qui en découlent. En somme, NCK1/2 participent à la dynamique du cytosquelette d'actine, le contrôle de l'adhésion et la mise en place de structures requises pour la migration (Chaki *et al.*, 2013). Toutefois, les rôles précis et fonctions spécifiques de chacune de ces protéines dans l'ensemble de ces processus restent superficiels. Cette caractérisation des rôles respectifs de NCK1/2 devient d'autant plus importante que ces protéines ont été récemment impliquées dans de nombreuses autres fonctions biologiques diamétralement différentes, comme par exemple le contrôle de la traduction et la gestion du stress du réticulum endoplasmique.

### 1.2.3.3 NCK1/2, des adaptateurs essentiels au contrôle de la traduction et impliqués dans les réponses au stress du réticulum endoplasmique

Pour surmonter des stress physiologiques délétères tels des chocs thermiques ou de l'hypoxie, les cellules eucaryotes ont développé des stratégies reposant sur plusieurs actions simultanées. Parmi celles-ci interviennent l'inhibition de la traduction, l'augmentation de la capacité de repliement ou dégradation des protéines mal repliées et l'induction de l'apoptose (Cybulsky, 2017). L'ensemble de ces réponses majoritairement transduites par le réticulum endoplasmique (RE) forment un mécanisme généralisé sous le nom 'unfolded protein response' (UPR). Lors de l'UPR, l'arrêt de la traduction passe essentiellement par la phosphorylation du facteur EIF2 $\alpha$  via différentes kinases dont les activités respectives dépendent majoritairement du stress ou du type de tissus dans lesquelles elles sont exprimées (Cnop *et al.*, 2017). La phosphorylation de certaines de ces kinases a été identifiée comme régulée par NCK1 (Cardin *et al.*, 2007; Cardin and Larose, 2008) (Tableau 1.1). De plus, l'identification au début des années 2000 de la sous-unité  $\beta$  du facteur eucaryotique d'initiation de la traduction 2 (EIF2) comme interacteur du premier et troisième domaine SH3 de NCK1 a appuyé l'hypothèse que ces adaptateurs puissent aussi être impliqués dans la gestion du stress du réticulum endoplasmique et dans l'UPR (Kebache *et al.*, 2002).

**Tableau 1. 1 : Implications respectives des protéines adaptatrices NCK1 et NCK2 dans la régulation des kinases régulant dans la réponse UPR.**

Tableau récapitulatif des kinases clés impliquées dans le stress du réticulum endoplasmique et leur dépendance à NCK1 et/ou NCK2. L'utilisation exclusive de NCK1 dans la majorité des études réalisées ne permet pas de conclure sur l'implication potentielle de NCK2 dans la régulation de 3 de ces kinases (indiquées avec «?»). Certaines études ont cependant suggéré l'importance de NCK2 dans la régulation de PERK sans toutefois fournir de mécanisme (Dusseault *et al.*, 2016; Haider *et al.*, 2017).

	<b>HRI</b>	<b>GCN2</b>	<b>PKR</b>	<b>PERK</b>
Type de stress	Disponibilité en groupement hème	Carence en acides aminés	Infection virale	Accumulation protéines mal repliées
Tissus ou Cellules	Précurseurs Globules rouges	Ubiquitaire	Ubiquitaire	Cellules sécrétrices, pancréas
Regulée par NCK1	OUI	NON	OUI	OUI
Regulée par NCK2	?	?	?	Sugérée

#### 1.2.3.3.1 NCK1/2 régulent la traduction en modulant l'état de phosphorylation de la kinase PERK

Afin de mieux définir l'implication de NCK1 dans le stress du RE, le mode de régulation de la *PKR-like endoplasmic reticulum kinase* (PERK) par cet adaptateur a été étudié plus en détail. Il a ainsi été mis en évidence que cette kinase, connue pour s'autophosphoryler sur de nombreux sites afin de réguler négativement ses fonctions, interagit avec le domaine SH2 de NCK1 en absence de stress. L'interaction de NCK1 avec la tyrosine phosphorylée 561 de PERK protège cette dernière et empêche sa déphosphorylation, prévenant ainsi l'activation subséquente de son domaine kinase, la phosphorylation de EIF2 $\alpha$  par cette dernière et donc, l'arrêt de la traduction (Yamani, Latreille and Larose, 2014) (Fig. 1.7). Toutefois, en cas de stress, l'interaction NCK1-PERK est abolie, la tyrosine 561 de PERK est déphosphorylée, le domaine kinase de cette dernière devient actif et la traduction peut alors être inhibée.

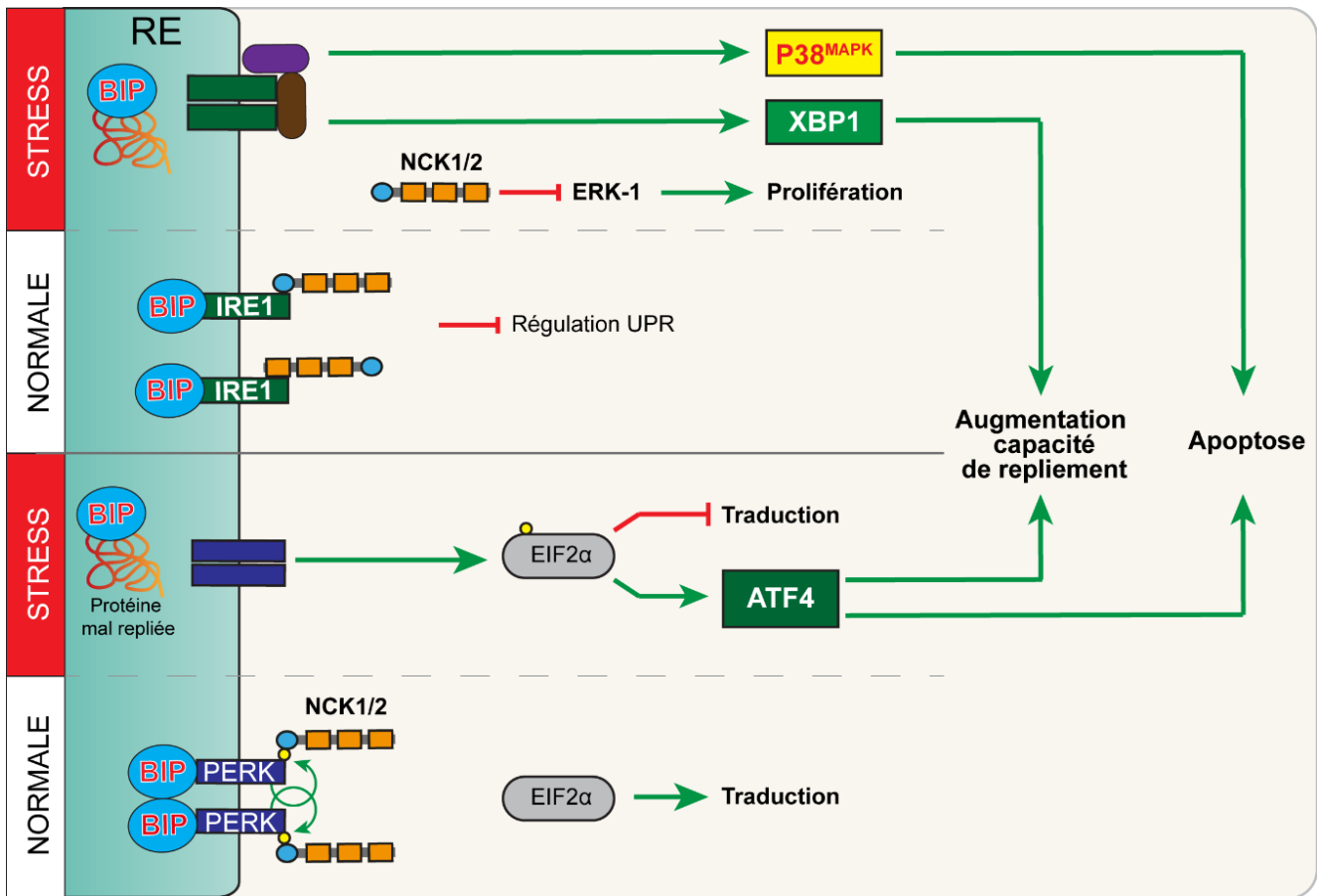
Ainsi, NCK1 agirait à titre de protecteur de la Y561 de PERK prévenant l'arrêt inadéquat de la traduction. Cependant, l'utilisation exclusive de NCK1 combinée à la découverte récente de l'implication négative de NCK2 dans les processus d'adipogenèse dépendants de PERK (Dusseault *et al.*, 2016) ne permettent d'envisager que partiellement les rôles respectifs de chacun de ces adaptateurs dans la régulation de cette fonction.

#### 1.2.3.3.2 NCK1/2 régulent la réponse UPR via la kinase IRE1

En plus de la régulation exercée sur PERK, NCK1 régule négativement la protéine *Inositol-requiring enzyme 1* (IRE1), un autre résident clef du RE impliqué dans la réponse UPR. Cette interaction médiée par les domaines SH2 ou SH3 de NCK1 empêche toute fuite de signal par le domaine kinase de cette protéine dans des conditions normales (Nguyên *et al.*, 2004; Li, Li and Larose, 2017). Lors d'un stress, l'association NCK1-IRE1 est abolie, permettant à NCK1 d'aller inhiber certains acteurs promoteurs de la survie tels ERK1, mais surtout, de libérer des sites de liaison requis par différents facteurs de la réponse cellulaire en aval d'IRE1 (Fig.1.7). En plus de ces rôles, NCK1 pourrait stabiliser au niveau transcriptionnel par un mécanisme encore inconnu certains acteurs de la réponse UPR tels IRE1 ou la protéine phosphatase non-



récepteur 1B (PTP1B), intimement liée à IRE1 et chargée d'inhiber la voie PI3K et la prolifération lors d'un stress UPR (Li, Dusseault and Larose, 2014; Li, Li and Larose, 2017).



**Figure 1. 7 : NCK1/2, des adaptateurs impliqués dans le contrôle du stress du réticulum endoplasmique.**

**Partie supérieure :** En absence de stress, les chaperonnes BIP préviennent la dimérisation de la kinase IRE1. NCK1, associée à IRE1 prévient toute fuite du signal et empêche l'activation de l'UPR. En cas de stress, l'interaction des chaperonnes BIP avec des protéines mal repliées permet à IRE1 de s'oligomériser, inhibant son interaction avec NCK1 et libérant ainsi des sites de liaison requis par certains acteurs afférents de la réponse UPR tel le facteur de transcription *X-box binding protein 1* (XBP1). En parallèle, NCK1 libéré de son interaction avec IRE1 inhibera certaines voies de survie ou prolifération telle la voie ERK-1.

**Partie inférieure :** En absence de stress, les chaperonnes BIP interagissent avec la kinase PERK qui s'autophosphoryle sur sa Y561 (indiquées par des flèches vertes et cercles jaunes), recrute NCK1/2 via leurs domaines SH2 et prévient ainsi son activation. PERK inactivé, la sous-unité EIF2 $\alpha$  reste déphosphorylée et peut initier la traduction. En cas de stress, l'interaction des chaperonnes BIP avec des protéines mal repliées autorise l'oligomérisation de PERK. L'interaction NCK1/2-PERK est rompue et PERK alors active peut phosphoryler EIF2 $\alpha$  (cercle jaune) afin d'inhiber la traduction et activer certains facteurs de transcription tels *Activating transcription factor 4* (ATF4) ciblant des gènes indispensables dans l'UPR.

#### 1.2.3.3.3 La protéine adaptatrice NCK1 participe aux réponses lors d'un stress hépatique en modulant la sécrétion d'insuline

L'ensemble des résultats suggérant que NCK1 régule la réponse UPR et participe au stress du RE a été montré comme important dans un contexte de stress hépatique ou de sécrétion d'insuline. En effet, une série d'études suggère qu'en réponse à l'insuline, NCK1 régule négativement la voie PI3K/AKT (Li, Dusseault and Larose, 2014) et agit à titre de frein dans le contexte du stress du RE en prévenant l'activation des acteurs de la réponse UPR précédemment décrits (Latreille *et al.*, 2011; Yamani, Li and Larose, 2015; Li, Li and Larose, 2017). De plus, cet adaptateur serait également requis pour la régulation et la synthèse d'insuline au niveau des cellules pancréatiques (Wu *et al.*, 2011; Yamani, Latreille and Larose, 2014). NCK1 pourrait donc être une cible thérapeutique intéressante dans le contexte de certaines pathologies telle le diabète. Ce point est notamment renforcé par certaines études suggérant que l'absence de NCK1 diminue le stress hépatique et améliore la tolérance au glucose (Latreille *et al.*, 2011; Kefalas *et al.*, 2018). Cependant, l'implication de NCK2 dans la régulation de ces fonctions biologiques restent à définir.

En conclusion, NCK1 et NCK2 sont des adaptateurs extrêmement versatiles comme le démontre leur implication dans la régulation du stress du réticulum endoplasmique. Cette polyvalence semble d'autant plus importante que leurs fonctions et localisations ne semblent pas limitées au cytoplasme.

#### 1.2.3.4 NCK1/2, des protéines adaptatrices aussi présentes au noyau

##### 1.2.3.4.1 Observations initiales suggérant que les adaptateurs NCK1/2 puissent réguler certaines fonctions nucléaires

Dès le début des années 90, il a été envisagé que les protéines adaptatrices NCK1/2 puissent jouer un rôle au noyau. En effet, des expériences menées en 1992 par le laboratoire de Dr J. Schlessinger utilisant préférentiellement NCK1 ont déterminé qu'une surexpression de cette protéine dans des cellules fibroblastiques murines était suffisante pour activer leur prolifération et induire leur transformation (Li *et al.*, 1992). Ces résultats, confirmés la même

année par une autre équipe utilisant des fibroblastes de rat ont alors soulevé l'hypothèse que NCK1 puisse jouer un rôle au noyau notamment dans le contrôle du cycle cellulaire (Chou, Fajardo and Hanafusa, 1992). Par la suite, l'équipe du Dr A.J. Wong a démontré par fractionnement dans plusieurs lignées cellulaires qu'une quantité significative de NCK1 est détectable dans la fraction nucléaire de cellules en culture et ce, sans aucun stimulus ou traitement particulier (Lawe, Hahn and Wong, 1997). Cette même équipe a de plus démontré que l'état de phosphorylation de NCK1 n'influence pas sa localisation au noyau et que celui-ci pourrait s'associer directement via ses domaines SH3 avec des interacteurs nucléaires telle la protéine *SRC-Associated substrate in Mitosis of 68 kDa* (SAM68), impliquée dans le contrôle de la prolifération (Frisone *et al.*, 2015). En parallèle, d'autres interacteurs potentiellement nucléaires ont été identifiés telle la protéine *Suppressor Of Cytokine Signaling-7* (SOCS7) dont la partie N-terminale interagit avec le SH3.2 de NCK1 (Matuoka *et al.*, 1997; Martens *et al.*, 2004). L'interaction entre NCK1 et cette protéine aux fonctions nucléaires connues arborant des séquences de localisation et d'export nucléaires (respectivement NLS et NES) a fortement renforcé l'hypothèse que NCK1 puisse jouer un rôle au noyau (Larsen and Röpke, 2002).

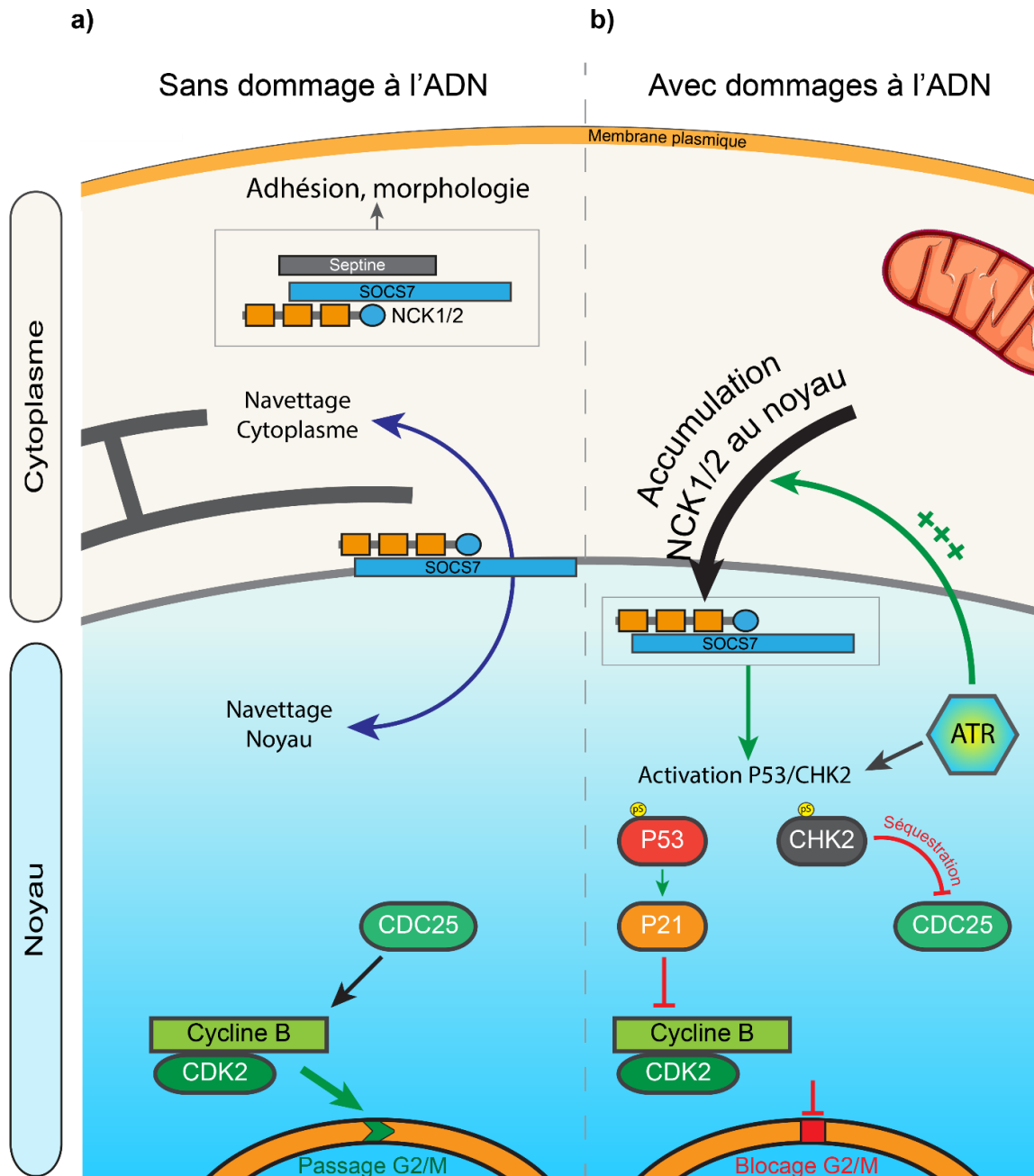
Toutefois, malgré la démonstration que NCK1 réside naturellement au noyau et pourrait réguler la prolifération cellulaire et interagir avec certains partenaires nucléaires, aucune réelle fonction biologique ou mécanisme d'action propre à ce compartiment n'a à l'époque été mis en évidence pour NCK1.

#### 1.2.3.4.2 Découverte des premières fonctions nucléaires de NCK1/2

En 2007, une étude utilisant préférentiellement NCK1 ainsi que certains outils ne permettant pas de distinguer NCK1/2 endogènes a permis d'éclaircir le rôle de l'interaction NCK1-SOCS7. Cet article paru dans le journal *Cell* a mis en avant que l'interaction NCK-SOCS7 permet le navettage constant de NCK1/2 entre cytoplasme et noyau, conférant ainsi à ces adaptateurs une dualité signalétique cytoplasmique et nucléaire (Kremer, Adang and Macara, 2007). Lorsqu'elles sont cytoplasmiques, les protéines NCK1/2 grâce à SOCS7 interagissent avec les septines, un groupe de protéines impliquées entre autres dans le remodelage du cytosquelette d'actine. Ce complexe NCK1/2-SOCS7-septine permet de réguler l'étalement et la morphologie cellulaires tout en prévenant l'accumulation nucléaire de NCK1/2

(Fig. 1.8a). Toutefois, quand des dommages à l'ADN surviennent, l'interaction entre NCK1/2 et septines est abolie, conduisant à une accumulation nucléaire des protéines adaptatrices NCK1/2 transportées au noyau grâce à la protéine SOCS7. Cette accumulation nucléaire de NCK1/2 est requise pour induire la phosphorylation des protéines *Tumor protein 53* (P53) et *Checkpoint kinase 2* (CHK2), engendrant leur subséquente activation et l'arrêt des cellules en phase G2/M (Kremer, Adang and Macara, 2007; Kasthuber and Lowe, 2017) (Fig. 1.8b). Cependant, NCK1/2 ne semblent pas particulièrement requis pour l'activation des kinases spécialisées dans la détection des dommages à l'ADN telles *Ataxia telangiectasia mutated* (ATM) et *Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein* (ATR), protéines agissant en amont des complexes P53/CHK2 (Kremer, Adang and Macara, 2007; Blackford and Jackson, 2017). Ainsi, le rôle de NCK1/2 durant la régulation des dommages à l'ADN serait situé entre l'étape de détection médiée par les kinases ATM/ATR et les étapes d'arrêt/réparation induites entre autres par les protéines P53 et CHK2. Finalement, ces résultats ont ensuite été confirmés en 2013 par la même équipe qui a en plus déterminé que l'accumulation nucléaire des protéines NCK1/2 suite à des dommages à l'ADN serait induite par la kinase ATR (Errington and Macara, 2013) (Fig. 1.8b). Cet article suggèrent que NCK2 serait plus impliqué que NCK1 dans la régulation de ce processus (Errington and Macara, 2013).

En conclusion, malgré leurs localisations majoritairement cytoplasmiques, les protéines NCK1 et NCK2 lors de l'induction de dommages à l'ADN peuvent aussi assurer certaines fonctions nucléaires. Même si leurs rôles respectifs dans ce compartiment restent partiellement caractérisés, il apparait évident que le spectre d'interacteurs et de fonctions communs ou potentiellement spécifiques exercées par chacun de ces adaptateurs s'étend bien au-delà de la zone cytoplasmique. Ainsi, la régulation de ces adaptateurs au niveau cellulaire apparait comme un paramètre prépondérant dans le contrôle des nombreuses fonctions auxquelles ils participent.



**Figure 1. 8 : Les protéines adaptatrices NCK1 et NCK2 sont impliquées dans la régulation des dommages à l'ADN.**

a) Dans le cytoplasme, NCK1/2 interagissent grâce à leur second domaine SH3 avec la partie N-terminale de la protéine SOCS7 qui interagit simultanément avec certaines septines. Ce complexe NCK1/2-SOCS7-Septine est notamment impliqué dans le contrôle du cytosquelette d'actine et plus globalement dans la régulation de la morphologie cellulaire. En parallèle, grâce à son interaction avec SOCS7, NCK1/2 peuvent constamment voyager entre cytoplasme et noyau. b) Lors de l'apparition de dommages sur l'ADN, la kinase ATR favorise l'accumulation nucléaire de NCK1/2 médiée par SOCS7. Lorsque nucléaires, NCK1/2 régulent les protéines P53 et CHK2 chargées de bloquer le complexe Cycline B - CDK2 - CDC25 prévenant ainsi le passage des cellules en mitose (Inspiré de Kremer, Adang and Macara, 2007)

## 1.2.4 Régulation des protéines adaptatrices NCK1/2

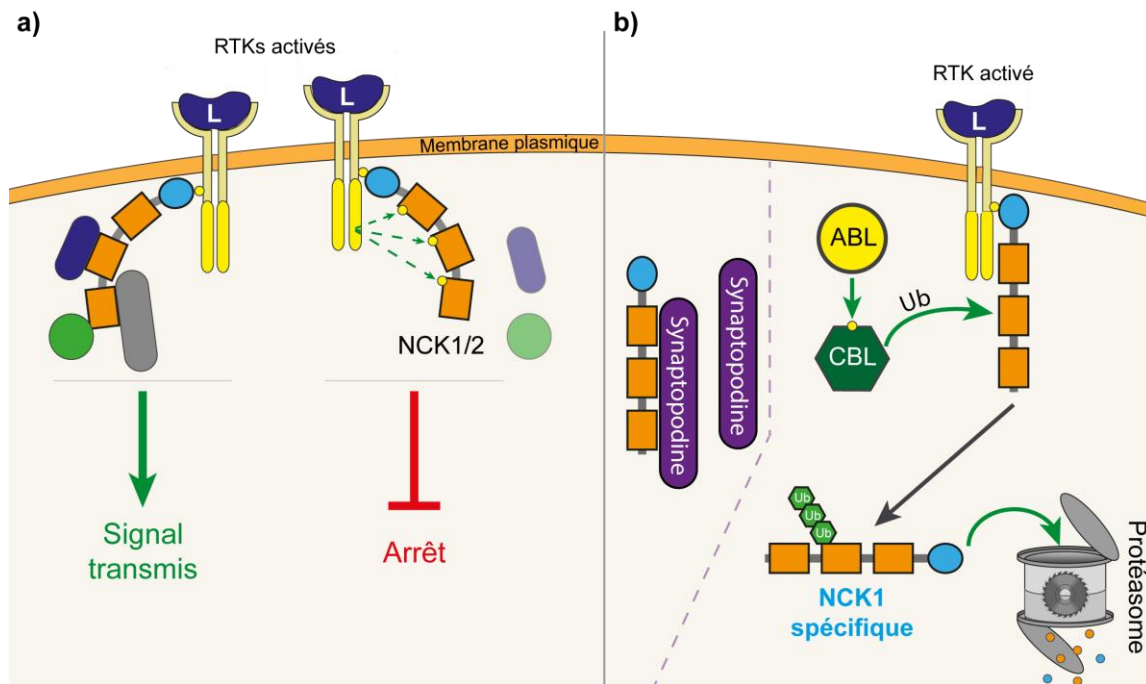
L'arrêt de la transmission d'un signal donné au niveau intracellulaire repose sur l'utilisation de certaines stratégies telles la dégradation de protéines clefs essentielles à la transmission de l'information, l'action de phosphatases ou même la mise en place de boucles de rétrocontrôle négatives (Lemmon *et al.*, 2016). Par leur rôle de pivot protéique dans l'orientation de l'information dans une voie cellulaire appropriée, NCK1/2 sont soumis à différents types de régulation permettant de moduler leurs fonctions.

### 1.2.4.1.1 L'activité de NCK1/2 est régulée par phosphorylation

L'organisation et la topologie des voies de signalisation en aval de RTK activés requièrent un assemblage et désassemblage rapides, fréquents et extrêmement dynamiques des complexes de signalisation orchestrés par NCK1/2. Les contrôles de cette dynamique et de cette organisation spatiotemporelle ne peuvent pas être complètement expliqués par les types de régulation classiquement envisagés telle l'endocytose, trop lente d'un point de vue cinétique. Plusieurs études ont suggéré que suite à leur recrutement au niveau d'un récepteur activé tel le VEGFR, les protéines adaptatrices NCK1/2 peuvent être phosphorylées par la kinase FYN sur certains résidus tyrosine (Guo *et al.*, 1995; Lamalice, Houle and Huot, 2006). Il a peu de temps après été mis en évidence que l'interaction entre NCK1/2 et la glycoprotéine membranaire CD3e peut être abolie directement à la membrane par la tyrosine kinase *lymphocyte-specific protein* (LCK) (Kesti *et al.*, 2007). Ces résultats ont suggéré l'existence d'un mécanisme de désassemblage des complexes signalétiques situés directement au récepteur activé. Par la suite, il a été mis en évidence que la phosphorylation d'une tyrosine conservée de NCK1/2 par la kinase ABL était suffisante pour réguler négativement la voie de signalisation P38 en aval du VEGFR (Anselmi *et al.*, 2012). Cette étude a conforté l'hypothèse de l'existence d'un mécanisme de régulation, phospho-dépendant, mis en place directement au niveau d'un récepteur activé. Ce mécanisme a ensuite été défini grâce à la mise en évidence de tyrosines conservées en position C-terminale de chacun des domaines SH3 de NCK1/2. En effet, il a été suggéré que la phosphorylation de ces dernières par un récepteur tyrosine kinase activé est suffisante pour induire la dissociation des complexes signalétiques directement au niveau du

récepteur (Dionne *et al.*, 2018). Cette étude a permis de mieux cerner la régulation des adaptateurs NCK1/2 et d'offrir un modèle de régulation fine plus en accord avec la dynamique et la cinétique des réseaux de signalisation (Fig. 1.9a).

Ainsi, NCK1/2 peuvent être régulés négativement directement au niveau d'un RTK activé. Pour cela, le récepteur peut être phosphorylé par une tyrosine kinase tierce ou ce dernier peut activement phosphoryler NCK1/2 sur chacun de leurs domaines SH3 afin d'induire la dissociation des complexes signalétiques.



**Figure 1.9 : Les protéines adaptatrices NCK1 et NCK2 sont régulées par phosphorylation et/ou ubiquitination.**

**a)** Un RTK activé peut phosphoryler NCK1/2 au niveau de tyrosines conservées dans la partie C-ter de chacun de leurs domaines SH3. Cette phosphorylation provoque le désassemblage des complexes de signalisation directement au niveau du RTK activé et l'arrêt de la transmission du signal. **b)** Lors de l'activation d'un récepteur, la kinase ABL peut phosphoryler l'ubiquitine ligase CBL qui, une fois activée, pourra ubiquitiner (indiqué Ub) NCK1/2. NCK1/2 ubiquitinés seront alors dégradés par le protéasome. La synaptopodine prévient ce mécanisme (indiqué par des pointillés) (Dionne *et al.*, 2018).

#### 1.2.4.1.2 Les protéines NCK1/2 sont régulées par ubiquitination

En 1999, lors d'études réalisées sur des macrophages, l'équipe du Dr D.L. Durden a identifié que l'adaptateur NCK1 était capable d'interagir avec la protéine *Casitas B-lineage Lymphoma* (CBL) (Izadi *et al.*, 1998), une ubiquitine ligase chargée entre autres de

cibler des protéines pour la dégradation via le protéasome. Des études subséquentes ont déterminé que plusieurs domaines SH3 de NCK1 sont requis pour lier CBL (Wunderlich *et al.*, 1999), que suite à l'activation d'un récepteur, la kinase ABL phosphoryle CBL favorisant son interaction avec NCK1 et son éventuelle ubiquitination (Erdreich-Epstein *et al.*, 1999; Miyoshi-Akiyama *et al.*, 2001). Si ce mécanisme de régulation n'est resté que partiellement caractérisé pendant plusieurs années, une étude parue en 2013 a confirmé l'ubiquitination de NCK1 par CBL, sa subséquente dégradation par le protéasome et l'importance de cette régulation dans la formation des fibres de stress (Buvall *et al.*, 2013). Cette même étude a aussi mis en évidence que cette ubiquitination de NCK1 peut être abolie par la protéine synaptopodine qui, en interagissant avec NCK1, prévient son interaction avec CBL et sa dégradation ultérieure (Fig. 1.9b).

Ainsi, le niveau protéique de l'adaptateur NCK1 est régulé par l'ubiquitine ligase CBL capable d'induire sa dégradation par le protéasome. De manière très intéressante, ce processus de protection par la synaptopodine et d'ubiquitination par CBL a été suggéré comme NCK1-spécifique. En effet, NCK1 arbore dans sa deuxième région interdomaine une lysine évolutivement conservée (K178), ubiquitinée par CBL et dont NCK2 est dépourvu (Buvall *et al.*, 2013). Ainsi, NCK1 et NCK2 pourraient être différenciellement régulés.

En conclusion, les protéines adaptatrices NCK1 et NCK2 assurent de nombreuses fonctions biologiques alternativement cytoplasmiques ou nucléaires. Chacune de ces protéines s'impose donc comme un adaptateur clef situé au cœur du système de signalisation cellulaire. Malgré toutes les études appuyant la redondance et l'indissociabilité des protéines NCK1 et NCK2, certains résultats tel le mécanisme d'ubiquitination par CBL démontré comme spécifique à NCK1 ou l'implication prépondérante de NCK2 dans le processus de détection des dommages à l'ADN suggèrent l'existence d'un certain degré de spécificité propre à chaque NCK (Buvall *et al.*, 2013) (Errington and Macara, 2013). En effet, ces exemples de spécificité rejoignent de nombreux autres exemples sporadiques identifiant des partenaires spécifiques pour chaque NCK et donc, des fonctions biologiques potentiellement régulées différenciellement par chacune de ces protéines.



### **1.3 Les protéines adaptatrices NCK1 et NCK2 : deux protéines uniques pouvant chacune assurer des fonctions spécifiques**

Tel qu'énoncé précédemment, les fonctions des protéines adaptatrices NCK1 et NCK2 sont majoritairement considérées redondantes. Cependant, la duplication d'un gène initial *NCK* en deux gènes distincts conservés au cours de l'évolution, l'expression différentielle de ces deux protéines au sein de plusieurs tissus ainsi que l'identification ponctuelle de nombreuses fonctions spécifiques pour chacun de ces adaptateurs argumentent en faveur de l'existence d'une spécificité pour chacune de ces protéines.

#### **1.3.1 Les adaptateurs NCK1 et NCK2 : deux paralogues conservés au cours de l'évolution**

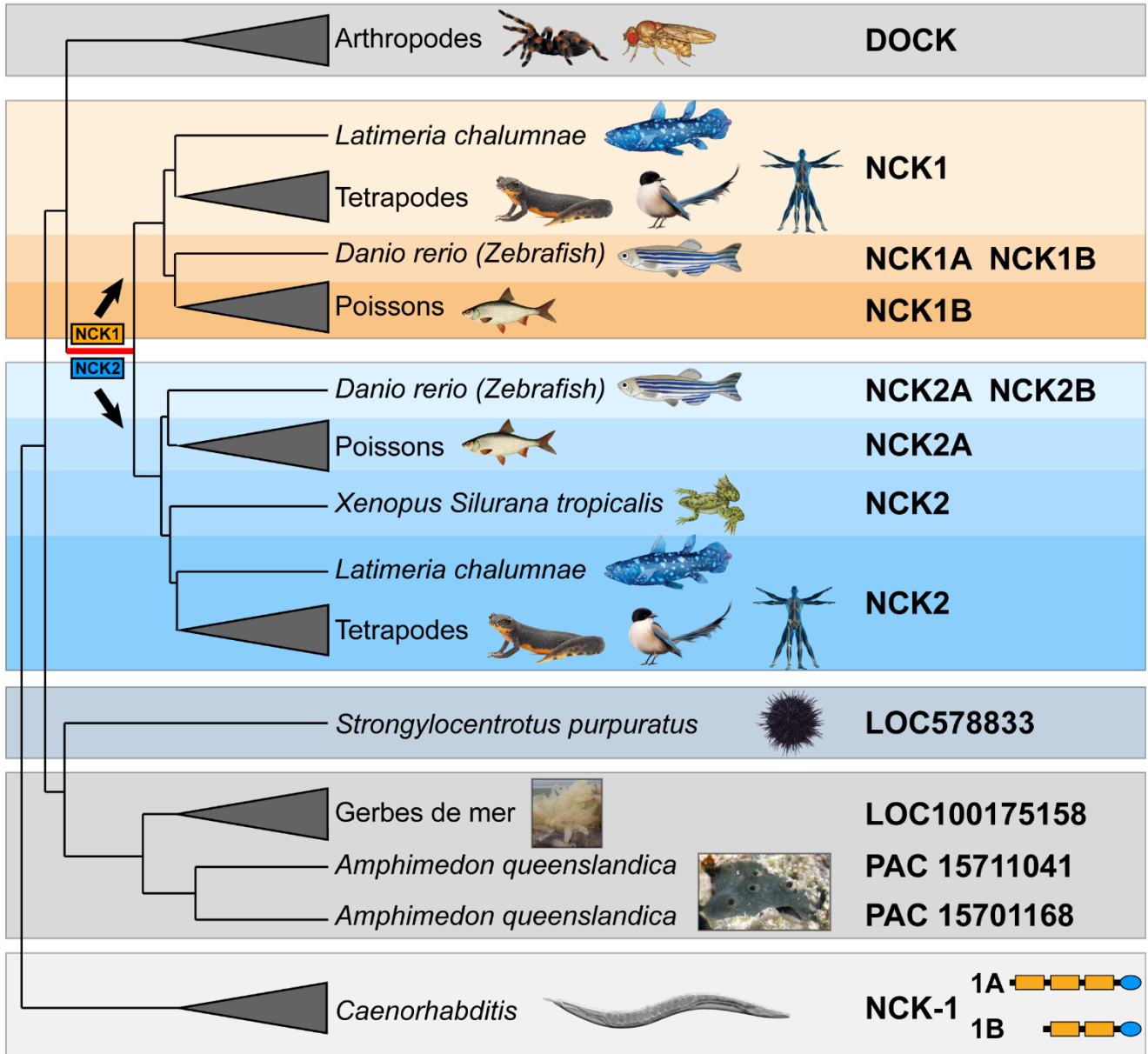
La duplication génique, phénomène récurrent dans l'évolution des génomes est un mécanisme important permettant une redondance des systèmes biologiques rendant ces derniers plus robustes aux perturbations génétiques et environnementales. Il s'agit aussi d'un moteur majeur dans l'apparition et le développement de nouvelles fonctions biologiques (Espinosa-Cantú *et al.*, 2015). La duplication du gène initial *NCK* en 2 gènes distincts et la conservation subséquente de ces produits argumente en faveur d'une fonction spécifique pour chacun. Après la découverte des protéines adaptatrices NCK1 et NCK2 chez les mammifères au début des années 90, plusieurs orthologues furent identifiés chez d'autres modèles utilisés en laboratoire. Ainsi, un criblage génétique destiné à identifier des protéines potentiellement impliquées dans les processus de projection et la guidance axonales chez la drosophile a conduit à l'identification de Dock, l'unique orthologue de NCK1/2 chez cette espèce (Garrity *et al.*, 1996; Rao, 2005). Cela suggère que la duplication initiale du gène *NCK* en deux gènes distincts serait survenue dans un embranchement parallèle à celui des arthropodes (Fig. 1.10).

De plus, la caractérisation du ou des gènes potentiels chez *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) a mis en évidence que comme chez la drosophile, cette espèce ne contient qu'un seul orthologue de *NCK1/2*, annoté *nck-1* (Mohamed and Chin-Sang, 2011). Toutefois, cette même étude a démontré que cet unique gène contient deux promoteurs distincts conduisant à la production de 2 protéines différentes. La première, annotée NCK-1A est composée comme chez

les autres espèces de 3 domaines SH3 suivis d'un domaine SH2 tandis que la deuxième, NCK-1B correspond à une forme plus courte de NCK-1A dans laquelle le premier domaine SH3 est tronqué. Cette même étude a aussi suggéré que chaque isoforme possède des localisations intracellulaires ainsi que des patrons d'expression tissulaires majoritairement redondants mais aussi en partie uniques. NCK-1A apparaît plus cytoplasmique et semble exprimé spécifiquement dans des motoneurons tandis que NCK-1B, en plus d'être cytoplasmique, peut localiser au noyau et être spécifiquement exprimé dans l'intestin ou le pharynx. Des expériences de délétion et de sauvetage par chaque isoforme a mis en avant que chaque isoforme possèdent des fonctions majoritairement redondantes, mais sont aussi capables d'assurer des fonctions restreintes aux tissus (Mohamed and Chin-Sang, 2011). Ces fonctions, visualisées par l'apparition de phénotypes isoformes spécifiques et restant à définir suggèrent que malgré la présence d'un seul gène *nck*, l'organisme *C. elegans* aurait développé une stratégie comparable à celle des mammifères où 2 protéines NCK similaires pourraient chacun assurer des fonctions spécifiques.

Finalement, des données fournies par le laboratoire du Dr Christian Landry suggèrent que l'ensemble du groupe paraphylétique des vertébrés, y compris les poissons, possède 2 NCK. De façon intrigante, *Danio rerio* (*D. rerio*) comporte une copie additionnelle de chaque NCK, faisant de cette espèce, la seule connue avec potentiellement 4 protéines NCK différentes (Fig. 1.10). L'ensemble de ces travaux suggère donc que l'origine de NCK1 et NCK2 serait à la base des vertébrés, avec une duplication et conservation du gène *NCK* original en minimalement 2 gènes distincts, *NCK1* et *NCK2* supportant chacun des fonctions à la fois redondantes mais aussi spécifiques.

Ainsi, malgré le fait que NCK1 et NCK2 soient considérées redondants dans leurs fonctions, la duplication du gène *NCK* initial et la conservation des produits de cette duplication argumentent en faveur de l'existence d'une spécificité pour chacune de ces protéines.



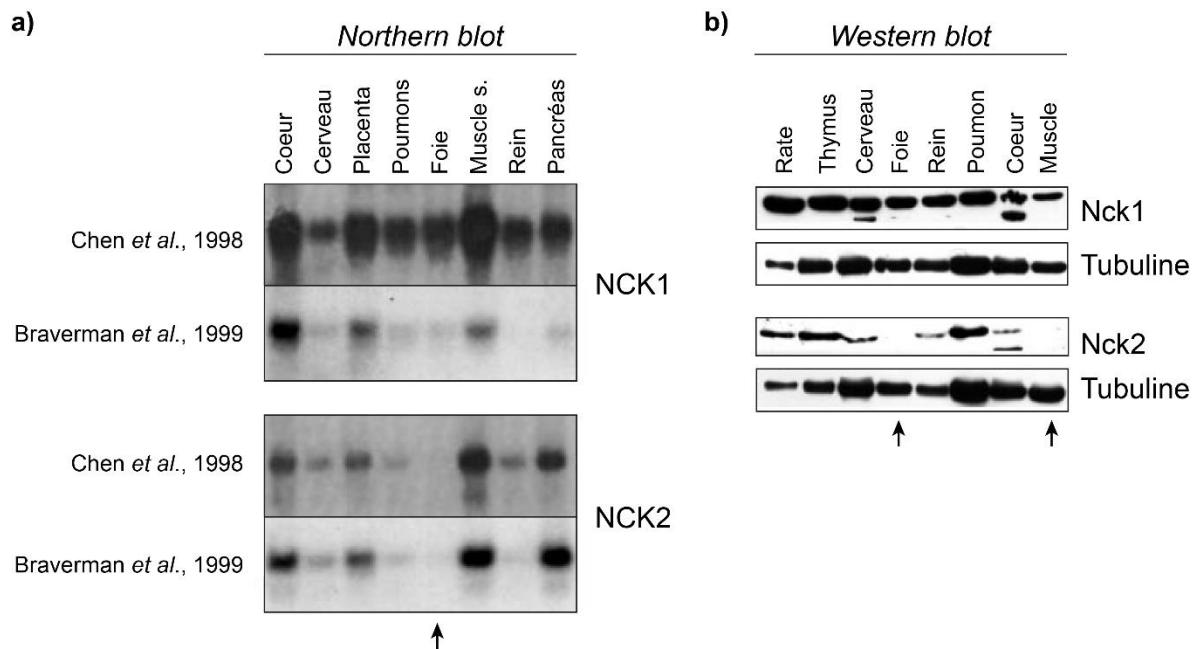
**Figure 1. 10 : La duplication du gène NCK serait survenue à la base des vertébrés.**

Arbre phylogénétique simplifié représentant la répartition des gènes *NCK1* et *NCK2* ainsi que leurs orthologues au cours de l'évolution. Des groupes rassemblant plusieurs espèces sont représentés par des triangles (e.g. Arthropodes). La duplication *NCK1/2* est indiquée par un trait rouge. Le cas particulier de *C. elegans* et de ses 2 isoformes de *NCK-1* est indiqué en bas à droite. Finalement, des espèces peu étudiées telles les gerbes de mer ou *Amphimedon queenslandica* (*A. queenslandica*) pouvant posséder une ou plusieurs copies des gènes *NCK* sont aussi représentées. Cependant, le manque d'information ne permet pas de conclure avec certitude que les produits des loci identifiés (e.g. PAC 15711041) correspondent à des paralogues de *NCK1/2*.

### 1.3.2 NCK1 et NCK2 sont exprimées différemment dans plusieurs tissus

Suite à la découverte des protéines adaptatrices NCK1 et NCK2, plusieurs études initiales ayant notamment pour objectif de démontrer que ces deux adaptateurs sont bien deux protéines différentes se sont attardées à mieux définir les patrons d'expression respectifs de ces derniers au sein de plusieurs tissus. Ainsi, il a par exemple mis de l'avant que chez l'humain, contrairement à NCK2, NCK1 semble exprimé dans le foie (Chen *et al.*, 1998; Braverman and Quilliam, 1999) (Fig. 1.11a).

Par la suite, des analyses d'expression protéique menées chez la souris ont confirmé que NCK2 n'est pas exprimée dans le foie et semble aussi absente des tissus musculaires tandis que NCK1 semble plus ubiquitaire (Bladt *et al.*, 2003) (Fig 1.11b). De plus, l'ensemble de ces études souligne qu'à l'échelle tissulaire, les niveaux transcriptionnels ou protéiques varient pour chaque NCK suggérant donc que dans certains tissus, un NCK donné pourrait dominer son paralogue et assurer certaines fonctions non compensables par ce dernier.



**Figure 1. 11 : Les protéines adaptatrices NCK1 et NCK2 sont exprimées de façon différentielle chez l'humain et la souris.**

**a)** Comparaison par *Northern blot* de l'expression de *NCK1* et *NCK2* dans différents tissus humains au travers différentes études (adapté de Chen *et al.*, 1998 et Braverman *et al.*, 1999). À l'inverse de *NCK1*, *NCK2* ne semble pas exprimé dans le foie (colonne indiquée par une flèche). **b)** Comparaison par *Western blot* de l'expression protéique de *NCK1* et *NCK2* dans

différents tissus murins. À l'inverse de NCK1, NCK2 ne semble pas exprimée dans les muscles et le foie (colonnes indiquées par des flèches). (Adapté de Bladt *et al.*, 2003).

### **1.3.3 Des partenaires spécifiques ainsi que des fonctions uniques ont été identifiées pour chaque NCK**

L'apparition de deux protéines NCK ainsi que l'expression différentielle de ces dernières suggèrent que chacune pourrait s'associer avec des partenaires spécifiques pour assurer des fonctions uniques. Cette hypothèse est de plus appuyée par plusieurs publications sporadiques démontrant que NCK1 et NCK2 peuvent chacune lier des partenaires spécifiques pour réguler des processus cellulaires distincts.

#### **1.3.3.1 NCK1 et NCK2 assurent chacune des fonctions spécifiques via leurs interactions avec le récepteur PDGFR et les GTPases de la famille Rho**

Dès la confirmation de l'individualité des protéines NCK1 et NCK2, certaines différences ont été observées entre les deux protéines. Par exemple, il a été souligné que NCK2 aurait une plus forte affinité pour le PDGFR et serait spécifiquement impliquée dans la régulation négative de voies mitogéniques (Chen *et al.*, 1998). Ces résultats complètent une série d'études indépendantes qui a identifié un site de liaison unique pour chaque NCK sur ce récepteur activé. L'adaptateur NCK1 lie ce dernier sur sa tyrosine 751 tandis que NCK2 lie la tyrosine située en position 1009, suggérant donc l'existence de déterminants moléculaires uniques au sein du domaine SH2 de NCK1 et/ou NCK2 (Nishimura *et al.*, 1993; Chen *et al.*, 2000). Par la suite, il a été mis de l'avant que via sa liaison à la tyrosine 751 du PDGFR activé, NCK1 régule spécifiquement la formation de filopodes grâce à la GTPase CDC42 tandis que NCK2, en interagissant spécifiquement avec la tyrosine 1009 de ce même récepteur, contrôle la formation de fibres de stress via la GTPase RHOA (Guan *et al.*, 2009). Ainsi, NCK1 et NCK2 via leurs interactions différentielles avec un même récepteur permettraient de réguler des fonctions moléculaires distinctes, impliquant des partenaires uniques afin de participer à des processus biologiques communs telle la migration.

En parallèle de ces études menées sur des cellules humaines fibroblastiques, il est important de rappeler le mécanisme d'ubiquitination NCK1 spécifique précédemment cité (Fig. 1.9) et son implication dans la formation des fibres de stress via la GTPase RHO (Buvall *et al.*, 2013). Ces résultats appuient également l'hypothèse de l'existence au sein des domaines SH3 de NCK1 et NCK2 de déterminants moléculaires uniques permettant à chacun de ces adaptateurs de s'associer avec des partenaires distincts.

Toutefois, l'utilisation de différentes lignées cellulaires issues d'organismes différents pourrait expliquer en partie la différence de spécificité observée dans chacune des études mentionnées. Néanmoins, chacune de ces publications appuient l'hypothèse que les protéines NCK1 et NCK2 ne sont pas complètement redondantes dans leurs fonctions.

### **1.3.3.2 NCK2 régule spécifiquement la croissance et l'extension de cellules neuronales**

Des expériences chez le xénope ont mis en évidence qu'une activation du récepteur EphA4 durant des stades embryonnaires précoces est suffisante pour induire une perte d'adhésion cellulaire conduisant à l'apparition de lésions à la surface des embryons de stade blastula (Bisson *et al.*, 2007). Dans ce même article, il a été démontré qu'une expression ectopique de NCK2 est suffisante pour abolir ces défauts tandis qu'une expression ectopique de NCK1 demeure sans effet. Ces résultats suggèrent un rôle spécifique pour NCK2 dans les processus d'adhésion et de migration dépendants des récepteurs Eph (EphR), protéines principalement exprimées dans les cellules neuronales et gouvernant la guidance axonale (Lisabeth, Falivelli and Pasquale, 2013). Par la suite, il a été démontré que NCK2 via son domaine SH2 interagit spécifiquement avec la protéine membranaire Ephrine-B1, un ligand des récepteurs EphR puis via ses domaines SH3 avec plusieurs interacteurs spécifiques telles les protéines AXIN1, *Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K* (HnRNPK) ou encore la PAXILLINE (Cowan and Henkemeyer, 2001; Guan *et al.*, 2007). Des résultats similaires ont été obtenus avec d'autres types de récepteurs telles les protéines *Roundabout homolog* (ROBO) 1 et ROBO 2 renforçant l'idée que NCK2 en opposition à NCK1 participe à l'assemblage de

complexes signalétiques requis pour l'élongation axonale et la migration neuronale (Round and Sun, 2011).

### **1.3.3.3 Exemples isolés de spécificité pour les protéines adaptatrices NCK1 et NCK2**

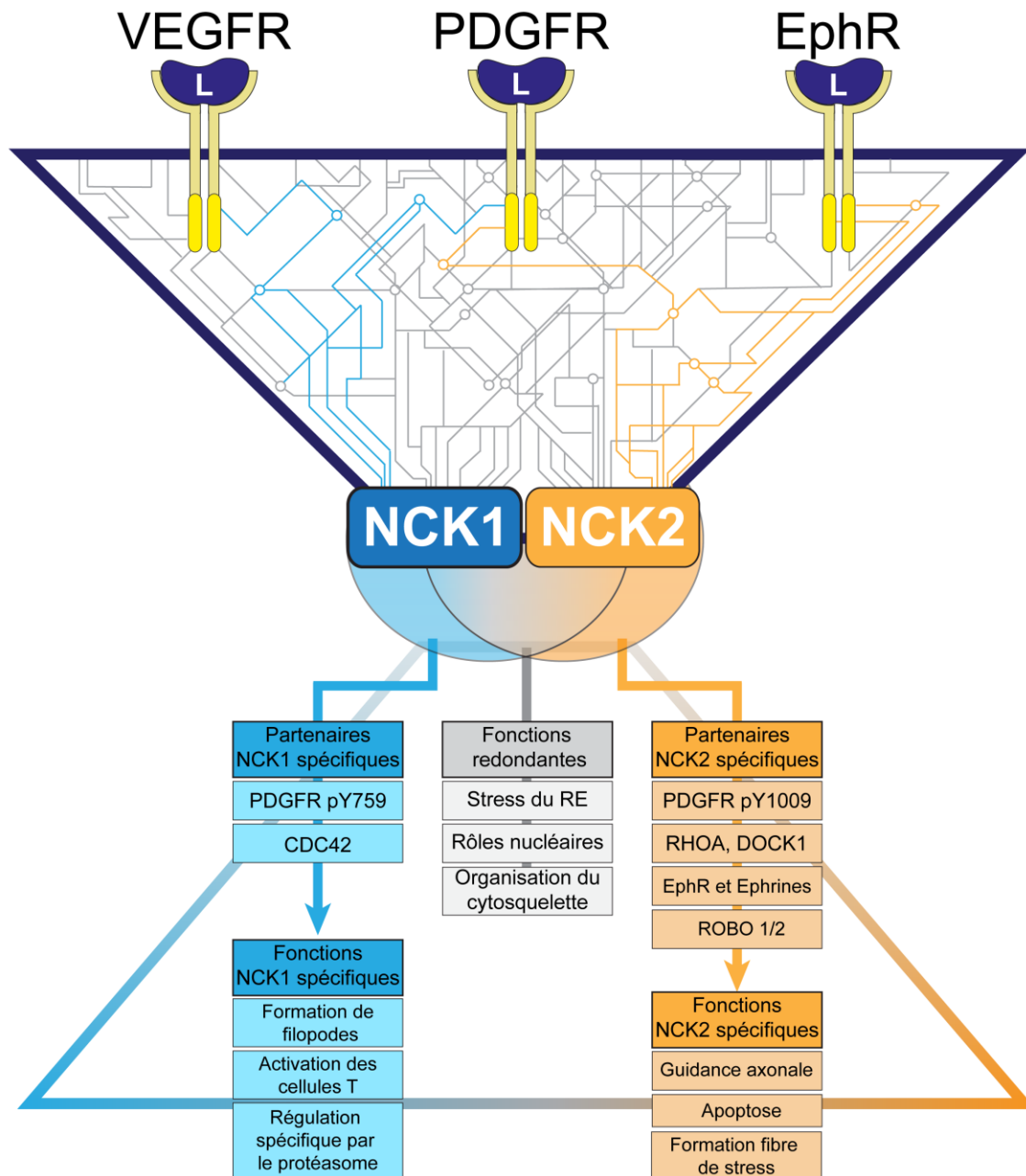
En plus des exemples précédemment cités, plusieurs études ont rapporté de manière isolée d'autres cas de spécificité pour chacun des adaptateurs NCK1 et NCK2 sans toutefois préciser le mode de liaison ou les mécanismes engendrant cette spécificité. Ainsi, il a été mis en lumière que contrairement à NCK1, NCK2 interagit spécifiquement via son troisième domaine SH3 avec la protéine *LIM and senescent cell antigen-like-containing domain protein 1* (LIMS1), acteur important de la prolifération et différenciation cellulaire, mais aussi de la régulation de l'adhésion par les intégrines (Tu, Li and Wu, 1998). De plus NCK2 serait beaucoup plus impliquée que NCK1 dans le processus d'induction de l'apoptose suite à l'apparition de dommages à l'ADN (Errington and Macara, 2013) tel que précédemment mentionné (Fig. 1.8). Ce dernier point appuie une étude de 2001 démontrant par double hybride que NCK2 interagit spécifiquement via ses domaines SH3 avec la protéine *Dedicator of cytokinesis protein 1* (DOCK1), une protéine impliquée dans le réarrangement du cytosquelette d'actine suite à des événements de type apoptotique (Tu, Kucik and Wu, 2001). À l'inverse, dans des cellules immunitaires humaines, suite à l'activation du *T-cell receptor* (TCR), NCK1 semble spécifiquement requise pour induire la phosphorylation des protéines ERK1/2, déclencher la production d'interleukine 2 et l'expression de marqueurs d'activation immunitaire assurant l'activation optimale des cellules de type T (Roy *et al.*, 2010; Yiemwattana *et al.*, 2012; Ngoenkam *et al.*, 2014).

Par conséquent, chaque NCK dans une certaine mesure semble capable d'interagir de manière spécifique avec divers partenaires impliqués dans des fonctions cellulaires plus ou moins proches.

### 1.3.4 Conclusion

En dépit des études suggérant que NCK1 et NCK2 sont redondants et similaires dans leurs fonctions, un certain nombre d'éléments suggèrent le contraire. Par exemple, la présence d'un seul gène NCK chez certaines espèces mais l'identification de différentes isoformes de tailles différentes avec des localisations et des fonctions uniques. Aussi, la duplication d'un gène *NCK* initial en deux gènes distincts et leurs conservations au cours de l'évolution argumente en faveur de cette hypothèse. Finalement, l'identification d'interacteurs spécifiques pour chaque NCK et la mise en évidence de fonctions moléculaires ou processus biologiques régulés spécifiquement par chacun laisse supposer que les domaines SH2/SH3 de NCK1/2 soient dotés de leurs propres mécanismes de spécificité permettant d'expliquer, de manière générale, la spécificité de ces protéines adaptatrices (Fig. 1.12).





**Figure 1. 12 : NCK1 et NCK2 assurent simultanément des fonctions redondantes et spécifiques.**

Comme représenté sur le schéma, NCK1 et NCK2 peuvent interagir avec des partenaires spécifiques ou communs afin de réguler des fonctions uniques ou redondantes. Les voies, fonctions et partenaires NCK1 spécifiques sont indiqués en oranges tandis que ceux NCK2 spécifiques sont indiqués en bleu. Les éléments communs et redondants à NCK1/2 précédemment décrits sont indiqués en gris.

## **1.4 Fonctions et spécificité des domaines SH2 et SH3, composantes clefs des protéines NCK1 et NCK2**

Les protéines adaptatrices NCK1 et NCK2 résultent de l'assemblage séquentiel de domaines SH3 et SH2 séparés par des régions courtes et désordonnées. Le fait que plusieurs études indépendantes démontrent que contrairement à ce qui est admis, NCK1 et NCK2 puissent chacun lier des partenaires uniques pour assurer des fonctions spécifiques suggère que les domaines qui les constituent sont un élément clef de cette spécificité.

### **1.4.1 Découverte, structure, fonctions et spécificités des domaines SH2**

Les domaines SH2 partagent la propriété de lier des tyrosines phosphorylées. Malgré un spectre de partenaires possibles extrêmement large, la liaison spécifique de protéines à domaines SH2 avec des motifs précis démontre l'existence d'une sélectivité moléculaire et fonctionnelle résidant dans l'architecture de ces domaines ainsi que dans les propriétés contextuelles de la phosphotyrosine qu'ils lient.

#### **1.4.1.1 Découverte et caractérisation initiale des domaines SH2**

Les domaines SH2 seraient apparus précocement chez le groupe des Unikontas, des organismes unicellulaires eucaryotes (Liu *et al.*, 2011). Le nombre de domaines SH2 se serait ensuite élargi dans le groupe des métazoaires avec l'apparition des tyrosines kinases et de la signalisation pTyr-dépendante aboutissant à l'apparition chez l'humain d'au moins 121 SH2 différents produits par 111 gènes distincts (Liu *et al.*, 2011; Liu, Engelmann and Nash, 2012). Ces domaines ont été mis en évidence pour la première fois en 1986 par l'équipe du Dr Tony Pawson qui, en comparant plusieurs protéines virales a remarqué que toutes celles-ci contenaient une région conservée d'environ 100 acides aminés en amont de leur domaine kinase (Sadowski, Stone and Pawson, 1986). Cette région, sans activité catalytique a alors été appelée SH2 pour *SRC Homology domain 2*, le domaine kinase (SH1) étant défini comme première source d'homologie avec les protéines de la famille SRC (Pawson, 1988).

Suite à la découverte des domaines SH2, les premières observations suggérant que ce nouveau domaine serait dépourvu d'activité catalytique tout en étant conservé au sein de nombreuses tyrosines kinases ont amené la communauté scientifique à spéculer que la fonction principale de celui-ci serait de diriger des interactions spécifiques entre protéines (Sadowski, Stone and Pawson, 1986). Cette hypothèse proposée à la fin des années 80 a fait du domaine SH2 le premier domaine de liaison de peptide découvert, révolutionnant ainsi la conception des interactions protéine-protéine et la vision générale de l'organisation de la signalisation intracellulaire (Sadowski, Stone and Pawson, 1986; Kuriyan and Cowburn, 1997). Cette présomption a ensuite été vérifiée en 1990 par les mêmes laboratoires qui ont démontré que les domaines SH2 de plusieurs protéines tel celui de l'adaptateur CRK lient préférentiellement des tyrosines phosphorylées (Moran *et al.*, 1990). Le fait que de nombreuses tyrosines phosphorylées se retrouvent principalement sur des RTK activés a amené les auteurs à tester puis valider la capacité des domaines SH2 à lier directement et spécifiquement certains récepteurs activés tel l'EGFR (Flynn, 2001; Lemmon and Schlessinger, 2010).

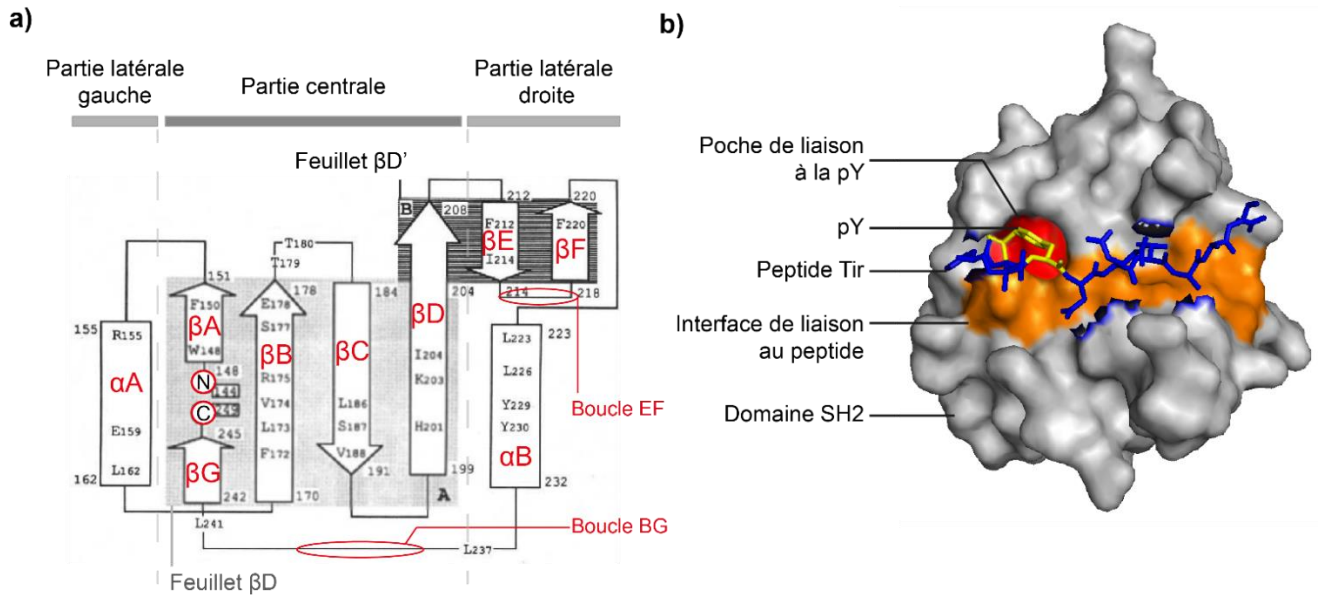
Ainsi, l'ensemble de ces découvertes a permis d'affiner la fonction potentielle des domaines SH2 et donc des protéines adaptatrices en établissant le concept que ces dernières favorisent l'assemblage de réseaux de signalisation au niveau d'un récepteur activé.

