

Université de Montréal

Implication des régions *N*-terminales des protéines BRAF et KSR1
dans la formation du dimère BRAF/KSR1

Par

Sara Marullo

Faculté de Médecine, Programmes de biologie moléculaire

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de Philosophiæ Doctor
en biologie moléculaire

Août 2022

© Sara Marullo, 2022

Université de Montréal

Unité de signalisation intracellulaire, Département de Pathologie cellulaire,

Faculté de médecine

Cette thèse intitulée

**Implication des régions *N*-terminales des protéines BRAF et KSR1
dans la formation du dimère BRAF/KSR1**

Présenté par

Sara Marullo

A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes

Gregory Emery

Président-rapporteur

Marc Therrien

Directeur de recherche

Audrey Claing

Membre du jury

Nathalie Lamarche-Vane

Examinatrice externe

Résumé

La voie de signalisation RAS-ERK régule la prolifération et la différenciation cellulaire par la propagation séquentielle d'un signal jusqu'au noyau, aboutissant à la régulation des gènes cibles. Après réception d'un stimulus extracellulaire conduisant à l'activation de la petite GTPase RAS (*Rat Sarcoma*), la transduction du signal s'effectue par les phosphorylations successives de RAF (*Rapid Accelerated Fibrosarcoma*), MEK (*MAPK/ERK Kinase 1/2*) et ERK (*Extracellular signal-Regulated Kinase 1/2*).

Chez les mammifères, la famille élargie des protéines RAF comprend les trois kinases ARAF, BRAF, CRAF et les pseudokinases KSR1, KSR2 pour *Kinase Suppressor of Ras 1/2*. En l'absence de stimuli, les kinases RAF adoptent une forme auto-inhibée où leur région régulatrice *N*-terminale (*N-terminal Region* ou NTR) inhibe l'activité catalytique de leur domaine kinase (*Kinase Domain* ou KD). L'activation des GTPases RAS ancre les kinases RAF à la membrane plasmique *via* le domaine RBD (*Ras Binding Domain*) de leur NTR. Ce phénomène favorise la dérépression des KD et dévoile leur interface de dimérisation. L'association de deux protéines RAF l'une avec l'autre induit l'activation des kinases RAF et la phosphorylation de leur substrat MEK. Bien que dénuées d'activité kinase intrinsèque, les pseudokinases KSR sont néanmoins capables de dimériser avec les kinases RAF et de les activer.

Des mutations des protéines clés de la voie RAS-ERK conduisent à son activation anormale et sont directement responsables du développement et de la progression tumorale. Notamment, la kinase BRAF est altérée dans 7 % des cancers. L'échec des stratégies thérapeutiques permettant d'inhiber les kinases RAF a mis en lumière l'importance de la dimérisation dans la régulation de leur activité. Ainsi, les processus favorisant la formation d'hétérodimères RAF/KSR ne sont, à ce jour, pas bien compris.

La problématique de la thèse a été d'identifier les mécanismes moléculaires régissant la formation spécifique du dimère BRAF/KSR1 aboutissant à la phosphorylation du substrat MEK1. Les objectifs de la thèse ont donc été 1) de déterminer ce qui permet au substrat MEK1 de se lier aux différentes protéines de la famille RAF, 2) d'identifier les domaines nécessaires à l'interaction spécifique de BRAF et KSR1, 3) de développer des stratégies de purification du dimère BRAF/KSR1 pour en faire une analyse structurale.

Ce travail a dans un premier temps montré que le substrat MEK1 est l'activateur de sa propre kinase BRAF, en favorisant sa transactivation par KSR1 via des interactions au niveau des domaines kinases. De manière inattendue, nous avons par la suite établi que ce sont les NTR des protéines BRAF et KSR1 qui guident leur hétérodimérisation. Le dimère BRAF/KSR1 repose ainsi sur l'interaction directe du domaine BRS de BRAF et du domaine CC-SAM de KSR1. Nous avons montré que le domaine CRD de BRAF exerce une influence sur l'interaction BRS/CC-SAM et par extension, sur la dimerisation de BRAF avec KSR1. Enfin, nous avons testé plusieurs stratégies de purification du dimère BRAF/KSR1 qui nous ont permis d'optimiser une technique de purification à partir de cellules de mammifères et de générer des constructions pour des cellules d'insectes.

Ainsi, ce travail nous a permis d'améliorer la compréhension des mécanismes de formation de l'hétérodimère BRAF/KSR1 et son lien avec le substrat MEK1. Nous avons découvert des nouveaux moyens de régulation de la signalisation RAS-ERK. À terme, les résultats obtenus s'avèreront utiles pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques efficaces pour inhiber la voie RAS-ERK dans des contextes pathologiques.

Mots-clés : cancer, signalisation, kinase, dimérisation, RAF, KSR, structure

Abstract

The RAS-ERK signaling pathway regulates cell proliferation and differentiation by signal propagation from the cell surface to the nucleus, resulting in the regulation of targeted genes. After receiving an extracellular stimulus leading to the activation of the small GTPase RAS (*Rat Sarcoma*), signal transduction is mediated by the successive phosphorylations of RAF (*Rapid Accelerated Fibrosarcoma*), MEK (*MAPK/ERK Kinase 1/2*) and ERK (*Extracellular signal-Regulated Kinase 1/2*) kinases.

In mammals, the extended family of RAF proteins is comprised of the three kinases ARAF, BRAF, CRAF and the two pseudokinases KSR1, KSR2 from *Kinase Suppressor of Ras 1/2*. In the absence of a stimulus, RAF kinases are in an auto-inhibited conformation wherein their N-terminal regulatory region (NTR) inhibits the catalytic activity of their kinase domain (KD). Activation of the RAS GTPases anchors RAF kinases to the plasma membrane through binding of the RBD (*Ras Binding Domain*), present in their NTR. This phenomenon induces the release of the KDs and unveils their dimerization interfaces. The association of two RAF proteins with each other stimulates the activation of RAF kinases and the phosphorylation of their substrate MEK. Although lacking an intrinsic kinase activity, KSR pseudokinases are nevertheless able to stimulate RAF kinase activity through dimerization and transactivation.

Mutations of core members of the RAS-ERK pathway led to its abnormal activation and are directly responsible for tumor development and progression. In particular, the BRAF isoform is mutated in 7 % of cancers. Unsuccessful therapeutic strategies developed to inhibit RAF kinases have highlighted the importance of dimerization in the regulation of the catalytic activity of RAF kinases. Moreover, the process favoring the formation of RAF/KSR heterodimers is not fully understood.

The focus of this Ph.D. was to identify the molecular mechanisms governing the specific formation of the BRAF/KSR1 dimer leading to the phosphorylation of the MEK1 substrate. Our main objectives were therefore to 1) determine what allows the substrate MEK1 to bind to the different members of the RAF family of proteins, 2) identify the domains necessary for the specific interaction of BRAF and KSR1 3) develop a new approach to purify the BRAF/KSR1 dimer for structural analysis.

This work showed that the substrate MEK1 stimulates the activation of its own kinase, by promoting BRAF transactivation by KSR1 through interactions at the kinase domain level. Unexpectedly, we subsequently established that the NTRs of BRAF and KSR1 guide their heterodimerization. BRAF/KSR1 dimer formation is thus based on direct interaction of the BRS domain of BRAF and the CC-SAM domain of KSR1. We then showed that the CRD domain of BRAF has an influence on the BRS/CC-SAM interaction which overall modulates the dimerization of BRAF with KSR1. Finally, we tested several BRAF/KSR1 dimer purification strategies that allowed us to optimize a purification technique from mammalian cells. We also generated constructs enhanced for insect cells expression in the hope of successfully stabilizing BRAF/KSR1 in a signaling complex.

Thus, this work allowed us to improve the understanding of the mechanisms underlying the formation of BRAF/KSR1 heterodimer and its link with its MEK1 substrate. We have discovered new ways of regulating the RAS-ERK signaling pathway. Ultimately, these results will prove useful for the development of new effective therapeutic strategies to inhibit the RAS-ERK pathway in pathological contexts.

Keywords: cancer, signalling, kinase, dimerisation, RAF, KSR, structure

Table des matières

Résumé	5
Abstract	7
Table des matières	9
Liste des tableaux	15
Liste des figures	17
Liste des sigles et abréviations	21
Remerciements	25
Avant-Propos.....	28
Chapitre 1 : Introduction	29
1.1 Principes généraux des voies de signalisation.....	29
1.1.1 Les caractéristiques d'une voie de signalisation	29
1.1.2 La signalisation par les RTK.....	32
1.2 La cascade RAS-ERK	33
1.2.1 Le module RAF-MEK-ERK	35
1.2.2 Les protéines régulatrices de la voie	37
1.2.3 Activation des gènes cibles et modulation des fonctions cellulaires	38
1.2.4 Les cancers causés par une suractivation de la voie RAS-ERK	39
1.3 La famille des protéines RAF.....	40
1.3.1 Les kinases RAF.....	40
1.3.1.1 Découverte et évolution	40
1.3.1.2 Rôles des kinases RAF dans le développement et spécificité des isoformes.....	41
1.3.1.3 La boucle de rétrocontrôle négatif	43
1.3.1.4 Rôles indépendants de la voie RAS-ERK.....	43
1.3.2 Les protéines KSR.....	44

1.3.2.1	Découverte des protéines KSR en lien avec la voie RAS-ERK.....	44
1.3.2.2	Rôle des protéines KSR dans les cancers, indépendamment de la voie RAS-ERK 45	
1.3.2.3	Les protéines KSR font partie de la famille des protéines RAF	46
1.4	Organisation structurale des protéines RAF et mode d'activation.....	48
1.4.1	Les domaines des kinases RAF	48
1.4.1.1	La région <i>N</i> -terminale régulatrice (NTR).....	49
1.4.1.2	Les sites de liaison des protéines 14-3-3	53
1.4.1.3	Le domaine kinase.....	54
1.4.1.3.1	Les différentes conformations du domaine kinase	54
1.4.1.3.2	La N-terminal Acidic region ou NtA	56
1.4.2	Spécificités des protéines KSR	57
1.4.2.1	La région NTR des protéines KSR.....	58
1.4.2.2	Les protéines KSR sont des pseudokinases.....	58
1.4.2.3	Interactions entre les kinases RAF, les protéines KSR et les protéines MEK ...	60
1.5	Implication de la structure des protéines RAF en pathologie humaine.....	64
1.5.1	Les Rasopathies : des maladies génétiques liées à RAF	64
1.5.2	Cancers et mutations ponctuelles des kinases RAF	65
1.5.2.1	Les mutants de BRAF de type « kinase-dead »	65
1.5.2.2	Les mutations activatrices : l'exemple de BRAF ^{V600E}	66
1.5.2.3	Les mutations de CRAF et d'ARAF	67
1.5.3	Les inhibiteurs de la voie RAS-ERK	68
1.5.3.1	Généralités.....	68
1.5.3.2	Inhibition du mutant BRAF ^{V600E}	69
1.5.3.3	L'activation paradoxale.....	69
1.6	Problématique et objectifs de la thèse	71

Chapitre 2 : Matériel et méthode.....	73
2.1 Lignées cellulaires et transfection	73
2.2 Génération des plasmides d'expression	73
2.2.1 Étapes du clonage.....	73
2.2.2 Clonage classique.....	74
2.2.3 Mutagénèse dirigée	74
2.2.4 Technique de Gibson.....	74
2.3 Mesure des interactions protéiques	75
2.3.1 Co-immunoprécipitation et Western Blot	75
2.3.2 Essai de double-hybride en levure (Y2H).....	77
2.3.2.1 Principe.....	77
2.3.2.2 Transformation et croisement de levures PJ69	78
2.3.2.3 Cribles par PCR à erreurs ou par mutagénèse saturante	80
2.3.3 Purification des protéines	81
Chapitre 3 : Éléments structuraux impliqués dans le complexe protéique MEK1/BRAF/KSR1	83
3.1 Le domaine kinase de MEK1 possède des structures secondaires lui permettant de discriminer ses partenaires d'interaction.....	83
3.1.1 Contexte	83
3.1.2 Effets de mutations des structures secondaires sur les interactions de MEK1 à BRAF, CRAF et KSR1	84
3.1.2.1 Une mutation de l'hélice α G de MEK1 perturbe son interaction avec ses partenaires	84
3.1.2.2 Les mutations des hélice α G n'impactent pas le repliement global du domaine: exemple de KSR1 ^{W831R}	86
3.1.2.3 L'hélice α G et la boucle d'activation des protéines RAF sont requises pour leur interaction avec MEK1.....	88

3.1.3	Identification des substitutions capables de moduler l'affinité de MEK1 pour BRAF, CRAF et KSR1	90
3.1.3.1	L'interaction de MEK1 avec ses partenaires est influencée par la nature des résidus de sa boucle d'activation.....	91
3.1.3.2	Évaluation de la force et de la spécificité des mutants de MEK1	93
3.1.4	Conclusions et perspectives	97
3.2	Le domaine BRS de BRAF est essentiel à l'interaction BRAF/KSR1	100
3.2.1	Contexte	100
3.2.2	La spécificité d'interaction des régions NTR.....	103
3.2.2.1	BRAF ^{NTR} interagit spécifiquement avec KSR1 ^{NTR}	103
3.2.2.2	Le BRS est nécessaire à l'interaction de BRAF ^{NTR} avec KSR1 ^{NTR}	104
3.2.3	Le domaine BRS et le domaine CC-SAM interagissent directement	110
3.2.3.1	Le BRS interagit avec le CC-SAM lorsque ces domaines sont exprimés isolément 110	
3.2.3.2	Purification du BRS et analyse structurale de l'interaction BRS/CC-SAM	112
3.2.4	Conclusions et perspectives	115
Chapitre 4 : Stabilisation du dimère BRAF/KSR1 en vue d'en obtenir la structure		116
4.1	Le rôle inattendu du CRD dans la formation du dimère BRAF/KSR1	116
4.1.1	Contexte	116
4.1.2	La voie Ras/MAPK est activée par des mutations du domaine CRD de BRAF ..	118
4.1.2.1	Des mutations du CRD augmentent l'interaction BRAF ^{NTR} /KSR1 ^{NTR}	118
4.1.2.2	Les mutations du CRD de BRAF activent la voie RAS-ERK	123
4.1.3	Les mutations du CRD de BRAF ont une incidence sur la formation du dimère BRAF/KSR1.....	124
4.1.3.1	Les mutations du CRD de BRAF favorisent la formation du dimère BRAF/ KSR1 124	

4.1.3.2	Lien entre dimérisation de BRAF/KSR1 et activation de la voie RAS-ERK..	126
4.1.4	Conclusions et Perspectives	129
4.2	Études structurales des protéines BRAF et KSR1	129
4.2.1	Contexte	129
4.2.2	Étude des interactions des domaines des protéines RAF	130
4.2.2.1	Interactions des domaines des NTRs de BRAF et KSR1.....	130
4.2.2.2	Stabilisation de l'interaction BRAF/ KSR1 par leurs domaines kinases	134
4.2.3	Vers l'obtention d'un complexe multiprotéique à partir de cellules eucaryotes..	136
4.2.4	Conclusions et perspectives	143
Chapitre 5 : Discussion		145
5.1	Comment le domaine CRD de BRAF impacte-t-il l'interaction BRS/CC-SAM ?	146
5.2	Quel est le rôle du domaine CRD dans l'activation des kinases RAF?	149
5.3	Que provoquent les mutations du domaine CRD de BRAF, découvertes par le crible ? 152	
5.4	Quels sont les mécanismes de régulation de l'interaction BRAF/KSR1 ?	155
5.5	Conclusion générale et perspectives	158
Références bibliographiques		161
Annexe		197

Liste des tableaux

Tableau 1 – Anticorps utilisés lors des expériences.	76
---	----

Liste des figures

Figure 1 – Schéma d’une voie de signalisation dite « classique » contrôlant la fonction d’un gène.	30
Figure 2 – La voie de signalisation RAS-ERK.....	36
Figure 3 – La diversité des dimères de RAF.	47
Figure 4 – Organisation structurale des kinases RAF.	48
50	
Figure 5 – Modèle d’activation des kinases RAF.....	50
Figure 6 – Les structures du domaine kinase de RAF.	55
58	
Figure 7 – Organisation structurale des pseudokinases KSR.	58
Figure 8 – Structures des complexes BRAF ^{KD} /MEK1 ^{KD} , KSR2 ^{KD} /MEK1 ^{KD} et BRAF ^{KD} /KSR1 ^{KD}	
61	
Figure 9 – Schéma du modèle d’interaction de Brennan et al.	63
Figure 10 – Le rôle central de la dimérisation dans l’activation des kinases RAF.	70
Figure 11 – Principe du Y2H : exemple de l’interaction KSR1 ^{KD} /MEK1 ^{KD}	79
Figure 12 – Mesure des interactions de MEK1, sauvage ou mutée avec KSR1, BRAF ou CRAF.	
85	
Figure 13 – Analyse des interacteurs de KSR1 ^{W831R}	87
Figure 14 – Mesure des interactions de MEK1 ^{KD} avec KSR1 ^{KD} , BRAF ^{KD} ou CRAF ^{KD} sauvages ou mutées.	88
Figure 15 – Nature et fréquence des substitutions du motif M ²¹⁹ -A ²²⁰ -N ²²¹ de MEK1 lors de son criblage avec KSR1 ^{W831R} , BRAF ou CRAF.....	92
Figure 16 – Exemples d’interactions testées entre des mutants de MEK1 et de BRAF.	94
Figure 17 – Sélectivité des mutants de MEK1 pour KSR1, BRAF et CRAF sauvages ou mutées.	
95	
Figure 18 – Résumé des résultats de la Figure 16.	97
Figure 19 – Modèle des interactions du complexe BRAF ^{KD} /KSR1 ^{KD} /MEK1 ^{KD}	99
Figure 20 – Activation de MEK1 après co-expression des protéines KSR1, BRAF ou CRAF et formation de dimères.....	102

Figure 21 – Mesure des interactions de KSR1 ^{NTR} avec BRAF ^{NTR} , CRAF ^{NTR} ou KSR1 ^{NTR}	103
Figure 22 – Les domaines des régions NTR de BRAF, CRAF et KSR1.....	105
Figure 23 – Effet de la mutation/déplétion du BRS ou de la mutation du CC-SAM sur l'interaction de BRAF ^{NTR} avec KSR1 ^{NTR}	107
Figure 24 – Effet de mutations ou de la déplétion du BRS sur l'interaction de BRAF ^{NTR} avec CRAF ^{NTR} ou KSR2 ^{NTR}	108
Figure 25 – Effet de l'ajout du domaine BRS à CRAF ^{NTR} sur l'interaction de CRAF ^{NTR} avec KSR1 ^{NTR} .	109
Figure 26 – Matrice d'interaction des domaines de BRAF ^{NTR} et KSR1 ^{NTR}	111
Figure 27 – Analyse du domaine BRS de BRAF.....	113
Figure 28 – Interaction du domaine CC-SAM de KSR1 avec le domaine BRS de BRAF.....	114
Figure 29 – Crible du domaine NTR de BRAF.....	117
Figure 30 – Résultats du crible de « gain d'interaction » entre BRAF ^{NTR} et KSR1 ^{NTR}	119
Figure 31 – Effet de la mutation C2S sur l'interaction BRAF ^{NTR} /KSR1 ^{NTR}	121
Figure 32 – Effet de la mutation C2S sur l'interaction BRAF ^{NTR} /CRAF ^{NTR} et BRAF ^{NTR} /KSR2 ^{NTR}	122
Figure 33 – Les mutations du domaine CRD de BRAF induisent l'activation de la voie RAS-ERK.	123
Figure 34 – Effets des mutations du CRD de BRAF sur son association à KSR1 ^{NTR} ou KSR1 ^{FL} .	125
Figure 35 – Interaction des formes mutées de BRAF ^{FL} avec KSR1 ^{FL} endogène.....	126
Figure 36 – Effet de la perturbation de l'interface de dimérisation de BRAF.....	128
Figure 37 – Purification des domaines de BRAF ^{NTR} et de KSR1 ^{NTR}	131
Figure 38 – Évaluation des interactions entre le domaine CC-SAM de KSR1 et les domaines CRD ^{CRAF} , RBD et CRD ^{KSR1}	133
Figure 39 – Impact du peptide SYNZIP14 sur la dimérisation du domaine KD de BRAF.....	135
Figure 40 – Analyse d'un complexe protéique en Cryo-EM.....	137
Figure 41 – Évaluation des conditions de purification du dimère KSR1/BRAF.....	140
Figure 42 – Plasmides d'expressions pour l'expression de complexes de BRAF/KSR1.....	143
	149

Figure 43 – Modèles de l'implication du domaine CRD _{BRAF} sur l'interaction BRS/-CC-SAM.	149
Figure 44 – Modèle de la formation des hétérodimères BRAF/CRAF et BRAF/KSR1.....	151
Figure 45 – Modèles d'activation du dimère BRAF/KSR1 et effets des mutations du CRD de BRAF.	154
Figure 46 – Régulation de l'interaction BRS/CC-SAM.....	157

Liste des sigles et abréviations

AMP : Adénosine monophosphate

ASK1 : Apoptosis Signal-regulating
Kinase 1

AS-H1 : Activation Segment Helix 1

ATP : Adénosine triphosphate

BA : Boucle d'activation

BRET : Bioluminescence Resonance Energy
Transfer

BRS : BRAF Specific domain

CA : Conserved Area

CC-SAM : Coiled-Coil Sterile Alpha Motif

Cdc37 : Cell Division Cycle 37

CFC : Cardio-Facio- Cutaneous

CK2 : Casein Kinase 2

CR : Conserved-Region

CRD : Cysteine-Rich Domain

Cryo-EM : Cryogenic-Electron Microscopy

CTAK1 : voir MARK3

d-RAF/-KSR : drosophila-RAF/-KSR

DAG : Diacylglycérol

EGF : Epidermal Growth Factor

EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor

ERK 1/2 : Extracellular signal-Regulated
Kinase 1/2

FDA : Food and Drug Aministration

FL : Full-Length

GAL4 : GAL4 transcription factor

GAL4 AD : GAL4 Activation Domain

GAL4 BD : GAL4 Binding Domain

GAP : GTPase-Activating Proteins

GDP : Guanosine DiPhosphate

GEF : Guanine-nucleotide Exchange Factor

GFP10 : Green Fluorescent Protein 10

GRB2 : Growth factor Receptor-Bound
protein 2

GST : Glutathione S-Transferase

GTP : Guanosine TriPhosphate

HEK293 : Human Embryonic Kidney 293

HSP90 : Heat-Shock Protein 90

HSQC : Heteronuclear Single Quantum
Correlation

IEG : ImmEDIATE EARLY GENE

(co-) IP : Immunoprécipitation

IP3 : Inositol trisphosphate

IQGAP1 : IQ motif-containing ras GTPase-Activating-like Protein

IMP: Impedes Mitogenic signal Propagation,

IR : Insulin Receptor

IRS : Insulin Receptor Substrate

KD : Kinase Domain

KSR 1/2 : Kinase Suppressor of Ras

LATS1 : Large Tumor Suppressor kinase 1

LEOPARD : multiple Lentigines,
Electrocardiographic conduction
abnormalities, Ocular hypertelorism,
Pulmonary stenosis, Abnormal genitalia,
Retardation of growth, sensorineural
Deafness

MAPK : Mitogen Activated-Protein Kinase

MAPKK : Mitogen Activated-Protein Kinase
Kinase

MAPKKK : Mitogen Activated-Protein
Kinase Kinase Kinase

MARK3 : MAP/microtubule Affinity-
Regulating Kinase 3

MEK1/2 : MAPK/ERK Kinase 1/2

MORG1 : MAPK organizer 1

MST2 : Mammalian STE20-like protein
kinase 2

MP1 : MEK partner 1

NF1 : NeuroFibromin 1

NtA : N-terminal Acidic region

NTR : N-terminal Region

p-ERK/-MEK : phospho-ERK/-MEK

PAK : p21-Activated Kinase

PDGF : Platelet Derived Growth Factor

PGC-1 : Peroxisome proliferator-activated
receptor Gamma Coactivator 1

PI3K/AKT : Phosphoinositide 3-Kinase

PKA : Protein Kinase A

PKB : Protéine Kinase B

PLCγ : PhosphoLipase C gamma

PP1 : Protein Phosphatase 1

PP2A : Protein Phosphatase 2A

PPP : Proline-rich sequence

(A-, B-, C-) RAF : Rapid Accelerated
Fibrosarcoma

(H-, N-, K-) Ras : Rat Sarcoma

RalGDS : Ral Guanine Nucleotide
Dissociation Stimulator

RAP1 : Ras-related Protein 1

RBD : Ras Binding Domain

RCPG : Récepteurs Couplés aux Protéines G

RlucII : *Renilla Luciferase II*

RMN : *Résonance Magnétique Nucléaire*

ROK α : *Rho-associated Kinase α*

RTK : *Receptor-Tyrosine Kinase*

SD -(TL, TLH, TLA) : *Synthetic Dextrose*

SEC : *Size Exclusion Chromatography*

SEF : *Similar Expression to FGF genes*

SFK : *SRC Family Kinases*

SH2 : *Src Homology 2*

SH3 : *Src Homology 3*

S/T-rich : *Serine/Threonine Rich*

SOS1 : *Son-of-Sevenless 1*

TCF : *T-Cell Factor*

TEM : *Transition Épithélio-
Mésenchymateuse*

TP53 : *Tumor Protein 53*

WT : *Wild-Type*

Y2H : *Yeast-2-Hybrid*

« C'est en voulant connaître toujours davantage qu'on se rend compte qu'on ne sait pas grand-chose. »

Pierre Dac

« La seule certitude que j'ai, c'est d'être dans le doute. »

Pierre Desproges

“I think that real friendship always makes us feel such sweet gratitude, because the world almost always seems like a very hard desert, and the flowers that grow there seem to grow against such high odds.”

Stephen King, The Eyes of the Dragon

À Descartes.

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres de mon jury : Gregory Emery, Audrey Claing, Nathalie Lamarche-Vane et David Hipfner d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse. J'aimerais particulièrement remercier mon président de thèse, Greg, pour son accompagnement et son soutien au cours de cette dernière année. Je remercie également Matt Smith pour ses encouragements et pour avoir patiemment suivi les avancées de mon projet en me donnant d'excellents conseils au cours de mes différents comités de thèse.

Un grand merci à mon directeur de thèse, Marc Therrien, pour m'avoir donné l'incroyable opportunité de me joindre à son équipe de recherche dès ma première année de master en 2014 (déjà!). Son attention particulière aux détails, son sens de la rigueur scientifique et son dévouement à son métier ont contribué à faire de moi ce que je suis aujourd'hui. Un immense merci également à Hugo Lavoie, pour son esprit d'analyse, pour ses précieux conseils, son encadrement et son incroyable virtuosité scientifique.

J'aimerais personnellement remercier tous les copains de paillasse qui ont contribué d'une façon ou d'une autre à la réussite de cette thèse : à ma « compagne de portée » Jessica pour avoir été là dans le même bateau pendant toutes ces années; au génialissime Martin dit Monsieur LeFrançois, le Quartz master, le pilier du labo, ton humour inoubliable et ta précieuse amitié, tu auras su éclairer toutes mes journées d'un rayon de soleil, je n'aurais jamais pu réussir cette thèse sans toi! Un merci à la remarquable Ting, merci pour ta passion pour la cuisine et ta bonne humeur ; à la belle et radieuse Malha, la gazelle d'Algérie, tu m'a toujours impressionnée par ton incroyable dévouement à ce métier et par ta gentillesse sans égale; à Caroline, Mother-of-Drosophiles (que tu aimes avec passion mais pas dans ton café), tu as été une superbe encadrante et j'ai toujours adoré discuter avec toi; à David pour ton humour acidulé, ta compagnie et tes très bons conseils (oui oui, il y en a eu!), à Driss pour ton soutien sans faille, nos nombreuses discussions et tous ces merveilleux repas gratuits (mon ventre affamé te remercie); à Damien pour tes conseils et ton soutien, à Guillaume, tu embarques dans une aventure mouvementée, je te souhaite bon courage; à Jean-René pour ta douceur, ton écoute et ta compagnie; à Gwenaëlle, grande sœur de labo, tu as su m'aiguiller et me conseiller à chaque instant; enfin je tenais à dire un grand merci à tous les anciens que j'ai eu le plaisir de côtoyer à un moment ou à un autre durant cette thèse: Caroline,

Hélène, Francis, Fanny, Samuel et Dariel. Et à Geneviève, je n'ai pas beaucoup passé de temps avec toi mais je te remerci pour ton aide.

Je tiens à présent à remercier toutes les personnes que j'ai pu croiser à l'IRIC et avec qui j'ai sympathisé. Un merci tout particulier à Lynda pour ton sourire quotidien et ta bonne humeur. Un grand merci à toute l'équipe des Affaires académiques de l'IRIC et notamment Valérie, Pascale, Évelyne, merci d'avoir été là, sans relâche. Je n'ai pas assez de mots pour remercier la directrice de l'équipe, Julie, je ne sais pas ce que j'aurais fait sans ton aide, merci infiniment. Les étudiants de l'IRIC sont exceptionnellement chanceux de t'avoir à leur côté.

Je voudrais remercier tous les copains de l'IRIC qui ont su être là au bon moment, à Léo merci, je te souhaite pleins de bonnes choses dans tes aventures, à Cédric pour ton humour incroyable et ta gentillesse. Je souhaite encourager tous les doctorants de l'IRIC à persévérer et à tenir bon.

Un énoorme merci aux Biologistes Anonymes et amies de galère : vous avez été mes rocs, mes caps, mes péninsules !! J'ai nommé Éloïse, Chloé, Léa et Robin (baby-sitters de Marcus à vos heures perdues). Vous avez été incroyables, je suis très heureuse de vous avoir rencontrée et vous avez grandement contribué à garder ma tête hors de l'eau tout au long de ce chemin sinueux. Tac, on n'oublie pas que même si on se tape régulièrement dessus, on s'aime quand même beaucoup (Jab, Jab crochet, direct, round-kick! Petit pas de danse). Léa, n'oublies pas de dessiner et d'aquarelliser, tu fais des merveilles et tu ne dois pas l'oublier. Cloclo, un de mes grands plaisirs de ces derniers jours de rédaction aura été de me poser en ta compagnie dans un coin d'herbe.

Aux nouvelles amitiés et aux nouvelles rencontres mais surtout au ciel étoilé bleu, parfois vert, de Montréal.

J'aimerai remercier ma famille québécoise : à vous deux Michel et Muriel, pour vos conseils si précieux, votre soutien indéfectible et votre chaleur. Merci pour tout! Je suis heureuse de m'être enracinée chez vous au Québec et d'avoir partagé avec vous tant de moments magiques en famille. J'ai hâte d'en créer pleins d'autres avec vous dans l'avenir. J'ai une pensée émue pour Madame Aubry et Réjeanne avec qui j'ai passé de précieux moments, souvent autour d'un bon repas, et que je n'oublierai jamais.

Je tiens également à remercier mes très chers amis que j'ai laissé en France : tonton Patoche et Ursula. Vous comptez beaucoup pour moi et vous me manquez terriblement, je n'ai hâte que d'une

chose c'est de venir me dorer la pilule sous le soleil de Corse ou de Normandie. Je continuerai jour après jour à me sentir jolie au piano.

Un grand merci à mes beaux-parents Annick et Jean-Marie, merci beaucoup d'avoir toujours été là pour moi, merci pour vos encouragements, pour m'avoir accueilli à bras ouverts chez vous et pour votre affection.

À mes famille : à ma sœur Giulia et ses deux adorables lardons et surtout à mes merveilleux parents. Merci Papa d'avoir été là pour moi, tu es mon idéal absolu de chercheur, passionné par ton métier et tu es un père dévoué et un vrai papa-poule avec qui j'adore rigoler. Merci à toi ma belle et affectueuse maman, j'admire ton courage et tes accomplissements, ta tendresse m'accompagne et me réconforte au quotidien. Je vous aime tendrement et vous manquez.

Bichette, comment te dire qu'il n'y a pas un jour qui ne passe sans que je pense à toi. Ma chasseuse de trèfle, ma grande fleur préférée, le plus grand esprit cartésien ayant jamais foulé les contrées neigeuses du Québec, une véritable force de la nature (arrête, tu sais que j'ai raison!). Je n'en serai clairement pas là sans toi. Au milieu de cet enfer que sont les autres, nos moments à rigoler, à boire et à refaire le monde sur les meilleurs bancs montréalais, ont été les plus beaux instants de cette thèse. Merci pour ton aide quotidien dans ce travail, mon très cher Cap'taine Grammaire, pour toutes ces heures où je t'ai faite trimer. Merci d'avoir été là, tous le temps, de m'avoir écoutée, d'avoir réussi à percer la carapace. Tu es ma guide à travers monts et vallées et la douce petite voix dans ma tête avec qui je partage mes improbabilités quotidiennes. T'es 1000 fois trop...tout! Et tu es et resteras ma plus chère et tendre amie. Un giga câlin d'amour et t'oublies pas de faire des bisous à Mummy et un miaou à Darwin.

Elliot, mon beau compagnon, merci d'avoir toujours été à mes côtés dans ces moments pas toujours très drôles. Tu as su m'accompagner, me faire rire et me ramener à toi dans mes périodes les plus sombres. Merci d'avoir patiemment su m'épauler, me garder la tête hors de l'eau, et d'avoir été là pour me réconforter à chaque instant. J'espère que tu me pardonneras un jour de t'avoir fait subir tout ça. Aux moments de partage, de découverte et de complicité, à la tendresse et à la camaraderie. À la route devant nous. Je t'aime.

Avant-Propos

Les chapitres 3 et 4 regroupent l'ensemble des résultats expérimentaux obtenus lors de ce doctorat. Le chapitre 3 concerne ma contribution à l'article « *MEK drives BRAF activation through allosteric control of KSR proteins* » paru en 2018 dans la revue Nature (Annexe). Les figures correspondant ainsi aux résultats que j'ai obtenus moi-même sauf si explicitement mentionné dans la légende. Il s'agit donc de figures directement adaptées de l'article ou de figures originales qui n'ont pas été incluses dans la version finale de la publication. Les lecteurs sont invités à consulter l'article mis en annexe pour de plus amples informations. Le chapitre 4 présente des résultats non publiés que j'ai effectués.