### **1.4.1.2 Caractérisation de la structure et du mode de liaison des domaines SH2**

#### 1.4.1.2.1 Caractérisation de la structure consensus des domaines SH2

Les premières structures de domaines SH2 non complexés ont simultanément été rapportées en 1992 pour plusieurs protéines, notamment pour SRC (Overduin *et al.*, 1992; Rizzuto *et al.*, 1992; Waksman, 1992). Malgré l'utilisation de techniques et protéines différentes, les structures publiées ont mis en avant des compositions similaires et une organisation conservée. Ces structures, comprenant au total 7 brins  $\beta$  et 2 hélices  $\alpha$  ont dévoilé qu'un domaine SH2 est organisé autour d'un feuillet  $\beta$  antiparallèle central (nommé  $\beta$ D) formé de 5 brins  $\beta$  (A,B,C,D,G) qui divise le domaine en deux sites fonctionnellement distincts. Le premier, flanqué d'une hélice  $\alpha$ A est principalement impliqué dans la liaison de la tyrosine phosphorylée. Le deuxième, flanqué d'une hélice  $\alpha$ B et de deux boucles inter-brin  $\beta$  (EF et BG

respectivement situées entre les brins  $\beta E/\beta F$  et l'hélice  $\alpha B$  et le brin  $\beta G$ ) fournit les résidus interagissant avec la chaîne peptidique en C-ter de la tyrosine phosphorylée. Enfin un petit feuillet (nommé  $\beta D'$ ) composé en général de 3 brins  $\beta$  (D,E,F) permet la fermeture de cette deuxième portion du domaine (Kuriyan and Cowburn, 1997) (Fig. 1.13a).



**Figure 1. 13 : L'ensemble des domaines SH2 présente une structure secondaire et tertiaire conservée.**

**a)** Adaptation de la toute première représentation de la structure d'un domaine SH2 annotée avec la nomenclature moderne. Cette dernière, publiée en 1992 pour le SH2 de la protéine SRC met en évidence la structure secondaire de ce domaine : un feuillet  $\beta$  central (nommé  $\beta D$  et annoté avec un rectangle gris clair par les auteurs) composé de 5 brins  $\beta$  (A, B, C, D, G notés en rouge) flanqués d'une hélice  $\alpha A$  (rectangle) impliquée dans la liaison de la pY et d'une hélice  $\alpha B$  et de 2 boucles EF et BG (annotées en rouge) impliquées dans la liaison des acides aminés en aval de la pY. Le petit feuillet  $\beta D'$  composé des brins  $\beta D$ ,  $\beta E$ ,  $\beta F$  a été indiqué par un rectangle gris foncé par les auteurs. Pour plus de clarté, les extrémités N-terminale et C-terminale du domaine (respectivement annotées N et C) ont été indiquées (Adapté de Overduin *et al.*, 1992).

**b)** Représentation en trois dimensions du domaine SH2 de la protéine adaptatrice NCK1 couplé au peptide Tir (PDB : 2CI9). Le peptide Tir est représenté en bleu tandis que sa pY est indiqué en jaune. L'interface de liaison au peptide (principalement constituée de l'hélice  $\alpha B$  et des boucles EF, BG) est représentée en orange tandis que la poche de liaison à la pY (constituée principalement de l'hélice  $\alpha A$ ) est représentée en rouge. Le reste du domaine, non requis pour la liaison au peptide est représenté en gris (Adapté de Frese *et al.*, 2006).

#### 1.4.1.2.2 Caractérisation du mode de liaison d'un domaine SH2 sur une tyrosine phosphorylée

Suite à la détermination de la structure consensus d'un domaine SH2, plusieurs études ont permis de mieux définir le mode de liaison de ces domaines sur une pTyr. La première structure cristallographique d'un domaine SH2 couplé à un phosphopeptide de haute affinité a permis de mieux comprendre ce mécanisme de liaison en révélant notamment la présence à la surface du domaine d'une poche hydrophobe acceptant la pY et la présence de poches secondaires ou interfaces de liaison pouvant interagir avec les résidus à proximité de la pY (Waksman *et al.*, 1993) (Fig. 1.13b).

En parallèle, l'analyse de la séquence et de la structure des domaines SH2 a mis en évidence que 118 des 121 SH2 humains incluant NCK1/2 présentent une arginine (R) conservée en position  $\beta$ B5 (Liu, Engelmann and Nash, 2012). Située à la base de la poche de liaison à la pY, la simple mutation de celle-ci est suffisante pour abolir la liaison entre domaine SH2 et phospho-peptide (Bibbins, Boeuf and Varmus, 1993; Tanaka, Gupta and Mayer, 1995; Liu, Engelmann and Nash, 2012). De plus, la position de cette arginine, située trop profondément dans la poche de liaison pour être contactée par le groupement phosphate d'une serine ou thréonine phosphorylée, explique en grande partie la spécificité des domaines SH2 envers des tyrosines phosphorylées (Mayer and Baltimore, 1993). Postérieurement, la détermination et publication de la structure d'autres domaines SH2 dans la *Protein Data Bank* (PDB, Berman *et al.* 2000) a permis de confirmer ce mode de liaison tout en définissant des résidus conservés structurellement fondamentaux pour l'intégrité de ces domaines (Bibbins, Boeuf and Varmus, 1993; Rahuel *et al.*, 1996; Frese *et al.*, 2006).

#### 1.4.1.2.3 Découverte de fonctions atypiques assurées par les domaines SH2

En parallèle de l'ensemble des travaux caractérisant l'interaction de domaines SH2 avec des pTyr, il est important de souligner qu'une étude récente a démontré la présence à la surface de 90% des SH2 humains (incluant NCK1/2) de zones cationiques distinctes de la poche de liaison à la pTyr. Ces zones permettraient d'ancrer un SH2 directement à la membrane par interaction avec des phosphoinositides malgré l'absence de signal (e.g. myristoylation) ou de domaine directement requis pour cette fonction (Park *et al.*, 2016). Ainsi, cette nouvelle

caractéristique intrinsèque à la majorité des SH2 élargit le mécanisme d'action de ce domaine et donc, par extension, des protéines adaptatrices, en leur conférant des propriétés proches de celles des protéines d'arrimage.

### 1.4.1.3 Étude de la spécificité des domaines SH2

#### 1.4.1.3.1 Caractérisation initiale de la spécificité des domaines SH2

Les premiers concepts de spécificité des SH2 ont émergé suite à la comparaison de séquences primaires de récepteurs préférentiellement liées par certains de ces domaines. Par comparaison et déduction, ces études ont permis d'envisager des motifs de haute affinité pour certains de ces domaines (Cantley, Auger *et al.*, 1991). Cette compréhension initiale a permis de renforcer l'hypothèse d'une spécificité SH2-dépendante tout en suggérant l'importance des résidus situés en aval d'une tyrosine phosphorylée (Waksman, 1992). Plusieurs études utilisant des bibliothèques dégénérées de phosphopeptides telle la bibliothèque *Oriented Peptide Array Library* (OPAL) en combinaison avec un grand nombre de domaines SH2 purifiés a permis la caractérisation des motifs préférentiellement liés par certains domaines SH2 (Songyang *et al.*, 1993, 1994; Songyang and Cantley, 1995; Rodriguez *et al.*, 2004). Ainsi, il a été validé que chaque domaine SH2 sélectionne un motif optimal unique composé d'acides aminés situés dans des positions précises. Par exemple, le domaine SH2 de l'adaptateur GRB2 lie spécifiquement un motif de type pYxNx (où x représente n'importe quel acide aminé) tandis que les protéines adaptatrices NCK1 et NCK2 lient préférentiellement un motif de type pY-D/E-x-V/P (Songyang *et al.*, 1994; Frese *et al.*, 2006). Toutefois, ces motifs précis peuvent être liés par plusieurs SH2 différents et permettent ainsi une certaine flexibilité autorisant un degré de redondance (Songyang and Cantley, 1995).

En parallèle de ces travaux menés sur les motifs de liaison, certaines recherches se sont attardées à élucider si la structure et l'architecture même de ces domaines pouvaient être en partie responsables de cette spécificité. L'alignement des séquences de nombreux domaines SH2 ainsi que la modélisation de certains a conduit à l'identification de groupes de résidus différenciellement conservés, situés principalement au sein du quatrième brin  $\beta$  ( $\beta$ D) en position 3 ou 5 ( $\beta$ D3/5). Ces résidus sont importants pour le contact avec les résidus en aval de la tyrosine

phosphorylée (Waksman *et al.*, 1992). De plus, il a été démontré qu'une simple mutation ponctuelle du résidu en position  $\beta$ D5 est suffisante pour commuter la spécificité entre plusieurs de ces domaines (Songyang *et al.*, 1995). Toutefois, le résidu en position  $\beta$ D5 étant souvent similaire dans des SH2 structurellement proches tels ceux de NCK1/2, ce mécanisme ne permet pas d'expliquer les mécanismes de spécificité gouvernant le domaine SH2 de ces protéines.

**Tableau 1. 2 : Classification en 3 grands groupes des domaines SH2 basée sur leurs séquences primaires et motifs OPAL préférentiellement liés.**

Tableau récapitulatif de la classification des domaines SH2 en 3 grands groupes (notés de I à III) initialement établie par Z. Songyang et collaborateurs en 1993 puis complétée par Huang et collaborateurs. Les protéines NCK1 et NCK2 (groupe 1A) sont indiquées en gras. Les motifs préférentiellement liés par chaque sous-groupe est indiqué. Le type d'acide aminé requis dans le motif est précisé : [-] : acide,  $\Phi$  : hydrophobe, ND : Non décrit. Sur les SH2, le résidu en position  $\beta$ D5 prédit comme important pour le contact avec les résidus en aval de la tyrosine phosphorylée est aussi indiqué. La position relative (P) par rapport à la tyrosine phosphorylée de l'acide aminé clef du peptide important pour la spécificité est indiquée dans la dernière colonne. Adapté de Kaneko *et al.*, 2010.

	Groupe	Domaine SH2	Motifs lié	$\beta$ D5	Résidu
<b>I</b>	IA	<b>NCK1, NCK2</b> , SRC, ABL1, ABL2, etc.	pY[-][-] $\Phi$	Y/F	P+3
	IB	CRK, CRKL, RASGAP, etc.	pYxx $\Phi$	Y/F	P+3
	IC	GRB2, GRB7, GRB10 etc.	pYxN	Y/F	P+2
	IE	$\alpha$ -Chimaerine, $\beta$ -Chimaerine	ND	Y/F	?
<b>II</b>	IIA	VAV1, VAV2, PI3K-p85 $\alpha$ , etc.	pY $\Phi$ x $\Phi$	I/C/L/V/A/T	P+3
	IIB	SHC1, SH2B, BLNK etc.	pY[E/D/x]x $\Phi$	L/I	P+3
	IIC	CBL, BKS, etc.	pYxxx $\Phi$	Y/T	P+4
	IID	SPT6	pY[P/I]P[K/R]M	V	?
<b>III</b>	III	STAT1, STAT3, STAT5A	pYxxQ	V/L	?

Ainsi, l'ensemble de ces résultats a permis de fournir une explication initiale sur la spécificité des domaines SH2 et protéines adaptatrices en démontrant que les résidus situés en aval de la tyrosine phosphorylée jouent un rôle clef dans cette spécificité, mais aussi que les

résidus du domaine SH2 lui-même, notamment ceux situés en position  $\beta$ D3/5 participeraient au processus de spécificité (Tableau 1.2).

Cependant, le fait que les SH2 d'un même groupe tels ceux de adaptateurs NCK1 et NCK2 partagent les mêmes résidus en positions  $\beta$ D3 et  $\beta$ D5 ainsi que des spécificités *in vitro* très similaires envers les motifs Y-D/E-X-V/P laisse supposer que les mécanismes de spécificité précédemment décrits peuvent être uniquement appliqués à des SH2 de groupes différents (Frese *et al.*, 2006). Ainsi d'autres mécanismes de spécificité restent possiblement à définir afin d'expliquer la spécificité des SH2 d'un même groupe.

#### 1.4.1.3.2 Découverte de l'implication des boucles EF et BG dans la spécificité des domaines SH2

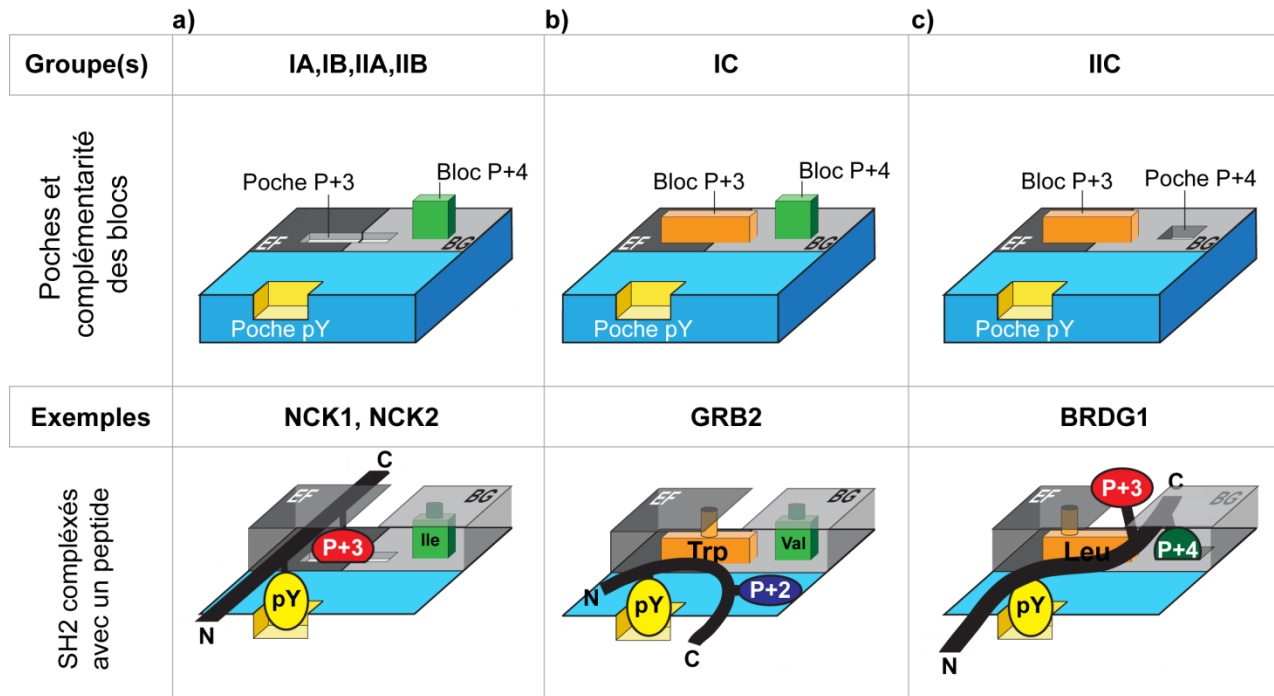
Lors de la modélisation par cristallographie de plusieurs domaines SH2 du groupe IA et IB en complexe ou non avec un substrat, il avait été envisagé qu'en plus des paramètres précédemment décrits, une seconde poche de liaison hydrophobe spécialisée dans la reconnaissance et la liaison du troisième résidu en aval de la pY puisse être formée par les boucles EF et BG (Huang *et al.*, 2008). Cette poche imposerait un second niveau de spécificité plus subtil pour chaque domaine SH2. Ce mécanisme, principalement utilisé par les SH2 des groupes IA, IB, IIA, IIB permettrait d'expliquer en partie la nécessité d'un résidu hydrophobe en aval de la phosphotyrosine en position P+3 (Fig. 1.14a).

En parallèle, les modélisations de SH2 du groupe IC préférant une asparagine en position +2 tel le SH2 de l'adaptateur GRB2 ont permis de mettre en évidence que, pour les SH2 de ce groupe, cette poche est occupée par un résidu de la boucle EF du domaine SH2 tel le tryptophane 121 de GRB2. Ce résidu prévenant ainsi l'insertion du résidu hydrophobe P+3 dans la poche de liaison imposerait aussi par sa taille importante une torsion au substrat. Ce dernier serait alors propice à exposer son résidu en deuxième position après la tyrosine phosphorylée, qui, si étant une asparagine préviendrait un encombrement stérique et autoriserait l'interaction du peptide avec le domaine SH2 (Ogura *et al.*, 1999; Nioche *et al.*, 2002) (Fig.1.14b).

Finalement, ce concept de modulation de la spécificité des domaines SH2 par le contrôle de l'accessibilité des poches de liaison régulée par les boucles EF et BG a par la suite été complété en 2010 par l'équipe du Dr S.S. Li qui a mis en évidence l'existence d'une seconde poche



hydrophobe spécialisée dans la reconnaissance du résidu P+4 (Fig. 1.14c). Cette poche occupée dans la plupart des SH2 par une isoleucine (Ile) ou valine (Val) de la boucle BG (Fig. 1.14a, b) reste accessible pour les SH2 du groupe IIC (Fig. 1.14c) expliquant ainsi la nécessité d'un résidu hydrophobe en position P+4 (Kaneko *et al.*, 2010) (Tableau 1.2).



**Figure 1. 14 : Représentation schématique des différents mécanismes de spécificité SH2-dépendant.**

**a-c)** Pour chaque groupe de SH2, la topologie du domaine ainsi que sa surface sont représentées. Les boucles EF et BG ainsi que les différentes poches de liaison occupées ou non par différents blocs sont indiquées. Le peptide est représenté par un trait noir tandis que les différents résidus clefs sont indiqués.

Ainsi, l'ensemble de ces travaux a démontré que la conformation de boucles BG et EF ainsi que l'insertion de certains de leurs résidus dans différentes poches de liaison situées à la surface d'un domaine SH2 participent au contrôle de la spécificité de ces domaines envers leurs ligands en permettant la reconnaissance de résidus spécifiques en aval d'une tyrosine phosphorylée. Malgré toutes ces évidences, aucun mécanisme permettant d'expliquer la spécificité de SH2 d'un même groupe aux structures proches tels ceux des adaptateurs NCK1 et NCK2 n'a à ce jour été mis en évidence.

## 1.4.2 Découverte, structure, fonctions et spécificité des domaines SH3

### 1.4.2.1 Découverte et caractérisation initiale des domaines SH3

Les domaines SH3, autre grande composante des protéines adaptatrices sont spécialisés principalement dans la reconnaissance de motifs contenant des prolines. Ces domaines possèdent eux-aussi une sélectivité moléculaire et fonctionnelle véhiculée par leurs évolutions différentielles, leurs architectures différentes et le nombre important de motifs distincts qu'ils peuvent reconnaître.

Plusieurs analyses bioinformatiques ont déterminé que les domaines SH3 seraient apparus relativement tôt au cours de l'évolution. En effet, certaines protéines bactériennes exprimeraient des domaines homologues aux domaines SH3 (Ponting *et al.*, 1999; Whisstock and Lesk, 1999), tandis que les protéomes de nombreux eucaryotes tels *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*), *C. elegans* et *Drosophila melanogaster* (*D. melanogaster*) contiennent un nombre important de protéines arborant également ces domaines (Rubin *et al.*, 2000). Ainsi, ce type de domaine se serait rependu précocement au cours de l'évolution notamment lors de la complexification des organismes vivants aboutissant à l'apparition chez l'humain d'un peu moins de 300 domaines SH3 différents présents sur au moins 210 protéines distinctes (Nash, 2013). Ces derniers ont initialement été remarqués en 1988 par deux équipes différentes comme étant des régions d'environ 60 acides aminés conservées parmi des protéines aux fonctions et structures divergentes telles les kinases de la famille SRC ou l'adaptateur CRK (Bruce J. Mayer, Hamaguchi and Hanafusa, 1988; Stahl *et al.*, 1988). Les caractéristiques de ce domaine telles sa conservation sur les protéines de la famille SRC et sa découverte survenue 2 ans après celle des domaines SH2 ont naturellement amenées les auteurs à nommer ce domaine SH3. Finalement, les études initiales démontrant que l'inactivation du domaine SH3 de la protéine ABL était suffisante pour activer son potentiel oncogénique (Franz, Berger and Wang, 1989; Jackson and Baltimore, 1989), combiné au manque d'activité catalytique de ce domaine ont amené les auteurs à conclure que les domaines SH3 seraient spécialisés dans les interactions protéine-protéine (Pawson, 1992).

Des criblages effectués notamment avec les SH3 des protéines ABL et SRC ont permis l'identification des premiers partenaires de ces domaines telle la protéine 3BP1 (Cicchetti *et al.*, 1992). Toutefois, à l'inverse des domaines SH2 pour lesquels le motif pY avait pu facilement être identifié, aucun point commun apparent ou motif(s) conservé(s) pouvant suggérer le mécanisme de liaison des domaines SH3 n'a été détecté sur ces partenaires. Cependant, l'étude de la liaison de domaines SH3 purifiés tels ceux des protéines ABL, NCK1 ou SRC avec différents peptides ont suggéré que ces derniers lieraient avec différentes affinités des régions d'environ 10 acides aminés riches en prolines (Ren *et al.*, 1993).

Ainsi, la présence des domaines SH3 au sein de protéines aux fonctions signalétiques telles les protéines adaptatrices ainsi que l'abondance des motifs qu'ils lient parmi les protéines cytoplasmiques ont permis de définir le rôle de ces domaines comme modules de liaison participant au couplage de signaux transmis de la membrane plasmique vers des effecteurs cytoplasmiques en aval (Pawson, 1992; Kuriyan and Cowburn, 1997; Li, 2005).

#### **1.4.2.2 Caractérisation de la structure des domaines SH3**

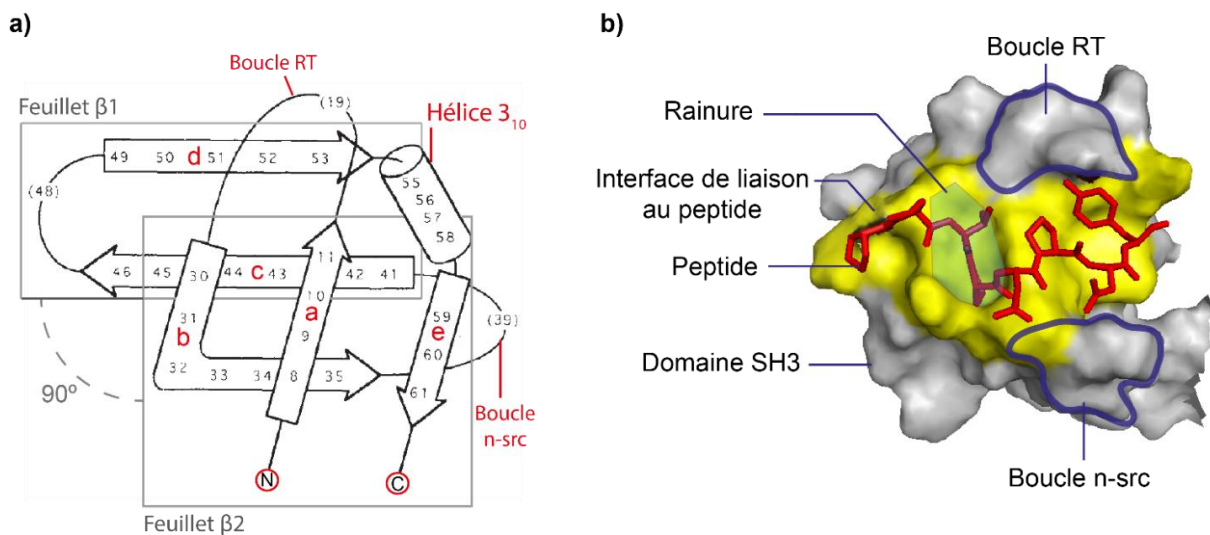
Afin de mieux envisager le mode de fonctionnement des domaines SH3 et notamment la complexité de leurs liaisons découlant de la grande variété de motifs que ces derniers sont capables de lier, plusieurs équipes se sont attardées à déterminer leurs structures cristallographiques.

##### **1.4.2.2.1 Caractérisation de la structure consensus d'un domaine SH3**

La publication en 1992 des premières structures cristallographiques de domaines SH3 a permis de mettre en évidence qu'en opposition aux domaines SH2, les structures de ces derniers semblent moins conservées notamment dans le nombre de brins  $\beta$  les constituant (Musacchio *et al.*, 1992; Yu *et al.*, 1992). La publication de la structure cristallographique du domaine SH3 de la protéine FYN a permis de définir une structure consensus aux SH3 ainsi que la nomenclature qui l'accompagne (Noble *et al.*, 1993). Ainsi, par convention, un domaine SH3 est généralement composé de 2 séries de 2 ou 3 brins  $\beta$  (5 ou 6 brins  $\beta$  au total) constituant 2 feuillets  $\beta$

antiparallèles perpendiculaires l'un à l'autre grâce à deux boucles variables notées RT et n-src et une hélice  $3_{10}$  imposant une rotation de  $120^\circ$ /résidu (Fig. 1.15a).

L'ensemble des brins  $\beta$  adopte une conformation en tonneau  $\beta$  compacte, structure où tous les brins se tordent et s'enroulent faisant en sorte que le premier brin lie le dernier et ferme la structure. Finalement, la caractérisation et modélisation de la structure d'autres domaines SH3 a confirmé que malgré des séquences primaires très différentes (au maximum 25% similaires), les domaines SH3 possèdent des structures tertiaires proches et organisées telles que précédemment décrites (Koyama *et al.*, 1993; Kay, 2012).



**Figure 1. 15 : L'ensemble des domaines SH3 présente une structure secondaire et tertiaire similaire.**

**a)** Adaptation de la toute première représentation de la structure d'un domaine SH3 présentée par Musacchio et collaborateurs annotée avec la nomenclature moderne. Cette dernière, publiée en 1992 pour le SH3 de l' $\alpha$ -spectrine met en évidence la structure secondaire de ce domaine : 2 feuillets  $\beta$  (composés respectivement des brins a,b,e et c,d) orientés perpendiculairement grâce à la présence de 2 boucles (RT et n-src) et d'une hélice  $3_{10}$ . Pour plus de clarté, les extrémités N-terminale et C-terminale du domaine (respectivement annotées N et C) ont été indiquées (Adapté de Musacchio *et al.*, 1992). **b)** Représentation en trois dimensions du domaine SH3 de la protéine adaptatrice NCK2 couplé avec la sous-unité CD3 $\epsilon$  (PDB : 2JXB). Le peptide appartenant à CD3 $\epsilon$  est représenté en rouge. L'interface de liaison au peptide (principalement constituée d'acides aminés aromatiques) est représentée en jaune tandis qu'un exemple de rainure dans laquelle le peptide s'insère est représenté en bleu transparent. Pour plus de clarté, les boucles RT et n-src bordant la poche de liaison ont été indiquées. Le reste du domaine, non primordial pour la liaison au peptide est représenté en gris (Adapté de Takeushi *et al.*, 2007).

#### 1.4.2.2.2 Caractérisation du mode de liaison d'un domaine SH3

Suite à la détermination de la structure consensus des domaines SH3, plusieurs études se sont attardées à caractériser le mode de liaison de peptides arborant des polyprolines sur ces derniers. Ainsi, la résolution de la structure du domaine SH3 de la protéine SRC complexé à des peptides riches en prolines a mis en évidence la présence à la surface du domaine d'une poche hydrophobe plane bordée de résidus aromatiques conservés permettant l'insertion du peptide au niveau du domaine (Yu *et al.*, 1992) (Fig. 1.15b). Cette poche plane est notamment composée de plusieurs cavités définies par la présence d'acides aminés aromatiques conservés tels un doublet de tryptophanes. Une simple mutation de ces résidus est suffisante pour abolir la liaison du SH3 avec son ligand (Musacchio, Wilmanns and Saraste, 1994; Tanaka, Gupta and Mayer, 1995; Mayer, 2001). Finalement, cette poche est encerclée par les boucles RT et n-Src venant constituer des rainures peu profondes et des poches de liaisons dans lesquelles le peptide riche en prolines peu s'insérer (Kay, 2012) (Fig. 1.15b).

En parallèle, plusieurs études ont permis de comprendre pourquoi les résidus prolines et par extension les motifs PxxP sont préférentiellement liés par les domaines SH3 et génèrent des interfaces de liaisons prises par ce type de domaines. Premièrement, pour être lié, un motif doit être exposé. Les prolines sont des résidus abondants qui, par leurs propriétés intrinsèques, limitent la formation de structures secondaires. Ils se retrouvent ainsi généralement exposés, donc accessibles. Deuxièmement, la structure du résidu proline restreint grandement le nombre de conformations dans lequel celui-ci peut être retrouvé. Il favorise ainsi la formation de régions désordonnées, redondantes et stables, donc propices aux interactions (Li, 2005).

### 1.4.2.3 Étude de la spécificité des domaines SH3

#### 1.4.2.3.1 Caractérisation initiale de la spécificité des domaines SH3

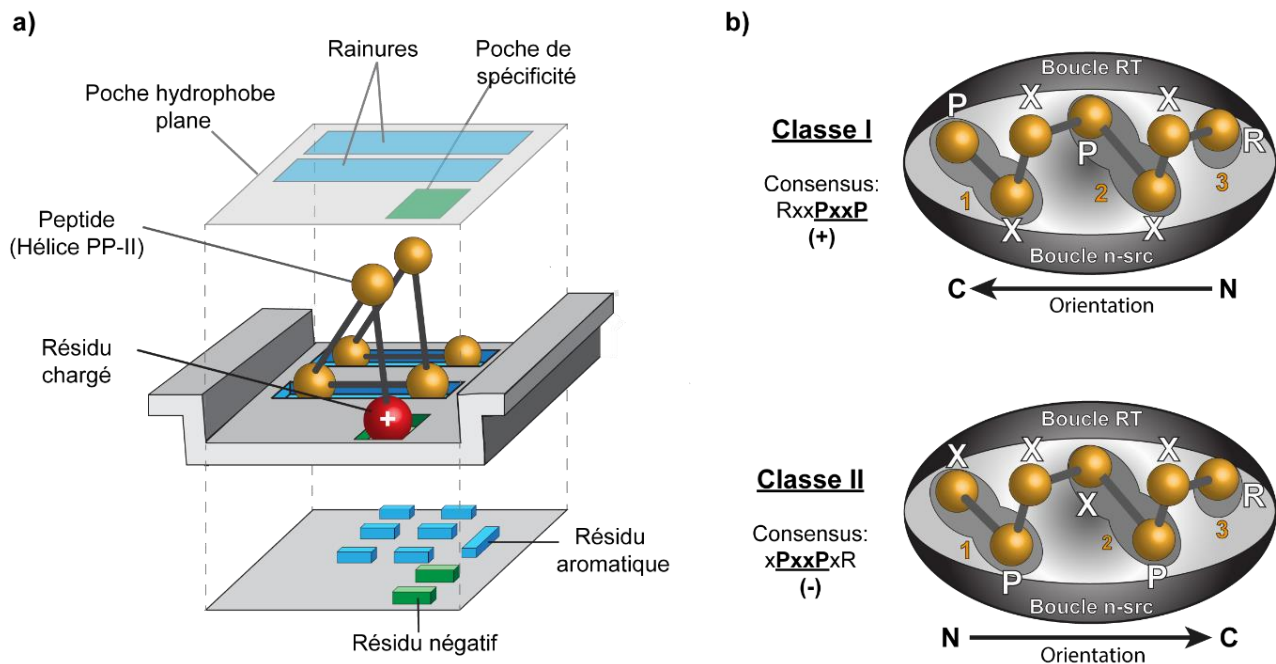
Une des premières découvertes concernant la spécificité des domaines SH3 fut qu'une partie de leur sélectivité réside dans l'organisation de la surface de leur poche hydrophobe. Tel que décrit précédemment, cette poche est composée minimalement de deux rainures dont les

organisations reposent sur la présence d'acides aminés aromatiques clefs situés dans des positions précises et d'une petite poche fréquemment négative, dite poche de spécificité formée par des acides aminés chargés négativement tels des acides aspartiques et glutamiques (Mayer, 2001) (Fig. 1.16a).

Un second paramètre clef dans la spécificité des domaines SH3 repose dans l'architecture du peptide qu'ils lient. En effet, ce dernier adopte généralement une conformation hélicoïdale appelée hélice polyproline-2 (PP-II). Cette structure, constituée des prolines organisées en trois hélices symétriques successives, forme le cœur du peptide. Celui-ci vient occuper les rainures à la surface du SH3 formées par les résidus aromatiques tandis qu'un résidu distal, généralement chargé positivement, s'insère dans la poche de spécificité (Fig. 1.16a). La nature symétrique de l'hélice PP-II ainsi que sa position au niveau du substrat autorise 2 orientations peptidiques différentes. Ces dernières, notées + ou – définissent ainsi deux grandes classes de domaines SH3 liant préférentiellement l'une ou l'autre de ces orientations (Yu *et al.*, 1994). Chacune de ces orientations est principalement dictées par la position sur le peptide des résidus prolines, mais aussi d'acides aminés positifs telles des arginines venant interagir avec des résidus négatifs formant la poche de spécificité (Feng *et al.*, 1994; Lim, Richards and Fox, 1994).

Finalement, l'utilisation de bibliothèques de peptides contenant un cœur PxxP a permis de déterminer les motifs préférentiellement liés par une dizaine de domaines SH3 tels ceux des adaptateurs GRB2 et CRK (Sparks *et al.*, 1996) accentuant ainsi l'importance des résidus bordant le cœur PxxP dans la spécificité SH3 dépendante et permettant ainsi de définir les premiers motifs consensus pour ces derniers.

Cependant, plusieurs autres études ont démontré que certains domaines SH3 sont spécialisés dans la liaison de motifs dépourvus de proline et donc de motif PxxP, suggérant ainsi l'existence d'une spécificité plus complexe des domaines SH3.



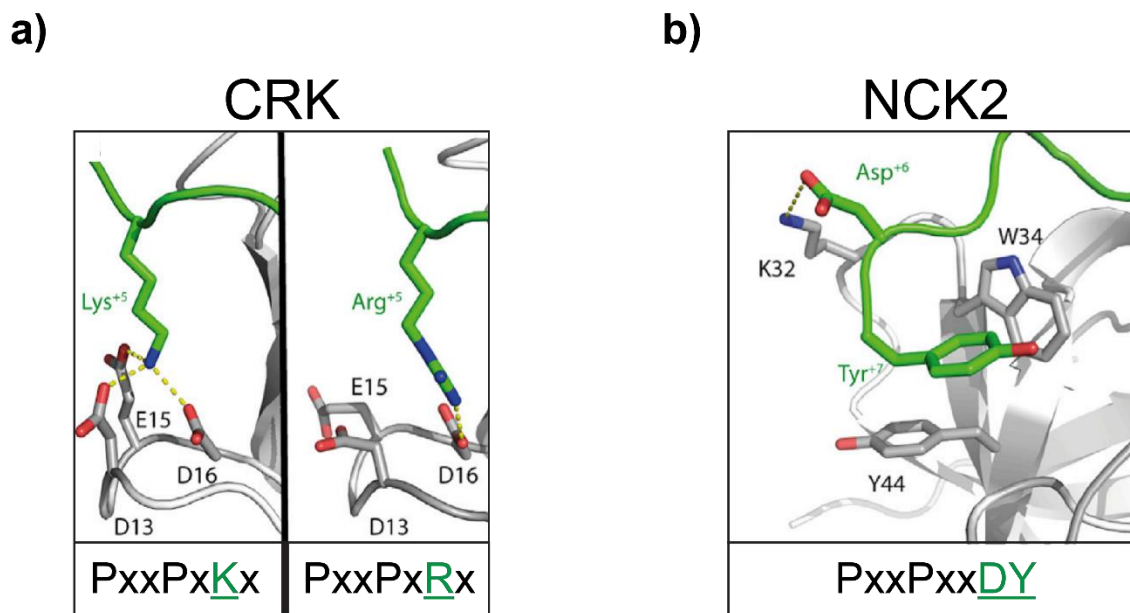
**Figure 1. 16 : Représentation schématique de l'organisation de la surface d'un domaine SH3.**

**a)** Représentation schématique des différentes poches de liaison présentes à la surface d'un domaine SH3 et de l'insertion de l'hélice PP-II dans ces dernières. Chaque élément clef impliqué dans l'interaction d'un domaine SH3 avec un peptide PxxP est indiqué dans une représentation plane ou en 3 dimensions afin de faciliter la visualisation de ces derniers. **b)** Représentation simplifiée des 2 types de liaisons possibles d'un peptide polyproline à un domaine SH3. La poche centrale hydrophobe du domaine (gris clair) contient les 2 rainures et la poche de spécificité (toutes colorées en gris semi-foncé et respectivement annotées 1,2,3) composées d'acides aminés aromatiques et chargés permettant la liaison du peptide au domaine. Ce dernier est bordé par les boucles RT et n-src (indiquées en gris foncé) participant à la formation des rainures et favorisant l'insertion du peptide.

#### 1.4.2.3.2 La spécificité des domaines SH3 s'étend au-delà des motifs initialement envisagés

La découverte au début des années 2000 que certains domaines SH3 tels les SH3 des protéines FYN et FYB (*Fyn binding protein*) lient préférentiellement des motifs dépourvus de proline a grandement complexifié les hypothèses de spécificité envers le simple motif PxxP initialement envisagé (Kang, 2000; Li, 2005). Ainsi, certains SH3 semblent préférer des motifs proches du consensus PxxP où les prolines sont plus espacées (PxxxP) tandis que d'autres ne requièrent qu'une proline (PxxD), voire aucune (xxxx) (Saksela and Permi, 2012).

Cette complexité des domaines SH3 a été abordée par de nombreuses études de cristallisation qui ont permis de mieux cerner leur plasticité. Il a ainsi été suggéré que chaque domaine SH3 pourrait reconnaître un motif consensus bordé de résidus uniques. Par exemple, l'adaptateur CRK nécessiterait en aval du motif PxxP un résidu lysine, seul motif capable de contacter simultanément trois acides aminés négatifs constituant sa boucle RT (Wu *et al.*, 1995) (Fig. 1.17a). En revanche, la modélisation du premier domaine SH3 de la protéine adaptatrice NCK2 complexé au peptide C-terminal de CD3ε a mis en évidence la présence de résidus clefs en amont du brin βC permettant la reconnaissance d'un motif atypique de type PxxDY par ce domaine (Takeuchi *et al.* 2008). En effet, l'acide aspartique et la tyrosine de ce motif sont les seuls résidus capables de venir se loger contre la lysine et les acides aminés aromatiques présents dans la boucle n-src de ce domaine (Fig. 1.17b). Ces résidus et mécanisme conservés sur NCK1 autorisent également cette protéine à lier ce motif atypique d'une façon similaire (Santiveri *et al.*, 2009).



**Figure 1. 17 : Exemples de mécanismes de spécificité utilisés par les domaines SH3 de CRK et NCK2.**

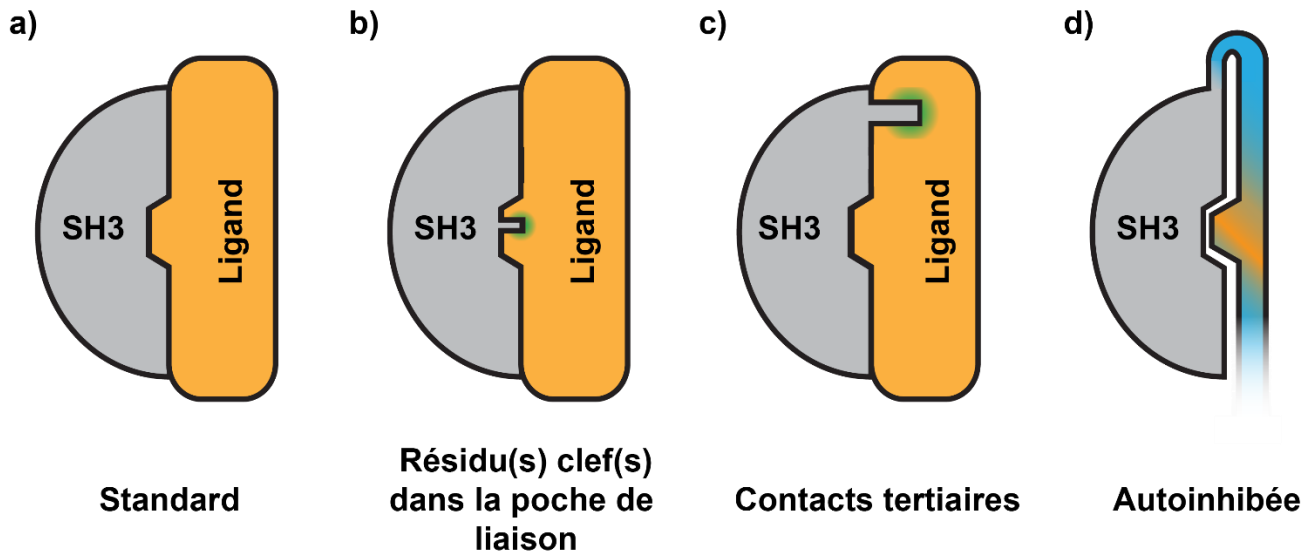
**a)** Mécanisme de spécificité gouvernant les deux domaines SH3 de CRK. Gauche : sur le peptide (représenté en vert), une lysine en aval du motif PxxP peut contacter (pointillés jaune) simultanément trois acides aminés négatifs présents dans la boucle RT du domaine. Droite : si cette lysine est remplacée par une arginine normalement requise par une majorité de domaines SH3, un seul contact est établi et l'affinité des domaines SH3 de CRK pour le ligand est plus



faible. **b)** Mécanisme de spécificité gouvernant le premier domaine SH3 de NCK1/2. Sur le peptide, seul une tyrosine et un acide aspartique en aval du motif PxxP peuvent se glisser contre des acides aminés aromatiques (Y44 et W34) et contre une lysine (K32) présents dans la boucle n-src du domaine (Adapté de Takeushi *et al.*, 2008).

Généralement, l'ensemble de ces travaux suggère que la longueur et composition des boucles RT et n-src d'un SH3 donné seraient des facteurs critiques dans les propriétés intrinsèques de sa spécificité (Saksela and Permi, 2012). Cette présomption a par ailleurs été appuyée par plusieurs études démontrant qu'il était possible de modifier et de réorienter la spécificité d'un domaine SH3 envers de nouvelles protéines en modifiant des résidus clefs non conservés situés au sein de ses boucles (Hiipakka and Saksela, 2007; Kay, 2012). Toutefois, ces boucles étant identiques entre NCK1 et NCK2, ce mécanisme ne permet pas d'expliquer la spécificité SH3 de ces deux protéines adaptatrices.

Par la suite, certaines études ont suggéré que les interactions spécifiques SH3-peptide ne reposeraient pas entièrement sur la reconnaissance d'un motif PxxP particulier, mais impliqueraient aussi certains mécanismes tels des processus d'autoinhibition ou des contacts tertiaires entre domaine et partenaire. Par exemple, la cristallisation du domaine SH3 de la protéine FYN complexé à la protéine NEF a amené les auteurs à suggérer qu'en plus de l'interaction SH3-PxxP survenant entre les deux protéines, un contact tertiaire indispensable à cette interaction existerait entre un résidu positif de la boucle RT du domaine SH3 et une poche hydrophobe située sur le ligand (Lee *et al.*, 1996) (Fig. 1.18c). Une autre étude a également démontré que la première région interdomaine de la protéine adaptatrice NCK2, équipée d'un motif atypique composé d'arginines et de lysines serait capable de se replier et interagir avec le deuxième SH3 de la protéine afin d'inhiber certaines interactions (Takeuchi *et al.*, 2010). Ce mécanisme permettrait d'orienter la spécificité du domaine envers des partenaires de haute affinité (Fig. 1.18d). Cette région, non conservée dans NCK1 pourrait partiellement expliquer le mécanisme de spécificité du deuxième domaine SH3 de NCK2.



**Figure 1. 18 : Représentation schématique des différents mécanismes expliquant la sélectivité des domaines SH3.**

**a)** Type de liaison initialement envisagé où un motif PxxP situé sur un ligand s’insère au niveau de la poche hydrophobe d’un domaine SH3. **b)** Exemple de l’importance de résidus clefs dans la spécificité des domaines SH3. La présence d’un résidu lysine clef en aval du brin  $\beta$ C dans le premier domaine SH3 de l’adaptateur NCK1 explique en partie la reconnaissance d’un motif atypique PxxDY. **c)** Exemple de l’importance d’un contact tertiaire dans la stabilisation de l’interaction SH3-ligand. Ce contact interviendrait aussi dans la spécificité des domaines SH3 telle la reconnaissance spécifique de la protéine NEF par le SH3 de la tyrosine kinase FYN. **d)** Exemple de l’importance des régions interdomaines dans la spécificité des domaines SH3. La première région interdomaine de NCK2 (représentée en bleu) contient un motif riche en lysines et arginines (représenté en orange) capable de compétitionner avec un ligand potentiel pour l’interaction avec le second domaine SH3.

Cette diversité de ligands et de spécificités au sein de la famille des domaines SH3 a par la suite amené certaines équipes à tenter de caractériser de manière exhaustive l’ensemble des motifs potentiels et donc des ligands possibles pour cette famille. Ainsi, l’utilisation de techniques de criblage à grande échelle chez la levure ou l’humain destinées à identifier les motifs préférentiellement liés par ces domaines a mis en évidence que l’ensemble des SH3 pourrait être catégorisé en minimalement 9 groupes contre 2 initialement envisagés (Tableau 1.3) (Verschuere *et al.*, 2015; Teyra *et al.*, 2017). Le dernier de ces groupes, noté atypique, regroupe environ 50% des domaines SH3 pour lequel aucun motif consensus évident n’a pu être défini témoignant ainsi de la plasticité et de la complexité de ces domaines. L’ensemble de ces données suggère que les mécanismes de spécificité ainsi que le spectre d’interactions et de

partenaires potentiels d'au moins la moitié des domaines SH3 s'étend bien au-delà des frontières et mécanismes actuellement connus.

**Tableau 1. 3 : Tableau récapitulatif des différents groupes de domaines SH3 ainsi que les motifs qu'ils reconnaissent.**

Classification des domaines SH3 humains en différents groupes (notés de I a IX) selon le motif consensus reconnu par chaque classe. Pour chaque groupe, le motif consensus est l'orientation de ce dernier sont indiqués dans les colonnes respectives tandis qu'un ou plusieurs exemples de domaines SH3 sont indiqués pour chaque classe. L'ensemble des domaines SH3 aux motifs atypiques (50% environ) sont regroupés dans la catégorie IX en bas du tableau (adapté de Teyra et al., 2017).

	Groupe	Motif	Exemple(s)	Orientation
Consensus initiaux	I	Rxx <u>PxxP</u>	NCK2 SH3-2	+
	II	<u>PxxPxR</u>	NCK1 SH3-2,CRK	-
	I et II	Rxx <u>PxxP</u> et <u>PxxPxR</u>	NCK1 SH3-1,3 NCK2 SH3-1,3	+ et -
Consensus élargis	III	RxxxxxP	STAC2	+
	IV	PxxxxR	MAP3K9	-
	V	RxxPxxx	ASAP2	+
	VI	xxxPxR	ASAP1	-
	VII	PxKP	BCAR1	-
	VIII	PxxPxxP	ABL2	-
IX Atypiques	xxxxxxxx xxRHxxx xWxFPxx	GRB2-SH3-2,SORBS3	?	

En somme, les domaines SH3 peuvent être catégorisés en minimalement 9 familles possédant des caractéristiques structurales distinctes leur conférant des attributs de spécificité allant au-delà de la simple reconnaissance d'un motif consensus. Les boucles RT et n-src, parties les moins conservées entre les domaines SH3 seraient en grande partie responsable de cette

spécificité qui reste totalement inconnue pour plus de la moitié des domaines SH3. Aussi, même si des motifs consensus et des résidus clefs ont été identifiés pour certaines classes de SH3, les origines de la spécificité de domaines appartenant à une même famille et structurellement proches tels ceux des protéines adaptatrices NCK1 et NCK2 restent à ce jour indéterminées.

## **Conclusion**

En conclusion, les domaines SH2 et SH3, grandes composantes des protéines adaptatrices NCK1 et NCK2 permettent à ces dernières de lier différents partenaires membranaires, cytoplasmiques ou nucléaires de manière ou potentiellement spécifiques. Ces domaines, respectivement impliqués dans la liaison de tyrosine phosphorylées et motifs contenant ou non des prolines sont donc au cœur de la spécificité de ces protéines en leur permettant d'assurer leurs fonctions cellulaires respectives. En dépit de certaines évidences permettant de mieux cerner les mécanismes de liaison de ces différents domaines avec leurs substrats, les modèles proposés ne conviennent toujours pas aux domaines SH2 ou SH3 structurellement proches tels ceux des protéines NCK1 et NCK2. Ainsi, les origines de la redondance et de la spécificité de deux protéines adaptatrices NCK1 et NCK2 restent à déterminer.

**Tableau 1. 4 : Récapitulatif des partenaires de NCK1/2 recensés dans la littérature.**

Les partenaires de NCK1 et/ou NCK2 recensés dans la littérature ont été listés dans le tableau ci-dessous. Pour chaque interacteur, le nom UniProt, le type de liaison (directe/indirecte), le ou les domaines de NCK1/2 permettant la liaison ainsi que la référence initiale décrivant l'interaction ont été indiqués si connus (- : inconnu). De plus, le ou les NCK utilisés si connus ont été indiqués (NCK indique que NCK1 et NCK2 n'ont pas été discriminés). Les éléments relatifs à NCK1 sont indiqués en bleu tandis que ceux relatif à NCK2 sont indiqués en orange. Les articles contenant des éléments de spécificité sont indiqués en vert. Dans un soucis de clarté et pertinence, les interactions reportées via le réseau BioPlex (Huttlin *et al.*, 2015, 2017) n'offrant aucun suivi pour NCK1/2 ont été volontairement omises.

	NCK1	NCK2	NCK	Nom UniProt	Liaison directe?	Domaine(s)	Référence
<b>NCK1 et NCK2 non discriminés - NCK</b>			X	A36R	-	SH2	Labelle-Côté et Louise Larose. 2011.
			X	ABL1	OUI	SH3.2	Ren et al., 1994.
			X	ABL2	OUI	SH3.1, SH3.2	Adler et al., 2000.
			X	C9ORF156	-	SH3.1	Labelle-Côté et Louise Larose. 2011.
			X	CAV2	-	SH2	Lee et al., 2002.
			X	CRK	En complexe	-	Minegishi et al., 1996.
			X	CSNK1A1	-	SH3.3	Labelle-Côté et Louise Larose. 2011.
			X	DAG1	-	SH2	Labelle-Côté et Louise Larose. 2011.
			X	DOK2	-	SH2	Master et al., 2001.
			X	DSCAM	-	SH3.1, SH3.2, SH3.3 et SH2	Labelle-Côté et Louise Larose. 2011.
			X	ERBB4	-	SH2	Schulze et al., 2005.
			X	FLT1,3, KDR	-	SH2	Labelle-Côté et Louise Larose. 2011.
			X	GAB1	-	SH2	Labelle-Côté et Louise Larose. 2011.
			X	GAB2	-	SH3	Zhao et al., 1999.
			X	GIT1,2	-	SH2	Labelle-Côté et Louise Larose. 2011.
			X	HSPA5	-	-	Misra et al., 2005.
			X	IRS1	-	SH3.2, SH3.3	Labelle-Côté et Louise Larose. 2011.
			X	LCP2	-	SH3.3	Wunderlich et al., 1999.
			X	MAP4K1	OUI	SH3	Anafi et al., 1997.
			X	MAP4K4	OUI	SH3.2	Su et al., 1999.
		X	MET	-	SH2	Labelle-Côté et Louise Larose. 2011.	
		X	MINK1	OUI	SH3	Hu et al., 2004.	
		X	MTA1	OUI	SH3	Simpson et al., 2001.	

<b>NCK1 et NCK2 non discriminées (suite)</b>	X	MTA3	OUI	SH3	Simpson et al., 2001.
	X	NCKAP5	-	SH3.2	Labelle-Côté et Louise Larose. 2011.
	X	NEDD9	-	SH2	Minegishi et al., 1996.
	X	PFN1	-	SH2	Anton et al., 1998.
	X	PI3KR1	-	SH2	Gelkop et al., 2001.
	X	RALGPS1	-	SH3.2	Rebhun et al., 2000.
	X	RET	-	SH2	Labelle-Côté et Louise Larose. 2011.
	X	RRAS	OUI	SH3.2	Wang et al., 2000.
	X	SH3PXD2A	-	SH2	Labelle-Côté et Louise Larose. 2011.
	X	SOCS1	-	SH3	Sepulveda et al., 1999.
	X	SOCS3	-	SH2	Labelle-Côté et Louise Larose. 2011.
	X	SOCS7	OUI	SH3.2	Matuoka et al., 1997.
	X	SORBS1	-	SH3.2	Labelle-Côté et Louise Larose. 2011.
	X	SYNJ1	-	SH3.2	Labelle-Côté et Louise Larose. 2011.
	X	TBK1	-	SH3.2	Chou et al., 1995.
	X	Tir	OUI	SH2	Frese et al., 2006
	X	TNK2	OUI	SH3	Chan et al., 2011.
	X	TUBA1A	-	SH3	Jeong et al., 2007.
	X	WASP	OUI	SH3.3	Rivero-Lezcano et al., 1995.
	X	WIPF1	OUI	SH3.2	Anton et al., 1998.

<b>NCK1 et NCK2 validées</b>	X	X		ABI1	-	SH3.1	Cowan et al., 2001.
	X	X		CBL	OUI	SH3.1, SH3.2	Buval et al., 2013.
	X	X		CD3ε	OUI	SH3.1	Gil et al., 2002.
	X	X		CD79A	OUI	SH2	Castello et al., 2013.
	X	X		CHN1	OUI	SH3.3	Gutierrez-Uzquiza et al., 2013.
	X	X		CHN2	OUI	SH3.3	Gutierrez-Uzquiza et al., 2013.
	X	X		DNM1	-	SH3.3	Cowan et al., 2001.
	X	X		DOK1	OUI	SH2	Chen et al., 1998.
	X	X		EGFR	OUI	SH2	Jones et al., 2006.
	X	X		EPHB2	OUI	SH2	Holland et al., 1997
	X	X		ERBB2	OUI	SH2	Jones et al., 2006.
	X	X		ERBB3	OUI	SH2	Jones et al., 2006.
	X	X		FAK (PTK2)	OUI	SH3.2	Goicoechea et al., 2002.
	X	X		FASLG	OUI	SH3.2 et SH3.3	Voss et al., 2009.
	X	X		IRS1	2.3	-	Tu et al., 1998. Nck-2

	X	X		NPHS1	Oui	SH2	Jones et al., 2006.
	X	X		NTRK2	-	SH2	Suzuki et al., 2002.
	X	X		N-WASP	OUI	SH3.2, SH3.3	Rohatgi et al., 2001.
	X	X		PAK1	OUI	SH3.2	Bokoch et al., 1996.
	X	X		PERK (EIF2AK3)	OUI	SH2	Yamani et al., 2014
	X	X		PKN2	-	-	Braverman et al., 1999.
	X	X		ROBO1	OUI	SH3	Round and Sun, 2011.
	X	X		ROBO2	OUI	SH3	Round and Sun, 2011.
	X	X		SAM68 (KHDRBS1)	OUI	SH3.1, SH3.3	Asbach et al., 2012.
	X	X		SOS1	-	SH3.3	Braverman et al., 1999.
	X	X		SYK	-	SH2	De Castro et al., 2012.
	X	X		SYNPO	OUI	SH3.2	Buval et al., 2013.

<b>Seulement NCK1 testée</b>	X	?		ADAM15	OUI	-	Kärkkäinen et al., 2006.
	X	?		CASKIN1	OUI	-	Balazs et al., 2009.
	X	?		CTTN	OUI	SH2	Okamura et al., 1995
	X	?		DCC	OUI	SH3.1,SH3.3	Li et al., 2002.
	X	?		EIF2B2	OUI	SH3.1,SH3.3	Kebache et al., 2002.
	X	?		ELMO1	OUI	SH2	Zhang et al., 2014.
	X	?		EPHA3	OUI	SH2	Hu et al., 2009
	X	?		EPHB1	OUI	SH2	Stein et al., 1998
	X	?		FGFR1	OUI	SH2	Liu et al., 2012.
	X	?		GRB2	-	SH2	De Castro et al., 2012.
	X	?		INPP5D	-	-	De Castro et al., 2012.
	X	?		IRE1 $\alpha$ (ERN1 $\alpha$ )	OUI	SH3.1	Nguyên et al., 2004.
	X	?		IRE1 $\beta$ (ERN1 $\beta$ )	OUI	SH3.3	Nguyên et al., 2004.
	X	?		IRS1	-	SH3.2, SH3.3	Tu et al., 1998.
	X	?		KIAA1522	OUI	-	Wang et al., 2011.
	X	?		LPHN2	OUI	-	Wang et al., 2011.
	X	?		MAP4K1	OUI	SH2	Liu et al., 2012.
	X	?		NEF	OUI	-	Kärkkäinen et al., 2006.
	X	?		P130CAS	OUI	SH2	Liu et al., 2012.
	X	?		PAK2	OUI	SH3.2	Kärkkäinen et al., 2006.
	X	?		PHC2	OUI	-	Wang et al., 2011.
	X	?		PTPN1	-	SH3	Li et al., 2014.
	X	?		RASA1	OUI	SH3.1,SH3.3	Ger et al., 2011.
	X	?		SHANK3	OUI	-	Wang et al., 2011.
X	?		SLC4A1	OUI	SH2	Liu et al., 2012.	

	X	?		UBASH3B	-	SH2	De Castro et al., 2012.
--	---	---	--	---------	---	-----	-------------------------

<b>Seulement NCK2 testée</b>	?	X		ABI2	OUI	-	Rual et al., 2005.
	?	X		ATN1	OUI	-	Lim et al., 2006.
	?	X		BLNK	-	-	Oellerich et al., 2011.
	?	X		CBLB	OUI	-	Rual et al., 2005.
	?	X		CPSF7	-	-	Rual et al., 2005.
	?	X		DOCK1	OUI	SH3.2, SH3.3	Tu et al., 2001.
	?	X		EEF1G	OUI	-	Stelzl et al., 2005.
	?	X		EPHA4	OUI	SH2	Bisson et al., 2007
	?	X		EPHB3	OUI	-	Henkemeyer et al., 2009
	?	X		FLJ12529	OUI	-	Rual et al., 2005.
	?	X		FXR2	OUI	-	Rual et al., 2005.
	?	X		ILK	Non, via PINCH	Voir PINCH	Tu et al., 1999.
	?	X		KIAA1217	OUI	-	Rual et al., 2005.
	?	X		MASP1	Oui	-	Vinayagam et al., 2011.
	?	X		NCKIPSD	OUI	SH3.1,SH3.3	Rual et al., 2005.
	?	X		SF3B4	OUI	-	Rual et al., 2005.
	?	X		SRPK1	-	-	Varjosalo et al., 2013.
	?	X		SRPK2	-	-	Varjosalo et al., 2013.
	?	X		TRIP6	OUI	-	Rual et al., 2005.
	?	X		WBP11	OUI	-	Rual et al., 2005.
?	X		WIPF2	-	SH3.2	Aspenstroem, 2002.	

<b>NCK1 spé.</b>	X	NON		CDC42	-	SH3	Guan et al., 2010.
	X	NON		PDGFR (Y751)	OUI	SH2	Nishimura et al., 1993.

<b>NCK2 spé.</b>	NON	X		AXIN1	-	SH3	Cowan et al., 2001.
	NON	X		CAP1	-	SH3	Cowan et al., 2001.
	NON	X		CPSF6	OUI	-	Rual et al., 2005.
	NON	X		DAB1	-	SH2	Pramatarova et al., 2003.
	NON	X		DDR1	-	SH2	Labelle-Côté et Louise Larose. 2011.
	NON	X		EFNB1	-	SH2	Cowan et al., 2001.
	NON	X		HNRNPK	-	SH3.2	Cowan et al., 2001.
	NON	X		PINCH (LIMS1)	OUI	SH3.3	Tu et al., 1998.
	NON	X		PAK3	OUI	SH3.2	Thévenot et al., 2011.



	NON	X	PDGFR (Y1009)	OUI	SH2	Chen et al., 2000.
	NON	X	RHOA	-	SH3	Guan et al., 2010.
	NON	X	PXN	-	-	Cowan et al., 2001.

## 1.5 Hypothèses et objectifs

Par leurs interactions avec différentes combinaisons de récepteurs et d'effecteurs cytoplasmiques, les protéines adaptatrices NCK1 et NCK2, deux paralogues 68% identiques régulent en partie la diversité et la spécificité de nombreuses réponses cellulaires. Ces deux adaptateurs conservés au cours de l'évolution étaient initialement considérés redondants dans leurs fonctions étant donné que dans un modèle murin, chaque NCK semble pleinement capable de compenser l'absence de son paralogue. Cependant, il a été suggéré que chacune de ces protéines pourrait avoir des cibles cellulaires spécifiques et des fonctions uniques. J'ai donc émis l'hypothèse que les adaptateurs NCK1 et NCK2 ne sont pas complètement redondants dans leurs fonctions et peuvent chacun s'associer avec des partenaires uniques pour réguler des processus distincts. L'objectif de ma thèse était d'analyser la spécificité des protéines NCK1/2, c'est-à-dire d'identifier pour chacune des cibles uniques, pour ensuite caractériser ce qui génère cette spécificité tout en définissant la fonction de ces interactions. En plus de la caractérisation des interactomes de NCK1/2 (sections 2.1 et 3.1), mon projet de doctorat était ainsi axé autour de deux objectifs principaux, soit (1) d'identifier des fonctions biologiques spécifiquement régulées par NCK1 ou NCK2 (chapitre 2) et (2) d'étudier certaines interactions spécifiques afin d'identifier l'origine de la spécificité de leurs interactions (chapitre 3).

## **Chapitre 2 : Proteomic analysis of NCK1/2 adaptors uncovers paralog-specific interactions that reveal a new role for NCK2 in cell abscission during cytokinesis**

**Kévin Jacquet<sup>1,2,3</sup>, Sara L. Banerjee<sup>1,2,3</sup>, François J. M. Chartier<sup>1,2,3</sup>, Sabine Elowe<sup>2,3,4,5</sup>, Nicolas Bisson<sup>1,2,3,6\*</sup>**

<sup>1</sup> Centre de recherche du Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Québec-Université Laval, Axe Oncologie, Québec, QC, Canada

<sup>2</sup> Centre de recherche sur le cancer de l'Université Laval, Québec, QC, Canada

<sup>3</sup> PROTEO-Quebec Network for Research on Protein Function, Engineering, and Applications

<sup>4</sup> Centre de recherche du Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Québec-Université Laval, Axe Reproduction, santé de la mère et de l'enfant, Québec, QC, Canada

<sup>5</sup> Department of Pediatrics, Université Laval, Québec, QC, Canada.

<sup>6</sup> Department of Molecular Biology, Medical Biochemistry and Pathology, Université Laval, Québec, QC, Canada.

\* To whom correspondence should be addressed ([nick.bisson@crchudequebec.ulaval.ca](mailto:nick.bisson@crchudequebec.ulaval.ca))

RUNNING TITLE: NCK2 but not NCK1 is required for cytokinesis

## 2.1 Résumé

NCK1 et NCK2 sont des protéines adaptatrices impliquées dans la signalisation par les RTK. Ces adaptateurs aux fonctions considérées redondantes interagissent avec une variété très large de récepteurs membranaires et d'effecteurs cytoplasmiques. Ces adaptateurs sont donc au cœur de la spécificité et la diversité des réponses cellulaires. Cependant, en opposition aux nombreuses études appuyant la redondance des NCK, il a été suggéré que chacun de ces adaptateurs pourrait avoir des cibles cellulaires spécifiques et réguler des fonctions uniques. J'ai donc émis l'hypothèse que contrairement à ce qui est admis, NCK1 et NCK2 pourraient chacun interagir avec des partenaires spécifiques pour réguler des fonctions biologiques distinctes. En premier lieu, j'ai utilisé deux techniques complémentaires de spectrométrie de masse (MS), soit (i) des purifications d'affinité suivies d'analyses en spectrométrie de masse (AP-MS) (ii) et du marquage de proximité *in vivo* (BioID) afin de caractériser les partenaires respectifs de NCK1/2 dans des cellules HEK293T. La combinaison de ces deux approches m'a permis d'identifier un total de 98 protéines associées avec NCK1/2 dont 30 protéines apparaissent NCK1-spécifiques tandis que 28 autres partenaires interagissent spécifiquement avec NCK2. Des analyses bio-informatiques basées sur l'ensemble de ces partenaires m'ont permises de mettre en évidence que NCK2 semble plus spécifiquement impliqué que NCK1 dans la régulation de l'organisation du cytosquelette d'actine, fonction cellulaire essentielle lors de la division et de la cytokinèse. En comparant simultanément des cellules fibroblastiques murines (MEF) déplétées soit pour NCK1, soit pour NCK2, j'ai remarqué que les cellules *Nck2*<sup>-/-</sup>, à l'inverse des cellules *Nck1*<sup>-/-</sup> sont plus multinucléées. Celles-ci présentent aussi de fortes connexions intercellulaires. La caractérisation de ce phénotype m'a permis de mettre en évidence qu'une absence spécifique de NCK2 dans ce type de cellules corrèle avec un temps accru passé en cytokinèse et une proportion plus élevée de cellules incapables de compléter l'étape finale de cytokinèse : l'abscission. Une analyse plus poussée de ce phénotype m'a permis de déterminer que le *midbody* des cellules *Nck2*<sup>-/-</sup> n'est pas seulement altéré en longueur, mais aussi en composition étant donné l'absence dans cette structure de protéines clés impliquées dans la régulation de cytokinèse telles les protéines PLK1, ECT2 ou encore AURKB. De plus, l'invalidation simultanée des 3 domaines SH3 de NCK2 ne semble pas suffisante pour générer ce phénotype. À l'inverse, une simple mutation du domaine SH2 de cet adaptateur récapitule l'intégralité des défauts observés lors de

sa délétion suggérant que la fonction de NCK2 durant la cytokinèse repose principalement sur son domaine SH2.

Ainsi, bien que les fonctions de NCK1/2 soient généralement considérées comme redondantes, mes résultats démontrent que ces protéines sont capables de lier des partenaires différents pour réguler des fonctions biologiques distinctes.

## 2.2 Abstract

Signals from cell surface receptors are often relayed via adaptor proteins. NCK1 and NCK2 are Src-Homology (SH) 2 and 3 domain adaptors that regulate processes requiring a remodelling of the actin cytoskeleton. Evidence from gene inactivation in mouse suggests that NCK1 and NCK2 are functionally redundant, although recent reports support the idea of unique functions for NCK1 and NCK2. We sought to examine this question further by delineating NCK1- and NCK2-specific signalling networks. We used both affinity purification-mass spectrometry and BioID proximity labelling to identify NCK1/2 signalling networks comprised of 98 proteins. Strikingly, we found 30 proteins restricted to NCK1 and 28 proteins specifically associated with NCK2, suggesting differences in their function. We report that *Nck2*<sup>-/-</sup>, but not *Nck1*<sup>-/-</sup> mouse embryo fibroblasts (MEFs) are multi-nucleated and display extended protrusions reminiscent of intercellular bridges, which correlate with an extended time spent in cytokinesis as well as a failure of a significant proportion of cells to complete abscission. Our data also show that the midbody of NCK2-deficient cells is not only increased in length, but also altered in composition, as judged by the mislocalization of AURKB, PLK1 and ECT2. Finally, we show that NCK2 function during cytokinesis requires its SH2 domain. Taken together, our data delineate the first high-confidence interactome for NCK1/2 adaptors and highlight a number of proteins specifically associated with either protein. Thus, contrary to what is generally accepted, we demonstrate that NCK1 and NCK2 are not completely redundant and shed light on a previously uncharacterized function for the NCK2 adaptor protein in cell division.

## 2.3 Introduction

NCK1 (Non-Catalytic region of tyrosine Kinase 1; NCK $\alpha$ ) and NCK2 (NCK $\beta$ , GRB4) adaptors (collectively NCK) are widely expressed proteins that are exclusively composed of Src-Homology (SH) 2 and 3 interaction domains. NCKs contain three SH3 domains, which generally associate with a canonical Pro-X-X-Pro motif (1), and a single C-terminal SH2 domain that exhibits a preference for variations of the core pTyr-Asp-X-Val consensus (2). A comparison of protein sequences revealed a 68% identity that can for the most part be attributed to these SH2-SH3 protein interaction domains (3). The main function of NCK adaptor proteins is to link receptor tyrosine kinase (RTK) activation to effectors involved in cytoskeletal reorganization, such as the Wiscott-Aldrich Syndrome Protein (WASP) and its associated proteins (WIPF1 to -3) (1, 4, 5).

Very few studies reported functions unique to NCK1 or NCK2. For example, activated Platelet-Derived Growth factor Receptor (PDGFRB) associates via two different residues to NCK1 (Y751) and NCK2 (Y1009), and only the latter interaction regulates downstream signalling (6). In addition, NCK2 but not NCK1 was reported to directly bind to EPH family RTKs (EphRs) ligands, B-type ephrins, to initiate reverse signals controlling the actin cytoskeleton (7-9). NCK2 was also found to specifically associate with Paxilin (PXN) in neuronal cells to facilitate neurite outgrowth (10). Finally, NCK2 was recently highlighted as a regulator of adipogenesis, as NCK2- (but not NCK1)-deficient mice display increased adiposity (11). Although simultaneous inactivation of NCK1 and NCK2 genes is embryonic lethal in mouse at mid-gestation (E9.5), single knockout animals did not display any overt phenotype (12). This suggests the existence of a substantial functional overlap between NCK1 and NCK2 functions, at least during early development, despite reports pointing towards a degree of specificity for each protein.

The successful analysis of protein complexes under physiological conditions has been spearheaded by affinity purification followed by mass spectrometry (AP-MS) (13). While this approach has proven useful to isolate and to characterize intact protein complexes, including those that are dependent on cell stimulation, it still presents limitations in that it requires gentle lysis conditions to preserve interactions, which may not be suitable for proteins with compartmentalized cellular localization. In addition, AP-MS generally fails to capture

weak/transient interactions due to the purification process, unless crosslinking is performed. Proximity labeling methods relying on the biotinylation of neighbouring proteins by spatially restricted enzymes, for example BioID, were developed to circumvent these issues (14). The covalent labeling of proteins with biotin allows for cell solubilization under stringent conditions and protein isolation without the strict requirement of them being maintained in a complex for the duration of the process. However, classical BioID does not allow for temporal resolution due to long labeling times.

In this study, we used affinity purification-mass spectrometry (AP-MS) and BioID proximity labeling to delineate NCK1 and NCK2 protein networks, which unexpectedly reveal a large number of interactors specific to each adaptor protein. In particular, the NCK2 network is enriched for proteins related to the actin cytoskeleton. Strikingly, we find that NCK2, but not NCK1, is localized at the site of furrow ingression and at the midbody during cell division, a process displaying the most extensive reorganization of the actin cytoskeleton. The final stage of cell division, cytokinesis, is a process during which the cytoplasm of the parental cell is partitioned between two daughter cells to terminate their physical separation (15, 16). This process requires the dynamic interplay between components of actin and tubulin cytoskeletons with the plasma membrane to coordinate both the positioning and assembly of an actomyosin ring (17). The mechanical constriction of this ring forces the ingression of the cleavage furrow, leading to the formation of the midbody. This protein-rich structure forms at the site of overlap of antiparallel microtubules derived from the central spindle, and serves as an assembly platform and signalling hub for the abscission machinery. Key factors implicated in formation of the cytokinetic furrow are the kinases Polo-like kinase 1 (PLK1) and Aurora-B (AURKB), which are collectively responsible for phosphorylation and recruitment of factors required for furrow ingression (18, 19). Failure in cytokinesis can result in an incomplete separation of the two incipient cells, thus leading to polyploidy or multinucleation (20, 21).

We investigated further the striking compartmentalization of NCK2 at the midbody. We found that *Nck2*<sup>-/-</sup> cells delay in cytokinesis, display longer intercellular bridges and often fail to complete abscission. We also found that NCK2 regulation of cytokinesis is dependent on its single SH2 domain, presumably via its interaction with putative tyrosine-phosphorylated targets. Together, our findings demonstrate a clear distinction in NCK1 and NCK2 interaction networks, as well as unique subcellular localization and role for NCK2 during the last stages of



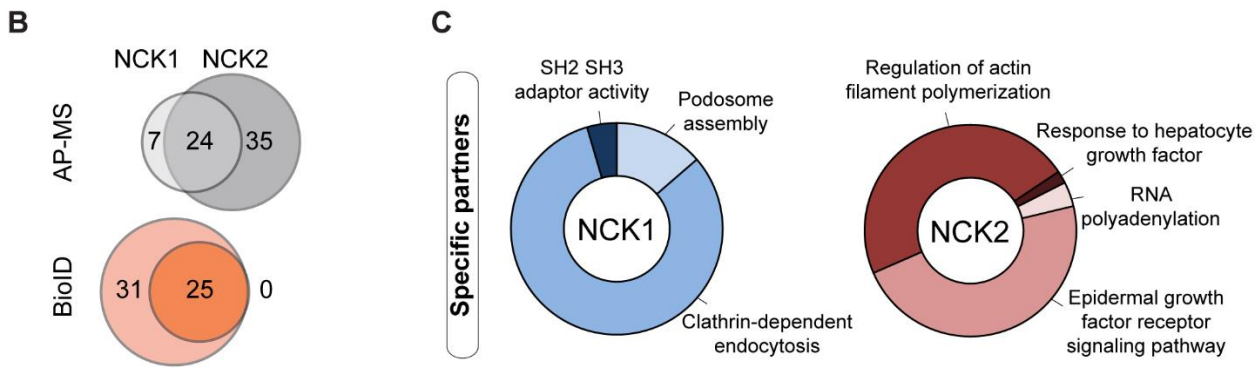
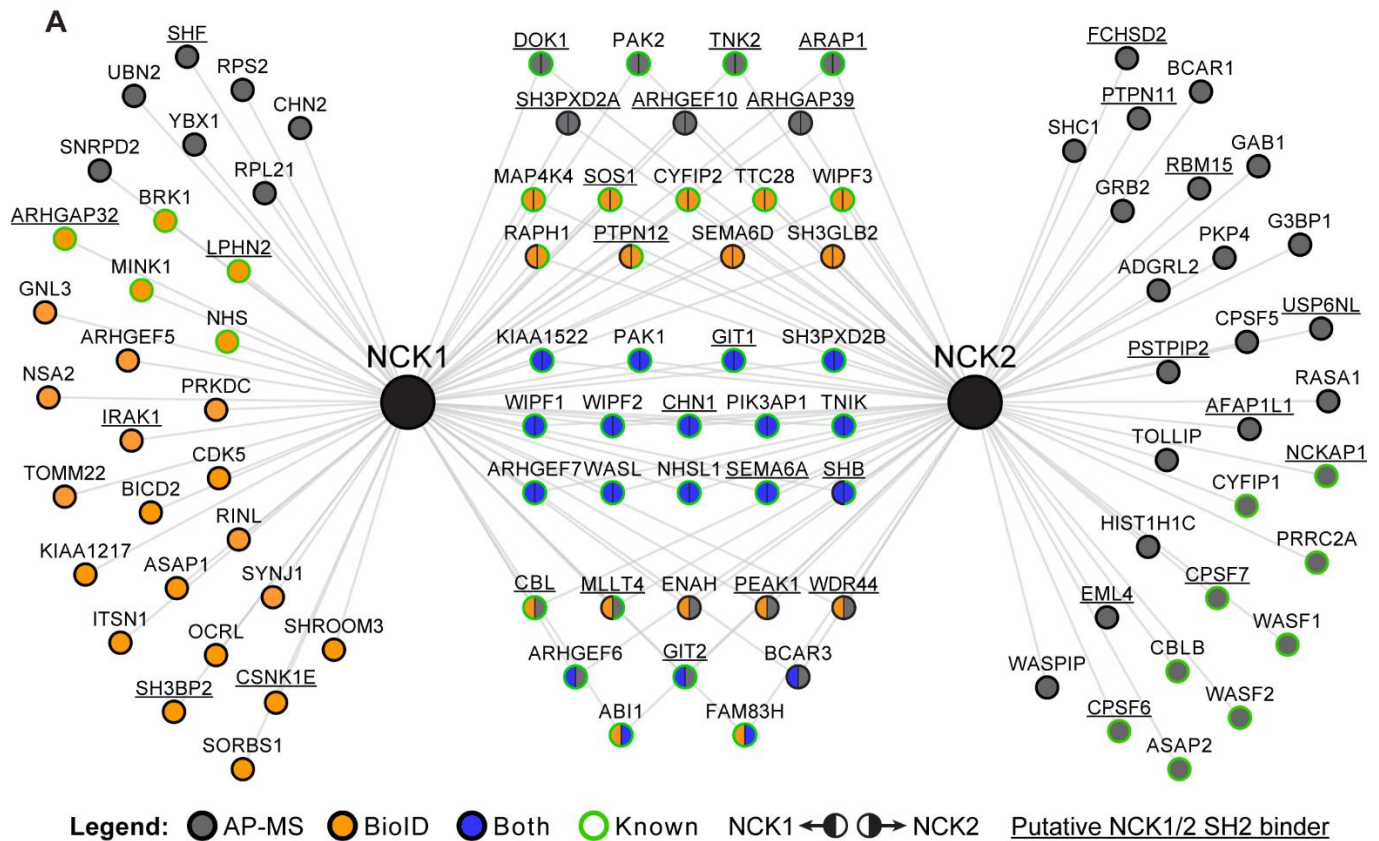
cell division, further supporting the notion that NCK1 and NCK2 are not fully redundant in their functions.

## **2.4 Results**

### **2.4.1 AP-MS and BioID proximity labelling delineate NCK1/2 adaptor proteins interactomes and identify specific partners for each NCK1 and NCK2**

To systematically delineate protein interaction networks nucleated by NCK1 and NCK2 adaptor proteins, we generated clonal HEK293T cells stably expressing 3xFLAG-tagged NCK1 or NCK2 at near endogenous levels (supplemental Fig. 2.S.1A). We performed FLAG AP-MS identification of NCK-associated proteins. Asynchronous cells were treated with sodium pervanadate, a phosphatase inhibitor that broadly elevates the total level of endogenous tyrosine phosphorylation, in order to obtain the full complement of phospho-dependent (SH2) interactions. Using data from three independent AP-MS experiments including a 3xFLAG-GFP line as a negative control, we performed a significance analysis using SAINT to focus on high-confidence interactions (supplemental Table S1-S2) (22, 23). Our analysis identified a total of 66 proteins associated with NCK1 and NCK2 (Fig. 2.1A-B).

To complement our AP-MS dataset, we further explored NCK1/2 interaction maps via BioID proximity labeling (14). To achieve this, we generated Flp-In T-REx HEK293 stable lines expressing NCK1 or NCK2 fused with BirA\*, a promiscuous mutant biotin ligase enzyme that favours covalent biotin binding to adjacent proteins. We validated that the expression levels, function and localization of the chimeras following tetracycline addition were indistinguishable for FLAG-BirA\*-NCK1 and FLAG-BirA\*-NCK2 (supplemental Fig. 2.S.1B-D). We affinity-purified biotinylated proteins from cell lysates and identified them by MS, using a FLAG-BirA\*-GFP control. We performed biological triplicates and eliminated non-specific interactions using SAINT (supplemental Table S1, S3) (22, 23). This BioID analysis identified 56 proteins associated with NCK1 and NCK2 (Fig. 2.1A-B).



**Figure 2. 1 : NCK adaptor proteins AP-MS and BioID interactome reveals targets specifically associated with NCK1 or NCK2.**

(A) NCK1/2-associated proteins were identified using AP-MS and BioID and combined to map the NCK1/2 interaction landscape. Previously reported interactions (known) from the BioGRID database were manually annotated. Putative NCK1/2 SH2 binders (underlined) were identified using SH2PepInt. (B) Venn diagram representation of the overlap between NCK1- and NCK2-associated proteins found via AP-MS or BioID. (C) Gene ontology (GO) and functional pathway analysis via ClueGO of NCK1- and NCK2-specific interactors.

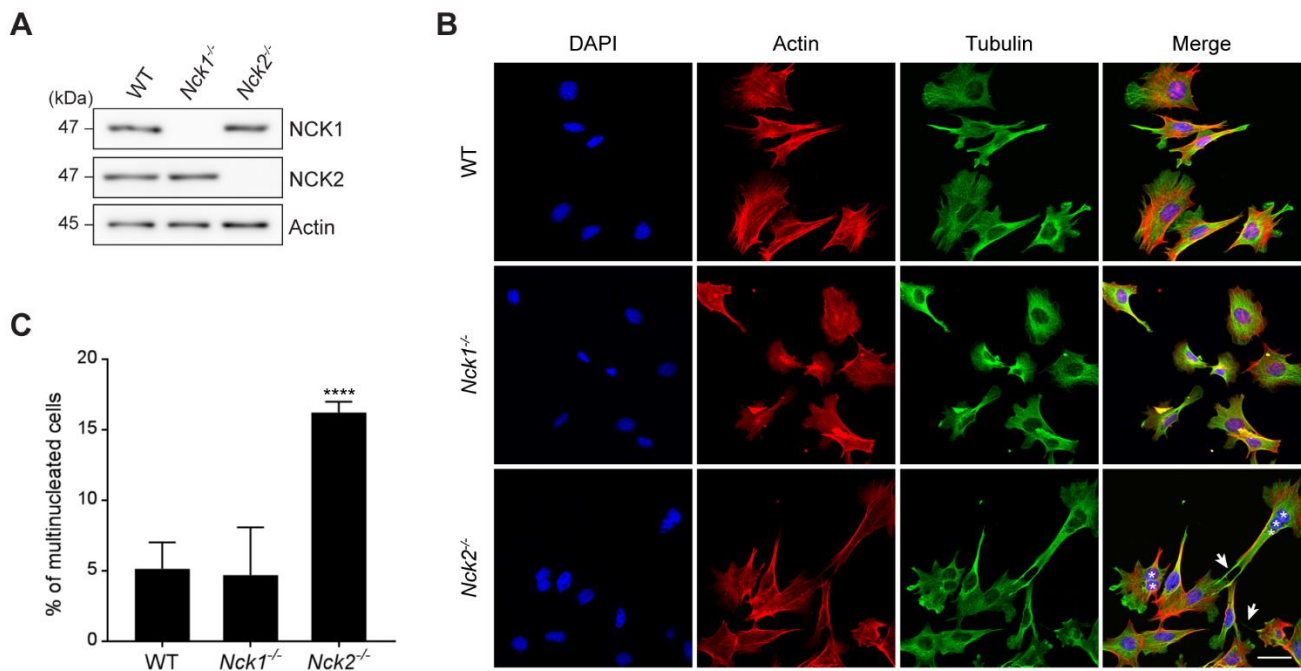
The combination of AP-MS and BioID data revealed a total of 98 proteins associated with NCK1/2. Among them, we found 45 targets previously reported to be NCK1- and/or NCK2-associated proteins, including PAK2 (24), CHN1 (25), CBL (26), WASL (27) and GIT1 (2). In addition, we discovered 53 NCK-associated proteins that were not previously reported in the BioGRID database (Fig. 2.1A) (28), suggesting previously uncharacterized functions for NCK adaptors. We used the SH2PepInt tool to identify putative NCK1/2 SH2 binding sites on 33 proteins identified in the NCK1/2 network (29, 30), of which only GIT1 (2) and DOK1 (31) were previously reported. As expected, only a subset of NCK-associated proteins was discovered by both AP-MS and BioID. Indeed, 24% of the NCK1 interactome (17/70 proteins) and 23% of the NCK2 interactome (16/68 proteins) were revealed using either approach (Fig. 2.1A).

To define the specificity landscape of NCK interaction networks, we compared the distinct NCK1 and NCK2 interactions. Strikingly, we found 30 proteins specifically associated with NCK1, and 28 with NCK2 (Fig. 2.1A). Interestingly, AP-MS revealed more NCK2-specific partners while BioID displayed more NCK1-specific interactions. To delineate putative specialized functions for NCK1 or NCK2, we performed gene ontology and pathway term analysis from the proteins specifically associated with NCK1 or NCK2 using the ClueGO (gene ontology) plugin via Cytoscape software (32, 33). This analysis highlighted a strong enrichment for proteins involved in endocytosis for NCK1. In addition, we found that actin polymerization and epidermal growth factor signalling were functions that best represented the NCK2-specific components (Fig. 2.1C). Together, our findings demonstrate non-redundant protein association profiles for NCK1 and NCK2, supporting the idea that each displays a certain level of specificity. Furthermore, our data highlight a number of biological processes that may differentially implicate NCK1 or NCK2.

#### **2.4.2 *Nck2*<sup>-/-</sup> cells are multi-nucleated and display long intercellular bridges**

To evaluate the relative contribution of NCK1 and NCK2 to cellular morphology and cytoskeleton dynamics given the discrepancy between their protein networks with regards to actin cytoskeleton regulators, we established primary mouse embryo fibroblasts (MEFs) using

animals bearing *Nck1* and *Nck2* gene targeting (12). Using antibodies that do not cross-react between NCKs, we confirmed that these cell lines specifically lacked NCK1 or NCK2 proteins, respectively (Fig. 2.2A). *Nck1*<sup>-/-</sup> MEFs were morphologically indistinguishable from wild-type cells. Surprisingly, most *Nck2*<sup>-/-</sup> MEFs were elongated and displayed extended protrusions that often maintained contact with adjacent cells, reminiscent of intercellular bridges (Fig. 2.2B). Staining for actin and tubulin did not reveal obvious disparities between the different lines that may explain the phenotype. However, we found that a significant proportion of *Nck2*<sup>-/-</sup> MEFs were multinucleated, suggesting a defect in cytokinesis (Fig. 2.2B-C). We confirmed our observations using HEK293T cells, which also displayed intercellular bridge-like structures as well as significant multi-nucleation when depleted of NCK2, but not NCK1 using siRNA (supplemental Fig. 2.S.2A-C). Collectively, these NCK2-specific phenotypes are consistent with a defect in cytokinesis (34), and reinforce the idea that NCK1 and NCK2 adaptors have non-redundant functions.



**Figure 2. 2 : *Nck2*<sup>-/-</sup> cells are multi-nucleated and display long protrusions.**

(A) Mouse embryonic fibroblasts (MEFs) bearing *Nck1* or *Nck2* gene inactivation were analyzed by Western blot to confirm NCK1/2 protein expression. (B) Wild-type, *Nck1*<sup>-/-</sup> and *Nck2*<sup>-/-</sup> MEFs were analyzed by immunofluorescence for actin (red), tubulin (green) and DAPI (blue) to assess cellular morphology. Multi-nucleation (asterisks) and intercellular bridges (arrows) are indicated. Representative images are presented (scale bar = 40  $\mu$ m). (C) The

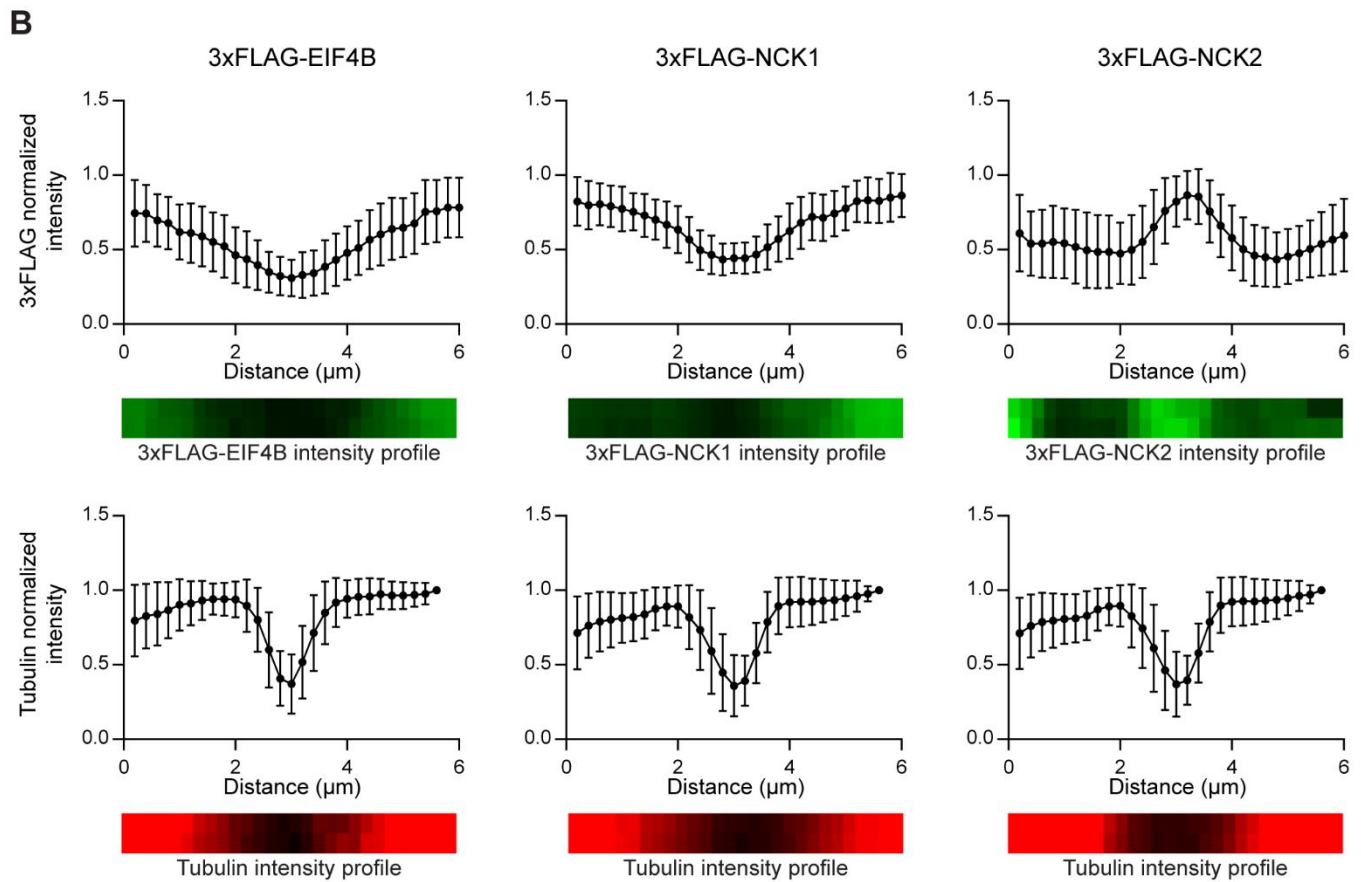
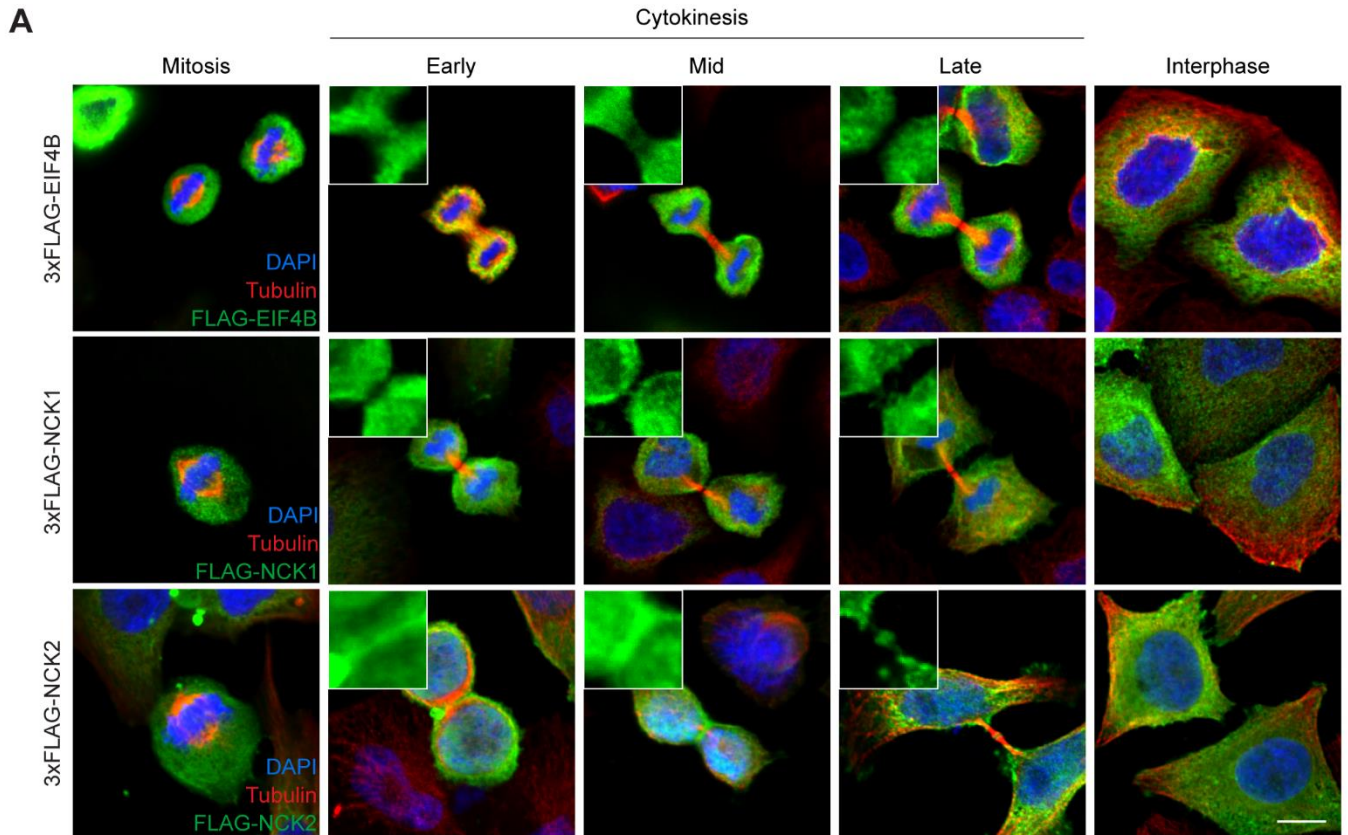
penetrance of the multi-nucleation phenotype was calculated for each genotype. Mean values and standard deviation from three independent experiments with >100 cells each are presented (WT, n=374; *Nck1*<sup>-/-</sup>, n=325; *Nck2*<sup>-/-</sup>, n=372) (\*\*\*\*p≤0.0001, Fisher's exact test).

### **2.4.3 NCK2, but not NCK1, localizes to the midbody during cytokinesis**

To examine a possible role for NCK during cell division, we first sought to analyze NCK1/2 expression in synchronized HeLa cells undergoing mitosis and cytokinesis. We were unable to detect the endogenous proteins under our fixation conditions (data not shown); we therefore transfected HeLa cells with 3xFLAG-NCK1 or 3xFLAG-NCK2 and assessed their localization during mitosis and cytokinesis. We found that both 3xFLAG-NCK1 and -NCK2 were distributed uniformly in the cytoplasm of daughter cells (Fig. 2.3A). However, we also detected 3xFLAG-NCK2, but not 3xFLAG-NCK1 or a 3xFLAG-EIF4B negative control, at the midbody in dividing cells (Fig. 2.3A). This was confirmed by quantifying the 3xFLAG signal across midbody length, the so-called dark zone (35) (Fig. 2.3B). Exogenous expression of 3xFLAG-NCK1 or -NCK2 did not alter tubulin localization relative to controls (Fig. 2.3B) and did not lead to cytokinesis defects (data not shown). The observation that NCK2, but not NCK1 localizes at the midbody is in agreement with the multi-nucleation and extended protrusions phenotypes specific to NCK2-deficient cells. Our observations also represent, to our knowledge, the first evidence of differential subcellular compartmentalization for the two NCK adaptor proteins.

### **2.4.4 NCK2 is required to complete cytokinesis and abscission**

To investigate possible midbody defects in the *Nck2*<sup>-/-</sup> MEFs model, we analyzed midbody morphology at different stages of cytokinesis. While midbody morphology appeared comparable in wild-type and *Nck1*<sup>-/-</sup> cells, it was clearly extended in length and persisted between nascent daughter cells for a longer period in *Nck2*<sup>-/-</sup> MEFs (Fig. 2.4A). To quantify this observation, we performed live-cell imaging of mitosis and cytokinesis, using the same lines (supplemental Fig. 2.S.3) or in NCK1/2-depleted HEK293T cells (supplemental Fig. 2.S.4). We



**Figure 2. 3 : NCK2 but not NCK1 localizes to the midbody during cytokinesis.**

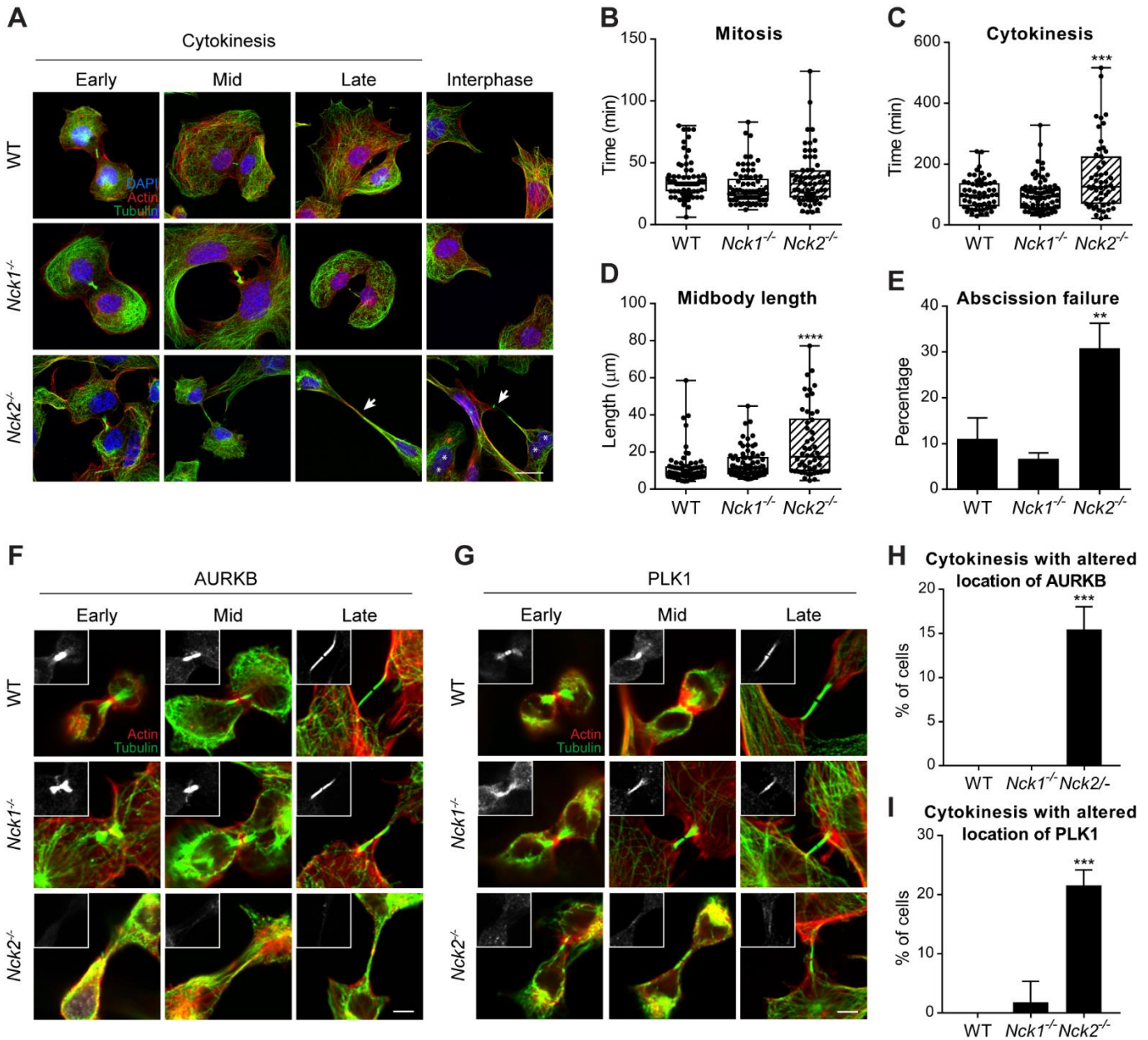
(A) HeLa cells were transiently transfected with 3xFLAG-EIF4B (control), 3xFLAG-NCK1 or 3xFLAG-NCK2 and synchronised. Cells were fixed at the cytokinesis stage and immunostained for tubulin (red), 3xFLAG (green) and DAPI (blue) to analyze 3xFLAG-tagged chimeras localization during cell division, as indicated. Representative images are shown (scale bar: 10  $\mu$ m). B) Quantification of pixel intensity as a function of position within the midbody of images processed as in (A). Distance was measured from a 6  $\mu$ m line selection over the midbody. Intensity of the 3xFLAG (top panels, green) or tubulin (bottom panels, red) staining is reported following normalization over the most intense pixel. Mean values and standard deviation from three independent experiments with >10 cells each are shown (3xFLAG-EIF4B cells: FLAG staining n=34, tubulin n=38; 3xFLAG-NCK1 cells: FLAG n=33, tubulin n=40; 3xFLAG-NCK2 staining: FLAG n=30, tubulin n=42).

found that *Nck2*<sup>-/-</sup> cells (34 $\pm$ 7min) underwent mitosis in a timeframe that was similar to wild-type (36 $\pm$ 4min) and to *Nck1*<sup>-/-</sup> cells (30 $\pm$ 9min) (Fig. 2.4B). However, we found that *Nck2*<sup>-/-</sup> cells required on average 50% more time (156 $\pm$ 9min) to complete cytokinesis compared to wild-type (104 $\pm$ 4min) or *Nck1*<sup>-/-</sup> (97 $\pm$ 11min) MEFs (p $\leq$ 0.001, unpaired *t*-test) (Fig. 2.4C).

In addition, *Nck2*<sup>-/-</sup> cells presented on average a significant increase in midbody length (25.8 $\pm$ 5.4 $\mu$ m) during abscission when compared to wild-type (12.2 $\pm$ 2.7 $\mu$ m) and *Nck1*<sup>-/-</sup> (13.9 $\pm$ 3.6 $\mu$ m) controls (Fig. 2.4D). Furthermore, we determined that 30.8% of NCK2-deficient cells failed to fully complete abscission (Fig. 2.4E). This led to a rise in the number of multinucleated cells to 16.2% in *Nck2*<sup>-/-</sup> cells, compared to 5.1% in wild-type and 4.7% in *Nck1*<sup>-/-</sup> MEFs (p $\leq$ 0.0001) (Fig. 2.2C). This also explained the presence of extended intercellular bridges that frequently maintained contact with adjacent cells following division (Fig. 2.2B).

To further delineate midbody defects in *Nck2*<sup>-/-</sup> MEFs, we examined the localization of midbody markers AURKB and PLK1 in our NCK-deficient lines. These kinases are recruited early in cytokinesis to the central spindle and site of furrow ingression, and play a crucial role in the recruitment of components of the midbody. In wild-type and *Nck1*<sup>-/-</sup> cells undergoing cytokinesis, both proteins localized to the ingressing furrow and midbody in >98% of the cells, as described previously (18, 19). Conversely, we did not detect AURKB (15.4 $\pm$ 2.6%) and PLK1 (21.7 $\pm$ 2.6%) in a significant proportion of *Nck2*<sup>-/-</sup> MEFs, respectively (p $\leq$ 0.001, Fisher's exact test) (Fig. 2.4F-I). PLK1 activity promotes the recruitment of the RhoGEF ECT2 to the central spindle, thereby establishing localized RhoA activation (36). In agreement with the loss of PLK1 at the central spindle and midbody, we observed a concomitant decrease in ECT2 recruitment

(supplemental Fig. 2.S.5). Collectively, these numbers are consistent with the penetrance of the multi-nucleation and abscission failure phenotypes in *Nck2*<sup>-/-</sup> MEFs (Fig. 2.4C-E). Together, these findings suggested that NCK2, but not NCK1 is required for the formation of a fully functional midbody in dividing cells.



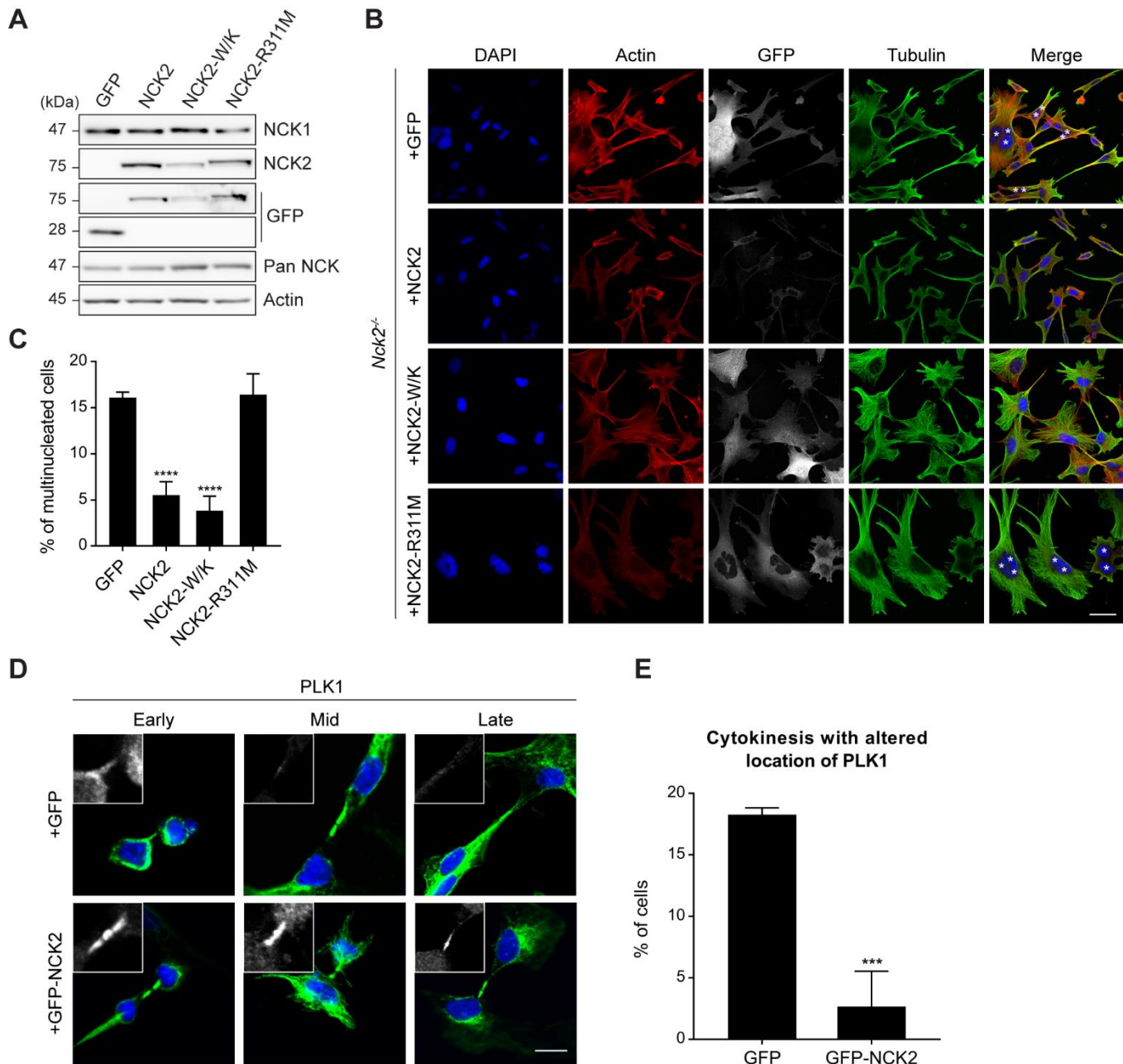
**Figure 2. 4 : NCK2 is required to complete cytokinesis and abscission.**

(A) Wild-type, *Nck1*<sup>-/-</sup> and *Nck2*<sup>-/-</sup> MEFs were fixed at different stages of cytokinesis and analyzed by immunofluorescence for actin (red), tubulin (green) and DAPI (blue) to evaluate midbody morphology. Multi-nucleation is indicated with asterisks and extended midbodies with



arrows. Representative images are presented (scale bar: 20  $\mu\text{m}$ ). (B-E) Wild-type, *Nck1*<sup>-/-</sup> and *Nck2*<sup>-/-</sup> MEFs were stained with SIR-ACTIN and analyzed by live imaging (Fig.2.S.3). Average time spent in mitosis (B), in cytokinesis (C), average midbody length (D) and abscission failure (E) were calculated for each genotype, from three independent experiments with >20 cells each (WT, n=70; *Nck1*<sup>-/-</sup>, n=76; *Nck2*<sup>-/-</sup>, n=63) (\*\*p $\leq$ 0.01; \*\*\* p $\leq$ 0.001; \*\*\*\* p $\leq$ 0.0001; unpaired *t*-test). (F-G) Wild-type, *Nck1*<sup>-/-</sup> and *Nck2*<sup>-/-</sup> MEFs were fixed at different stages of cytokinesis and analyzed by immunofluorescence for actin (red), tubulin (green) and AURKB (insert, panel F) or PLK1 (insert, panel G). Representative images from four experiments are shown (scale bar: 5  $\mu\text{m}$ ). (H-I) The penetrance of the AURKB/PLK1 mislocalization was calculated for each genotype. Cells in which the AURKB or PLK1 signal at the midbody (identified via the tubulin signal) was barely detectable or not detected at all, relative to WT cells under identical acquisition settings, were considered to display altered staining. Mean values and standard deviation from four independent experiments with >10 cells each are presented (WT, n=53; *Nck1*<sup>-/-</sup>, n=59; *Nck2*<sup>-/-</sup>, n=81) (\*\*\*) p $\leq$ 0.001; Fisher's exact test).

To confirm that our observations were due to the NCK2 loss-of-function, we re-expressed wild-type NCK2 from a stably inserted transgene in *Nck2*<sup>-/-</sup> MEFs (Fig. 2.5A). Expression of GFP-NCK2, but not GFP alone, led to a significant decrease in the proportion of multi-nucleated cells (Fig. 2.5B-C). We also discovered that expression of GFP-NCK2 in *Nck2*<sup>-/-</sup> cells restored the localization of PLK1 to the midbody during cytokinesis, when compared to cells expressing GFP alone (Fig. 2.5D-E). To determine the domain requirement of NCK2 for the regulation of cytokinesis, we introduced point mutations that inactivate the conventional binding of its three SH3 domains (W38K, W148K, W234K; W/K) or single SH2 domain (R311M) and repeated the rescue experiments (37). Interestingly, only the SH3-inactive NCK2 mutant was able to revert multi-nucleation; thus, a functional SH2 domain was required to support NCK2 function during cytokinesis (Fig. 2.5B-C).



**Figure 2. 5 : NCK2 regulation of cytokinesis is dependent on its SH2 domain.**

(A) Mouse embryonic fibroblasts (MEFs) bearing *Nck2* gene inactivation were infected with GFP, GFP-NCK2 wild-type, SH3-inactive (W38K, W148K, 234K; W/K) or SH2-inactive (R311M) mutants. Lysates were analyzed by Western blot to confirm GFP or GFP-NCK2 protein expression. (B) *Nck2*<sup>-/-</sup> MEFs expressing GFP or GFP-NCK2 wild-type and mutants (as indicated) were analyzed by immunofluorescence for actin, tubulin, DAPI and GFP to assess cellular morphology. Multi-nucleation is indicated with asterisks. Representative images are presented (scale bar: 40  $\mu$ m). (C) The penetrance of the multi-nucleation phenotype was calculated for each tentative rescue condition. Mean values and standard deviation from three independent experiments with >100 cells each are presented (+GFP, n=409; +GFP-NCK2, n=335; +GFP-NCK2-W3K, n=328; +GFP-NCK2-R311M, n=392) (\*\*\*\* $p \leq 0.0001$ ; Fisher's

exact test). (D) *Nck2*<sup>-/-</sup> MEFs expressing GFP or GFP-NCK2 wild-type were fixed at different stages of cytokinesis and analyzed by immunofluorescence for tubulin (green), DAPI (blue) and PLK1 (insert panel, white) to assess cellular morphology. Representative images from four experiments are shown (scale bar: 10  $\mu$ m). (E) The penetrance of the PLK1 mislocalization was calculated for each condition. Mean values and standard deviation from four independent experiments with >20 cells each are presented (+GFP, n=120; +GFP-NCK2, n=106) (\*\*\*)  $p \leq 0.001$ ; Fisher's exact test).

## 2.5 Discussion

In this work, we report the first high-confidence protein-protein interaction and proximity network for NCK family adaptors. We stressed the complementarity of the AP-MS and BioID approaches by highlighting that <25% of the NCK-associated proteins were revealed by both methods. This observation is consistent with previous reports in which AP-MS and BioID were directly compared (38, 39). We found that the best characterized NCK-associated proteins, such as PAK1/2, CHN1, CBL, WASL and TNIK are common to both NCK1 and NCK2. Interestingly, our AP-MS and BioID data also led to the identification of 30 NCK1- and 28 NCK2-specific partners, the majority of which being new NCK-associated proteins. The large number of NCK1- and NCK2-restricted associations is striking, given that the *in vitro* binding preference of the respective SH2 domains of NCK1 and NCK2 are virtually indistinguishable (2). However, the analysis of NCK-associated proteins for putative NCK1/2 SH2 binding sites (Y-D/E-X-V/P) revealed a number of potential targets (Fig.2.1A), which suggests that the NCK1 and NCK2 SH2 binding specificities determined *in vitro* using synthetic peptides might not be reflected *in vivo* with native proteins in a complex environment. In addition, to our knowledge the binding specificities of corresponding SH3 domains of each NCK have not been explored and may also explain, at least in part, the presence of specific interactions. Differences between the repertoires of NCK1 and NCK2 interactomes are consistent with studies that have described a function specific to one of the two adaptors. In particular, NCK2 was previously found to regulate EPH receptor-mediated cell adhesion during early vertebrate development (40) and adipogenesis in a mouse model (11). Yet, no specific NCK2 target was defined in either study. The differential subcellular compartmentalization that we discovered in dividing HeLa cells may also occur in other cell types and/or under different

conditions, thus explaining in part the disparities between NCK1- and NCK2-associated proteins. Nonetheless, it is likely that our description of the NCK1/2 signalling network specificity landscape will contribute to providing mechanistic explanations to functional distinctions between NCK1 and NCK2.

We also report for the first time a role for NCK2 in the regulation of cell division that is not redundant with NCK1 function. Interestingly, the function of NCK2 appears to be early during cytokinesis as loss of NCK2 attenuates the recruitment of PLK1 and AURKB to the central spindle, a structure required to position the cleavage plane. Two protein complexes play key roles in central spindle assembly: PRC1 (Protein required for cytokinesis 1) and Centralspindlin (41). The latter consists of a hetero-tetramer of RACGAP1 and KIF23/MKLP1 (42). Their phosphorylation by AURKB and PLK1, respectively, leads to Centralspindlin activation at the onset of anaphase (43, 44). This promotes the recruitment of ECT2 and the subsequent accumulation of active RhoA, which promotes the assembly and stimulates contraction of the actomyosin ring and thus furrow ingression (Bement et al., 2005, Su 2011). How the loss of NCK2 prevents PLK1 and AURKB recruitment remains to be explored. Since NCK adaptors play an important role in the assembly and reorganization of the actin cytoskeleton, it is conceivable that they have a similar function during early cytokinesis. Our MS analyses led to the identification of a few proteins previously described to regulate cytokinesis, such as GIT1 (45) and PKP4 (46). Interestingly, the latter was specifically identified in NCK2 complexes, thus suggesting that they may contribute to NCK2-dependent regulation of the process.

Moreover, considering the requirement for the NCK2-SH2 domain for rescue of the cell division defects, our data suggest that the NCK2 adaptor is a strong candidate for nucleation of essential phospho-tyrosine signalling networks during cytokinesis. Interestingly, the unique *Drosophila* ortholog of NCK1/2, Dock, localizes at ring canals structures that are assembled from arrested cleavage furrows following incomplete cytokinesis of male germ cells (47). These structures share most of their constituents with contractile rings of dividing cells and display strong phospho-tyrosine signals (48). The subcellular localization of Dock at ring canals was suggested to be dependent on its SH2 domain (47), which supports an evolutionary-conserved SH2-dependent function for NCK adaptors in cytokinesis. Remarkably, a more prominent role for tyrosine phosphorylation during cell division than previously recognized has been recently

reported in mammalian cells (49-51). Moreover, tyrosine phosphorylation has been shown to increase at the cleavage furrow of dividing cells (52), suggesting the presence of localized phospho-tyrosine signalling during furrow ingression and cytokinesis. Consistent with this, tyrosine kinases ABL and SRC were shown to localize at the midbody in dividing cells where their functions are required to complete cytokinesis (53-55). The requirement for the tight regulation of phospho-tyrosine signals during cytokinesis is also supported by the findings that PTPN12 and PTPN13 tyrosine phosphatases also contribute to cytokinesis (56, 57). More recently, receptor tyrosine kinase EPHB2-dependent phosphorylation of CIT (Citron kinase) was shown to impair cytokinesis (58). Strikingly, EPHB2 bears a *bona fide* binding site for NCK adaptors SH2 domains in its juxtamembrane domain when tyrosine phosphorylated (59), thus suggesting a possible mechanism for cytokinesis regulation.

In summary, the NCK1 and NCK2 interaction profiles revealed a plethora of new candidates that may pave the way for the mechanistic dissection of NCK1 and NCK2 contribution to biological processes. In particular, the data led to the discovery that NCK2 but not NCK1 is present at the midbody in dividing cells, where it is required for proper cytokinesis and abscission. This supports the very few previous reports showing that NCK1 and NCK2 functions are not completely redundant.

## 2.6 Experimental procedures

### 2.6.1 Constructs and sequences

Murine NCK1 (NCBI clone NM010878.3), murine NCK2 (NCBI clone NM010879.3) and human EIF4B (NCBI clone NM001300821.2) were subcloned into pMSCVpuro (Clontech) with a N-terminal 3xFLAG tag, FLAG-BirA\*-pcDNA5-FRT-TO (Thermo Fisher Scientific), pcDNA3.1 (Thermo Fisher Scientific) with a N-terminal 3xFLAG tag (Sigma-Aldrich), or in pLJM1-EGFP (Addgene, Sabatini lab). Point mutations were introduced using the Q5 mutagenesis kit (New England Biolabs) according to manufacturer instructions. All inserts were fully sequenced and protein expression was verified. siRNA sequences (Integrated DNA Technologies) were as follows: (NCK1, Sense :

rGrGrCrCrUrUrCrArCrUrCrArCrUrGrGrArArArGrUrUrUGC;                    Antisense                    :  
 rGrCrArArArCrUrUrUrCrCrArGrUrGrArGrUrGrArArGrGrCrCrUrA) (NCK2, Sense                    :  
 rUrArArUrArCrArGrArUrGrArUrUrArArGrGrArArArArCAG;                    Antisense                    :  
 rCrUrGrUrUrUrUrCrCrUrUrArArUrCrArUrCrUrGrUrArUrUrArGrU).                    Non-targeting  
 DsiRNA sequences provided by the manufacturer were used as negative control.

## 2.6.2 Cell culture, transfections and virus infection

Human embryonic kidney 293T cells (HEK293T), Flp-In T-REx HEK293, HeLa cervical carcinoma cells and mouse embryonic fibroblasts (MEF) were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM, Thermo Fisher Scientific) high glucose supplemented with 10% fetal bovine serum (Sigma-Aldrich). HEK293T stable cell lines expressing 3xFLAG-tagged NCK1 or NCK2 were selected with  $1.5 \mu\text{g.ml}^{-1}$  puromycin (Thermo Fisher Scientific). Flp-In T-REx HEK293 stable lines expressing NCK1 or NCK2 fused with BirA\* were generated as described (39), and grown in the presence of  $150 \mu\text{g.ml}^{-1}$  hygromycin (Thermo Fisher Scientific). Expression was induced with  $1 \mu\text{g.ml}^{-1}$  tetracycline for 24 h. For the BioID experiments,  $50 \mu\text{M}$  biotin was added at the time of induction. MEFs were generated as previously described (60), then immortalized by the introduction of the SV40 T/t antigens via transfection of the pBSV0.3T/t plasmid (kindly provided by E. W. Khandjian, U. Laval) using jetPRIME (Polyplus). HeLa cells were transiently transfected with 3xFLAG constructs using Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific). HeLa cells were synchronized 8h post-transfection with a double thymidine block as previously described (61), with a relaxation time of 10h. Transfections of siRNAs in HEK293T were performed using RNAiMAX (Thermo Fisher Scientific). Lentivirus were produced by co-transfection of pLJM1-GFP constructs, pMD2G and psPAX2 (Addgene, Trono lab). Viral supernatants were collected after 48h, filtered through a  $0.45 \mu\text{m}$  membrane and supplemented with  $8 \mu\text{g.ml}^{-1}$  polybrene (Sigma-Aldrich). Stable clonal lines were obtained by transducing *Nck2*<sup>-/-</sup> MEFs and maintaining a  $2 \mu\text{g.ml}^{-1}$  puromycin selection.

### **2.6.3 Cell lysis and Western blotting**

Cells were grown to confluency prior to lysis. Sodium orthovanadate (Sigma-Aldrich) pre-activated with 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1: 200) (perovanadate) was added to cell medium at a final concentration of 100 μM for 20 min, as indicated. Cells were washed once with ice cold PBS before lysis. For AP-MS and Western blotting, proteins were extracted by scraping cells in ice-cold lysis buffer as described elsewhere (56,57). For BioID, cells were lysed in cold RIPA buffer followed by benzonase treatment for 1h (Sigma-Aldrich) and 3 cycles of sonication. Protein concentrations were measured and normalized using a BCA kit (Thermo Fisher Scientific). Lysates were incubated under agitation for 2h at 4°C with M2 affinity resin (Sigma-Aldrich) for FLAG AP or 3h at 4°C with streptavidin agarose beads (Sigma-Aldrich) for BioID. Beads were washed three times with lysis buffer.