Chapitre 1 : Introduction

1.1 Principes généraux des voies de signalisation

La croissance et le renouvellement cellulaires doivent s'adapter rapidement à l'environnement tissulaire. Les cellules perçoivent et intègrent des stimuli pour conserver une homéostasie optimale, que ce soit au cours du développement de l'organisme, lors de la régénération tissulaire (Golfeshan et al., 2021) ou en situation de stress (Galluzzi et al., 2018; Kyriakis and Avruch, 2012).

Le traitement des informations perçues par la cellule s'effectue par la coopération d'un ensemble de protéines organisé en une « voie de transduction » transformant un signal extracellulaire en une réponse au sein de la cellule. Ces protéines propagent le signal intracellulaire par interaction directe, contrôle allostérique ou par le biais de modifications post-traductionnelles. Ces changements qui sont extrêmement régulés, interviennent séquentiellement provoquant une réaction en chaîne jusqu'à induire une réponse cellulaire. Ce contrôle précis des processus biologiques fondamentaux tels que la morphogénèse, la prolifération, ou l'apoptose par ces réseaux de signalisation permet de coordonner les réponses cellulaires (Gomperts et al., 2009a)

1.1.1 Les caractéristiques d'une voie de signalisation

Bien que les signaux perçus par les cellules soient de nature variable (chimique, physique, osmotique, électrique, mécanique) (Valet et al., 2021), leur réception se transforme en une information chimique qui se propage au sein de la cellule. La transduction du signal est extrêmement sélective notamment grâce à 1) l'affinité des molécules de signalisation pour leur récepteurs, 2) le phénomène de coopérativité lors des interactions substrat-récepteur et 3) l'amplification du signal par des cascades enzymatiques (Nelson and Cox, 2008).

Malgré la variabilité des stimuli et des récepteurs des voies de signalisation, les caractéristiques générales de la transduction du signal sont communes : le récepteur activé provoque une réaction en cascade faisant intervenir des intermédiaires tels que des protéines d'échafaudage, des seconds messagers, ou des enzymes. Les signaux extracellulaires sont ainsi relayés jusqu'à leurs cibles moléculaires qui, une fois activées, modifient une ou plusieurs fonctions de la cellule. L'arrêt de la transduction du signal met en jeu des mécanismes de rétrocontrôle négatif, directs ou indirects, ciblant le récepteur ou des protéines à différents niveaux

de la cascade de signalisation. Il y a donc un retour à l'état basal, ce qui est essentiel au maintien de l'homéostasie cellulaire (Gomperts et al., 2009). La **Figure 1** présente l'exemple d'une voie de signalisation stimulée par la liaison d'un ligand à son récepteur, entraînant une activation séquentielle de plusieurs enzymes pour finalement aboutir à la translocation d'une protéine dans le noyau et à la transcription de gènes cibles.

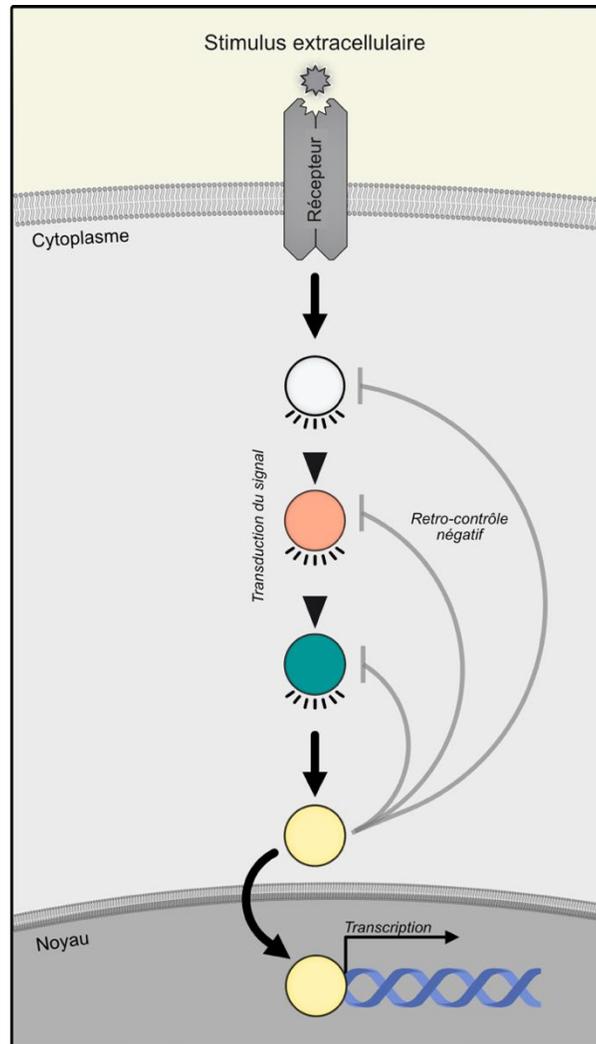


Figure 1 – Schéma d'une voie de signalisation dite « classique » contrôlant la fonction d'un gène.

Une voie de signalisation se définit par un ensemble de protéines, en particulier des enzymes (en blanc, saumon ou vert) dont la régulation spatio-temporelle et la stimulation en cascade permet l'activation de cibles cellulaires spécifiques (ici des gènes en bleu). Après activation, le retour à l'état basal s'effectue par des phénomènes de rétrocontrôles négatifs et par l'inactivation des enzymes impliquées (par inhibition, dégradation, etc.).

La transmission de l'information perçue à la surface cellulaire se déroule en règle générale, par la succession d'appariements non covalents entre protéines. Le signal qui déclenche la cascade de signalisation doit fonctionner comme un interrupteur moléculaire (« MARCHE/ARRÊT ») pour que la réponse en aval du récepteur soit directement proportionnelle au stimulus d'origine (Ferrell, 1996). La temporalité et la localisation subcellulaire des composantes des voies sont ainsi précisément contrôlées pour permettre la formation des complexes de signalisation adéquats (Gomperts et al., 2009b).

Il existe également une signalisation dite « horizontale » où certaines protéines fonctionnent comme des pôles d'échanges (des « hubs »), adoptant des rôles distincts au sein de différentes voies. Un même signal stimule ainsi plusieurs voies et impacte différents processus cellulaires simultanément (Yan et al., 1998), induisant un phénomène d'interdépendance des voies. La perturbation d'un composant d'une de ces cascades peut donc avoir une répercussion indirecte sur d'autres voies de signalisation contrôlant des processus cellulaires différents, comme par exemple le couplage du métabolisme avec la prolifération cellulaire dans les cancers (Cisowski et al., 2016; Romeo et al., 2013).

Ces principales caractéristiques font que les voies de signalisation sont retrouvées dans la majorité des types cellulaires (Wortzel and Seger, 2011) dont elles assurent l'intégrité. Ces voies sont communes à de nombreux organismes et les protéines qui les composent sont pour la plupart, extrêmement conservées entre espèces (Black et al., 2019). Leurs perturbations par des altérations génétiques ont de ce fait souvent des conséquences importantes sur les organismes, en particulier lorsqu'elles affectent la prolifération ou la différenciation cellulaire (Barbosa et al., 2021). Les cellules reçoivent des informations provenant des cellules avoisinantes grâce à des récepteurs localisés dans la membrane plasmique.

Les récepteurs membranaires sont organisés en trois grandes classes selon leur organisation et leurs fonctions : les canaux ioniques, les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) et les récepteurs associés à une activité enzymatique. Cette dernière classe regroupe l'ensemble des récepteurs transmembranaires possédant une activité enzymatique qui est stimulée par la liaison d'un ligand, tels que les récepteurs tyrosine-kinase (*Receptor-Tyrosine Kinase*; RTK). (Yeagle, 2016)

1.1.2 La signalisation par les RTK

La liaison du ligand sur la région extracellulaire des RTK entraîne un changement conformationnel de celui-ci, sa dimérisation, et la stimulation de son activité tyrosine kinase qui se situe dans sa région intracellulaire (Lemmon and Schlessinger, 2010). Il existe une vingtaine de classes de RTK groupés selon la nature de leurs ligands (hormones, facteurs de croissances ou cytokines) (Bergeron et al., 2015). Les récepteurs de cette famille s'activent par autophosphorylation croisée de leurs résidus tyrosines. La phosphorylation déplace une séquence autoinhibitrice au niveau de la face cytoplasmique et libère le site actif qui peut s'associer aux protéines cibles (Schlessinger et al., 2014).

L'une des sous-familles de récepteurs RTK les mieux caractérisés est celle des récepteurs de l'EGF (ou EGFR, *Epidermal Growth Factor Receptor*) qui sont impliqués dans la croissance des cellules épithéliales (Yarden and Sliwkowski, 2001). Cette famille comprend 4 membres (ErbB-1 à -4). ErbB-1 (ou EGFR) active au moins 4 voies majeures de signalisation dont la voie EGFR (Cohen et al., 1965); ErbB-2 est un oncogène qui joue un rôle dans de nombreux types de tumeurs (Olayioye et al., 2000); ErbB-3 et ErbB-4 sont les récepteurs des neurégulines notamment impliquées dans le développement du système nerveux central (Ieguchi et al., 2010; Plowman et al., 1993). La stimulation de la voie EGFR favorise notamment la motilité et l'adhésion cellulaires, qui sont des propriétés participant à la physiopathologie des métastases des cancers (Engebraaten et al., 1993; Wells, 1999). L'activation de ces récepteurs faisant suite à la fixation de l'EGF, induit la fixation de GRB2 (*Growth factor Receptor-Bound protein 2*). GRB2 est une protéine adaptatrice sans activité catalytique dont le domaine SH2 (de *Src Homology 2*) reconnaît les résidus tyrosines phosphorylés de différents types de récepteurs dont l'EGFR. GRB2 sert ici de plateforme pouvant recruter d'autres protéines *via* ses domaines SH3, qui s'associent à des séquences riches en prolines présentes dans de nombreuses enzymes (Lowenstein et al., 1992). L'une d'entre elles, la protéine SOS1 (de *Son-of-Sevenless 1*) de type GEF (*Guanine-nucleotide Exchange Factor*) interagit avec les protéines RAS (de *Rat Sarcoma*) et favorisent ainsi leur activation (Chardin et al., 1993) (Figure 2, p. 36).

1.2 La cascade RAS-ERK

La voie RAS-ERK (ERK : *Extracellular signal-Regulated Kinase*) ou RAS-MAPK (MAPK : *Mitogen Activated-Protein Kinase*) est capable d'être activée par des « mitogènes », c'est-à-dire des éléments qui activent la mitose (Pearson et al., 2001). Elle contrôle principalement la prolifération et la différenciation cellulaires (Lavoie et al., 2020; Robinson and Pitcher, 2013) et peut être stimulée par des hormones (insuline) ou des facteurs de croissance tels que l'EGF et le PDGF, (Morrison et al., 1989) ou des ligands agonistes de certains RCPGs. La voie RAS-ERK est extrêmement conservée chez les eucaryotes; des plantes à l'homme (Black et al., 2019; Mulner-Lorillon et al., 2017; Widmann et al., 1999). Il s'agit de la première voie MAPK canonique qui a été identifiée chez les mammifères en réponse à la stimulation par des facteurs de croissance (Rubinfeld and Seger, 2005) et son implication dans la survenue de tumeurs a rapidement été établie (Hoshino et al., 1999). Pour être activées, toutes les protéines de type MAPK doivent être doublement phosphorylés sur une thréonine et une tyrosine (Matsuda et al., 1993). Il existe 7 MAPK avec leurs cascades, les « classiques » : ERK/MAPK, cJun, p38 et les « atypiques » ERK3/4, ERK7 et NLK (Mathien et al., 2021). Ces voies de signalisation « classiques » ont la caractéristique principale de posséder un module constitué de trois kinases archétypes que sont MAPKKK (*MAPK Kinase Kinase*), MAPKK (*MAPK Kinase*) et MAPK, correspondant à leur activation séquentielle par des phosphorylations successives (**Figure 2**).

Dans le cas de la voie RAS-ERK, ces kinases sont RAF (*Rapid Accelerated Fibrosarcoma*), MEK (*MAPK/ERK Kinase*) et ERK (Kolch, 2000). Leur activation dépend notamment de la stimulation en amont des GTPases RAS. Par la grande diversité de leurs effecteurs (Rodriguez-Viciano et al., 2004), les protéines RAS contrôlent un grand nombre de cascades de signalisation impliquées dans la migration, la survie, la croissance ou encore la morphologie cellulaire. La forme activée de RAS permet l'entrée en phase S de la mitose (Stacey and Kung, 1984). L'activation de la cascade de signalisation dépend avant tout de l'agrégation (« nanoclustering ») de molécules de RAS au niveau de la membrane plasmique conduisant à la stimulation de la voie RAS-ERK (Tian et al., 2007).

Le génome humain comprend 3 gènes *RAS* (*HRAS*, *KRAS*, *NRAS*) encodant 4 isoformes protéiques HRAS, NRAS, KRAS4A et KRAS4B (Harvey et al., 1964; Kirsten and Mayer, 1967). L'expression et la fonction des isoformes de RAS sont variables selon les tissus et le stade du

développement. Le plus abondant est l'isoforme KRAS4B, présent dans la plupart des tissus et tout au long du développement (Castellano and Santos, 2011; Newlaczyl et al., 2017). Des défauts d'expression des protéines RAS sont associés à un grand nombre de maladies (Simanshu et al., 2017) soulignant le rôle central de RAS dans l'homéostasie cellulaire. Les RAS sont des GTPases (des enzymes hydrolysant le *Guanosine TriPhosphate* ou GTP) fonctionnant comme des interrupteurs moléculaires de la voie RAS-ERK. Elles possèdent un cycle d'activation/inactivation faisant passer l'enzyme d'un état « OFF » inactif à un état « ON » activé. L'état inactif est caractérisé par la liaison de RAS au nucléotide GDP (*Guanosine DiPhosphate*) dans le site catalytique. L'échange de GDP en GTP au niveau du site catalytique va permettre à RAS d'être activée (Bourne et al., 1991).

Ces permutations de nucléotides sont facilitées par des protéines GEFs (*Guanine-nucleotide Exchange Factor*) telles que SOS1 qui accélère l'échange GDP en GTP, et des protéines GAPs (*GTPase-Activating Proteins*) telles que NF1 (*NeuroFibromin 1*) qui augmente l'hydrolyse du GTP (Xu et al., 1990). D'un point de vue fonctionnel, les GEFs favorisent l'activation des RAS tandis que les GAP induisent sa désactivation (Adari et al., 1988). Dans leurs formes liées au GTP, les protéines RAS adoptent une conformation qui expose une région particulière leur permettant de s'associer au RBD (*Ras-Binding Domain*), le domaine de liaison à RAS, présent chez les partenaires d'interactions de RAS (Rajalingam et al., 2007). RAS s'associe également à d'autres domaines tels que le domaine RA (*Ras Association*) ou à d'autres éléments structuraux trouvé au sein du complexe SHOC2/PP1C (McCormick et al., 2021).

Les protéines RAS sont, de ce fait, des carrefours signalétiques pouvant activer une douzaine de voies de signalisation différentes, dont les voies PI3K/AKT (*Phosphoinositide 3-Kinase*) RalGDS (*Ral Guanine Nucleotide Dissociation Stimulator*), Rac/PAK (*p21-Activated Kinase*) ou encore RAP1 (*Ras-related Protein 1*) (pour revue : Kiel et al., 2021). Les effecteurs les mieux caractérisés des protéines RAS sont les kinases RAF (Chuang et al., 1994). Les kinases RAF possèdent en effet un domaine RBD leur permettant de s'associer aux protéines RAS (Kolch et al., 1991). Les GTPases RAS sont ancrées à la membrane plasmique grâce à la prenylation de leur extrémité C-terminale (Ahearn et al., 2012). L'interaction RAS/RAF permet ainsi l'ancrage membranaire des kinases RAF et entraîne leur activation.

1.2.1 Le module RAF-MEK-ERK

Lors de leur découverte, les trois kinases RAF (ARAF, BRAF et CRAF) ont été historiquement décrites comme étant les protéines effectrices des GTPases RAS (Vojtek et al., 1993) et comme pouvant phosphoryler MEK (Alessi et al., 1994). Lorsqu'elles sont actives, les kinases RAF s'associent aux protéines MEK, leurs substrats exclusifs comprenant les deux isoformes MEK1 et MEK2 qui partagent 80 % d'homologie (Aelst et al., 1993; Denouel-Galy et al., 1998). RAF active les protéines MEK par phosphorylation de leur segment d'activation ce qui stimule leur activité catalytique (Kyriakis et al., 1992; Zheng and Guan, 1994).

Les protéines RAF sont des sérine/thréonine kinases (Moelling et al., 1984) qui phosphorylent donc leurs substrats sur des résidus sérine et/ou thréonine (Ser-218 et Ser-222 dans MEK1; Ser-222 et Ser-226 dans MEK2) (Kolch et al., 2000). Les kinases MEK activées sont des kinases dites à double spécificité, car elles sont capables de phosphoryler à la fois des résidus sérine/thréonine et des résidus tyrosine (Dhanasekaran and Reddy, 1998). Les substrats des kinases MEK sont les kinases ERK1 et ERK2 qui partagent 83 % d'homologie et sont interchangeable pour la plupart des fonctions biologiques qui leurs sont associées (Buscà et al., 2016). ERK1 et ERK2 sont activées par phosphorylation double de leur résidus thréonine et tyrosine dans leur segment d'activation (Dephoure et al., 2008; Sacco et al., 2009). Leur phosphorylation a lieu en réponse directe à une stimulation par les facteurs de croissance (Boulton et al., 1991; Canagarajah et al., 1997; Crews and Erikson, 1992). Par ailleurs, les phosphorylations additionnelles des résidus serines favorisent notamment l'interaction des kinases ERK avec l'importin-7 et leur translocation au noyau, leur permettant de réguler la transcription de gènes cibles tels que *c-Fos* et *c-Myc* (Chuderland et al., 2008).

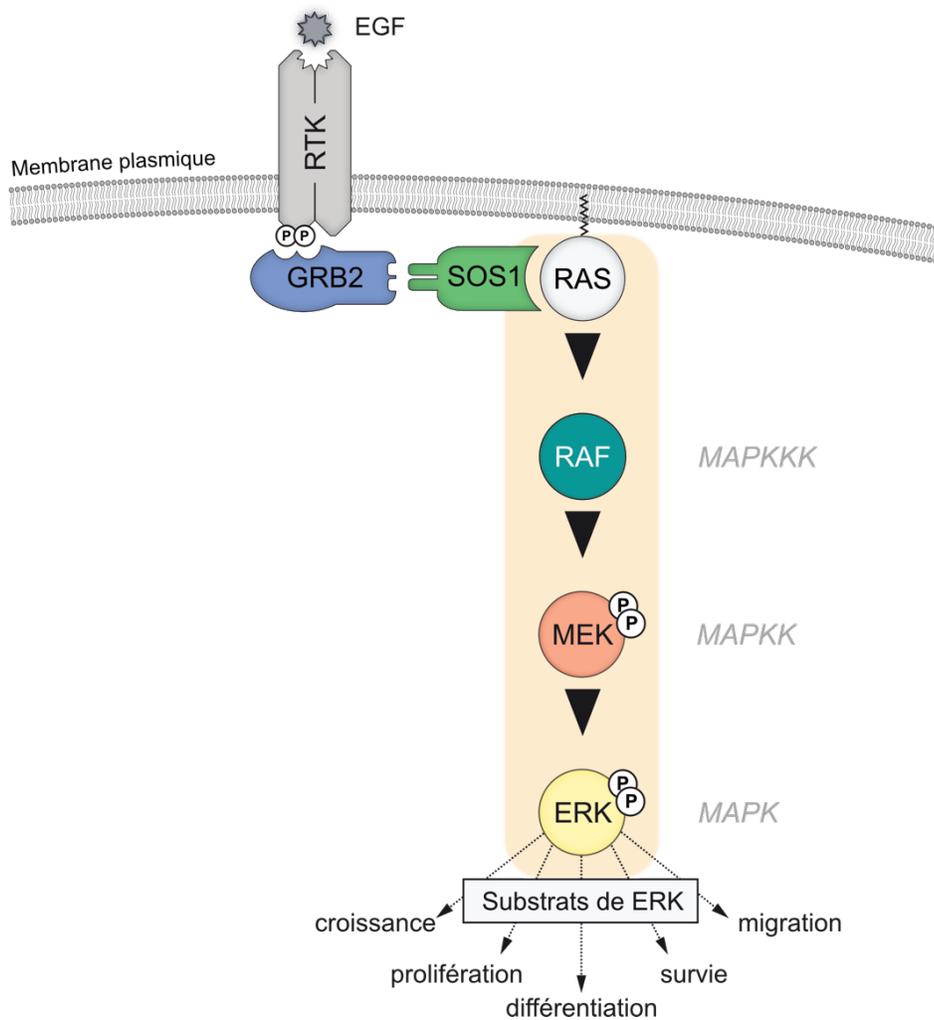


Figure 2 – La voie de signalisation RAS-ERK.

L'activation de la voie de signalisation RAS-ERK est initiée par la fixation du ligand EGF sur un récepteur de type RTK. L'activation et l'autophosphorylation du récepteur permettent l'association de la protéine adaptatrice GRB2, favorisant l'activation de la petite GTPase RAS via son association à SOS1. Par la suite, l'activation en cascade des kinases RAF, MEK et ERK aboutit à la modulation de gènes spécifiques qui contrôlent l'activation des processus cellulaires associés. EGF: Epidermal Growth Factor, RTK: Receptor-Tyrosine Kinase, GRB2: Growth factor Receptor-Bound protein 2, SOS1: Son-of-Sevenless 1, RAS: Rat Sarcoma, RAF: Rapid Accelerated Fibrosarcoma, MEK: MAPK/ERK Kinase, ERK: Extracellular signal-Regulated Kinase, MAPK: Mitogen Activated-Protein Kinase, MAPKK: MAPK Kinase, MAPKKK: MAPK Kinase Kinase

1.2.2 Les protéines régulatrices de la voie

Le module RAF-MEK-ERK est l'unité minimale de la voie RAS-ERK. La durée de son activation, l'intensité du signal et ses effets biologiques dépendent également de l'interaction de ses composants avec des partenaires d'interaction qui concentrent et isolent le signal.

- Les protéines KSR font partie intégrante de la famille des protéines RAF et ont été précocement associées à la régulation de la voie RAS-ERK. Elles y ont notamment un double rôle : elles fonctionnent comme des protéines d'échafaudage pour colocaliser les kinases du module RAF-MEK-ERK et modulent l'activation des kinases RAF par allostérie (**voir infra : section 1.3.2**).
- Les protéines chaperonnes 14-3-3 régulent et interagissent avec de nombreuses enzymes et sont conservées chez tous les organismes eucaryotes (Aitken et al., 1992). Elles opèrent en dimère (ou en tandem) via un motif de reconnaissance caractéristique R-X-X-S-X-P (où R représente un résidu arginine, S une sérine, P une proline et X n'importe quel acide aminé) qui est régulé par phosphorylations (Morrison et al., 2009). Dans la voie RAS-ERK, un tandem de protéines 14-3-3 se fixe aux protéines RAF par l'intermédiaire de ce motif de liaison. L'effet fonctionnel des 14-3-3 est complexe, à la fois inhibiteur, par le maintien de RAF dans un état inactivé, et pro-activateur en stabilisant leur forme dimérique activée (Fantl et al., 1994; Freed et al., 1994; Irie et al., 1994).

D'autres partenaires d'interaction permettent de circonscrire le module dans des compartiments subcellulaires bien spécifiques. Ainsi, les RTK activés et les protéines KSR localisées à proximité des récepteurs participent à l'activation de la voie RAS-ERK au niveau de la membrane plasmique. Son activation au niveau de l'appareil de Golgi se produit en réponse à la stimulation de la PLC γ (*PhosphoLipase C gamma*) par l'intermédiaire des seconds messagers IP3 (*Inositol trisphosphate*) et DAG (*Diacylglycérol*) produits par PLC γ , et par le recrutement de la protéine d'échafaudage SEF (*Similar Expression to EGF genes*) (Dhanasekaran et al., 2007). La stimulation cytoplasmique de la voie RAS-ERK par les RCPG implique la production d'AMP (*Adénosine monophosphate*) cyclique, activateur de la PKA (*Protein Kinase A*), en présence de la protéine d'échafaudage MORG1 (*MAPK organizer 1*). En plus de s'associer aux protéines G hétérotrimériques, les RCPG s'associent également aux β -arrestines leur permettant de stimuler

diverses voies de signalisation telle que la voie RAS/ERK (DeWire et al. 2007). Les complexes RCPG- β -arrestines interagissent ainsi avec la kinase CRAF permettant l'activation de la voie (Luttrell et al. 2001). Enfin, les RTK peuvent également être activés au niveau des endosomes où le module RAF-MEK-ERK est stabilisé par la protéine MP1 (*MEK partner 1*) (Casar and Crespo, 2016).

Certains partenaires protéiques semblent avoir une fonction plus sélective pour certaines isoformes de RAF. La protéine HSP90 (*Heat-Shock Protein 90*) est recrutée par sa co-chaperone CDC37 (de *Cell Division Cycle 37*). Elle favorise le repliement adéquat de la kinase BRAF lors de sa synthèse et permet de stabiliser les complexes de signalisation et l'activité kinasique optimale de BRAF (Stancato et al., 1993; Wan et al., 2004). Cette propriété fait que les protéines HSP90 ont été sélectionnées comme des cibles moléculaires dans le cadre de stratégies thérapeutiques développées pour contrer les phénomènes de résistance aux inhibiteurs de BRAF (Paraiso et al., 2012; Sanchez et al., 2021).

La fonction de certains partenaires protéiques a pu être identifiée par leur rôle dans la tumorigénèse RAS ou RAF dépendante : par exemple, la protéine d'échafaudage IQGAP1 (*IQ motif-containing ras GTPase-Activating-like Protein*) facilite la co-localisation de certaines kinases telles que la kinase ERK avec ses effecteurs et de ce fait facilite l'activation de la voie de signalisation (Jameson et al., 2013). De nombreux autres partenaires protéiques des protéines RAF ont également été identifiés dans des contextes expérimentaux particuliers (Zhang et al., 2019).

1.2.3 Activation des gènes cibles et modulation des fonctions cellulaires

La kinase ERK impacte directement la croissance, la prolifération, la différenciation et la survie en modulant de nombreux substrats qui affectent l'activité enzymatique, les partenaires d'interaction, la localisation cellulaire ou la stabilité de leurs cibles (Lavoie et al., 2020). Par exemple, la translocation nucléaire de ERK suite à sa phosphorylation, lui permet notamment d'activer la famille des facteurs de transcription TCF (de *T-Cell Factor*). Cette activation induit l'expression de gènes de réponse précoce (appelés *Immediate Early Gene* ou IEG) tels que les gènes *c-Fos*, *c-Jun* et *c-Myc* (Minden et al., 1994) qui, à leur tour, stimulent l'expression des gènes de réponse tardive. Plusieurs des protéines issues de l'expression de ces IEG ont des sites d'ancrage à la kinase ERK leur permettant de focaliser son activité kinase et, en conséquence, de favoriser la transcription prolongée de ces gènes (Murphy et al., 2004). La kinase ERK a plusieurs centaines

de substrats différents (Ünal et al., 2017) et cette diversité explique en partie comment la voie RAS-ERK, par la modulation de sa cinétique et de son amplitude, peut influencer des processus cellulaires aussi nombreux que variés (Marshall et al., 1995). Les rôles variés des facteurs de transcription contrôlés par ERK sur le métabolisme cellulaire et leur lien direct avec l'activation de la voie RAS-ERK font de ces facteurs de parfaits oncogènes potentiels dont c-myc en est le parfait exemple (Dhillon et al., 2007; Morrish et al., 2008).

1.2.4 Les cancers causés par une suractivation de la voie RAS-ERK

La voie RAS-ERK est une des voies principales de l'oncogenèse et est associée à plus de 50 % de tous les cancers humains (Davies et al., 2002). Il existe différents types de perturbations génétiques responsables de la survenue de cancers liés à la voie RAS-ERK, mais la majorité sont des mutations activatrices qui désolidarisent la voie de son système d'interrupteur « ON/OFF ». Chaque cancer est généralement associé à l'activation oncogénique d'un seul acteur de la voie de signalisation car la co-activation simultanée de plusieurs oncogènes aurait pour conséquence la sénescence accélérée des cellules. Les oncogènes de la voie RAS-ERK sont de ce fait mutuellement exclusifs (Jaroslaw Cisowski and Bergo, 2016).

Du fait de leurs rôles prépondérants dans la prolifération et la survie cellulaire, ainsi que dans la résistance aux inhibiteurs, les gènes *RAS* sont les plus communément mutés (Fernandez-Medarde and Santos, 2011). Ces mutations représentent plus de 30 % de l'ensemble des cancers. La protéine KRAS est la plus fréquemment atteinte et est souvent porteuse d'une mutation activatrice. (Santarpia et al., 2012). À elle seule, KRAS est par exemple mutée dans 90 % des cancers du pancréas, 50 % des cancers colorectaux, 22 % des cancers du poumon de type adénocarcinome et 5 % des carcinomes urothélial de la vessie (Mukhopadhyay et al., 2021). Les mutations qui l'affectent inhibent généralement son activité GTPase intrinsèque ou bloque l'action des GAP, la rendant activée en permanence. Par exemple, les codons 12, 13 ou 61 des protéines RAS sont les plus fréquemment mutées, les allèles G12D, G12V ou Q61L étant retrouvés dans de nombreux cancers (McCormick et al., 2021). Dans des conditions non mutées, l'activité GTPasique des protéines RAS est stimulée par des protéines GAP telles que la protéine NF1 qui joue ainsi le rôle de suppresseur de tumeur. Lorsque NF1 est mutée et rendue non fonctionnelle, elle est responsable de la neurofibromatose et prédispose à la survenue de cancers (Ratner and Miller, 2015). Il est

important de noter qu'aucune mutation ou protéine fusionnée en lien direct avec les cancers n'a encore été détectée pour les protéines KSR (Tate et al., 2019).

L'incidence des altérations génétiques de la voie RAS-ERK diminue à mesure que l'on progresse en aval dans la cascade de signalisation. Ainsi, les mutations des gènes *RAS* représentent 30 % de toutes les tumeurs, celles de *BRAF* 7 %, celles de *MEK* moins de 1 %, les mutations des gènes *ERK* étant exceptionnelles. Plus le composant qui stimule la voie se situe en amont de la voie, plus il est susceptible d'être contrebalancé par un système de rétrocontrôle négatif situé en aval. Ainsi, les perturbations en aval de la voie RAS-ERK, n'ayant pas ou peu de rétrocontrôles négatifs, ont des effets davantage prononcés et délétères. Ces mutations sont par conséquent plus rares puisqu'elles provoquent un désavantage évolutif lors de leur survenue (Yaeger and Corcoran, 2019).

1.3 La famille des protéines RAF

1.3.1 Les kinases RAF

1.3.1.1 Découverte et évolution

La première protéine découverte de la famille des protéines RAF est la kinase RAF-1 (renommée CRAF), les deux autres isoformes BRAF et ARAF ayant été caractérisées plus tardivement (Roskoski et al., 2010). Bien que tout au long de ce manuscrit le terme « d'isoforme » soit utilisé, elles sont en fait encodées par trois gènes distincts : *ARAF*, *BRAF* et *CRAF*. La caractérisation de ces protéines a débuté lors de l'étude d'un rétrovirus oncogénique provoquant la transformation des fibroblastes de rat en cellules cancéreuses. Le gène responsable de ce phénotype a alors été baptisé « *Virus-induced Rapidly Accelerated Fibrosarcoma* » ou encore *v-raf*. Une analyse génomique a permis l'identification d'un gène homologue chez les souris qui a été nommé « *C-raf* » pour « *Cellular-raf* » pour le distinguer de son homologue transmis par voie virale (Kozak et al., 1984; Rapp et al., 1983). Des orthologues de *CRAF* ont été identifiés par la suite chez *Drosophila melanogaster* (*D-Raf*) et *Caenorhabditis elegans* (*lin-45*), ainsi que deux paralogues additionnels chez les mammifères – *ARAF* et *BRAF* – (Beck et al., 1987; Huleihel et al., 1986; Ikawa et al., 1988). Pour certains auteurs, *BRAF* est plus proche des orthologues *D-Raf* et *lin-45* que des gènes *ARAF* et *CRAF*, ce qui suggère une origine commune entre *BRAF* et ses

paralogues ; *CRAF* et *ARAF* étant issus d'évènements de duplication génique (Matallanas et al., 2011). À la différence des kinases MEK ou ERK dont les isoformes sont relativement proches (> 70 %), les trois isoformes de RAF ne partagent que 39 % d'homologie (Baljuls et al., 2009).

1.3.1.2 Rôles des kinases RAF dans le développement et spécificité des isoformes

La voie RAS-ERK comprend plusieurs isoformes d'enzymes, ce qui confère à la cascade de signalisation une très grande plasticité. Cependant, chaque isoforme peut détenir un rôle physiologique bien spécifique selon le contexte cellulaire (Braicu et al., 2019). Bien que les trois isoformes de RAF aient toutes la capacité d'activer MEK1/2 par phosphorylation, des études comparatives ont mis en évidence que BRAF est l'activateur le plus fort de la voie RAS-ERK alors qu'ARAF est le plus faible (Wellbrock et al., 2004). Ce phénomène s'explique par le fait que BRAF a une plus grande activité catalytique, mais aussi par l'implication de mécanismes d'activation et de régulation différents (Desideri et al., 2015; O'Neill and Kolch, 2004). Pour être actives, les kinases RAF doivent dimériser en homo- ou en hétérodimère, l'hétérodimère BRAF/CRAF étant la paire la plus efficace pour l'activation des protéines MEK1/2. La dimérisation dépend de l'activation des GTPases RAS lors de l'association RAS/RAF et de l'ancrage des kinases RAF à la membrane plasmique (Garnett et al., 2005; J. Hu et al., 2013; Rushworth et al., 2006). La dimérisation s'effectue au niveau de leur domaine kinase et est essentielle à leur activation (Farrar et al., 1996; Weber et al., 2001).