For Western blotting, beads were resuspended in 4x Laemmli buffer. A total of 15 μg of whole-cell lysates were resolved by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes (GE Healthcare). Loading was verified with Ponceau S (Sigma-Aldrich) staining. Western blotting was performed as previously described (62). Primary antibodies were as follows: rabbit anti-NCK1 (Cell Signalling Technology, #2319), mouse anti-NCK2 (Abnova, #MAB2727), rabbit anti-NCK (gift from T. Pawson, Toronto), rabbit anti-FLAG (Sigma-Aldrich, #F7425), mouse anti-actin (Cell Signalling Technology, #3700), mouse anti-tubulin (DSHB, #E7) and mouse anti-GFP (Abcam, #290). Secondary antibodies were the following: horse anti-mouse IgG (Cell Signalling Technology, #7076), goat anti-rabbit (Cell Signalling Technology, #7074) and streptavidin-HRP (Life Technologies #434323). Signal was revealed using BioRad Clarity Western ECL substrate and detected with an Amersham Imager 600RGB (GE Healthcare).

### **2.6.4 Immunofluorescence, cell labeling and microscopy**

Cells were fixed with 4% paraformaldehyde (BioShop) for 15 min, washed with PBS and permeabilized with 0.5% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) for 15 min at room temperature. Cells were blocked in 10% goat serum (Wisent) and 0.1% NP-40 (Sigma-Aldrich) and incubated with the following primary antibodies diluted in blocking solution for 1h: rabbit anti-tubulin (Abcam, #ab18251), rabbit anti-FLAG (Sigma-Aldrich, #F7425), mouse anti-AURKB (BD

Biosciences, #611082) and mouse anti-PLK1 (63). Following 3 washes in PBS with 0.1% NP-40 (Sigma-Aldrich), cells were incubated for 1h with the following secondary antibodies: Alexa Fluor 488-goat anti-rabbit IgG (Jackson ImmunoResearch, #111-545-003), Alexa Fluor 568-goat anti-rabbit IgG (Thermo Fisher Scientific, #A11011), Alexa Fluor 647-goat anti-mouse IgG (Thermo Fisher Scientific, #A21235), Alexa Fluor 647-goat anti-rabbit IgG (Thermo Fisher Scientific, #A21245) and Alexa Fluor 594-sptreptavidin (Thermo Fisher Scientific, #S11227). Actin was visualized using Alexa Fluor 555-phalloidin (Cell Signalling Technology, #8953) or Alexa Fluor 647-phalloidin (Cell Signalling Technology, #8940). Slides were washed 3 times with 0.1% NP-40 (Sigma-Aldrich) in PBS and twice with PBS before being mounted in ProLong Gold Antifade with DAPI (Thermo Scientific). Confocal images were acquired using a FV1000 system (Olympus) via the Fluoview 3.0 software.

For fluorogenic labeling and live imaging microscopy, cells were plated into 8-well  $\mu$ -Slides (Ibidi) and treated with 90 nM SiR-Actin and 7  $\mu$ M Verapamil (Cytoskeleton Inc). Acquisition was performed using an UltraView spinning disc confocal microscope (Perkin-Elmer) equipped with an EMCCD camera (Hamamatsu Photonics), a humidified 5% CO<sub>2</sub> thermo-regulated chamber. Images were acquired with the Volocity software (version 6.01, Perkin-Elmer) at 5 minutes intervals with low laser power at 647 nm for 18-24h starting at 24h post-seeding.

For phase contrast live imaging, images were acquired every 5 min for 18-24h starting at 24h post-seeding. Images were obtained with a Nikon TE2000 inverted microscope equipped with a humidified 5% CO<sub>2</sub> thermo-regulated chamber and a Photometrix Coolsnap FX CCD camera (Rooper Scientific) driven by the MetaView software (Version 4.5, Universal Imaging Corp).

### **2.6.5 Experimental Design and Statistical Rationale**

Each AP-MS and BioID experiment was performed in biological triplicate (n=3). Affinity purifications were performed on different days, using cells from successive passages. Controls for each experiment were treated concomitantly to experimental samples. 3xFLAG-GFP was used as a control for 3xFLAG-NCK1/2 in AP-MS experiments, and BirA\*-FLAG-GFP for BirA\*-FLAG-NCK1/2 BioID experiments. Biological triplicates were required and



sufficient to perform SAINT analyses, as reported (22, 23), to distinguish background from *bona fide* protein associations. Statistical significance for cell imaging-based phenotypes was determined via unpaired *t*-student test (95% confidence intervals, two tails) or Fisher's exact test (95% confidence intervals, two tails) using Prism 7 software (GraphPad).

### **2.6.6 Mass spectrometry analyses**

For MS experiments, beads were additionally washed twice with 20 mM Tris pH 7.4 and proteins were eluted by incubating with agitation at 4 °C with 50 mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> before digestion with trypsin, as described (64). A 5600+ TripleTOF mass spectrometer (Sciex) equipped with a nanoelectrospray ion source and coupled with an Agilent 1200 HPLC system (Agilent) was used to acquire data for AP-MS experiments. Peptides from tryptic digest were resolved using a New Objective PicoFrit column (15 cm×0.075 mm I.D.) (Scientific Instrument Services) packed with Jupiter 5 µm C18 (Phenomenex) stationary phase. A 65-minute linear gradient of a 5-35% mixture of acetonitrile, 0.1% formic acid injected at 300 nL/min was used to elute peptides. Data dependent acquisition mode was used in Analyst version 1.7 (Sciex) to acquire mass spectra. Full scan mass spectrum (400 to 1250m/z) were acquired and followed by collision-induced dissociation of the twenty most intense ions. A period of 20 seconds and a tolerance of 100 ppm were set for dynamic exclusion. Protein Pilot version 5.0 (Sciex) was used to generate MS/MS peak lists. Mascot (Matrix Science, London, UK; version 2.4.0) and X! Tandem (The GPM, thegpm.org; version CYCLONE (2010.12.01.1) were used to analyse MGF sample files. The Uniprot Homo sapiens reference proteome (March 2014 release, 69150 entries) was used assuming tryptic peptides. Two missed cleavages were allowed. The protein sequences of the GFP and NCK1/2 FLAG-tagged constructs were added to the database to estimate protein sequence coverage. Searches were performed using a fragment ion mass tolerance and a parent ion tolerance of 0.100Da. Cysteine carbamidomethylation was specified for all samples as a fixed modification. Variable modifications specified were oxidation of methionine, phosphorylation of serine, threonine and tyrosine, conversion of glutamate and glutamine to pyroglutamate, deamidation of asparagine and glutamine.

For BioID, peptide identification was carried out on an Orbitrap Fusion spectrometer (Thermo Fisher Scientific) equipped with a nanoelectrospray ion source (Thermo Scientific)

and coupled to a UltiMate 3000 nanoRSLC (Dionex). Data dependent acquisition of mass spectra was performed using XCalibur software version 3.0.63 (Thermo Scientific). Full scan mass spectra (350 to 1800m/z) were acquired in the orbitrap at a resolution of 120 000 using a maximum injection time of 50 ms and automatic gain control target of 4e5. The quadrupole analyzer allowed for the isolation of selected ions in a window of 1.6 m/z and fragmentation by higher energy collision-induced dissociation (HCD) with 35% energy. The resulting fragments were detected by the linear ion trap at a rapid scan rate. Dynamic exclusion of previously fragmented peptides was set for a period of 20 sec and a tolerance of 10 ppm. All MS/MS peak lists were generated using Thermo Proteome Discoverer version 1.4.0.288 (Thermo Scientific). MGF sample files were analyzed using Mascot (Matrix Science, London, UK; version 2.4.0) and X! Tandem (The GPM, thegpm.org; version CYCLONE (2010.12.01.1)). Both softwares were programmed to search Uniprot Homo sapiens reference proteome (March 2014 release, 69150 entries) assuming trypsin digestion. Searches were carried out with a fragment ion mass tolerance of 0.60 Da and a parent ion tolerance of 10 ppm. Carbamidomethyl of cysteine was specified as a fixed modification. Variable modifications were deamidation of asparagine and glutamine, oxidation of methionine and phosphorylation of serine, threonine and tyrosine. Two miscleavages were allowed.

For both AP-MS and BioID, Scaffold version 4.7.5 (Proteome Software Inc.) was used to validate MS/MS-based peptide and protein identifications. Criteria for protein identifications were fixed at greater than 99% probability to achieve a FDR less than 1% and required at least 1 peptide to be identified. Peptide and protein probabilities were assigned via the Protein Prophet algorithm (65, 66). Principle of parsimony was applied for proteins that contained similar peptides and could not be differentiated based on MS/MS analysis alone. Spectral counts were exported from Scaffold and were formatted according to SAINT algorithm guidelines. SAINT express statistical analyses were carried out including 3xFLAG-GFP controls for AP-MS. For BioID, the maximal spectral count value from Flag-BirA\*-GFP ( $\pm$  biotin) for each prey was utilized as control. Proteins with a SAINT score  $\geq 0.9$  were deemed genuine interactors.

### 2.6.7 Network modelling and clustering analysis

Interaction networks were modeled using Cytoscape v3.1.1. For clustering analysis, ClueGO plug-in v2.1.7 set for GO Biological process and GO Molecular function analysis with upper medium network specificity was used (32). Venn diagrams were prepared using Venn Diagram Plotter (<https://omics.pnl.gov/software/venn-diagram-plotter>).

### 2.6.8 Data availability

The mass spectrometry proteomics data have been deposited to the ProteomeXchange Consortium via the PRIDE partner repository (67), with the dataset identifier PXD008824.

## 2.7 Footnotes

We thank members of the Bisson laboratory for discussions, J. Ruston, J. Du and T. Pawson for the pan-NCK antibody as well as *Nck1*<sup>-/-</sup> and *Nck2*<sup>-/-</sup> MEFs. Mass spectrometry was performed at the CHU de Québec – Université Laval Proteomics Platform. This work was funded by Discovery Grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) (418615-2012, 2018-06293 to N.B. and 2016-05841 to S.E.), and Operating Grants from the Canadian Institutes for Health Research (CIHR) (130335 to N.B., 312588 to S.E.). N.B. was also supported by Leader's Opportunity Funds from the Canada Foundation for Innovation (30308, 34963), holds a Canada Research Chair (Tier 2) in Cancer Proteomics, and previously a Junior 1 salary award from the Fonds de Recherche du Québec-Santé (FRQ-S) with funds from the Quebec Breast Cancer Foundation. S.E. holds a Junior 2 salary award from the Fonds de Recherche du Québec-Santé (FRQ-S). K.J. and S.L.B. held PROTEO scholarships.

## 2.8 References

1. Buday, L., Wunderlich, L., and Tamas, P. (2002) The Nck family of adapter proteins: regulators of actin cytoskeleton. *Cell Signal* 14, 723-731
2. Frese, S., Schubert, W. D., Findeis, A. C., Marquardt, T., Roske, Y. S., Stradal, T. E., and Heinz, D. W. (2006) The phosphotyrosine peptide binding specificity of Nck1 and Nck2 Src homology 2 domains. *J Biol Chem* 281, 18236-18245
3. Chen, M., She, H., Davis, E. M., Spicer, C. M., Kim, L., Ren, R., Le Beau, M. M., and Li, W. (1998) Identification of Nck family genes, chromosomal localization, expression, and signaling specificity. *J Biol Chem* 273, 25171-25178
4. Li, W., Fan, J., and Woodley, D. T. (2001) Nck/Dock: an adapter between cell surface receptors and the actin cytoskeleton. *Oncogene* 20, 6403-6417
5. Rohatgi, R., Nollau, P., Ho, H. Y., Kirschner, M. W., and Mayer, B. J. (2001) Nck and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate synergistically activate actin polymerization through the N-WASP-Arp2/3 pathway. *J Biol Chem* 276, 26448-26452
6. Guan, S., Fan, J., Han, A., Chen, M., Woodley, D. T., and Li, W. (2009) Non-compensating roles between Nckalpha and Nckbeta in PDGF-BB signaling to promote human dermal fibroblast migration. *J Invest Dermatol* 129, 1909-1920
7. Bong, Y. S., Park, Y. H., Lee, H. S., Mood, K., Ishimura, A., and Daar, I. O. (2004) Tyr-298 in ephrinB1 is critical for an interaction with the Grb4 adaptor protein. *Biochem J* 377, 499-507
8. Cowan, C. A., and Henkemeyer, M. (2001) The SH2/SH3 adaptor Grb4 transduces B-ephrin reverse signals. *Nature* 413, 174-179
9. Su, Z., Xu, P., and Ni, F. (2004) Single phosphorylation of Tyr304 in the cytoplasmic tail of ephrin B2 confers high-affinity and bifunctional binding to both the SH2 domain of Grb4 and the PDZ domain of the PDZ-RGS3 protein. *Eur J Biochem* 271, 1725-1736
10. Guan, S., Chen, M., Woodley, D., and Li, W. (2007) Nckbeta adapter controls neuritegenesis by maintaining the cellular paxillin level. *Mol Cell Biol* 27, 6001-6011
11. Dusseault, J., Li, B., Haider, N., Goyette, M. A., Cote, J. F., and Larose, L. (2016) Nck2 Deficiency in Mice Results in Increased Adiposity Associated With Adipocyte Hypertrophy and Enhanced Adipogenesis. *Diabetes* 65, 2652-2666
12. Bladt, F., Aippersbach, E., Gelkop, S., Strasser, G. A., Nash, P., Tafuri, A., Gertler, F. B., and Pawson, T. (2003) The murine Nck SH2/SH3 adaptors are important for the development of mesoderm-derived embryonic structures and for regulating the cellular actin network. *Mol Cell Biol* 23, 4586-4597

13. Gingras, A. C., Gstaiger, M., Raught, B., and Aebersold, R. (2007) Analysis of protein complexes using mass spectrometry. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 645-654
14. Roux, K. J., Kim, D. I., Raida, M., and Burke, B. (2012) A promiscuous biotin ligase fusion protein identifies proximal and interacting proteins in mammalian cells. *J Cell Biol* 196, 801-810
15. Green, R. A., Paluch, E., and Oegema, K. (2012) Cytokinesis in animal cells. *Annu Rev Cell Dev Biol* 28, 29-58
16. Pollard, T. D. (2010) Mechanics of cytokinesis in eukaryotes. *Curr Opin Cell Biol* 22, 50-56
17. Miller, A. L. (2011) The contractile ring. *Curr Biol* 21, R976-978
18. Carmena, M., and Earnshaw, W. C. (2003) The cellular geography of aurora kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 842-854
19. Takaki, T., Trenz, K., Costanzo, V., and Petronczki, M. (2008) Polo-like kinase 1 reaches beyond mitosis--cytokinesis, DNA damage response, and development. *Curr Opin Cell Biol* 20, 650-660
20. Barr, F. A., and Gruneberg, U. (2007) Cytokinesis: placing and making the final cut. *Cell* 131, 847-860
21. Pollard, T. D., and Wu, J. Q. (2010) Understanding cytokinesis: lessons from fission yeast. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11, 149-155
22. Choi, H., Larsen, B., Lin, Z. Y., Breikreutz, A., Mellacheruvu, D., Fermin, D., Qin, Z. S., Tyers, M., Gingras, A. C., and Nesvizhskii, A. I. (2011) SAINT: probabilistic scoring of affinity purification-mass spectrometry data. *Nature methods* 8, 70-73
23. Choi, H., Liu, G., Mellacheruvu, D., Tyers, M., Gingras, A. C., and Nesvizhskii, A. I. (2012) Analyzing protein-protein interactions from affinity purification-mass spectrometry data with SAINT. *Curr Protoc Bioinformatics* Chapter 8, Unit8 15
24. Bokoch, G. M., Wang, Y., Bohl, B. P., Sells, M. A., Quilliam, L. A., and Knaus, U. G. (1996) Interaction of the Nck adapter protein with p21-activated kinase (PAK1). *J Biol Chem* 271, 25746-25749
25. Wells, C. D., Fawcett, J. P., Traweger, A., Yamanaka, Y., Goudreault, M., Elder, K., Kulkarni, S., Gish, G., Virag, C., Lim, C., Colwill, K., Starostine, A., Metalnikov, P., and Pawson, T. (2006) A Rich1/Amot complex regulates the Cdc42 GTPase and apical-polarity proteins in epithelial cells. *Cell* 125, 535-548

26. Rivero-Lezcano, O. M., Sameshima, J. H., Marcilla, A., and Robbins, K. C. (1994) Physical association between Src homology 3 elements and the protein product of the c-cbl proto-oncogene. *J Biol Chem* 269, 17363-17366
27. Rivero-Lezcano, O. M., Marcilla, A., Sameshima, J. H., and Robbins, K. C. (1995) Wiskott-Aldrich syndrome protein physically associates with Nck through Src homology 3 domains. *Mol Cell Biol* 15, 5725-5731
28. Chatr-Aryamontri, A., Oughtred, R., Boucher, L., Rust, J., Chang, C., Kolas, N. K., O'Donnell, L., Oster, S., Theesfeld, C., Sellam, A., Stark, C., Breitkreutz, B. J., Dolinski, K., and Tyers, M. (2017) The BioGRID interaction database: 2017 update. *Nucleic Acids Res* 45, D369-D379
29. Kundu, K., Costa, F., Huber, M., Reth, M., and Backofen, R. (2013) Semi-supervised prediction of SH2-peptide interactions from imbalanced high-throughput data. *PLoS One* 8, e62732
30. Kundu, K., Mann, M., Costa, F., and Backofen, R. (2014) MoDPepInt: an interactive web server for prediction of modular domain-peptide interactions. *Bioinformatics* 30, 2668-2669
31. Liu, B. A., Engelmann, B. W., Jablonowski, K., Higginbotham, K., Stergachis, A. B., and Nash, P. D. (2012) SRC Homology 2 Domain Binding Sites in Insulin, IGF-1 and FGF receptor mediated signaling networks reveal an extensive potential interactome. *Cell Commun Signal* 10, 27
32. Bindea, G., Mlecnik, B., Hackl, H., Charoentong, P., Tosolini, M., Kirilovsky, A., Fridman, W. H., Pages, F., Trajanoski, Z., and Galon, J. (2009) ClueGO: a Cytoscape plug-in to decipher functionally grouped gene ontology and pathway annotation networks. *Bioinformatics* 25, 1091-1093
33. Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N. S., Wang, J. T., Ramage, D., Amin, N., Schwikowski, B., and Ideker, T. (2003) Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res* 13, 2498-2504
34. Normand, G., and King, R. W. (2010) Understanding cytokinesis failure. *Adv Exp Med Biol* 676, 27-55
35. Hu, C. K., Coughlin, M., and Mitchison, T. J. (2012) Midbody assembly and its regulation during cytokinesis. *Mol Biol Cell* 23, 1024-1034
36. Su, K. C., Takaki, T., and Petronczki, M. (2011) Targeting of the RhoGEF Ect2 to the equatorial membrane controls cleavage furrow formation during cytokinesis. *Dev Cell* 21, 1104-1115
37. Tanaka, M., Gupta, R., and Mayer, B. J. (1995) Differential inhibition of signaling pathways by dominant-negative SH2/SH3 adapter proteins. *Mol Cell Biol* 15, 6829-6837

38. Couzens, A. L., Knight, J. D., Kean, M. J., Teo, G., Weiss, A., Dunham, W. H., Lin, Z. Y., Bagshaw, R. D., Sicheri, F., Pawson, T., Wrana, J. L., Choi, H., and Gingras, A. C. (2013) Protein interaction network of the mammalian Hippo pathway reveals mechanisms of kinase-phosphatase interactions. *Sci Signal* 6, rs15
39. Lambert, J. P., Tucholska, M., Go, C., Knight, J. D., and Gingras, A. C. (2015) Proximity biotinylation and affinity purification are complementary approaches for the interactome mapping of chromatin-associated protein complexes. *J Proteomics* 118, 81-94
40. Bisson, N., Poitras, L., Mikryukov, A., Tremblay, M., and Moss, T. (2007) EphA4 Signaling Regulates Blastomere Adhesion in the Xenopus Embryo by Recruiting Pak1 to Suppress Cdc42 Function. *Mol Biol Cell* 18, 1030-1043
41. Mierzwa, B., and Gerlich, D. W. (2014) Cytokinetic abscission: molecular mechanisms and temporal control. *Dev Cell* 31, 525-538
42. Pavicic-Kaltenbrunner, V., Mishima, M., and Glotzer, M. (2007) Cooperative assembly of CYK-4/MgcRacGAP and ZEN-4/MKLP1 to form the centralspindlin complex. *Mol Biol Cell* 18, 4992-5003
43. Guse, A., Mishima, M., and Glotzer, M. (2005) Phosphorylation of ZEN-4/MKLP1 by aurora B regulates completion of cytokinesis. *Curr Biol* 15, 778-786
44. Mishima, M., Pavicic, V., Gruneberg, U., Nigg, E. A., and Glotzer, M. (2004) Cell cycle regulation of central spindle assembly. *Nature* 430, 908-913
45. Hagemann, N., Ackermann, N., Christmann, J., Brier, S., Yu, F., and Erdmann, K. S. (2013) The serologically defined colon cancer antigen-3 interacts with the protein tyrosine phosphatase PTPN13 and is involved in the regulation of cytokinesis. *Oncogene* 32, 4602-4613
46. Wolf, A., Keil, R., Gotzl, O., Mun, A., Schwarze, K., Lederer, M., Huttelmaier, S., and Hatzfeld, M. (2006) The armadillo protein p0071 regulates Rho signalling during cytokinesis. *Nat Cell Biol* 8, 1432-1440
47. Abdallah, A. M., Zhou, X., Kim, C., Shah, K. K., Hogden, C., Schoenherr, J. A., Clemens, J. C., and Chang, H. C. (2013) Activated Cdc42 kinase regulates Dock localization in male germ cells during Drosophila spermatogenesis. *Dev Biol* 378, 141-153
48. Hime, G. R., Brill, J. A., and Fuller, M. T. (1996) Assembly of ring canals in the male germ line from structural components of the contractile ring. *J Cell Sci* 109 ( Pt 12), 2779-2788
49. Caron, D., Byrne, D. P., Thebault, P., Soulet, D., Landry, C. R., Eyers, P. A., and Elowe, S. (2016) Mitotic phosphotyrosine network analysis reveals that tyrosine phosphorylation regulates Polo-like kinase 1 (PLK1). *Sci Signal* 9, rs14
50. Elowe, S. (2017) Tyr(less) kinase signaling during mitosis. *Cell Cycle* 16, 746-748

51. St-Denis, N., Gupta, G. D., Lin, Z. Y., Gonzalez-Badillo, B., Veri, A. O., Knight, J. D. R., Rajendran, D., Couzens, A. L., Currie, K. W., Tkach, J. M., Cheung, S. W. T., Pelletier, L., and Gingras, A. C. (2016) Phenotypic and Interaction Profiling of the Human Phosphatases Identifies Diverse Mitotic Regulators. *Cell Rep* 17, 2488-2501
52. Ng, M. M., Chang, F., and Burgess, D. R. (2005) Movement of membrane domains and requirement of membrane signaling molecules for cytokinesis. *Dev Cell* 9, 781-790
53. Chen, S., and Tang, D. D. (2014) c-Abl tyrosine kinase regulates cytokinesis of human airway smooth muscle cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 50, 1076-1083
54. Kasahara, K., Nakayama, Y., Nakazato, Y., Ikeda, K., Kuga, T., and Yamaguchi, N. (2007) Src signaling regulates completion of abscission in cytokinesis through ERK/MAPK activation at the midbody. *J Biol Chem* 282, 5327-5339
55. Soeda, S., Nakayama, Y., Honda, T., Aoki, A., Tamura, N., Abe, K., Fukumoto, Y., and Yamaguchi, N. (2013) v-Src causes delocalization of Mklp1, Aurora B, and INCENP from the spindle midzone during cytokinesis failure. *Exp Cell Res* 319, 1382-1397
56. Angers-Loustau, A., Cote, J. F., Charest, A., Dowbenko, D., Spencer, S., Lasky, L. A., and Tremblay, M. L. (1999) Protein tyrosine phosphatase-PEST regulates focal adhesion disassembly, migration, and cytokinesis in fibroblasts. *J Cell Biol* 144, 1019-1031
57. Herrmann, L., Dittmar, T., and Erdmann, K. S. (2003) The protein tyrosine phosphatase PTP-BL associates with the midbody and is involved in the regulation of cytokinesis. *Mol Biol Cell* 14, 230-240
58. Jungas, T., Perchey, R. T., Fawal, M., Callot, C., Froment, C., Burlet-Schiltz, O., Besson, A., and Davy, A. (2016) Eph-mediated tyrosine phosphorylation of citron kinase controls abscission. *J Cell Biol* 214, 555-569
59. Holland, S. J., Gale, N. W., Gish, G. D., Roth, R. A., Songyang, Z., Cantley, L. C., Henkemeyer, M., Yancopoulos, G. D., and Pawson, T. (1997) Juxtamembrane tyrosine residues couple the Eph family receptor EphB2/Nuk to specific SH2 domain proteins in neuronal cells. *Embo J* 16, 3877-3888
60. Bisson, N., Tremblay, M., Robinson, F., Kaplan, D. R., Trusko, S. P., and Moss, T. (2008) Mice lacking both mixed-lineage kinase genes *Mlk1* and *Mlk2* retain a wild type phenotype. *Cell Cycle* 7, 909-916
61. Ma, H. T., and Poon, R. Y. (2017) Synchronization of HeLa Cells. *Methods Mol Biol* 1524, 189-201
62. Beigbeder, A., Chartier, F. J. M., and Bisson, N. (2017) MPZL1 forms a signalling complex with GRB2 adaptor and PTPN11 phosphatase in HER2-positive breast cancer cells. *Sci Rep* 7, 11514



63. Yamaguchi, T., Goto, H., Yokoyama, T., Sillje, H., Hanisch, A., Uldschmid, A., Takai, Y., Oguri, T., Nigg, E. A., and Inagaki, M. (2005) Phosphorylation by Cdk1 induces Plk1-mediated vimentin phosphorylation during mitosis. *J Cell Biol* 171, 431-436
64. Beigbeder, A., Velot, L., James, D. A., and Bisson, N. (2016) Sample Preparation for Mass Spectrometry Analysis of Protein-Protein Interactions in Cancer Cell Lines and Tissues. *Methods Mol Biol* 1458, 339-347
65. Keller, A., Nesvizhskii, A. I., Kolker, E., and Aebersold, R. (2002) Empirical statistical model to estimate the accuracy of peptide identifications made by MS/MS and database search. *Anal Chem* 74, 5383-5392
66. Nesvizhskii, A. I., Keller, A., Kolker, E., and Aebersold, R. (2003) A statistical model for identifying proteins by tandem mass spectrometry. *Anal Chem* 75, 4646-4658
67. Vizcaino, J. A., Csordas, A., del-Toro, N., Dianes, J. A., Griss, J., Lavidas, I., Mayer, G., Perez-Riverol, Y., Reisinger, F., Ternent, T., Xu, Q. W., Wang, R., and Hermjakob, H. (2016) 2016 update of the PRIDE database and its related tools. *Nucleic Acids Res* 44, D447-456

## 2.9 Supplementary information

### Contents

#### Disponible dans ce document :

**Figure 2.S.1 :** Validation of the expression and localisation of Flag-NCK1/2 or Flag-BirA\*-NCK1/2 in HEK293T cells.

**Figure 2.S.2 :** NCK2-depleted 293T cells are multi-nucleated and display long protrusions.

**Figure 2.S.3 :** Cytokinesis delay and abscission failure in Nck2<sup>-/-</sup> cells.

**Figure 2.S.4 :** NCK2-depleted 293T cells fail to complete abscission.

**Figure 2.S.5:** ECT2 cytokinesis localization is altered in Nck2<sup>-/-</sup> cells.

#### À télécharger sur <http://www.mcponline.org> :

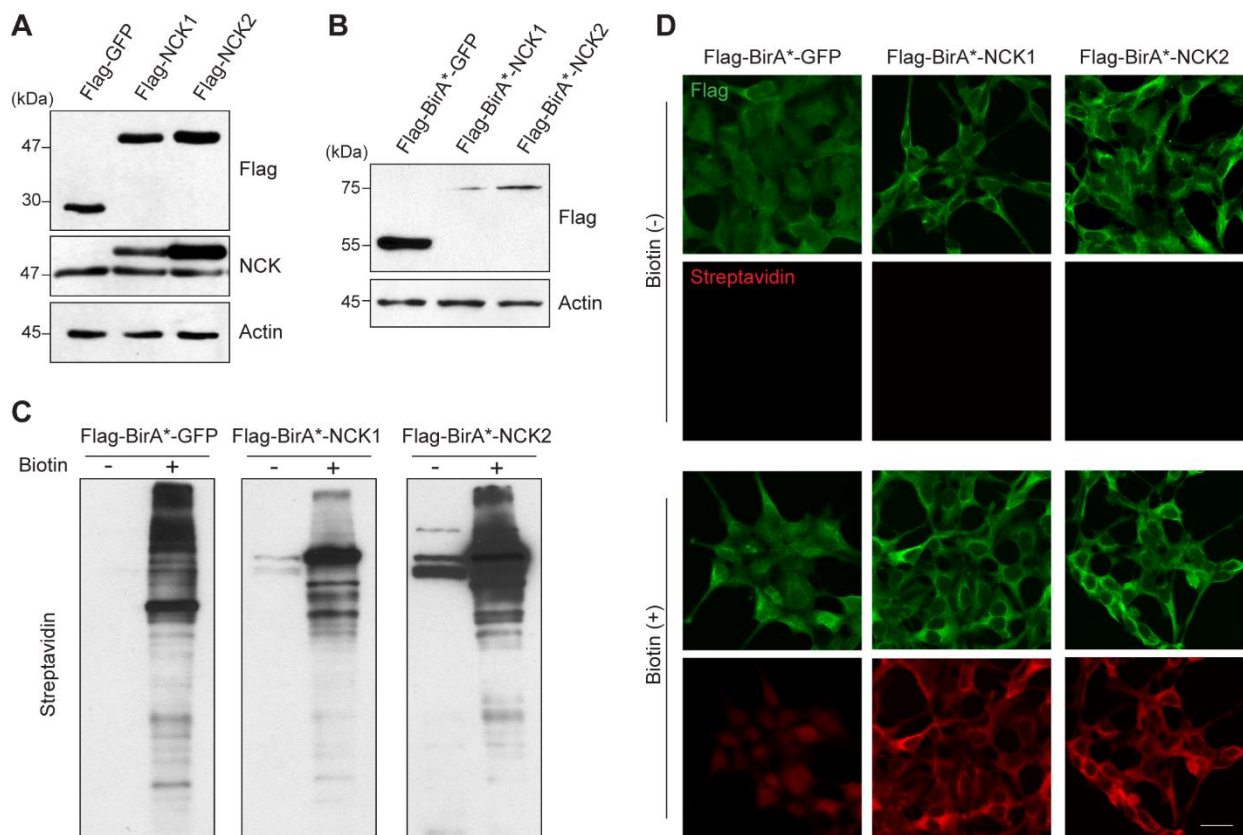
**Table S1 :** List of AP-MS and BioID experiments, controls and sample files (Excel document).

**Table S2 :** AP-MS: identified peptides and proteins (Excel document).

**Table S3 :** BioID: identified peptides and proteins (Excel document).

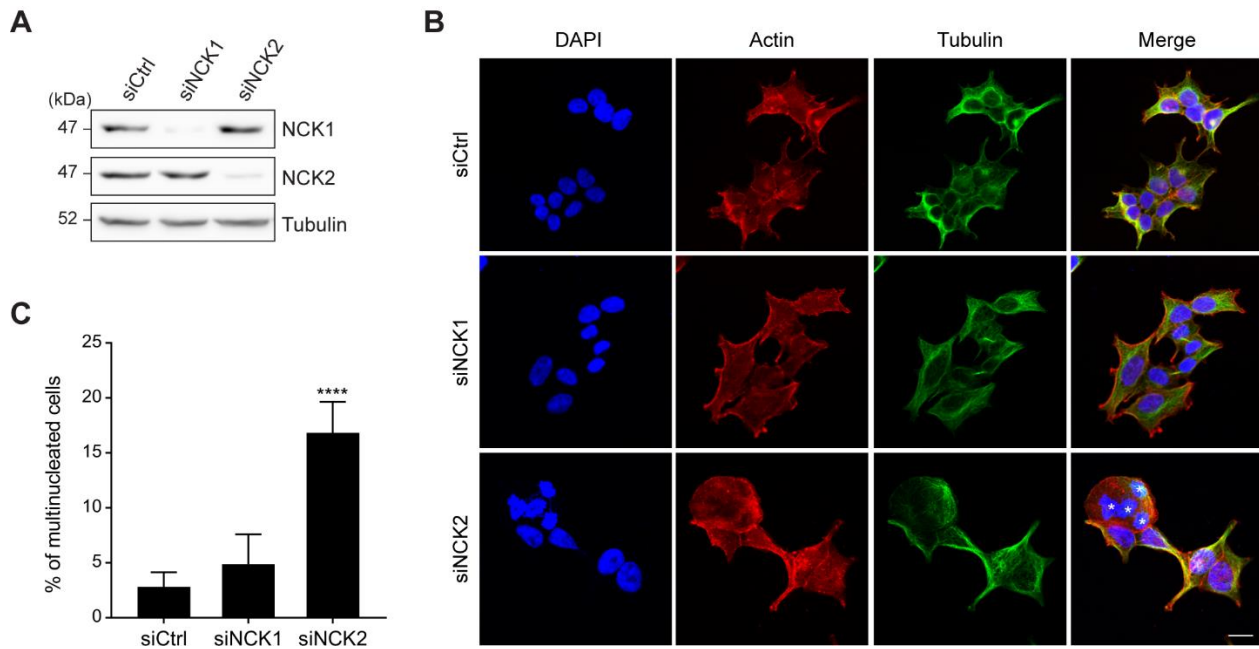
#### À télécharger sur <http://www.proteomexchange.org> :

Data availability: The mass spectrometry proteomics data have been deposited to the ProteomeXchange Consortium via the PRIDE partner repository, with the dataset identifier PXD008824.



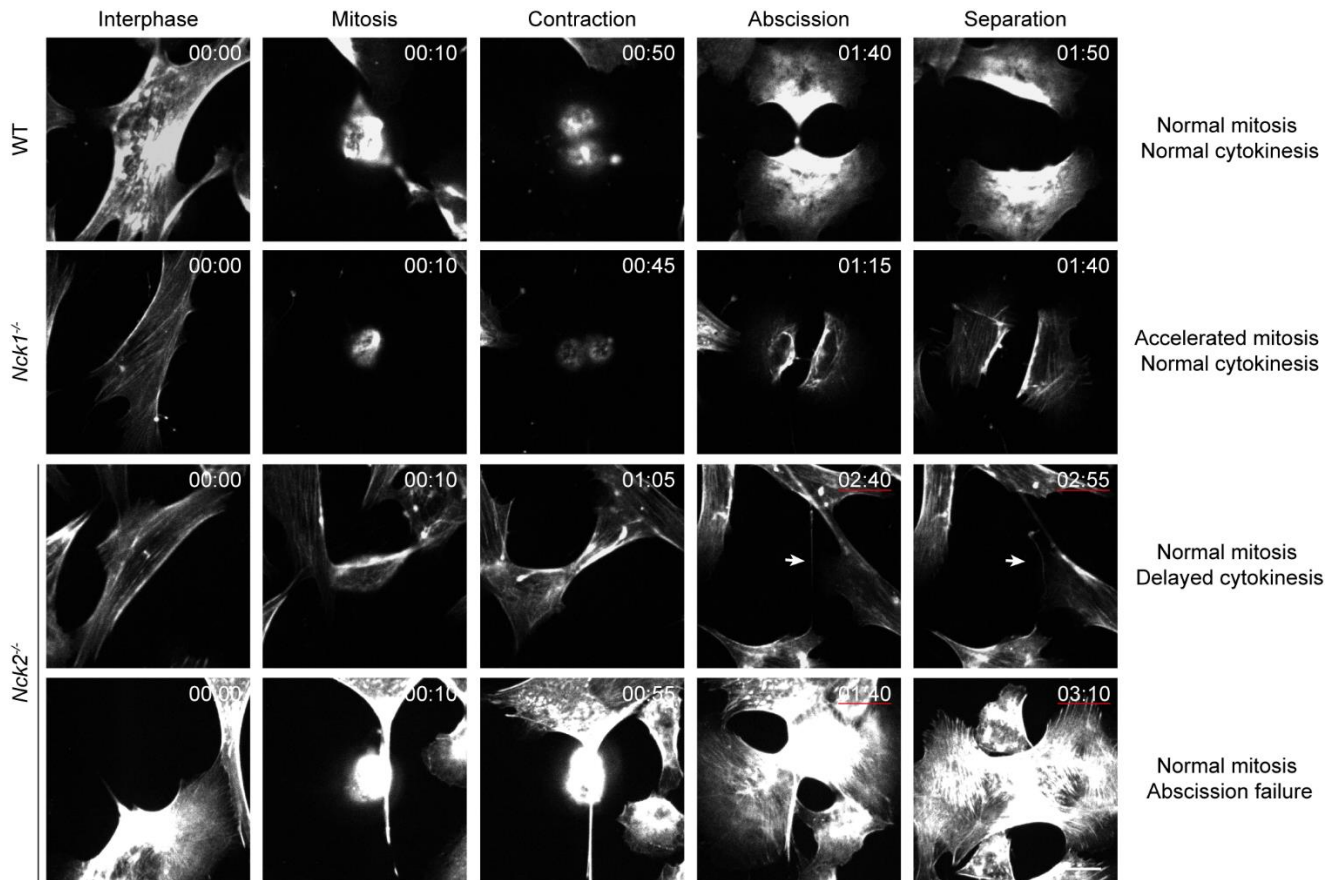
**Figure 2.S. 1 : Validation of the expression and localisation of Flag-NCK1/2 or Flag-BirA\*-NCK1/2 in HEK293 cells.**

(A) HEK293T cells stably expressing Flag-GFP (control), Flag-NCK1 or Flag-NCK2 were analyzed by Western blotting to compare exogenous Flag-NCK1/2 protein expression to endogenous NCK1/2. (B) Flp-In T-REx HEK293 cells stably expressing Flag-BirA\*-GFP (control), Flag-BirA\*-NCK1 or Flag-BirA\*-NCK2 were analyzed by Western blotting to confirm protein expression. (C) Biotinylation assay to validate BirA\* activity of the GFP and NCK1/2 chimeras. (D) Validation of the subcellular localization and biotinylation activity of the FlagBirA\* constructs (scale bar: 20  $\mu$ m).



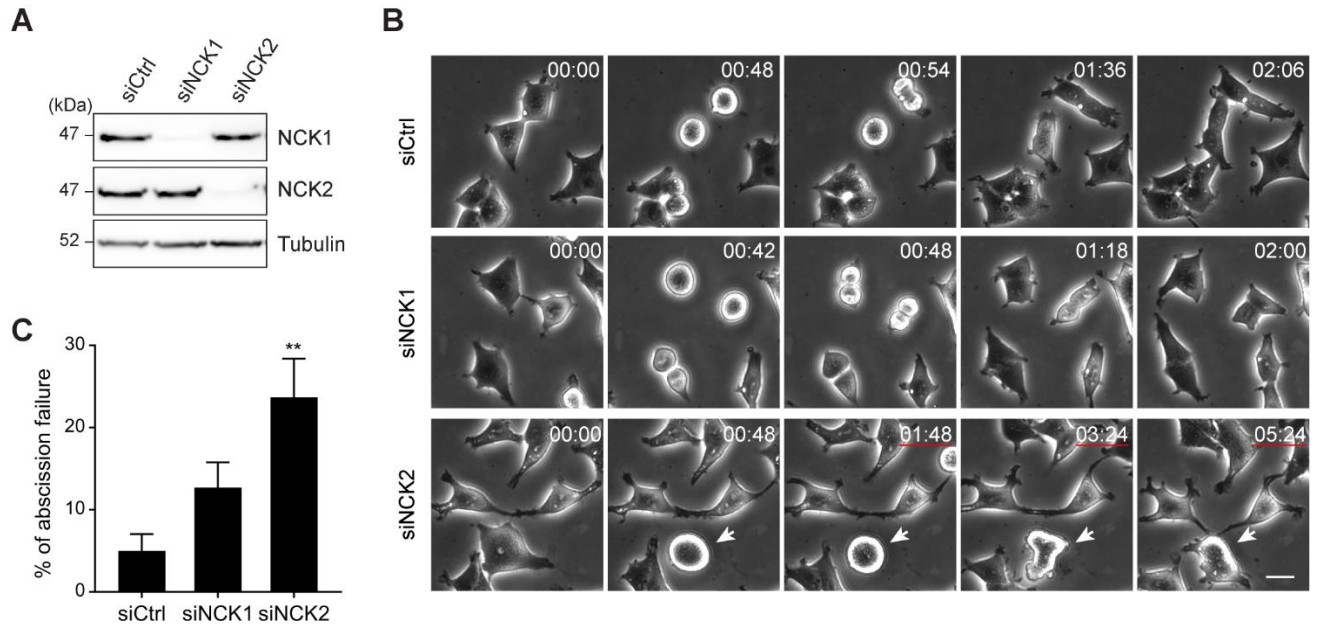
**Figure 2.S. 2 : NCK2-depleted HEK293T cells are multi-nucleated and display long protrusions.**

(A) Endogenous NCK1- and NCK2-depleted 293T cells were analyzed by Western blot to confirm NCK1/2 protein depletion. (B) Control, siNCK1 and siNCK2 transfected 293T cells were analyzed by immunofluorescence for actin (red), tubulin (green) and DAPI (blue) to assess cellular morphology. Multi-nucleation is indicated with asterisks. Representative images are presented (scale bar: 20  $\mu$ m). (C) The penetrance of the multi-nucleation phenotype was calculated for each condition. Mean values and standard deviation from four independent experiments with >90 cells each are presented (siCtrl, n=308; siNCK1, n=435; siNCK2, n=372) (\*\*\*\*  $p \leq 0.0001$ ; Fisher's exact test).



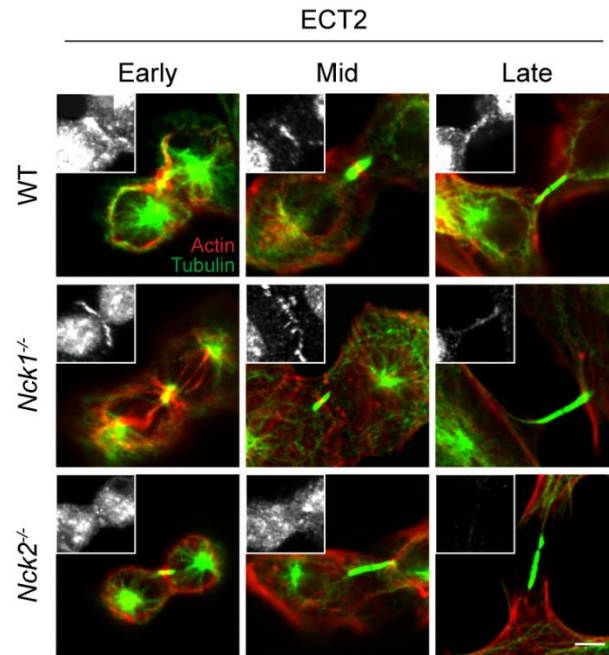
**Figure 2.S. 3 : Cytokinesis delay and abscission failure in *Nck2*<sup>-/-</sup> cells.**

Wild-type, *Nck1*<sup>-/-</sup> and *Nck2*<sup>-/-</sup> MEFs were stained with SIR-ACTIN and analyzed by live imaging. Images were taken every 5 minutes for 24 hours. Representative images from 3 experiments are presented (scale bar: 20 μm).



**Figure 2.S. 4 : NCK2-depleted 293T cells fail to complete abscission.**

(A) Endogenous NCK1- and NCK2-depleted 293T cells were analyzed by Western blot to confirm NCK1/2 protein depletion. (B) Control, siNCK1 and siNCK2 transfected 293T cells were analyzed by live cell imaging. Images were taken every 5 minutes for 24 hours. Representative images from 3 experiments are presented (scale bar: 20  $\mu$ m). Abscission failure is indicated with arrows. (C) Average abscission failure was calculated for each condition, from 2 independent experiments with >30 cells each (siCtrl, n=87; siNCK1, n=123; siNCK2, n=119) (\*\* $p \leq 0.01$ ; Fisher's exact test).



**Figure 2.S. 5 : ECT2 cytokinesis localization is altered in *Nck2*<sup>-/-</sup> cells.**

Wild-type, *Nck1*<sup>-/-</sup> and *Nck2*<sup>-/-</sup> MEFs were fixed at different stages of cytokinesis and analyzed by immunofluorescence for actin (red), tubulin (green), and ECT2 (insert). Representative images from four experiments are shown (scale bar: 5  $\mu$ m).

## **Chapitre 3 : Étude de la spécificité biochimique des protéines adaptatrices NCK1 et NCK2**

Tel que présenté auparavant, les protéines NCK1 et NCK2 sont impliquées dans le contrôle et la régulation de nombreuses fonctions cellulaires telles le remodelage du cytosquelette d'actine, le stress du RE ou encore la détection des dommages à l'ADN (Labelle-Côté and Larose, 2011). De nombreuses études ont par ailleurs suggéré que les fonctions de NCK1 et NCK2 sont majoritairement redondantes (Buday, Wunderlich and Tamás, 2002; Bladt *et al.*, 2003) et que les propriétés de certains de leurs domaines SH2 et SH3 semblent virtuellement indistinguables (Frese *et al.*, 2006). *A contrario*, plusieurs études ont identifié des partenaires spécifiques et des fonctions uniques pour chaque NCK (Cowan and Henkemeyer, 2001; Bisson *et al.*, 2007; Guan *et al.*, 2009; Ngoenkam *et al.*, 2014). De plus, l'expression tissulaire différentielle entre NCK1 et NCK2 combinée à l'apparition et la conservation des deux gènes NCK à la base des vertébrés argumente en faveur de l'existence de fonctions spécifiques pour chacune de ces protéines (Chen *et al.*, 1998; Braverman and Quilliam, 1999).

Afin d'étudier la spécificité biochimique des protéines adaptatrices NCK1 et NCK2, j'ai compilé l'ensemble de mes résultats de MS obtenus en cellules HEK293T (2.5.1 et 3.1), sélectionné un certain nombre de partenaires NCK1 et NCK2 spécifiques (3.2.1) puis validé ces interactions par une méthode orthogonale (3.2.2). J'ai finalement choisi l'interacteur PKP4 comme modèle pour tenter d'identifier les déterminants moléculaires responsables de cette spécificité (3.3 et 3.4).

### **3.1 Création d'un réseau d'interaction pour les protéines adaptatrices NCK1 et NCK2**

Afin d'obtenir le maximum de visibilité sur les interacteurs potentiels de NCK1 et NCK2, j'ai rassemblé toutes mes données de MS obtenues en cellules HEK293T. Pour cela, j'ai combiné les données présentées en chapitre 2 (Fig. 2.1) avec les données issues d'une série

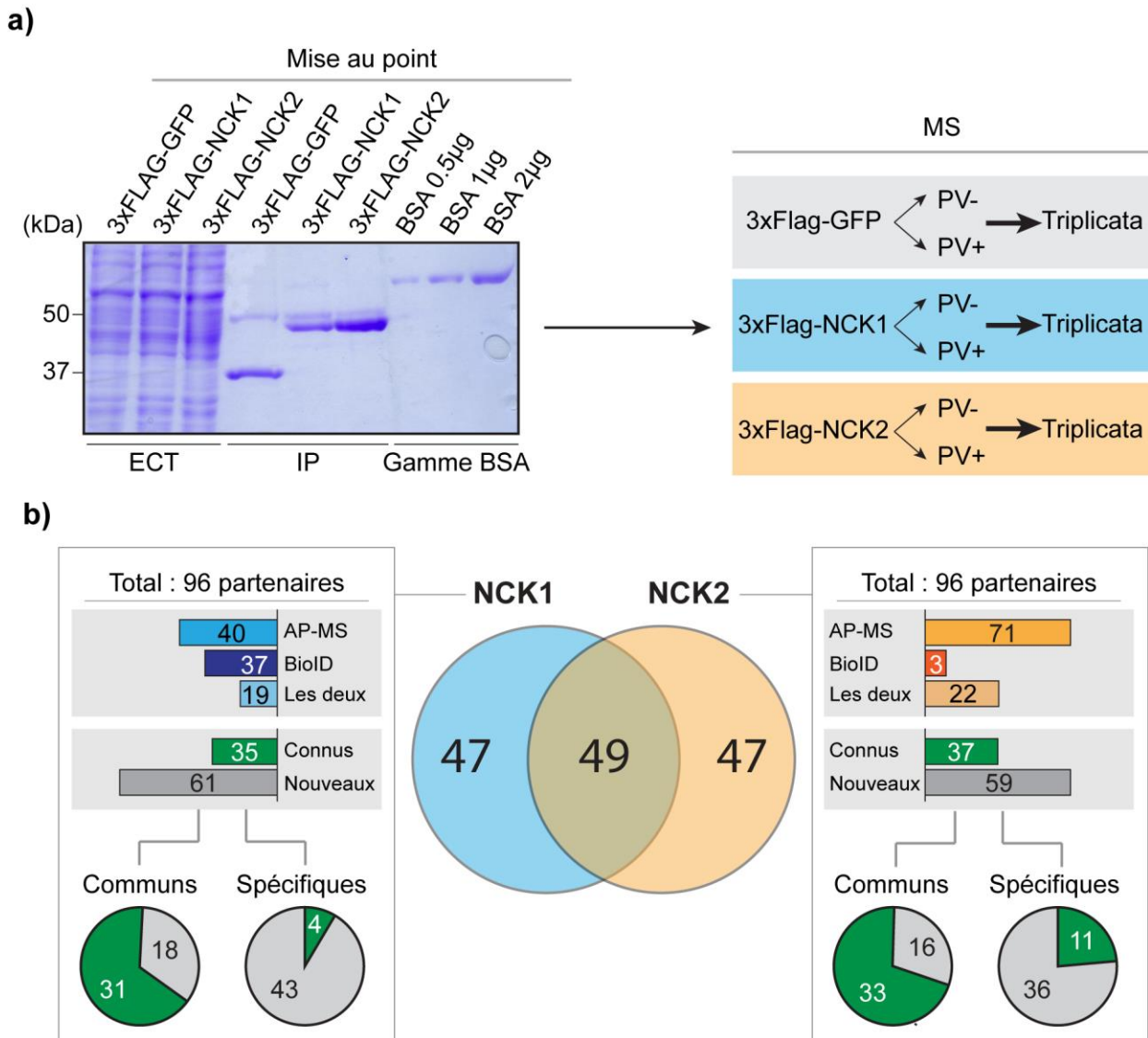


d'expériences réalisées en triplicata au début de mon doctorat dans des cellules HEK293T transfectées transitoirement.

Brièvement, lors de cette série initiale d'expériences, j'ai défini les quantités adéquates de cellules à utiliser permettant une immunoprécipitation suffisante de protéine appât. L'utilisation d'environ 20 millions de cellules par condition, soit 2 pétris de 10 cm m'a permis d'immunoprécipiter plus de 1 µg de protéine appât, quantité normalement désirée pour effectuer ces expériences dans des conditions optimales (Fig 3.1a). Chacune des expériences de MS conduite en triplicata avec des cellules traitées ou non au PV a ensuite été analysée avec l'algorithme SAINT (Choi *et al.*, 2011, 2012). Tel que mentionné en chapitre 2, j'ai également fixé un seuil de probabilité à 0.9 et rejeté tous les partenaires avec un score strictement inférieur à ce palier. Après analyse, j'ai combiné l'ensemble de mes données de MS puis j'ai recensé manuellement tous les partenaires de NCK1/2 précédemment rapportées dans la banque de données BioGRID, une des banques d'interaction protéine-protéine les plus complètes disponibles à ce jour (Chatr-Aryamontri *et al.*, 2017).

La combinaison de l'ensemble de ces données de MS m'a permis de compléter les interactomes respectifs de chaque NCK en révélant un total de 143 partenaires s'associant avec NCK1/2 (Fig. 3.1b et tableau 3.1). Parmi ceux-ci, 47 apparaissent comme étant NCK1 ou NCK2 spécifiques tandis que 49 semblent communs aux deux NCK. J'ai constaté que plus de 65% des partenaires communs détectés (31/49 et 33/49 pour respectivement NCK1 et NCK2) correspondent à des interacteurs connus de NCK1/2 toujours selon BioGRID (Chatr-Aryamontri *et al.*, 2017).

L'ensemble des partenaires identifiés récapitule fidèlement les grandes fonctions régulées par NCK1/2 telles le contrôle de la traduction, le remodelage du cytosquelette d'actine ou encore la régulation des jonctions cellulaires (Labelle-Côté and Larose, 2011).



**Figure 3. 1 : La caractérisation des interactomes des protéines NCK1 et NCK2 a révélé des interacteurs spécifiques pour chacun de ces adaptateurs.**

**a)** Plan expérimental et contrôle de la quantité de protéines appâts immunoprécipitées. La quantité totale de chaque protéine appât immunoprécipitée avec 2 pétris 10cm de cellules HEK293T transféctées transitoirement a été contrôlée par Coomassie. ECT : Extrait cellulaire total, IP : Immunoprécipitation, BSA : *Bovine serum albumin*. **b)** Diagramme de Venn offrant une comparaison entre les interactomes de NCK1 et NCK2 générés après compilation de l'ensemble des données d'AP-MS obtenues en cellules HEK293T. Le nombre de partenaires recensés pour chaque catégorie (NCK1 spécifique, commun, NCK2 spécifique) est indiqué. Les compositions respectives de chaque interactome sont précisées.

De plus, certains partenaires recensés NCK2 spécifiques dans la littérature et évoqués en introduction tels le récepteur ROBO1 (Round and Sun, 2011), EFN1 (Cowan and

Henkemeyer, 2001) ou PXN (Cowan and Henkemeyer, 2001) ont aussi été détectés spécifiques à NCK2 dans mes essais (Tableau 3.1). La combinaison de ces approches de protéomique m'a également permis d'identifier un total de 43 nouveaux partenaires NCK1 spécifiques ainsi que 36 partenaires NCK2 spécifiques jamais rapportés dans la littérature (Tableau 3.1).

**Tableau 3. 1 : Récapitulatif de l'ensemble des partenaires de NCK1 et NCK2 identifiés par AP-MS et BioID.** Les partenaires recensés dans la banque de données BioGRID en date du 1<sup>er</sup> janvier 2014 ont été indiqués en vert (Chatr-Aryamontri et al., 2017). Les partenaires NCK1/2 communs ont été indiqués avec un astérisque (\*).

NCK1				NCK2							
AP-MS		BioID		AP-MS et BioID		AP-MS		BioID		AP-MS et BioID	
ARAP1*	PRMT5*	ABI1*	NSA2	ARHGGEF6*	ACTB	EML1	PTPN11	MAP4K4*	ABI1*		
ARHGAP39*	PRPF31	ARHGAP32	OCRL	ARHGGEF7*	ACTC1	EML4*	PTPN18	SEMA6D*	ARHGGEF7*		
ARHGGEF10*	RIOK1	ARHGGEF5	PEAK1*	BCAR3*	ADGRL2	ENAH*	PXN	SH3GLB2*	CHN1*		
BCAR1*	RPL21	ASAP1	PRKDC	CHN1*	AFAP1L1	FCHSD2*	RASA1				CYFIP2*
BLOC1S2	RPS2	BICD2	PTPN12*	FAM83H*	ARAP1*	G3BP1	RBM15				FAM83H*
C11orf84	SH3PXD2A*	BRK1*	RAPH1*	GIT1*	ARHGAP39*	GAB1	RNF219				GIT1*
CHN2	SHF	CBL*	RINL	GIT2*	ARHGGEF10*	GIT2*	ROBO1				KIAA1522*
CLNS1A	SNRPB	CDK5	SEMA6D*	KIAA1522*	ARHGGEF6*	GRB2	SCARF2				NHSL1*
DBNL*	SNRPD1	CSNK1E	SH3BP2	NHSL1*	ASAP2	HIST1H1C	SFPQ				PAK1*
DKFZp686E2	SNRPD2	CYFIP2*	SH3GLB2*	PAK1*	BCAR1*	HNRNPK*	SH3PXD2A*				PIK3AP1*
DOK1*	SNRPD3	ENAH*	SHROOM3	PIK3AP1*	BCAR3*	HSPA5	SHC1				PTPN12*
EIF4B	SPIN1	GNL3	SORBS1	SEMA6A*	BRK1*	HSPA9	SYNJ1*				RAPH1*
EML4*	STK38L	IRAK1	SYNJ1*	SH3PXD2B*	CBL*	IRS4	TAOK2				SEMA6A*
FCHSD2*	TEAD3	ITSN1	TOMM22	SHB*	CBLB	KHDRBS1	TJP1				SH3PXD2B*
HNRNPH1	THRAP3	KIAA1217	TTC28*	SOS1*	CDC42	MLLT4*	TNK2*				SHB*
HNRNPK*	TNK2*	LPHN2	WDR44*	TNIK*	CPSF5	NCKAP1	TOLLIP				SOS1*
IPO8	UBN2	MAP4K4*	WIPF3*	WASL*	CPSF6	NUDT21	USP6NL				TNIK*
MOB2	WDR77*	MINK1		WIPF1*	CPSF7	PAK2*	VASP				TTC28*
PAK2*	YBX1	MLLT4*		WIPF2*	CTTN	PDPK1	WASF1				WASL*
PPM1B	ZNF580	NHS			CYFIP1	PEAK1*	WASF2				WIPF1*
					DBNL*	PKP4	WASPIP				WIPF2*
					DDX17	PRMT5*	WDR44*				WIPF3*
					DOK1*	PRRC2A	WDR77*				
					EFNB1	PSTPIP2					

En somme, la combinaison de l'ensemble de mes expériences de MS en cellules HEK293T a permis de dévoiler le premier interactome de haute confiance pour les protéines adaptatrices NCK1 et NCK2, révélant un nombre important de partenaires spécifiques à chacune. Ces données m'ont permis de suggérer que la différence de spécificité entre NCK1 et NCK2 ne repose pas uniquement sur des interactions communes de différentes affinités, mais bien sur l'existence d'interactions exclusives à chaque NCK.

## **3.2 Validation et identification de partenaires directs pour chaque protéine NCK**

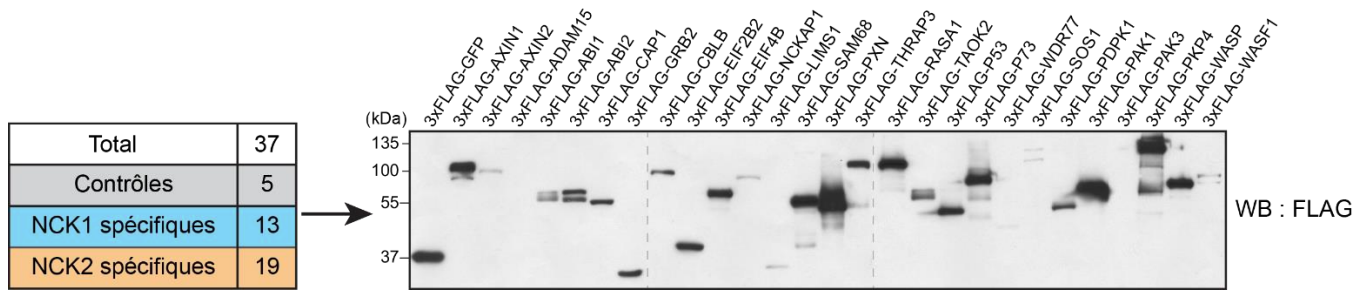
Afin de poursuivre l'étude de la spécificité des protéines adaptatrices NCK1/2 et l'identification des déterminants moléculaires responsables de cette spécificité, la deuxième étape était, sur la base de mes résultats de MS, de sélectionner un certain nombre de partenaires spécifiques pour chaque NCK, de valider par une méthode orthogonale ces interactions tout en définissant parmi celles-ci lesquelles surviennent de manière directe.

### **3.2.1 Validation par une méthode orthogonale des interactions spécifiques ou communes identifiées en MS**

À l'appui des résultats de MS et de données disponibles dans le laboratoire, j'ai initialement sélectionné 37 partenaires pour poursuivre mes études (Tableau 3.2). Parmi ceux-ci, j'ai inclus plusieurs contrôles positifs correspondant à des interactions bien documentées de NCK1/2 telles WASP (Rivero-Lezcano *et al.*, 1995) ou PAK1 (Bokoch *et al.*, 1996) ainsi que le maximum de partenaires NCK1 ou NCK2 spécifiques. J'ai ensuite complété cette liste en incluant quelques partenaires spécifiques à NCK2 décrits dans la littérature mais non retrouvés dans mes essais tels AXIN1 ou PAK3 (Cowan and Henkemeyer, 2001; Thévenot *et al.*, 2011). De plus, sur la base des études évoquant les fonctions nucléaires de NCK1/2 (Kremer, Adang and Macara, 2007; Errington and Macara, 2013), ainsi que des résultats préliminaires démontrant que les protéines P53 et P73 seraient respectivement des partenaires NCK1 et NCK2 spécifiques (données non incluses), j'ai également ajouté ces deux protéines dans ma liste initiale. Finalement, j'ai inclus les protéines SAM68 et RASA1 détectées NCK2 spécifiques dans mes essais de MS mais respectivement rapportées commune et NCK1-spécifique dans la littérature (Ger, Zitkus and Valius, 2011; Asbach *et al.*, 2012). J'ai ensuite exprimé chacune de ces protéines avec une étiquette 3xFLAG afin de valider leurs interactions avec NCK1 et/ou NCK2.

**Tableau 3. 2 : Tableau cataloguant les 37 partenaires initialement sélectionnés pour le suivi.** Chaque fonction cellulaire principalement régulée par chacune de ces protéines et annotée dans la banque de données UniProt est indiquée (Bateman et al., 2017).

	Nom	Rôle(s) ou fonction(s) cellulaire(s) régulée(s) d'après UniProt
<b>Contrôles</b>	GFP	Contrôle négatif
	PAK1	Sérine/Thréonine kinase, remodelage du cytosquelette d'actine
	SOS1	GEF pour la GTPase RAS
	WASL	Remodelage cytosquelette d'actine
	WDR77	Régulation des complexes d'épissage
<b>NCK1 spécifiques</b>	ADAM15	Métalloprotéinase régulant l'adhésion
	EIF2B2	GEF pour la GTPase EIF2, initiation de la traduction
	EIF4B	Initiation de la traduction
	MOB2	Régule l'activité de la kinase STK38L
	P53	Contrôle du cycle cellulaire, apoptose, etc.
	PPM1B	Phosphatase, contrôle du cycle cellulaire, voie NF-kappa-B
	RASA1	GAP pour la GTPase RAS
	SHF	Adaptateur, régule l'apoptose après activation du PDGFR
	SNRNPB	Ribonucléoprotéine impliquée dans l'épissage des ARNs
	SPIN1	Régulation de l'organisation de la chromatine
	STK38L	Interacteur de MOB2. Régule la différenciation et morphologie cellulaire
	TEAD3	Facteur de transcription. Régulateur de la voie Hippo
THRAP3	Épissage des arn pré-messagers	
<b>NCK2 spécifiques</b>	ABI1	Organisation du cytosquelette d'actine, prolifération, croissance
	ABI2	Organisation du cytosquelette d'actine, membre du complexe WAVE
	AXIN1	Interacteur de la bêta-caténine et régulateur de la voie Wnt
	AXIN2	Interacteur de la bêta-caténine et régulateur de la voie Wnt
	CAP1	Régulateur de la formation des filaments d'actine
	CBLB	Ubiquitine ligase, membre du complexe CBL
	CPSF6	Maturation des ARN pré-messagers
	GRB2	Protéine adaptatrice, régulateur de la voie RAS
	SAM68	Régulation du cycle cellulaire, de la stabilité et traduction des ARNm
	LIMS1	Adaptateur, régule l'adhésion en couplant intégrines et cytosquelette
	NCKAP1	Membre du complexe WAVE, régule le cytosquelette d'actine
	P73	Régulation de l'apoptose suite à des dommages à l'ADN
	PAK3	Sérine/Thréonine kinase, remodelage du cytosquelette d'actine
	PDPK1	Sérine/Thréonine kinase, contrôle la prolifération, survie, polymérisation d'actine
	PKP4	Régulation de la GTPase Rho, impliqué dans la cytokinèse et l'adhésion
	PXN	Couple cytosquelette d'actine et matrice extracellulaire
	RBM15	Épissage alternatif des ARNm
	TAOK2	Kinase régulant les dommages à l'ADN, l'apoptose, la voie p38 MAPK, etc.
WASF1	Membre du complexe WAVE régulant l'organisation des filaments d'actine	

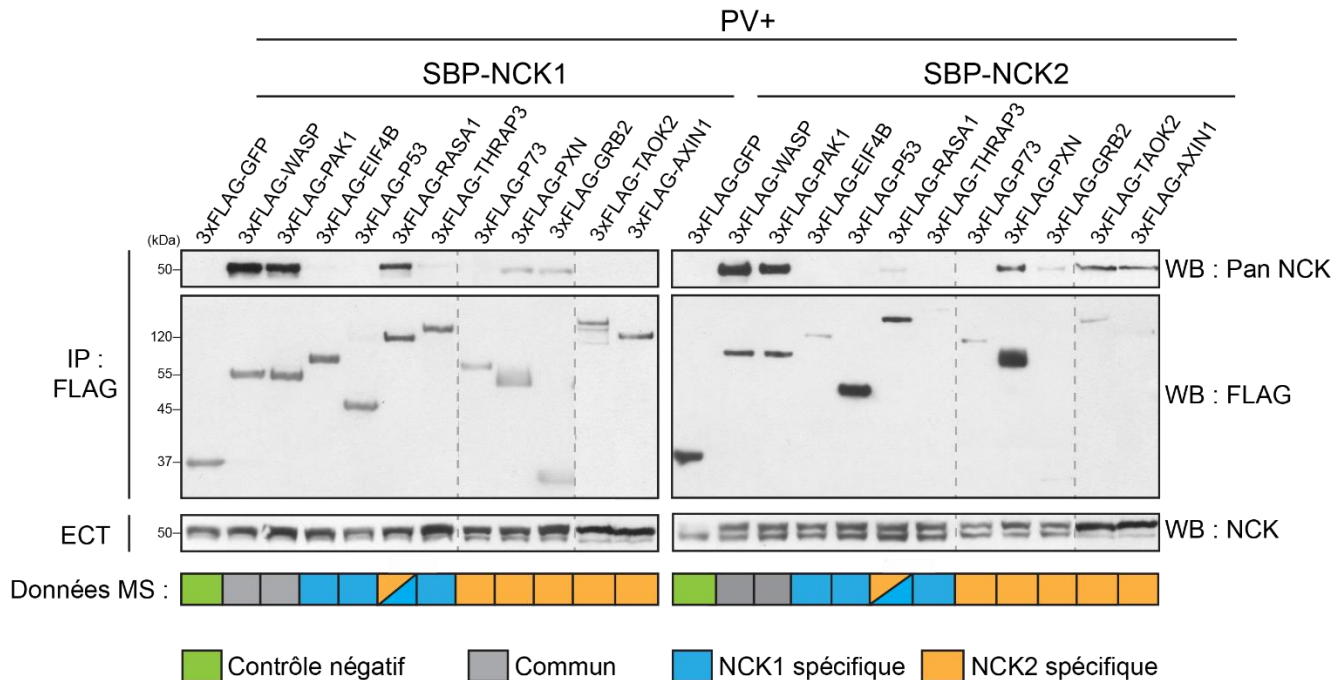


### Figure 3. 2 : Expression des partenaires sélectionnés.

Sur 37 partenaires initialement envisagés, 29 ont pu être clonés avec succès et 27 exprimés en cellules HEK293T. Seuls 3xFLAG-ADAM15 et 3xFLAG-PAK3 ne semblent pas exprimés. Le partenaire CPSF6, cloné et exprimé ultérieurement est absent de cette expérience.

Suite au clonage des partenaires précédemment sélectionnés, j'ai ensuite testé par une méthode orthogonale douze des interactions identifiées initialement. Pour cela j'ai co-exprimé individuellement ces partenaires avec NCK1 et NCK2, tous deux étiquetés avec le *Streptavidin-Binding Peptide* (SBP). Après traitement pervanadate (PV) permettant de maintenir actives dans la cellule les phosphorylations sur tyrosine, j'ai effectué des immunoprécipitations et visualisé les différentes interactions par immunobuvardage. Tel qu'attendu NCK1/2 s'associent avec WASP et PAK1, les deux partenaires communs utilisés comme contrôles (Fig. 3.3). De plus, j'ai pu confirmer 4 des 6 interactions attendues NCK2 spécifiques (PXN, GRB2, TAOK2 et AXIN1). En revanche, seule l'interaction NCK1 spécifique THRAP3 a pu être validée. L'interacteur RASA1, supposément NCK2 spécifique d'après mes essais de MS, mais rapporté NCK1 spécifique dans la littérature semble interagir spécifiquement avec NCK1 (Ger, Zitkus and Valius, 2011). Finalement, l'utilisation d'un anticorps reconnaissant simultanément NCK1 et NCK2 ('Pan NCK') ne m'a pas permis de conclure sur la présence de bandes de plus faible poids moléculaire détectées dans les pistes NCK1-PXN, NCK1-GRB2 et NCK2-RASA1, pouvant correspondre à NCK1 et/ou NCK2 endogènes.

En conclusion, l'utilisation d'une méthode orthogonale m'a permis de confirmer 65% des interactions identifiées en MS (8 confirmées sur 12 testées) tandis qu'une minorité, non confirmée ou ne récapitulant pas le profil de spécificité précédemment observé n'a pas pu être validée.



### Figure 3.3 : Chaque NCK interagit avec un ou plusieurs partenaires spécifiques.

Sur 29 partenaires clonés avec une étiquette 3xFLAG, 12 ont été co-exprimés en cellules HEK293T avec SBP-NCK1 ou SBP-NCK2. Les partenaires 3xFLAG ont été immunoprécipités et chaque interaction a été détectée par immunobuvardage avec un anticorps Pan NCK (n=2). Afin de faciliter l'interprétation des résultats, les profils de spécificité obtenus en MS ont été récapitulés en dessous des immunobuvardages. RASA1 identifié NCK2 spécifique dans mes essais mais rapporté NCK1-spécifique dans la littérature est indiqué avec un carré divisé (Ger, Zitkus and Valius, 2011).

### 3.2.2 Identification d'interacteurs directs et spécifiques pour NCK1 et NCK2

Pour pleinement poursuivre l'exploration de la spécificité des protéines adaptatrices NCK1/2, j'ai ensuite cherché à identifier de manière systématique, parmi les partenaires obtenus, lesquels interagissent directement et spécifiquement avec NCK1 ou NCK2. Pour cela, j'ai conduit des essais de liaison *in vitro* avec NCK1/2 fusionnés à la Glutathione S-transférase (GST) produits en bactérie. J'ai utilisé comme appât chacun des 27 partenaires étiquetés 3xFLAG produit à l'aide d'un système de traduction *in vitro* à partir d'extraits de réticulocytes de lapin.

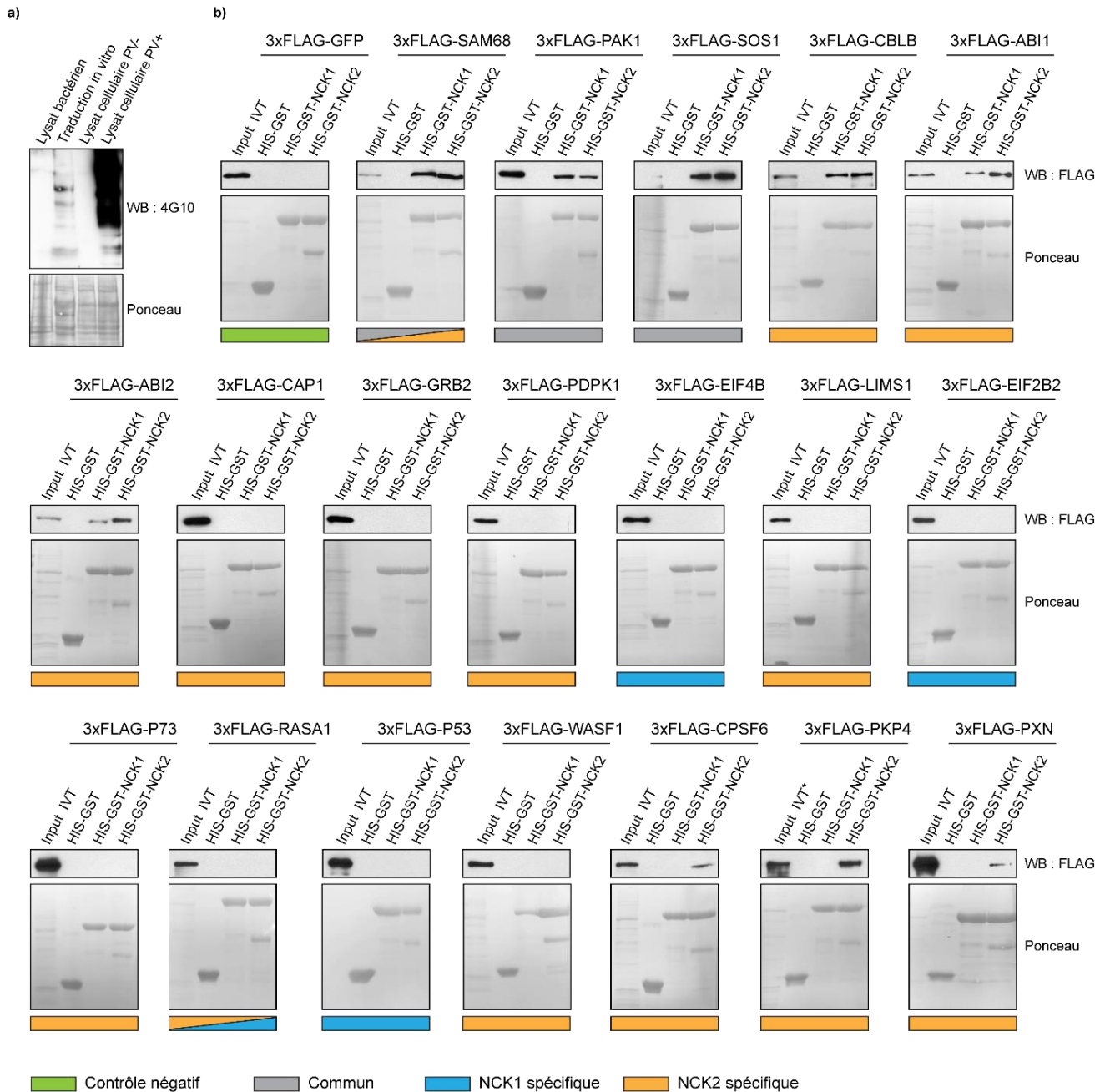
Premièrement, j'ai voulu confirmer la présence de phosphorylation sur tyrosines au sein de ce système *in vitro* afin de valider que cette approche permet les interactions de type SH2

dépendantes. Pour ce faire, j'ai comparé les niveaux de phosphorylation sur tyrosines à ceux d'un lysat bactérien utilisé comme contrôle négatif ainsi qu'à différents lysats cellulaires traités ou non au PV. L'utilisation d'un anticorps 4G10 reconnaissant largement les phosphorylations sur tyrosines m'a permis de visualiser cette modification post-traductionnelle. Tel que présenté en figure 3.4a, l'immunobuvardage 4G10 a révélé des niveaux de phosphotyrosines au sein du système significativement supérieurs aux contrôles négatifs, me confortant ainsi sur la validité de mon approche.

Après l'expression fructueuse de 20 des 27 partenaires, j'ai réalisé chacun des essais de liaison en triplicata (Fig. 3.4b). Mes observations les plus pertinentes sont les suivantes. Premièrement, aucune interaction n'a été détectée avec la moitié des partenaires (11/20). Cela suggère que ces partenaires interagissent de manière indirecte avec NCK1/2 et/ou que l'intermédiaire est absent des extraits. Il est aussi possible qu'une modification post-traductionnelle requise pour médier ces interactions telle une phosphorylation sur NCK1/2 produits en bactérie pourrait être manquante. Deuxièmement, en accord avec la littérature, les partenaires attendus communs aux deux NCK tels PAK1 et SOS1 interagissent en effet directement avec NCK1/2. Toutefois, plusieurs partenaires attendus NCK2-spécifiques tels ABI1, ABI2 ou CBLB ont été détectés comme interagissant avec NCK1 et NCK2. Troisièmement, le partenaire SAM68 identifié NCK2 spécifique dans mes essais de MS (Tableau 3.1), mais rapporté NCK1/2 commun dans la littérature apparaît aussi NCK1/2 commun dans cette expérience (Asbach *et al.*, 2012). Finalement, j'ai pu identifier 3 partenaires interagissant directement et spécifiquement avec NCK2 parmi lesquels sont retrouvés la PXN, un partenaire NCK2 spécifique déjà connu (Cowan and Henkemeyer, 2001), mais aussi CPSF6 et PKP4, deux nouveaux partenaires de NCK2.

Ainsi, l'ensemble de ces essais en accord avec la littérature m'a permis d'identifier 3 partenaires NCK2-spécifiques, dont deux nouveaux interacteurs potentiels avec lesquels j'ai décidé de poursuivre mes études.





**Figure 3. 4 : CPSF6, PXN et PPK4 interagissent directement et spécifiquement avec NCK2.**

**a)** Validation de la présence de tyrosines phosphorylées dans le système de traduction *in vitro*. La phosphorylation de l'ensemble d'une traduction *in vitro* a été comparée grâce à un anticorps 4G10 à différents contrôles tels un lysat bactérien et des lysats cellulaires traités ou non au PV.

**b)** Identification de partenaires interagissant directement et spécifiquement avec NCK1 ou NCK2. Les protéines GST-NCK1/2 ont été produites en bactérie tandis que chacun des 27 partenaires a été produit à l'aide d'un système de traduction *in vitro*. Après traduction fructueuse de 20 des 27 partenaires, chaque interaction a été testée en triplicata et détectée par immunobuvardage. Une expérience représentative pour chacun est montrée. GST seul et

3xFLAG-GFP ont été utilisés comme contrôles négatifs tandis que les protéines 3xFLAG-PAK1 et 3xFLAG-SOS1 ont été utilisées comme contrôles positifs. Afin de faciliter l'interprétation des résultats, les profils de spécificité obtenus en MS ont été récapitulés en dessous des immunobuvardages. Les protéines RASA1 et SAM68, identifiées NCK2-spécifiques dans mes essais, mais respectivement rapportées NCK1-spécifique ou NCK1/2 communs sont indiquées avec des carrés divisés (Ger, Zitkus and Valius, 2011; Asbach *et al.*, 2012).

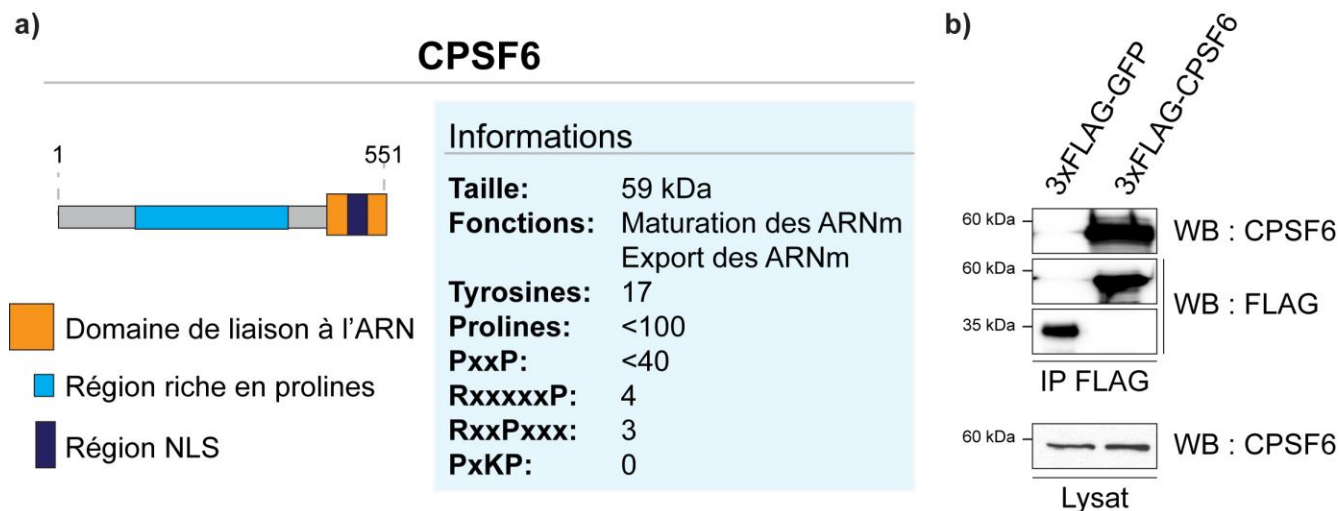
### **3.3 Caractérisation des interactions spécifiques de NCK2 avec PKP4 et CPSF6**

L'identification des protéines PKP4 et CPSF6 comme interacteurs directs et spécifiques de NCK2 m'a poussé à étudier simultanément ces partenaires. De plus, les propriétés de chacune de ces protéines ainsi que les fonctions biologiques qu'elles régulent pour lesquelles NCK2 n'a jamais été montré comme impliqué m'a motivé davantage à caractériser ces interactions.

#### **3.3.1 Étude de l'interaction NCK2-CPSF6**

##### **3.3.1.1 La protéine CPSF6**

La littérature sur CPSF6 suggère que cette petite protéine serait membre du *cleavage factor I complex* (Elkon, Ugalde and Agami, 2013), un complexe protéique impliqué dans la régulation de la polyadénylation des ARNm (Martin *et al.*, 2012). Également, les données disponibles suggèrent que CPSF6, via son interaction avec le récepteur *Nuclear RNA export factor 1* (NXF1) contrôlerait l'export nucléaire de certains ARNm (Ruepp *et al.*, 2009), mais pourrait aussi moduler la capacité d'infection du virus de l'immunodéficiência humaine et l'activation de la réponse immunitaire innée qui s'en suit (Lee *et al.*, 2010; Sowd *et al.*, 2016). Les quelques données et prédictions structurales relatives à CPSF6 suggèrent que cette protéine ne comporte dans sa partie C-terminale qu'un domaine de liaison à l'ARN et une séquence NLS, n'arbore que peu de tyrosines (17), et ne serait phosphorylée que sur deux thréonines à proximité l'une de l'autre (Cantin *et al.*, 2008; Mayya *et al.*, 2009). Finalement, l'analyse de la séquence primaire de CPSF6 a révélé un nombre important de régions riches en prolines (~40 régions) (Fig. 3.5a), suggérant que l'interaction NCK2-CPSF6 serait possiblement SH3 dépendante.



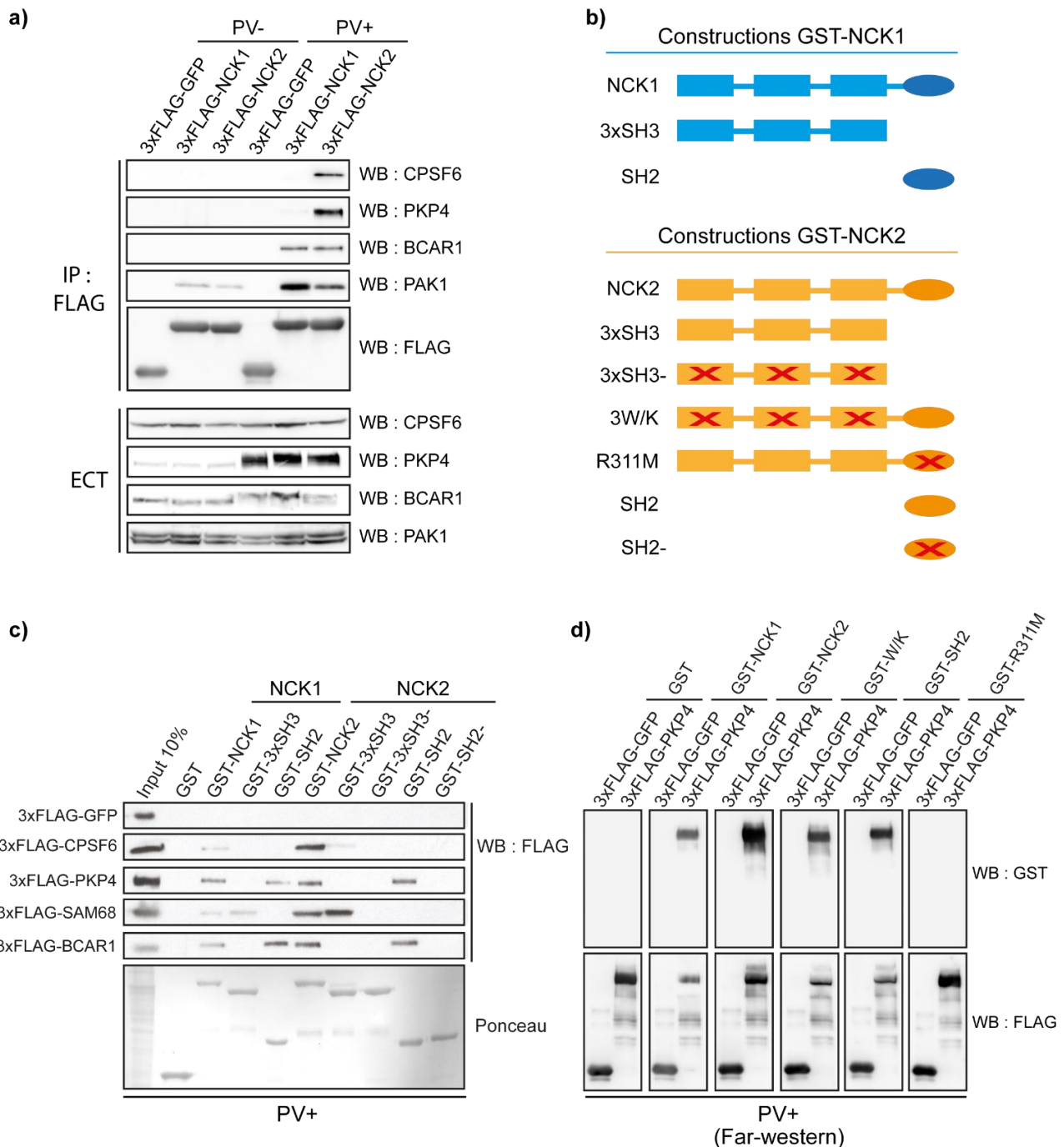
**Figure 3. 5 : Représentation schématique de la protéine CPSF6 et validation de son anticorps spécifique.**

**a)** Représentation schématique de la protéine CPSF6. Chaque région d'intérêt ou domaine est représenté et précisé. Les tailles, fonctions ainsi que le nombre de tyrosines et les principaux motifs SH3-consensus définis par Teyra et collaborateurs sont aussi indiqués (Teyra *et al.*, 2017). **b)** Validation d'un anticorps CPSF6-spécifique. Des cellules HEK293T ont été transfectées avec chacune des constructions 3xFLAG indiquées. Chaque construction 3xFLAG a été immunoprécipitée puis respectivement détectée à l'aide des différents anticorps indiqués.

### 3.3.1.2 Caractérisation de l'interaction spécifique NCK2-CPSF6

Premièrement, j'ai voulu valider l'interaction entre 3xFLAG-NCK2 et CPSF6 endogène. Pour cela, j'ai conduit des essais de co-immunoprécipitation entre NCK2 étiqueté 3xFLAG préalablement transfecté dans des cellules HEK293T et CPSF6 endogène. J'ai ensuite détecté l'interaction en utilisant l'anticorps dirigé contre CPSF6 précédemment validé (Fig. 3.5b). Tel qu'identifié en MS, CPSF6 endogène interagit spécifiquement avec NCK2 en présence de PV (Fig. 3.6a). Afin de déterminer le(s) domaine(s) de NCK2 requis pour médier cette interaction, j'ai ensuite cloné et purifié en bactéries différentes constructions de GST-NCK1/2 tronquées ou aux domaines SH2/SH3 invalidés (Fig. 3.6b). J'ai conduit des essais de liaison en combinant ces constructions avec des lysats de cellules HEK293T surexprimant 3xFLAG-CPSF6 préalablement traités au PV. Ces essais réalisés en triplicata ne m'ont pas permis de déterminer clairement le ou les domaines de NCK2 interagissant avec CPSF6 comme démontré par l'absence d'interaction convaincante dans chacune des conditions à l'exception de la piste NCK2 pleine longueur (Fig. 3.6c). L'ensemble de ces données combinée à la

publication concomitante d'un article de criblage protéomique à grande échelle confirmant l'interaction spécifique NCK2-CPSF6 m'a motivé à me concentrer sur l'interaction NCK2-PKP4 (Huttlin *et al.*, 2015).



**Figure 3. 6 : PKP4 interagit directement avec le domaine SH2 de NCK2.**

**a)** PKP4 et CPSF6 interagissent de manière spécifique avec NCK2 lors d'un traitement PV. Des cellules HEK293T ont été transfectées avec chacune des constructions 3xFLAG indiquées puis traitées ou non au PV avant la lyse. Chaque construction 3xFLAG a été immunoprécipitée et les

interactions entre ces dernières et les protéines d'intérêt endogènes ont été visualisées à l'aide d'anticorps spécifiques. BCAR1 et PAK1 ont respectivement été utilisés comme contrôles pour les interactions SH2 et SH3 dépendantes (n=3). **b)** Ensemble des constructions GST-NCK1/2 utilisées dans les essais de liaison directe et indirecte. **c)** Essais de liaisons indirectes. Chacune des constructions 3xFLAG indiquée a été exprimée en cellules HEK293T qui ont ensuite été lysées. Chaque lysat a ensuite été utilisé pour conduire les essais de liaison avec chaque construction GST indiquée liée à des billes GST. Les interactions ont été visualisées avec un anticorps FLAG. Afin de simplifier l'interprétation des résultats, un seul ponceau représentatif de l'ensemble des expériences a été ajouté (n=3). **d)** Essais de liaisons directes (*Far western*). Chaque construction 3xFLAG exprimée en cellules HEK293T traitées au PV puis lysées a été immunoprécipitée, migrée par électrophorèse et transférée sur une membrane de nitrocellulose. Les membranes ont ensuite été sondées avec les constructions GST indiquées qui ont été rincées et détectées avec un anticorps anti-GST (n=2).

### 3.3.2 Étude de l'interaction NCK2-PKP4

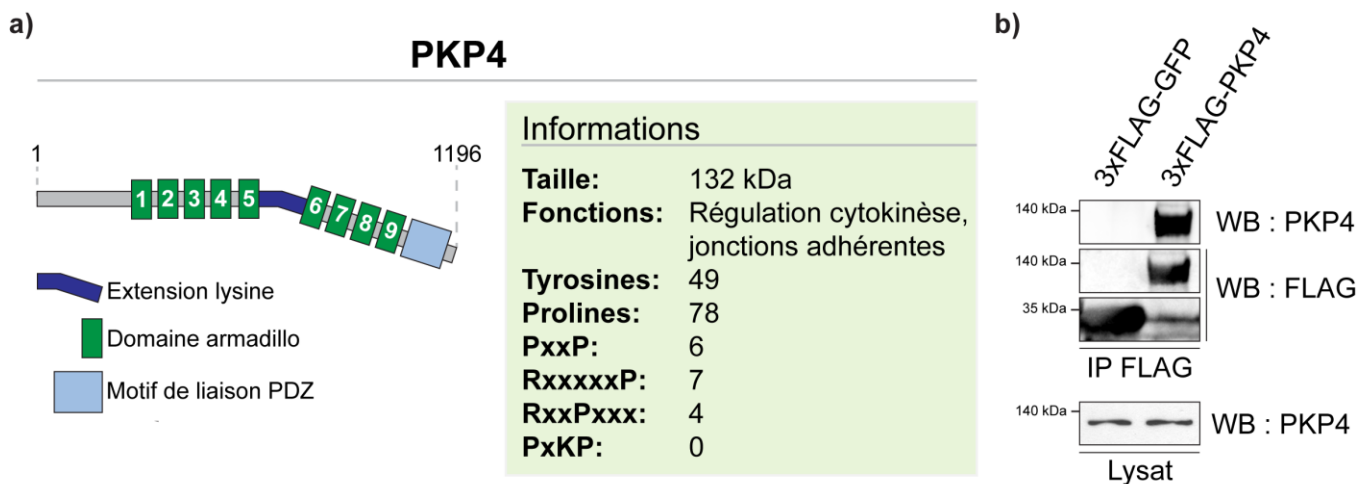
#### 3.3.2.1 La protéine PKP4

La protéine PKP4 appartient au grand groupe des protéines *armadillos*. Ces dernières sont toutes caractérisées par une région centrale constituée de la répétition d'un domaine d'approximativement 45 acides aminés appelé domaine armadillo (ARM) (Peifer *et al.*, 1992; Keil, Schulz and Hatzfeld, 2013). Chaque domaine ARM est typiquement composé de 3 hélices qui, lorsque combinées entre plusieurs domaines ARM, forment de nombreuses structures favorables aux interactions protéine-protéine (Pawson and Nash, 2003). Ainsi, il est connu que la répétition de domaines ARM fournit une région d'interaction polyvalente pour les interactions protéine-protéine et contribue à la régulation de nombreuses fonctions telles la signalisation intracellulaire, l'adhésion ou encore l'organisation du cytosquelette (Keil, Schulz and Hatzfeld, 2013).

Parmi cette grande famille de protéines *armadillos*, PKP4 appartient à une sous-famille de 9 protéines principalement impliquées dans l'adhésion cellulaire. Leurs régions centrales sont toutes constituées par la répétition de 9 domaines ARM interrompus par une extension de lysines imposant une torsion dans la protéine (Choi and Weis, 2005) (Fig. 3.7a). Certaines études menées sur PKP4 ont démontré que cette protéine localise majoritairement aux jonctions cellulaires et interagit directement via sa région ARM avec plusieurs membres de la famille des cadhérines (Hatzfeld and Nachtsheim, 1996; Calkins *et al.*, 2003; Hofmann, Kuhn and Franke,

2008; Hofmann *et al.*, 2009). PKP4 participe ainsi à l'adhésion cellulaire en permettant l'assemblage de complexes protéiques destinés à ancrer les cadhérines au cytosquelette d'actine. Quelques études ont également suggéré que PKP4 contribue à l'organisation du cytosquelette d'actine via son interaction avec les petites GTPases de la famille RHO. Ces interactions permettraient notamment à PKP4 de jouer un rôle essentiel durant les processus de mitose et de cytokinèse (Wolf *et al.*, 2006; Keil *et al.*, 2007).

Toutefois, PKP4 étant très peu étudiée, les données disponibles sur les fonctions, modes de régulation ou même modifications post-traductionnelles de cette protéine demeurent limitées. Cependant, l'analyse de la structure primaire de PKP4 a révélé un nombre restreint de motifs PxxP (6), mais un nombre important de tyrosines (49) (Fig.3.7a). Cette composition suggère que certaines modifications post-traductionnelles de cette protéine telle la phosphorylation sont envisageables et qu'une interaction de type SH2 dépendante avec NCK2 est possible.



**Figure 3. 7 : Représentation schématique de la protéine PKP4 et validation de son anticorps spécifique.**

**a)** Représentation schématique de la protéine PKP4. Chaque domaine ARM est numéroté et représenté avec un carré vert. L'extension lysine imposant une torsion à la protéine est représentée en bleu foncé. La partie C-terminale contient également un motif de liaison aux domaines PDZ (représenté en bleu pâle). Afin de permettre la visualisation de l'extension lysine, la protéine n'est volontairement pas représentée à l'échelle. Les tailles, fonctions ainsi que le nombre de tyrosines et les principaux motifs SH3-consensus définis par Teyra et collaborateurs sont aussi indiqués (Teyra *et al.*, 2017). **b)** Validation d'un anticorps PKP4-spécifique. Des cellules HEK293T ont été transféctées avec chacune des constructions 3xFLAG indiquées. Chaque construction 3xFLAG a été immunoprécipitée puis respectivement détectée à l'aide des différents anticorps spécifiques indiqués.

### 3.3.2.2 Caractérisation de l'interaction spécifique NCK2-PKP4

J'ai mené l'ensemble des expériences précédemment décrites pour CPSF6 avec la protéine PKP4. Tel qu'identifié en MS, PKP4 endogène interagit spécifiquement avec NCK2 en présence de PV (Fig. 3.6a). Tel que précédemment, j'ai conduit des essais de liaison en combinant les différentes constructions GST-NCK1/2 (Fig. 3.6b) avec des lysats de cellules HEK293T surexprimant 3xFLAG-PKP4 préalablement traités au PV. Ces essais réalisés en triplicata m'ont permis de constater que 3xFLAG-PKP4 interagit avec GST-NCK2 pleine longueur mais aussi avec le SH2 seul de NCK2 (GST-SH2) (Fig. 3.6c). De plus, la simple mutation de l'arginine 311 de ce domaine isolé est suffisante pour abolir cette interaction. Également, le manque d'interaction entre PKP4 et les 3 domaines SH3 sauvages (3xSH3) ou mutés (3xSH3-) de NCK2 complète parfaitement ces résultats. Ainsi, le profil de liaison affiché par PKP4, parfaitement similaire au contrôle SH2 BCAR1 suggère donc que l'association NCK2-PKP4 repose sur le domaine SH2 de NCK2.

### 3.3.2.3 Validation de l'interaction directe et spécifique entre NCK2 et PKP4

Afin de consolider l'ensemble de mes résultats *in vitro* suggérant une interaction directe (Fig.3.4b) et SH2-dépendante (Fig. 3.6c) entre NCK2 et PKP4, j'ai ensuite réalisé des essais de liaison directe (*Far-western*). Pour cela, j'ai produit 3xFLAG-PKP4 en cellules HEK293T traitées ou non au PV puis isolé et transféré la construction sur une membrane de nitrocellulose. J'ai ensuite sondé cette dernière avec les différentes constructions GST pleine longueur indiquées ou avec le domaine GST-SH2 isolé de NCK2 (Fig. 3.6b). Tandis qu'aucune interaction n'est détectée en absence de PV (données non incluses), j'ai pu mettre en évidence que les constructions GST-NCK2 pleine longueur aux domaines SH3 sauvages (GST-NCK2) ou invalidés (GST-W/K) sont capables de lier directement 3xFLAG-PKP4 (Fig. 3.6d). Le GST-SH2 isolé de NCK2 (GST-SH2) est également capable de lier 3xFLAG-PKP4. À l'inverse, j'ai observé une perte totale d'interaction entre la construction GST-NCK2 pleine longueur au domaine SH2 invalidé (GST-R311M) et 3xFLAG-PKP4. L'ensemble de ces résultats combiné à la nécessité d'un traitement PV afin de visualiser l'interaction NCK2-PKP4 confirment que l'interaction directe entre NCK2 et PKP4 repose sur le domaine SH2 de NCK2.

En somme, mes résultats suggèrent que PKP4 interagirait de manière directe avec le domaine SH2 de NCK2. De manière intrigante, lors de l'utilisation de la combinaison GST-NCK1/2 avec 3xFLAG-PKP4, j'ai constaté une perte de spécificité matérialisée par l'apparition d'une interaction NCK1-PKP4 similaire à celle observée avec NCK2 (Fig.3.6c et 3.6d). Ces résultats en désaccord avec l'ensemble de mes données démontrant une association NCK2-PKP4 endogène spécifique m'ont poussé à déterminer l'origine de ces différences.

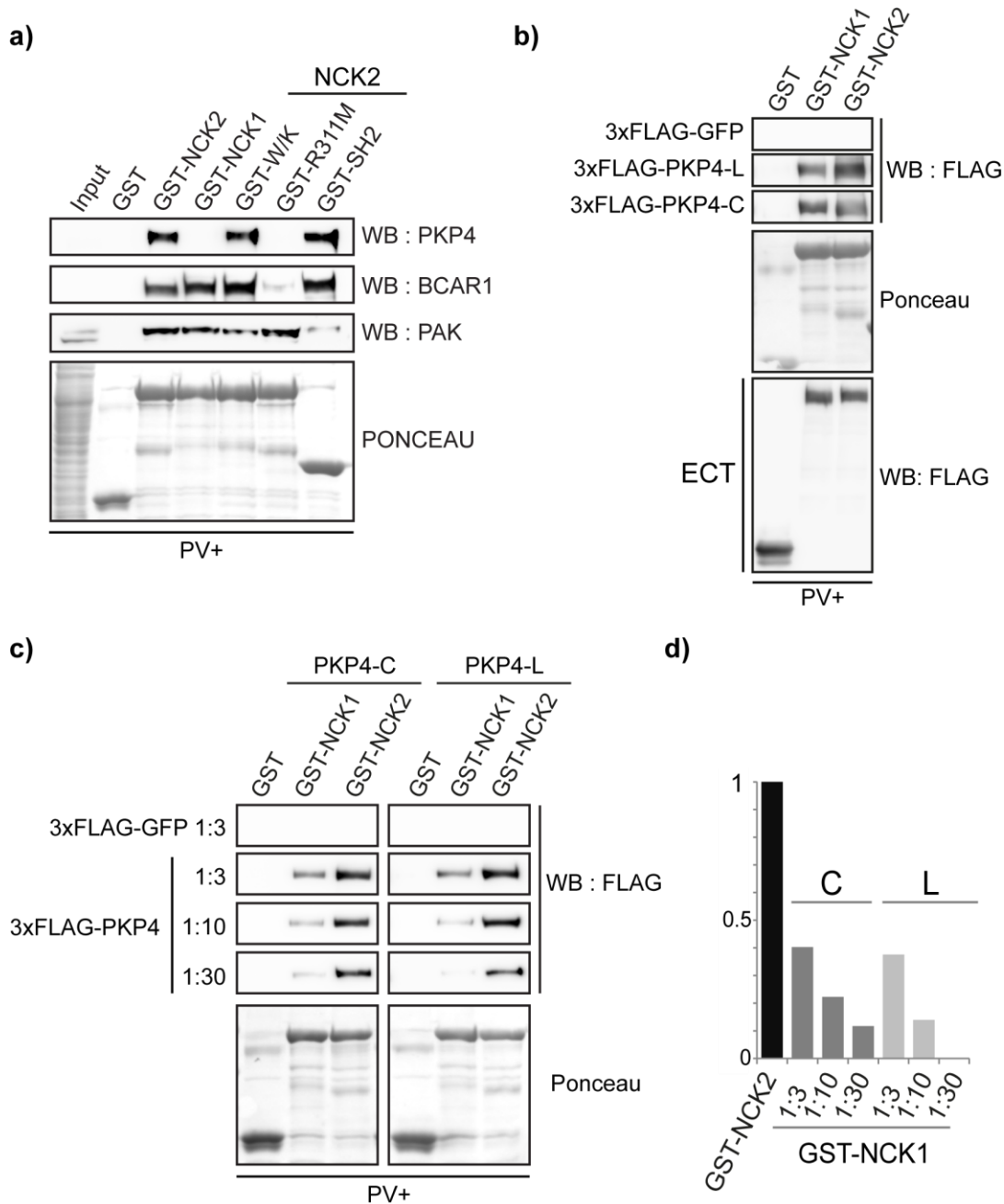
### **3.3.3 Une surexpression de PKP4 abolit la spécificité pour NCK2**

Afin d'élucider l'origine de cette perte de spécificité observée lors de l'utilisation de protéines recombinantes, j'ai contrôlé successivement chaque paramètre variant entre les différentes séries d'expériences réalisées. Premièrement, j'ai voulu vérifier si l'utilisation de NCK1/2 étiquetées GST et produites en bactérie pourrait être responsable de la perte de spécificité observée. Comme démontré en figure 3.8a, l'utilisation de protéines NCK1/2 sauvages ou mutantes étiquetées GST avec un lysat de cellules non transfecté engendre un retour de spécificité matérialisé par l'interaction spécifique NCK2-PKP4 endogène. De plus, cette expérience confirme une interaction de type SH2 dépendante entre NCK2 et PKP4 endogène comme démontré par la liaison de PKP4 avec le domaine SH2 seul de NCK2 (GST-SH2) ou avec GST-NCK2 pleine longueur aux 3 domaines SH3 invalidés (GST-W/K). En accord avec mes résultats précédents, une simple mutation du domaine SH2 de NCK2 pleine longueur (GST-R311M) est suffisante pour abolir l'interaction NCK2-PKP4 endogène. L'ensemble de ces résultats confirme mes données précédentes, mais n'explique pas la perte de spécificité observée avec la version 3xFLAG-PKP4. Cela m'a donc incité à chercher des différences entre PKP4 endogène et la version exogène utilisée.

Une étude publiée en 1996 a suggéré que PKP4 pourrait exister sous deux isoformes : une courte (C) de 1148 acides aminés utilisée initialement dans mes essais ainsi qu'une longue (L) contenant 43 acides aminés supplémentaires dont 4 tyrosines dans sa partie C-terminale (Hatzfeld and Nachtsheim, 1996). Afin de vérifier si une différence d'isoforme entre PKP4 endogène et exogène serait à l'origine des discordances observées, j'ai conduit des essais de liaison avec chacune de ces isoformes clonée et étiquetée 3xFLAG et GST-NCK1 ou GST-NCK2. J'ai ainsi pu observer que chaque isoforme de PKP4 lie de façon équivalente GST-NCK1



et GST-NCK2 (Fig. 3.8b). Ces résultats réfutent ainsi l'hypothèse que PKP4 pourrait interagir différemment avec NCK1 et/ou NCK2 selon la présence de son extension C-terminale.



**Figure 3.8 : Une surexpression de PKP4 abolit sa liaison spécifique avec NCK2.**

a) PKP4 endogène interagit spécifiquement avec le domaine SH2 de NCK2. Un lysat de cellules HEK293T non transfectées a été utilisé pour conduire les essais de liaison avec chaque construction GST indiquée. Les interactions ont été visualisées avec les différents anticorps spécifiques indiqués. b) Comparaison de la liaison des deux isoformes de PKP4 étiquetées 3xFLAG avec GST-NCK1/2. Chaque isoforme a été exprimée en cellules HEK293T traitées au PV et le lysat cellulaire a été utilisé pour conduire des essais de liaison avec GST-NCK1/2. c)

Effet de la dilution de chaque isoforme de PKP4 sur la spécificité envers NCK1/2. Chaque isoforme de PKP4 a été exprimée en cellules HEK293T et le lysat cellulaire dilué de 3 à 30 fois a été utilisé pour conduire des essais de liaison avec GST-NCK1/2. **d)** Quantification du signal obtenu sur les immunobuvardages présentés en figure 3.8c. La mesure de l'intensité relative de chaque bande de PKP4 dans chaque condition GST-NCK1 a été normalisée par rapport à chaque condition GST-NCK2.

Je me suis donc demandé si les différences de spécificité observées pourraient résulter d'une surexpression de 3xFLAG-PKP4, paramètre pouvant biaiser la localisation cellulaire de la protéine et altérer les interactions protéiques *in vivo* en modifiant la stœchiométrie. De plus, la version endogène de cette protéine difficilement détectable dans mes essais d'immunobuvardage est connue pour être finement régulée et maintenue à des niveaux cellulaires faibles (Wolf *et al.*, 2006). Ainsi, j'ai reconduit les essais de liaison entre les 2 isoformes de 3xFLAG-PKP4 produites en cellules HEK293T et GST-NCK2 en diluant cependant de 3 à 30 fois la quantité de lysats, et donc de 3xFLAG-PKP4 utilisée. J'ai pu constater qu'une dilution d'au moins 30 fois de la quantité de 3xFLAG-PKP4 utilisée est suffisante pour récapituler une interaction NCK2 spécifique, et ce avec les deux isoformes de PKP4 (Fig. 3.8c-d).

L'ensemble de mes résultats confirme une interaction spécifique entre le domaine SH2 de NCK2 et la protéine PKP4 endogène mais suggère aussi qu'une surexpression de PKP4 serait suffisante pour biaiser cette spécificité. Ce constat maintient ouverte l'hypothèse de l'existence d'une localisation cellulaire différente entre NCK1 et NCK2, mais aussi la possibilité d'une interaction non exclusive à NCK2 reposant sur des différences d'affinités entre PKP4 et chaque NCK.

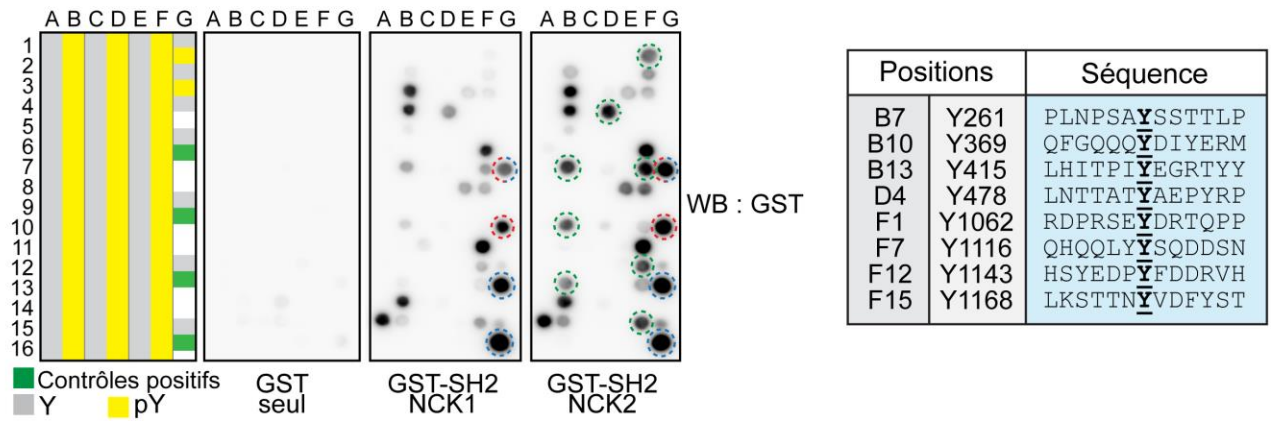
### **3.3.4 Identification d'une région de PKP4 interagissant avec le domaine SH2 de NCK2**

Afin de déterminer les affinités respectives de NCK1 et NCK2 pour PKP4, j'ai par la suite cherché à identifier le motif de cette protéine capable de lier le domaine SH2 de NCK2. Sachant que NCK2 lie spécifiquement la tyrosine 1009 du récepteur PDGFR activé sur un motif YTAV (Chen *et al.*, 2000), j'ai analysé la séquence primaire de PKP4 et recherché une séquence similaire. L'absence de motif de ce type ou même de motif consensus précédemment décrit

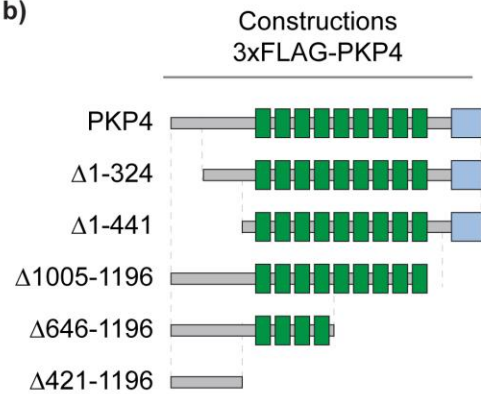
combinée au nombre important de tyrosines présentes dans la structure primaire de PKP4 m'a poussé à utiliser comme première stratégie une approche *peptide array* (Frese *et al.*, 2006). J'ai utilisé des membranes de peptides afin de couvrir l'ensemble des tyrosines de l'isoforme longue de PKP4, de même que plusieurs contrôles positifs. Ces derniers comprennent la tyrosine 474 du peptide Tir ainsi que la tyrosine 361 de DOK1, 2 tyrosines liées communément et directement par les SH2 de NCK1/2. J'ai également inclus la tyrosine 602 du récepteur EPHA4, possiblement NCK2-spécifique ainsi que la tyrosine 1009 du récepteur PDGFR démontrée comme NCK2-spécifique (Chen *et al.*, 2000; Bisson *et al.*, 2007). Sur chaque membrane, chacun de ces peptides a été synthétisé dans une forme phosphorylée (pY) ou non (Y) puis organisés en 7 colonnes (A-G) comprenant 18 lignes (Fig. 3.9a ; Annexe 1). Chacune des membranes a ensuite été sondée avec GST comme contrôle négatif ou le domaine SH2 isolé de NCK1 ou NCK2 étiquetés GST. L'ensemble des interactions a été visualisé par immunobuvardage. Mes observations sont les suivantes. J'ai identifié plus de 20 tyrosines réparties sur l'ensemble de PKP4 possiblement liées par NCK1/2, incluant 8 tyrosines (indiquées par un rond vert) préférentiellement ou spécifiquement liées par NCK2 (Fig. 3.9a). Étonnamment, le peptide EPHA4 potentiellement NCK2 spécifique (rond rouge et bleu) ainsi que le peptide PDGFR supposément NCK2 spécifique (rond rouge) sont aussi parfaitement reconnus par NCK1. Le nombre important de tyrosines reconnues par NCK1/2 ainsi que la perte de spécificité envers la tyrosine 1009 du PDGFR suggèrent que la structure tertiaire de NCK1/2 et/ou de leurs partenaires spécifiques pourraient être des facteurs importants dans les mécanismes de spécificité SH2 dépendant.

Afin de délimiter une région de PKP4 interagissant avec le domaine SH2 de NCK2 et faciliter l'identification subséquente d'une tyrosine responsable de cette interaction, j'ai successivement supprimé certaines portions PKP4 pleine longueur (Fig. 3.9b). J'ai ensuite testé par *pull-down* l'association de chacune de ces constructions exprimées en cellules HEK293T traitées au PV avec GST-NCK2. J'ai constaté une perte totale de liaison entre NCK2 et PKP4 lorsque la partie centrale de ce dernier ( $\Delta$ 646-1196) est supprimée (Fig. 3.9c). Étonnamment, lors de la délétion du fragment 421-1196 aboutissant à la production d'une forme de PKP4 composée uniquement de la partie N-terminale, un retour de liaison à NCK2 est visualisé.

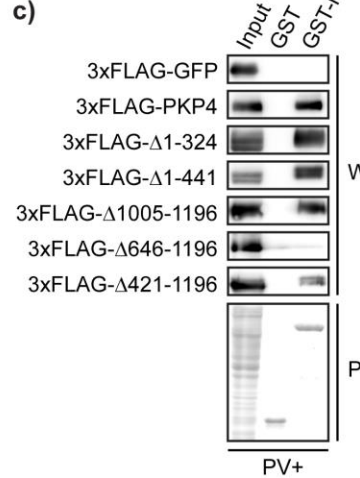
a)



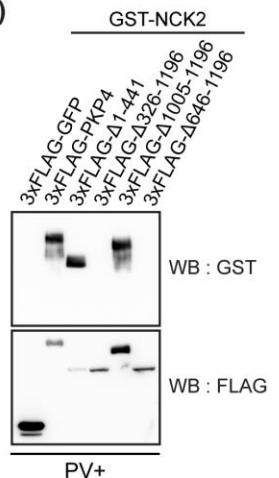
b)



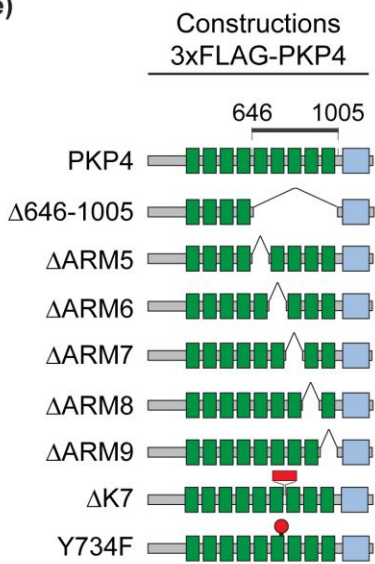
c)



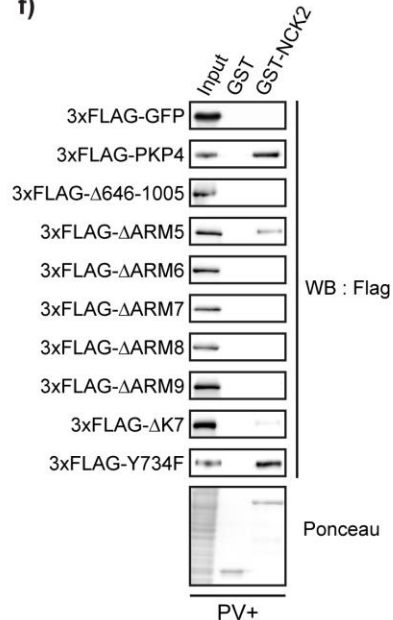
d)



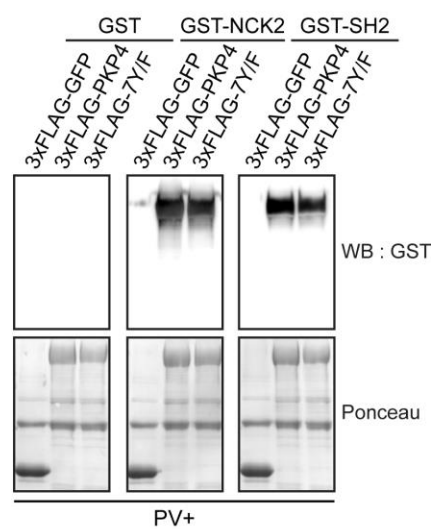
e)



f)



g)

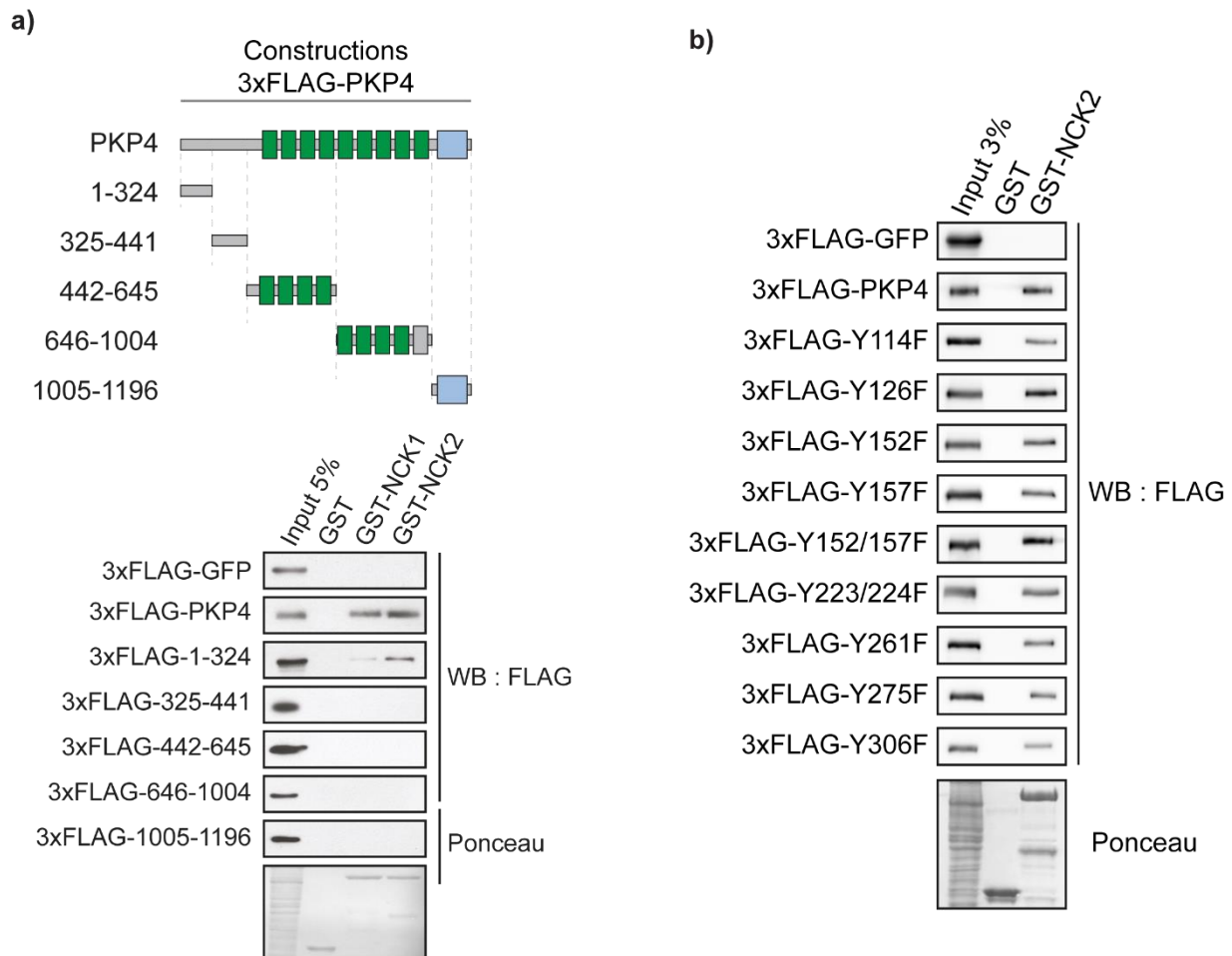


**Figure 3. 9 : La région centrale de PKP4 permet l'interaction directe avec NCK2.**

**a)** Approche de *peptide array* utilisée pour identifier la tyrosine de PKP4 interagissant avec le SH2 de NCK2. Les peptides correspondant aux 49 tyrosines de l'isoforme longue de PKP4 ont été synthétisées dans une forme phosphorylée ou non sur trois membranes différentes. Chaque membrane a été sondée avec la construction indiquée. Plusieurs contrôles positifs ont été ajoutés : rond bleu/rouge : Y602 EPHA4, rond rouge : Y1009 PDGFR, ronds bleus : Y361 DOK1, Y374 peptide TIR. Les informations relatives aux 8 peptides de PKP4 liant préférentiellement NCK2 ont été indiquées. **b)** Troncations de PKP4 utilisées pour identifier une région responsable de l'interaction avec NCK2. **c)** Caractérisation initiale d'un fragment de PKP4 capable de lier NCK2. Chaque construction de PKP4 a été exprimée en cellules HEK293T traitées au PV et le lysat cellulaire a été utilisé pour conduire des essais de liaison avec GST-NCK1/2 (n=3). Dans un souci d'espace, la protéine PKP4 a été représentée de manière linéaire dans l'ensemble de la figure. **d)** Confirmation de l'implication de la région 646-1005 dans la liaison directe entre NCK2 et PKP4. Des essais de liaison directs (*Far western*) ont été réalisés avec les différentes troncations de PKP4 précédemment décrites et GST-NCK2 (n=2). **e)** Représentation des différentes constructions de PKP4 utilisées pour caractériser le motif central responsable de l'interaction avec NCK2. **f)** Caractérisation d'un motif sur PKP4 capable de lier NCK2. Chaque troncation de la partie centrale de PKP4 a été exprimée en cellules HEK293T traitées au PV et le lysat cellulaire a été utilisé pour conduire des essais de liaison avec GST-NCK1/2 (n=3). **g)** Identification d'une tyrosine de la région 706-1005 responsable de la liaison entre NCK2 et PKP4. Un mutant de PKP4 où l'ensemble des 7 tyrosines de la région 706-1005 ont été mutées a été cloné et utilisé pour réaliser des essais de liaison directs (*Far western*) avec GST-NCK2 ou le domaine SH2 seul de NCK2 (n=1).

Une série d'expériences complémentaire de type *pull-down* utilisant des fragments de PKP4 et des mutants tyrosines de la portion N-terminale m'a toutefois permis de déterminer qu'aucune de ces tyrosines ne contribue de manière significative à la liaison NCK2-PKP4 (Fig. 3.10).

Ainsi, l'ensemble de ces résultats suggère que i) la région 646-1005 de PKP4 serait importante pour la liaison à NCK2 (Fig. 3.9c), ii) la portion N-terminale de PKP4 serait aussi dotée d'un motif capable de lier NCK2 (Fig. 3.10a) de manière phosphotyrosine indépendante (Fig.3.10b), iii) la partie centrale de PKP4 (421-646) contiendrait un motif inhibiteur prévenant l'interaction entre la partie N-terminale de cette protéine et NCK2. De plus, il ne peut pas être exclu que des troncations abusives de PKP4 puissent provoquer l'exposition d'un motif de la partie N-terminale capable d'interagir avec NCK2 mais normalement enfoui dans la structure de la protéine pleine longueur (Fig. 3.9a-c).