La suppression simultanée des trois gènes *RAF* étant délétère pour le développement, des études d'inactivation génique séquentielle chez la souris ont permis de hiérarchiser fonctionnellement les isoformes les unes par rapport aux autres (Blasco et al., 2011). La double délétion *BRAF* *-/-* provoque la mort *in utero* des embryons par un déficit de croissance et une atteinte neuronale sévère. Ces phénotypes sont corrélés à un faible taux d'activation MEK/ERK dans les tissus embryonnaires impactés. Les embryons *CRAF* *-/-* meurent par apoptose hépatique, atrophie placentaire et faible développement du système hématopoïétique sans pour autant que les niveaux d'activation de MEK ne diminuent (Galabova-Kovacs et al., 2006; Mikula et al., 2001; Wojnowski et al., 2000). Ces effets proviennent de la combinaison de plusieurs des fonctions de l'isoforme CRAF. La kinase CRAF s'associe spécifiquement à la kinase ROK α (*Rho-associated Kinase α*) et régule son activité. Elle s'oppose en outre aux effets pro-apoptotiques de la kinase ASK1 (*Apoptosis Signal-regulating Kinase 1*) (Yamaguchi et al., 2004) Finalement, CRAF inhibe

la voie Hippo en se liant à MST2 (*Mammalian STE20-like protein kinase 2*) (Nguyen et al., 2015). Les souris *ARAF*^{-/-} naissent à terme mais succombent après 3 semaines de vie en raison d'atteintes neurologiques et intestinales (Pritchard et al., 1996). Il n'y a donc pas de phénomène de compensation dans les modèles murins d'inactivation de RAF.

D'autres modèles d'inactivation génique ont également mis en lumière les interventions successives mais bien distinctes des kinases RAF dans le développement de cellules de l'épiderme et des nevi en lien avec les mélanomes (Valluet et al., 2012). Dans le contexte des cancers liés à des mutations de *KRAS* ou de *TP53* (*Tumor Protein 53*), seule l'ablation de *CRAF* provoque la régression de certaines tumeurs (Blasco et al., 2019; Sanclemente et al., 2018). L'expression tissulaire est également responsable des variabilités fonctionnelles entre les isoformes. BRAF est par exemple, la seule des protéines RAF qui possède des produits issus de l'épissage alternatif à activité catalytique variable. Certains de ces produits peuvent ainsi être dans un état suractivé (Barnier et al., 1995) d'autres, au contraire, se stabilisent dans leur état auto-inhibé, restreignant l'activité catalytique (Hmitou et al., 2007).

Les isoformes RAF ont des fonctions distinctes au cours du développement, malgré leur capacité conservée d'être activatrices de MEK. Des différences entre isoformes s'observent également dans leurs modes de régulation. Bien que pouvant être activée par BRAF, ARAF ne peut pas se substituer à CRAF pour atteindre un niveau comparable d'activation des protéines MEK. Les dimères de ARAF sont moins actifs que les dimères BRAF/CRAF (Freeman et al. 2013). La fonction d'ARAF se rapproche de celle d'une protéine d'échafaudage puisque ARAF participe à la stabilisation de l'hétérodimère BRAF/CRAF par un processus encore inconnu (Rebocho and Marais, 2013). Les isoformes ARAF et CRAF sont fortement stimulés par l'activation oncogénique de SRC contrairement à BRAF qui est plus fortement stimulée par des mutations activatrices au niveau de RAS (Marais et al., 1997). Ce phénomène s'explique par le fait que les isoformes ARAF et CRAF ont un potentiel d'activation plus bas que BRAF et requièrent des phosphorylations additionnelles pour être pleinement actives (Baljuls et al., 2008). Dans un contexte pathologique, en particulier dans les cancers, ces caractéristiques spécifiques des isoformes, en lien ou non avec leur activité catalytique expliquent la grande hétérogénéité des effets causés par des altérations géniques associées à RAF et la prédominance de certaines mutations.

1.3.1.3 La boucle de rétrocontrôle négatif

Plusieurs niveaux de rétrocontrôle négatif se mettent en place pour limiter la durée de la stimulation de la voie RAS-ERK (Mathien et al., 2021). L'inactivation de la voie RAS-ERK s'opère, par exemple, par la déphosphorylation de ses composantes. Lors de la stimulation de la voie RAS-ERK, l'activation de la kinase MEK entraîne la phosphorylation de la kinase ERK. Les protéines RAF deviennent alors des substrats de la kinase ERK activée. En s'associant aux protéines RAF, ERK activée phosphoryle des résidus sérine/thréonine spécifiques ce qui perturbe la formation des dimères de RAF et les dissocie de la membrane plasmique (McKay et al., 2009). Par exemple, l'hyper-phosphorylation de CRAF par ERK dissocie le dimère CRAF/BRAF et inhibe son activité (Dougherty et al., 2005). Les phosphorylations inhibitrices de BRAF par ERK influencent également la demi-vie de BRAF (Eisenhardt et al., 2016; Hernandez et al., 2016). La forme active de la kinase ERK phosphoryle et inhibe de nombreux composants en amont dans la voie RAS-ERK, tels que les EGFRs (Avraham and Yarden, 2011), le facteur d'échange SOS1 (ce qui diminue l'activité des protéines RAS (Chen et al., 1996) ou encore la kinase MEK1 (Eblen et al., 2004).

L'ensemble de ces événements de régulation négative dépendant de l'activation de ERK contribue à l'atténuation du signal RAS-ERK (Shin et al., 2009). La boucle de rétrocontrôle négatif met un terme à la signalisation « verticale » déclenchée à la suite de la stimulation des récepteurs membranaires. Il existe par ailleurs une signalisation dite « horizontale » où certaines protéines de la voie RAS-ERK fonctionnent comme des pôles d'échanges (des « hubs »), impactant ainsi différents processus cellulaires simultanément. Les phosphatases telles que les DUSP (*Dual-Specificity Phosphatase*) et PP2A (*Phosphatase 2A*) exercent un contrôle négatif de la voie RAS/ERK notamment au niveau de la kinase ERK (Kidger and Keyse, 2016). Le complexe SHOC2/MRAS/PP1C a quant à lui un rôle activateur, en favorisant la déphosphorylation de la phospho-sérine inhibitrice située dans la région N-terminale des protéines RAF (Kwon et al., 2022).

1.3.1.4 Rôles indépendants de la voie RAS-ERK

Il existe de nombreux événements d'activations croisées (ou « cross-talks ») entre la voie RAS-ERK et d'autres voies de signalisation. Par exemple, la voie mTOR régule la voie RAS-ERK à différents niveaux dans la cascade (Mendoza et al., 2011; Saxton and Sabatini, 2017), tout en étant elle-même contrôlée par la signalisation RAS-ERK. Cette régulation s'exerce notamment par

les protéines ERK (Carriere et al., 2011) mais également par l'intermédiaire des protéines 14-3-3 qui sont communes à ces deux voies de signalisation (Gwinn et al., 2008).

Les kinases RAF se distinguent les unes des autres par des propriétés spécifiques, notamment dans le contexte des activations croisées (Desideri et al., 2015). Ainsi CRAF et ARAF peuvent contrôler la mort cellulaire programmée en interagissant avec des membres de la famille de protéines Bcl-2, protéines régulatrices de l'apoptose qui peuvent relocaliser CRAF à la membrane mitochondriale (Salomoni et al., 1998; Wang et al., 1996). Par ailleurs, en inhibant l'activation des caspases, BRAF possède également une activité anti-apoptotique (Erhardt et al., 1999). Des rôles indépendants de la voie ont également été établis entre la signalisation Rho et Hippo (Matallanas et al., 2011) et avec l'activation des RCPG (Bourquard et al., 2015; Zang et al., 2021). Bien qu'indirectement associé au processus de cancérisation, ces liens peuvent être responsables d'effets secondaires indésirables « off-target » lors de l'utilisation d'inhibiteurs de RAF, *via* par exemple l'association de la protéine d'échafaudage β -arrestin à différents composants de la voie RAS-ERK (Bagnato and Rosanò, 2019; Qu et al., 2021)

1.3.2 Les protéines KSR

1.3.2.1 Découverte des protéines KSR en lien avec la voie RAS-ERK

La famille des protéines RAF se compose des kinases RAF et comporte également les pseudokinases KSR 1/2 (Wellbrock et al., 2004). Les deux isoformes KSR1 et KSR2 (« Kinase Suppressor of Ras ») tirent leur appellation de leur découverte dans des cribles génétiques. Ces cribles, de type « perte de fonction », ont été motivés par l'identification de partenaires d'interactions essentiels à la signalisation RAS-ERK chez des organismes modèles tels que *C. elegans* (Kornfeld et al., 1995; Sundaram and Han, 1995). D'un point de vue fonctionnel, la perte de la protéine KSR « supprime » la signalisation RAS et chez la drosophile, la délétion de l'unique isoforme de KSR est létale (Therrien et al., 1995). Les isoformes de KSR chez *C. elegans* peuvent se compenser par leurs rôles redondants dans la régulation de la voie RAS-ERK (Ohmachi et al., 2002). Chez la souris, la déplétion génique *KSR1* *-/-* n'a aucun impact notable sur le développement ou la survie. (Lozano et al., 2003).

Les souris *KSR1* *-/-* présentent cependant une atténuation de la signalisation ERK-dépendante, suffisante pour bloquer l'activation des cellules T (Nguyen et al., 2002). Par son lien

avec la voie RAS-ERK, KSR1 induit également la stimulation des cytokines pro-inflammatoires et le stress cellulaire (Kortum et al., 2006). De nombreuses autres études ont rapporté le rôle de KSR1 dans les cancers dépendants de l'activation de RAS (Clapéron and Therrien, 2007; Joneson et al., 1998; Kortum et al., 2006). La protéine KSR1 est ainsi indispensable à la tumorigénèse dans un modèle murin porteur de la mutation activatrice de RAS (RAS^{G12V}) (Lozano et al., 2003). Le pouvoir transformant de cette forme oncogénique de RAS est atténué par la déplétion de KSR1 dans des fibroblastes de souris mais n'inhibe pas le développement tumoral (Germino et al., 2018; Kortum and Lewis, 2004).

1.3.2.2 Rôle des protéines KSR dans les cancers, indépendamment de la voie RAS-ERK

KSR1 a aussi un impact direct sur l'homéostasie du glucose (Klutho et al., 2011) en régulant notamment le coactivateur transcriptionnel PGC-1 (de *Peroxisome proliferator-activated receptor Gamma Coactivator 1*). Cette protéine est spécifiquement exprimée dans le tissu adipeux brun, le foie et le pancréas, et contrôle les métabolismes énergétique et glucidique. Cette régulation de PGC-1 par KSR1 favorise la survie cellulaire dans des tumeurs de cancers du côlon (McCall et al., 2016). Cette survie passe par la régulation de la kinase AMPK qui augmente les capacités métaboliques des cellules tumorales en leur permettant d'avoir un avantage sélectif dans des conditions de stress (Fisher et al., 2015). KSR1 promeut également la survie des cellules de cancer colorectal en induisant la traduction de certains ARN messagers (ARNm) spécifiques favorables à ces cellules (McCall et al., 2016). De façon similaire, KSR1 induit la traduction de l'ARNm du gène *EPSTII* qui participe à la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM ou EMT en anglais), processus central des cellules métastatiques (Rao et al., 2021). À l'inverse, l'ubiquitination de KSR1 et sa dégradation dans des cellules gastriques cancéreuses inhibent la prolifération cellulaire et la progression tumorale *in vivo* (Zhao et al., 2021).

La protéine KSR2 est quant à elle plus spécifiquement associée à des troubles homéostatiques dont celui du métabolisme du glucose. Les souris *KSR2* *-/-* sont infertiles, deviennent obèses et développent un diabète ainsi que de l'hypertension (Costanzo-Garvey et al., 2009; Revelli et al., 2011). Des mutations ou des troncations du domaine pseudo-kinase de KSR2 sont directement associées à des formes d'obésité et d'insulino-résistance. (Pearce et al., 2013). La régulation du glucose dans le cerveau est également dépendante des niveaux de KSR2 (Guo et al., 2016). Comme

pour KSR1, la transformation des cellules tumorales dépendrait également de KSR2 et ce *via* la signalisation par l'AMPK (Dougherty et al., 2009; Fernandez et al., 2012)

1.3.2.3 Les protéines KSR font partie de la famille des protéines RAF

Les protéines KSR jouent un rôle central dans la régulation de la voie RAS-ERK : elles favorisent la phosphorylation de MEK par les kinases RAF (Michaud et al., 1997), elles peuvent se lier aux protéines MEK (Denouel-Galy et al., 1998) et moduler leur localisation et leur activité (Stewart et al., 1999). Enfin, les protéines KSR comportent également un site de liaison à ERK qui dépend de la stimulation de RAS (Jacobs et al., 1999; Therrien et al., 1996). Les protéines KSR ont donc été considérées comme des protéines d'échafaudage permettant un contrôle spatio-temporel de MEK, RAF et ERK en régulant leur localisation subcellulaire (Nguyen et al., 2002; Roy et al., 2002). En effet, l'impact des protéines d'échafaudage sur la durée et l'intensité du signal est directement corrélé à leur concentration (Levchenko et al., 2000). Les protéines KSR impactent l'activité RAS-ERK de façon dose-dépendante. L'augmentation de l'expression de KSR1 stimule la prolifération cellulaire par son rôle dans de la voie RAS-ERK (Kortum and Lewis, 2004). La fonction des protéines KSR au sein des cellules de mammifères, est cependant plus complexe, en particulier via leur lien avec les kinases RAF.

L'analyse génétique des protéines KSR a montré qu'elles possèdent une forte homologie de séquence avec les kinases RAF (Therrien et al., 1995), homologie confirmée par des études structurales du domaine kinase (Brennan et al., 2011). Elles possèdent notamment une interface de dimérisation leur permettant de dimériser en homodimères (KSR/KSR) ou en hétérodimères (KSR/RAF) avec les kinases RAF (Rajakulendran et al., 2009). En effet, la similitude structurale des domaines kinases des protéines KSR et des kinases RAF leur permet de s'associer (Freeman et al., 2013a; Rajakulendran et al., 2009).

En conséquence, il existerait jusqu'à 15 dimères différents de protéines RAF formés d'homodimères ou d'hétérodimères de RAF et KSR. La formation *in vitro* de certains de ces dimères a effectivement été rapportée, tel que le dimère BRAF/CRAF qui a directement été associé à l'activation de MEK (Lavoie et al., 2013; Cope et al., 2018). D'autres, au contraire, n'ont jusqu'à ce jour jamais été détectés et leurs fonctions restent inconnues. La capacité des protéines RAF à former un nombre conséquent de dimères participerait à la grande plasticité de la voie RAS-ERK où les fonctionnalités propres à chacun des isoformes seraient à mettre en lien avec les variabilités

de leur séquence. D'un point de vue structural, les mécanismes favorisant la formation de dimères spécifiques restent cependant inconnus (**Figure 3**).

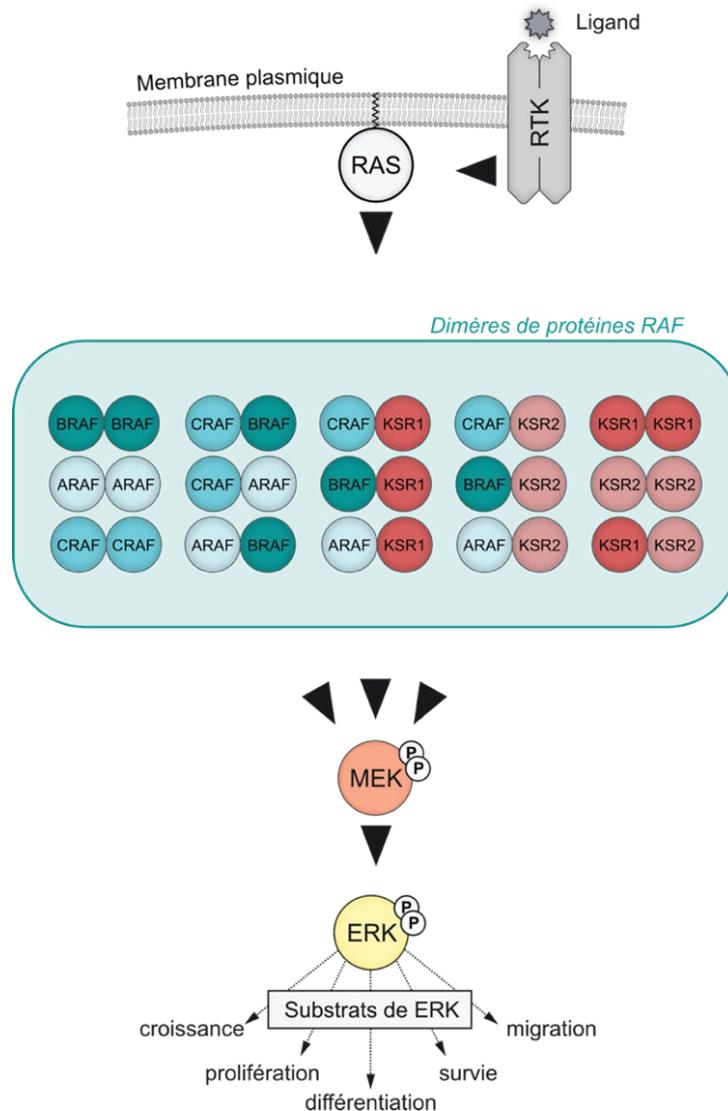


Figure 3 – La diversité des dimères de RAF.

La dimérisation des kinases RAF est essentielle à leur activité catalytique. Les trois kinases RAF (bleu) et les deux protéines KSR (rouge) possèdent une interface de dimérisation similaire au niveau de leur domaine kinase leur permettant de s'associer. En théorie, 15 dimères différents pourraient se former dans les cellules de mammifères. RTK : Receptor-Tyrosine Kinase, RAS : Rat Sarcoma, A/B/C/RAF : Rapid Accelerated Fibrosarcoma, KSR1/2 : Kinase Suppressor of Ras, MEK : MAPK/ERK Kinase, ERK : Extracellular signal-Regulated Kinase.

1.4 Organisation structurale des protéines RAF et mode d'activation

1.4.1 Les domaines des kinases RAF

L'organisation des kinases RAF comprend 3 « régions conservées » (*Conserved-Region* ; CR). La portion *N*-terminale des protéines, appelée la *N-Terminal Region* (NTR), comporte la CR1 qui se compose des domaines RBD (*Ras Binding Protein*) et du CRD (*Cysteine-Rich Domain*) ainsi que la CR2 qui est une courte séquence comportant des sites clés de phosphorylation. La portion *C*-terminale des kinases est quant à elle constituée de la CR3 qui comprend le domaine kinase (*Kinase Domain* ; KD) siège de l'activité catalytique. Les kinases RAF comportent également plusieurs sites de phosphorylations qui se concentrent sur les sites d'ancrage des protéines 14-3-3, sur la boucle d'activation (BA) du KD et sur la NtA (*N-terminal Acidic region* également appelée la *N-region*) du KD (**Figure 4**).

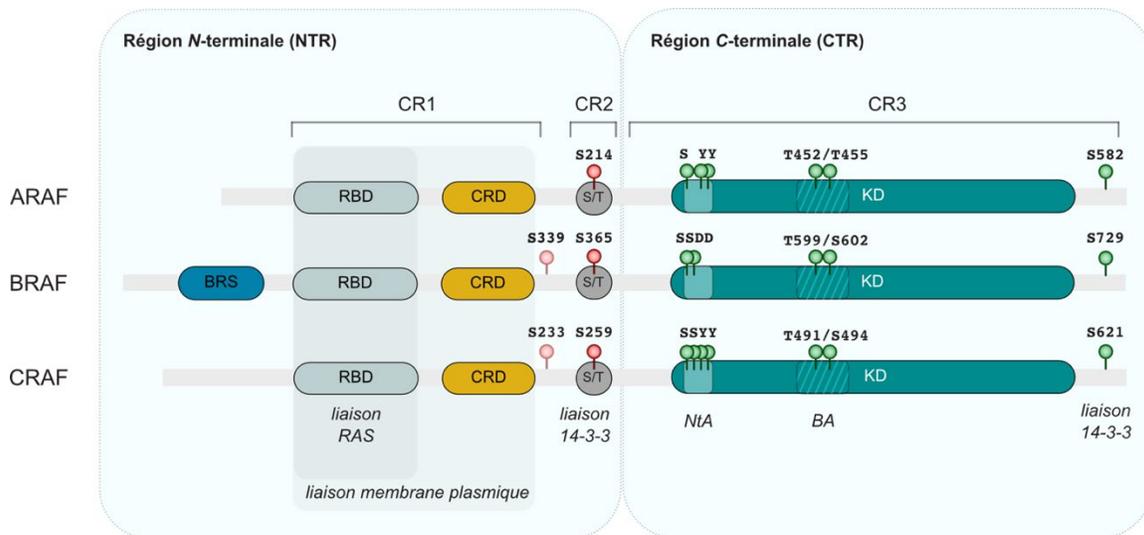


Figure 4 – Organisation structurale des kinases RAF.

Les kinases A-, B- et CRAF possèdent un domaine kinase (KD) en C-terminal. La région NTR des kinases RAF se compose du Ras-Binding Domain (RBD), du Cysteine-Rich Domain (CRD) et d'une séquence riche en Sérine/Thréonine (S/T rich). BRAF est l'unique isoforme qui possède une extension N-terminal comportant le BRAF-specific Sequence (BRS). Les protéines 14-3-3 se lient aux kinases RAF sur deux résidus phosphorylés : le premier en N-terminal (rouge) dans la séquence S/T est inhibiteur, le deuxième en C-terminal (vert) dans la région C3 est activateur. Un 3^{ème} site de phosphorylation (rouge pâle) présent uniquement dans les isoformes BRAF et CRAF permet également la liaison des protéines 14-3-3. L'activation des kinases requiert également des phosphorylations activatrices dans la N-terminal Acidic region (NtA) et dans le site boucle d'activation (BA). La numérotation correspond aux positions des acides aminés phosphorylés dans chacune des isoformes des kinases RAF.

Les kinases A-, B- et CRAF possèdent un domaine kinase (KD) en C-terminal. La région NTR des kinases RAF se compose du Ras-Binding Domain (RBD), du Cysteine-Rich Domain (CRD) et d'une séquence riche en Sérine/Thréonine (S/T rich). BRAF est l'unique isoforme qui possède une extension N-terminal comportant le BRAF-specific Sequence (BRS). Les protéines 14-3-3 se lient aux kinases RAF sur deux résidus phosphorylés : le premier en N-terminal (rouge) dans la séquence S/T est inhibiteur, le deuxième en C-terminal (vert) dans la région C3 est activateur. Un 3^{ème} site de phosphorylation (rouge pâle) présent uniquement dans les isoformes BRAF et CRAF permet également la liaison des protéines 14-3-3. L'activation des kinases requiert également des phosphorylations activatrices dans la N-terminal Acidic region (NtA) et dans le site boucle d'activation (BA). La numérotation correspond aux positions des acides aminés phosphorylés dans chacune des isoformes des kinases RAF.

Les kinases RAF adoptent deux états principaux lors de leur cycle d'activation : un état auto-inhibé monomérique et un état dimérique activé (Dougherty et al., 2005; Ritt et al., 2010). Cette transition d'un état à un autre est le fait de plusieurs événements simultanés lors de la stimulation de la voie RAS-ERK : 1) l'adressage de kinases RAF à la membrane plasmique via la NTR, 2) la liaison d'un tandem de protéines 14-3-3 et 3) la conformation du domaine kinase.

1.4.1.1 La région N-terminale régulatrice (NTR)

En l'absence de stimuli extracellulaires et de l'activation de RAS, la NTR est associée au KD réprimant ainsi l'activité catalytique des kinases par auto-inhibition (Chong and Guan, 2003). Lors de la stimulation de la voie RAS-ERK, le désengagement de la NTR du KD et son association à RAS ainsi qu'à la membrane plasmique, permettent aux kinases RAF d'adopter un état dimérique (**Figure 5**).

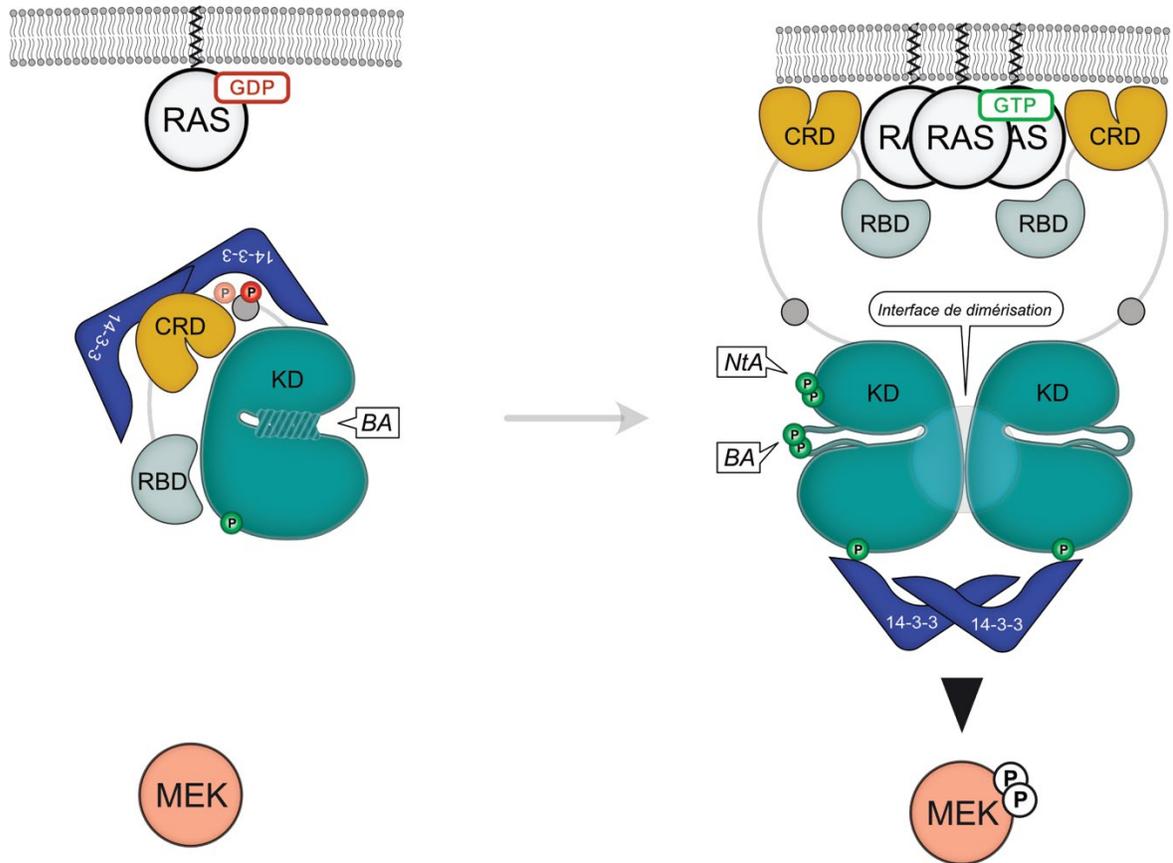


Figure 5 – Modèle d’activation des kinases RAF.

Dans des cellules quiescentes, les kinases A-, B- et CRAF sont dans une conformation monomérique où le KD (turquoise) est inhibé par la région NTR qui comprend le RBD (gris) et le CRD (or). Cette conformation est stabilisée par la liaison d’un tandem de protéines 14-3-3 (bleu foncé) sur les sites N-terminal (rouges) et C-terminal (vert). À la suite de l’activation de RAS, la région NTR se désengage du KD et ancre RAF à la membrane plasmique. Cette désinhibition libère l’interface de dimérisation des KD (cercle transparent) facilitant la formation de dimères. L’état dimérique est stabilisé par le tandem de protéines 14-3-3 qui se lie aux deux protomères de RAF via leur site C-terminal (vert) respectif. En parallèle, le KD subit des modifications conformationnelles favorisant son activation par phosphorylation de sa BA.

KD : Domaine kinase, RBD : Ras-Binding Domain, CRD : Cysteine-Rich Domain, 14-3-3 : protéines 14-3-3, MEK : MAPK/ERK Kinase, BA : Boucle d’Activation, NtA : N-terminal Acidic region, P : site de phosphorylation.

Dans des cellules quiescentes, les kinases A-, B- et CRAF sont dans une conformation monomérique où le KD (turquoise) est inhibé par la région NTR qui comprend le RBD (gris) et le CRD (or). Cette conformation est stabilisée par la liaison d’un tandem de protéines 14-3-3 (bleu foncé) sur les sites N-terminal (rouges) et C-terminal (vert). À la suite de l’activation de RAS et à

la déphosphorylation de la phospho-sérine *N*-terminale permettant la dissociation d'un des deux protomères de 14-3-3, la région NTR se désengage du KD et ancre RAF à la membrane plasmique. Cette désinhibition libère l'interface de dimérisation des KD (cercle transparent) facilitant la formation de dimères. L'état dimérique est stabilisé par le tandem de protéines 14-3-3 qui se lie aux deux protomères de RAF via leur site C-terminal (vert) respectif. En parallèle, le KD subit des modifications conformationnelles favorisant son activation par phosphorylation de sa BA.

La NTR est essentielle pour permettre la répression de l'activité catalytique puisque son absence dans des formes tronquées de RAF est associée à une activité oncogénique (Ikawa et al., 1988; Stanton and Cooper, 1987). La surexpression de la NTR (domaines RBD et CRD uniquement) est suffisante pour complètement réprimer l'activité kinase de RAF (Chong et al., 2001; Cutler et al., 1998). L'ancrage membranaire des kinases RAF est essentiel à leur l'activation (Leevers et al., 1994; Stokoe et al., 1994). Lors de la stimulation de la voie RAS-ERK, les kinases RAF sont ancrées à la membrane plasmique par 1) leur association aux protéines RAS (Morrison et al., 1988) et 2) l'interaction directe avec les phospholipides (Bondeva et al., 2002; Li et al., 2018; Luo et al., 1997).

L'interface RAS/RBD est essentielle pour stabiliser les kinases RAF à la membrane plasmique et induire leur activation. La forme mutée RAS^{Q61L} reste ainsi liée au GTP de façon plus durable que la forme sauvage, via son interaction avec le domaine RBD de RAF, prolongeant ainsi l'activation de RAS (Buhrman et al., 2007; Fetics et al., 2015). C'est notamment par ce contact, que l'oligomérisation de RAS à la membrane plasmique (ou « nanoclustering ») facilite la dimérisation des kinases RAF. De façon réciproque, la dimérisation des kinases RAF favorise l'agrégation des protéines RAS. La coopérativité de ces événements participe à l'amplification du signal RAS-ERK (Nan et al., 2015; Santos, 2014). L'association des kinases RAF aux protéines RAS s'effectue principalement par leur domaine RBD (Chuang et al., 1994) mais implique également le domaine CRD qui lui est juxtaposé (Drugan et al., 1996; Ghosh et al., 1994).

Le CRD appartient à la famille des domaines C1 atypiques retrouvés dans plusieurs familles de protéines telles que les PKC (Colón-González and Kazanietz, 2006) et comporte un motif de liaison au zinc composé de résidus histidines et cystéines qui assurent le repliement global du domaine (Mott et al., 1996). La structure globulaire du CRD lui permet de s'associer directement aux protéines RAS (Brtva et al., 1995; Hu et al., 1995) mais également à la membrane plasmique

(Cookis and Mattos, 2020; Fang et al., 2020; Travers et al., 2020). Cette interaction implique spécifiquement les phosphatidyl-sérines (Ghosh et al., 1996) mais pas les phorbol-esters ni le diacylglycérol (Kazanietz et al., 1994). Cet ancrage direct aux lipides dépend également de la présence de radeaux lipidiques qui faciliteraient l'ancrage membranaire des kinases RAF (Ghosh et al., 1996, 2003; Improta-Brears et al., 1999). Il a par ailleurs été suggéré qu'une fraction de molécules de kinases RAF se trouverait dans un état « pré-associé » à la membrane plasmique, favorisé par la présence de cholestérol et des céramides, ce qui participerait à l'amplification du signal reçu par les RTK (Hekman et al., 2002). Le domaine CRD contribue à l'association des kinases RAF aux protéines RAS, à l'ancrage membranaire des kinases RAF et, par extension, à leur activation. Plusieurs auteurs ont également souligné l'importance du domaine CRD dans l'auto-inhibition des kinases RAF. Le domaine CRD est ainsi essentiel pour réprimer l'activité catalytique (Tran et al., 2005). Cette répression s'effectue par contact direct avec le domaine KD, masquant l'interface de dimérisation des kinases RAF (**Figure 5**). La liaison du domaine CRD aux protéines RAS favoriserait la dé-répression du KD et leur dimérisation. La perturbation du repliement du domaine CRD est donc suffisante pour lever l'inhibition de l'activité kinase de RAF (Cutler et al., 1998).

Les isoformes des kinases RAF partagent plus de 96 % d'homologie de séquence au niveau de leur KD mais seulement 60 % pour leur NTR (Baljuls et al., 2009). Par exemple, bien que les domaines CRD des différentes isoformes possèdent des structures similaires, la nature de leurs acides aminés influencent directement leur interaction aux protéines de la famille des RAS GTPases (Okada et al., 1999). Plus encore, l'isoforme BRAF a également la particularité de posséder une extension *N*-terminale de la CR1 (**Figure 4, p. 48**) qui comporte un domaine unique à cette isoforme : le BRS pour « *BRAF Specific domain* » (Terai and Matsuda, 2006), et qui est également retrouvé chez la drosophile où il contribue à l'interaction de D-RAF avec RAS (Ding et al., 2010).

De façon plus générale, le désengagement de la NTR du KD des kinases RAF assure leur transition d'un état monomérique à état dimérique. Cette transition s'accompagne également de déplacement des protéines 14-3-3 qui stabilisent les différents états par leurs liaisons à des sites spécifiques.