**Figure 3. 10 : La portion N-terminale de PKP4 ne lie pas NCK2 d'une manière phosphotyrosine dépendante.**

**a)** Caractérisation initiale d'un fragment de PKP4 capable de lier NCK2. Différents fragments de la protéine PKP4 (indiqués en haut) ont été clonés puis exprimés en cellules HEK293T. Les associations respectives de ces fragments avec NCK1/2 ont été visualisées par immunobuvardage grâce à des essais de liaison. Dans un souci d'espace, la protéine PKP4 a été représentée de manière linéaire dans l'ensemble de la figure. **b)** Identification d'une tyrosine de la portion N-terminale de PKP4 capable de lier NCK2. Différents mutants tyrosine (Y/F) de la protéine PKP4 ont été exprimés en cellules HEK293T et leurs associations respectives avec NCK2 ont été visualisées par immunobuvardage grâce à des essais de liaison.

Afin de valider que la région 646-1005 de PKP4 lie directement le domaine SH2 de NCK2, j'ai conduit des essais de liaison direct (*far western*) avec différentes troncations de 3xFLAG-PKP4. En accord avec mes résultats précédents, la suppression de la portion N-terminale ( $\Delta$ 1-441) ou C-terminale ( $\Delta$ 1005-1196) de PKP4 maintient la liaison directe entre le reste de la protéine et GST-NCK2 (Fig.3.9d). Cela suggère que ces deux portions ne sont pas

requis dans la liaison NCK2-PKP4. De plus, la partie N-terminale seule ( $\Delta$ 326-1196) suggérée précédemment capable de lier NCK2 (Fig.3.9c et Fig. 3.10a-b), ne semble pas capable de lier directement GST-NCK2. En revanche, la suppression de la partie 646-1196 ( $\Delta$ 646-1196) abolit complètement l'interaction directe avec NCK2 telle que précédemment suggérée (Fig. 3.9c, d). Ainsi, l'ensemble de ces expériences m'a permis d'identifier que NCK2 interagit avec la portion 646-1005 de PKP4 et de rejeter l'hypothèse que la partie N-terminale de PKP4 puisse médier une quelconque interaction directe avec NCK2.

Afin de poursuivre l'identification d'un motif présent sur PKP4 responsable de l'interaction avec NCK2, j'ai poursuivi la caractérisation de l'interaction entre NCK2 et la portion 646-1005 de PKP4. La composition de cette région arborant 5 domaines ARM et l'extension lysine décrite précédemment (Fig. 3.7a) m'a poussée à successivement supprimer chacun des domaines ARM de la protéine pleine longueur ( $\Delta$ ARM5 à 9) ou l'intégralité de l'extension lysine ( $\Delta$ K7). De plus, la présence de 7 tyrosines sur cette portion incluant un motif semi-similaire au motif consensus lié par NCK1/2 (Y734 de PKP4 : **YDSK** ; consensus NCK1/2 : **YDxV** ; (Frese *et al.*, 2006)) m'a également conduit à muter ce résidu en phénylalanine (Y734F) (Fig. 3.9e). La réalisation des différents essais de liaison m'a permis de mettre en évidence que lors de la suppression de l'extension lysine ou des domaines ARM 6 à 9 de PKP4, l'interaction avec GST-NCK2 est abolie (Fig. 3.9f). En revanche, lors d'une délétion du domaine ARM 5 (ARM5) ou une mutation de la tyrosine 734 de PKP4 (Y734F) l'interaction NCK2-PKP4 est maintenue (Fig. 3.9f). Ainsi, l'ensemble de ces résultats m'a permis de suggérer que la région de 706-1005 de PKP4 serait requise pour médier l'interaction avec NCK2.

Afin de valider l'implication d'une des 7 tyrosines de la portion 706-1005 de PKP4 dans la liaison avec NCK2, j'ai ensuite muté simultanément ces 7 résidus en phénylalanine (7Y/F) et conduit des essais de liaison direct (*far western*) avec GST-NCK2 ou le domaine GST-SH2 seul de NCK2. De manière inattendue, le multiple mutant PKP4 conserve sa capacité à lier directement GST-NCK2 ou le domaine SH2 isolé de NCK2 (Fig. 3.9g), rendant impossible l'identification d'un motif précis responsable de l'interaction NCK2-PKP4.

En bref, en accord avec certaines données suggérant que la région comprenant les domaines ARM 6 à 9 de PKP4 permettrait à cette protéine d'interagir avec une partie de ces partenaires (Keil, Schulz and Hatzfeld, 2013), j'ai pu déterminer que cette même portion serait

responsable de l'interaction directe avec le domaine SH2 de NCK2. Toutefois, le caractère potentiellement atypique de cette nouvelle interaction a rendu impossible l'identification d'un peptide responsable de cette association et donc, les subséquentes mesures d'affinités de ce dernier pour NCK1 et NCK2.

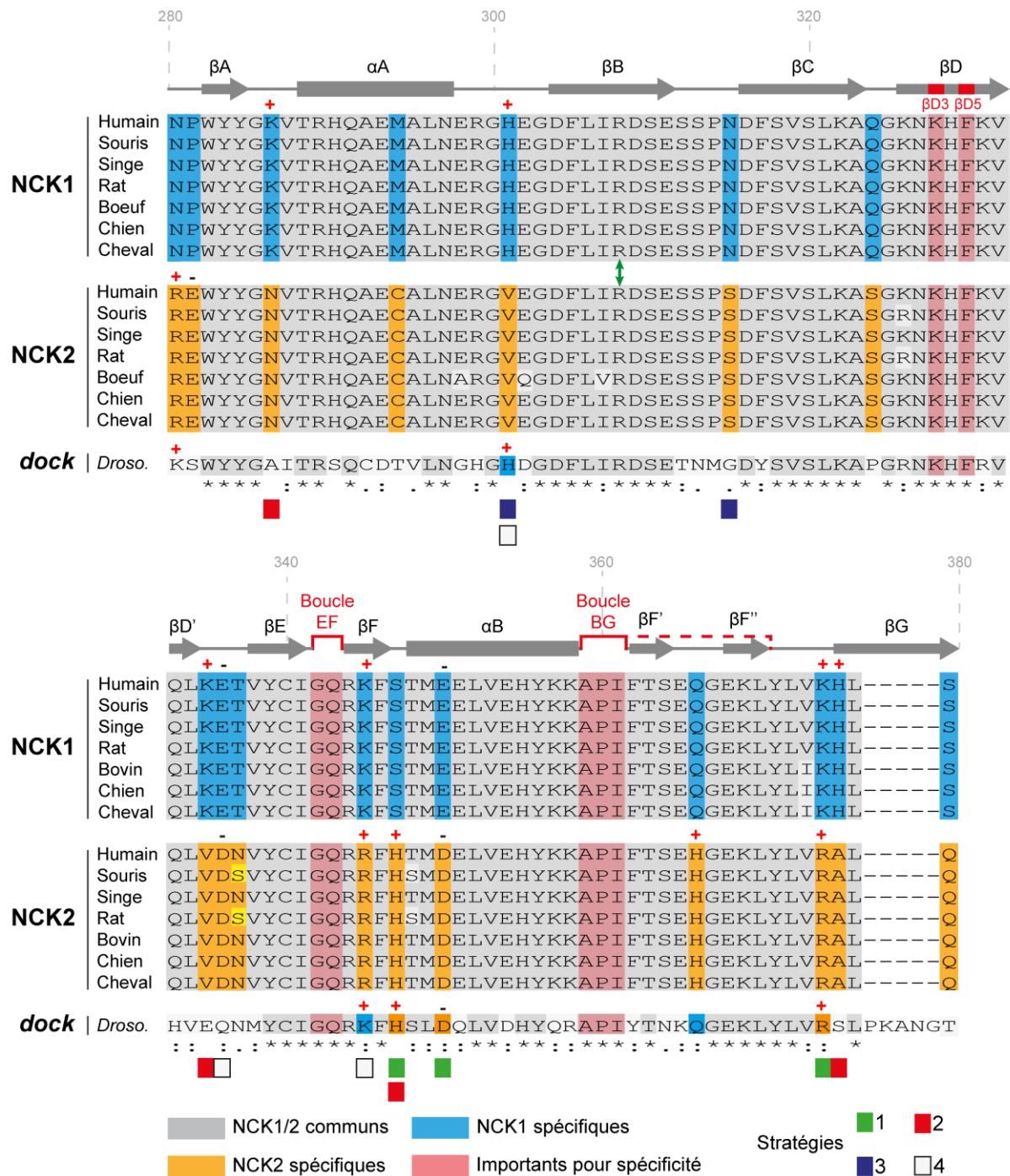
### **3.4 Étude des déterminants moléculaires responsables de la spécificité des protéines adaptatrices NCK1 et NCK2**

Sur la base de mes résultats démontrant que le domaine SH2 de NCK2 interagit directement et spécifiquement avec la région 706-1005 de PKP4, j'ai ensuite cherché à caractériser plus en détail les déterminants moléculaires du domaine SH2 de NCK2 à l'origine de cette spécificité.

#### **3.4.1 Identification de résidus clefs importants pour la spécificité du domaine SH2 de NCK2**

Afin d'identifier facilement des résidus différents entre les domaines SH2 de NCK1 et de NCK2 pouvant contribuer à leur spécificité, j'ai réalisé des alignements multiples de chacun de ces domaines. J'ai ainsi identifié 17 résidus différentiellement conservés entre NCK1 et NCK2 (Fig. 3.11). Afin d'obtenir un aperçu de l'importance potentielle de chacun de ces résidus, j'ai superposé à cet alignement les informations connues relatives à la structure secondaire de ces deux domaines (Li and She, 2000; Frese *et al.*, 2006), ainsi que les résidus mentionnés en introduction (section 1.4.1) et suggérés comme importants dans la spécificité générale des domaines SH2 (Waksman, 1992; Songyang *et al.*, 1995; Tanaka, Gupta and Mayer, 1995; Huang *et al.*, 2008).





**Figure 3. 11 : 17 acides aminés varient entre les domaines SH2 de NCK1 et NCK2.**

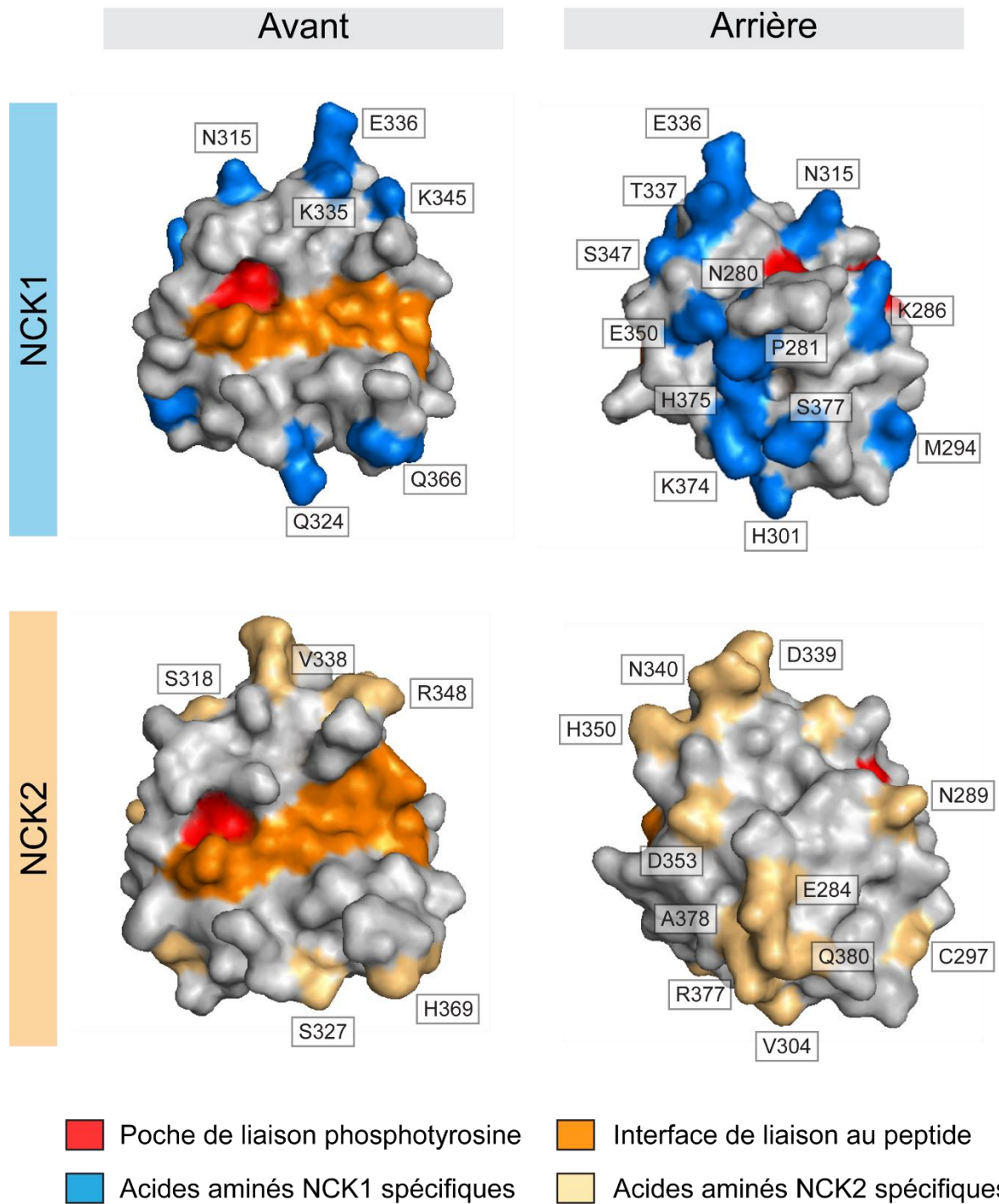
Les séquences primaires en acides aminés de différents domaines SH2 de NCK1, NCK2 et Dock ont été alignées. La structure secondaire des domaines a été indiquée au-dessus des alignements (flèche : feuillet β ; rectangle : hélice α). Les 17 acides aminés variant entre NCK1 et NCK2 ainsi que leurs charges respectives ont été indiqués en bleu pour NCK1 et orange pour NCK2. L'arginine conservée en position βB5 essentielle pour la liaison à la tyrosine phosphorylée a été indiquée par une double flèche verte. Les acides aminés démontrés comme importants dans la spécificité des domaines SH2 ont été indiqués en rouge. Les différentes stratégies de mutation

utilisées ont été indiquées par un code couleur (Cf. Fig. 3.13). La boucle BG, normalement composée d'une dizaine d'acides aminés dans la plupart des domaines SH2 (pointillés rouges), mais remplacée par les brins bêta  $\beta F'$  et  $\beta F''$  dans les domaines de NCK2 a été indiquée (Ran and Song, 2005; Frese *et al.*, 2006).

Ainsi, j'ai pu mettre en évidence que l'ensemble des résidus suggérés comme importants dans la spécificité des domaines SH2 tels ceux en position  $\beta 3/5$  ou ceux constituant les boucles EF et BG sont identiques entre NCK1 et NCK2.

J'ai ensuite utilisé les modélisations disponibles afin de visualiser la position de chacun de ces résidus au sein des domaines SH2 de NCK1/2. J'ai ainsi pu mettre en évidence que la majorité de ces résidus sont situés sur la face à l'opposé de l'interface de liaison au peptide. Uniquement 4 résidus (NCK1 : K335, K345, Q324 et Q366 ; NCK2 : V338, R348, S327 et H369) semblent situés sur la même face que l'interface de liaison au peptide (Fig. 3.12). L'ensemble de ces analyses *in silico* ne m'a pas permis d'identifier de motifs évidents qui pourraient être responsables de la spécificité des domaines SH2 de NCK1 et NCK2. Toutefois, la nature potentiellement atypique de l'interaction NCK2-PKP4 maintient ouverte l'hypothèse qu'un mécanisme de liaison différent impliquant des résidus ou même des régions inattendues puisse expliquer cette interaction.

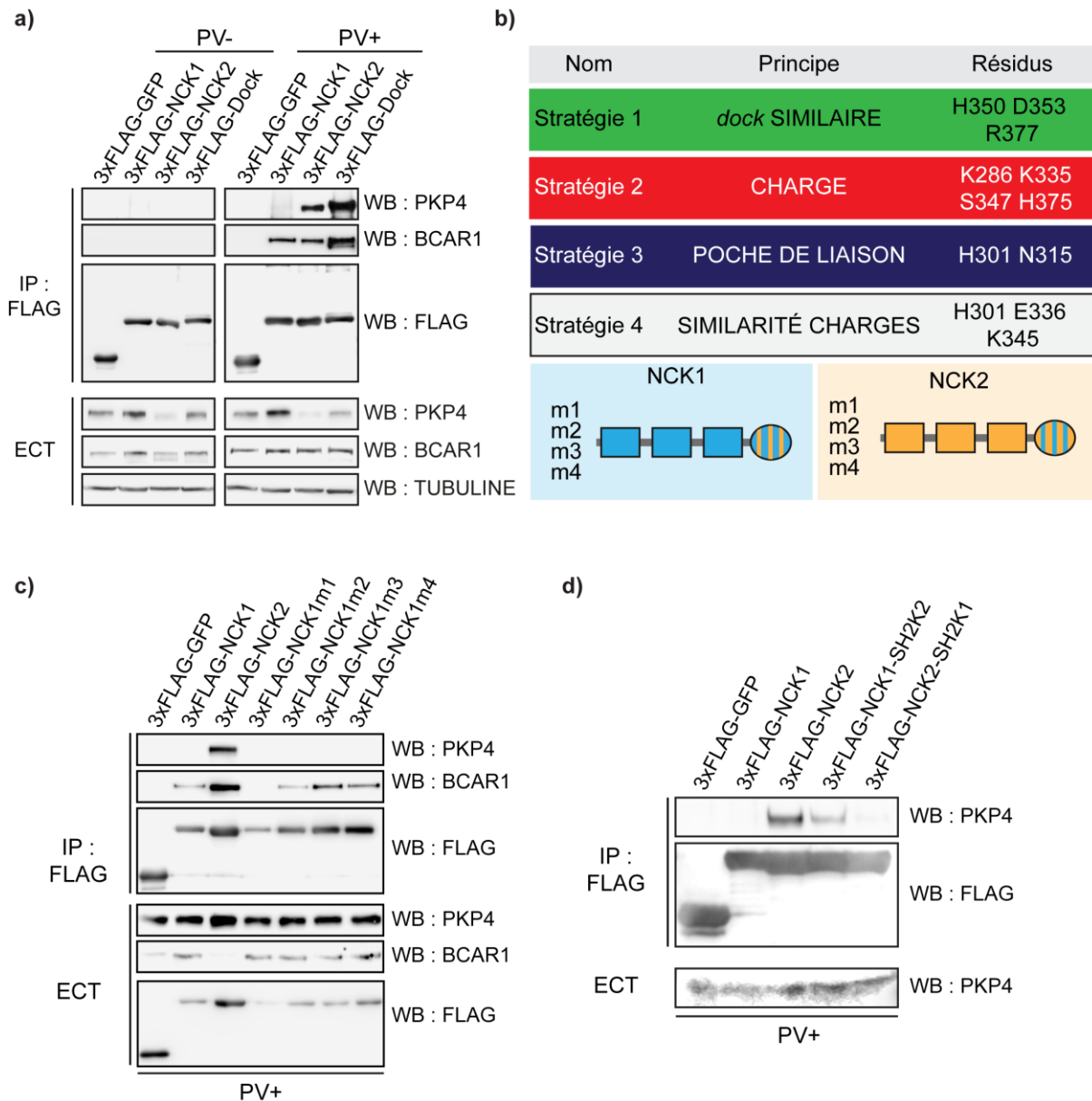
Afin d'élaguer le nombre de possibilités et obtenir un meilleur aperçu du ou des résidus importants pour la spécificité de ces domaines, j'ai évalué la capacité de Dock, l'unique orthologue de NCK1/2 à lier PKP4. Des essais de co-immunoprécipitation entre 3xFLAG-Dock et PKP4 endogène ont révélé que telle NCK2, Dock est aussi capable de lier PKP4 lors d'un traitement PV (Fig. 3.13a). J'ai donc inclus la séquence primaire de Dock comme paramètre dans les alignements multiples et identifié des groupes de résidus communs entre NCK2-Dock mais différents de NCK1. Sur la base des similarités et différences entre NCK1, NCK2 et/ou Dock, j'ai envisagé 4 stratégies ou séries d'acides aminés importants pouvant intervenir dans la spécificité des domaines SH2 de NCK1/2 (Fig. 3.11, 3.13b).



**Figure 3. 12 : Les acides aminés différents entre les domaines SH2 de NCK1/2 ne sont pas situés proche de l'interface de liaison au peptide.**

Les domaines SH2 de NCK1 et NCK2 ont été visualisés à l'aide des données disponibles dans la littérature (PDB NCK1 : 2CI9, PDB NCK2 : 2CIA) et du logiciel Pymol. Chacun des 17 acides aminés NCK1 spécifiques (bleu) ou NCK2 spécifiques (jaune) est indiqué sur la face

avant ou arrière du domaine. L'interface de liaison au domaine a été colorée en orange tandis que la poche de liaison acceptant la tyrosine phosphorylée a été indiquée en rouge.



**Figure 3. 13 : Une inversion des domaines SH2 entre NCK1/2 n'est pas suffisante pour commuter la spécificité de ces protéines envers PKP4.**

a) Identification de PKP4 comme partenaire de Dock. Des cellules HEK293T ont été transfectées avec chacune des constructions 3xFLAG indiquées puis traitées au PV avant lyse. Chaque construction 3xFLAG a été immunoprécipitée et les interactions entre ces dernières et protéines d'intérêts endogènes telle BCAR1 utilisée comme contrôle SH2 ont été visualisées à l'aide d'anticorps spécifiques (n=3). b) Illustration des 4 stratégies de mutation envisagées. Selon les alignements présentés en figure 3.11, 4 stratégies de mutation ont été envisagées. Le

principe ainsi que les résidus mutés sont indiqués pour chacune de ces stratégies. **c)** Chaque mutant NCK1 demeure incapable de lier PKP4 endogène. Des cellules HEK293T ont été transfectées avec chacune des constructions 3xFLAG indiquées puis traitées au PV avant lyse. Chaque construction 3xFLAG a été immunoprécipitée et les interactions entre ces dernières et PKP4 endogène ont été visualisées à l'aide d'anticorps spécifiques (n=2). **d)** Les propriétés intrinsèques des domaines SH2 de NCK1/2 n'expliquent pas leurs spécificités. NCK1 et NCK2 aux domaines SH2 inversés ont été exprimées en cellules HEK293T traitées au PV puis immunoprécipitées. L'association de PKP4 endogène avec chaque construction a été visualisée à l'aide d'un anticorps spécifique (n=2).

Les différentes stratégies sont les suivantes. Premièrement, en analysant les résidus NCK2-Dock communs, mais différents de NCK1, j'ai identifié 3 acides aminés identiques entre NCK2 et Dock mais différents de NCK1 (H350, D353, R377). Deuxièmement, NCK1 arbore différemment certains acides aminés chargés ou non comparé au duo NCK2-Dock (K286, K335, S347, H375). Troisièmement, j'ai décidé de muter les 2 acides aminés les plus proches de la poche de liaison (H301, N315), mais différents entre NCK1/2. Finalement, j'ai inversé entre NCK1/2 une série de 3 acides aminés avec une charge similaire, mais différents (H301, E336, K345) (Fig 3.13b).

Ainsi, j'ai cloné 4 NCK1 et 4 NCK2 mutants (notés m1, m2, m3, m4) aux domaines SH2 partiellement inversés que j'ai exprimé en cellules HEK293T traitées au PV. Après avoir visualisé par immunobuvardage la capacité d'interaction de chacun de ces mutants avec PKP4 endogène, j'ai constaté qu'aucun des mutants 3xFLAG-NCK1 ne gagne la capacité de lier PKP4 endogène d'une manière similaire à NCK2 (Fig. 3.13c). De plus, une expérience préliminaire suggère que tous les mutants 3xFLAG-NCK2 conservent leurs capacités à lier PKP4 endogène.

À l'appui de ces résultats, j'ai voulu vérifier si l'inversion complète des domaines SH2 entre NCK1 et NCK2 serait suffisante pour commuter la spécificité de ces protéines ou si d'autres régions ou domaines pourraient être impliqués dans le contrôle de la spécificité des domaines SH2. Ainsi, j'ai créé deux NCK chimériques pleine longueur aux domaines SH2 inversés (respectivement nommés NCK1-SH2K2 et NCK2-SH2K1) puis testé la capacité de ces constructions à lier PKP4 endogène. Via la réalisation d'expériences d'immunoprécipitation et d'immunobuvardages contre PKP4 endogène, mes résultats préliminaires suggèrent que NCK1 avec le SH2 de NCK2 (NCK1-SH2K2) devient partiellement capable de lier PKP4 endogène tandis que la liaison entre NCK2-SH2K1 et PKP4 endogène est fortement entravée par rapport à NCK2. Ainsi, la liaison partielle de PKP4 endogène avec NCK1-SH2K2 suggère que les

domaines SH2 seuls de NCK1/2 et les déterminants moléculaires spécifiques qu'ils arborent ne sont pas complètement responsables de la spécificité.

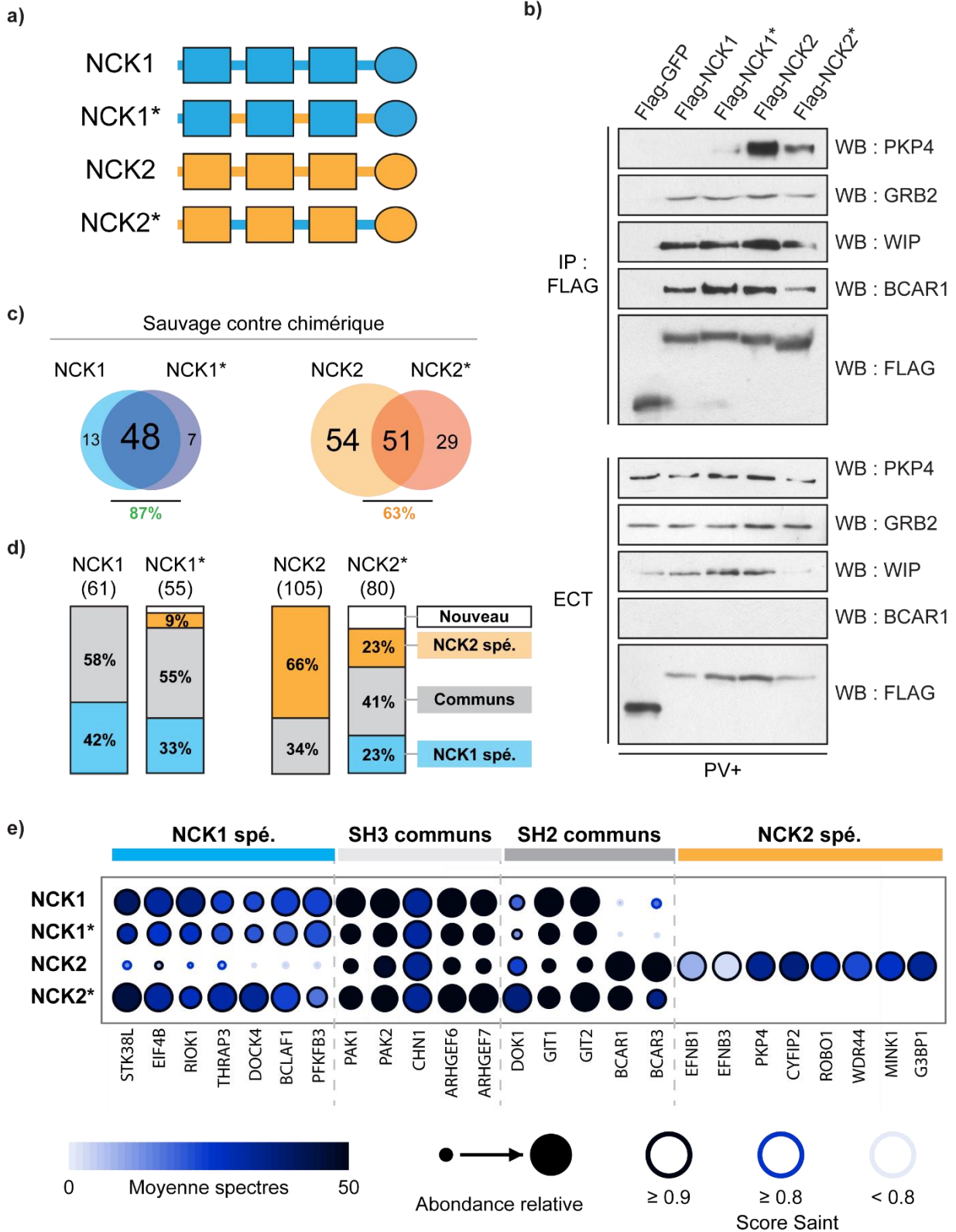
En conclusion, j'ai identifié 17 acides aminés différents entre les domaines SH2 de NCK1 et NCK2 et entrepris l'identification d'un groupe de résidus régulant la spécificité de ces domaines. Toutefois, les expériences réalisées avec des protéines NCK1/2 aux domaines SH2 commutés suggère qu'un ou plusieurs éléments dans la structure globale de ces protéines pourraient moduler la spécificité de leurs domaines SH2 respectifs. Ainsi, le contexte dans lequel ces domaines se situent pourrait être un facteur clef dans la compréhension de leur spécificité respective.

### **3.4.2 Étude de l'implication des régions interdomaines dans la spécificité des protéines adaptatrices NCK1/2**

Afin de déterminer si le contexte des SH2 de NCK1/2 est un paramètre important dans les spécificités respectives de ces domaines, j'ai inversé simultanément certaines régions entre NCK1 et NCK2 et j'ai évalué la capacité de ces NCK chimériques (notés NCK1\* et NCK2\*) à lier PKP4. J'ai tout d'abord tenu compte des résultats présentés en figures 3.6c et 3.8a démontrant que les domaines SH3 de NCK2 ne sont aucunement impliqués dans la liaison NCK2-PKP4. Par conséquent, j'ai négligé l'hypothèse qu'un de ces domaines puisse intervenir dans la liaison avec PKP4. De plus, tel que présenté en introduction, il a déjà été suggéré que la première région interdomaine de NCK2 puisse se replier et moduler la spécificité du deuxième domaine SH3 de cette protéine (Takeuchi *et al.*, 2010) (Fig.1.18d).

Ainsi, j'ai porté mon attention sur les régions interdomaines de NCK1/2, parties les moins conservées de ces protéines (Fig. 1.4). J'ai vérifié si ces dernières modulent la spécificité des domaines SH2 de NCK1/2. Pour cela, j'ai inversé les 3 régions interdomaines de NCK1 avec celles de NCK2 (Fig. 3.14a), et j'ai transfecté ces constructions dans des cellules HEK293T. Après immunoprécipitation de chacune des constructions étiquetées 3xFLAG, j'ai réalisé des immunobuvardages contre un certain nombre de protéines endogènes. Mes observations sont les suivantes. Premièrement, chacune des constructions conserve sa capacité à interagir avec des partenaires SH2 ou SH3 communs connus tels WIP et BCAR1 (Antón *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 2012), indiquant que la structure des NCK chimériques n'a pas été altérée

(Fig. 3.14b). Deuxièmement, la liaison entre NCK2\* et PKP4 endogène est entravée et récapitule parfaitement la liaison observée entre NCK1-SH2K2 et PKP4 endogène (Fig. 3.13d).



**Figure 3. 14 : La spécificité des protéines adaptatrices NCK1/2 est modulée par leurs régions interdomaines.**

**a)** Représentation des différentes constructions chimériques utilisées. **b)** Des cellules HEK293T ont été transfectées avec chacune des constructions 3xFLAG indiquées puis traitées au PV avant lyse. Chaque construction 3xFLAG a été immunoprécipitée et les interactions entre ces dernières et protéines d'intérêts endogènes ont été visualisées à l'aide d'anticorps spécifiques (n=3). **c)** Diagramme de Venn comparant l'interactome de haute confiance obtenu en AP-MS pour chaque NCK et sa version chimérique. Le pourcentage de similarité entre chaque interactome est indiqué. **d)** Histogrammes empilés permettant la visualisation de la distribution des partenaires identifiés pour chaque construction. Le nombre total de partenaires identifiés pour chaque NCK est indiqué entre parenthèses tandis que les pourcentages de chaque catégorie sont précisés. **e)** Partie représentative des résultats de MS obtenus représentés avec un graphique de type DotPlot. Chaque protéine détectée ayant un score Saint supérieur à 0.8 après analyse est représentée par un cercle. La couleur du pourtour du cercle correspond à la probabilité statistique de l'interaction. La couleur intérieure d'un cercle donné représente la moyenne des spectres obtenus pour les différents répliquas tandis que la taille du cercle reflète l'enrichissement par rapport au contrôle (n=2).

L'ensemble de ces résultats suggère qu'une ou plusieurs régions interdomaines de NCK1 pourraient réguler négativement les domaines SH2 de NCK1/2. Afin de vérifier mais également de généraliser ce constat, j'ai reconduit des essais de MS avec chacune de ces constructions. Après analyse des résultats préliminaires, mes conclusions sont les suivantes. L'interactome de NCK1\* apparaît très similaire (>87%) à celui de NCK1 (Fig.3.14c) suggérant ainsi que les régions interdomaines de NCK2 n'ont que peu d'influence sur NCK1. Toutefois, j'ai observé une perte mineure de partenaires pour NCK1\* (13 partenaires) lorsque comparé à NCK1 sauvage. À l'inverse, les interactomes de NCK2 et NCK2\* présentent une similarité plus faible (63%) et apparaissent plus divergents. J'ai notamment observé une perte massive de partenaires pour NCK2\* (54 partenaires) lorsque comparé à NCK2 sauvage (Fig. 3.14c). Également, un nombre significatif de partenaires (29) semble interagir spécifiquement avec cette construction.

Dans le but d'obtenir un meilleur aperçu de la modification de spécificité de chacune des constructions chimériques et de l'influence des régions interdomaines sur ces dernières, j'ai ensuite analysé en détail la composition des interactomes de chaque construction. Mes conclusions sont les suivantes. Premièrement, NCK1\* conserve globalement sa capacité à lier les partenaires normalement NCK1 communs ou spécifiques (Fig. 3.14d). Toutefois, 9% des partenaires normalement NCK1 spécifiques ne sont plus retrouvés avec NCK1\* (42% pour NCK1 contre 33% pour NCK1\*). Deuxièmement, cette même construction acquiert la capacité



de lier une petite quantité de partenaires normalement NCK2 spécifiques (9%). Troisièmement, NCK2\* semble fortement perdre sa capacité à lier des partenaires normalement NCK2 spécifiques (66% pour NCK2 contre 23% pour NCK2\*). Quatrièmement, sur l'ensemble des partenaires détectés avec NCK2 chimérique, environ un quart (23%) correspond à des partenaires normalement NCK1 spécifiques (Fig. 3.14d). Ainsi, l'ensemble de ces résultats suggère qu'une ou plusieurs des régions interdomaine de NCK1 pourrait moduler positivement l'interaction avec certains partenaires tandis qu'une deuxième région interdomaine régulerait négativement la spécificité du domaine SH2 de cette protéine envers certains interacteurs tel PKP4.

Afin de plus facilement visualiser ce constat et le comportement de chaque construction, j'ai ensuite utilisé une représentation de type *Dotplot* permettant de comparer simultanément plusieurs expériences de MS. J'ai ainsi pu valider que chacune des constructions conserve sa capacité à lier des partenaires SH2 ou SH3 communs mais que la majorité des partenaires NCK2 spécifiques ne sont pas retrouvés avec NCK2\* (Fig. 3.14e). En revanche j'ai pu confirmer que NCK1\* conserve sa capacité à lier les partenaires NCK1 spécifiques. Finalement, j'ai pu valider que NCK2\* acquiert partiellement la capacité de lier une partie des partenaires normalement NCK1 spécifiques tels THRAP3, DOCK4 ou EIF4B (Fig 3.14e).

L'ensemble de ces résultats suggère que la spécificité des domaines SH2 et SH3 de NCK1/2 pourrait être majoritairement régulée par les régions interdomaines qui les bordent plutôt que par les acides aminés qui les constituent.

### **3.5 Discussion**

Les expériences et analyses présentées dans ce chapitre ont rendu possible l'étude de la spécificité des protéines adaptatrices NCK1 et NCK2 et la validation de mon hypothèse initiale qui était que les protéines adaptatrices NCK1/2 peuvent chacune interagir avec des partenaires uniques pour exercer des fonctions non redondantes.

### 3.5.1 NCK1 et NCK2 interagissent chacun avec des partenaires spécifiques

J'ai pour la première fois rapporté les interactomes de haute confiance pour les protéines NCK1 et NCK2 tout en suggérant un nombre important de partenaires spécifiques pour chacune de ces protéines. En comparant mes données avec l'ensemble des interactions connues dans la littérature, j'ai pu souligner que si la majorité des interacteurs communs de NCK1/2 ont précédemment été rapportés, plus de 90% de leurs interactomes spécifiques restaient à découvrir. Ces données, pour la plupart validées par une méthode orthogonale, m'ont permis de suggérer que la différence de spécificité entre NCK1 et NCK2 repose bien sur des associations potentiellement exclusives et non sur un ensemble d'interactions mutuelles de différentes affinités.

Si la majorité des partenaires testés ne semblent pas interagir directement avec NCK1/2 ou requièrent certaines modifications post-traductionnelles non soutenues par mon approche, j'ai pu toutefois confirmer 3 partenaires directs NCK2 spécifiques : PXN, CPSF6 et PKP4. La validité de ces résultats a été appuyée par le rapport antérieur de l'interaction spécifique NCK2-PXN (Cowan and Henkemeyer, 2001), et par l'identification concomitante de l'interaction NCK2-CPSF6 via l'utilisation d'approches protéomiques à grande échelle (Huttlin *et al.*, 2015). L'ensemble de ces résultats m'a poussé vers l'étude de l'interaction spécifique de NCK2 avec PKP4 et la caractérisation des déterminants moléculaires la gouvernant. De plus, les fonctions régulées par cette protéine en ont fait un modèle de choix pour mes expériences subséquentes. Premièrement, PKP4 a été suggéré comme impliqué dans le processus d'adhésion cellulaire via sa régulation des jonctions adhérentes et des jonctions serrées (Keil, Schulz and Hatzfeld, 2013). Tel que mentionné en introduction, un certain nombre d'études n'ayant pas distingué NCK1/2 ont démontré que ces adaptateurs régulent l'adhésion cellulaire via leurs interactions avec les complexes intégrines ou cadhérines-cortactine (Tehrani *et al.*, 2007; Ren *et al.*, 2009). Ainsi, l'identification de PKP4 comme interacteur NCK2 spécifique apporte un nouvel élément de réponse sur la façon dont cet adaptateur pourrait réguler ces fonctions. Deuxièmement, PKP4 a été suggéré comme étant un régulateur clef de la cytokinèse (Wolf *et al.*, 2006), processus hautement dépendant de la dynamique du cytosquelette d'actine. Tel que mentionné précédemment, la régulation du cytosquelette d'actine correspond à la fonction la mieux décrite pour NCK1/2 (Buday, Wunderlich and Tamás, 2002). Également, l'identification par MS d'un

certain nombre de partenaire NCK2 spécifiques impliqués dans le processus de cytokinèse tels CDC42 ou PKN2 m'a conforté dans le choix de PKP4 comme modèle de spécificité (Schmidt *et al.*, 2007; Chircop, 2014). Ainsi, PKP4 permettrait simultanément d'étudier et de préciser certaines fonctions biologiques déjà reliées aux NCK (régulation des jonctions adhérentes) tout en explorant de nouvelles (cytokinèse), s'est imposé comme un partenaire de choix dans l'étude de la spécificité des protéines adaptatrices NCK1/2.

### **3.5.2 Le mécanisme d'interaction entre NCK2 et PKP4 reste à déterminer**

De manière intéressante, la quasi-totalité des études relatives à NCK1/2 a suggéré que ces protéines interagissent avec leurs partenaires via leurs domaines SH2 ou SH3 (Buday and Tompa, 2010), modules agissant de manière indépendante ou coopérative (Paensuwan *et al.*, 2016). Ce point est souligné par des nombreuses études ayant identifié un certain nombre de partenaires ne requérant qu'un seul des domaines de NCK1/2 afin de pouvoir interagir avec ceux-ci (Labelle-Côté and Larose, 2011). *A contrario*, plusieurs interacteurs tels CBL, ABL ou encore RASA1 ont été rapportés comme requérant minimalement deux domaines SH3 en tandem afin de pouvoir interagir avec les protéines NCK1 et/ou NCK2 (Adler *et al.*, 2000; Ger, Zitkus and Valius, 2011). Ces données m'ont donc poussé à assumer qu'un des domaines SH de NCK2 serait pleinement responsable de l'interaction spécifique avec PKP4 et arborerait un certain nombre de déterminants moléculaires comme vecteurs de cette spécificité.

L'ensemble de mes données, de la nécessité d'un traitement pervanadate pour pouvoir visualiser l'interaction NCK2-PKP4 à l'utilisation de domaines isolés ou constructions mutantes pleine longueur, appuie une interaction de type SH2 dépendante entre NCK2 et PKP4. De façon intéressante, j'ai pu observer une perte de spécificité lors de la surexpression de PKP4, conduisant à l'idée que NCK1 pourrait également interagir avec PKP4. Toutefois, dans un contexte biologique présentant un spectre d'interacteurs disponibles élevé, cette interaction pourrait être défavorisée au profit d'une interaction de plus forte affinité entre NCK1 et un de partenaire SH2 spécifique. De plus, une surexpression de PKP4 pourrait altérer la localisation cellulaire de la protéine et favoriser son interaction avec NCK1. Afin de répondre à cette question, il serait intéressant de visualiser les localisations cellulaires de NCK1, NCK2 et PKP4 endogènes tout en mesurant les affinités respectives de chaque NCK pleine longueur pour PKP4.

Toutefois, ce dernier point implique des techniques biochimiques requérant de définir la région de PKP4 permettant son association avec NCK2. Dans cette optique, j'ai entrepris à l'aide de mutants la caractérisation d'un motif sur PKP4 capable de lier le domaine SH2 de NCK2. En accord avec la littérature démontrant que les domaines ARM de PKP4 permettraient à cette protéine d'interagir avec une partie de ses interacteurs (Keil, Schulz and Hatzfeld, 2013), mes données suggèrent que la région 706-1005 arborant les 4 derniers domaines ARM de PKP4 serait responsable de la liaison au domaine SH2 de NCK2. Malgré la mutation de l'ensemble de tyrosines présentes sur cette portion, PKP4 conserve sa capacité à lier NCK2.

Certaines études ont suggéré que plusieurs membres de la famille protéique à laquelle PKP4 appartient pourraient oligomériser via un mécanisme par lequel la région N-terminale d'une molécule contacterait les régions ARM 6 à 8 d'une seconde molécule (Pokutta and Weis, 2000; Ishiyama *et al.*, 2010). Ce processus, indispensable pour l'agrégation des cadhérines et le renforcement subséquent des jonctions adhérentes pourrait aussi impliquer PKP4 (Ishiyama *et al.*, 2010). Ainsi, il serait intéressant de vérifier à l'aide de constructions étiquetées GFP et GST la capacité de PKP4 à dimériser. Aussi, il pourrait être pertinent de reconduire les essais de liaison avec le sextuple mutant Y/F de PKP4 et GST-NCK2 dans un lysat de cellules où PKP4 endogène aurait préalablement été supprimé via l'utilisation d'un ARN interférant ou de la technique *clustered regularly interspaced short palindromic repeats* (CRISPR). Cette dernière expérience pourrait prévenir une interaction indirecte entre NCK2 et PKP4-7/F médiée par PKP4 endogène sauvage.

Étonnamment, un essai préliminaire de liaison après déphosphorylation réalisé dans le laboratoire suggère que PKP4 déphosphorylé conserve sa capacité à lier directement NCK2 (Fig. 3.15). Bien que préliminaires, ces résultats combinés à la découverte récente de nouvelles propriétés des domaines SH2 telle leur capacité à lier des phospholipides alimentent l'hypothèse que NCK2 pourrait interagir avec PKP4 selon un mécanisme atypique jamais décrit (Park *et al.*, 2016).



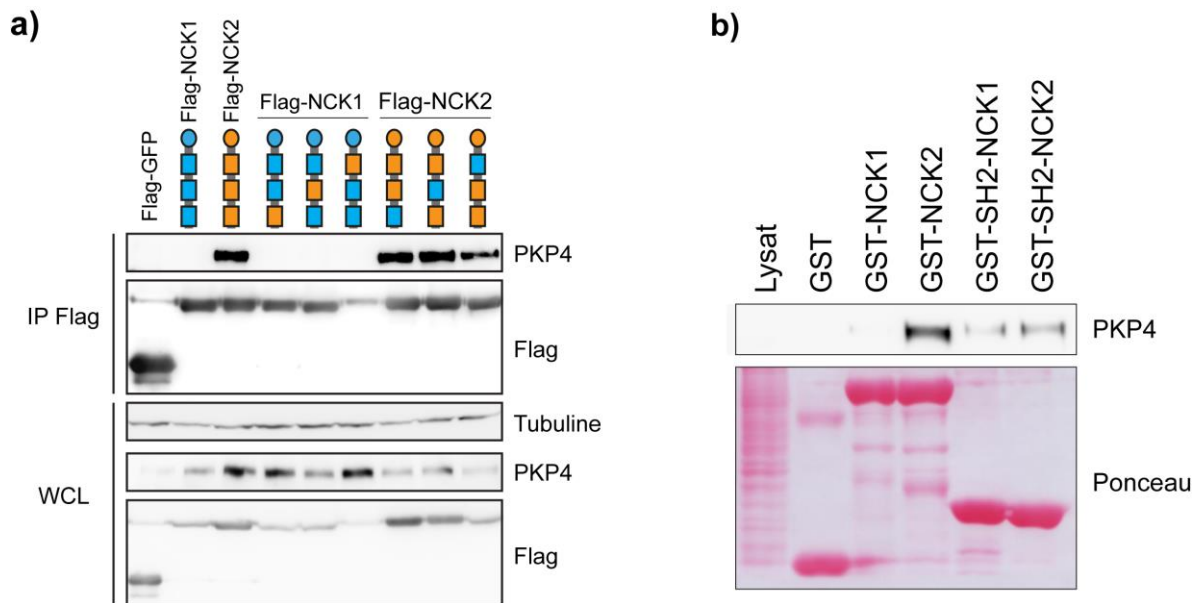
**Figure 3. 15 : PKP4 déphosphorylé conserve sa capacité à lier NCK2.**

L'interaction directe NCK2-PPK4 ne semble pas dépendre de l'état de phosphorylation des tyrosines de PPK4. Des essais de liaison direct ont été réalisés avec PPK4 immunoprécipité puis déphosphorylé ou non. Chaque membrane a été sondée avec GST-NCK2. P : phosphatase.

### 3.5.3 Influence des régions interdomaines de NCK1/2 dans leur spécificité respective

En sus, je me suis attaché à identifier les résidus sur les domaines SH2 de NCK1/2 responsables de leur spécificité. Les différents alignements réalisés ont rendu possible l'identification de 17 résidus différentiellement conservés entre NCK1 et NCK2. Toutefois, mes expériences d'inversion de groupes de résidus ou de domaines SH2 entier entre NCK1 et NCK2 suggèrent que les résidus variables entre ces domaines ne sont pas majoritairement responsables de l'association spécifique NCK2-PPK4. Ainsi, j'ai porté mon attention sur les régions interdomaines de NCK1/2, portions les moins conservées de ces protéines. J'ai pu démontrer que l'inversion de ces régions entre NCK1 et NCK2 pour créer NCK1\* et NCK2\* est suffisante pour instaurer une liaison entre NCK1\* avec PPK4 tout en entravant la liaison NCK2\*-PPK4. De plus, NCK2\* devient capable de lier certains partenaires NCK1 spécifiques tandis que la détection de certains partenaires NCK1 spécifiques avec NCK1\* semble diminuée. L'ensemble de ces résultats suggère que le SH2 de NCK1 pourrait être négativement régulé par une ou

plusieurs régions interdomaines de cette protéine. Plus globalement, l'ensemble de ces données appuie l'idée que pour un domaine donné, le contexte dans lequel celui-ci se trouve pourrait influencer positivement ou négativement la liaison de certains de ces partenaires. Ces données, en accord avec deux articles démontrant l'importance de ces régions dans l'interaction NCK1-WASP ou le contrôle de la spécificité du deuxième domaine SH3 de NCK2 rejoignent également certaines de mes données préliminaires (Takeuchi *et al.*, 2010; Okrut *et al.*, 2015). Une expérience initiale m'a permis de constater que l'inversion successive de chacun des trois domaines SH3 entre NCK1 et NCK2 demeure sans effet dans le contexte de la liaison NCK-PKP4 (Fig. 3.16a), mais aussi que le domaine SH2 isolé de NCK1 dans une certaine mesure est capable de lier PKP4 endogène (Fig. 3.16b). Finalement, les auteurs de l'étude ayant identifié le mécanisme d'autoinhibition de la première région interdomaine de NCK2 dans le contrôle de la spécificité du SH3.2 de cette protéine ont suggéré que la simple mutation du résidu thréonine 84 de cette région en proline, le résidu présent sur NCK1, est suffisante pour abolir cette autoinhibition (Takeuchi *et al.*, 2010). Ces résultats suggèrent donc que cette interaction intramoléculaire pourrait être une caractéristique propre à NCK2.



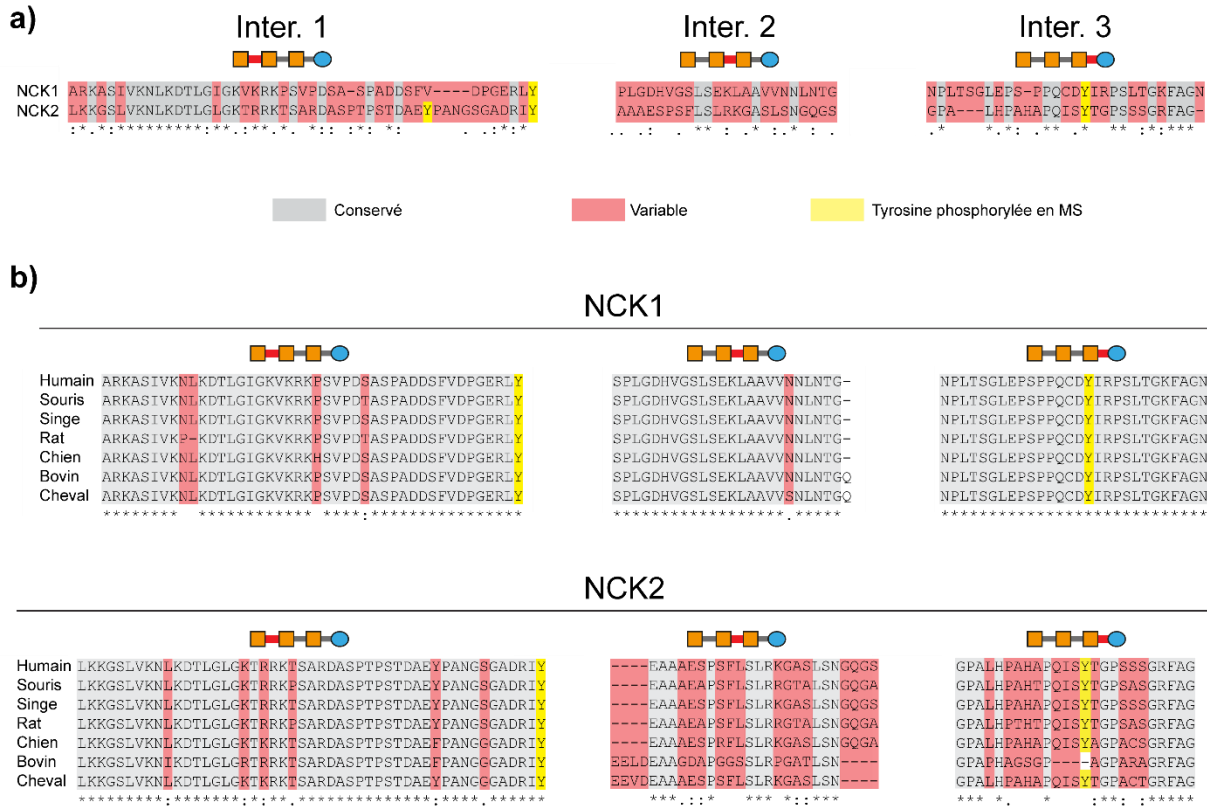
**Figure 3. 16 : La spécificité des domaines SH2 de NCK1/2 pourrait être régulée par le contexte dans lesquels ils se trouvent.**

**a)** Les domaines SH3 de NCK2 ne sont pas impliqués dans la liaison avec PKP4. Un lysat de cellules HEK293T non transfectées a été utilisé pour conduire les essais de liaison avec chaque construction GST indiquée. Les interactions ont été visualisées avec les différents anticorps spécifiques indiqués. (n=2). **b)** Le contexte des domaines SH2 de NCK1/2 est important pour

réguler la liaison à PKP4. Un lysat de cellules HEK293T non transfectées a été utilisé pour conduire les essais de liaison avec chaque construction GST indiquée. Les interactions ont été visualisées avec les différents anticorps spécifiques indiqués (n=3).

Afin de poursuivre ces études, il serait intéressant dans un premier temps de vérifier par immunobuvardage si NCK1 équipé des régions interdomaines et du domaine SH2 de NCK2 devient pleinement capable de lier PKP4. Cette expérience permettrait d'exclure définitivement l'implication potentielle des domaines SH3 dans la liaison NCK2-PKP4. Deuxièmement, il serait intéressant d'inverser successivement chacune des régions interdomaines de NCK1 avec celles de NCK2 afin d'identifier la région régulant le domaine SH2 de NCK2.

Des expériences d'alignements multiples de chacune des régions interdomaines de NCK1/2 permettent cependant d'élaborer des hypothèses. J'ai ainsi constaté que la troisième région interdomaine de NCK1 contient un motif YIRP tandis que celle de NCK2 contient un motif YTGP (Fig. 3.16). Ces deux tyrosines, retrouvées phosphorylées dans mes essais de MS pourraient virtuellement interagir avec chaque domaine SH2 à proximité et prévenir certaines interactions. Toutefois, le motif YTGP présent sur NCK2 pourrait interagir plus faiblement avec le domaine SH2 de cette protéine autorisant d'avantage certaines interactions. Également, les propriétés de cette région interdomaine de NCK2, plus courte de 3 acides aminés pourraient prévenir l'interaction de cette tyrosine avec le domaine SH2 adjacent, empêchant ainsi ce mécanisme d'autoinhibition. Ainsi, le domaine SH2 de NCK1 serait naturellement dans une conformation autoinhibée tandis que le domaine SH2 de NCK2 serait plutôt accessible. Ce paramètre combiné à une affinité plus élevée du domaine SH2 de NCK2 pour PKP4 véhiculée par la présence d'acides aminés différenciellement conservés entre NCK1/2 pourrait expliquer la spécificité de ces domaines. Finalement, il n'est pas à exclure qu'une ou plusieurs régions interdomaines de NCK2 puissent aussi stabiliser et favoriser la liaison NCK2-PKP4. De manière générale, le fait que les régions interdomaines de NCK1 semblent beaucoup plus conservées que celles de NCK2 argumente en faveur de ces hypothèses (Fig. 3.17). Finalement, il serait également intéressant de mesurer l'affinité de la région interdomaine identifiée et du motif qu'elle arbore pour le domaine SH2 isolé de NCK1 et NCK2. Des expériences de titration calorimétrique isotherme (ITC) ou de fluorescence polarisée (FP) pourraient être ainsi envisagées afin de compléter ces études et pleinement caractériser la spécificité biochimique des domaines SH2 des protéines adaptatrices NCK1 et NCK2.



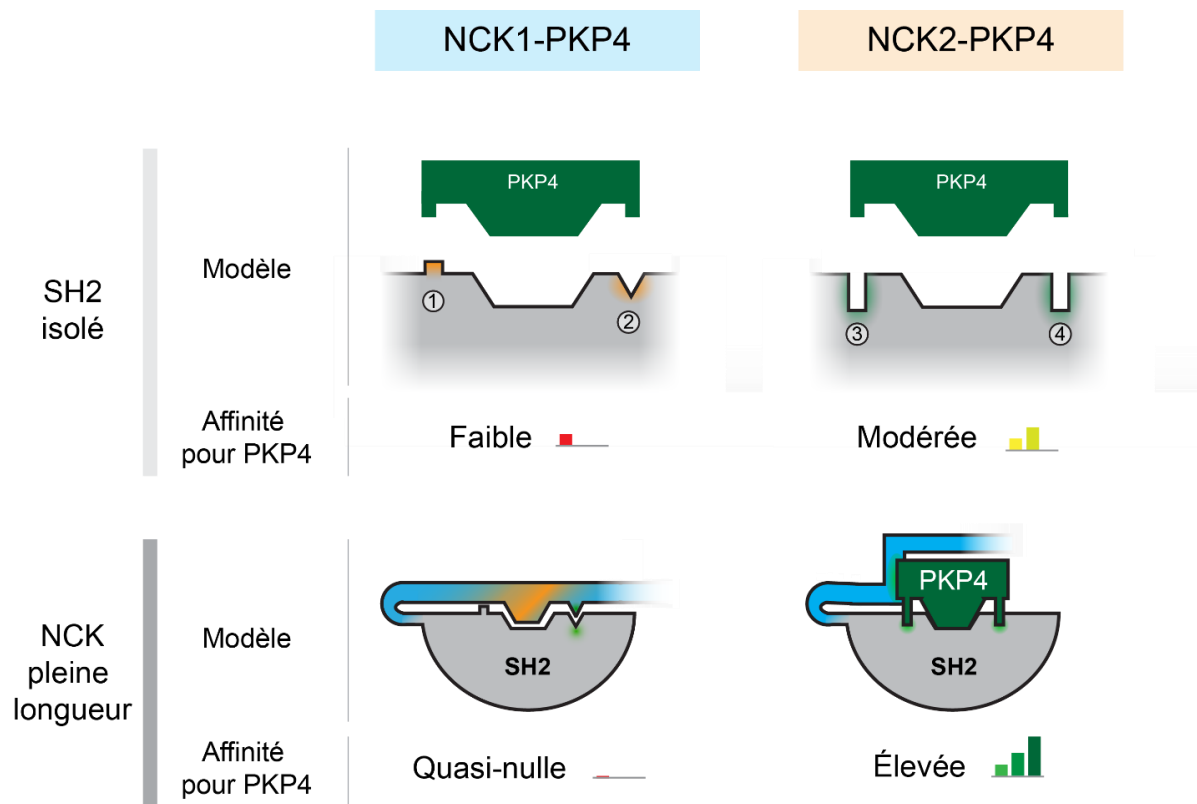
**Figure 3. 17 : Les régions interdomaines de NCK1 sont plus conservées que celles de NCK2.**

**a)** Comparaison des régions interdomaines de NCK1 et NCK2 humains. Chaque région interdomaine de NCK1 a été alignée avec celle de NCK2. Les acides aminés non conservés sont indiqués en rouges tandis que les tyrosines retrouvées phosphorylées dans mes essais de MS (Fig. 2.1a et 3.1b) sont indiquées en jaune. **b)** Comparaison des régions interdomaines de NCK1 et NCK2 à travers l'évolution. Les régions interdomaines de NCK1 ou NCK2 de différentes espèces ont été alignées. Les régions interdomaines de NCK1 apparaissent généralement plus longues et mieux conservées.

En conclusion, mes résultats apportent une preuve de concept importante validant que NCK1 et NCK2 peuvent chacun s'associer avec des partenaires uniques. Ces résultats rejoignent un certain nombre d'études isolées suggérant que chacune de ces protéines pourraient interagir avec des partenaires spécifiques pour réguler des fonctions uniques. Mes travaux complètent ces résultats et proposent pour la première fois une caractérisation des interactomes des protéines adaptatrices NCK1 et NCK2, ainsi que la validation de nouveaux partenaires spécifiques à NCK2. Également, mes résultats permettent de suggérer que le contexte dans lequel un domaine est situé pourrait également participer à sa spécificité (Fig.3.18). Ce type de



mécanisme permettrait d'expliquer la spécificité des domaines SH2 d'un même groupe, domaines similaires pour lesquels aucun mécanisme de spécificité n'a à ce jour été proposé. Bien que ce modèle ainsi que la dernière partie de mes résultats soit encore préliminaire, et que l'origine même du mécanisme de régulation de la spécificité des domaines SH2 de NCK1/2 reste à définir, mes travaux constituent une avancée majeure vers la compréhension de la spécificité des protéines adaptatrices NCK1 et NCK2 et de l'organisation générale des réseaux de signalisation.



**Figure 3. 18 : La spécificité des domaines SH2/SH3 des protéines NCK1/2 pourrait être modulée par les contextes dans lesquels ils se trouvent.**

La présence de déterminants moléculaires différents (notés 1 à 4) au sein des domaines SH2 de NCK1 et NCK2 pourraient expliquer que le domaine SH2 de NCK2 serait naturellement affiné pour PKP4 tandis que celui de NCK1 n'aurait que peu d'affinité pour PKP4. Certaines régions des protéines pleine longueur telles les régions interdomaines pourraient exacerber cette spécificité. Une région interdomaine de NCK1 préviendrait l'interaction entre le domaine SH2 et PKP4 tandis qu'une région interdomaine de NCK2 la favoriserait. Chaque motif ou région favorisant l'interaction NCK-PKP4 est coloré en vert tandis que chaque élément la prévenant est coloré en orange. Les éléments neutres sont en gris tandis que les régions extra-domaines modulant la spécificité de ces derniers sont colorées en bleu.