1.4.1.2 Les sites de liaison des protéines 14-3-3

Des événements de phosphorylation stabilisent les kinases RAF dans leur état monomérique ou dimérique. Ces modifications post-traductionnelles contrôlent notamment l'interaction des protéines RAF avec leurs partenaires (Wimmer and Baccharini, 2010). Avant toute dimérisation, les protéines d'échafaudage 14-3-3 maintiennent BRAF (et par analogie, ARAF et CRAF) dans sa forme auto-inhibée, où la NTR est associée au KD (**Figure 5**). Un tandem de protéines 14-3-3 interagit avec chaque protéine RAF via deux sites de reconnaissance qui sont phosphorylés sur une sérine centrale (R-X-X-pS-X-P) (Michaud et al., 1995; Muslin et al., 1996). Le premier site, situé dans la CR2 (Ser-259 dans CRAF) (Rommel et al., 1996), est phosphorylé par la PKA (*Protein Kinase A*), la PKB (*Protéine Kinase B* aussi appelée AKT) ou la protéine LATS1 (*Large Tumor Suppressor kinase 1*) lorsque les kinases sont sous forme inactive dans des cellules quiescentes (Cook and McCormick, 1993; Romano et al., 2014; Zimmermann and Moelling, 1999). La déphosphorylation de ce site inhibiteur par les phosphatases PP2A (*Protein Phosphatase 2A*) ou PP1 (*Protein Phosphatase 1*) (Dhillon et al., 2002) est une des étapes de l'activation des RAF (Light et al., 2002). Le tandem de protéines 14-3-3 se désengage alors de ce premier site mais reste lié aux kinases RAF par son deuxième site de liaison localisé à l'extrémité C-terminale (Ser621) de la CR3. Cette dissociation partielle favorise l'ancrage de RAF à la membrane plasmique, où l'accumulation de RAS dans des radeaux lipidiques accompagne la dimérisation et l'activation des RAF (Santos et al., 2014). La liaison des protéines 14-3-3 aux kinases RAF est essentielle à leur activation (Tzivion et al., 1998) ; par cette association, elles participent activement à la stabilisation des dimères de RAF (Kondo et al., 2019; Weber et al., 2001).

Il existe un 3^{ème} site d'ancrage pour les protéines 14-3-3 (Ser-233) ou appelé aussi « site cryptique », car les protéines 14-3-3 s'y ancrent avec une faible affinité. Ce point d'ancrage présent uniquement dans BRAF et CRAF est situé en C-terminal du domaine CRD et fonctionne en synergie avec le site (Ser-259) pour stabiliser l'inhibition des kinases RAF (Molzan and Ottmann, 2012). Parallèlement à ces événements de phosphorylation, le domaine kinase subit également de nombreux réarrangements structuraux, en particulier au niveau du site actif.

1.4.1.3 Le domaine kinase

1.4.1.3.1 Les différentes conformations du domaine kinase

Comme pour la plupart des sérines-thréonines kinases, le KD est composé de deux lobes connectés par une région charnière extrêmement mobile (Wellbrock et al., 2004). Il contient un lobe N-terminal (*N*-lobe) riche en feuillets β et un lobe C-terminal (*C*-lobe) constitué d'hélices α . Lors de l'activation des kinases, l'accès au site actif est influencé par les mouvements des deux lobes l'un par rapport à l'autre. Ce site actif se situe dans une fente catalytique créée par l'interface entre le *N*-lobe et le *C*-lobe et adopte différentes conformations selon l'état d'activation de la kinase (Kornev and Taylor, 2010). Le site actif se compose d'éléments structuraux provenant des deux lobes dont les mouvements permettant à la fois l'accès du substrat à la fente et le bon déroulement des différentes étapes de la catalyse (liaison de l'ATP, du substrat, et phospho-transfert entre autres) (Ubersax and Ferrell, 2007). Le premier de ces éléments structuraux, appelée l'hélice α_C , adopte une conformation « IN » ou « OUT » qui définit l'état d'activation de la kinase. Le deuxième élément est la boucle d'activation (BA) située dans le *C*-lobe, et plus spécifiquement le motif DFG (Asp594-Phe595-Gly596) qui se déplace selon les mouvements des lobes (**Figure 6**).

Le domaine kinase des protéines RAF comprend deux lobes (*N*-lobe et *C*-lobe) présentant des éléments structuraux mobiles dont la conformation dicte l'état d'activation des kinases. Lorsque le KD est dans l'état monomérique inactif, la boucle d'activation est repliée sous forme d'hélice (AS-H1) et l'hélice α_C du *C*-lobe est dans une conformation dite « OUT » (Taylor et al., 2004). Dans l'état dimérique, la boucle d'activation est déployée permettant sa double phosphorylation (T599/S602 dans BRAF). Ce déploiement entraîne l'exposition du motif DFG (en « IN ») qui est nécessaire à la liaison de l'ATP (Lavoie et al., 2015). L'hélice α_C se place également en position « IN » pour bloquer la poche catalytique en forme active. Ce mouvement de l'hélice est par ailleurs favorable à la dimérisation des KD via le motif RKTR situé dans l'interface de dimérisation qui comporte notamment l'arginine 509 (R509) par lesquels les protomères se contactent directement. Entre ces deux états actif/inactif, le KD adopte des états intermédiaires inactifs où seul l'un ou l'autre des éléments mobiles s'est déplacé (Kornev et al., 2006).

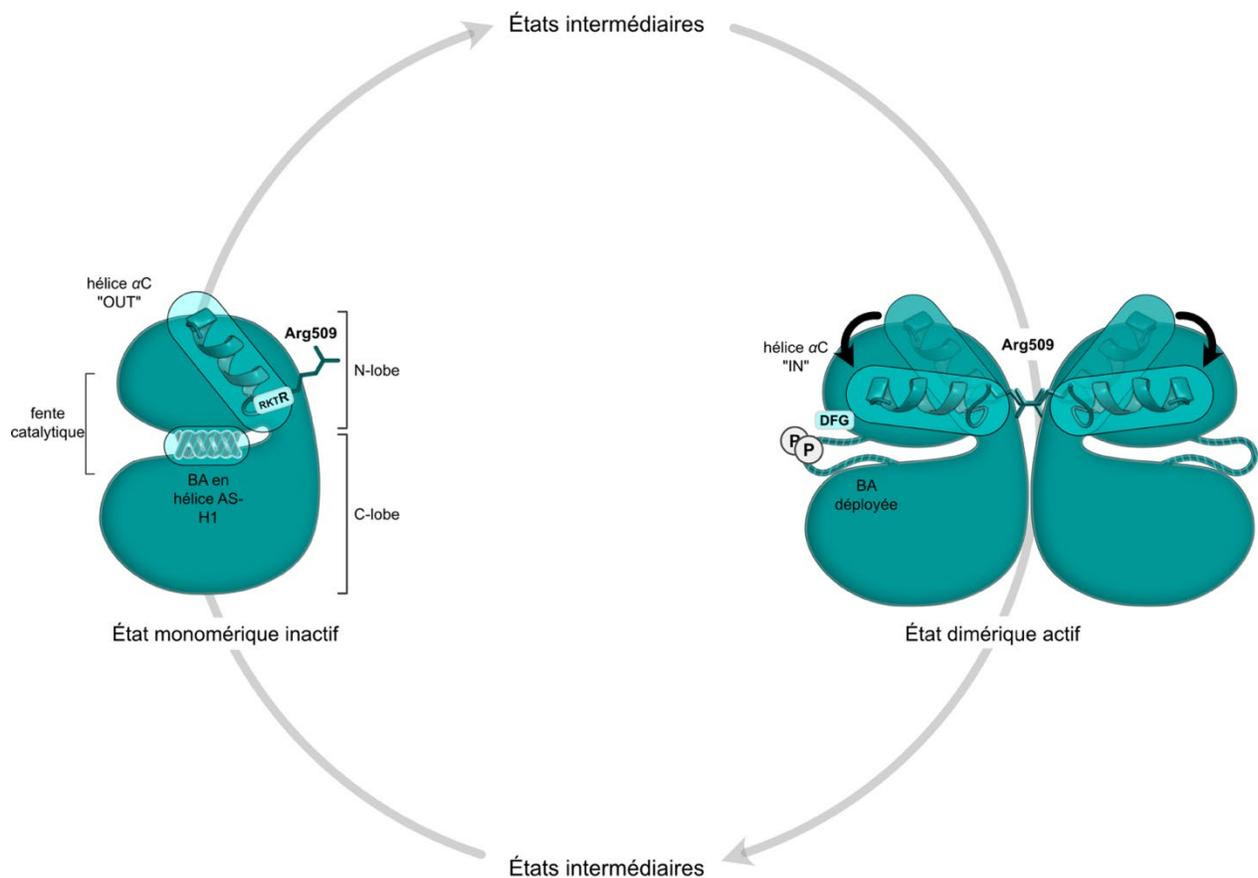


Figure 6 – Les structures du domaine kinase de RAF.

Le domaine kinase des protéines RAF comprend deux lobes (N-lobe et C-lobe) présentant des éléments structuraux mobiles dont la conformation dicte l'état d'activation des kinases. Lorsque le KD est dans l'état monomérique inactif, la boucle d'activation est repliée sous forme d'hélice (AS-H1) et l'hélice αC du C-lobe est dans une conformation dite « OUT ». Dans l'état dimérique, la boucle d'activation est déployée permettant sa double phosphorylation (T599/S602 dans BRAF). Ce déploiement entraîne l'exposition du motif DFG (en « IN ») qui est nécessaire à la liaison de l'ATP. L'hélice αC se place également en position « IN » pour bloquer la poche catalytique en forme active. Ce mouvement de l'hélice est par ailleurs favorable à la dimérisation des KD via le motif RKTR situé dans l'interface de dimérisation qui comporte notamment l'arginine 509 (R509) par lesquels les protomères se contactent directement. Entre ces deux états actif/inactif, le KD adopte des états intermédiaires inactifs où seul l'un ou l'autre des éléments mobiles s'est déplacé.

KD : Domaine kinase, BA : Boucle d'Activation, AS-H1 : Activation Segment Helix 1, P : site de phosphorylation, RKTR : Arg-Lys-Thr-Arg.

Dans son état inactif non phosphorylé, la boucle d'activation est repliée en une forme hélicoïdale appelée AS-H1 (Activation Segment Helix 1) qui comporte les résidus phosphorylables (Thr599 et Ser602). Lorsque les kinases RAF sont phosphorylées sur ces résidus, l'AS-H1 se déploie complètement et entraîne avec elle le motif DFG dans la conformation « IN » qui peut

désormais lier l'ATP (Thevakumaran et al., 2015). Dans la forme active, l'hélice α C et le motif DFG sont donc en position « IN » pour stabiliser la fente catalytique et fixer l'ATP. Par ailleurs, la réorientation de l'hélice α C lui permet d'exposer son motif RKTR (Arg506-Lys507-Thr508-Arg509) situé à son extrémité C-terminale. Ce motif constitue le centre de l'interface de dimérisation des kinases RAF et leur permet de stabiliser leur KD dans une conformation fermée active en dimérisant. Il existe ainsi un couplage entre la position de l'hélice α C et l'interface de dimérisation par le biais d'une modification structurale de la boucle d'activation. En dimérisant, les résidus du motif RKTR, en particulier l'arginine (R509 dans BRAF) bloquerait l'hélice α C dans la conformation « IN » (Rajakulendran et al., 2009). Cette série de changements conformationnels provoquée par la double phosphorylation sur la Thr-599 et la Ser-602 induit 1) le passage des kinases RAF d'une forme monomérique à une forme dimérique (Freeman et al., 2013a; Wan et al., 2004) et 2) rendent les kinases RAF catalytiquement actives (Chong et al., 2001; Köhler et al., 2016; Zhang and Guan, 2000). Dans sa forme hélicoïdale AS-H1 (non déployée), la boucle d'activation inhibe le mouvement de l'hélice α C, ce qui bloque l'accès au site actif et maintient ainsi RAF dans une forme monomérique inactive (**Figure 6**).

1.4.1.3.2 La N-terminal Acidic region ou NtA

La CR3 comporte la NtA qui est située en N-terminal du KD. Cette courte région de 4 acides aminés diffère entre les protéines RAF et est à l'origine des différences dans leur régulation (Marais et al., 1995). Ainsi, dans les isoformes ARAF et CRAF, cette région se compose de 3 ou 4 résidus phosphorylables (SSYY/SGYY : Ser-Ser-Tyr-Tyr/Ser-Gly-Tyr-Tyr) (**Figure 4, p. 48**). La phosphorylation du premier (Ser) et du dernier résidu (Tyr) de ce motif est particulièrement critique pour que les kinases soient catalytiquement actives (Diaz et al., 1997). Les événements de phosphorylations ont lieu séquentiellement. À la suite de l'activation de la PI3K, le résidu Tyr est d'abord phosphorylé par des tyrosine kinases de la famille SFK (*SRC Family Kinases*) (Cleghon and Morrison, 1994; Fabian et al., 1993), permettant la phosphorylation secondaire de la première sérine par les kinases PAK (*P21-Activated protein Kinases*). Le premier résidu Ser est également la cible de la kinase CK2 (*Casein Kinase 2*), qui y reconnaît un site consensus (Ritt et al., 2007). Dans BRAF, les deux résidus tyrosines présents dans les autres isoformes sont remplacés par deux résidus aspartate (SSDD: Ser-Ser-**Asp-Asp**). Ces résidus dits phosphomimétiques fournissent les charges négatives nécessaires à l'activation en place et lieu des tyrosines phosphorylées (Marais et al., 1997; Mason et al., 1999). Étant donné la présence de ces résidus, l'activation de BRAF

nécessite moins d'évènements de phosphorylations que les autres isoformes. Lors de l'activation de la voie RAS-ERK, BRAF est en effet activée par RAS seul, alors que A- et CRAF requièrent également la phosphorylation par une kinase de la famille SRC sur les résidus tyrosine. L'activité enzymatique basale de BRAF est donc supérieure à celle des autres kinases RAF (Roskoski et al., 2010).

L'importance de la NtA a été mis en avant lorsque l'état de phosphorylation du « motif phosphorylable » a été mis en relation avec le phénomène dit de « transactivation asymétrique des dimères ». Il a été postulé qu'au sein des dimères de RAF, chaque protomère constituant les dimères de RAF a un rôle spécifique avec un protomère « activateur » stimulant le protomère « receveur » par activation allostérique (Hu et al., 2013). Ce phénomène a été illustré par les propriétés des mutants de BRAF sans activité catalytique (« kinase-dead »). Ces mutants sont toujours capables de stimuler l'activation de MEK en dimérisant avec un autre protomère de RAF et en le transactivant (Poulikakos et al., 2011). La phosphorylation de la NtA participerait à cette transactivation allostérique lors de la dimérisation. Structurellement, la phosphorylation de la NtA stabilise les dimères en permettant l'établissement d'un pont électrostatique entre la NtA d'un premier protomère et le motif RTKR de l'hélice α C du second protomère (Jambrina et al., 2014, 2016). Les différents éléments structuraux et les conformations que les kinases RAF adoptent lors de la catalyse ont été identifiées dans de nombreuses études structurales et sont communes aux kinases RAF et aux pseudokinases KSR (Shaw et al., 2014).

1.4.2 Spécificités des protéines KSR

Les protéines KSR ont une organisation similaire à celles des kinases RAF, mais elles se distinguent cependant des kinases RAF par l'organisation de leur région NTR. Elles sont subdivisées en 5 « zones conservées » (*Conserved Area*; CA). Leur portion *N*-terminale, appelée la *N-Terminal Region* (NTR) se compose des zones conservées CA1 à CA4 (Therrien et al., 1995). La CA1 comprend le domaine CC-SAM (*Coiled Coil-Sterile Alpha Motif*), qui est spécifique aux protéines KSR. La CA2 est une répétition de résidus proline de fonction inconnue. La CA3 correspond à un domaine CRD (*Cysteine-Rich Domain*) similaire à celui retrouvé chez les kinases RAF. La CA4 est une région riche en Ser/Thr qui comporte le motif de liaison à ERK, et qui ressemble à la CR2 des RAF. Enfin, la portion *C*-terminale des KSR est constituée de la CA5 qui comprend le domaine kinase (*Kinase Domain*; KD) (**Figure 7**).

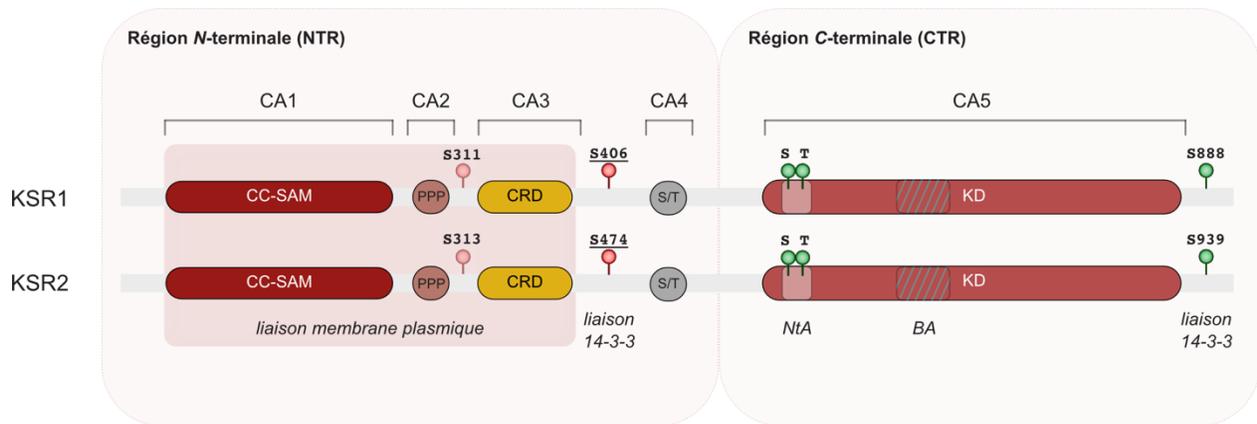


Figure 7 – Organisation structurale des pseudokinases KSR.

Les protéines KSR se composent de 5 Conserved Areas (CA). Un domaine similaire au KD des kinases RAF est retrouvé chez les protéines KSR mais aucune activité catalytique n'y a été associée. La région NTR des protéines se compose comme chez les kinases RAF du Cysteine-Rich Domain (CRD) et d'une séquence riche en Sérine/Thréonine (S/T rich). Les séquences riches en prolines (PPP) et le Coiled-Coil Sterile Alpha Motif (CC-SAM) sont spécifiquement retrouvés dans les protéines KSR. Les protéines KSR possèdent des sites potentiels de phosphorylations similaires à ceux retrouver dans les kinases RAF notamment les sites des liaisons aux 14-3-3 et les sites de la NtA. Seul le site N-ter (souligné) a été validé de façon expérimentale. NtA : N-terminal Acidic region ; BA : Boucle d'activation.

1.4.2.1 La région NTR des protéines KSR

Le domaine CC-SAM, présent dans la CA1, favorise l'association de KSR1 à la membrane plasmique et est essentiel au rôle de KSR1 dans la signalisation RAS-ERK (Koveal et al., 2012). Ce domaine est extrêmement conservé et chez la drosophile permet à KSR d'interagir avec RAF. De façon similaire, le CC-SAM de KSR1 est requis pour l'interaction de KSR1 avec BRAF (McKay et al., 2009; Roy et al., 2002). La CA3, qui comprend le domaine CRD, permet l'ancrage de KSR1 aux phospholipides membranaires. Sa structure, bien que très proche de celle des CRD des kinases RAF, ne lui permet ni de s'associer aux phorbol-esters ni aux protéines RAS (Michaud et al., 1997; Zhou et al., 2002). KSR1 possède également un site de liaison à ERK dans la CA4 qui favorise l'atténuation de la signalisation RAS-ERK par un phénomène de rétrocontrôle négatif (Jacobs et al., 1999; Therrien et al., 1996).

1.4.2.2 Les protéines KSR sont des pseudokinases

Lors de leur découverte, les protéines KSR ont été rapprochées des kinases RAF sur la base d'une similarité de séquence de leur domaine kinase (Therrien et al., 1995). Ce domaine a une

organisation en deux lobes, caractéristique des sérine-thréonine kinases et son repliement protéique général est très proche de celui du KD des kinases RAF. Il présente également une boucle d'activation composé de résidus caractéristiques des kinases, avec la présence d'un site actif potentiel de liaison de l'ATP (Brennan et al., 2011). Bien que les protéines KSR soient effectivement capables de lier l'ATP et qu'une faible activité ait pu être détectée dans des conditions expérimentales particulières (Brennan et al., 2011; Goettel et al., 2011; Hu et al., 2011), elles ne sont pas considérées comme des kinases actives *in vivo*. Elles sont ainsi classées dans un sous-groupe émergent dit de « pseudokinases ».

D'un point de vue structural, l'activité enzymatique des kinases dépend de la présence de résidus spécifiques dans leur site actif (Manning et al., 2002). Les protéines KSR se caractérisent par la substitution de l'arginine en position 639 (R639) qui est remplacée à la même position par une lysine. Cette substitution est défavorable au bon positionnement de l'ATP et est caractéristique du sous-groupe des pseudokinases. Cette substitution ainsi que d'autres divergences structurales encore non identifiées, pourraient expliquer l'absence d'activité catalytique chez les protéines KSR (Byrne et al., 2017; Carrera et al., 1993). Ainsi, bien qu'ayant tous les attributs structuraux des sérine-thréonine kinases, les protéines KSR sont catalytiquement inactives. Pour preuve, la perturbation du site actif des protéines KSR (ou mutation dite « kinase-dead ») n'a aucun impact sur l'activation de la kinase MEK (Lavoie et al., 2018). Comme vu précédemment (**Figure 3, p. 47**), les protéines KSR ont néanmoins la capacité de former des dimères avec les kinases RAF les rendant catalytiquement actives pour la phosphorylation de MEK (Freeman et al., 2013a; Rajakulendran et al., 2009).

Les protéines KSR possèdent par ailleurs plusieurs sites de phosphorylation dans des séquences hautement conservées, dont des sites d'ancrage des protéines 14-3-3 similaires à ceux des kinases RAF (Jagemann et al., 2008; Ory et al., 2003). Bien que la phosphorylation de ces sites ait été détectée par spectrométrie de masse (PhosphoSitePlus : (Hornbeck et al., 2015)), seul le site *N-terminal* d'ancrage des 14-3-3, phosphorylé par la kinase MARK3 (*MAP/microtubule Affinity-Regulating Kinase 3* ou CTAK1), a été formellement identifié (Müller et al., 2000). Aussi, le domaine pseudo-kinase des protéines KSR possède également une région analogue à la NtA des kinases RAF, qui serait soumise aux mêmes événements de phosphorylations. Globalement, les protéines KSR ont un mode de régulation de leur KD similaire à celui des kinases RAF (Lavoie

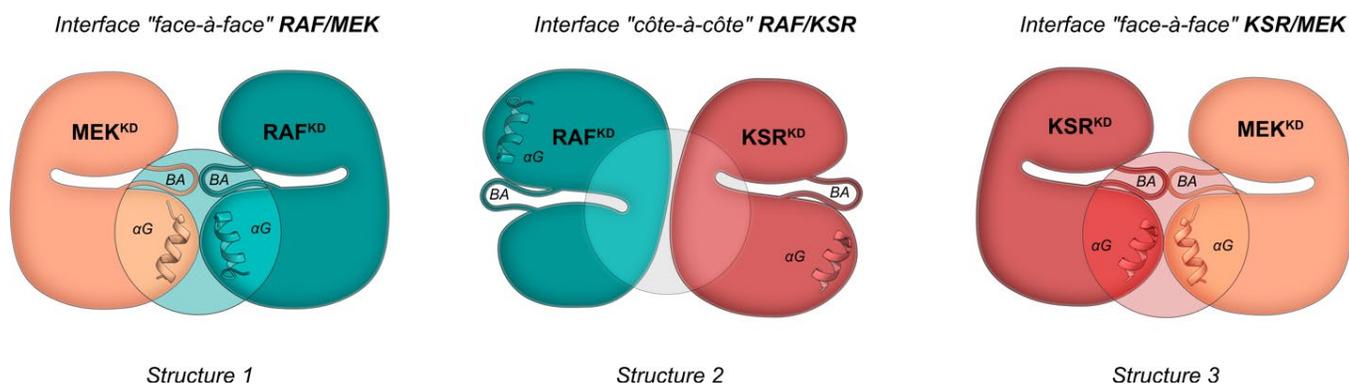
and Therrien, 2015; Shaw et al., 2014). En particulier, leur région NTR s'associe également à leur domaine KD, imitant en cela la forme auto-inhibée des kinases RAF (Jin et al., 2017). Les protéines KSR possèdent des états intermédiaires entre leur état inhibé et leur association à MEK1, rappelant les conformations adoptées par les kinases RAF (Dhawan et al., 2016).

Néanmoins, l'absence d'un domaine de liaison aux protéines RAS actives ne leur permet pas de désengager le NTR de leur KD directement par RAS. Le domaine kinase des protéines KSR a cependant la capacité de s'associer aux kinases MEK de façon constitutive aussi bien dans des cellules quiescentes que dans des cellules stimulées. L'affinité de MEK pour les protéines KSR est donc plus élevée que pour les kinases RAF (Cacace et al., 1999; Müller et al., 2000). Les protéines KSR ne possédant pas de RBD, leur association avec MEK pourrait permettre aux protéines KSR de libérer leur NTR. Le mécanisme permettant à MEK de s'associer spécifiquement aux domaines kinases des protéines KSR n'est cependant pas connu.

1.4.2.3 Interactions entre les kinases RAF, les protéines KSR et les protéines MEK

Comme mentionné plus haut, lors de son interaction avec les kinases RAF, MEK1 est phosphorylée sur les sérines Ser218 et Ser222 de sa boucle d'activation, ce qui la rend catalytiquement active (Zheng and Guan, 1994). De façon générale, le domaine kinase doit être bien positionné par rapport au substrat afin que ce dernier ait accès à la fente catalytique et que l'activité kinase résultante soit optimale. (Ubersax and Ferrell, 2007). Les complexes BRAF^{KD}/MEK1^{KD} (Haling et al., 2014), RAF^{KD}/KSR^{KD} (Rajakulendran et al., 2009) et KSR2^{KD}/MEK1^{KD} (Brennan et al., 2011) obtenus par cristallographie aux rayons X ou par modélisation, ont permis d'identifier les éléments structuraux permettant à MEK d'interagir avec les protéines de la famille RAF (**Figure 8**). La résolution structurale de ces complexes a notamment mis en lumière les points de contacts essentiels impliqués dans ces interactions protéiques.

A)



B)

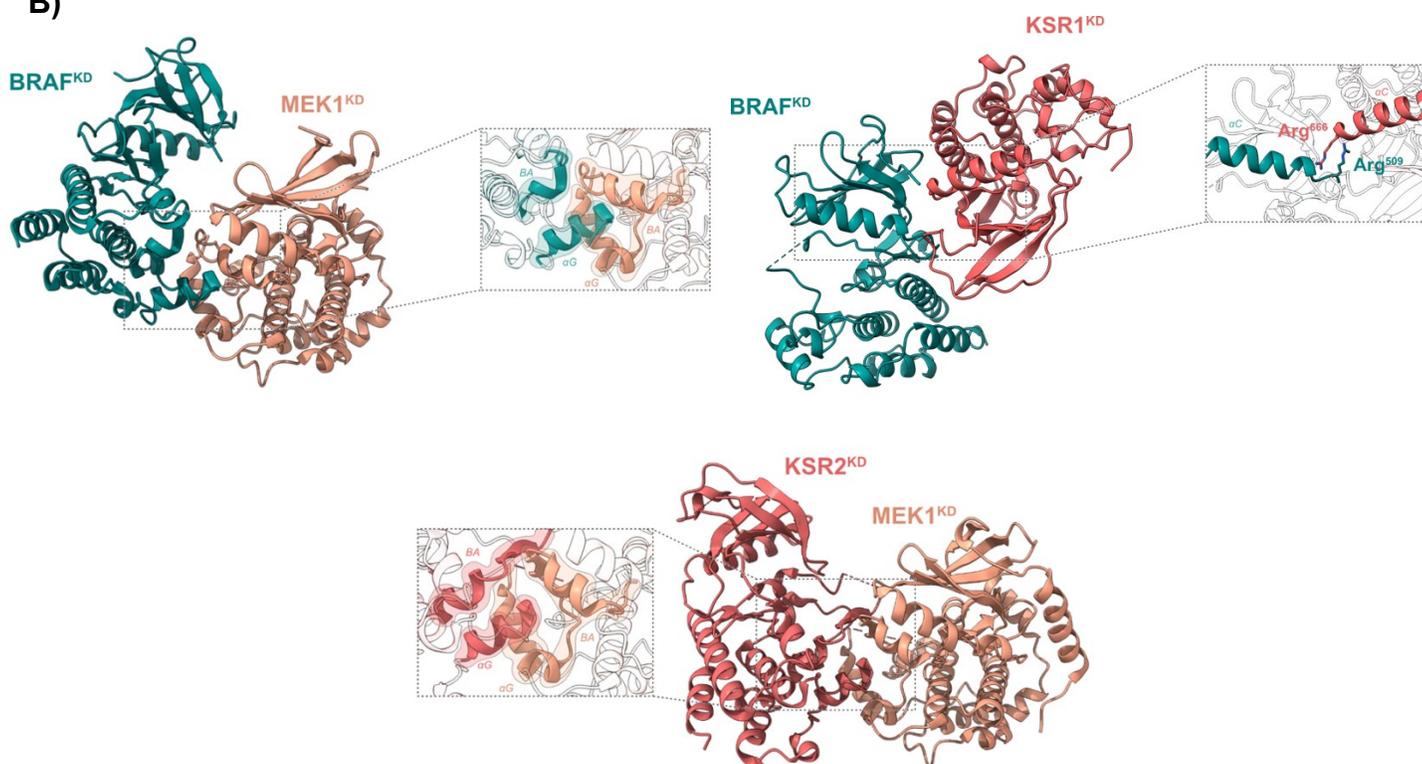


Figure 8 – Structures des complexes BRAF^{KD}/MEK1^{KD}, KSR2^{KD}/MEK1^{KD} et BRAF^{KD}/KSR1^{KD}

A) À gauche : structure de BRAF^{KD} en interaction avec MEK1^{KD}. L'interface d'interaction de MEK1^{KD} (saumon) avec BRAF^{KD} (turquoise) est très similaire à l'interaction de MEK1^{KD} avec KSR2^{KD} (rouge) à droite (PDB: 2Y4I, Brennan et al. 2011). Les domaines kinases de chaque protéine se font face. Ces interactions reposent principalement sur un contact direct entre leurs hélices αG et leurs boucles d'activation respectives. (PDB: 4MNE, (Haling et al., 2014). Ces éléments ont été agrandis dans les encadrés en pointillés. En bas : À partir du complexe BRAF^{KD}/BRAF^{KD} (PDB : 1UWH, Wan et al. 2004), la structure de KSR1^{KD} (rouge) a été alignée (PDB: 7JUW, (Khan et al., 2020) avec un des monomères de

BRAF (turquoise) pour reconstituer artificiellement l'interface $BRAF^{KD}/KSR1^{KD}$. L'arginine à la position 509 (Arg509) de $BRAF^{KD}$ et l'arginine à la position 666 (Arg666) de $KSR1^{KD}$ positionnées à l'extrémité de leur hélice αC participent à l'interaction $BRAF^{KD}/KSR1^{KD}$. Dans cette représentation, les KD de *BRAF* et *KSR1* sont « tête-bêche » où le N-lobe de *BRAF* contact le C-lobe de *KSR1* et inversement.

B) Schéma illustrant les modes d'interaction des protéines *RAF*, *KSR* et *MEK*. Par analogie entre les isoformes, nous considérons dans cette schématisation que « *RAF* » représente les kinase *RAF*, « *KSR* » les protéines *KSR* et « *MEK* » les kinases *MEK*. Le rendu des structures protéiques a été réalisé avec le logiciel *CHIMERA* (Pettersen et al., 2004).

KD : Kinase Domain, *BA* : Boucle d'Activation, αG : Hélice αG , αC : Hélice αC .

La résolution de la structure du complexe RAF^{KD}/MEK^{KD} (**Figure 8.B, structure 1**) révèle une interaction « face-à-face » qui implique deux points de contacts; un premier entre les hélices αG présentes dans les lobes C des KD et un second entre les boucles d'activation (Haling et al., 2014). Le mode d'interaction illustré par la structure de RAF^{KD}/KSR^{KD} souligne la similitude d'interaction qui existe entre les dimères des kinases *RAF* (*RAF/RAF*) et les dimères de *RAF* avec *KSR* (*RAF/KSR*). Cette interface de type « côte-à-côte » (par rapport à un modèle d'interaction « face à face »), repose sur le contact direct des résidus arginine (**Figure 6, p. 55**) également présents dans les protéines *KSR* (Rajakulendran et al., 2009). Enfin, le complexe KSR^{KD}/MEK^{KD} se forme avec une interface très similaire à celle de MEK^{KD}/RAF^{KD} , *via* les mêmes deux points de contact (Brennan et al., 2011).

À partir de ces trois complexes, Brennan et collaborateurs ont élaboré un modèle englobant le trio *BRAF*, *MEK1* et *KSR2* en se focalisant uniquement sur les interactions des domaines kinases (**Figure 9**). Le but de ce modèle a été de comprendre le mécanisme permettant aux protéines *KSR* de stimuler la phosphorylation des protéines *MEK* par le biais des kinases *RAF*, comme proposé précédemment (Michaud et al., 1997; Therrien et al., 1996). Notamment, le phénomène de transactivation de RAF^{KD} par KSR^{KD} observé chez la drosophile n'est observable qu'avec la co-surexpression simultanée de MEK^{KD} et KSR^{KD} (Rajakulendran et al., 2009). Le modèle doit tenir compte de la stœchiométrie des protéines impliquées ainsi que de la succession des interactions intervenant au sein du complexe de signalisation *BRAF/MEK1/KSR2* permettant à *BRAF* d'activer *MEK1* par l'intermédiaire de *KSR2* (**Figure 9**).