## 3.6 Matériel et méthodes

### 3.6.1 Constructions et clonage

Les séquences murines de NCK1 (NCBI clone NM010878.3), NCK2 (NCBI clone NM010879.3) sauvages et SH2 mutantes ainsi que GRB2 (NCBI clone NM\_002086), N-WASP (NCBI clone NM001110365.1) et l'ensemble des partenaires testés ont été clonés dans le vecteur pcDNA3.1 (Thermo Fisher Scientific) avec une étiquette 3xFLAG (Sigma-Aldrich) en position N-terminale. Les partenaires WIPF1 (Clone MHS6278-202800932), EIFB2 (Clone MHS6278-202825855), EIF4B (Clone MHS6278-202759243), MOB2 (Clone MHS6278-202809106), PPM1B (Clone MHS6278-202758210), RASA1 (Clone MHS6278-202807517), SHF (Clone MHS6278-202857523), SNRPB (Clone MHS6278-202826072), SPIN1 (Clone MHS6278-202756919), STK38L (Clone MHS6278-202807055), TEAD3 (Clone MHS6278-202760031), THRAP3 (Clone MHS6278-211689716), WDR77 (Clone MHS6278-202756033), ABI1 (Clone MHS6278-202828588), ABI2 (Clone MHS6278-202827162), CAP1 (Clone MHS6278-202826588), CBLB (Clone MHS6278-202808290), CPSF6 (Clone MHS6278-202826313), LIMS1 (Clone MHS6278-202839448), PAK3 (Clone MHS6278-211687776), PKPK1 (Clone MHS6278-202800774), PXN (Clone MHS6278-202755606), RBM15 (Clone MHS6278-202831300) et WASF1 (Clone MHS1010-202744239) originaires de la banque Dharmacon ont généreusement été offerts par le Dr Mathieu Laplante, CRIUCPQ, Université Laval. Les constructions SOS1 (Clone V94087), ADAM15 (Clone V66050), NCKAP1 (Clone V66101), PKP4 (Clone V67738) et TAOK2 (Clone V99557) ont été obtenus via la banque OpenFreezer, Institut de recherche Samuel Lunenfeld, Toronto. Les constructions PAK1, P53, P73, AXIN1, AXIN2 et SAM68 ont respectivement et gentiment été fournies par les laboratoires des Dr Tom Moss (Université Laval), Dr David Kaplan (Université de Toronto), Dr Stephane Angers (Université de Toronto) et Dr Marc-Étienne Huot (Université Laval). NCK1/2 sauvages ou mutants W/K (NCK1 : W37K, W143K, W229K ; NCK2 : W38K, W148K, W234K) et RXM (NCK2 : R311M) étiquetés SBP ou GST en position N-terminale ont respectivement été clonés dans les vecteurs pcDNA3.1 et pGEx 4T3. Pour expression de façon stable, NCK1 et NCK2 ont également été clonés dans le vecteur pMSCVpuro (Clontech) avec une étiquette N-terminale

3xFLAG ainsi que dans le vecteur FLAG-BirA\*-pcDNA5-FRT-TO (Thermo Fisher Scientific) également étiquetés en position N-terminale.

Les différents mutants ponctuels de NCK1/2 ou PKP4 ont été générés en utilisant la polymérase Q5 (New England Biolabs). Les différentes inversions de domaines ou régions interdomaines de NCK1/2 ont été réalisées à l'aide du kit *Gibson assembly* (New England Biolabs) selon les instructions fournies par le détaillant. Le multiple mutant 7/F de PKP4 a été cloné à l'aide d'un gBlock (IDT).

### 3.6.2 Culture cellulaire

Les cellules HEK293T ou Flp-In T-REx HEK293 ont été cultivées dans du Dulbecco's Modified Eagle's medium high glucose (DMEM, Thermo Fisher Scientific) supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (Sigma-Aldrich). Les cellules exprimant de façon stable 3xFLAG-NCK1/2 ont été sélectionnées avec  $1.5 \mu\text{g.ml}^{-1}$  de puromycine (Thermo Fisher Scientific). Les cellules HEK293T Flp-In T-Rex exprimant NCK1/2 fusionnées à l'enzyme BirA\* ont été générées telles que précédemment décrites (Lambert *et al.*, 2015), et sélectionnées puis cultivées en présence de  $150 \mu\text{g.ml}^{-1}$  d'hygromycine (Thermo Fisher Scientific). L'expression protéique a été induite avec  $1 \mu\text{g.ml}^{-1}$  de tetracycline pendant 24 h. Pour les expériences de BioID,  $50 \mu\text{M}$  de biotine ont été ajoutés au moment de l'induction. Les cellules HEK293T ont été transfectées transitoirement à l'aide de Polyéthylèneimine (PEI) pendant 36h. Lors d'un traitement PV, du sodium orthovanadate (Sigma-Aldrich) préactivé avec 30% de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (1: 200) (pervanadate) a été ajouté dans le milieu de culture à une concentration finale de  $100 \mu\text{M}$  pendant 20 min.

### 3.6.3 Immunoprécipitations

Les immunoprécipitations ont été réalisées telles que précédemment décrites (Dionne *et al.*, 2018). Brièvement, les cellules transfectées à confluence ont été lavées une fois au PBS. L'extrait cellulaire total a été obtenu en grattant sur glace les cellules dans du tampon de lyse supplémenté avec des inhibiteurs de protéases (Sigma-Aldrich P8340) et phosphatases (Sigma-Aldrich). Les lysats, incubés 30 minutes sur glace ont ensuite été centrifugés 20 minutes à  $20.000\text{g}$  puis conservés jusqu'à utilisation. Les lysats ont été incubés sous agitation pendant 2h

avec des billes FLAG-M2 agarose (Sigma-Aldrich) à 4°C. Ces dernières ont été lavées 3 fois avec du tampon de lyse et utilisées pour les expériences de MS ou d'immunobuvardages.

### 3.6.4 Immunobuvardages et anticorps

Les immunobuvardages ont été réalisés tels que précédemment décrits (Dionne *et al.*, 2018). Brièvement, les lysats cellulaires ou les extraits purifiés ont été séparés sur des gels de polyacrylamide avec des concentrations comprises entre 8 et 10% puis transférés sur des membranes de nitrocellulose. Après incubations avec les différents anticorps indiqués, le signal généré par les anticorps secondaires conjugués à l'enzyme HRP a été révélé en utilisant le *Clarity Western ECL Substrate* (Bio-Rad) en combinaison avec des films autoradiographiques de type Hyblot CL (Denville) ou un Amersham Imager 600RGB (GE Healthcare). Anticorps primaires utilisés : lapin Pan-NCK (Cadeau du laboratoire du Dr Tony Pawson), lapin anti-NCK1 (Cell Signalling Technology, #2319), souris anti-NCK2 (Abnova, #MAB2727), lapin anti-FLAG (Sigma-Aldrich, #F7425), souris anti-actine (Cell Signalling Technology, #3700), souris anti-tubuline (DSHB, #E7), souris anti-CPSF6 (Abcam, #99347), souris anti-PKP4 (PROGEN, #651166), souris anti-BCAR1 (Santa Cruz, #sc-860), lapin anti-PAK1 (Santa Cruz, #sc-881), souris anti-GRB2 (BD Biosciences, #610111) et lapin anti-WIP (Santa Cruz, #sc-25533). Anticorps secondaires ou primaires directement conjugués à l'enzyme HRP utilisés : cheval anti-souris IgG (Cell Signalling Technology, #7076), chèvre anti-lapin (Cell Signalling Technology, #7074), souris anti-FLAG M2-HRP (Sigma-Aldrich, #F1804) et lapin anti-g (Novus Biologicals, #NB600-388).

### 3.6.5 Traduction *in vitro*

Chaque traduction *in vitro* a été réalisée avec le kit PROMEGA *TnT® Coupled Reticulocyte Lysate Systems* selon les instructions fournies par le fabricant. Brièvement, les différents mélanges ont été assemblés puis incubés 90 minutes à 30 degrés. Les pourcentages indiqués sur chaque figure ont été prélevés et conservés comme extraits cellulaires totaux. Chacune des traductions a ensuite été divisée entre les différents essais de liaison tel qu'antérieurement mentionné.

### 3.6.6 Essais de liaison

Les différents essais de liaison avec GST-NCK1/2 ont été réalisés tels que précédemment décrits (Einarson, 2004). Brièvement, après purification de chaque construction GST en bactérie, chaque lysat cellulaire ou traduction *in vitro* a été prélevé avec 25µL de billes GST solides et 5µg de GST seul pendant 2h à 4°C. Les lysats PV- ou PV+ ainsi que les traductions *in vitro* ont ensuite été centrifugées 2 minutes à vitesse max, réparties entre les différents essais (1 pétris 10cm pour 3 essais ou 2 traductions pour 3 essais) puis incubées sous agitation avec 10µg de protéines étiquetées GST précédemment purifiées. Les billes ont ensuite été lavées 4 fois avec du tampon de lavage, rependues dans du Laemmli et conservée à -20°C jusqu'à utilisation ultérieure.

### 3.6.7 Essai de liaison direct (*Far western*)

Chaque essai de liaison a été réalisé tel que précédemment décrit (Wu, Li and Chen, 2007). Brièvement, chaque membrane arborant une construction préalablement exprimée en cellules HEK293T et purifiée tel que décrit dans la section 3.6.3 a été sondée avec 2.5µg de protéine étiquetée GST *overnight* à 4°C. Chaque membrane a ensuite été lavée 3 fois 10 minutes et un immunobuvardage anti-GST a été réalisé tel que mentionné dans le chapitre 3.

### 3.6.8 Essai phosphatase

Brièvement, après immunoprécipitation, transfert sur membrane de 3xFLAG-PKP4 et blocage de ces dernières, chacune des membranes a été équilibrée dans le tampon phosphatase composé de 100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM dithiothréitol ajusté à pH 7.9. Chaque membrane a ensuite été traitée avec de la phosphatase (Abcam) pendant 1 heure à 37 degrés). Les membranes ont ensuite été rincées 5 fois et un essai de liaison direct a été réalisé tel que mentionné en section 3.6.7.

### **3.6.9 Réseau peptidique (*Peptide array*)**

Un ensemble de 108 peptides d'une longueur de 13mer couvrant les 49 tyrosines de l'isoforme longue de PKP4 a été synthétisé en triplicata sur 3 membranes par le laboratoire de Dr Guy Poirier. Chaque membrane a ensuite été sondée avec 30µg de protéine étiquetée GST pendant 1h30 à température pièce. Chaque membrane a ensuite été lavée 3 fois et un immunobuvardage anti-GST a été réalisée tel que mentionné en section 3.6.4.

### **3.6.10 Spectrométrie de masse**

L'ensemble des expériences de spectrométrie de masse ont été réalisées telles qu'abordé dans les sections 2.7.

### **3.6.11 Analyses informatiques**

L'ensemble des analyses de spectrométrie de masse ont été réalisées telles que décrit dans la section 2.7.

L'outil *Dotplot Generator* (<http://prohibitools.mshri.on.ca/Dotplot/Dotplot.php>) a été utilisé afin de visualiser l'ensemble des interactions présentées en figure 3.14e ) (Knight *et al.*, 2015).

L'ensemble des alignements ont été réalisés à l'aide de l'outil T-Coffee (<http://tcoffee.crg.cat/>). Chaque ajout a ensuite été réalisé grâce au logiciel Adobe Illustrator.

Les domaines SH2 de NCK1 et NCK2 complexés ou non ont été représentés à l'aide du logiciel Pymol.

## **Chapitre 4 : Discussion générale**

L'hypothèse de mon projet de doctorat postulait que les protéines adaptatrices NCK1 et NCK2 ne sont pas complètement redondantes dans leurs fonctions. L'objectif principal de mon projet consistait à étudier la spécificité des protéines NCK1/2 en identifiant pour chacune des cibles uniques tout en caractérisant l'origine de cette spécificité et la fonction de ces interactions. J'ai mis en évidence qu'un certain nombre de partenaires interagissent spécifiquement avec NCK1 ou NCK2 (Fig. 2.1a, 3.1b). J'ai ensuite étudié les déterminants moléculaires responsables de cette spécificité (Chapitre 3) tout en décrivant une nouvelle fonction biologique dans laquelle NCK2 est spécifiquement impliqué (Chapitre 2).

### **4.1 NCK1 et NCK2, deux protéines adaptatrices capables de lier des partenaires spécifiques à travers certains mécanismes de spécificité impliquant plus que leurs domaines individuels**

Les différentes fonctions des protéines adaptatrices NCK1 et NCK2 dans la signalisation cellulaire sont véhiculées par leurs capacités à interagir avec différentes combinaisons de récepteurs et/ou d'effecteurs cytoplasmiques (Flynn, 2001; Labelle-Côté and Larose, 2011). L'identification d'un certain degré de redondance entre NCK1/2 matérialisé par des fonctions biologiques communes et des partenaires similaires a conduit à la généralisation que NCK1 et NCK2 sont deux protéines plutôt redondantes. Dans cette optique, je me suis attardé à étudier la spécificité des protéines adaptatrices NCK1 et NCK2 en définissant leurs interactomes puis en caractérisant certaines interactions spécifiques.

#### **4.1.1 NCK2 lie PKP4 via un mécanisme complexe**

Afin de mieux caractériser la spécificité des protéines adaptatrices NCK1 et NCK2, j'ai conduit des essais de MS dans le but de définir les interactomes de chacune de ces protéines. J'ai identifié plus d'une quarantaine de protéines interagissant spécifiquement avec NCK1 ou NCK2 (Fig. 2.1a, 3.1b). La sélection de certains partenaires (Tableau 3.2) et la validation de leur interaction par plusieurs méthodes orthogonales (Fig. 3.3, 3.4b, 3.6a) m'ont conduit à

étudier l'interaction spécifique de NCK2 avec PKP4, une protéine impliquée dans la régulation des jonctions adhérentes et de la cytokinèse (Keil, Schulz and Hatzfeld, 2013). L'ensemble de mes données suggère que le domaine SH2 de NCK2 interagirait directement et spécifiquement avec PKP4 (Fig. 3.6c,d, 3.9g). En effet, la détection de l'interaction NCK2-PKP4 uniquement lors de l'utilisation de pervanadate (Fig. 3.6a) suggère que minimalement une phosphotyrosine de PKP4 est requise pour lier le domaine SH2 de NCK2. De plus, la perte de liaison observée lors de la mutation sur ce domaine du résidu R311 situé dans la poche de liaison de la phosphotyrosine (Fig. 3.6c,d) suggère que cette structure est essentielle à la liaison.

Lors de la poursuite de la caractérisation de cette interaction, j'ai pu observer une perte de spécificité lorsque la protéine PKP4 était surexprimée (Fig. 3.8). J'ai alors voulu mesurer et comparer les affinités respectives de NCK1 et NCK2 pour PKP4. Dans cette optique, j'ai entrepris la caractérisation d'un motif sur PKP4 capable de lier le domaine SH2 de NCK2. En accord avec la littérature démontrant que la région 706-1005 médierait une partie des interactions entre PKP4 et ses partenaires (Keil, Schulz and Hatzfeld, 2013), j'ai pu déterminer que cette même portion serait responsable de l'interaction directe avec le domaine SH2 de NCK2 (Fig. 3.9). Toutefois, la mutation de l'ensemble des tyrosines de cette portion n'a pas été suffisante pour abolir la liaison entre NCK2 et PKP4 (Fig. 3.9g). De plus, un essai préliminaire de liaison après déphosphorylation réalisé dans le laboratoire suggère que PKP4 déphosphorylé conserve sa capacité à lier directement NCK2 (Fig. 3.15). De manière surprenante, j'ai démontré une absence de liaison entre NCK2 et PKP4 lors de l'utilisation de la portion 706-1005 isolée, mais aussi un gain de liaison lorsque la partie N-terminale isolée de PKP4 est utilisée (Fig. 3.9c,d). Ainsi, il n'est pas exclu que l'utilisation de tronctions de PKP4 ait pu altérer la structure globale de la protéine aboutissant à l'exposition ou au masquage de certains résidus clefs situés sur la protéine.

L'ensemble de ces observations ne m'ont pas permis de définir un motif précis sur PKP4 responsable de l'interaction NCK2-PKP4 et laisse supposer que d'autres mécanismes pourraient expliquer cette interaction.



#### 4.1.1.1 L'oligomérisation de PKP4 pourrait expliquer son interaction avec NCK2

Il est important de souligner que pour la majorité des études rapportant une interaction entre PKP4 et un partenaire telle la VE-cadhérine (Calkins *et al.*, 2003), ou encore RHOA et ECT2 (Wolf *et al.*, 2006; Keil *et al.*, 2007), aucun motif de liaison n'a été proposé. Il est donc possible que la protéine PKP4 interagisse avec ses partenaires via un mécanisme complexe impliquant plusieurs régions et rendant ainsi difficile la caractérisation de ces interactions.

De plus, tel que mentionné précédemment, plusieurs membres de la famille protéique à laquelle PKP4 appartient pourraient oligomériser via un mécanisme selon lequel la région N-terminale d'une molécule contacterait les régions ARM 6 à 8 d'une seconde molécule (Pokutta and Weis, 2000; Ishiyama *et al.*, 2010). Il serait intéressant d'étudier si un hétérodimère PKP4 sauvage/mutant permet l'interaction indirecte entre NCK2 et PKP4 muté. De ce fait, il serait pertinent de reconduire les différents essais de liaison réalisés entre GST-NCK2 purifié en bactérie et les différents mutants 3xFLAG-PKP4 exprimés en cellules dans lesquelles PKP4 endogène aurait préalablement été supprimé. Pour ce faire, un ARN interférent préalablement validé pourrait être utilisé pour réduire les niveaux de PKP4 endogène ou alors, la technique CRISPR pourrait être employée afin de totalement supprimer l'expression de la protéine.

#### 4.1.2 Les domaines SH2 : le classique, l'atypique et le versatile

Au-delà des mécanismes de liaison classiques sur phosphotyrosine précédemment décrits, un certain nombre d'exemples de liaisons atypiques de SH2 ont été rapportés. Il a ainsi été identifié que le domaine SH2 de la protéine ABL peut lier les protéines *Breakpoint cluster region protein* (BCR) et SHC via 2 régions dépourvues de phosphotyrosine, mais riches en phosphosérines et thréonines (Pendergast *et al.*, 1991; Raffel, Parmar and Rosenberg, 1996). Il a également été suggéré que plusieurs autres domaines SH2 tels ceux des protéines SRC et Phospholipase C gamma (PLC $\gamma$ ) peuvent lier des partenaires contenant ce type de régions tel BCR (Muller *et al.*, 1992). Malgré la publication de ces études suggérant que ce type de liaison pourrait concerner un nombre significatif de domaines SH2, aucun mécanisme précis ou motif particulier n'a été proposé.

Par la suite et de manière similaire à mes résultats, le domaine SH2 de la protéine SAP a été identifié comme capable de lier la Y281 de SLAM et ce, même lors de la mutation de ce

résidu en phénylalanine (Sayos *et al.*, 1998). L'utilisation de peptides tronqués a permis la mise en évidence du premier mécanisme de liaison phosphotyrosine-indépendant et de proposer un modèle étendant la flexibilité et le spectre d'interacteurs potentiels des domaines SH2. Premièrement, les auteurs ont confirmé que la séquence en aval de la tyrosine permet de reconnaître le résidu phosphorylé. Deuxièmement, ils ont proposé que la séquence globale dans laquelle cette tyrosine est intégrée incluant la séquence en amont de celle-ci permettrait de reconnaître ce résidu non phosphorylé (Li *et al.*, 1999). Dans ces deux conformations, les différents peptides lient le domaine SH2 de façon similaire. La mutation de l'arginine conservée du SH2 est suffisante pour prévenir la liaison (Li *et al.*, 1999). La publication subséquente des structures cristallographiques du domaine SH2 de SAP en complexe avec des peptides arborant la Y281 de SLAM phosphorylée ou non ont permis de préciser ce mécanisme de liaison atypique. Les auteurs ont ainsi déterminé que les tyrosines phosphorylées ou non s'insèrent dans la poche de liaison de manière similaire (Poy *et al.*, 1999). Cependant, la tyrosine phosphorylée apparaît beaucoup plus figée dans la poche de liaison. Toutefois, son homologue non phosphorylée semble beaucoup plus mobile, autorisant ainsi des contacts supplémentaires entre le peptide et le domaine SH2. L'ensemble de ces résultats a permis de proposer le premier motif de liaison consensus non phosphorylé : **S/TIYXX(V/I)** (Poy *et al.*, 1999).

Ce mécanisme atypique a par la suite permis d'expliquer la liaison entre d'autres SH2 et certains partenaires. On citera par exemple la liaison entre le domaine SH2 de la protéine Tensine-4 et la région riche en sérines et thréonines du partenaire *Deleted in liver cancer 1* (DLC-1) ayant permis de confirmer le motif précédemment proposé (Liao *et al.*, 2007; Dai *et al.*, 2011).

De manière intéressante, PKP4 n'arbore qu'un seul motif de ce type situé en position 1001 (**SIYKKD**), précisément dans la région identifiée indispensable pour la liaison à NCK2. La liaison d'une tyrosine non phosphorylée de PKP4 avec le domaine SH2 de NCK2 pourrait expliquer mes résultats. Cela permettrait également à PKP4 de conserver une certaine flexibilité autorisant ainsi une des régions interdomaine de NCK2 à stabiliser cette interaction. Ainsi, il serait intéressant de muter en alanine la tyrosine 1001 ou l'ensemble des tyrosines de la portion 706-1005 afin de confirmer l'importance de chacun de ces résidus dans la liaison avec NCK2.

Cependant, cette hypothèse de liaison atypique s'oppose à première vue avec mes résultats démontrant que l'interaction NCK2-PKP4 survient uniquement lors d'un traitement

PV (Fig. 3.6a), et donc, qu'une phosphotyrosine de PKP4 est requise pour lier NCK2. Toutefois, les résultats présentés en figure 3.6a suggèrent que les niveaux de PKP4 endogène sont beaucoup plus élevés lors d'un traitement PV. Ce type d'inhibition pourrait indirectement favoriser la liaison NCK2-PKP4 en stabilisant PKP4 via l'inhibition d'une ou plusieurs phosphatases directement ou indirectement responsables de la dégradation de PKP4. Afin de préciser l'interaction NCK2-PKP4 et pouvoir discriminer entre un mécanisme de liaison typique ou atypique, il pourrait également être pertinent de visualiser l'état de phosphorylation de PKP4 lorsque co-immunoprécipité avec NCK2. Ce type d'expérience pourrait ainsi permettre de distinguer si PKP4, lorsque interagissant avec NCK2, est préférentiellement phosphorylé sur tyrosine ou sur sérine/thréonine.

Finalement, au-delà de la reconnaissance d'un motif atypique, il a été suggéré que les domaines SH2 puissent être beaucoup plus versatiles qu'initialement envisagé en reconnaissant des résidus complètement différents d'une tyrosine. Il a été proposé qu'un second site de liaison sur le domaine SH2 de la protéine PLC $\gamma$  permet la liaison de la kinase RAF à ce domaine de manière tyrosine-indépendante (Fang *et al.*, 2002). La mutation du résidu arginine du domaine SH2 de PLC $\gamma$  étant sans effet sur la liaison PLC $\gamma$ -RAF, il a été suggéré que ce site fonctionnerait de manière complètement indépendante de la poche de liaison à la tyrosine (Fang *et al.*, 2002). Toutefois, la perte de liaison observée entre NCK2 et PKP4 lors de la mutation de l'arginine 311 de NCK2 (Fig. 3.6c,d) suggère que cet exemple isolé ne s'applique pas à l'interaction NCK2-PKP4.

#### **4.1.3 NCK1 et NCK2 interagissent avec des partenaires spécifiques tel PKP4 via un mécanisme de spécificité impliquant les régions interdomaines**

Une étude a initialement démontré que les propriétés *in vitro* des domaines SH2 isolés de NCK1 et NCK2 sont virtuellement identiques (Frese *et al.*, 2006). Cependant, l'ensemble de mes données soutient que le SH2 de NCK2 s'associe spécifiquement avec PKP4. Basée sur ces résultats, mon approche initiale supposait que la présence de résidus uniques au sein du domaine SH2 de NCK2 serait suffisante pour expliquer la liaison spécifique à PKP4. J'ai ainsi initialement utilisé les domaines SH2 isolés de NCK1/2 dans différentes séries d'expériences tels les essais de liaison sur *peptide array* (Fig. 3.9a). En accord avec l'étude publiée (Frese *et al.*, 2006), j'ai constaté que les profils de liaison des domaines SH2 isolés de NCK1/2 sont en

effet très similaires. De façon inattendue, le transfert du domaine SH2 de NCK2 sur NCK1 n'a pas permis d'instaurer une liaison entre NCK1 et PKP4 (Fig. 3.13d). Aussi, une inversion de domaine SH2 entre NCK1 et NCK2 n'est pas suffisante pour pleinement récapituler les profils de liaison des protéines sauvages. De plus, mes résultats préliminaires suggèrent que les domaines isolés de NCK1 et NCK2 peuvent lier PKP4 endogène de façon similaire (Fig. 3.16b). Ces résultats tendent vers l'hypothèse que les domaines SH2 de NCK1/2 et les résidus uniques que chacun arbore ne sont pas pleinement responsables de leurs propres spécificités et que plusieurs éléments au sein de la structure de ces protéines seraient importants dans le contexte de leur spécificité.

#### **4.1.4 Les régions interdomaines de NCK1/2 pourraient moduler la spécificité de leurs différents domaines SH2 et SH3**

L'ensemble de mes résultats ainsi que la faible similarité entre les régions interdomaines de NCK1/2 combinée à quelques articles témoignant de l'importance de ces régions dans la fonction de NCK1/2 m'ont amenés à étudier l'importance de régions interdomaines de NCK1/2 dans la spécificité de ces protéines adaptatrices (Takeuchi *et al.*, 2008; Okrut *et al.*, 2015). De manière intrigante, le transfert des régions interdomaines de NCK1 sur NCK2 conduit à un changement drastique d'interactome matérialisé par la perte d'un grand nombre de partenaires SH2 spécifiques et un gain significatif de partenaires potentiellement SH3-spécifiques (Fig. 3.14). À l'inverse, le positionnement des régions interdomaines de NCK2 sur NCK1 n'a que peu d'effet. De plus, mes résultats préliminaires suggèrent que le SH2 isolé de NCK2 lierait moins efficacement PKP4 que NCK2 pleine longueur tandis que le SH2 isolé de NCK1 acquiert la capacité de lier PKP4, contrairement à la protéine entière (Fig. 3.16b). Ainsi, il n'est pas exclu qu'une région interdomaine de NCK2 puisse moduler positivement la spécificité du domaine SH2 de cette protéine tandis qu'une région interdomaine de NCK1 puisse la réguler négativement.

Par le passé, des mécanismes d'autoinhibition entre le domaine SH2 d'une protéine donnée et une tyrosine située sur cette même protéine ont déjà été proposés. C'est le cas par exemple des protéines de la famille SRC, autoinhibées lorsque leur domaine SH2 central se replie sur leur portion C-terminale contenant une tyrosine pouvant être phosphorylée (Hubbard, 1999; Xu *et al.*, 1999). De plus, la cristallisation de plusieurs membres de cette famille tels c-

SRC ou l'*Hematopoietic cell kinase* (HCK) a révélé que les domaines SH3 de ces protéines sont capables d'interagir avec la région interdomaine reliant le domaine SH2 au domaine kinase (Sicheri, Moarefi and Kuriyan, 1997; Xu, Harrison and Eck, 1997). Ce type d'interaction intramoléculaire place le domaine SH3 dans une conformation inactive, prévenant toute interaction avec ses partenaires. Ainsi, il n'est pas exclu que les propriétés des domaines isolés de NCK1 et NCK2 soient similaires, mais que des mécanismes d'autoinhibition reposant sur les régions les moins conservées de ces protéines permettent de moduler la spécificité de ces domaines. Pour tester cette hypothèse, il serait intéressant de mesurer pour chaque NCK, la capacité de chacune de ses régions interdomaines à lier chacun de ses domaines. Pour cela, il serait possible de conduire des essais de liaison indirects ou de *Far western* avec chacun des domaines isolés, étiquetés GST et purifiés en bactérie puis mis en présence d'un lysat de cellules exprimant chacune des régions interdomaines étiquetées GFP. Les expériences d'essais de liaison indirects offriraient ainsi un aperçu initial de la capacité de chaque région interdomaine à lier un domaine particulier tandis que les expériences de *Far western* permettraient de valider ces résultats tout en identifiant les régions interdomaines capables de lier directement chaque domaine. Ces résultats permettraient de cataloguer chaque région interdomaine en fonction de sa capacité à lier un domaine particulier mais surtout, d'identifier des régions se comportant différemment entre NCK1 et NCK2. En fonction de ces résultats, il pourrait ensuite être intéressant de mesurer pour NCK1 et NCK2, les différences d'affinités entre certaines régions candidates appartenant à différents groupes et certains domaines particuliers. Pour cela, la technique de fluorescence polarisée pourrait être envisagée.

L'ensemble de ces résultats permettrait de mettre en évidence que les domaines SH2/SH3 isolés des protéines NCK1 et NCK2 apparaissent similaires et majoritairement redondants et que leur spécificité pourrait être modulée par les régions interdomaines à proximité. Ultimement, pour une ou plusieurs régions interdomaines se comportant différemment entre NCK1/2, il serait possible d'entreprendre l'identification d'un ou plusieurs motifs responsables de cette différence d'affinité. Il serait alors possible d'inverser ce motif entre NCK1 et NCK2 et de mesurer, tel que je l'ai fait avec PKP4, la capacité de ces NCK chimériques à lier ou non certains partenaires spécifiques identifiés en MS.

De plus, la mise en évidence de l'importance de la structure globale des protéines adaptatrices NCK1/2 pour leur spécificité apporte de nouveaux éléments pour la reconduction

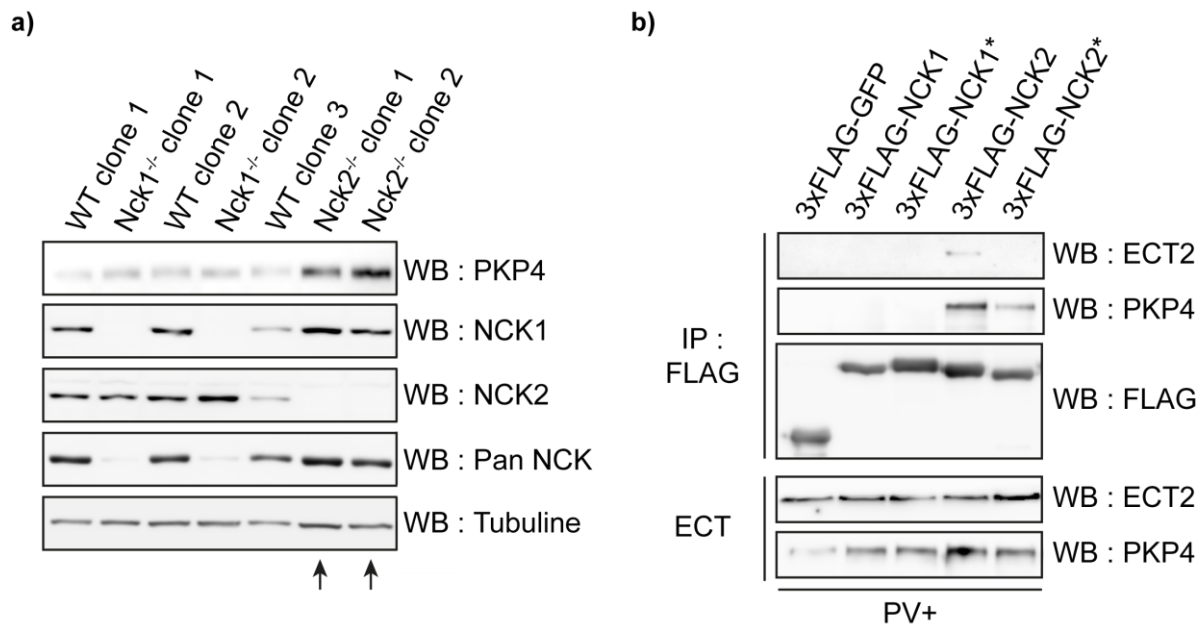
de certaines mes expériences, potentiellement biaisées car initialement réalisées avec les domaines isolés de NCK1/2. Ainsi, il pourrait être intéressant de reconduire les essais sur *peptide array* avec les protéines NCK1 et NCK2 pleine longueur afin d'obtenir un aperçu des tyrosines différenciellement liées par chacune de ces protéines. Les résultats obtenus pourraient fournir de précieuses informations sur la ou les tyrosines de PKP4 préférentiellement liée(s) par NCK2 dans le contexte d'une liaison classique mais surtout, permettraient de comparer les profils de spécificité entre domaines isolés et protéines pleine longueur.

En bref, mes résultats suggèrent que NCK2 via son domaine SH2 interagit de manière directe avec PKP4, un régulateur de la cytokinèse. Même si cette interaction reste partiellement caractérisée, l'identification de PKP4 comme interacteur NCK2 spécifique améliore la compréhension de l'implication de cette protéine adaptatrice dans la régulation de la cytokinèse.

## **4.2 NCK2, un régulateur inattendu de la cytokinèse**

Mes analyses de MS ont rendu possible la caractérisation de l'interactome de NCK2 (Fig. 2.1a). L'analyse individuelle de chaque partenaire NCK2 spécifique a révélé que plusieurs de ces protéines sont impliquées dans la régulation de la cytokinèse. Parmi celles-ci, j'ai identifié les protéines PKP4 (Keil, Schulz and Hatzfeld, 2013), GIT1 (Hagemann *et al.*, 2013), ECT2 (Wolf *et al.*, 2006) ou encore *Echinoderm microtubule-associated protein-like 1* (EML1), une protéine importante pour l'organisation des microtubules et possiblement impliquée dans l'orientation et le positionnement du fuseau mitotique (Kielar *et al.*, 2014). Ces données combinées à différentes analyses bio-informatiques mettant en évidence que NCK2 serait plus associé via ses partenaires à la dynamique du cytosquelette d'actine que NCK1 (Fig. 2.1b) m'ont poussé à étudier le rôle potentiel de NCK2 dans la régulation de la cytokinèse. J'ai ainsi pu déterminer que NCK2 localise au site de scission durant l'étape finale de séparation des deux cellules filles (Fig. 2.3a,b) et, via son domaine SH2, est spécifiquement requis durant ce processus (Fig. 2.4, 2.5). NCK1 en revanche ne semble pas impliqué dans cette fonction. Mes résultats offrent ainsi la première preuve de la compartimentalisation cellulaire différentielle pour les deux protéines adaptatrices NCK1 et NCK2 tout en apportant une preuve supplémentaire de l'existence de processus biologiques spécifiquement régulés par chacun.

J'ai également essayé de clarifier par quel mécanisme NCK2 est impliqué dans la régulation de ce processus. Premièrement, il est connu que NCK2 est spécifiquement impliqué dans la régulation de la voie Rho (Guan *et al.*, 2009) (Fig.4.2-1), une GTPase indispensable dans le processus de cytokinèse (Piekny, Werner and Glotzer, 2005). Deuxièmement, Il a été démontré que PKP4 régule positivement Rho durant la cytokinèse (Wolf *et al.*, 2006; Nahorski *et al.*, 2012)(Fig. 4.2-2). Troisièmement, il est connu que des niveaux trop élevés de PKP4 aboutissent à une suractivation de la protéine RHOA et à des défauts de cytokinèse (Wolf *et al.*, 2006) (Fig. 4.2-3). Quatrièmement, j'ai déterminé que NCK2 interagit avec PKP4 via son domaine SH2 (chapitre 3) (Fig. 4-2-4) et participe au processus de cytokinèse grâce à ce même domaine (chapitre 2). Cinquièmement, certains de mes résultats préliminaires suggèrent que les cellules *Nck2*<sup>-/-</sup> présentent des niveaux élevés de PKP4 comparés à des cellules sauvages (Fig. 4.1a et 4.2-5) et que NCK2 s'associe spécifiquement avec ECT2 endogène (Fig. 4.1b), une des GEF de RHOA (Miki *et al.*, 1993). Sixièmement, il a récemment été suggéré que le récepteur EPHB2 puisse réguler via SRC la phosphorylation de la *Citron kinase* (CIT) (Jungas *et al.*, 2016; Jungas, Besson and Davy, 2017), une kinase régulatrice de la cytokinèse intimement liée à la GTPase RHOA (D'Avino, 2017) (Fig. 4.2-6). Septièmement, Plusieurs études ont déjà démontré que EPHB2 arbore un site de liaison à NCK2 dans sa partie cytoplasmique lorsque phosphorylé (Holland *et al.*, 1997; Srivastava *et al.*, 2013)(Fig. 4.2-7). L'ensemble de ces évidences permet de suggérer que NCK2 pourrait spécifiquement réguler la cytokinèse via différents mécanismes impliquant la régulation de l'activation de CIT et le contrôle de l'activité de la protéine RHOA via l'inhibition de PKP4 (Fig. 4.2). Malgré la proposition d'un modèle récapitulant mes résultats et la littérature, l'ensemble de ces mécanismes reste à définir.



**Figure 4. 1 : Données complémentaires permettant d’envisager les rôles de NCK2 durant l’étape de cytokinèse.**

**a)** Niveaux d’expression de PKP4 dans différentes lignées de cellules MEF invalidés pour les gènes de NCK1 ou NCK2. Les 2 flèches indiquent les 2 lignées *Nck2*<sup>-/-</sup>. **b)** ECT2 endogène interagit de manière spécifique avec NCK2 lors d’un traitement PV. Des cellules HEK293T ont été transféctées avec chacune des constructions 3xFLAG indiquées puis traitées au PV avant lyse. Chaque construction 3xFLAG a été immunoprécipitée et les interactions entre ces dernières et protéines d’intérêts endogènes ont été visualisées à l’aide d’anticorps spécifiques (n=1).

### 4.3 NCK2, régulateur inconnu des jonctions serrées?

Il a été suggéré que NCK1 pouvait réguler la formation de jonctions adhérentes via son interaction avec la cortactine (Okamura and Resh, 1995), une protéine favorisant le recrutement du complexe ARP2/3 au niveau de la *zonula adherens* et assurant la cohésion de cette structure (Kourtidis, Ngok and Anastasiadis, 2013; Han *et al.*, 2014). L’association entre NCK2 et cortactine n’a jamais été testée. Toutefois, j’ai identifié la cortactine comme interacteur de NCK2 dans mes essais de MS (Tableau 3.1). Également, certaines études n’ayant pas discriminé NCK1 et NCK2 suggèrent que ces protéines sont indispensables à l’intégrité de jonctions adhérentes. La suppression de ces deux adaptateurs dans des cellules endothéliales polarisées est suffisante pour déstabiliser les jonctions adhérentes, entraver la localisation de nombreuses

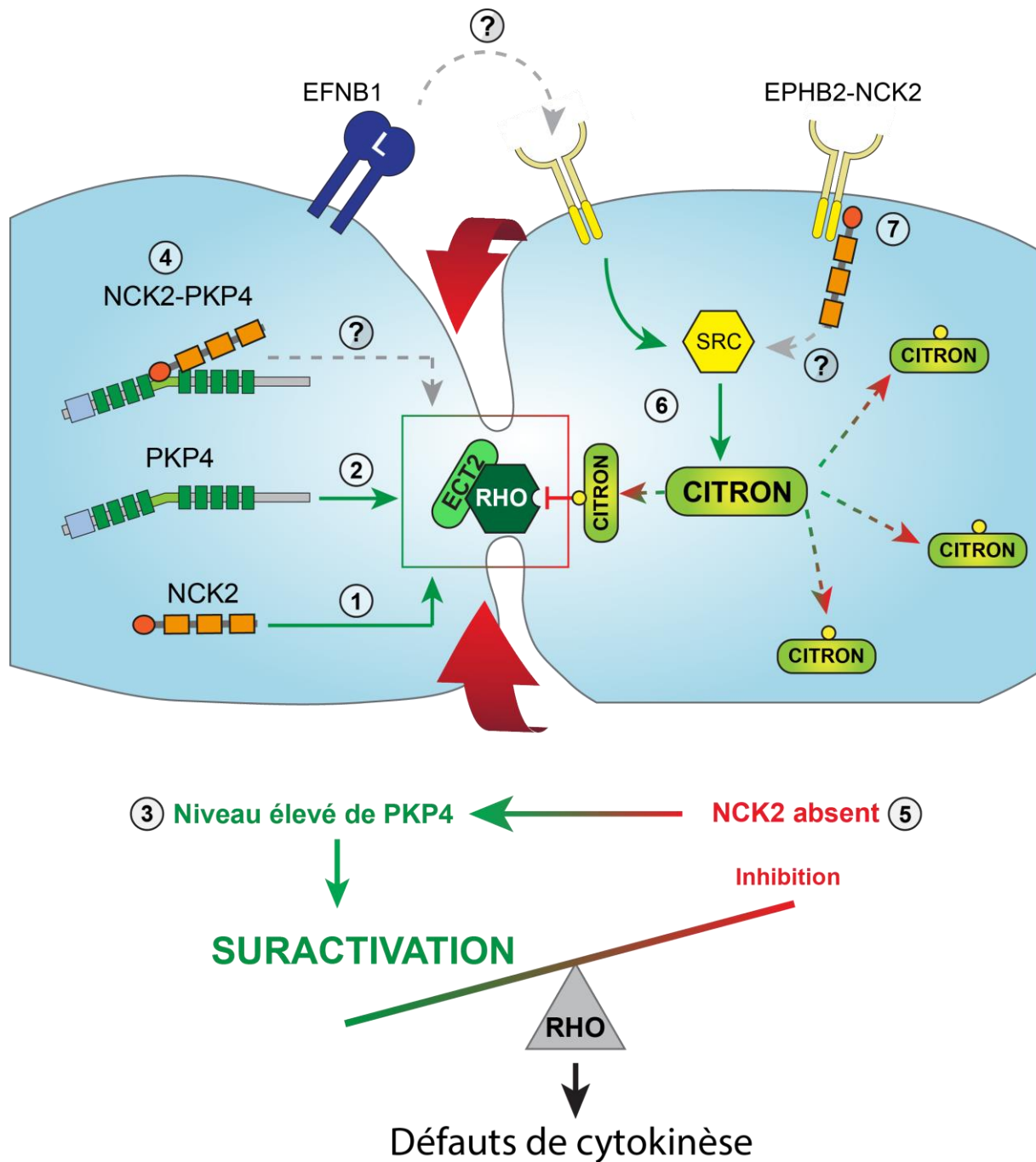


protéines de polarité aboutissant à une perte de polarité généralisée (Chaki, Barhoumi and Rivera, 2015). Toutefois, la contribution respective de chaque NCK dans cette fonction n'a jamais été mesurée.

Tel que mentionné à la section 3.3.2.1, PKP4 interagit directement via sa région ARM avec plusieurs membres de la famille des cadhérines (Hatzfeld and Nachtsheim, 1996; Calkins *et al.*, 2003; Hofmann, Kuhn and Franke, 2008; Hofmann *et al.*, 2009). PKP4 participe ainsi activement à l'adhésion cellulaire en permettant l'assemblage de complexes protéiques destinés à ancrer les cadhérines au cytosquelette d'actine. Mes résultats ont démontré que PKP4 est un partenaire NCK2 spécifique (chapitre 3). Sans que les rôles précis de chaque NCK dans la formation des jonctions adhérentes n'aient été investigués, l'ensemble de ces résultats suggère que NCK1/2 pourraient avoir une fonction redondante dans la formation de ces structures. Il pourrait toutefois être intéressant de tester la possibilité que ces adaptateurs puissent réguler de façon spécifique mais compensatoire l'organisation des jonctions adhérentes : NCK1 via la cortactine, NCK2 via PKP4.

Ces résultats permettraient de confirmer ou d'infirmer la redondance de NCK1/2 dans l'organisation des jonctions adhérentes. Pour cela, il serait possible d'utiliser un modèle de cellules polarisées aux jonctions adhérentes fonctionnelles telles les cellules *Madin-Darby Canine Kidney* (MDCK) afin de vérifier par immunobuvardage si la cortactine endogène ou certaines protéines clefs des jonctions adhérentes telles les cadhérines interagissent de manière spécifique avec un NCK donné. Il serait aussi essentiel de confirmer dans ce modèle que PKP4 reste un partenaire NCK2 spécifique. Toutefois, si ces résultats suggèrent l'existence d'une quelconque spécificité de NCK1/2 dans la formation des jonctions adhérentes, il serait alors intéressant de regarder par immunofluorescence la localisation de certains marqueurs jonctionnels lors de la déplétion de NCK1 ou NCK2.

Au-delà de son rôle dans l'organisation de la *zonula adherens*, PKP4 est également requis durant l'assemblage des jonctions serrées (Nahorski *et al.*, 2012), des structures en amont des jonctions adhérentes et intimement liées à ces dernières (Gumbiner and Simons, 1986; Rajasekaran *et al.*, 1996; Itoh *et al.*, 1997).



**Figure 4. 2 : Modèle détaillant les fonctions possibles de NCK2 durant la cytokinèse.**  
 1- NCK2 a déjà été démontré comme spécifiquement lié à la voie RHO (Guan *et al.*, 2009). Certains de mes résultats préliminaires suggèrent que NCK2 s'associe spécifiquement avec ECT2. 2- PKP4 a été démontré comme important pour l'activation de RHO durant la cytokinèse (Wolf *et al.*, 2006). 3- Des niveaux trop élevés de PKP4 conduisent à une suractivation de RHO et des défauts de cytokinèse (Wolf *et al.*, 2006). 4- Nous avons identifié que NCK2 via son domaine SH2 interagit directement et spécifiquement avec PKP4. 5- Nos résultats préliminaires suggèrent qu'en absence de NCK2, les niveaux endogènes de PKP4 sont plus élevés. 6- Le récepteur EPHB2 via SRC a été démontré important pour la phosphorylation de la kinase Citron.

Une portion de citron phosphorylée est délocalisée de la zone d'abscission tandis qu'une seconde fraction favorise la fin de l'abscission en inhibant RHO. 7- NCK2 a été démontré comme capable d'interagir avec EPHB2 (Srivastava *et al.*, 2013). ?- Liens fonctionnels restants à caractériser. Gauche : NCK2 pourrait promouvoir la dégradation de PKP4 ou son inhibition. Haut et droite : lors de la fin de la cytokinèse et situés à proximité, la membrane de la première cellule fille pourrait contacter la membrane de la seconde cellule fille afin de signaler la fin de l'abscission via un système EPHB2-EFNB1. NCK2 pourrait participer à ce processus.

De façon intéressante, j'ai identifié dans mes essais de MS comme partenaire NCK2 spécifique la *Tight junction protein ZO-1* (TJP1), une protéine d'échafaudage arborant un domaine SH3 et impliquée dans l'organisation des jonctions serrées (Fanning *et al.*, 1998). Cette protéine permet entre autres de relier les protéines transmembranaires claudine et occludine au cytosquelette d'actine afin d'assurer la cohésion des jonctions serrées (Furuse *et al.*, 1994; Fanning *et al.*, 1998; Shen, 2012). L'identification de PKP4 et TJP1 comme partenaires de NCK2 suggère que cet adaptateur pourrait spécifiquement réguler l'organisation des jonctions serrées. Selon la possible redondance de NCK1/2 dans l'organisation des jonctions adhérentes et la potentielle implication spécifique de NCK2 dans l'organisation des jonctions serrées, il pourrait être intéressant d'utiliser la technique de *calcium switch*, un essai consistant à priver temporairement des cellules polarisées de calcium afin d'induire le désassemblage de leurs jonctions cellulaires puis mesurer le réassemblage de ces structures lorsque le calcium est réintroduit (Tobey *et al.*, 2004). Avec cet essai, il serait possible de déterminer si la déplétion d'un seul NCK affecte la formation des jonctions et donc, de tester simultanément une possible implication de NCK1/2 dans l'organisation des jonctions serrées et/ou adhérentes. De façon intéressante, un essai préliminaire réalisé au laboratoire m'a permis de constater que la déplétion de NCK1 durant un *calcium switch* est létale, tandis que la déplétion de NCK2 induit des retards de réassemblage de jonctions. Dans un premier temps, il serait essentiel de confirmer ces résultats suggérant que les rôles respectifs de NCK1/2 dans la formation des jonctions cellulaires ne sont pas complètement redondants. En complément des expériences proposées pour l'étude du rôle respectif de NCK1/2 dans la formation des jonctions adhérentes, il pourrait être intéressant de visualiser par immunofluorescence la localisation de certains marqueurs des jonctions serrées tels TJP1, l'occludine et la claudine lors d'une déplétion de NCK1 ou NCK2.

L'ensemble de ces expériences permettrait de rassembler un certain nombre d'évidences sur les rôles respectifs de NCK1/2 dans la formation des jonctions adhérentes/serrées.

## Conclusion générale

Mon projet de doctorat consistait à caractériser la spécificité fonctionnelle des protéines adaptatrices NCK1 et NCK2 tout en identifiant les déterminants moléculaires responsables de cette spécificité. Via l'utilisation de différentes approches de protéomique, j'ai identifié un certain nombre de partenaires spécifiques pour chaque NCK. Sur la base de ces résultats, j'ai émis l'hypothèse que NCK2 était spécifiquement impliqué dans la régulation de la cytokinèse. L'utilisation de cellules murines dont les gènes *Nck1* ou *Nck2* ont individuellement été invalidés m'a permis de constater que l'absence de NCK2 engendre des défauts de cytokinèse matérialisés notamment par l'apparition de cellules multinucléées ou partiellement séparées. Certaines analyses complémentaires m'ont permis de suggérer que la fonction de NCK2 durant la cytokinèse repose majoritairement sur son domaine SH2. L'ensemble de mes résultats soutient indéniablement l'hypothèse que les protéines adaptatrices NCK1 et NCK2 ne sont pas complètement redondantes dans leurs fonctions.

En parallèle, j'ai sélectionné 27 partenaires identifiés en MS et confirmé par une méthode orthogonale leurs interactions respectives avec NCK1 et/ou NCK2. Grâce à des tests de liaison *in vitro*, j'ai déterminé que plusieurs protéines dont la *Plakophilin 4* (PKP4), un régulateur de la cytokinèse lient directement et spécifiquement NCK2. La caractérisation de l'interaction NCK2-PKP4 m'a permis de mettre en évidence que le domaine SH2 de NCK2 interagit directement avec un motif potentiellement atypique de PKP4. La conservation d'une interaction spécifique NCK2-PKP4 lors de l'inversion de résidus entre les domaines SH2 de NCK1/2 m'a conduit à assumer que les propriétés intrinsèques de ce domaine isolé ne sont pas suffisantes pour pleinement expliquer sa spécificité. Il est envisageable que certaines portions des protéines adaptatrices NCK1 et/ou NCK2 telles leurs régions interdomaines puissent moduler les propriétés de liaison des domaines qui les entourent. Ces résultats soutiennent formellement l'existence d'une spécificité biochimique propre à chaque protéine NCK mais laissent supposer que le contexte dans lequel un domaine se trouve pourrait être aussi important que sa structure.

En conclusion, ces travaux ont permis de caractériser pour la première fois les interactomes respectifs de NCK1/2 tout en suggérant un mécanisme responsable de cette spécificité et en dévoilant une fonction biologique dans laquelle ils pourraient être appliqués.

## Bibliographie des chapitres 1,2 et 4

Adler, C. E. *et al.* (2000) ‘Abl family kinases and Cbl cooperate with the Nck adaptor to modulate *Xenopus* development’, *Journal of Biological Chemistry*, 275, 36472-36478. doi: 10.1074/jbc.M005424200.

Anselmi, F. *et al.* (2012) ‘C-ABL modulates MAP kinases activation downstream of VEGFR-2 signaling by direct phosphorylation of the adaptor proteins GRB2 and NCK1’, *Angiogenesis*, 15(2), pp. 187–197. doi: 10.1007/s10456-012-9252-6.

Antón, I. M. *et al.* (1998) ‘The Wiskott-Aldrich syndrome protein-interacting protein (WIP) binds to the adaptor protein Nck’, *Journal of Biological Chemistry*, 273(33), pp. 20992–20995. doi: 10.1074/jbc.273.33.20992.

Asbach, B. *et al.* (2012) ‘Comprehensive analysis of interactions between the src-associated protein in mitosis of 68 kDa and the human src-homology 3 proteome’, *PLoS ONE*, 7(6):e38540. doi: 10.1371/journal.pone.0038540.

Aspenström, P. (2002) ‘The WASP-binding protein WIRE has a role in the regulation of the actin filament system downstream of the platelet-derived growth factor receptor.’, *Experimental Cell Research*, 279(1), pp. 21–33.No doi.

Bateman, A. *et al.* (2017) ‘UniProt: The universal protein knowledgebase’, *Nucleic Acids Research*. 45(D1):D158-D169. doi: 10.1093/nar/gkw1099.

Berman, H. M. *et al.* (2000) ‘The protein data bank.’, *Nucleic acids research*, 28(1), pp. 235–242. doi: 10.1093/nar/28.1.235.

Bibbins, K. B., Boeuf, H. and Varmus, H. E. (1993) ‘Binding of the Src SH2 domain to phosphopeptides is determined by residues in both the SH2 domain and the phosphopeptides.’, *Molecular and Cellular Biology*, 13(12), pp. 7278–7287. doi: 10.1128/MCB.13.12.7278.

Bisson, N. *et al.* (2007) ‘EphA4 Signaling Regulates Blastomere Adhesion in the *Xenopus* Embryo by Recruiting Pak1 to Suppress Cdc42 Function’, *Molecular biology of the cell*. (3):1030-43. doi: 10.1091/mbc.E06.

Blackford, A. N. and Jackson, S. P. (2017) ‘ATM, ATR, and DNA-PK: The Trinity at the Heart of the DNA Damage Response’, *Molecular Cell*, pp. 801–817. 66(6):801-817. doi: 10.1016/j.molcel.2017.05.015.

Bladt, F. *et al.* (2003) ‘The Murine Nck SH2/SH3 Adaptors Are Important for the Development of Mesoderm-Derived Embryonic Structures and for Regulating the Cellular Actin Network’, *Molecular and Cellular Biology*, 23(13), pp. 4586–4597. doi: 10.1128/MCB.23.13.4586-4597.2003.

Blasutig, I. M. *et al.* (2008) ‘Phosphorylated YDXV motifs and Nck SH2/SH3 adaptors act cooperatively to induce actin reorganization’, *Mol Cell Biol*, 28(6), pp. 2035–2046. doi:

10.1128/MCB.01770-07.

Bokoch, G. M. *et al.* (1996) 'Interaction of the Nck adapter protein with p21-activated kinase (PAK1)', *Journal of Biological Chemistry*, 271(42), pp. 25746–25749. doi: 10.1074/jbc.271.42.25746.

Braverman, L. E. and Quilliam, L. A. (1999) 'Identification of Grb4/Nck??, a Src homology 2 and 3 domain-containing adapter protein having similar binding and biological properties to Nck', *Journal of Biological Chemistry*, 274(9), pp. 5542–5549. doi: 10.1074/jbc.274.9.5542.

Buday, L. and Tompa, P. (2010) 'Functional classification of scaffold proteins and related molecules', *FEBS Journal*, 277(21), pp. 4348–4355. 277(21):4348-55. doi: 10.1111/j.1742-4658.2010.07864.x.

Buday, L., Wunderlich, L. and Tamás, P. (2002) 'The Nck family of adapter proteins: Regulators of actin cytoskeleton', *Cellular Signalling*, pp. 723–731. doi: 10.1016/S0898-6568(02)00027-X.

Buvall, L. *et al.* (2013) 'Proteasomal degradation of Nck1 but not Nck2 regulates RhoA activation and actin dynamics', *Nature Communications*, 4. doi: 10.1038/ncomms3863.

Calkins, C. C. *et al.* (2003) 'The armadillo family protein p0071 is a VE-cadherin- and desmoplakin-binding protein', *Journal of Biological Chemistry*. 278(3):1774-83. doi: 10.1074/jbc.M205693200.

Cantin, G. T. *et al.* (2008) 'Combining Protein-Based IMAC, Peptide-Based IMAC, and MudPIT for Efficient Phosphoproteomic Analysis', *Journal of Proteome Research*. 7(3):1346-51. doi: 10.1021/pr0705441.

Cardin, E. *et al.* (2007) 'Nck-1 selectively modulates eIF2 $\alpha$ Ser51 phosphorylation by a subset of eIF2 $\alpha$ -kinases', *FEBS Journal*, 274(22), pp. 5865–5875. doi: 10.1111/j.1742-4658.2007.06110.x.

Cardin, E. and Larose, L. (2008) 'Nck-1 interacts with PKR and modulates its activation by dsRNA', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 377(1), pp. 231–235. doi: 10.1016/j.bbrc.2008.09.112.

Chaki, S. P. *et al.* (2013) 'Nck enables directional cell migration through the coordination of polarized membrane protrusion with adhesion dynamics', *Journal of Cell Science*, 126(7), pp. 1637–1649. doi: 10.1242/jcs.119610.

Chaki, S. P., Barhoumi, R. and Rivera, G. M. (2015) 'Actin remodeling by Nck regulates endothelial lumen formation.', *Molecular biology of the cell*, 26(17), pp. 3047–60. doi: 10.1091/mbc.E15-06-0338.

Chatr-Aryamontri, A. *et al.* (2017) 'The BioGRID interaction database: 2017 update', *Nucleic Acids Research*. 45(Database issue): D369–D379. doi: 10.1093/nar/gkw1102.

- Chen, M. *et al.* (1998) 'Identification of Nck family genes, chromosomal localization, expression, and signaling specificity', *Journal of Biological Chemistry*, 273(39), pp. 25171–25178. doi: 10.1074/jbc.273.39.25171.
- Chen, M. *et al.* (2000) 'Nck $\beta$  Adapter Regulates Actin Polymerization in NIH 3T3 Fibroblasts in Response to Platelet-Derived Growth Factor bb', *Molecular and Cellular Biology*, 20(21), pp. 7867–7880. doi: 10.1128/MCB.20.21.7867-7880.2000.
- Chinnaiyan, A. M. *et al.* (1995) 'FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of fas and initiates apoptosis', *Cell*, 81(4), pp. 505–512. doi: 10.1016/0092-8674(95)90071-3.
- Chircop, M. (2014) 'Rho GTPases as regulators of mitosis and cytokinesis in mammalian cells', *Small GTPases*. 5: e29770. doi: 10.4161/sgtp.29770.
- Choi, H. *et al.* (2011) 'SAINT: Probabilistic scoring of affinity purification-mass spectrometry data', *Nature Methods*. 8, 70–73. doi: 10.1038/nmeth.1541.
- Choi, H. *et al.* (2012) 'Analyzing protein-protein interactions from affinity purification-mass spectrometry data with SAINT', *Current Protocols in Bioinformatics*. Chapter 8:Unit8.15. doi: 10.1002/0471250953.bi0815s39.
- Choi, H. J. and Weis, W. I. (2005) 'Structure of the armadillo repeat domain of plakophilin 1', *Journal of Molecular Biology*. 346(1):367-76. doi: 10.1016/j.jmb.2004.11.048.
- Chou, M. M., Fajardo, J. E. and Hanafusa, H. (1992) 'The SH2- and SH3-containing Nck protein transforms mammalian fibroblasts in the absence of elevated phosphotyrosine levels', *Mol Cell Biol*, 12(12), pp. 5834–5842. doi: 10.1128/MCB.12.12.5834.
- Choudhury, G. G., Marra, F. and Abboud, H. E. (1996) 'Thrombin stimulates association of src homology domain containing adaptor protein Nck with pp125FAK', *Am J Physiol*, 270(2 Pt 2). doi: org/10.1152/ajprenal.1996.270.2.F295.
- Cicchetti, P. *et al.* (1992) 'Identification of a protein that binds to the SH3 region of Abl and is similar to Bcr and GAP-rho.', *Science (New York, N.Y.)*, 257(5071), pp. 803–806. doi: 10.1126/science.1379745.
- Cnop, M. *et al.* (2017) 'Endoplasmic reticulum stress and eIF2 $\alpha$  phosphorylation: The Achilles heel of pancreatic  $\beta$  cells', *Molecular Metabolism*. 6(9):1024-1039. doi: 10.1016/j.molmet.2017.06.001.
- Cowan, C. A. and Henkemeyer, M. (2001) 'The SH2/SH3 adaptor Grb4 transduces B-ephrin reverse signals', *Nature*. 413(6852):174-9. doi: 10.1038/35093123.
- Cybulsky, A. V. (2017) 'Endoplasmic reticulum stress, the unfolded protein response and autophagy in kidney diseases', *Nature Reviews Nephrology*, 13(11):681-69. doi: 10.1038/nrneph.2017.129.