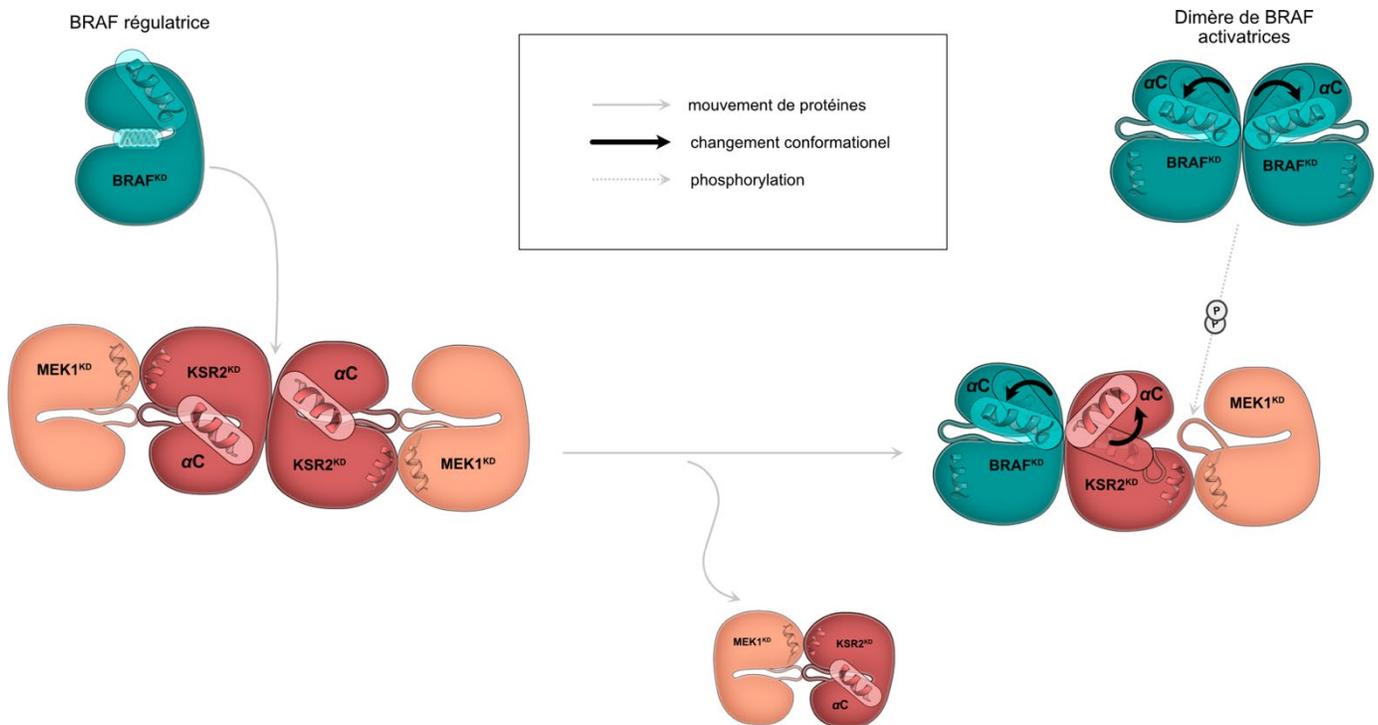


Figure 9 – Schéma du modèle d’interaction de Brennan et al.

Dans ce modèle, KSR2^{KD} (rouge) existerait dans un état pré-associé à MEK1^{KD} (saumon) sous forme « d’hétérotétramère » (deux complexes MEK1^{KD}/KSR2^{KD}). Une molécule BRAF^{KD} « régulatrice » (turquoise) s’associerait à KSR2^{KD} à la place d’un des complexes MEK1^{KD}/KSR2^{KD}. Cette dimérisation induirait un changement conformationnel des hélices αC de BRAF^{KD} et KSR2^{KD} illustré ici par une flèche noire. Chez KSR2, ce mouvement provoquerait un déploiement de sa boucle d’activation et sa dissociation de la boucle d’activation de MEK1^{KD}. MEK1^{KD} pourrait ainsi exposer les sérines Ser218 et Ser222 de sa boucle d’activation. Un dimère de de BRAF^{KD} « activatrices » interviendrait alors pour phosphoryler MEK1 sur ces résidus sérine (lettre P entourée).

Néanmoins, ce modèle ne tient pas compte de plusieurs observations. Les protéines KSR ont une forte affinité pour les kinases MEK, comparativement à l’interaction RAF/MEK. L’interaction KSR2^{KD}/MEK1^{KD} est de ce fait, stable et peu dissociable (Roy et al., 2002). Le mode d’interaction « côte-à-côte » de BRAF et KSR2 ne semble pas suffisant pour provoquer un changement conformationnel suffisant pour libérer la boucle d’activation de MEK1. Il serait donc peu probable que BRAF^{KD} seule puisse induire un déplacement de la boucle d’activation de MEK1^{KD} alors qu’elle est déjà engagée et stabilisée par KSR2^{KD}. Une compréhension approfondie de ces interactions est donc nécessaire pour proposer un modèle plus en adéquation avec les données de la littérature. Les enjeux liés à la compréhension de ce complexe de signalisation est d’autant plus

important que la structure protéique des kinases a permis de faire le lien entre des dysfonctionnement de la voie RAS-ERK et la survenue de maladies.

1.5 Implication de la structure des protéines RAF en pathologie humaine

1.5.1 Les Rasopathies : des maladies génétiques liées à RAF

Des mutations de la voie RAS-ERK sont retrouvées fréquemment dans un ensemble de maladies génétiques dénommées « Rasopathies ». Il s'agit de mutations germinales qui provoquent des syndromes développementaux caractéristiques, tels que les syndromes de Noonan, de Costello, de type CFC (de *C*ardio-*F*acio-*C*utaneous) ou de type LEOPARD (acronyme résumant l'ensemble des signes cliniques du syndrome : *m*ultiple *L*entigines, *E*lectrocardiographic *c*onduction *a*bnormalities, *O*cular *h*ypertelorism, *P*ulmonary *s*tenosis, *A*bnormal *g*enitalia, *R*etardation of *g*rowth, *s*ensorineural *D*eafness) (Aoki et al., 2008). La plupart de ces mutations sont associées à une stimulation excessive de la voie RAS-ERK (Rauen et al., 2013). L'excès de stimulation de la signalisation RAS-ERK induirait, entre autres, une insensibilité partielle aux facteurs de croissance et serait responsable de troubles du développement (Malaquias and Jorge, 2020). La sévérité du phénotype observé chez les patients est corrélée à la position de la protéine mutée au sein de la cascade RAS-ERK. L'augmentation de signal est directement causée par des mutations de type « gain-de-fonction ». Parmi les kinases RAF celles qui affectent l'isoforme BRAF sont plus souvent associées au syndrome CFC (Niihori et al., 2006; Rodriguez-Viciano et al., 2006) alors que celles de l'isoforme CRAF sont plus fréquemment observées dans les syndromes de Noonan ou LEOPARD (Kobayashi et al., 2010; Pandit et al., 2007; Razzaque et al., 2007).

Les mutations pathologiques sont principalement localisées au niveau du domaine kinase dans BRAF et dans CRAF, conduisant ainsi à une augmentation de l'activité catalytique. Comme pour les cancers, certaines mutations de CRAF abolissent la fonction de la kinase, mais favorisent sa dimérisation avec BRAF, provoquant l'activation de la voie RAS-ERK (Wu et al., 2012). Par ailleurs, des mutations de CRAF se retrouvent en cluster au niveau du site *N*-terminal de liaison aux protéines 14-3-3, perturbant leur ancrage et leur fonction inhibitrice, ce qui constitue un autre mécanisme d'hyperactivation de la kinase (Molzan et al., 2010). Ces deux « hotspots » de mutations sont uniquement présents dans les isoformes CRAF et BRAF. Les formes mutées de

BRAF et CRAF se lient moins efficacement aux protéines 14-3-3 conduisant à des kinases déréprimées (Molzan et al., 2010)

Il existe un autre site de mutations de BRAF au niveau de son domaine CRD (Rodriguez-Viciano et al., 2006). Bien qu'éloigné d'une centaine de résidus du site d'ancrage des protéines 14-3-3, ces mutations du CRD déstabilisent la structure auto-inhibée de BRAF, favorisant la dissociation NTR/KD, l'ancrage membranaire du CRD (Spencer-Smith et al., 2021) et la dissociation des 14-3-3. Il a également été observé que certains patients atteints de Rasopathie, en particulier ceux ayant le syndrome de Costello, développaient des prédispositions à certains cancers tels que les neuroblastomes ou les carcinomes des voies urinaires (Niihori et al., 2006). Ces patients sont également plus à risque de développer des cancers infantiles (Tidyman and Rauen, 2016). Les mutations causant les Rasopathies surviennent précocement au cours du développement embryonnaire alors que la majorité des mutations des composants de la voie RAS-ERK ont été mises en lien avec des formes de cancers chez l'adulte et surviennent plus tardivement au cours de la vie.

1.5.2 Cancers et mutations ponctuelles des kinases RAF

Les kinases RAF sont sujettes à un nombre important de mutations dans le contexte de l'oncogenèse. *BRAF* est muté dans près de 7 % de tous les cancers (Davies et al., 2002) avec une fréquence de mutations particulièrement élevée dans les mélanomes, les cancers colorectaux, ovariens et thyroïdiens (Fransén et al., 2004; Santarpia et al., 2012). Dans certains cas plus rares, le gène *BRAF* peut subir des événements de délétion génique ou s'hybrider avec un autre gène aboutissant à des protéines BRAF tronquées ou fusionnées. La fusion *KIAA1549:BRAF* en est le meilleur exemple et est retrouvée dans 80 % des astrocytomes pylocytiques, de rares tumeurs de l'enfant peu infiltrantes et de croissance lente (Jones et al., 2012). Dans ces formes, la protéine BRAF fusionnée est dépourvue de sa NTR auto-inhibitrice et seul le domaine KD est présent. Ces fusions de BRAF sont activatrices, démontrant l'importance de la régulation par la NTR (Ross et al., 2016).

1.5.2.1 Les mutants de BRAF de type « kinase-dead »

La majorité des altérations géniques de *BRAF* est cependant représentée par des mutations ponctuelles, notamment des substitutions. Les mutations ponctuelles de BRAF ont été classées

selon les éléments structuraux affectés (tels que le motif DFG ou l'hélice AS-H1) et les conséquences de ces mutations sur l'activité enzymatique de BRAF. Ainsi, des mutants de BRAF sans activité catalytique dits « kinase-dead » sont toujours capables de stimuler l'activité catalytique de CRAF par hétéro-dimérisation. Lorsque ce phénomène survient en concomitance de mutations activatrices des protéines RAS, l'activation incontrôlée des protéines RAS potentialise la dimérisation des mutants BRAF « kinase-dead », favorisant l'apparition de tumeurs (Heidorn et al., 2010; Wan et al., 2004). L'interface de dimérisation de cette forme de BRAF est intacte et lui permet de transactiver CRAF en réponse à la stimulation des protéines RAS (Freeman et al., 2013a). Un phénomène de transactivation similaire de BRAF par une kinase CRAF catalytiquement inactive a également été retrouvé chez des patients atteints du syndrome de Noonan (Wu et al., 2012).

1.5.2.2 Les mutations activatrices : l'exemple de BRAF^{V600E}

Environ 98 % des mutations de BRAF sont localisées au niveau de la boucle d'activation de son domaine KD (Forbes et al., 2011). En particulier, les substitutions de type « gain de fonction », qui rendent BRAF constitutivement active, se concentrent au niveau de l'hélice AS-H1 à l'extrémité *N*-terminale de la boucle d'activation (Haling et al., 2014). En réarrangeant certains ponts salins et des liaisons hydrogènes, ces mutations imitent l'environnement provoqué par la double phosphorylation des résidus Thr-599 et Ser-602 (**pTVKpS**) et favorisent la conformation active dimérique de BRAF.

Une autre forme d'activation pathogène provient de la substitution *V600E* dans *BRAF*, où un résidu glutamate remplace la valine en position 600. Elle est présente dans plus de 60 % des mélanomes, ainsi que dans les cancers thyroïdiens ou certains cancers du poumon et représente plus de 97 % de toutes les mutations de BRAF (Greenman et al., 2007). Au cours de la formation des mélanomes, *BRAF^{V600E}* est une mutation fondatrice qui s'acquiert précocement, puisque qu'elle est présente dans les nævi précancéreux atypiques et dans près de 80 % des nevi dont l'apparence clinique n'a pas évolué pendant plusieurs années. La mutation stimule la formation de ces nævi et active la senescence des mélanocytes (Michaloglou et al., 2005; Pollock et al., 2003). Elle participe par la suite, à la progression des mélanomes lorsque l'étape de sénescence est dépassée et que la prolifération cellulaire reprend (Dhomen et al., 2009). La mutation seule ne provoque pas la survenue de mélanomes, mais nécessite la stimulation complémentaire de l'activité PI3K/AKT

(Silva et al., 2014). Les cellules tumorales porteuses de mutations de BRAF telles que la *V600E*, deviennent dépendantes à la signalisation RAS-ERK, contrairement aux cellules saines. D'un point de vue structural, la mutation *V600E* provoque un phénomène unique : contrairement à sa forme sauvage, la protéine BRAF^{V600E} adopte une conformation monomérique dans sa forme active (Röring et al., 2012). Son activité catalytique est indépendante de l'activation des protéines RAS en amont. BRAF^{V600E} ne nécessite plus la dimérisation pour activer MEK (Karoulia et al., 2017).

1.5.2.3 Les mutations de CRAF et d'ARAF

De façon intrigante, il existe peu de mutations correspondantes à celles de BRAF dans ARAF ou CRAF. Les mutations activatrices de ces isoformes sont exceptionnelles, et doivent généralement être au moins deux pour rendre la kinase constitutivement active (Dhomen and Marais, 2007). Par exemple, dans ARAF, une seule occurrence de mutation ponctuelle transformante a été rapportée (Imielinski et al., 2014). Contrairement à la majorité des mutations de BRAF, les mutants de ARAF et CRAF ont une activité kinase moins importante en raison de la différente composition en acides aminés de leurs NtA (voir section 1.4.1.3.2). L'activité basale de BRAF est donc plus élevée que CRAF et ARAF (Emuss et al., 2005; Fransén et al., 2004).

Comme pour BRAF, il existe des fusions des KD de ARAF (Diamond et al., 2016; Li et al., 2019) et des KD de CRAF (Jain et al., 2017). De manière générale, BRAF est une cible plus fréquente des mutations pathogènes, du fait de son activité basale plus élevée et parce qu'elle requiert moins de modifications post-traductionnelles pour être activée. En cas de mutation, BRAF est donc plus susceptible d'induire une activation oncogénique. Ces mécanismes d'activation ont notamment pu être mis en évidence lors du développement d'inhibiteurs thérapeutiques de RAF. L'utilisation de ces composés a mis à jour des événements inattendus tels que le phénomène d'activation paradoxale (**voir p. 69**) (Hatzivassiliou et al., 2010; Heidorn et al., 2010; Poulidakos et al., 2010).

1.5.3 Les inhibiteurs de la voie RAS-ERK

1.5.3.1 Généralités

Plusieurs niveaux de la voie RAS-ERK ont été explorés comme cibles potentielles dans le cadre du développement de molécules inhibitrices antiprolifératives, pouvant être utilisées dans le traitement de cancers tels que les mélanomes. (Yaeger and Corcoran, 2019). Les protéines RAS ont longtemps représenté la cible principale pour le développement de ces inhibiteurs en raison de leur position d'amont dans la voie RAS-ERK. Diverses stratégies ont successivement été utilisées pour cibler les différents mécanismes d'activation connus de ces protéines (Papke and Der, 2017). Ainsi, des molécules ont été développées ciblant le transfert du groupement farnésyl permettant aux protéines RAS d'être insérées dans la bicouche lipidique des membranes cellulaires. Cependant, en présence de ces inhibiteurs, un phénomène compensatoire de prénylation se développe, faisant en sorte que ces molécules deviennent inopérantes voire stimulatrices, à cause de l'ancrage membranaire constitutif de KRAS et NRAS (Fiordalisi et al., 2003). La compréhension de plus en plus en fine de la structure des mutants de l'isoforme KRAS, l'oncogène le plus fréquent de la voie, a récemment permis le développement d'inhibiteurs efficaces et prometteurs (Canon et al., 2019; Janes et al., 2018). Cependant, en se basant sur les observations antérieures, plusieurs auteurs prévoient déjà la survenue de résistances à ces inhibiteurs lors de leur administration prolongée aux patients (Moore and Malek, 2021). Comme pour les protéines RAS, les cibles des inhibiteurs et leurs mécanismes d'action ont évolué au fur et à mesure que la structure et la régulation des protéines RAF se sont précisées (Heppner and Eck, 2021).

Ces phénomènes de résistance avec mécanismes compensatoires ont mis un frein à de nombreuses études expérimentales et cliniques ciblant l'inhibition de la voie RAS-ERK. Lors du développement d'inhibiteurs ciblant les kinases RAF, des effets cliniques inattendus ont en particulier contrecarré la mise au point de stratégies thérapeutiques. Seuls quelques éléments clés de ces modes d'inhibition sont présentés ici, en particulier ceux qui ont mis en lumière des aspects insoupçonnés de la régulation de ces kinases, tels que les propriétés activatrices de certains inhibiteurs (pour revues : Hymowitz and Malek, 2018; Karoulia et al., 2017; Kidger et al., 2018).

1.5.3.2 Inhibition du mutant BRAF^{V600E}

Les premiers inhibiteurs développés contre les kinases RAF ont eu pour but de cibler la forme BRAF^{V600E} monomérique du fait de sa prévalence chez les patients, notamment ceux atteints de mélanomes. Différents mécanismes d'inhibition ont été envisagés dans ce contexte pathologique. Certains inhibiteurs ont été développés pour entrer en compétition avec l'ATP au niveau du site actif de la kinase : ils sont dits « ATP-compétitifs ». Seuls trois inhibiteurs de RAF ont reçu l'approbation de la FDA (*Food and Drug Administration*) pour le traitement des patients atteints de mélanome provoqué par le mutant BRAF^{V600E} (Hauschild et al., 2012). Parmi eux, le Vemurafenib (de *V600E mutant of RAF inhibitor*) produit une réponse clinique initiale favorable chez plus de 70 % des patients.

Le mécanisme d'action de cet inhibiteur repose sur sa capacité de se fixer au niveau du KD de BRAF afin de bloquer la kinase dans sa forme inactive, avec l'hélice α C en position « OUT ». Cette spécificité est théoriquement idéale pour une utilisation thérapeutique (Wang and Kim, 2012). Du point de vue mécanistique, la fixation de l'inhibiteur est favorisée par, l'absence d'activité RAS en amont dans la voie RAS/ERK dans les mélanomes métastatiques porteurs de la mutation *BRAFV600E*. Dans ces conditions, la protéine BRAF^{V600E} est principalement monomérique et est fortement inhibée par le Vemurafenib. Dans la forme sauvage au contraire, suite à l'activation de RAS, l'hélice α C du KD de BRAF est bloquée dans sa position « IN » lors de la dimérisation ce qui empêche la fixation des molécules inhibitrices. Malgré les résultats encourageants en début d'administration, la majorité des patients développe des résistances avec apparition de cancers secondaires métastatiques, majoritairement au niveau du système nerveux central, souvent mortels après 6 mois de traitement (Sosman et al., 2012).

1.5.3.3 L'activation paradoxale

Bien qu'elle soit efficace dans les cellules cancéreuses BRAF^{V600E}, la fixation des inhibiteurs sur le KD induit la dimérisation de la kinase sauvage dans les cellules où l'activité des protéines RAS est fortement stimulée. Ces inhibiteurs de RAF ont ainsi la capacité d'activer la voie RAS-ERK par un phénomène baptisé « activation paradoxale ». À une concentration thérapeutique cliniquement tolérable, une molécule d'inhibiteur ne s'associe qu'à un seul protomère des dimères BRAF/BRAF ou BRAF/CRAF. Le protomère inactivé est toujours capable de dimériser, permettant la transactivation allostérique de l'autre protomère après changement conformationnel,

activant ainsi la voie RAS-ERK. Seules des doses d'inhibiteur dépassant le seuil de toxicité peuvent bloquer simultanément les deux protomères de kinases RAF (Hatzivassiliou et al., 2010; Heidorn et al., 2010; Poulikakos et al., 2010). La liaison d'une molécule inhibitrice induit une rigidification du protomère dans sa forme fermée, et dévoile l'interface de dimérisation (Lavoie et al., 2013). À partir de ces observations, une deuxième génération d'inhibiteurs a vu le jour, basée sur leur capacité de « casser » les dimères issus de l'activation paradoxale (« paradox breakers ») (Yu et al., 2015).

Une kinase BRAF « kinase-dead » et une kinase BRAF liée à une molécule inhibitrice ont en commun la capacité à activer un autre protomère par transactivation (**Figure 10**) ce qui tend à confirmer le postulat qu'il existe au sein d'un dimère de kinases RAF, une kinase « activatrice » et une kinase « réceptrice » (Hu et al., 2013).

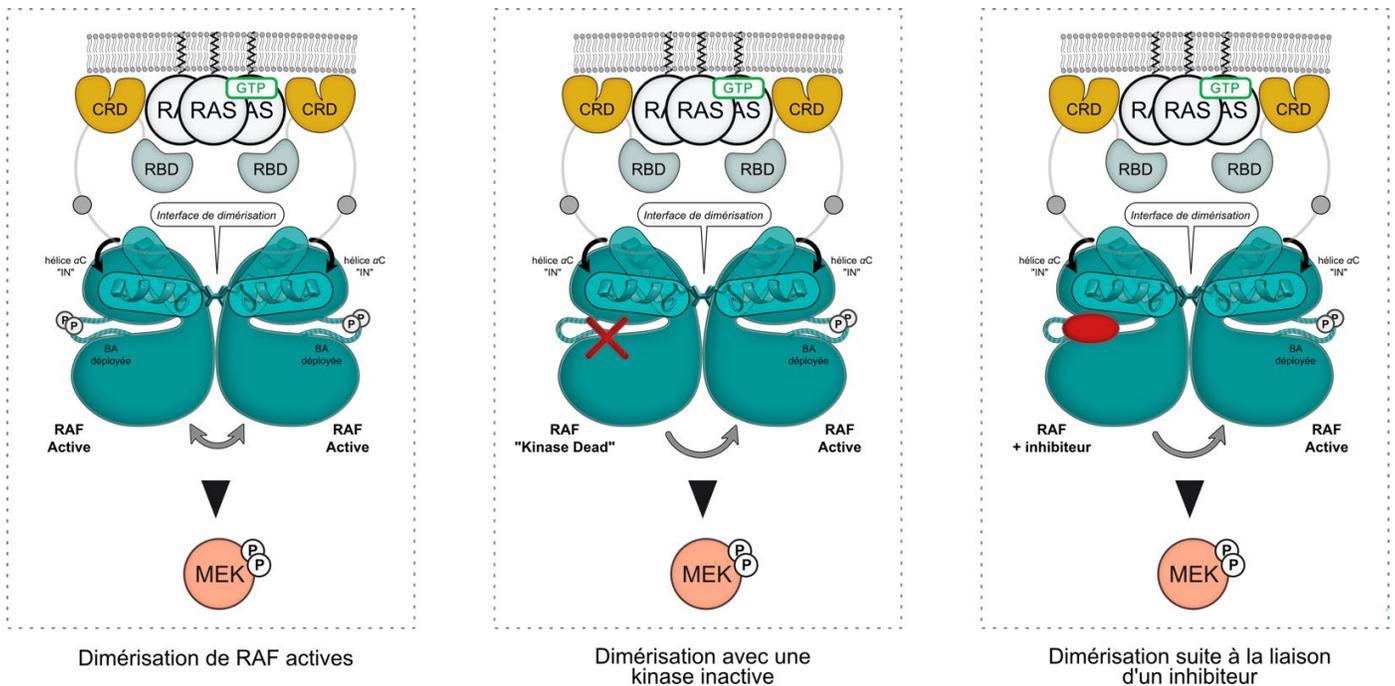


Figure 10 – Le rôle central de la dimérisation dans l'activation des kinases RAF.

Dans sa forme sauvage (à gauche), la dimérisation de la kinase RAF dépend notamment du mouvement de son hélice αC dont la position est directement liée à la capacité des kinases à dimériser. Des mutants « kinase-dead » ayant perdu leur activité catalytique ont toujours la capacité d'activer un autre protomère de RAF sauvage (milieu). La liaison d'une molécule inhibitrice sur une protomère sauvage provoque également un phénomène d'activation.

GTP : *Guanosine TriPhosphate*, *RBD*: *Ras-Binding Domain*, *CRD*: *Cysteine-Rich Domain*, *14-3-3*: *proteins 14-3-3*, *MEK*: *MAPK/ERK Kinase*, *BA*: *Boucle d'Activation*, *P*: *site de phosphorylation*.

En plus de leur action au niveau des dimères de kinases RAF, les inhibiteurs de première génération induisent également la formation du dimère BRAF/KSR1 (McKay, Ritt, et al., 2011). Dans un contexte oncogénique il a ainsi été proposé de stimuler la formation du dimère BRAF/KSR1 aux dépens du dimère BRAF/CRAF, dans le but de séquestrer BRAF et de diminuer le phénomène de l'activation paradoxale, avec des niveaux KSR1 stoechiométriquement favorables (McKay, Freeman, et al., 2011).

1.6 Problématique et objectifs de la thèse

L'étude de la régulation de la signalisation RAS-ERK a dévoilé la complexité de cette voie de signalisation et montré que certains mécanismes modulant son activation demeurent méconnus. La longue liste des échecs thérapeutiques des inhibiteurs de la voie RAS-ERK justifie la poursuite d'une exploration approfondie des mécanismes moléculaires mis en jeu lors des phénomènes d'oncogenèse. Ces revers ont néanmoins grandement contribué à la compréhension des mécanismes de régulation de la voie physiologique et à l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles dans le cadre du traitement des cancers.

Dans des cellules saines non mutées, la liaison d'une molécule inhibitrice à BRAF^{WT} favorise la formation du dimère BRAF/CRAF au sein duquel, bien qu'inhibée, BRAF^{WT} devient un transactivateur plus efficace pour CRAF (Lavoie et al., 2013). De façon similaire, des formes mutées de BRAF qui abrogent son activité catalytique conduisent à des dimères CRAF/BRAF constitutivement liés, provoquant une activation dérégulée de la voie RAS-ERK (Heidorn et al., 2010). La dimérisation des kinases RAF est apparue comme un des aspects centraux des mécanismes d'évasion et de résistance des cancers lors de leur inhibition par des traitement chimiothérapeutiques (Poulikakos et al., 2011). La compréhension des éléments qui régulent la formation de dimères spécifiques est notamment devenue un axe primordial dans le développement des inhibiteurs de RAF efficaces (Zhang et al., 2015).

Dans ce contexte, le rôle fonctionnel des protéines KSR dans la voie de signalisation RAS physiologique et pathologique est apparue comme un élément essentiel à comprendre.

Chez la drosophile, KSR est un partenaire d'interaction de RAF essentiel à la signalisation RAS-ERK et la délétion de son unique isoforme est létale (Therrien et al., 1995). En plus de s'associer à la majorité des composants de la voie RAS-ERK et d'influencer la transmission du signal, chez l'humain, les pseudokinases KSR pourraient moduler la transformation cancéreuse des cellules porteuses d'une mutation oncogénique de RAS (Kortum et al., 2006) Elles sont évolutivement proches de kinases RAF, forment des dimères KSR/RAF et ont la particularité d'être constitutivement associées aux protéines MEK (Cacace et al., 1999). Au sein des dimères RAF/KSR, les protéines KSR sont des transactivateurs allostériques permettant aux kinases RAF d'être activées et de phosphoryler leur substrat MEK (Rajakulendran et al., 2009).

En dépit de ces avancées scientifiques, les mécanismes permettant aux dimères RAF/KSR de phosphoryler les protéines MEK restent difficile à cerner, notamment en raison de la pluralité des isoformes de KSR et de RAF. Ce travail de thèse s'est focalisé sur la formation du dimère particulier BRAF/KSR1 notamment sur l'hypothèse qu'il existe des éléments structuraux et régulateurs régissant sa formation. Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés aux mécanismes permettant aux protéines MEK de se lier avec plus d'affinité aux protéines KSR plutôt qu'aux kinases RAF. Pour cela, nous avons étudié les interactions des domaines kinases de MEK1, BRAF, CRAF et KSR1 afin de déterminer les éléments structuraux permettant à MEK1 de discriminer ses partenaires d'interaction.

Dans un second temps, nous avons cherché à identifier les domaines permettant à BRAF et à KSR1 d'interagir spécifiquement. Pour cela, nous avons analysé les régions *N*-terminales respectives de BRAF et KSR1 afin de délimiter les interfaces d'interaction de ces deux protéines. Nous avons par la suite mené un crible visant à moduler cette interaction pour comprendre le rôle des autres domaines présents dans les NTRs. En parallèle, nous avons exploré plusieurs approches expérimentales pour obtenir des données structurales sur le dimère BRAF/KSR1 seul, ou au sein d'un complexe multiprotéique.

Les résultats des travaux expérimentaux sont détaillés ci-après ; certains d'entre eux ont été inclus dans un article publié et joint en annexe (Lavoie et al., 2018).

Chapitre 2 : Matériel et méthodes

2.1 Lignées cellulaires et transfection

Toutes les expériences en cellule de mammifère ont été réalisées dans la lignée 293T (Sigma-Aldrich; cat. number 12022001-1VL). Les cellules ont été cultivées à 37 °C avec 5 % de CO₂ dans du milieu DMEM (Sigma-Aldrich) contenant du glucose, du pyruvate et de la L-glutamine additionné de 5 % de sérum bovin fœtal (FBS) (Wisent). Les cellules ont été régulièrement testées pour évaluer leur éventuelle contamination par des mycoplasmes et maintenues par passage bi-hebdomadaire lorsque la confluence atteignait 80 %. Pour les expériences de surexpression et de co-IP, les cellules ont étéensemencées à une confluence de 10 % dans des boîtes 15 mm ou 10 mm et transfectées le lendemain en utilisant du polyéthylèneimine (PEI) à 25 µg/mL (Boussif et al., 1995).

2.2 Génération des plasmides d'expression

2.2.1 Étapes du clonage

Pour l'essai de double-hybride, les ADN codant pour formes tronquées des protéines KSR1, BRAF ou CRAF ont été clonées sous forme de fusions avec l'ADN complémentaire (ADNc) codant pour le domaine d'activation (GAL4_AD) ou celui de liaison à l'ADN (GAL4_BD) de GAL4 dans les vecteurs pGAD-T7 ou pGBK-T7 (Clontech). Pour les essais de surexpression et de co-IP en cellules 293T, les ADNc des protéines BRAF, CRAF, KSR1 ou MEK1 ont été intégrés au plasmide d'expression pcDNA 3.1-hygro (Invitrogen). Pour la purification de protéines, des fragments géniques ont été insérés dans les plasmides pGEX-4T1, pProEX-HTA ou pET2.a (voir Tableau XX pour consulter la liste des constructions).

Les constructions ont été générées par clonage classique, mutagenèse dirigée et PCR ou par sous-clonage à partir d'autres vecteurs d'expression existants dans le laboratoire. Pour toutes les manipulations de plasmides en cellules bactériennes (clonage, mutagenèse dirigée, amplification plasmidique, etc.), la souche DH5α a été utilisée. Ces bactéries ont été rendues chimiocompétentes par la technique du chlorure de calcium (Sambrook and Russell, 2006) puis transformées par un choc thermique de 45 secondes. Les cellules ont ensuite été resuspendues à 37 °C en milieu *Lysogeny Broth* (LB; 25 g/L) liquide pendant 1 h puis étalées sur des boîtes de Pétri comprenant la

sélection appropriée sur la nuit à 37 °C. Le lendemain, des clones bactériens ayant intégré les plasmides ont été sélectionnés et amplifiés. Les plasmides porteurs des mutations ont été extraits des bactéries par lyse chimique (QiaGEN) et séquencés par la technique de Sanger à la plateforme de séquençage à haut débit de l'Institut de Recherche en Cancérologie et Immunologie (IRIC) de l'Université de Montréal.

2.2.2 Clonage classique

Pour chaque construction, la séquence d'intérêt a d'abord été amplifiée par PCR avec la polymérase Q5 (New England Biolabs). Les amorces ont été désignées à l'aide du logiciel CloneManager © et de façon à contenir les sites de restriction adéquats pour l'intégration dans le plasmide de destination.

2.2.3 Mutagenèse dirigée

L'introduction de mutations ponctuelles a été réalisée en utilisant la technique de mutagenèse dirigée sur des matrices sauvages dans les plasmides précédemment décrits. Cette mutagenèse a été réalisée en utilisant des amorces conçues en respectant les indications du protocole QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent). La mutagenèse a été effectuée grâce à la polymérase Q5 (New England Biolabs) et le cycle de PCR associé. Les produits de PCR ont par la suite été digérés par l'enzyme DpnI pendant 1 h afin d'en éliminer le plasmide matrice. Après digestion, les plasmides ont ensuite été transformés dans des bactéries DH5alpha chimio-compétentes pour amplification.

2.2.4 Technique de Gibson

Des plasmides d'expression pour cellules d'insectes permettant la co-expression de plusieurs protéines d'un même complexe de signalisation ont été générés (Weissmann et al., 2016) Pour produire les plasmides, les gènes d'intérêt ont d'abord été intégrés dans le plasmide pLIB par clonage classique pour doter chaque gène individuel d'un promoteur et d'un terminateur. Ces séquences (promoteur + gène + terminateur) ont ensuite été amplifiées par PCR avec des oligonucléotides porteurs de bras d'homologies spécifiques. Les différentes séquences ont ensuite été assemblées en un seul plasmide polygénique dans le vecteur pBIGBAC1a grâce à une version optimisée de la technique de Gibson. Les bras d'homologies ont permis de réaliser cet assemblage

en une seule étape en excluant la possibilité d'insérer plusieurs fois le même fragment (Weissmann and Peters, 2018).

2.3 Mesure des interactions protéiques

2.3.1 Co-immunoprécipitation et Western Blot

Après transfection au PEI, les cellules 293T ont été incubées pendant 72 h à 37 °C. Pour préparer les lysats cellulaires, les cellules ont d'abord été lavées dans du tampon phosphate salin froid (PBS) puis lysées par ajout de 1 mL de tampon de lyse froid (Triton 0,2 %, 20 mM Tris à pH 8,0, 137 mM NaCl, 2 mM EDTA, cocktail d'inhibiteurs de phosphatases 1X (Sigma-Aldrich), 1 mM de vanadate de sodium, 20 µM leupeptine, aprotinine (0,15 U/ml) et 1 mM de fluorure de phenylmethylsulfonyl (PMSF)). Les cellules en cours de lyse ont été incubées pendant 10 min à 4 °C avec agitation, puis centrifugées à 14000 x g, à 4 °C pendant 10 min pour éliminer les débris cellulaires. Les lysats ont ensuite été quantifiés par la technique de Bradford et pour chaque condition, l'équivalent de 100 µg de protéines ont été maintenus dans la glace pour la suite de l'expérience. Pour la co-immunoprécipitation, des anticorps primaires ont été ajoutés au restant des lysats et incubés pendant 2h à 4°C. Des billes d'agarose enrobées de protéines A/G (Calbiochem) ont ensuite été ajoutées sous rotation à 4 °C pendant 1 h additionnelle. Les protéines immunoprécipitées ont ensuite été lavées à trois reprises avec du tampon de lyse froid. Les lysats et les co-IP ont ensuite été bouillis pendant 5 min dans du tampon de charge Laemmli 5X.

Les protéines des lysats et les protéines immunoprécipitées ont ensuite été séparées par électrophorèse SDS-PAGE (gels de 7 %, 8 % ou 10 %), puis transférées du gel sur des membranes de nitrocellulose (Pall Corporation) ou de PVDF (GE Healthcare) pendant 1h. Les membranes ont été rincées à l'eau distillée, colorées temporairement au rouge Ponceau puis découpées selon le poids moléculaire attendu des protéines. Les membranes ont ensuite été incubées 1h dans du tampon Tris salin (TBS) additionné de 5 % de lait à température ambiante sous agitation. Les anticorps primaires appropriés préalablement dilués dans du TBS + 0,2 % Tween ont été ajoutés aux membranes correspondantes et incubés pendant la nuit à 4 °C sous agitation. Le lendemain, les membranes ont été lavées trois fois pendant 5 min avec agitation dans du TBS + 0,2 % Tween puis incubées 2 h à température ambiante et sous agitation avec les anticorps secondaires appropriés

dilués dans du TBS + 0,2 % Tween. Les protéines ont été détectées par chimioluminescence après incubation avec de l'ECL préparé dans le laboratoire.

Des lysats ou des protéines purifiées ont également été analysés sur gel de polyacrylamide après marquage au SilverStain ou au bleu de Coomassie suivant les protocoles précédemment établis (Walker et al., 2009). Les échantillons envoyés en spectrométrie de masse ont été directement extraits des gels de polyacrylamide.

Tableau 1 – Anticorps utilisés lors des expériences.

Anticorps	Dilution	Source	Numéro de catalogue
Phospho-MEK	1/1000	Cell Signaling Technology	9121
MEK1/2	1/1000	Cell Signaling Technology	9122
Phospho-ERK	1/2000	Sigma-Aldrich	M8159
ERK1/2	1/2000	Cell Signaling Technology	4695
BRAF	1/2000	Santa Cruz	sc-9002
CRAF	1/2000	BD-Millipore	610152
KSR1	1/2000	Abcam	ab68483
MEK1	1/2000	BD-Millipore	610121
Ras	1/2000	Abcam	ab108602
HSP90	1/2000	New England Biolabs	4877
CDC37	1/2000	Santa Cruz	sc-13129
pan-14-3-3	1/2000	Cell Signaling Technology	8312
Flag M2	1/50000	Sigma-Aldrich	F1804
Myc (9G10)	1/10	Surnageant (Hybridome)	N/A
Pyo	1/10	Surnageant (Hybridome)	N/A

Les anticorps secondaires conjugués à l'enzyme HRP (*Horseradish Peroxidase*), ont été utilisés pour reconnaître les anticorps primaires listés dans le tableau ci-dessus : l'anticorps anti-souris-HRP (Jackson Immunoresearch Labs; 115-035-146 ou 115-035-174); Dilution 1/10000 et l'anticorps anti-lapin-HRP (Jackson Immunoresearch Labs; 111-035-144); Dilution 1/20000.

2.3.2 Essai de double-hybride en levure (Y2H)

2.3.2.1 Principe

L'essai Y2H évalue l'interaction entre deux protéines grâce à la reconstitution du facteur de transcription GAL4. Des hybrides sont donc générés par génie génétique. Une protéine d'intérêt A est fusionnée au domaine d'activation de GAL 4 (*GAL4 Activation Domain* ; GAL4_AD par clonage de son ADNc dans le plasmide pGADT7. La protéine B est quant à elle fusionnée au domaine de liaison à l'ADN de GAL4 (*GAL4 Binding Domain* ; GAL4_BD) par clonage de son ADNc dans le vecteur pGBKT7. La souche de levures *Saccharomyces cerevisiae* PJ69 (James et al., 1996) est auxotrophe aux acides aminés suivants : tryptophane, leucine, histidine, adénine et uracile. Des levures haploïdes de type sexuel différent ont été transformées par chacune des constructions: les plasmides pGADT7 porteurs du marqueur de sélection *leu2* (L) dans la souche PJ69-4a et les plasmides pGBKT7 porteurs du gène *trp1* (T) dans PJ69-4a. Après croisement des levures sur milieu riche YPD (1 % d'extrait de levure, 2 % de peptone, 2 % de dextrose), les cellules diploïdes résultantes possèdent les deux plasmides et sont donc sélectionnées sur du milieu *Synthetic Dextrose* (0,67 % de « Yeast Nitrogen Base », 2 % de glucose, mix « Drop-out » d'acides aminés appropriés) ici dépourvu de T et de L (SD-TL). Après expression et interaction, la reconstitution de GAL4 active la transcription de gènes permettant la survie des levures auxotrophes. En l'absence de l'un ou l'autre de ses domaines, GAL4 ne peut pas induire seul la transcription. Pour évaluer le degré d'interaction des deux protéines, les gènes *his3* et *ade2* sont utilisés comme rapporteurs mis sous le contrôle de deux promoteurs différents pouvant chacun être activé par GAL4. Grâce à des milieux appropriés (SD-TLH et SD-TLA), on peut donc aisément corréler la force de l'interaction protéique avec la croissance de levures.

La croissance des levures diploïdes après croisements des levures haploïdes ayant incorporés les plasmides d'intérêt est analysée sur les milieux sélectifs. Des levures comportant des plasmides vides n'exprimant que le domaine d'activation (*Activation Domain, AD*) ou seulement le domaine de liaison à l'ADN (*Binding Domain, BD*) de GAL4 ont également été croisées et ont été utilisées comme contrôles négatifs des expériences de Y2H. Ainsi, les interactions de MEK1 avec BRAF, CRAF ou KSR1 ont été validées par la croissance des levures diploïdes sur milieux sélectifs comparativement aux conditions contrôles (données non présentées). Lors des cribles, une des

protéines fusionnées à GAL4 sert « d'appât » (par exemple : KSR1^{NTR}) vis-à-vis d'une collection de mutants « proies » (par exemple : les mutants de BRAF^{NTR}).

2.3.2.2 Transformation et croisement de levures PJ69

Les levures ont été préalablement cultivées en milieu riche YPD à 30 °C pendant la nuit. Elles ont ensuite été lavées avec de l'eau stérile puis centrifugées à 4000 rpm. Le culot a été resuspendu dans du PEG 3500 (50 %), de l'acétate de lithium (1.0 M) et de l'ADN de hareng (2 mg/mL). Après homogénéisation, 100 µL de ce mélange ont été ajoutés à 10 µL d'ADN plasmidique (1 ng/µL). Les levures ont ensuite subi un choc thermique de 42 °C pendant 1 h. Après dilution dans 100 µL d'eau stérile, 50 µL de culture de levures ont été étalés sur des milieux sélectifs puis incubés pendant 3 jours à 30 °C. Les milieux de sélection suivants ont été utilisés : SD-L (-Leu) et SD-T (-Trp). Pour chaque condition, une colonie de levure a été repiquée, striée sur une nouvelle boîte de sélection et incubée 48 h à 30 °C. À partir de la strie, une « ligne » de levures a étéensemencée sur une nouvelle boîte de sélection et incubée 48 h à 30 °C. Des velours autoclavés ont ensuite été utilisés pour créer un quadrillage de croisement sur milieu YPD en conditions stériles. Les boîtes YPD ont été incubées entre 24 h à 30 °C. Le lendemain, les velours ont été utilisés pour réaliser des empreintes des boîtes YPD sur les boîtes de sélection SD-TL (-Trp, -Leu) et sur les milieux d'interaction SD-TLH (-Trp, -Leu, -His) et SD-TLA (-Trp, -Leu, -Ade). Les levures ont été incubées entre 48 h et 72 h à 30 °C. La présence ou non d'une interaction protéique a été visualisée sur les milieux SD-TLH et SD-TLA au niveau des jonctions des lignes du quadrillage. Pour confirmer ces résultats, la croissance des diploïdes a été réévaluée par « Spot Assay ». Un échantillon des levures diploïdes obtenues a été transféré dans un milieu sélectif SD-TL liquide et cultivé 48 h à 30 °C avec agitation. Les levures ont ensuite été culotées et lavées trois fois avec de l'eau stérile. Une concentration identique de levures mesurée a été isolée pour chaque condition (Seidel et al., 2000) puis diluée par un facteur 10, 100 puis 1000 etensemencées sur des boîtes SD-TL, SD-TLH et SD-TLA. Les figures ont été réalisées à l'aide du logiciel SPOT Advanced™, Adobe Illustrator® et Affinity Designer® (**Figure 11**).

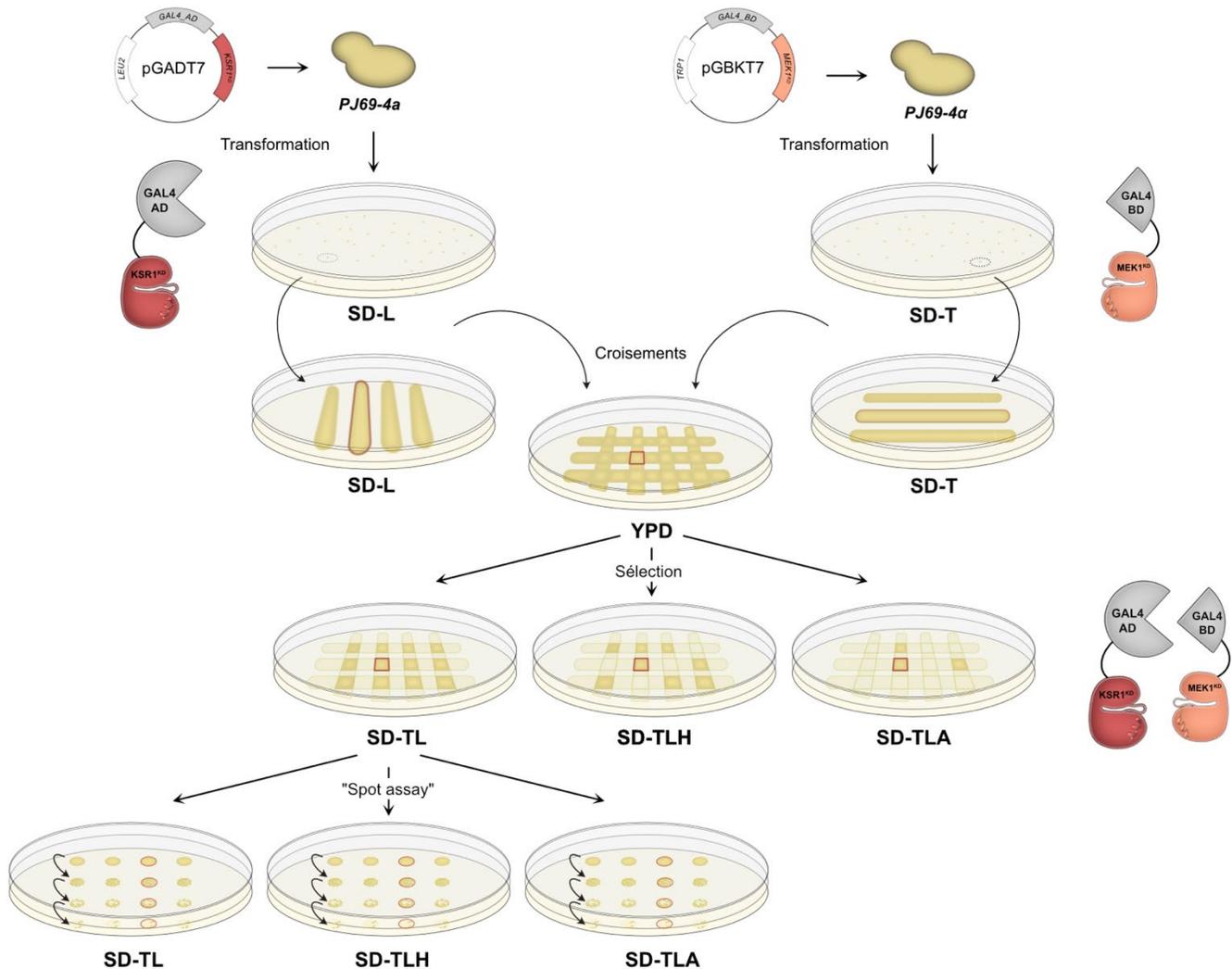


Figure 11 – Principe du Y2H : exemple de l'interaction KSR1^{KD}/MEK1^{KD}.

Le plasmide pGADT7-KSR1^{KD} porteurs du marqueur de sélection *leu2* a été transformé dans la souche PJ69-4α. Le plasmide pGBKT7-MEK1^{KD} porteurs du gène *trp1* dans PJ69-4α. Les transformants ont été sélectionnés sur les milieux SD appropriés : SD-L pour le plasmide pGADT7-KSR1^{KD} et SD-T pour le plasmide pGBKT7-MEK1^{KD}. À partir de ces milieux, un clone a été amplifié et strié en une ligne sur une nouvelle boîte de Pétri. Les interactions étant testées en simultanée, chaque ligne correspond à une protéine exprimée par Y2H (par exemple à gauche, la 2^{ème} ligne correspond à MEK1^{KD}, la 3^{ème} ligne pourrait correspondre à BRAF^{KD}). Après croisement des levures sur milieu riche YPD, des empreintes des croisements ont été effectuées sur les boîtes de sélection : SD-TL (milieu de sélection non-stringent des transformants possédant les deux plasmides), SD-TLH (milieu de sélection de niveau de stringence modérée) et SD-TLA (milieu de sélection de niveau de stringence élevée). Pour évaluer plus aisément la force des interactions, la croissance des diploïdes a été réévaluée par « Spot Assay ». À partir du milieu SD-TL, les diploïdes ont été ensemencés à une concentration identique qui a également été diluée par un facteur 10, 100 puis 1000 sur des boîtes SD-TL, SD-TLH et SD-TLA

2.3.2.3 Cribles par PCR à erreurs ou par mutagenèse saturante

Pour les cribles de double-hybride dans la levure, deux types d'approches ont été utilisées pour obtenir les bibliothèques de mutants. Afin de faciliter le procédé expérimental, les deux types de plasmides (pGBKT7 et pGADT7) ont été co-transformés dans une seule et même souche de levures (PJ69-4a). Les sélections et l'analyse de l'interaction ont donc été réalisées sur des organismes haploïdes. La première approche par mutagenèse aléatoire par PCR à erreurs (« Error-prone PCR ») a été utilisée lorsque les mutations ciblaient l'ensemble d'un domaine ou d'une région de façon aléatoire (par exemple : crible de la NTR de BRAF dans la section 4.1.2.1). La souche PJ69-4a a été transformée avec la construction pGBKT7-KSR1^{NTR}. En parallèle, des mutations aléatoires ont été introduites dans BRAF^{NTR} par PCR en présence de la polymérase *Taq* et de dITP (Spee et al., 1993). Le plasmide pGADT7 a été linéarisé par digestion enzymatique. Les levures PJ69-4a comportant pGBKT7-KSR1^{NTR} ont ensuite été transformées avec le plasmide pGADT7 ainsi que les produits de PCR BRAF^{NTR} mutés qui se sont intégrés à pGADT7 *in vivo* par recombinaison homologue. Pour obtenir toutes les mutations possibles pour chaque acide aminé (BRAF^{NTR} comprend 434 acides aminés : Nombre de mutations possibles = $4 \times 4 \times 4 \times 434 = 27776$ possibilités), environ 1000 clones par boîte ont étéensemencés sur 40 boîtes SD-TL puis incubées 72 h à 30 °C. Toutes les boîtes ont par la suite été répliquées sur les boîtes SD-TLH et SD-TLA et incubées 48 h. Les colonies apparues sur les milieux SD-TLH et/ou SD-TLA ont été striées sur milieu SD-TL puis leur phénotype a été confirmé par « Spot Assay ». Les plasmides des mutants ainsi obtenus ont été extraits par lyse mécanique avec des billes de verre (Sigma Aldrich) couplée à un protocole d'extraction d'ADN plasmidique (Qiagen). Les plasmides récupérés ont ensuite été amplifiés en bactérie avant d'être analysés par séquençage.

La seconde approche par mutagenèse saturante (Zheng et al., 2004) a ciblé une courte séquence de 3 acides aminés de MEK1_{KD} dans le but d'en obtenir toutes les permutations possibles (section 3.1.3). Une bibliothèque de mutants de MEK1 a été réalisée sur le motif MAN de la boucle d'activation (résidus 219 à 221) permettant de tester toutes les mutations possibles du motif. Dans ce but, un oligonucléotide « dégénéré » TCC-NNK-NNK-NNK-TCC (N=A, T, G ou C ; K = G ou C) a été utilisé pour remplacer la séquence codante du motif MAN. Les produits de PCR obtenus ont été intégrés au plasmide pGBKT7 lors de la transformation de la souche pJ694-a comportant la « proie » appropriée (pGADT7-KSR1^{KD W831R}, pGADT7-BRAF^{KD} ou pGADT7-CRAF^{KD}). Les

mutants de MEK1^{KD} ont été sélectionnées puis les plasmides isolés selon la technique précédemment décrite.

2.3.3 Purification des protéines

Pour la purification des différents domaines, les constructions pGEX-4T1 ou pProEX-HTA ont été transformées la veille dans des bactéries BL21-CodonPlus DE3-RIL (Agilent Technologies) rendues chimiocompétentes. Une colonie a ensuite été ensemencée dans 25 mL de LB liquide contenant l'antibiotique de sélection adéquat, puis incubée o/n à 37 °C avec agitation. Le lendemain, 10 mL de la préculture ont été transférés dans 1 L de LB, de *Terrific Broth* (TB) supplémenté en tampon potassium (KH₂PO₄ /K₂HPO₄), ou de milieu minimal M9 (Goyal et al., 2015) supplémenté de [¹⁵N]NH₄Cl (Cambridge Isotopes) pour les expériences de RMN, dans des fioles Erlenmeyer à chicanes. Pour les expériences en milieu minimal, la préculture a été préalablement lavée dans de l'eau stérile pour éviter le transfert d'azote non marquée. Les cultures ont été incubées à 37 °C avec agitation jusqu'à atteindre leur phase de croissance logarithmique puis induites avec 1 mM d'IPTG et incubées 15 h supplémentaires à 18 °C. Après incubation, les cultures ont été culotées par centrifugation puis congelés dans de l'azote liquide pour faciliter la lyse des bactéries. Les culots ont été re-suspendus dans les tampons de lyse appropriés. Les lysats ont par la suite été homogénéisés par sonication, épurés par centrifugation à 20000 rpm pendant 30 min à 4 °C. En parallèle, des résines de glutathione (GE Healthcare) ou de Ni-NTA (*Nickel-Nitrilotriacetic acid*) (Qiagen) ont été équilibrées avec de l'eau stérile puis du tampon de lyse. Les lysats ont été mis au contact des résines (pour plus d'efficacité certains lysats ont été préalablement filtrés) puis drainés par gravité. Les résines ont été lavées 3 fois avec des tampons de lavage. Les protéines fixées à la résine ont soit été directement éluées par clivage sur résine grâce à la protéase TEV (produite dans le laboratoire) soit élués par excès de glutathione (25 mM) ou ajout d'imidazole 250 mM pour la résine Ni-NTA lors de la purification de protéines peu solubles. Dans ce second cas, le clivage à la TEV a été effectuée pendant la nuit à 4 °C lors de la dialyse des protéines après récolte des éluats. Les protéines clivées ont ensuite été concentrées avec des filtres à centrifuger (Amicon) puis purifiées par chromatographie d'exclusion (*Size Exclusion Chromatography*; SEC) avec une colonne Superdex75 24 mL (GE Healthcare). Lors de la SEC, les protéines ont été équilibrées dans un tampon adapté aux expériences de RMN (20 mM tampon phosphate, 100 mM NaCl, 0,5 mM TCEP, pH 6.5). Les fractions de SEC comportant la protéine d'intérêt ont été concentrées, congelées dans l'azote liquide et conservées à -80 °C. Chaque étape

de la purification ainsi que la pureté finale des protéines ont été évaluées sur gel polyacrylamide après coloration au bleu de Coomassie alors que la concentration des échantillons a été estimée par mesure spectroscopique de l'absorbance UV à la longueur d'onde de 280 nm avec un spectrophotomètre NanoDrop (Thermo-Fisher Scientific) et le calcul des coefficients d'extinction (Gasteiger et al., 2005). Le domaine BRS a été lysé dans 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM PMSF, 5 mM 2-βmercaptoéthanol, 10 µg/mL de DNase I (Sigma Aldrich). Le CC-SAM a été purifié suivant le protocole précédemment décrit (Koveal et al., 2011) et lysé dans un tampon adapté (50 mM HEPES pH 7.5, 500 mM NaCl, 1 mM PMSF, 20 mM d'imidazole et 5 mM 2-β-mercaptoéthanol)

Le BRS a également été analysé par dichroïsme circulaire (*Circular Dichroism*, CD) pour confirmer les résultats de bio-informatique indiquant la présence d'une structure en coiled-coil. Cette technique permet notamment de mesurer le contenu en feuillets β et en hélices α par la diffraction des protéines. Pour cela, le BRS a été purifié à partir du vecteur pGEX-4T1 suivant le protocole précédemment décrit. Un échantillon du domaine purifié a ensuite été dilué puis analysé avec un spectropolarimètre Jasco J-810 par le Dr. Laurent Volpon.

Chapitre 3 : Éléments structuraux impliqués dans le complexe protéique MEK1/BRAF/KSR1

3.1 Le domaine kinase de MEK1 possède des structures secondaires lui permettant de discriminer ses partenaires d'interaction

3.1.1 Contexte

Le premier objectif de ce travail de thèse a été de mieux comprendre la contribution des éléments structuraux qui unissent MEK1 aux différentes protéines de la famille RAF. À partir de ces informations, des versions mutées de chaque protéine (MEK1, BRAF ou KSR1) ont été utilisées comme outils moléculaires afin de parvenir à un modèle d'interactions en adéquation avec les données de la littérature.

Dans ce but, la totalité du kinome humain a été criblé pour identifier des protéines régulatrices des dimères BRAF/KSR. De façon inattendue, seules les kinases MEK1/2 stimulent la formation des dimères BRAF/KSR1 et BRAF/KSR2 (Lavoie et al., 2018 : **Figure 1.a et Extended Data Figure 1.a**). Notre objectif a donc été la caractérisation de la formation du complexe BRAF/KSR1/MEK1 et principalement d'identifier les éléments structuraux permettant à MEK de discriminer ses différents partenaires.

Nous nous sommes focalisés sur les domaines kinases (*Kinase Domain, KD*) des protéines MEK1, BRAF, CRAF et KSR1. La mention de ces protéines fera donc uniquement référence aux domaines KD et non aux formes pleine longueur sauf indication contraire. Les séquences en acides aminés des KD de KSR1 et KSR2 sont très proches. La superposition structurale des KD a montré que ces domaines sont de structures comparables (Khan et al., 2020). Par souci de simplification des analyses, nous avons donc fait le choix d'intégrer une seule des protéines KSR à notre étude, l'isoforme KSR1.

En raison de l'analogie entre les KD des KSR et des RAF, nous avons fait l'hypothèse que BRAF et CRAF pourraient former des complexes similaires au complexe MEK1/KSR2, où BRAF et CRAF se lieraient à MEK1 *via* des surfaces homologues à celles de KSR2. Nous nous sommes proposés de valider cette hypothèse par des expériences de double hybride en levure (« yeast two-

hybrid », Y2H). Cette technique nous a permis de tester les interactions entre le KD de MEK1 et les KD de BRAF, CRAF ou KSR1, sauvages ou mutées.

3.1.2 Effets de mutations des structures secondaires sur les interactions de MEK1 à BRAF, CRAF et KSR1

Le principe du Y2H repose sur la reconstitution du facteur de transcription Gal4 qui a été scindé en deux domaines : le domaine d'activation (*Activation Domain, AD*) et le domaine de liaison à l'ADN (*Binding Domain, BD*). Chacun de ces domaines est fusionnés aux protéines dont on veut évaluer l'interaction. La force de l'interaction protéique considérée est directement corrélée à la croissance de levures sur les milieux de sélection. Tous les résultats de Y2H sont présentés sous forme de « Spot assay » c'est-à-dire, une dilution sériée de levures diploïdes où une concentration décroissante de cellules a étéensemencée du haut vers le bas. La présence de colonies de levures à la concentration la plus faible témoigne d'une interaction robuste. Cet agencement nous permet de comparer avec plus de nuances, les interactions des différentes protéines (voir le chapitre « Matériel et méthodes » pour plus de détails).

La robustesse de l'essai de double-hybride a été préalablement établie par la reproduction des interactions connues de MEK1 avec les protéines RAF (non montré). Après validation de ces interactions, nous avons voulu déterminer avec précision les éléments structuraux permettant à MEK1 d'interagir avec ses partenaires. Les données de cristallographie par rayons X du complexe MEK1/KSR2 ont montré que les hélices α G et les boucles d'activations permettent à ces deux protéines d'interagir (Brennan et al., 2011). Des mutants ciblant spécifiquement ces structures ont donc été générés dans MEK1 et dans les protéines RAF. L'impact de ces mutations sur l'interaction de MEK1 avec les protéines RAF a ensuite été évalué par Y2H.

3.1.2.1 Une mutation de l'hélice α G de MEK1 perturbe son interaction avec ses partenaires

Nous nous sommes tout d'abord intéressés aux mutations affectant la protéine MEK1. La mutation (F311S) de l'hélice α G présente dans le lobe C de MEK1, a été caractérisée lors d'expériences précédentes visant à impacter l'association de MEK1 avec KSR1 (**Figure 12.A en haut**). Cette mutation F311S induit à elle seule la perte d'interaction de MEK1 avec KSR1. Comme pour l'interaction de MEK1 avec KSR2, il est apparu que l'interaction de MEK1 avec KSR1 dépend également de l'hélice α G de MEK1. Nous avons pu reproduire cette expérience de perte

d'interaction de MEK1 vis-à-vis de KSR1 avec succès comme en témoigne l'absence de croissance de levures (**Figure 12.B, comparez la colonne 1 à la colonne 2 du panneau SD-TLH**).

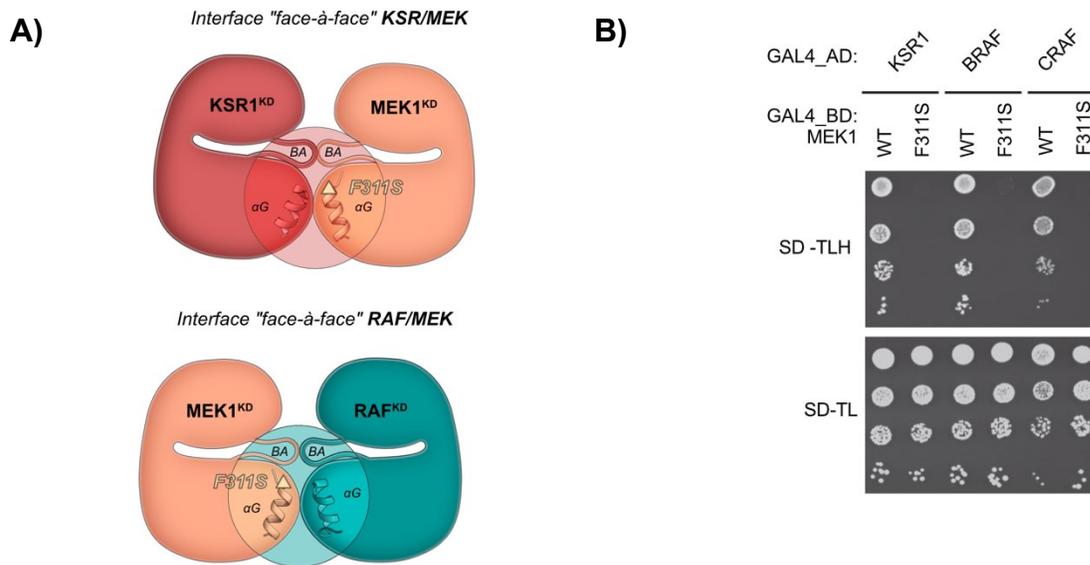


Figure 12 – Mesure des interactions de MEK1, sauvage ou mutée avec KSR1, BRAF ou CRAF.

A) Schéma replaçant la mutation F311S de MEK1 dans les complexes KSR1/MEK1 et MEK1/BRAF ou CRAF et qui a été utilisée dans cette expérience.

B) Interactions de KSR1^{KD}, BRAF^{KD} et CRAF^{KD} avec MEK1^{KD} ou MEK1^{F311S} (mutation de l'hélice α G). Les KD de KSR1, BRAF ou CRAF ont été fusionnées au domaine activateur de GAL4 (AD). Le KD de MEK1 a été fusionné au domaine liant l'ADN de GAL4 (BD). SD-TL : milieu de sélection non-stringent des transformants ; SD-TLH : milieu de sélection de niveau de stringence modérée ; Aucune interaction n'a été détectée sur le milieu de stringence le plus élevé (SD-TLA, non présenté).

WT : forme sauvage, F311S : résidu Phe à la position 311 muté en Ser, KD : Kinase Domain, BA : Boucle d'Activation, α G : Hélice α G. Figure 12.B adaptée de Lavoie et al. 2018, Extended Data Figure 2.c

Les protéines KSR font partie de la famille des protéines RAF car elles présentent une forte homologie de séquence avec les kinases RAF. En nous basant sur les similitudes structurales entre KSR1 et les kinases BRAF et CRAF, nous avons supposé que la mutation F311S de MEK1 pourrait également perturber les interactions MEK1/BRAF et MEK1/CRAF (**Figure 12.A en bas**). Nos expériences de Y2H confirment que le mutant MEK1^{F311S} n'est plus capable d'interagir avec les protéines BRAF et CRAF (**Figure 12.B**). L'introduction d'une mutation unique au niveau du point de contact de l'hélice α G de MEK1 avec l'hélice α G de BRAF ou CRAF est suffisante pour complètement abroger les interactions MEK1/BRAF et MEK1/CRAF. Nous avons ainsi démontré que, comme pour KSR1, MEK1 engage son hélice α G pour interagir avec BRAF et CRAF. De

façon réciproque, nous avons voulu déterminer si les protéines RAF engagent elles aussi leurs hélices α G lors de leur interaction avec MEK1. Nous avons dans un premier temps, évalué l'impact de ces mutations sur les fonctions des protéines RAF.

3.1.2.2 Les mutations des hélice α G n'impactent pas le repliement global du domaine: exemple de KSR1^{W831R}

Dans le complexe MEK1/KSR2, les hélices α G de chacune des deux protéines établissent un point de contact permettant à MEK1 et KSR2 d'interagir (Brennan et al., 2011). Nous avons voulu corroborer ces données et déterminer si l'hélice α G de KSR1 était pareillement engagée avec l'hélice α G de MEK1. Une mutation permettant d'abroger l'interaction MEK1/KSR a été isolée par crible génétique (Lavoie et al., 2018 : **Extended Data Figure 2**). Comme pour le mutant de MEK^{F311S} précédemment décrit, la mutation KSR1^{W831R} est également localisée dans l'hélice α G, soutenant l'hypothèse que pour chacune de ses interactions (MEK1/KSR1, MEK1/CRAF et MEK1/BRAF), MEK1 engage son hélice α G par un contact direct avec l'hélice α G de son partenaire d'interaction. Contrairement à KSR1 qui est constitutivement liée à MEK1, KSR1^{W831R} n'interagit plus avec MEK1.

L'introduction de mutations ponctuelles pour modifier la nature d'un acide aminé peut avoir des répercussions inattendues sur la structure et la fonction d'une protéine. Il a de ce fait, été important de s'assurer que les mutations des hélices α G (telle que MEK^{F311S} ou KSR1^{W831R}) n'impactaient que l'interaction MEK/KSR et n'avaient pas d'effets délétères sur les autres interactions de MEK ou de KSR1 (Lavoie et al., 2018 : **Extended Data Figure 3**). En particulier, la capacité de KSR1^{W831R} à lier l'ensemble de ses partenaires d'interaction a été évaluée. La mutation W831R qui induit la perte d'interaction avec MEK1, a été introduite dans une protéine KSR1 pleine longueur (KSR1^{FL}) et ses interactions protéiques ont été analysées par Western Blot et par spectrométrie de masse (**Figure 13**).