- D'Avino, P. P. (2017) 'Citron kinase – renaissance of a neglected mitotic kinase', *Journal of Cell Science*. 130(10):1701-1708. doi: 10.1242/jcs.200253.
- Dai, K. *et al.* (2011) 'Solution structure of Tensin2 SH2 domain and its Phosphotyrosine-Independent interaction with DLC-1', *PLoS ONE*. 6(7):e21965. doi: 10.1371/journal.pone.0021965.
- Dionne, U. *et al.* (2018) 'Direct Phosphorylation of SRC Homology 3 Domains by Tyrosine Kinase Receptors Disassembles Ligand- Induced Signaling Networks', *Molecular Cell*, pp. 1–13. 70(6):995-1007. doi: 10.1016/j.molcel.2018.05.013.
- Ditlev, J. A. *et al.* (2012) 'Stoichiometry of Nck-dependent actin polymerization in living cells', *Journal of Cell Biology*, 197(5), pp. 643–658. doi: 10.1083/jcb.201111113.
- Donnelly, S. K. *et al.* (2013) 'WIP provides an essential link between nck and n-wasp during arp2/3-dependent actin polymerization', *Current Biology*, 23(11), pp. 999–1006. doi: 10.1016/j.cub.2013.04.051.
- Dusseault, J. *et al.* (2016) 'Nck2 deficiency in mice results in increased adiposity associated with adipocyte hypertrophy and enhanced adipogenesis', *Diabetes*. 65(9): 2652-2666. doi: 10.2337/db15-1559.
- Eden, S. *et al.* (2002) 'Mechanism of regulation of WAVE1-induced actin nucleation by Rac1 and Nck', *Nature*, 418(6899), pp. 790–793. doi: 10.1038/nature00859.
- Einarson, M. B. (2004) 'Detection of protein-protein interactions using the GST fusion protein pull-down technique', *Nature Methods*. 1, 275–276 doi: 10.1038/nmeth1204-275.
- Elkon, R., Ugalde, A. P. and Agami, R. (2013) 'Alternative cleavage and polyadenylation: Extent, regulation and function', *Nature Reviews Genetics*. doi: 10.1038/nrg3482.
- Erdreich-Epstein, A. *et al.* (1999) 'Cbl functions downstream of Src kinases in FcγRI signaling in primary human macrophages', *Journal of Leukocyte Biology*, 65(4), pp. 523–534. doi: 10.1002/jlb.65.4.523.
- Errington, T. M. and Macara, I. G. (2013) 'Depletion of the Adaptor Protein NCK Increases UV-Induced p53 Phosphorylation and Promotes Apoptosis', *PLoS ONE*, 8(9). doi: 10.1371/journal.pone.0076204.
- Espinosa-Cantú, A. *et al.* (2015) 'Gene duplication and the evolution of moonlighting proteins', *Frontiers in Genetics*. 6: 227-230. doi: 10.3389/fgene.2015.00227.
- Fang, Y. *et al.* (2002) 'Two phosphorylation-independent sites on the p85 SH2 domains bind A-Raf kinase', *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 290(4):1267-74. doi: 10.1006/bbrc.2002.6347.
- Fanning, A. S. *et al.* (1998) 'The tight junction protein ZO-1 establishes a link between the transmembrane protein occludin and the actin cytoskeleton', *Journal of Biological Chemistry*.



273(45):29745-53. doi: 10.1074/jbc.273.45.29745.

Feng, S. *et al.* (1994) 'Two binding orientations for peptides to the Src SH3 domain: development of a general model for SH3-ligand interactions', *Science*, 266(5188), pp. 1241–1247. doi: 10.1126/science.7526465.

Flynn, D. C. (2001) 'Adaptor proteins', *Oncogene*, 20(44), pp. 6270–6272. doi: 10.1038/sj.onc.1204769.

Franz, W. M., Berger, P. and Wang, J. Y. (1989) 'Deletion of an N-terminal regulatory domain of the c-abl tyrosine kinase activates its oncogenic potential', *EMBO J*, 8(1), pp. 137–147. No doi.

Frese, S. *et al.* (2006) 'The phosphotyrosine peptide binding specificity of Nck1 and Nck2 Src homology 2 domains', *Journal of Biological Chemistry*, 281(26), pp. 18236–18245. doi: 10.1074/jbc.M512917200.

Frischknecht, F. *et al.* (1999) 'Actin-based motility of vaccinia virus mimics receptor tyrosine kinase signalling.', *Nature*, 401(6756), pp. 926–929. doi: 10.1038/44860.

Frisone, P. *et al.* (2015) 'SAM68: Signal transduction and RNA metabolism in human cancer', *BioMed Research International*. 24(7):833-844. doi: 10.1155/2015/528954.

Furuse, M. *et al.* (1994) 'Direct association of occludin with ZO-1 and its possible involvement in the localization of occludin at tight junctions', *Journal of Cell Biology*. 127(6 Pt 1):1617-26. doi: 10.1083/jcb.127.6.1617.

Garrity, P. A. *et al.* (1996) 'Drosophila photoreceptor axon guidance and targeting requires the dreadlocks SH2/SH3 adapter protein', *Cell*, 85(5), pp. 639–650. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81231-3.

Ger, M., Zitkus, Z. and Valius, M. (2011) 'Adaptor protein Nck1 interacts with p120 Ras GTPase-activating protein and regulates its activity', *Cellular Signalling*. 23(10):1651-8. doi: 10.1016/j.cellsig.2011.05.019.

Goicoechea, S. M. *et al.* (2002) 'Nck-2 interacts with focal adhesion kinase and modulates cell motility', *Int J Biochem Cell Biol*, 34(7), pp. 791–805. doi: 10.1016/S1357-2725(02)00002-X.

Guan, S. *et al.* (2007) 'Nckbeta adapter controls neuritogenesis by maintaining the cellular paxillin level.', *Molecular and cellular biology*. 27(17): 6001–6011. doi: 10.1128/MCB.01807-06.

Guan, S. *et al.* (2009) 'Non-compensating roles between Nck $\alpha$  and Nck $\beta$  in PDGF-BB signaling to promote human dermal fibroblast migration', *Journal of Investigative Dermatology*, 129(8), pp. 1909–1920. doi: 10.1038/jid.2008.457.

Gumbiner, B. and Simons, K. (1986) 'A functional assay for proteins involved in establishing and epithelial occluding barrier: Identification of a uvomorulin-like polypeptide', *Journal of*

*Cell Biology*. 102(2):457-68. doi: 10.1083/jcb.102.2.457.

Guo, D. *et al.* (1995) 'Vascular endothelial cell growth factor promotes tyrosine phosphorylation of mediators of signal transduction that contain SH2 domains. Association with endothelial cell proliferation.', *The Journal of biological chemistry*, 270(12), pp. 6729–33. doi: 10.1074/jbc.270.12.6729.

Hagemann, N. *et al.* (2013) 'The serologically defined colon cancer antigen-3 interacts with the protein tyrosine phosphatase PTPN13 and is involved in the regulation of cytokinesis', *Oncogene*. 32(39):4602-13. doi: 10.1038/onc.2012.485.

Haider, N. *et al.* (2017) 'Nck2, an unexpected regulator of adipogenesis', *Adipocyte*. 6(2):154-160. doi: 10.1080/21623945.2017.1291102.

Han, S. P. *et al.* (2014) 'Cortactin scaffolds Arp2/3 and WAVE2 at the epithelial zonula adherens', *Journal of Biological Chemistry*, 289(11), pp. 7764–7775. doi: 10.1074/jbc.M113.544478.

Hashimoto, S. *et al.* (2001) 'Interaction of paxillin with p21-activated kinase (PAK). Association of paxillin  $\alpha$  with the kinase-inactive and the Cdc42-activated forms of PAK3', *Journal of Biological Chemistry*, 276(8), pp. 6037–6045. doi: 10.1074/jbc.M005854200.

Hatzfeld, M. and Nachtsheim, C. (1996) 'Cloning and characterization of a new armadillo family member, p0071, associated with the junctional plaque: evidence for a subfamily of closely related proteins.', *Journal of cell science*. 109 ( Pt 11):2767-78. No doi.

Hiipakka, M. and Saksela, K. (2007) 'Versatile retargeting of SH3 domain binding by modification of non-conserved loop residues', *FEBS Letters*, 581(9), pp. 1735–1741. doi: 10.1016/j.febslet.2007.03.044.

Hing, H. *et al.* (1999) 'Pak functions downstream of Dock to regulate photoreceptor axon guidance in *Drosophila*', *Cell*, 97(7), pp. 853–863. doi: 10.1016/S0092-8674(00)80798-9.

Hofmann, I. *et al.* (2009) 'Protein p0071 - an armadillo plaque protein that characterizes a specific subtype of adherens junctions.', *Journal of cell science*. 122(Pt 1):21-4. doi: 10.1242/jcs.043927.

Hofmann, I., Kuhn, C. and Franke, W. W. (2008) 'Protein p0071, a major plaque protein of non-desmosomal adhering junctions, is a selective cell-type marker', *Cell and Tissue Research*. 334(3):381-99. doi: 10.1007/s00441-008-0725-2.

Holland, S. J. *et al.* (1997) 'Juxtamembrane tyrosine residues couple the Eph family receptor EphB2/Nuk to specific SH2 domain proteins in neuronal cells', *EMBO Journal*, 16(13), pp. 3877–3888. doi: 10.1093/emboj/16.13.3877.

Howe, A. K. (2001) 'Cell Adhesion Regulates the Interaction between Nck and p21-activated Kinase', *Journal of Biological Chemistry*. 276(18):14541-4. doi: 10.1074/jbc.C000797200.

Hu, T. *et al.* (2009) 'Regulation of process retraction and cell migration by EphA3 is mediated by the adaptor protein Nck1', *Biochemistry*, 48(27), pp. 6369–6378. doi: 10.1021/bi900831k.

Huang, H. *et al.* (2008) 'Defining the specificity space of the human SRC homology 2 domain.', *Molecular & cellular proteomics : MCP*, 7(4), pp. 768–784. doi: 10.1074/mcp.M700312-MCP200.

Hubbard, S. R. (1999) 'Src autoinhibition: Let us count the ways', *Nature Structural Biology*. 6(8):711-4. doi: 10.1038/11468.

Huttlin, E. L. *et al.* (2015) 'The BioPlex Network: A Systematic Exploration of the Human Interactome', *Cell*. 162(2):425-440. doi: 10.1016/j.cell.2015.06.043.

Huttlin, E. L. *et al.* (2017) 'Architecture of the human interactome defines protein communities and disease networks', *Nature*. 545(7655):505-509. doi: 10.1038/nature22366.

Ishiyama, N. *et al.* (2010) 'Dynamic and Static Interactions between p120 Catenin and E-Cadherin Regulate the Stability of Cell-Cell Adhesion', *Cell*. 141(1):117-2. doi: 10.1016/j.cell.2010.01.017.

Itoh, M. *et al.* (1997) 'Involvement of ZO-1 in cadherin-based cell adhesion through its direct binding to alpha catenin and actin filaments', *Journal of Cell Biology*. 138(1):181-92. doi: 10.1083/jcb.138.1.181.

Izadi, K. D. *et al.* (1998) 'Characterization of Cbl-Nck and Nck-Pak1 interactions in myeloid FcγRII signaling', *Experimental Cell Research*, 245(2), pp. 330–342. doi: 10.1006/excr.1998.4259.

Jackson, P. and Baltimore, D. (1989) 'N-terminal mutations activate the leukemogenic potential of the myristoylated form of c-abl', *EMBO J*, 8(2), pp. 449–456. No doi.

Jin, J. and Pawson, T. (2012) 'Modular evolution of phosphorylation-based signalling systems', *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 367(1602), pp. 2540–2555. doi: 10.1098/rstb.2012.0106.

Jones, N. *et al.* (2006) 'Nck adaptor proteins link nephrin to the actin cytoskeleton of kidney podocytes', *Nature*, 440(7085), pp. 818–823. doi: 10.1038/nature04662.

Jungas, T. *et al.* (2016) 'Eph-mediated tyrosine phosphorylation of citron kinase controls abscission', *Journal of Cell Biology*. 214(5):555-69. doi: 10.1083/jcb.201602057.

Jungas, T., Besson, A. and Davy, A. (2017) 'EPH-ective control of cytokinesis', *Cell Cycle*. 16(3):241-242. doi: 10.1080/15384101.2016.1251230.

Kaneko, T. *et al.* (2010) 'Loops govern SH2 domain specificity by controlling access to binding pockets', *Science Signaling*, 3(120): 534-345. doi: 10.1126/scisignal.2000796.

Kang, H. (2000) 'SH3 domain recognition of a proline-independent tyrosine-based RKxxYxxY

motif in immune cell adaptor SKAP55', *The EMBO Journal*, 19(12), pp. 2889–2899. doi: 10.1093/emboj/19.12.2889.

Kastenhuber, E. R. and Lowe, S. W. (2017) 'Putting p53 in Context', *Cell*, 170(6):1062-1078. doi: 10.1016/j.cell.2017.08.028.

Kay, B. K. (2012) 'SH3 domains come of age', *FEBS Letters*, 586(17):2606-8. doi: 10.1016/j.febslet.2012.05.025.

Kebache, S. *et al.* (2002) 'Modulation of protein translation by Nck-1.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(8), pp. 5406–11. doi: 10.1073/pnas.082483399.

Kefalas, G. *et al.* (2018) 'Peptide-based sequestration of the adaptor protein Nck1 in pancreatic  $\beta$  cells enhances insulin biogenesis and protects against diabetogenic stresses', *Journal of Biological Chemistry*, 1, 1121-1128. jbc.RA118.002728. doi: 10.1074/jbc.RA118.002728.

Keil, R. *et al.* (2007) 'Beyond regulation of cell adhesion: Local control of RhoA at the cleavage furrow by the p0071 catenin', *Cell Cycle*. 6(2):122-7. doi: 10.4161/cc.6.2.3741.

Keil, R., Schulz, J. and Hatzfeld, M. (2013) 'P0071/PKP4, a multifunctional protein coordinating cell adhesion with cytoskeletal organization', *Biological Chemistry*. 394(8):1005-17. doi: 10.1515/hsz-2013-0114.

Kesti, T. *et al.* (2007) 'Reciprocal Regulation of SH3 and SH2 Domain Binding via Tyrosine Phosphorylation of a Common Site in CD3 ', *The Journal of Immunology*. 179(2):878-85. doi: 10.4049/jimmunol.179.2.878.

Kielar, M. *et al.* (2014) 'Mutations in Eml1 lead to ectopic progenitors and neuronal heterotopia in mouse and human', *Nature Neuroscience*. 17(7):923-33. doi: 10.1038/nn.3729.

Kitamura, T. *et al.* (1996) 'Molecular cloning of p125Nap1, a protein that associates with an SH3 domain of Nck', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 219(2), pp. 509–514. doi: 10.1006/bbrc.1996.0264.

Knight, J. D. R. *et al.* (2015) 'A web-tool for visualizing quantitative protein-protein interaction data', *Proteomics*. 15(8):1432-6. doi: 10.1002/pmic.201400429.

Koch, C. a. *et al.* (1991) 'SH2 and SH3 domains: elements that control interactions of cytoplasmic signaling proteins.', *Science (New York, N.Y.)*, 252(5006), pp. 668–74. doi: 10.1126/science.1708916.

Kourtidis, A., Ngok, S. P. and Anastasiadis, P. Z. (2013) 'P120 catenin: An essential regulator of cadherin stability, adhesion-induced signaling, and cancer progression', *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 116, pp. 409–432. doi: 10.1016/B978-0-12-394311-8.00018-2.

Koyama, S. *et al.* (1993) 'Structure of the Pl3K SH3 domain and analysis of the SH3 family',

*Cell*, 72(6), pp. 945–952. doi: 10.1016/0092-8674(93)90582-B.

Kremer, B. E., Adang, L. A. and Macara, I. G. (2007) ‘Septins Regulate Actin Organization and Cell-Cycle Arrest through Nuclear Accumulation of NCK Mediated by SOCS7’, *Cell*, 130(5), pp. 837–850. doi: 10.1016/j.cell.2007.06.053.

Kuriyan, J. and Cowburn, D. (1997) ‘Modular peptide recognition domains in eukaryotic signaling.’, *Annual review of biophysics and biomolecular structure*, 26, pp. 259–88. doi: 10.1146/annurev.biophys.26.1.259.

Labelle-Côté, M. and Larose, L. (2011) ‘Une protéine uNick en son genre’, *Medecine/Sciences*. 27,746-752. doi: 10.1051/medsci/2011278017.

Lamalice, L., Houle, F. and Huot, J. (2006) ‘Phosphorylation of Tyr1214 within VEGFR-2 triggers the recruitment of Nck and activation of Fyn leading to SAPK2/p38 activation and endothelial cell migration in response to VEGF’, *Journal of Biological Chemistry*, 281(45), pp. 34009–34020. doi: 10.1074/jbc.M603928200.

Lambert, J. P. *et al.* (2015) ‘Proximity biotinylation and affinity purification are complementary approaches for the interactome mapping of chromatin-associated protein complexes’, *Journal of Proteomics*. 118:81-94. doi: 10.1016/j.jprot.2014.09.011.

Larsen, L. and Röpke, C. (2002) ‘Suppressors of cytokine signalling: SOCS’, *APMIS*, 8, pp. 833–844. doi: 10.1034/j.1600-0463.2002.1101201.x.

Latreille, M. *et al.* (2011) ‘Deletion of Nck1 attenuates hepatic ER stress signaling and improves glucose tolerance and insulin signaling in liver of obese mice.’, *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 300, pp. E423–E434. doi: 10.1152/ajpendo.00088.2010.

Lawe, D. C., Hahn, C. and Wong, A. J. (1997) ‘The Nck SH2/SH3 adaptor protein is present in the nucleus and associates with the nuclear protein SAM68’, *Oncogene*, 14(2), pp. 223–231. doi: 10.1038/sj.onc.1200821.

Lebensohn, A. M. and Kirschner, M. W. (2009) ‘Activation of the WAVE Complex by Coincident Signals Controls Actin Assembly’, *Molecular Cell*, 36(3), pp. 512–524. doi: 10.1016/j.molcel.2009.10.024.

LeClaire, L. L. *et al.* (2008) ‘Phosphorylation of the Arp2/3 complex is necessary to nucleate actin filaments’, *Journal of Cell Biology*, 182(4), pp. 647–654. doi: 10.1083/jcb.200802145.

LeClaire, L. L. *et al.* (2015) ‘The Nck-interacting kinase NIK increases Arp2/3 complex activity by phosphorylating the Arp2 subunit’, *Journal of Cell Biology*, 208(2), pp. 161–170. doi: 10.1083/jcb.201404095.

Lee, C. H. *et al.* (1996) ‘Crystal structure of the conserved core of HIV-1 Nef complexed with a Src family SH3 domain.’, *Cell*, 85(6), pp. 931–42. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81276-3.

Lee, K. E. *et al.* (2010) ‘Flexible Use of Nuclear Import Pathways by HIV-1’, *Cell Host and*

*Microbe*. 7(3):221-33. doi: 10.1016/j.chom.2010.02.007.

Lehmann, J. M., Riethmüller, G. and Johnson, J. P. (1990) 'Nck, a melanoma cDNA encoding a cytoplasmic protein consisting of the SRC homology units SH2 and SH3', *Nucleic Acids Research*, 18(4), p. 1048. doi: 10.1093/nar/18.4.1048.

Lemmon, M. A. *et al.* (2016) 'The Dark Side of Cell Signaling: Positive Roles for Negative Regulators', *Cell*, 164(6), pp. 1172–1184. doi: 10.1016/j.cell.2016.02.047.

Lemmon, M. a and Schlessinger, J. (2010) 'Cell signaling by receptor-tyrosine kinases Mark', *Biochemistry*, 141(7), pp. 1117–1134. doi: 10.1016/j.cell.2010.06.011.Cell.

Lettau, M. *et al.* (2014) 'The adapter proteins ADAP and Nck cooperate in T cell adhesion', *Molecular Immunology*, 60(1):72-9. doi: 10.1016/j.molimm.2014.03.017.

Lettau, M., Pieper, J. and Janssen, O. (2009) 'Nck adapter proteins: Functional versatility in T cells', *Cell Communication and Signaling*. 7:1: 89-94. doi: 10.1186/1478-811X-7-1.

Lewis C. Cantley, Kurt R. Auger, C. *et al.* (1991) 'Oncogenes and Signal Transduction', *Cell*, 64, pp. 281–302. doi: 10.1016/B978-141603703-3.10002-0.

Li, H. *et al.* (2006) 'Rat nephrin modulates cell morphology via the adaptor protein Nck', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 349(1), pp. 310–316. doi: 10.1016/j.bbrc.2006.08.053.

Li, H., Dusseault, J. and Larose, L. (2014) 'Nck1 depletion induces activation of the PI3K/Akt pathway by attenuating PTP1B protein expression', *Cell Communication and Signaling*, 12(1), 1123-1129. doi: 10.1186/s12964-014-0071-9.

Li, H., Li, B. and Larose, L. (2017) 'IRE1 $\alpha$  links Nck1 deficiency to attenuated PTP1B expression in HepG2 cells', *Cellular Signalling*, 36, pp. 79–90. doi: 10.1016/j.cellsig.2017.04.017.

Li, S.-C. *et al.* (1999) 'Novel mode of ligand binding by the SH2 domain of the human XLP disease gene product SAP/SH2D1A', *Current Biology*. 9(23):1355-62. doi: 10.1016/S0960-9822(00)80080-9.

Li, S. S.-C. (2005) 'Specificity and versatility of SH3 and other proline-recognition domains: structural basis and implications for cellular signal transduction', *Biochemical Journal*, 390(3), pp. 641–653. doi: 10.1042/BJ20050411.

Li, W. *et al.* (1992) 'The SH2 and SH3 domain-containing Nck protein is oncogenic and a common target for phosphorylation by different surface receptors', *Mol Cell Biol*, 12(12), pp. 5824–5833. doi: 10.1128/MCB.12.12.5824.Updated.

Li, W., Fan, J. and Woodley, D. T. (2001) 'Nck/Dock: An adapter between cell surface receptors and the actin cytoskeleton', *Oncogene*, 20(44):6403-17. doi: 10.1038/sj.onc.1204782.

Li, W. and She, H. (2000) 'The SH2 and SH3 adapter Nck: A two-gene family and a linker between tyrosine kinases and multiple signaling networks', *Histology and Histopathology*. 20(11):913-21. doi: 10.1002/(SICI)1521-1878(199811)20

Li, X. *et al.* (2002) 'The adaptor protein Nck-1 couples the netrin-1 receptor DCC (deleted in colorectal cancer) to the activation of the small GTPase Rac1 through an atypical mechanism', *Journal of Biological Chemistry*. 277(40):37788-97. doi: 10.1074/jbc.M205428200.

Liao, Y. C. *et al.* (2007) 'The phosphotyrosine-independent interaction of DLC-1 and the SH2 domain of cten regulates focal adhesion localization and growth suppression activity of DLC-1', *Journal of Cell Biology*. 176(1): 43–49. doi: 10.1083/jcb.200608015.

Lim, W. A., Richards, F. M. and Fox, R. O. (1994) 'Structural determinants of peptide-binding orientation and of sequence specificity in SH3 domains', *Nature*, 372(6504), pp. 375–379. doi: 10.1038/372375a0.

Lisabeth, E. M., Falivelli, G. and Pasquale, E. B. (2013) 'Eph receptor signaling and ephrins', *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 1;5(9). doi: 10.1101/cshperspect.a009159.

Liu, B. A. *et al.* (2011) 'The SH2 domain-containing proteins in 21 species establish the provenance and scope of phosphotyrosine signaling in eukaryotes', *Science Signaling*, 4(202). doi: 10.1126/scisignal.2002105.

Liu, B. A., Engelmann, B. W. and Nash, P. D. (2012) 'The language of SH2 domain interactions defines phosphotyrosine-mediated signal transduction', *FEBS Letters*, pp. 2597–2605 (24). doi: 10.1016/j.febslet.2012.04.054.

Liu, B. a *et al.* (2012) 'SRC Homology 2 Domain Binding Sites in Insulin, IGF-1 and FGF receptor mediated signaling networks reveal an extensive potential interactome.', *Cell communication and signaling : CCS*. 10(1):27. doi: 10.1186/1478-811X-10-27.

Lock, P., Casagrande, F. and Dunn, A. R. (1999) 'Independent SH2-binding sites mediate interaction of Dok-related protein with RasGTPase-activating protein and Nck', *Journal of Biological Chemistry*, 274(32), pp. 22775–22784. doi: 10.1074/jbc.274.32.22775.

Lu, W. *et al.* (1997) 'Activation of Pak by membrane localization mediated by an SH3 domain from the adaptor protein Nck', *Current Biology*, 7(2), pp. 85–94. doi: 10.1016/S0960-9822(06)00052-2.

Margolis, B. *et al.* (1992) 'High-efficiency expression/cloning of epidermal growth factor-receptor-binding proteins with Src homology 2 domains.', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(19), pp. 8894–8898. doi: 10.1073/pnas.89.19.8894.

Martens, N. *et al.* (2004) 'The suppressor of cytokine signaling (SOCS)-7 interacts with the actin cytoskeleton through vinexin', *Experimental Cell Research*, 298(1), pp. 239–248. doi: 10.1016/j.yexcr.2004.04.002.

Martin, G. *et al.* (2012) 'Genome-wide Analysis of Pre-mRNA 3' End Processing Reveals a

Decisive Role of Human Cleavage Factor I in the Regulation of 3' UTR Length', *Cell Reports*. (6):753-63. doi: 10.1016/j.celrep.2012.05.003.

Matuoka, K. *et al.* (1992) 'Cloning of ASH, a ubiquitous protein composed of one Src homology region (SH) 2 and two SH3 domains, from human and rat cDNA libraries.', *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 89(19):9015-9. doi: 10.1073/pnas.89.19.9015.

Matuoka, K. *et al.* (1997) 'A novel ligand for an SH3 domain of the adaptor protein Nck bears an SH2 domain and nuclear signaling motifs', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 239(2), pp. 488-492. doi: 10.1006/bbrc.1997.7492.

Mayer, B. J. (2001) 'SH3 domains: complexity in moderation.', *Journal of cell science*, 114(Pt 7), pp. 1253-1263. doi: 10.1038/20726.

Mayer, B. J. and Baltimore, D. (1993) 'Signalling through SH2 and SH3 domains', *Trends in Cell Biology*, pp. 8-13. doi: 10.1016/0962-8924(93)90194-6.

Mayer, B. J., Hamaguchi, M. and Hanafusa, H. (1988) 'A novel viral oncogene with structural similarity to phospholipase C', *Nature*, 332(6161), pp. 272-275. doi: 10.1038/332272a0.

Mayer, B. J., Hamaguchi, M. and Hanafusa, H. (1988) 'Characterization of p47(gag-crk), a novel oncogene product with sequence similarity to a putative modulatory domain of protein-tyrosine kinases and phospholipase C', in *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, pp. 907-914. doi: 10.1101/SQB.1988.053.01.104.

Mayya, V. *et al.* (2009) 'Quantitative phosphoproteomic analysis of T Cell receptor signaling reveals system-wide modulation of protein-protein interactions', *Science Signaling*. 2(84). doi: 10.1126/scisignal.2000007.

Miki, T. *et al.* (1993) 'Oncogene *ect2* is related to regulators of small GTP-binding proteins', *Nature*. 362(6419):462-5. doi: 10.1038/362462a0.

Milo, R. *et al.* (2009) 'BioNumbers The database of key numbers in molecular and cell biology', *Nucleic Acids Research*, 38(SUPPL.1), pp. 750-753. doi: 10.1093/nar/gkp889.

Miyoshi-Akiyama, T. *et al.* (2001) 'Regulation of Cbl phosphorylation by the Abl tyrosine kinase and the Nck SH2/SH3 adaptor', *Oncogene*, 20(30), pp. 4058-4069. doi: 10.1038/sj.onc.1204528.

Mohamed, A. M. and Chin-Sang, I. D. (2011) 'The *C. elegans* *nck-1* gene encodes two isoforms and is required for neuronal guidance', *Developmental Biology*, 354(1), pp. 55-66. doi: 10.1016/j.ydbio.2011.03.019.

Moran, M. F. *et al.* (1990) 'Src homology region 2 domains direct protein-protein interactions in signal transduction.', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(21), pp. 8622-8626. doi: 10.1073/pnas.87.21.8622.

Muller, J. *et al.* (1992) 'A limited set of SH2 domains binds BCR through a high-affinity



phosphotyrosine-independent interaction.’, *Molecular and cellular biology*. (11):5087-93. doi: 10.1128/MCB.12.11.5087.Updated.

Musacchio, A. *et al.* (1992) ‘Crystal structure of a Src-homology 3 (SH3) domain.’, *Nature*, 359(6398), pp. 851–855. doi: 10.1038/359851a0.

Musacchio, A., Wilmanns, M. and Saraste, M. (1994) ‘Structure and Function of the SH3 Domain’, *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 61, pp. 283–297. doi: org/10.1016/0079-6107(94)90003-5

Nahorski, M. S. *et al.* (2012) ‘Folliculin interacts with p0071 (plakophilin-4) and deficiency is associated with disordered rhoa signalling, epithelial polarization and cytokinesis’, *Human Molecular Genetics*. 21(24):5268-79. doi: 10.1093/hmg/dds378.

Narayanan, A. *et al.* (2011) ‘Phosphorylation of the Arp2 subunit relieves Auto-Inhibitory interactions for Arp2/3 complex activation’, *PLoS Computational Biology*, 7(11). doi: 10.1371/journal.pcbi.1002226.

Nash, P. (2013) ‘SH3 Domain’, in *Brenner’s Encyclopedia of Genetics: Second Edition*, pp. 421–421. doi: 10.1016/B978-0-12-374984-0.01415-7.

New, L. A., Chahi, A. K. and Jones, N. (2013) ‘Direct regulation of nephrin tyrosine phosphorylation by Nck adaptor proteins’, *Journal of Biological Chemistry*, 288(3), pp. 1500–1510. doi: 10.1074/jbc.M112.439463.

Ngoenkam, J. *et al.* (2014) ‘Non-overlapping functions of Nck1 and Nck2 adaptor proteins in T cell activation’, *Cell Communication and Signaling*. 12:21. doi: 10.1186/1478-811X-12-21.

Nguyên, D. T. *et al.* (2004) ‘Nck-dependent activation of extracellular signal-regulated kinase-1 and regulation of cell survival during endoplasmic reticulum stress.’, *Molecular biology of the cell*, 15(9), pp. 4248–60. doi: 10.1091/mbc.E03-11-0851.

Nioche, P. *et al.* (2002) ‘Crystal structures of the SH2 domain of Grb2: Highlight on the binding of a new high-affinity inhibitor’, *Journal of Molecular Biology*, 315(5), pp. 1167–1177. doi: 10.1006/jmbi.2001.5299.

Nishimura, R. *et al.* (1993) ‘Two signaling molecules share a phosphotyrosine-containing binding site in the platelet-derived growth factor receptor.’, *Molecular and cellular biology*, 13(11), pp. 6889–6896. doi: 10.1128/MCB.13.11.6889.Updated.

Noble, M. E. *et al.* (1993) ‘Crystal structure of the SH3 domain in human Fyn; comparison of the three-dimensional structures of SH3 domains in tyrosine kinases and spectrin.’, *The EMBO journal*, 12(7), pp. 2617–24. doi: 7687536.

Noguchi, T. *et al.* (1999) ‘Tyrosine phosphorylation of p62(Dok) induced by cell adhesion and insulin: possible role in cell migration’, *EMBO J*, 18(7), pp. 1748–1760. doi: 10.1093/emboj/18.7.1748.

Ogura, K. *et al.* (1999) 'Solution structure of the SH2 domain of Grb2 complexed with the Shc-derived phosphotyrosine-containing peptide', *Journal of Molecular Biology*, 289(3), pp. 439–445. doi: 10.1006/jmbi.1999.2792.

Okamura, H. and Resh, M. D. (1995) 'p80/85 Cortactin associates with the Src SH2 domain and colocalizes with v-Src in transformed cells', *Journal of Biological Chemistry*, 270(44), pp. 26613–26618. doi: 10.1074/jbc.270.44.26613.

Okrut, J. *et al.* (2015) 'Allosteric N-WASP activation by an inter-SH3 domain linker in Nck', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(47), pp. E6436–E6445. doi: 10.1073/pnas.1510876112.

Overduin, M. *et al.* (1992) 'Three-dimensional solution structure of the src homology 2 domain of c-abl.', *Cell*, 70(4), pp. 697–704. doi: 10.1016/0092-8674(92)90437-H.

Oxley, C. L. *et al.* (2008) 'An integrin phosphorylation switch: The effect of  $\beta 3$  integrin tail phosphorylation on Dok1 and talin binding', *Journal of Biological Chemistry*, 283(9), pp. 5420–5426. doi: 10.1074/jbc.M709435200.

Paensuwan, P. *et al.* (2016) 'Nck Binds to the T Cell Antigen Receptor Using Its SH3.1 and SH2 Domains in a Cooperative Manner, Promoting TCR Functioning', *The Journal of Immunology*. 196(1):448-58. doi: 10.4049/jimmunol.1500958.

Park, M. J. *et al.* (2016) 'SH2 Domains Serve as Lipid-Binding Modules for pTyr-Signaling Proteins', *Molecular Cell*, 62(1), pp. 7–20. doi: 10.1016/j.molcel.2016.01.027.

Pawson, T. (1988) 'Noncatalytic domains of cytoplasmic protein-tyrosine kinases: regulatory elements in signal transduction', *Oncogene*, 3(5):491-5.No doi

Pawson, T. (1992) 'SH2 and SH3 domains', *Current Opinion in Structural Biology*, 2(3), pp. 432–437. doi: 10.1016/0959-440X(92)90235-Y.

Pawson, T. (2004) 'Specificity in Signal Transduction: From Phosphotyrosine-SH2 Domain Interactions to Complex Cellular Systems', *Cell*, 116(2), pp. 191–203. doi: 10.1016/S0092-8674(03)01077-8.

Pawson, T. and Nash, P. (2003) 'Assembly of cell regulatory systems through protein interaction domains.', *Science (New York, N.Y.)*. doi: 10.1126/science.1083653.

Peifer, M. *et al.* (1992) 'The vertebrate adhesive junction proteins  $\beta$ -catenin and plakoglobin and the Drosophila segment polarity gene armadillo form a multigene family with similar properties', *Journal of Cell Biology*. 118(3):681-91. doi: 10.1083/jcb.118.3.681.

Pendergast, A. M. *et al.* (1991) 'BCR sequences essential for transformation by the BCR-ABL oncogene bind to the ABL SH2 regulatory domain in a non-phosphotyrosine-dependent manner', *Cell*. 66(1):161-71. doi: 10.1016/0092-8674(91)90148-R.

Piekny, A., Werner, M. and Glotzer, M. (2005) 'Cytokinesis: Welcome to the Rho zone', *Trends*

*in Cell Biology*. 15(12):651-8. doi: 10.1016/j.tcb.2005.10.006.

Pils, S. *et al.* (2012) 'The adaptor molecule Nck localizes the WAVE complex to promote actin polymerization during CEACAM3-mediated phagocytosis of bacteria', *PLoS ONE*, 7(3). doi: 10.1371/journal.pone.0032808.

Pokutta, S. and Weis, W. I. (2000) 'Structure of the dimerization and beta-catenin-binding region of alpha-catenin.', *Molecular Cell*. 5(3):533-43. doi: 10.1016/S1097-2765(00)80447-5.

Ponting, C. P. *et al.* (1999) 'Eukaryotic signalling domain homologues in archaea and bacteria. Ancient ancestry and horizontal gene transfer', *Journal of Molecular Biology*, 289(4), pp. 729–745. doi: 10.1006/jmbi.1999.2827.

Poy, F. *et al.* (1999) 'Crystal structures of the XLP protein SAP reveal a class of SH2 domains with extended, phosphotyrosine-independent sequence recognition', *Molecular Cell*. 4(4):555-61. doi: 10.1016/S1097-2765(00)80206-3.

Raffel, G. D., Parmar, K. and Rosenberg, N. (1996) 'In vivo association of v-Abl with Shc mediated by a non-phosphotyrosine-dependent SH2 interaction', *Journal of Biological Chemistry*. 271(9):4640-5. doi: 10.1074/jbc.271.9.4640.

Rahuel, J. *et al.* (1996) 'Structural basis for specificity of GRB2-SH2 revealed by a novel ligand binding mode', *Nature Struct Biol*, 3(7), pp. 586–589. doi: 10.1038/nsb0796-586.

Rajasekaran, A. K. *et al.* (1996) 'Catenins and zonula occludens-1 form a complex during early stages in the assembly of tight junctions', *Journal of Cell Biology*. 132(3):451-63. doi: 10.1083/jcb.132.3.451.

Ran, X. and Song, J. (2005) 'Structural insight into the binding diversity between the Tyrosine-phosphorylated human ephrinBs and Nck2 SH2 domain', *Journal of Biological Chemistry*. 280(19):19205-12. doi: 10.1074/jbc.M500330200.

Rao, Y. (2005) 'Dissecting Nck/Dock signaling pathways in Drosophila visual system.', *International journal of biological sciences*, 1(2): 80–86. doi: 10.7150/ijbs.1.80.

Rao, Y. and Zipursky, S. L. (1998) 'Domain requirements for the Dock adapter protein in growth-cone signaling', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(5), pp. 2077–2082. doi: 10.1073/pnas.95.5.2077.

Ren, G. *et al.* (2009) 'Cortactin is a functional target of E-cadherin-activated Src family kinases in MCF7 epithelial monolayers', *Journal of Biological Chemistry*, 284(28), pp. 18913–18922. doi: 10.1074/jbc.M109.000307.

Ren, R. *et al.* (1993) 'Identification of a ten-amino acid proline-rich SH3 binding site', *Science*, 259(5098), pp. 1157–1161. doi: 10.1126/science.8438166.

Rivera, G. M. *et al.* (2004) 'Inducible Clustering of Membrane-Targeted SH3 Domains of the Adaptor Protein Nck Triggers Localized Actin Polymerization', *Current Biology*, 14(1), pp. 11–

22. doi: 10.1016/j.cub.2003.12.033.

Rivera, G. M. *et al.* (2006) 'Requirement of Nck adaptors for actin dynamics and cell migration stimulated by platelet-derived growth factor B.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(25), pp. 9536–41. doi: 10.1073/pnas.0603786103.

Rivero-Lezcano, O. M. *et al.* (1995) 'Wiskott-Aldrich syndrome protein physically associates with Nck through Src homology 3 domains.', *Molecular and cellular biology*, 15(10), pp. 5725–31. doi: 10.1128/MCB.15.10.5725.

Rizzuto, R. *et al.* (1992) 'Structure of an SH2 domain of the p85 $\alpha$  subunit of phosphatidylinositol-3-OH kinase', *Nature*, 358, pp. 325–327.

Rodriguez, M. *et al.* (2004) 'An Oriented Peptide Array Library (OPAL) Strategy to Study Protein-Protein Interactions', *Journal of Biological Chemistry*, 279(10), pp. 8802–8807. doi: 10.1074/jbc.M311886200.

Rohatgi, R. *et al.* (2001) 'Nck and Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate Synergistically Activate Actin Polymerization through the N-WASP-Arp2/3 Pathway', *Journal of Biological Chemistry*, 276(28), pp. 26448–26452. doi: 10.1074/jbc.M103856200.

Round, J. E. and Sun, H. (2011) 'The adaptor protein Nck2 mediates Slit1-induced changes in cortical neuron morphology', *Molecular and Cellular Neuroscience*. 47(4):265-73. doi: 10.1016/j.mcn.2011.04.009.

Roy, E. *et al.* (2010) 'Nck adaptors are positive regulators of the size and sensitivity of the T-cell repertoire', *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 107(35):15529-34. doi: 10.1073/pnas.1009743107.

Ruan, W., Pang, P. and Yong, R. (1999) 'The SH2/SH3 adaptor protein dock interacts with the Ste20-like kinase misshapen in controlling growth cone motility', *Neuron*, 24(3), pp. 595–605. doi: 10.1016/S0896-6273(00)81115-0.

Rubin, G. M. *et al.* (2000) 'Comparative genomics of the eukaryotes', *Science*, 287(5461):2204-15. doi: 10.1126/science.287.5461.2204.

Ruepp, M.-D. *et al.* (2009) 'Mammalian pre-mRNA 3' End Processing Factor CF Im68 Functions in mRNA Export', *Molecular Biology of the Cell*. 20(24): 5211–5223. doi: 10.1091/mbc.E09-05-0389.

Sadowski, I., Stone, J. C. and Pawson, T. (1986) 'A noncatalytic domain conserved among cytoplasmic protein-tyrosine kinases modifies the kinase function and transforming activity of Fujinami sarcoma virus P130gag-fps.', *Molecular and cellular biology*, 6(12), pp. 4396–4408. doi: 10.1128/MCB.6.12.4396.Updated.

Saksela, K. and Permi, P. (2012) 'SH3 domain ligand binding: What's the consensus and where's the specificity?', *FEBS Letters*, 586(17):2609-14. doi: 10.1016/j.febslet.2012.04.042.

- Santiveri, C. M. *et al.* (2009) 'Interaction between the N-terminal SH3 domain of Nck $\alpha$  and CD3e-derived peptides: Non-canonical and canonical recognition motifs', *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 1794(1), pp. 110–117. doi: 10.1016/j.bbapap.2008.09.016.
- Sayos, J. *et al.* (1998) 'The X-linked lymphoproliferative-disease gene product SAP regulates signals induced through the co-receptor SLAM', *Nature*. 395(6701):462-9. doi: 10.1038/26683.
- Schlaepfer, D. D., Broome, M. A. and Hunter, T. (1997) 'Fibronectin-stimulated signaling from a focal adhesion kinase-c-Src complex: involvement of the Grb2, p130cas, and Nck adaptor proteins', *Mol Cell Biol*, 17(3), pp. 1702–1713. doi: 10.1128/MCB.17.3.1702.
- Schmidt, A. *et al.* (2007) 'Rho GTPases regulate PRK2/PKN2 to control entry into mitosis and exit from cytokinesis', *EMBO Journal*. 26(6):1624-36. doi: 10.1038/sj.emboj.7601637.
- Shen, L. (2012) 'Tight junctions on the move: Molecular mechanisms for epithelial barrier regulation', *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1258:9-18. doi: 10.1111/j.1749-6632.2012.06613.x.
- Sicheri, F., Moarefi, I. and Kuriyan, J. (1997) 'Crystal structure of the Src family tyrosine kinase Hck', *Nature*. 385(6617):602-9. doi: 10.1038/385602a0.
- Sims, C. E. and Allbritton, N. L. (2007) 'Analysis of single mammalian cells on-chip', *Lab on a Chip*, 7(4), p. 423. doi: 10.1039/b615235j.
- Songyang, Z. *et al.* (1993) 'SH2 domains recognize specific phosphopeptide sequences.', *Cell*, 72(5), pp. 767–778. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90404-E](http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674(93)90404-E).
- Songyang, Z. *et al.* (1994) 'Specific motifs recognized by the SH2 domains of Csk, 3BP2, fps/fes, GRB-2, HCP, SHC, Syk, and Vav.', *Molecular and Cellular Biology*, 14(4), pp. 2777–2785. doi: 10.1128/MCB.14.4.2777.
- Songyang, Z. *et al.* (1995) 'A single point mutation switches the specificity of group III Src homology (SH) 2 domains to that of group I SH2 domains', *Journal of Biological Chemistry*, 270(44), pp. 26029–26032. doi: 10.1074/jbc.270.44.26029.
- Songyang, Z. and Cantley, L. C. (1995) 'Recognition and specificity in protein tyrosine kinase-mediated signalling', *Trends in Biochemical Sciences*, pp. 470–475. 20(11):470-5. doi: 10.1016/S0968-0004(00)89103-3.
- Sowd, G. A. *et al.* (2016) 'A critical role for alternative polyadenylation factor CPSF6 in targeting HIV-1 integration to transcriptionally active chromatin', *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 113(8):E1054-63. doi: 10.1073/pnas.1524213113.
- Sparks, A. B. *et al.* (1996) 'Distinct ligand preferences of Src homology 3 domains from Src, Yes, Abl, Cortactin, p53bp2, PLCgamma, Crk, and Grb2.', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(4), pp. 1540–1544. doi: 10.1073/pnas.93.4.1540.

Srivastava, N. *et al.* (2013) 'EphB2 receptor forward signaling controls cortical growth cone collapse via Nck and Pak', *Molecular and Cellular Neuroscience*. 52:106-16. doi: 10.1016/j.mcn.2012.11.003.

Stahl, M. L. *et al.* (1988) 'Sequence similarity of phospholipase C with the non-catalytic region of src', *Nature*, 332(6161), pp. 269–272. doi: 10.1038/332269a0.

Stein, E. *et al.* (1998) 'Nck recruitment to Eph receptor, EphB1/ELK, couples ligand activation to c-Jun kinase', *Journal of Biological Chemistry*. 273, 1303-1308. doi: 10.1074/jbc.273.3.1303.

Stoletov, K. V. *et al.* (2001) 'NCK and PAK Participate in the Signaling Pathway by which Vascular Endothelial Growth Factor Stimulates the Assembly of Focal Adhesions', *Journal of Biological Chemistry*, 276(25), pp. 22748–22755. doi: 10.1074/jbc.M009720200.

Su, Y. C. *et al.* (1997) 'NIK is a new Ste20-related kinase that binds NCK and MEKK1 and activates the SAPK/JNK cascade via a conserved regulatory domain', *EMBO Journal*, 16(6), pp. 1279–1290. doi: 10.1093/emboj/16.6.1279.

Takenawa, T. and Suetsugu, S. (2007) 'The WASP-WAVE protein network: Connecting the membrane to the cytoskeleton', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(1):37-48. doi: 10.1038/nrm2069.

Takeuchi, K. *et al.* (2008) 'Structural and Functional Evidence that Nck Interaction with CD3ε Regulates T-Cell Receptor Activity', *Journal of Molecular Biology*, 380(4), pp. 704–716. doi: 10.1016/j.jmb.2008.05.037.

Takeuchi, K. *et al.* (2010) 'Autoinhibitory interaction in the multidomain adaptor protein nck: Possible roles in improving specificity and functional diversity.', *Biochemistry*. 49(27): 5634–5641. doi: 10.1021/bi100322m.

Tanaka, M., Gupta, R. and Mayer, B. J. (1995) 'Differential inhibition of signaling pathways by dominant-negative SH2/SH3 adapter proteins', *Mol Cell Biol*, 15(12), pp. 6829–6837. doi: 10.1128/MCB.15.12.6829.

Tehrani, S. *et al.* (2007) 'Src phosphorylation of cortactin enhances actin assembly', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(29), pp. 11933–11938. doi: 10.1073/pnas.0701077104.

Teyra, J. *et al.* (2017) 'Comprehensive Analysis of the Human SH3 Domain Family Reveals a Wide Variety of Non-canonical Specificities', *Structure*, 25(10), p. 1598–1610.e3. doi: 10.1016/j.str.2017.07.017.

Thévenot, E. *et al.* (2011) 'p21-activated kinase 3 (PAK3) protein regulates synaptic transmission through its interaction with the Nck2/Grb4 protein adaptor', *Journal of Biological Chemistry*. 286(46):40044-59. doi: 10.1074/jbc.M111.262246.

Tobey, N. *et al.* (2004) 'Calcium-switch technique and junctional permeability in native rabbit

esophageal epithelium', *AJP: Gastrointestinal and Liver Physiology*. 286(6):G1042-9. doi: 10.1152/ajpgi.00387.2003.

Tu, Y., Kucik, D. F. and Wu, C. (2001) 'Identification and kinetic analysis of the interaction between Nck-2 and DOCK180', *FEBS Letters*. 491 (3),193-199. doi: 10.1016/S0014-5793(01)02195-0.

Tu, Y., Li, F. and Wu, C. (1998) 'Nck-2, a novel Src homology2/3-containing adaptor protein that interacts with the LIM-only protein PINCH and components of growth factor receptor kinase-signaling pathways', *Mol Biol Cell*, 9(12), pp. 3367–3382. doi: 10.1091/mbc.9.12.3367.

Verma, R. *et al.* (2006) 'Nephrin ectodomain engagement results in Src kinase activation, nephrin phosphorylation, Nck recruitment, and actin polymerization', *Journal of Clinical Investigation*, 116(5), pp. 1346–1359. doi: 10.1172/JCI27414.

Verschueren, E. *et al.* (2015) 'Evolution of the SH3 domain specificity landscape in yeasts', *PLoS ONE*, 10(6). doi: 10.1371/journal.pone.0129229.

Waksman, G. *et al.* (1992) 'Crystal structure of the phosphotyrosine recognition domain SH2 of v-src complexed with tyrosine-phosphorylated peptides', *Nature*, 355, pp. 646–653. doi: 10.1038/358646a0

Waksman, G. (1992) 'Crystal structure of the phosphotyrosine recognition domain SH2 of the Src oncogene product complexed with tyrosine-phosphorylated peptides.', *Cellular and Molecular Biology*, 40(5), pp. 611–618. doi: 10.1038/358646a0.

Waksman, G. *et al.* (1993) 'Binding of a high affinity phosphotyrosyl peptide to the Src SH2 domain: Crystal structures of the complexed and peptide-free forms', *Cell*, 72(5), pp. 779–790. doi: 10.1016/0092-8674(93)90405-F.

Weisswange, I. *et al.* (2009) 'The rate of N-WASP exchange limits the extent of ARP2/3-complex-dependent actin-based motility', *Nature*, 458(7234), pp. 87–91. doi: 10.1038/nature07773.

Whisstock, J. C. and Lesk, A. M. (1999) 'SH3 domains in prokaryotes', *Trends in Biochemical Sciences*, 24(4):132-3. doi: 10.1016/S0968-0004(99)01366-3.

Wolf, A. *et al.* (2006) 'The armadillo protein p0071 regulates Rho signalling during cytokinesis', *Nature Cell Biology*. 8(12):1432-40. doi: 10.1038/ncb1504.

Wu, C.-L. *et al.* (2011) 'Dock/Nck facilitates PTP61F/PTP1B regulation of insulin signalling', *Biochemical Journal*, 439(1), pp. 151–159. doi: 10.1042/BJ20110799.

Wu, X. *et al.* (1995) 'Structural basis for the specific interaction of lysine-containing proline-rich peptides with the N-terminal SH3 domain of c-Crk', *Structure*. 3(2):215-26. doi: 10.1016/S0969-2126(01)00151-4.

Wu, Y., Li, Q. and Chen, X. Z. (2007) 'Detecting protein-protein interactions by far western

- blotting', *Nature Protocols*. 2(12):3278-84. doi: 10.1038/nprot.2007.459.
- Wunderlich, L. *et al.* (1999) 'Requirement of multiple SH3 domains of Nck for ligand binding', *Cellular Signalling*, 11(4), pp. 253–262. doi: 10.1016/S0898-6568(98)00054-0.
- Xu, W. *et al.* (1999) 'Crystal structures of c-Src reveal features of its autoinhibitory mechanism', *Molecular Cell*. (5):629-3. doi: 10.1016/S1097-2765(00)80356-1.
- Xu, W., Harrison, S. C. and Eck, M. J. (1997) 'Three-dimensional structure of the tyrosine kinase c-Src', *Nature*. 385(6617):595-602. doi: 10.1038/385595a0.
- Xu, Z. *et al.* (2005) 'Molecular dissection of PINCH-1 reveals a mechanism of coupling and uncoupling of cell shape modulation and survival', *Journal of Biological Chemistry*, 280(30), pp. 27631–27637. doi: 10.1074/jbc.M504189200.
- Yamani, L., Latreille, M. and Larose, L. (2014) 'Interaction of Nck1 and PERK phosphorylated at Y561 negatively modulates PERK activity and PERK regulation of pancreatic  $\beta$ -cell proinsulin content', *Molecular Biology of the Cell*, 25(5), pp. 702–711. doi: 10.1091/mbc.E13-09-0511.
- Yamani, L., Li, B. and Larose, L. (2015) 'Nck1 deficiency improves pancreatic  $\beta$  cell survival to diabetes-relevant stresses by modulating PERK activation and signaling', *Cellular Signalling*, 27(12), pp. 2555–2567. doi: 10.1016/j.cellsig.2015.09.016.
- Yiemwattana, I. *et al.* (2012) 'Essential role of the adaptor protein Nck1 in Jurkat T cell activation and function', *Clinical and Experimental Immunology*. 167(1):99-107. doi: 10.1111/j.1365-2249.2011.04494.x.
- Yu, H. *et al.* (1992) 'Solution structure of the SH3 domain of Src and identification of its ligand-binding site', *Science*, 258(5088), pp. 1665–1668. doi: 10.1126/science.1280858.
- Yu, H. *et al.* (1994) 'Structural basis for the binding of proline-rich peptides to SH3 domains', *Cell*, 76(5), pp. 933–945. doi: 10.1016/0092-8674(94)90367-0.
- Zhang, W., Liu, H. and Tu, H. (2002) 'MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells', *Cell Research*, 12(1), pp. 9–18. doi: 10.1038/sj.cr.7290105.
- Zhao, Z. and Manser, E. (2012) 'PAK family kinases', *Cellular Logistics*, 2(2), pp. 59–68. doi: 10.4161/cl.21912.
- Zhao, Z. S., Manser, E. and Lim, L. (2000) 'Interaction between PAK and nck: a template for Nck targets and role of PAK autophosphorylation.', *Molecular and cellular biology*. 20(11):3906-17. doi: 10.1128/MCB.20.11.3906-3917.2000.



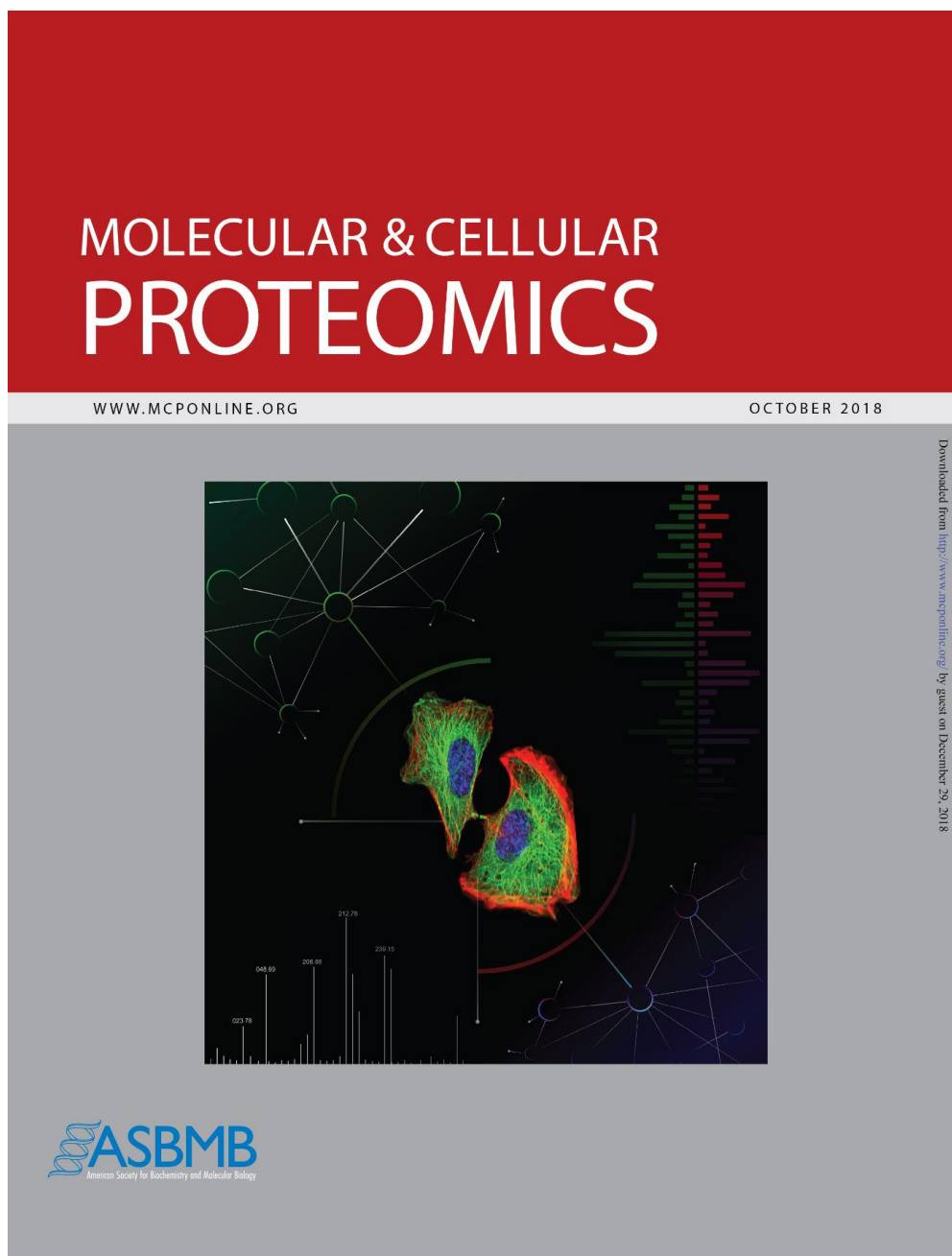
## Annexe 1 : Ensemble des peptides utilisés pour l'approche de *peptide array*

L'intégralité des peptides utilisés pour l'approche de *peptide array* (Fig. 3.9) ainsi que leurs assignations respectives sont précisées dans les tableaux suivants.

AVQPNNYLIRTEP	AVQPNNBLIRTEP	GSQTALYRTGSVG	GSQTALBRTGSVG	RDRPSEYDRTQPP	RDRPSEBDRTQPP	STKRPSYRAEQYP	STKRPSBRAEQYP
PEQGTLYSPEQTS	PEQGTLBSPEQTS	QRSTLTYQRNNYA	QRSTLTBQRNNYA	TQPPMQYYNSQGD	TQPPMQBYNSQGD	SYRAEQYPGSPDS	SYRAEQBPGSPDS
STQMNSYSDSGYQ	STQMNSBDSGYQ	TYQRNNYALNTTA	TYQRNNBALNTTA	QPPMQYYNSQGDA	QPPMQYBNSQGDA	SBSDSGBQEAGSF	
SYSDSGYQEAGSF	SYSDSGBQEAGSF	LNTTATYAEPYRP	LNTTATBAEPYRP	ATHKGLYPGSSKP	ATHKGLBPGSSKP	RAQSPBBVISTGV	
SRAQSPYYVISTG	SRAQSPBYVISTG	ATYAEPYRPIQYR	ATYAEPBRPIQYR	SKPSPYIYSSYSS	SKPSPIBISSYSS	QQQBDIBERMVPP	
RAQSPYYVISTGV	RAQSPYBVISTGV	PYRPIQYRVQECN	PYRPIQBRVQECN	PIYISSYSSPARE	PIYISSBSSPARE	BEGRTBBSPVBR	YVDPFTYEDPNQA
PLNPSAYSSTTLP	PLNPSABSSTTLP	RVQECNYNRLQHA	RVQECNBNRLQHA	LQHQQLYYSQDDS	LQHQQLBYSQDDS	TBQRNNBALNTTA	YVDPFTBEDPNQA
ARAASPYSQRPAS	ARAASPBSQRPAS	QANAAAYLQHLCF	QANAAABLQHLCF	QHQQLYYSQDDSN	QHQQLYBSQDDSN	ATBAEPBRPIQBR	
NGPTPQYQTARV	NGPTPQBQTARV	LVDSLLYVIHTCV	LVDSLLBVIHTCV	RKNFDAYRLYLQS	RKNFDABRLYLQS	QPPMQBNSQGDA	DTSSVLYTAVQPN
QFGQQYDIYERM	QFGQQBDIYERM	CVNTSDYDSKTVE	CVNTSDBDSKTVE	FDAYRLYLQSPHS	FDAYRLBLQSPHS	PIBIBSSSPARE	DTSSVLBTAVQPN
QQQYDIYERMVPP	QQQYDIBERMVPP	TLRNLSYRLELEV	TLRNLSBRLELEV	LQSPHSYEDPYFD	LQSPHSBEDPYFD	QHQQLBBSQDDSN	
TGLRSSYASQHSQ	TGLRSSBASQHSQ	PSVVKPYLTLLE	PSVVKPBLTLLE	HSYEDPYFDDRVR	HSYEDPBFDDRVR	FDBARLBLQSPHS	PKEDPIYDEPEGL
LHITPIYEGRTYY	LHITPIBEGRTYY	NWKFAAYIRAAVR	NWKFAABIRAAVR	FPASTDYSTQYGL	FPASTDBSTQYGL	HSBEDPBFDDRVR	PKEDPIBDEPEGL
IYEGRTYYSPVYR	IYEGRTYBSPVYR	KELIGKYAMRDLV	KELIGKBAMRDLV	TDYSTQYGLKSTT	TDYSTQBGLKSTT	TDBSTQBGLKSTT	
YEGRTYYSPVYRS	YEGRTYBSPVYRS	LNTLWQYRDLRSI	LNTLWQBRDLRSI	LKSTTNYVDFYST	LKSTTNBVDYFYST	TNBVDYBSTKRPS	ISEEPYDEVAAD
TYYSFVYRSPNHG	TYYSFVBRSPNHG	RDLRSIYKKGWGN	RDLRSIBKKGWGN	TNYVDFYSTKRPS	TNYVDFBSTKRPS	SBRAEQBPGSPDS	ISEEPYBDEVAAD

Y114	pY114	Y443	pY443	Y1062	pY1062	Y1179	pY1179	
Y126	pY126	Y465	pY465	Y1071	pY1071	y1184	pY1184	
Y152	pY152	Y470	pY470	Y1072	pY1072	pY152pY157		
Y157	pY157	Y478	pY478	Y1084	pY1084	pY223pY224		
Y223	pY223	Y482	pY482	Y1094	pY1094	pY369pY372		
Y224	pY224	Y487	pY487	Y1098	pY1098	pY415pY420pY421pY425		Y602 EPHA4
Y261	pY261	Y494	pY494	Y1115	pY1115	pY465pY470		pY602 EPHA4
Y275	pY275	Y551	pY551	Y1116	pY1116	pY478p482p487		
Y306	pY306	Y723	pY723	Y1129	pY1129	pY1071pY1072		Y1009 PDGFRB
Y369	pY369	Y734	pY734	Y1132	pY1132	pY1094pY1098		pY1009 PDGFRB
Y372	pY372	Y751	pY751	Y1139	pY1139	pY1115pY1116		
Y390	pY390	Y830	pY830	Y1143	pY1143	pY1129pY1132		Y361 DOK1
Y415	pY415	Y863	pY863	Y1156	pY1156	pY1139pY1143		pY361 DOK1
Y420	pY420	Y912	pY912	Y1160	pY1160	pY156pY1160		
Y421	pY421	Y994	pY994	Y1168	pY1168	pY1168pY1172		Y474 Tir E.Coli
Y425	pY425	Y1001	pY1001	Y1172	pY1172	pY1179pY1184		pY474 E.Coli

**Annexe 2 : Couverture du journal MOLECULAR & CELLULAR  
PROTEOMICS, Vol. 17, Issue 10, 1 Oct. 2018**



**On the Cover:** Confocal image of daughter cells that are undergoing cytokinesis to complete cell division. Fluorescence labeling shows the actin (*red*) as well as tubulin (*green*) cytoskeletons and highlights the last point of contact before abscission, the midbody. NCK1/2 adaptor protein interaction networks were defined via AP-MS and BioID proximity labeling. Their comparison revealed a specific role for NCK2 in cell abscission during cytokinesis. For details, see the article by Jacquet *et al.*, pages [1979–1990](#).