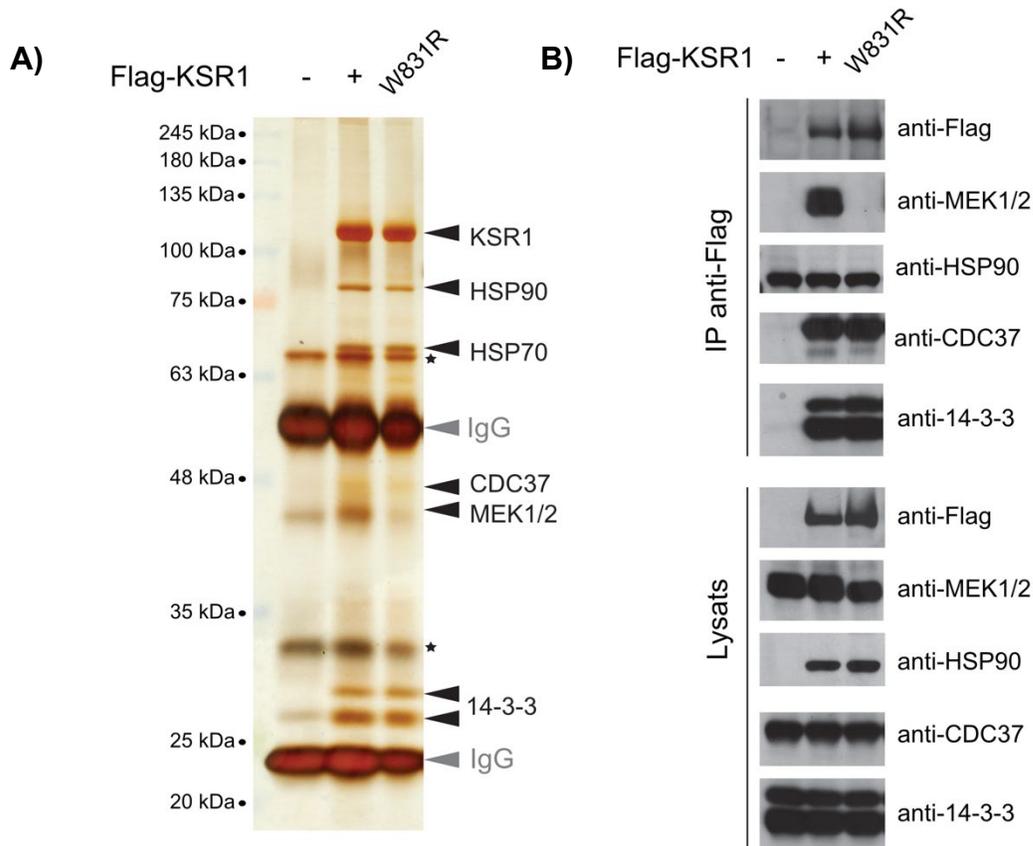


Figure 13 – Analyse des interacteurs de KSR1^{W831R}.

*Purification de Flag-KSR1^{FL} sauvage ou muté par immunoprécipitation après transfection en cellules humaines 293T. La détection des interacteurs des Flag-KSR1 a été réalisée par spectrométrie de masse après migration sur un gel SDS-PAGE et coloration au nitrate d'argent (A) ou par immunobuvardage de type Western et utilisation des anticorps appropriés (B). Les protéines contaminantes sont indiquées par une étoile. IP : Immunoprécipitation, « - » / « + » : contrôles expérimentaux
Figure adaptée de Lavoie et al. 2018, Extended Data Figure 3.d et 3.e*

Les résultats de ces expériences indiquent que la mutation W831R n'affecte pas l'interaction de KSR1 avec 14-3-3, CDC37 ou encore HSP90 (Oughtred et al., 2021; Stewart et al., 1999), comparativement à sa forme sauvage (à l'exception attendue de l'interaction avec MEK1). On peut donc raisonnablement supposer que la substitution n'a pas d'impact majeur sur la structure globale de KSR1 qui conserve ses fonctions d'interaction. Cependant, seule une étude structurale approfondie de KSR1 et de sa forme mutée soit par RMN, soit par cristallographie aux rayons X, pourrait évaluer avec précision l'impact réel de cette substitution sur le repliement de KSR.

Après avoir caractérisé la mutation KSR1^{W831R}, des substitutions similaires ont été introduites dans BRAF et CRAF pour en étudier les effets.

3.1.2.3 L'hélice αG et la boucle d'activation des protéines RAF sont requises pour leur interaction avec MEK1

Les mutations MEK^{F311S} et KSR1^{W831R} ont permis de valider les données de cristallographie par rayons X: comme pour l'interaction MEK1/KSR2, MEK1 et KSR1 se font face via leur hélices αG respectives. Ainsi, l'introduction de la mutation W831R dans l'hélice αG de KSR1 (**Figure 14.A en haut**) conduit bien à une perte d'interaction par Y2H comme l'indique l'absence de croissance (**Figure 14.B : comparer les colonnes 1 et 2**).

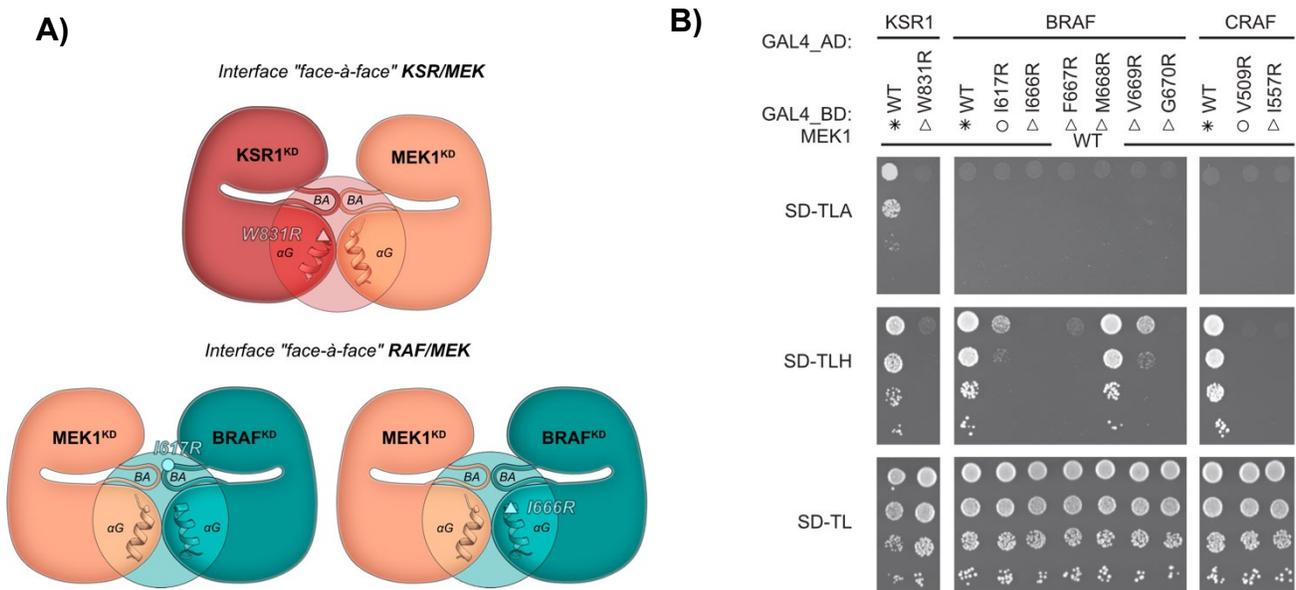


Figure 14 – Mesure des interactions de MEK1^{KD} avec KSR1^{KD}, BRAF^{KD} ou CRAF^{KD} sauvages ou mutées.

A) Schéma remplaçant les mutations des protéines KSR1 et BRAF dans les complexes KSR/MEK et MEK/RAF et qui ont été utilisées dans cette expérience. Les mutations de CRAF sont localisées dans des localisations similaires à celles de BRAF.

B) Interactions des KD de MEK1^{KD} avec KSR1^{KD}, BRAF^{KD} et CRAF^{KD} sauvages (*); mutés dans leur hélice αG (Δ) ou mutés dans leurs boucles d'activation (○). Les peptides correspondants aux KD fusionnés au domaine activateur de GAL4 (AD) ou au domaine liant l'ADN de GAL4 (BD) sont indiqués; SD-TL : milieu de sélection non-stringent des transformants; SD-TLH : milieu de sélection de niveau de stringence modérée; SD-TLA : milieu de sélection de niveau de stringence élevée.

KD : Kinase Domain, BA : Boucle d'Activation, αG : Hélice αG.

Par analogie structurale avec KSR1, nous avons émis l'hypothèse que les kinases BRAF et CRAF pourraient elles aussi interagir avec MEK1 via leurs hélices α G respectives. Nous avons introduit des mutations dans les hélices α G et les boucles d'activation des protéines RAF (BRAF et CRAF) pour en étudier les effets sur les interactions avec MEK1/BRAF et MEK1/CRAF.

Les protéines RAF étant des sérine-thréonine kinases, elles interagissent donc avec leur substrat par leurs boucles d'activation (BA), ce qui a été confirmé par cristallographie aux rayons X (Haling et al., 2014). Afin de valider l'implication potentielle de ces éléments structuraux de BRAF et de CRAF dans leur interaction avec MEK1, des mutants des hélices α G d'une part et des mutations de résidus localisés dans les boucles d'activation (BRAF : résidus 666 à 670 ; CRAF : résidu 557) d'autre part, ont été générés par mutagenèse dirigée (**Figure 14.A en bas**) puis testés par Y2H. Lors de la réalisation de cette expérience, un milieu de stringence plus élevé (SD-TLA) a également été utilisé pour observer des interactions protéiques plus fortes. Ainsi, il est intéressant de noter que le KD de la kinase MEK1 interagit plus fortement avec le KD de KSR1 qu'avec les KD des kinases RAF, confirmant la plus grande affinité de MEK1 pour les protéines KSR (Roy et al., 2002) (**Figure 14.B : comparer les colonnes surmontées par ***). Pour les interactions MEK1/BRAF et MEK1/CRAF, l'analyse des pertes d'interactions a uniquement pu être effectuée sur le milieu de stringence minimal (SD-TLH).

Tous les mutants de BRAF et CRAF, à l'exception de BRAF^{M668R}, abrogent ou réduisent l'interaction avec la forme sauvage MEK1 (**Figure 14.B**). Les hélices α G de BRAF et de CRAF ainsi que leurs boucles d'activations sont donc nécessaires à leur interaction avec le domaine kinase de MEK1. Ces expériences ont permis d'isoler des mutants de type « perte de fonction » (KSR1^{W831R}, BRAF^{I666R} et CRAF^{I557R}) qui ont été utilisés par la suite (**Figure 16, p. 94**).

Il est intéressant de noter que pour BRAF, seuls deux mutations (I666R et G670R) permettent de complètement inhiber l'interaction MEK1/BRAF. Ces résultats suggèrent que les boucles d'activation de MEK1 et de BRAF établissent un point de contact extrêmement précis que ne peut être perturbé qu'en ciblant les acides aminés spécifiquement engagés dans l'interaction. Contrairement aux autres mutations de BRAF, la mutation BRAF^{M668R} n'est donc, à elle seule, pas suffisante pour perturber l'interaction MEK1/BRAF qui repose sur deux points de contact : 1) *via* leurs hélices α G et 2) *via* leurs boucles d'activation.

Il est donc bien nécessaire pour MEK1 d'engager son hélice α G ainsi que sa boucle d'activation avec l'hélice α G et la boucle d'activation de son partenaire d'interaction. En

corrélation avec les données structurales (**Figure 8, p. 61**), ces résultats démontrent donc bien que les interactions MEK1/BRAF et MEK1/CRAF impliquent les mêmes structures que l'interaction MEK1/KSR1 et MEK1/KSR2.

3.1.3 Identification des substitutions capables de moduler l'affinité de MEK1 pour BRAF, CRAF et KSR1

Dans le but de pouvoir isoler spécifiquement les complexes MEK1/BRAF, MEK1/CRAF ou MEK1/KSR1 les uns des autres, nous avons isolé des mutants de MEK1 ayant des affinités différentes selon les partenaires d'interaction considérés.

Il a été postulé que chacune des interactions de MEK1 (MEK1/BRAF, MEK1/CRAF ou MEK1/KSR1) pourrait être renforcée par l'introduction de mutations spécifiques dans MEK1; chaque mutant de MEK1 ainsi généré s'associant de façon préférentielle à BRAF, CRAF ou KSR1. Pour cela, un système de crible en Y2H a été élaboré permettant d'identifier et isoler ces mutants de MEK1.

Dans un premier temps, un crible préliminaire de MEK1 a été élaboré à partir de l'interaction MEK1/KSR1. Comme mentionné précédemment, l'interaction MEK1/KSR1 est la seule qui est détectée sur les deux milieux de stringence de Y2H, du fait de l'affinité élevée de MEK1 pour KSR1. Dans ce contexte, il est donc impossible de faire la distinction entre une mutation provoquant un gain d'interaction et l'interaction des protéines sauvages. Le mutant « perte de fonction » KSR1^{W831R} qui n'interagit plus avec MEK1 (**Figure 14.B : colonnes 1 et 2, comparez KSR1^{WT} et KSR1^{W831R}**) a donc été choisi pour cette expérience.

En utilisant KSR1^{W831R} comme appât, la totalité de la protéine MEK1 a été criblée par mutagenèse aléatoire par PCR à erreurs (« Error-prone PCR ») lors d'une expérience réalisée par le Dr. Lavoie. Des mutants de MEK1 de plus forte affinité pour KSR1^{W831R} ont ainsi pu être isolés. Cette expérience a ainsi permis de sélectionner des mutations de MEK1 pouvant restaurer l'interaction avec KSR1^{W831R}. Logiquement, ces mutants de MEK1 interagissent aussi plus fortement avec la forme sauvage de KSR1. Il a été observé que les mutations possédant ces propriétés sont exclusivement localisées dans le KD de MEK1, plus particulièrement au niveau de sa boucle d'activation et du motif M²¹⁹-A²²⁰-N²²¹ (Met, Ala et Asp), situé entre les sérines phosphorylables de MEK1 (**voir Introduction**). Ainsi, les substitutions uniques M219V ou N221Y

permettent de rétablir l'interaction de MEK1 avec KSR1^{W831R}. Il a été conclu que le motif M²¹⁹-A²²⁰-N²²¹ est important pour l'interaction de MEK1 avec KSR1.

À la suite de ce crible préliminaire, chacune des interactions (MEK1/KSR1^{W831R}, MEK1/BRAF et MEK1/CRAF) a subi un crible génétique ciblant spécifiquement les résidus 219 à 221 de MEK1 afin d'identifier des mutations capables d'augmenter l'affinité de MEK1 pour ses partenaires d'interaction. D'un point de vue expérimental, une mutagenèse aléatoire et saturante a été privilégiée afin d'obtenir toutes les combinaisons possibles de codons à la place des trois acides aminés ciblés (**Figure 15.A**). En comparant les gains d'interaction provoqués par ces mutations, cet essai mis au point dans le laboratoire, a eu pour but de découvrir les résidus permettant à MEK1 de discriminer ses différents partenaires d'interaction au cours de la formation des complexes protéiques.

3.1.3.1 L'interaction de MEK1 avec ses partenaires est influencée par la nature des résidus de sa boucle d'activation

Plus de 300 mutants provoquant un gain d'interaction de MEK1 pour ses partenaires, ont été sélectionnés puis séquencés pour l'ensemble des trois cribles. Les différents acides aminés retrouvés aux positions 219, 220 et 221 de la boucle d'activation de MEK1 ont ensuite été rassemblés sous forme de logos dont la taille est fonction de leur fréquence d'apparition (**Figure 15.B**).

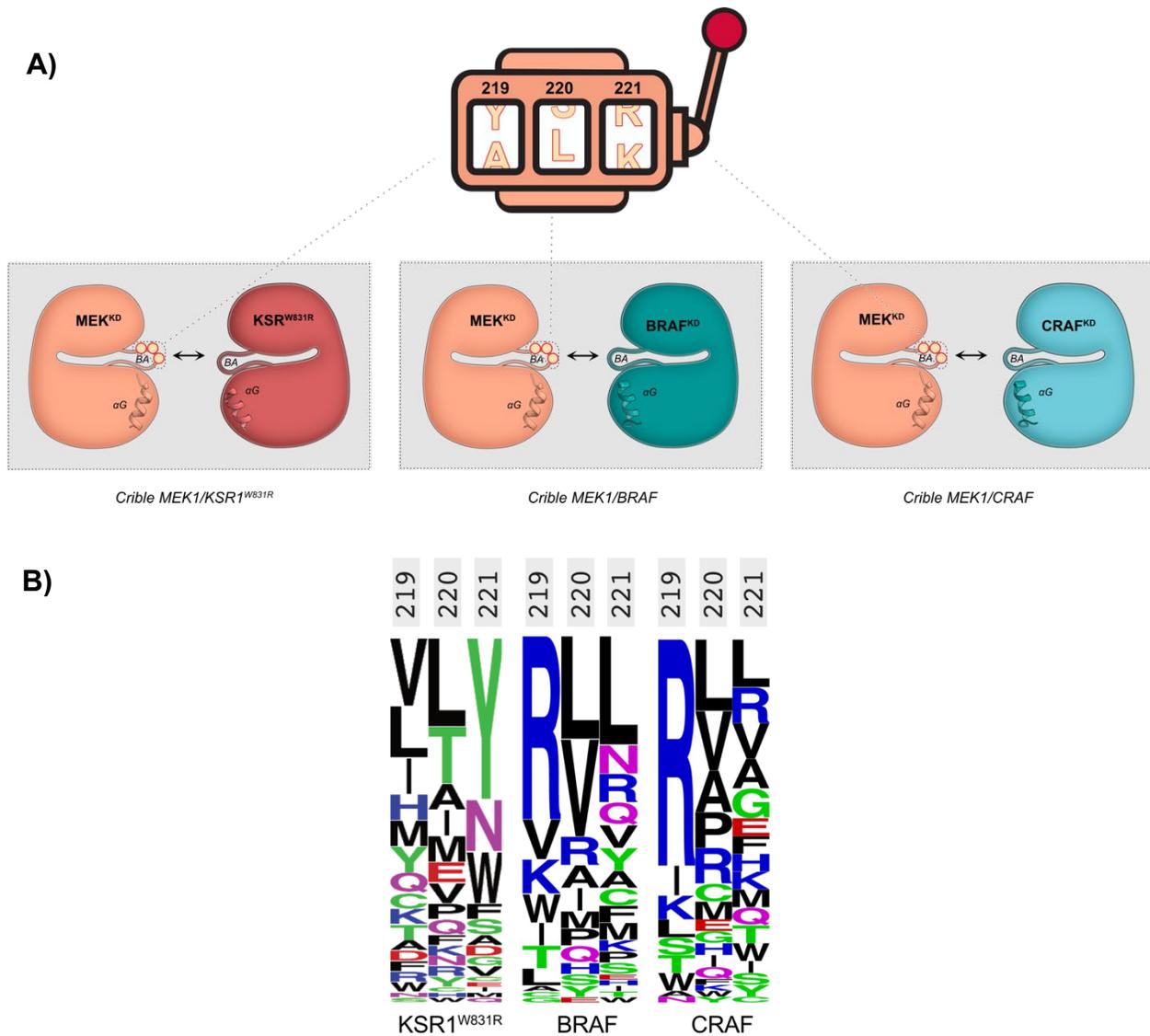


Figure 15 – Nature et fréquence des substitutions du motif M²¹⁹-A²²⁰-N²²¹ de MEK1 lors de son criblage avec KSR1^{W831R}, BRAF ou CRAF.

A) Schéma représentant les trois cribles effectués sur MEK1 sélectionnant des mutants induisant des phénotypes de « gain d'interaction ». La nature des acides aminés aux positions 219, 220 et 221 est déterminée de façon randomisée par mutagenèse aléatoire.

B) Acides aminés enrichis en 219, 220 et 221. La position de l'acide aminé muté du motif M²¹⁹-A²²⁰-N²²¹ de MEK1 est indiquée dans un encadré gris en haut. La nature des acides aminées est indiquée par une couleur déterminée (bleu: résidus basiques; rouge: résidus acides; noir: résidus hydrophobes, violet: résidus amidiques vert: résidus polaires). La taille de chaque lettre représente la fréquence d'apparition de l'acide aminé. La protéine « appât » utilisée pour chaque crible est indiquée en bas. Par exemple, dans le crible de MEK1 contre KSR1^{W831R}, la majorité des mutants de MEK1 qui ont été isolés possède une substitution de l'alanine 221 en une tyrosine. (Logos générés via le site web <http://weblogo.berkeley.edu/>)

KD : Kinase Domain, BA : Boucle d'Activation, αG : Hélice αG . Figure adaptée de Lavoie et al. 2018, Extended Data Figure 5.a.

Ces résultats démontrent que la distribution des acides aminés n'est pas aléatoire. Ainsi, on observe un enrichissement des substitutions M219R, A220L et N221L de MEK1 (abrégées en MEK1^{RLL}) lors des cribles réalisés avec BRAF ou CRAF. Comparativement au résidu méthionine (M) à la position 219 de la forme sauvage de MEK 219, l'arginine (R) impose un encombrement stérique plus important du fait du groupe guanidine chargé de sa chaîne latérale (Sneath et al., 1966). Des études structurales de ces permutations sont nécessaires pour déterminer l'impact de ces substitutions sur la capacité d'interaction de MEK. Hormis l'arginine (en position 219), la position 220 comprend principalement des résidus hydrophobes (L, V, A, M, I) alors que la position 221 comporte une part proportionnellement plus importante d'acides aminés hydrophiles (N, Q, E, H, K, R). La combinaison de ce type de résidus à ces positions particulières permettent donc à MEK1 d'augmenter la force de son interaction avec BRAF et CRAF.

Lors du crible réalisé avec KSR1^{W831R}, le mutant MEK1^{VLY} a été isolé le plus fréquemment. À l'inverse des deux autres cribles, ici c'est le résidu à la 3^{ème} position du motif qui est remplacé par un résidu aromatique (une tyrosine), stériquement plus contraignant. Ces résultats font échos au crible préliminaire effectué sur l'interaction MEK1/KSR1 où les mutants MEK1^{VAN} (substitution unique d'une valine à la place de la méthionine) et MEK1^{MAY} comportent également une tyrosine à la 3^{ème} position. Un résidu aromatique à la place de l'alanine (A) dans le motif M-A-N de MEK1 peut donc spécifiquement renforcer l'interaction MEK1/KSR1. Il est donc possible d'isoler des mutants de MEK1 interagissant spécifiquement avec l'un ou l'autre de ses partenaires. Pour confirmer cette hypothèse, la force et la spécificité des mutants de MEK1 a été évaluée par la technique du double hybride.

3.1.3.2 Évaluation de la force et de la spécificité des mutants de MEK1

Une analyse comparative a été effectuée sur neuf mutants de MEK1 issus des trois cribles. Un schéma des différentes interactions testées pour le mutant MEK1^{RLL}, est illustré comme exemple dans la **Figure 16**. Ce mutant est issu du crible de MEK1 avec BRAF (**Figure 16.A**) et comprend une triple mutation du motif M-A-N (M219R, A220L et N221L). MEK1^{RLL} a donc été comparé à des mutants comportant des substitutions uniques (tel que le mutant MEK1^{VAN}). Nous avons supposé qu'une triple mutation sélectionnée de façon aléatoire conduirait à une interaction MEK1/BRAF plus forte qu'une substitution unique (**Figure 16.B**). MEK1^{RLL} et MEK1^{VAN} ont

également été testés en interaction avec BRAF^{I666R} (**Figure 16.C et D**) Cette forme mutée de BRAF a été isolée précédemment (**Figure 14.B, p. 88**) car elle conduit à une perte de l'interaction MEK1/BRAF. Si la mutation R-L-L dans MEK1 induit un gain suffisant, l'interaction MEK1/BRAF pourrait être renforcée avec BRAF sauvage et restaurée avec BRAF^{I666R}.

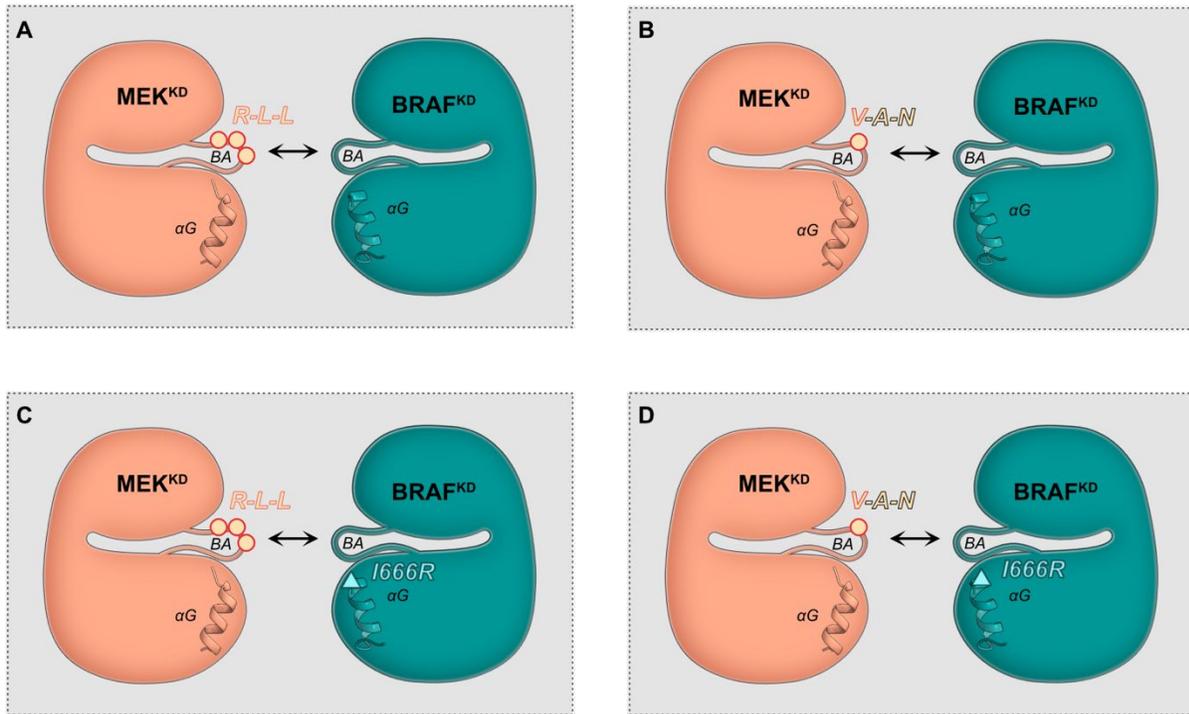


Figure 16 – Exemples d’interactions testées entre des mutants de MEK1 et de BRAF.

- A) Interaction MEK1^{RLL}/BRAF correspondant à la colonne 5 de la Figure 17.B en haut.
 B) Interaction MEK1^{VAN}/BRAF correspondant à la colonne 2 de la Figure 17.B en haut.
 C) Interaction MEK1^{RLL}/BRAF^{I666R} correspondant à la colonne 5 de la Figure 17.B en bas.
 D) Interaction MEK1^{VAN}/BRAF^{I666R} correspondant à la colonne 2 de la Figure 17.B en bas.
 KD: Kinase Domain, BA: Boucle d’Activation, αG: Hélice αG.*

Pour déterminer la spécificité de la mutation R-L-L, les interactions MEK1^{RLL}/CRAF, MEK1^{RLL}/CRAF^{I557R}, MEK1^{RLL}/KSR1 et MEK1^{RLL}/KSR1^{W831R} ont également été testées. Chaque mutant de MEK1 a ainsi été évalué en interaction avec différents partenaires pour 1) évaluer la force du gain d’interaction apportés par ces mutations et 2) déterminer leurs spécificités vis-à-vis de KSR1, BRAF ou CRAF. Le but de cette expérience a été de discriminer les mutants de MEK1 par leur capacité d’interaction en identifiant les interactions les plus fortes et, si possible, les interactions sélectives.

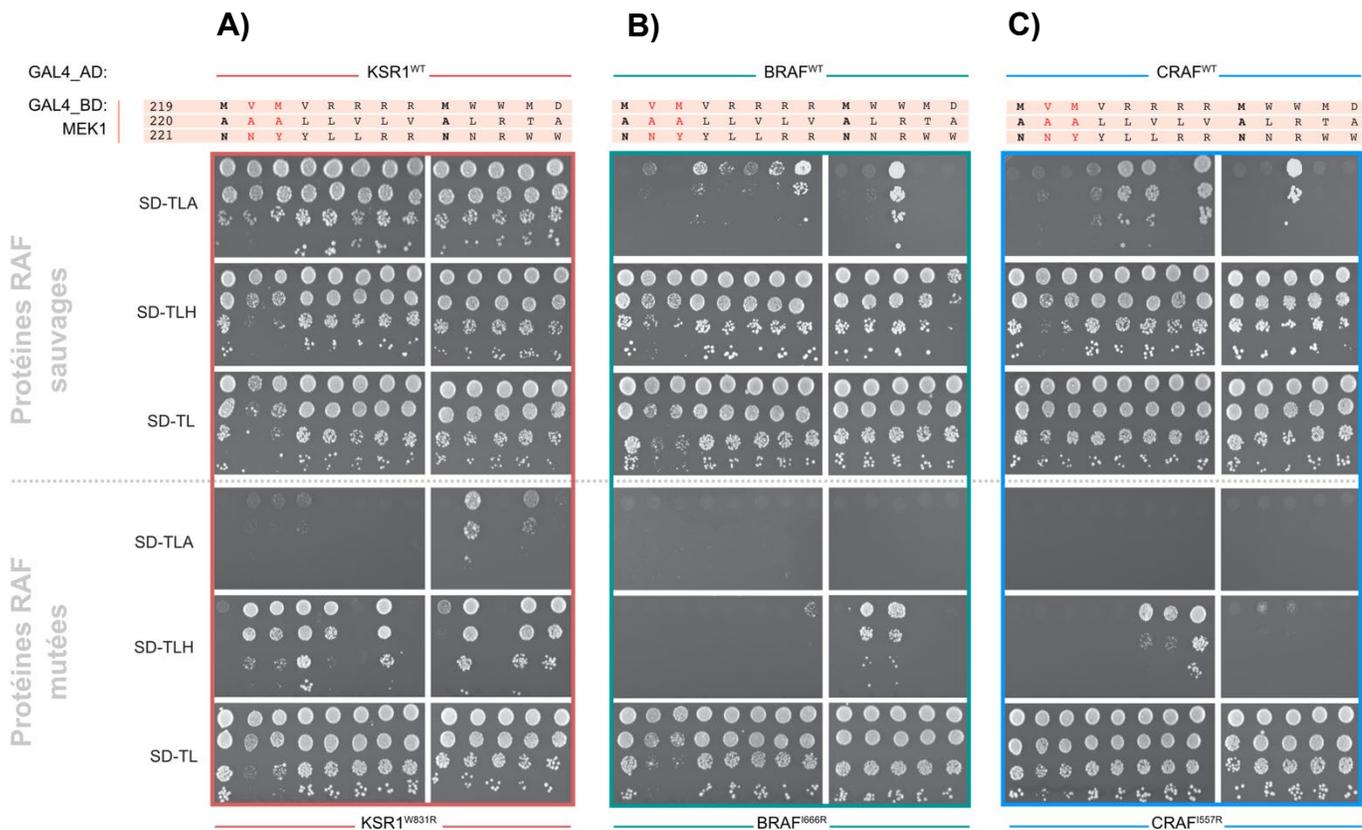


Figure 17 – Sélectivité des mutants de MEK1 pour KSR1, BRAF et CRAF sauvages ou mutées.

A) Interactions des mutants de MEK1 avec KSR1 (en haut) ou KSR1^{W831R} (en bas) ;

B) Interactions des mutants de MEK1 avec BRAF (en haut) ou BRAF^{F1666R} (en bas) ;

C) Interactions des mutants de MEK1 avec CRAF (en haut) ou CRAF^{I557R} (en bas).

Les mutations de MEK1 aux positions 219 à 221 de sa BA issues des cribles sont indiquées dans l'encadré rose. La forme sauvage MEK1^{WT} (résidus « M-A-N » en gras) est présente dans chaque expérience sur la première colonne de chaque panneau, suivi des différents mutants de MEK1. Les mutants de MEK1 indiqués en rouge (« V-A-N » et « M-A-Y ») correspondent à des substitutions uniques où seul un des trois acides aminés du motif M-A-N a été permuté.

À l'exception des interactions comprenant KSR1 sauvage, la force de chacune des interactions peut être évaluée sur les deux milieux de sélection (SD-TLH et SD-TLA). Sept mutants de MEK1 augmentent significativement l'interaction de MEK1 avec BRAF^{WT} comme l'indique la présence de levures sur milieu de stringence le plus élevée (SD-TLA). Parmi elles, la mutation W-R-R est la plus forte puisque des colonies de levures sont observées à toutes les concentrations d'ensemencement (**Figure 17.B, colonne 11, en haut**). La mutation W-R-R induit un gain

d'interaction suffisant pour restaurer l'interaction de MEK1 avec BRAF^{I666R}. Un gain similaire est observé pour la mutation W-L-N mais est en contradiction avec l'absence d'interaction observée avec BRAF^{WT} (**Figure 17.B, colonnes 11 et 12, en bas**). 6 mutants de MEK1 augmentent significativement l'interaction MEK1/CRAF. Parmi eux, les mutants R-V-L et R-V-R ont le plus d'impact sur l'interaction puisqu'une interaction est détectée avec CRAF ainsi qu'avec le mutant CRAF^{I557R} « perte d'interaction » (**Figure 17.C, colonnes 6 et 8**). Il est intéressant de noter qu'il semble y avoir une spécificité d'interaction dans la mesure où le mutant R-V-L de MEK1 se lie avec plus d'affinité à CRAF qu'à BRAF. Plus globalement, les triples mutations apportent des gains d'interaction plus important comparativement aux substitutions simples (**Figure 17.B et C, colonnes 2 et 3**).

Comme mentionné plus haut, l'affinité de MEK1 est plus importante vis-à-vis des protéines KSR que vis-à-vis des kinases (Roy et al., 2002), l'interaction MEK1/KSR est donc plus forte que les interactions MEK1/BRAF et MEK1/CRAF. Cette interaction est telle, qu'elle se situe au-delà des limites de détection de l'essai de Y2H et sature le milieu de stringence le plus élevé. Ainsi, un gain d'interaction ne peut pas être évalué dans ces conditions (**Figure 17.A, haut**). De ce fait, la comparaison des mutants a n'a pu être réalisée qu'en utilisant le mutant KSR1^{W831R} « perte d'interaction ». Dix mutants de MEK1 augmentent significativement l'interaction MEK1/KSR1^{W831R}. Parmi eux, les mutants W-L-N et M-T-W présentent la plus forte interaction (**Figure 17.A, bas, colonnes 10 et 12**)

Le récapitulatif des résultats (**Figure 18**) permet d'identifier des mutants de MEK1 spécifiques d'un partenaire. Ainsi, il met en avant la spécificité du mutant MEK1^{RVL} pour CRAF (sauvage et muté) au détriment des interactions MEK1/BRAF et MEK1/KSR1. Ce mutant particulier constitue donc un outil avantageux pour étudier le dimère MEK1/CRAF de manière ciblée. Par ailleurs, la double substitution W-L-N a la capacité de restaurer l'interaction de MEK1 avec les mutants « perte d'interaction » de KSR1 et BRAF (KSR1^{W831R} et BRAF^{I666R}). Le gain apporté par ce mutant est donc supérieur à celui du mutant V-L-Y qui n'apporte un gain qu'à l'interaction de MEK1 avec BRAF sauvage.

		Mutants de MEK1									
		V L Y	R L L	R V L	R L R	R V R	W L N	W R R	M T W	D A W	
Protéines RAF	KSR1 ^{WT}										
	KSR1 ^{W831R}										
	BRAF ^{WT}										
	BRAF ^{I666R}										
	CRAF ^{WT}										
	CRAF ^{I557R}										

Figure 18 – Résumé des résultats de la Figure 16.

Les mutants de MEK1 induisant un gain d'interaction avec un des partenaires d'interaction de MEK1 sont indiqués par une case colorée. Les cases rouges indiquent un gain d'interaction avec KSR1 sauvage ou mutée, les cases vertes avec BRAF sauvage ou mutée, les bleues avec CRAF sauvage ou mutée.

Les mutants décrits ci-dessus ont eu une importance considérable dans l'étude du complexe MEK1/BRAF/KSR1, notamment pour élucider la dualité de MEK1 jouant ici à la fois le rôle de substrat et celui d'activateur allostérique de BRAF.

Par la suite, les mutants MEK1^{WLN}, KSR1^{W831R}, BRAF^{I666R} ont été introduits dans les formes pleines longueurs des protéines correspondantes et exprimés dans des cellules humaines. Des expériences, de co-surexpressions et de co-immunoprécipitations, qui ne sont pas présentées dans cette thèse, ont permis de confirmer les résultats obtenus par Y2H et d'analyser l'impact de ces mutations sur l'activation de MEK dans un contexte de protéines pleines longueurs. Ces résultats combinés à l'utilisation d'autres outils moléculaires ont permis de disséquer les interactions BRAF/KSR1, MEK1/KSR1 et MEK1/BRAF aboutissant à un nouveau modèle qui illustre le rôle de MEK1 sur la formation du dimère BRAF/KSR1.

3.1.4 Conclusions et perspectives

Dans cette première partie, nous nous sommes focalisés sur l'étude de l'interaction des domaines kinase des protéines BRAF et KSR1 avec MEK1. Nous avons montré que l'interaction de MEK1 et de ses partenaires passe par une interface impliquant des structures secondaires spécifiques : leur hélice αG et leur boucle d'activation. La perturbation de l'une ou l'autre de ces structures est suffisante pour impacter significativement l'interaction des protéines RAF avec MEK1. Nous avons également déterminé que la nature des acides aminés de la boucle d'activation

de MEK1 avait un impact non négligeable sur ces interactions. En modulant la séquence en acide amines M-A-N (positions 219, 220 et 221), nous avons modifié la force d'interaction de MEK1 avec l'une ou l'autre des protéines RAF.

Ces mutants de MEK1 ont été utilisés comme outils moléculaires dans de nombreuses expériences complémentaires, notamment pour moduler la formation des interactions MEK1/KSR1, MEK1/BRAF et BRAF/KSR1. Grâce à cela, un nouveau modèle d'interaction mettant en jeu les domaines kinases des protéines MEK1/BRAF/KSR1 a été proposé. Ce modèle représente une version alternative du modèle existant (Brennan et al., 2011), en particulier vis-à-vis de la « directionnalité » des événements aboutissant à la phosphorylation de MEK1.

Ce modèle repose principalement sur l'observation que BRAF phosphoryle préférentiellement des molécules MEK1 « libres », non liées à KSR1. Il existerait ainsi deux « pools » de molécules de MEK1 dans les cellules. Le premier pool serait constitué de molécules de MEK1 pré-associées à KSR1 (ou « MEK1 activatrices »). Le second pool se composerait de molécules de MEK1 libres (ou « MEK1 substrats »). Dans la situation où la voie RAS-ERK est activée, le pool de « MEK1 activatrices » présenterait KSR1 à BRAF et provoquerait la formation du dimère BRAF/KSR1. En conséquence, KSR1 transactiverait BRAF qui phosphorylait les molécules « MEK1 substrats ». Ici, BRAF est donc activée allostériquement par son propre substrat MEK1. Il est important de noter que « MEK1 activatrice », c'est-à-dire liée à KSR1, n'a pas besoin d'être activée pour stimuler BRAF. On peut donc supposer que MEK1 participe à sa propre activation par un phénomène d'auto-amplification lorsque la voie RAS-ERK est activée *via* le complexe MEK1/KSR1/BRAF (**Figure 19**).

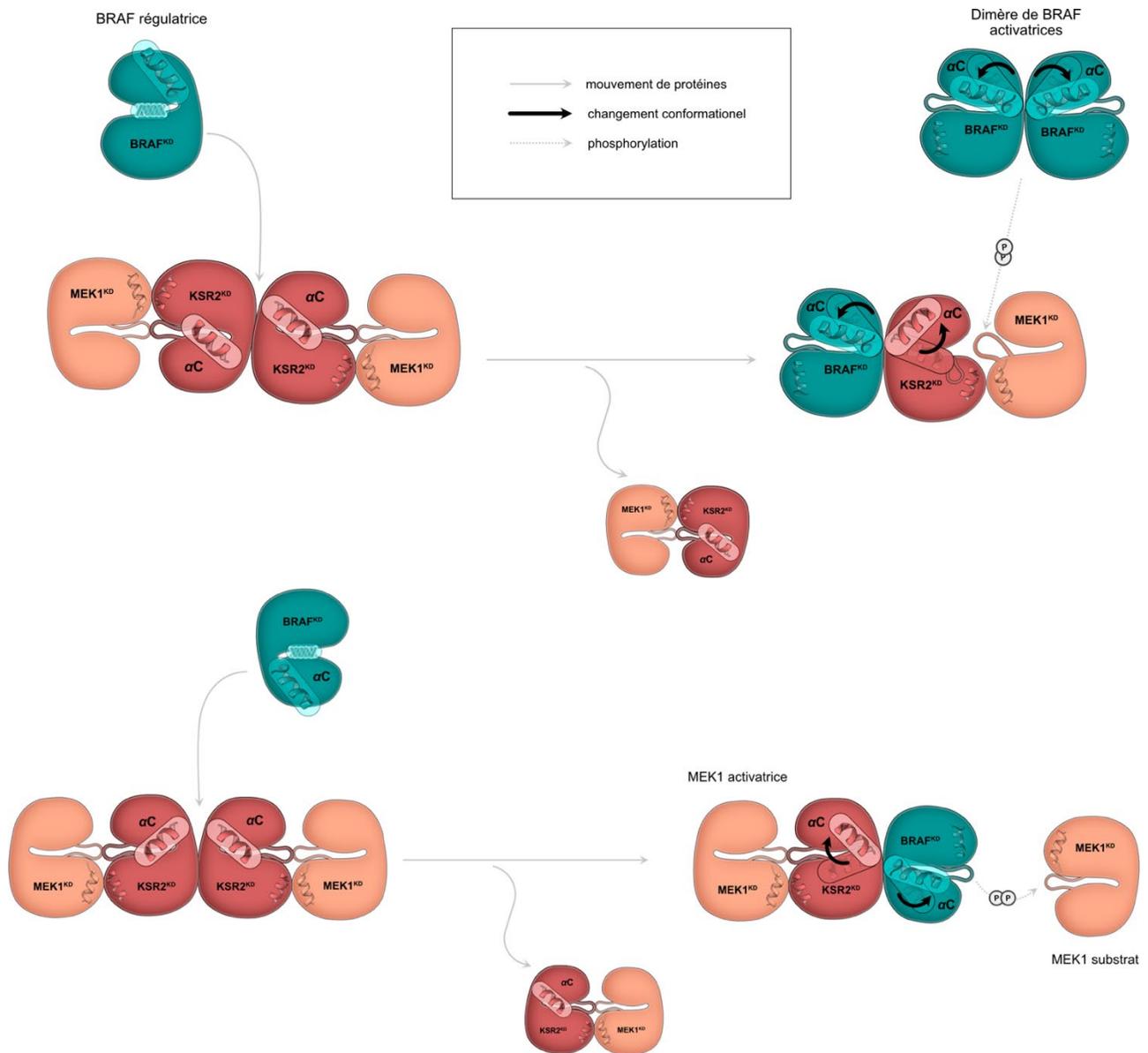


Figure 19 – Modèle des interactions du complexe BRAF^{KD}/KSR1^{KD}/MEK1^{KD}.

Comparativement au modèle de Brennan et collaborateurs (en haut), le complexe MEK1^{KD}/KSR1^{KD} (en saumon et rouge respectivement) sert ici d'unité d'activation pour BRAF. Dans sa forme désinhibée, l'interface de dimérisation du KD de BRAF (bleu) est disponible pour dimériser avec le KD de KSR1. Cette compétition déplace un des complexe MEK1/KSR1 permettant à BRAF d'être transactivée par KSR1 qui est amenée dans ce contexte par une molécule MEK1 « activatrice ». Une fois activée, BRAF phosphoryle une molécule de MEK1 appartenant au pool « substrat » disponible dans la cellule et non associée à KSR1. Ce schéma a été adapté à partir de l'article Lavoie et al. 2018. La structure de BRAF^{KD}/KSR1^{KD} n'étant pas disponible, nous avons choisi de représenter cette interaction « tête-bêche » ; les mouvements des hélices αC sont hypothétiques.

Dans cette partie, nous nous sommes focalisés sur l'étude de l'interaction des domaines kinase des protéines BRAF, KSR1 avec MEK1. Le modèle dévoile un nouveau mode de régulation allostérique de MEK1 sur la formation du dimère BRAF/KSR1 mais qui ne tient pas compte des régions NTR. À partir de ces résultats, nous pouvons supposer que ce modèle d'interaction est également valable pour le complexe MEK1/KSR1/CRAF où MEK1 servirait également d'activateur allostérique à CRAF. Aucun élément ne nous permet d'expliquer ce qui permet à la protéine KSR1 de discriminer les isoformes des kinases RAF les unes des autres. Il a ainsi été important d'évaluer l'impact des régions N-terminales régulatrices des protéines RAF et KSR sur la formation des hétérodimères RAF/KSR.

3.2 Le domaine BRS de BRAF est essentiel à l'interaction BRAF/KSR1

3.2.1 Contexte

Le cycle d'activation des kinases RAF se compose de plusieurs événements séquentiels, essentiels pour leur activation. Lors de son interaction avec la protéine RAS, la région *N*-terminale régulatrice (NTR) de RAF libère le domaine kinase (KD) exposant ainsi une surface d'interaction hautement conservée lui permettant d'atteindre un état actif par dimérisation (Lavoie and Therrien, 2015). Cet événement de dimérisation exerce une grande influence sur l'efficacité de transduction. Les cinq membres de la famille de protéines RAF possèdent tous une interface de dimérisation « côte-à-côte » extrêmement conservée dans le KD (Rajakulendran et al., 2009). La conservation de cette interface suppose l'existence de jusqu'à 15 dimères différents dans les cellules humaines contrairement aux cellules de drosophile chez qui il n'existe qu'une seule protéine RAF et qu'une seule protéine KSR.

Plusieurs études ont rapporté l'existence de différents dimères de RAF se formant en conditions physiologiques tels que BRAF/ARAF, BRAF/CRAF et BRAF/KSR1, pouvant chacune participer à l'activation de la voie RAS-ERK (Freeman et al., 2013b; Rajakulendran et al., 2009). Il est à noter que pour les hétérodimères de kinases RAF (tels que BRAF/CRAF), il est nécessaire de stimuler la voie par l'activation en amont des protéines RAS pour induire la phosphorylation de MEK. Les hétérodimères formés d'une kinase RAF et d'une protéine KSR dépendent aussi de l'activation des protéines RAS lors du phénomène de transactivation où la protéine KSR stimule l'activité catalytique de RAF comme chez la drosophile (Roy et al., 2002). Cependant, dans des

conditions de surexpressions non physiologiques, l'hétérodimère BRAF/KSR1 peut se former indépendamment de la présence ou non de la protéine RAS. Chez l'homme, KSR1 pourrait en théorie, transactiver trois isoformes de kinases RAF (ARAF, BRAF ou CRAF) pour induire la phosphorylation de MEK. Nous avons voulu déterminer si l'activation de MEK par un dimère RAF/KSR est possible quelle que soit l'isoforme des kinases RAF utilisées.

Nous avons donc modulé les quantités de kinases BRAF et CRAF exprimées en pleine longueur dans les cellules, en co-surexpression avec KSR1. Les résultats montrent que c'est en présence des protéines BRAF et KSR1 que l'activation de MEK1 est la plus forte (**Figure 20.A : panneau « anti-pMEK »**). Nous constatons aussi que cette activation est directement corrélée aux quantités de BRAF et de KSR1 transfectées dans les cellules. Une expérience de co-immunoprécipitation a été réalisée pour déterminer si la phosphorylation de MEK est liée à la formation du dimère BRAF/KSR1. Cette expérience montre ainsi que le dimère de BRAF/KSR1 se forme préférentiellement au dimère CRAF/KSR1 (**Figure 20.B : comparer les colonnes 3 et 5, panneau « anti-Pyo »**). Cette association est potentialisée par la présence de la protéine MEK1 (**Figure 20.B : comparer les colonnes 2 et 3, panneau « anti-Pyo »**).

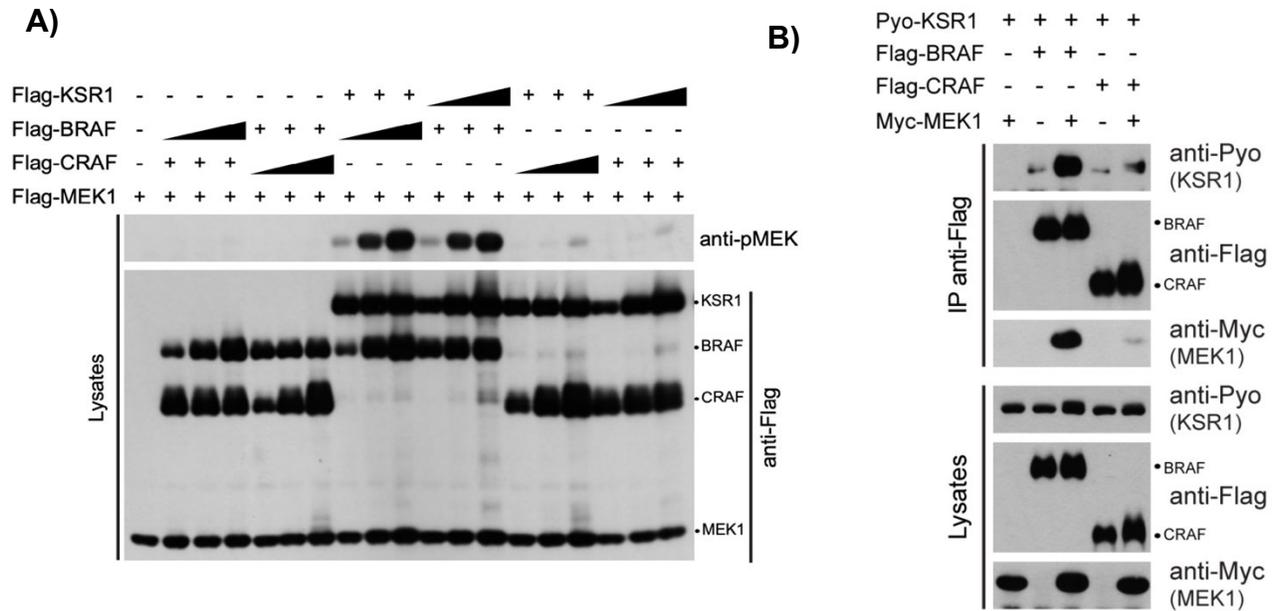


Figure 20 – Activation de MEK1 après co-expression des protéines KSR1, BRAF ou CRAF et formation de dimères.

A) Les protéines *KSR1*, *BRAF* ou *CRAF* portant l'étiquette « Flag » ont été co-surexprimées avec la protéine *Flag-MEK1* selon différentes conditions dans des cellules *HEK293T*. L'activation de *MEK1* a été évaluée en mesurant les niveaux de *pMEK1* par Western Blot. Trois quantités différentes de plasmides ont été testées pour chacune des protéines *RAF* (triangles noirs).

B) Les protéines *BRAF* ou *CRAF* ont été immunoprécipitées à l'aide de leur étiquette *Flag*. La protéine *KSR1* porte l'étiquette *Pyo* ce qui permet de suivre son association à *BRAF* ou *CRAF*.

Les anticorps utilisés sont indiqués sur la droite. *pMEK* : *MEK* phosphorylée. Ces expériences ont été publiées dans l'article Lavoie et al. 2018 (Figure 3.a et Extended Data Figure 6.a) et ont été réalisées par M. Sahmi.

Comme vu précédemment (**Figure 19, p. 99**), la formation du dimère *BRAF/KSR1* est favorisée par le substrat *MEK1* lui-même au niveau de leur domaine kinase. Les kinases *BRAF* et *CRAF* possèdent une interface de dimérisation similaire dans leur *KD* dont les séquences sont conservées à 96 %. Aucun mécanisme n'explique à ce jour pourquoi *KSR1* s'associe davantage à l'isoforme *BRAF* que l'isoforme *CRAF*.

Pour rappel, l'auto-inhibition des kinases *RAF* repose sur le repliement de la région *NTR* sur le *KD*. Cette auto-inhibition est impossible si les régions *NTR* de *CRAF* et *BRAF* sont interverties, corroborant leur degré moyen de conservation (60 %) et une différence importante dans leur fonctionnalité (Tran et al., 2005). Nous avons donc proposé que ce sont les différences entre les

NTR de BRAF et CRAF qui favorisent l'association de BRAF avec KSR1 par rapport à celle de CRAF avec KSR1.

3.2.2 La spécificité d'interaction des régions NTR

3.2.2.1 BRAF^{NTR} interagit spécifiquement avec KSR1^{NTR}

Nous nous sommes ainsi focalisés sur l'étude des régions *N*-terminales des protéines BRAF, CRAF et KSR1 et des domaines qui les composent. Afin de tester les interactions entre les régions NTR des protéines RAF, des expériences en double hybride dans la levure ont été réalisées. Dans un premier temps, les NTR de BRAF, CRAF, et KSR1 ont été clonés dans les plasmides pGADT7 et pGBKT7 pour évaluer leur interaction en Y2H. Le niveau de croissance relatif des levures montre que le dimère KSR1^{NTR}/BRAF^{NTR} se forme préférentiellement au dimère KSR1^{NTR}/CRAF^{NTR} (**Figure 21**).

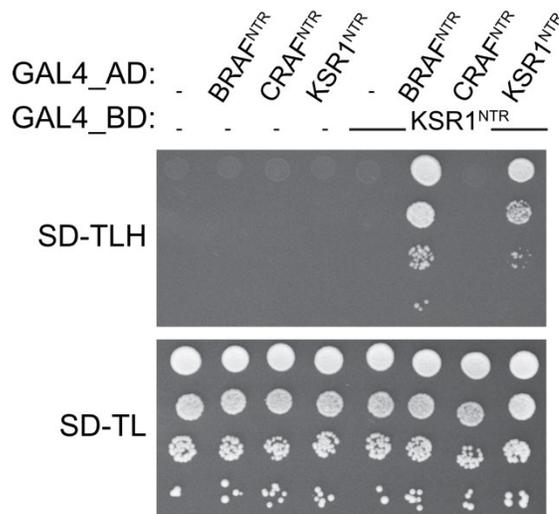


Figure 21 – Mesure des interactions de KSR1^{NTR} avec BRAF^{NTR}, CRAF^{NTR} ou KSR1^{NTR}.

Les séquences correspondant aux NTR de BRAF, CRAF ou KSR1 ont été fusionnées au domaine activateur de GAL4 (AD) ou au domaine liant l'ADN de GAL4 (BD); SD-TL : milieu de sélection non-stringent des transformants ; SD-TLH : milieu de sélection de niveau de stringence modérée ; Les conditions 1 à 5 sont des contrôles expérimentaux. Ces expériences ont été publiées dans l'article Lavoie et al. 2018. La version originale, non modifiée de ces résultats est présentée dans cette thèse.

Ainsi, en isolant les régions *N*-terminales (NTR) de leur domaine kinase, nous avons constaté que la spécificité de KSR1 pour BRAF est indépendante de leur domaine kinase respectif. Il est intéressant de noter que l'homodimère KSR1^{NTR}/KSR1^{NTR} est également détecté en Y2H. Ces résultats ont successivement été confirmés par BRET et co-IP dont la sensibilité accrue a montré que l'association KSR1/KSR1 est la plus forte. L'étude particulière de l'homodimérisation de KSR1 a fait l'objet d'un autre projet de doctorat et sera brièvement abordé dans la discussion.

De manière intéressante, BRAF est l'isoforme partageant le plus d'homologie de séquence avec son orthologue chez la drosophile, RAF, où l'on retrouve une extension d'une centaine d'acides aminés au niveau de son extrémité *N*-terminale. Une analyse de prédiction des structures secondaires de cette extension dans RAF a révélé la présence probable de deux hélices α , résultat qui a été confirmé par dichroïsme circulaire, suggérant que cette extension est structurée en un domaine (Ding et al., 2010). En alignant la séquence en acides aminés de ce domaine chez une dizaine d'autres espèces de métazoaires, il a été observé que ce domaine est extrêmement conservé et possède une répétition de résidus hydrophobes organisés en motif (voir Annexe 1 : Extended Data Figure 7.b). Ce type de répétition est habituellement rencontré dans des motifs structuraux de type « coiled-coil » (Gromiha and Parry, 2004). Ainsi, chez l'Homme, BRAF possède également une extension d'une centaine d'acides aminés (Terai and Matsuda, 2006), absent des isoformes ARAF et CRAF. Ce domaine spécifique à BRAF a donc été nommé le BRS (« BRAF Specific domain »).

Ces données ont abouti aux hypothèses suivantes : 1) ce domaine pourrait être nécessaire à l'interaction de KSR1 avec BRAF, 2) sa présence dans BRAF expliquerait la spécificité d'interaction de BRAF avec KSR1 et 3) ce domaine serait composé d'un motif hélicoïdal en épingle à cheveux.

3.2.2.2 Le BRS est nécessaire à l'interaction de BRAF^{NTR} avec KSR1^{NTR}

Dans un premier temps, nous avons déterminé la séquence précise nécessaire à l'interaction KSR1^{NTR}/ BRAF^{NTR}. Dans ce but, des expériences de co-immunoprécipitation entre KSR1^{NTR} et des formes tronquées de BRAF^{NTR} ou entre KSR1^{NTR} et des formes tronquées de BRAF^{NTR} ont été testées (**Figure 22**). Ces expériences ont montré que la délétion du domaines BRS ou de celle du domaine CRD (ou CRD^{BRAF}) déstabilise l'interaction KSR1^{NTR}/ BRAF^{NTR}. Du coté de KSR1, l'interaction est impactée par la délétion du CC-SAM et également du domaine (ou CRD_{KSR1})

(Lavoie et al., 2018 : **Extended Data Figure 6.d**). La délétion du domaine CC-SAM a un impact plus modéré sur l'interaction de BRAF^{NTR}/KSR1^{NTR}.

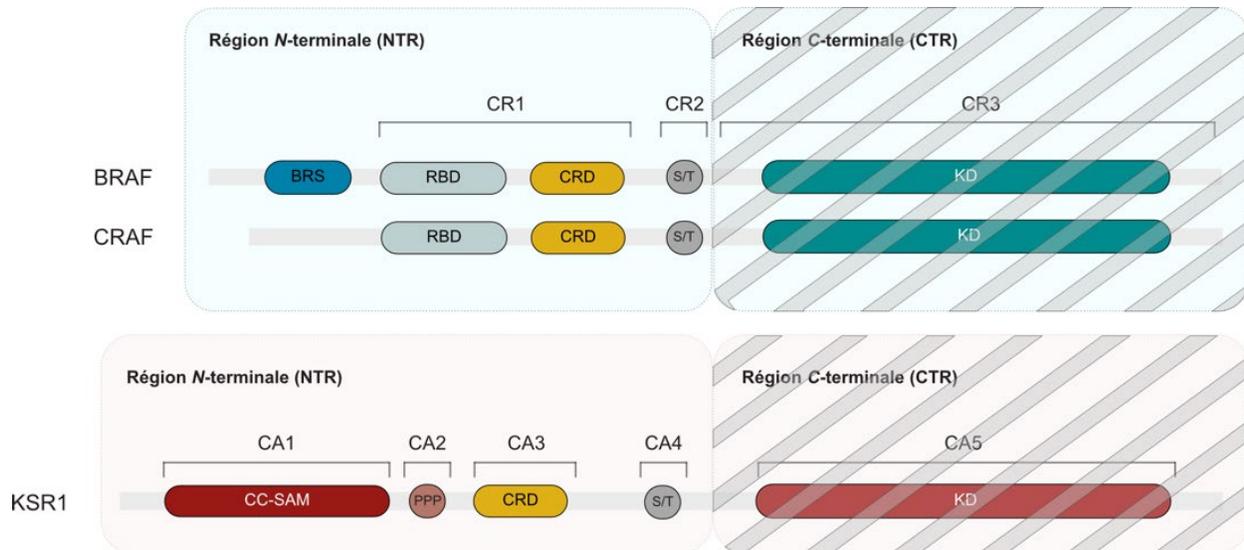


Figure 22 – Les domaines des régions NTR de BRAF, CRAF et KSR1.

Afin de déterminer les éléments guidant la spécificité d'interaction de BRAF et KSR1, seules les régions NTR de BRAF, CRAF et KSR1 ont été conservées. La kinase BRAF se distingue de l'isoforme CRAF par la présence d'un domaine additionnel, le BRS (bleu foncé). KSR1 possède un domaine CC-SAM qui est unique aux protéines KSR.

BRS : BRAF specific Sequence; RBD : Ras-Binding Domain; CRD : Cysteine-Rich Domain; CC-SAM : Coiled-Coil Sterile Alpha Motif, S/T : Serine/Threonine rich sequence, PPP : Proline rich sequence, KD : Kinase Domain.

Afin de valider ce résultat par une méthode supplémentaire, cette forme tronquée de BRAF^{NTR} ou « BRAF^{NTR}ΔBRS » a également été évaluée par le système de double hybride de levure. Plusieurs mutations du BRS qui ont des effets moins délétères sur la structure du NTR que l'ablation complète du domaine BRS ont également été testées. Il s'agit de mutants avec doubles ou triples substitutions de résidus conservés et jugés essentiels à l'interaction du BRS avec KSR1. Ces résidus ont été ciblés à partir de leur degré de conservation au sein dans les domaines BRS des autres eucaryotes. Enfin dans KSR1, le mutant LGRS (L56G/R57S) a été précédemment caractérisé comme perturbant l'interaction de KSR1 avec BRAF (McKay et al., 2009). Ce mutant a donc également été intégré à notre essai. Ce mutant, découvert à l'origine dans un crible génétique dépendant de RAS (Therrien et al., 1995) est localisé dans le domaine CC-SAM, uniquement retrouvé dans les protéines KSR (**Figure 23.A**).

Comparativement à son interaction avec la protéine BRAF^{NTR} sauvage (**Figure 23.B, colonne 4**), KSR1^{NTR} n'interagit plus avec les formes mutées ou tronquée de BRAF^{NTR}. Le domaine BRS est donc bien nécessaire à l'interaction de BRAF^{NTR} avec KSR1^{NTR}, puisque sa troncation ou la perturbation de son repliement, impactent cette interaction. Dans le cas où KSR1^{NTR} est mutée (mutant LGRS du CC-SAM), l'interaction KSR1^{NTR} / BRAF^{NTR} est également impactée confirmant l'importance du domaine CC-SAM dans l'interaction KSR1/BRAF (McKay et al., 2009; Roy et al., 2002). À l'inverse de la co-immunoprécipitation dont les partenaires sont principalement cytoplasmiques, l'interaction KSR1^{NTR}/BRAFF^{NTR} observée en Y2H est nucléaire. Cette localisation subcellulaire différente modifie l'environnement immédiat des protéines (présence de membranes cellulaires et interactions avec les protéines RAS entre autres).

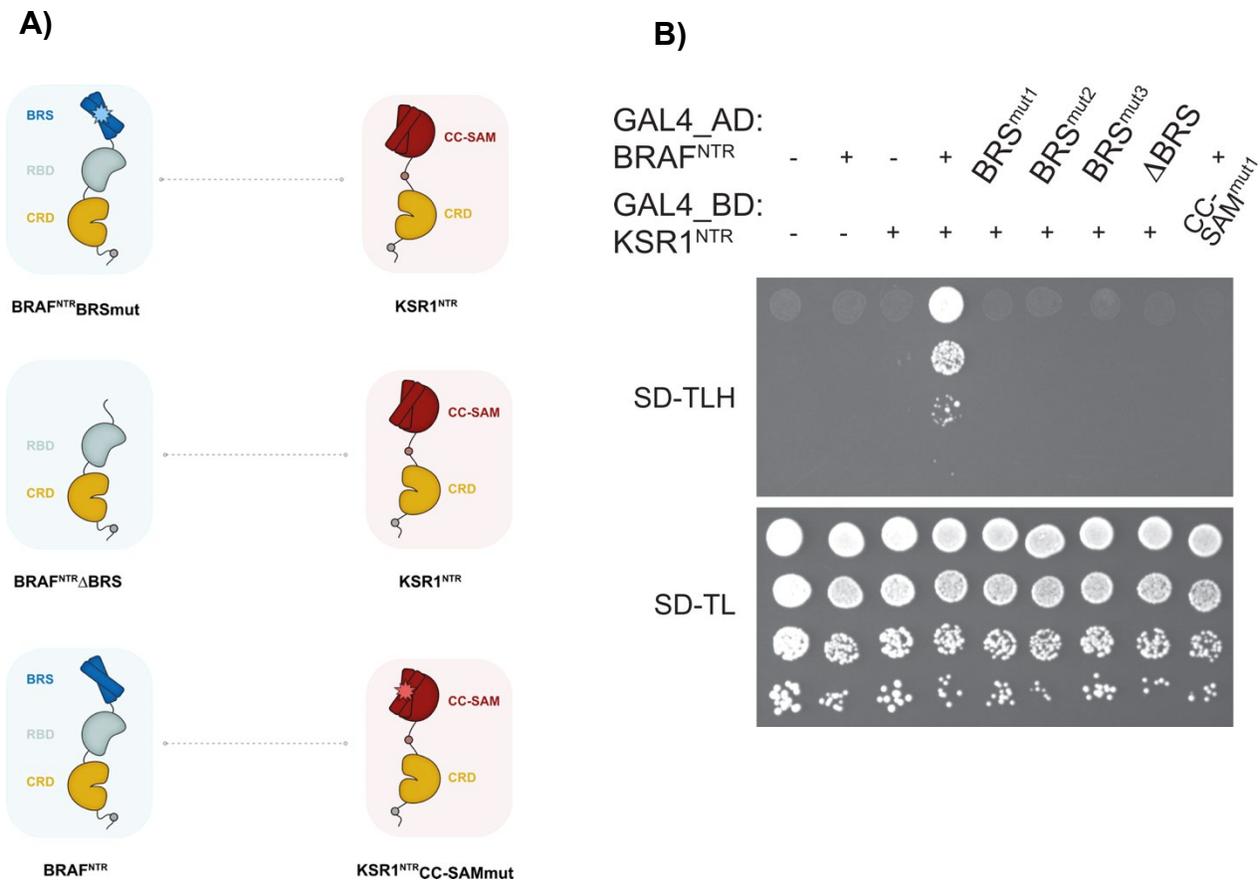


Figure 23 – Effet de la mutation/déplétion du BRS ou de la mutation du CC-SAM sur l’interaction de BRAF^{NTR} avec KSR1^{NTR}.

A) Schéma indiquant la localisation des mutations et la troncation générées dans cette expérience.
 B) Les conditions 1 à 3 sont des contrôles expérimentaux. La condition 4 mesure l’interaction des formes sauvages de BRAF^{NTR} et KSR1^{NTR}. Expérience de Y2H réalisée de la même façon que dans l’expérience précédente.
 BRS^{mut1} à BRS^{mut3} : mutants du domaine BRS de BRAF^{NTR}; ΔBRS : délétion du domaine BRS de BRAF^{NTR};
 CC-SAM^{mut1} : mutation du domaine CC-SAM de KSR1^{NTR}.

Nous avons également testé l’interaction des formes mutées ou tronquées de BRAF^{NTR} avec CRAF^{NTR} et avec KSR2^{NTR} afin de s’assurer de la spécificité des effets observés précédemment. L’interaction CRAF^{NTR} /BRAFF^{NTR} n’est pas détectable en Y2H (Figure 24.A) ce qui confirme les résultats précédents indiquant qu’en l’absence de l’activation préalable des protéines RAS, le dimère CRAF/BRAF ne se forme pas (Figure 20, p. 102). De façon plus surprenante, BRAF^{NTR} n’interagit pas avec KSR2^{NTR} qui possède également un CC-SAM (Figure 24.B). La différence de séquence entre les deux isoformes KSR1 et KSR2 pourrait expliquer l’absence d’interaction entre BRAF^{NTR} et KSR2^{NTR}. Comme pour les conditions avec BRAF^{NTR} sauvage, les mutations du BRS ou sa délétion ne permettent aucune interaction avec CRAF^{NTR} ou avec KSR2^{NTR}. Il y a donc bien une spécificité d’interaction de BRAF^{NTR} pour KSR1^{NTR}.

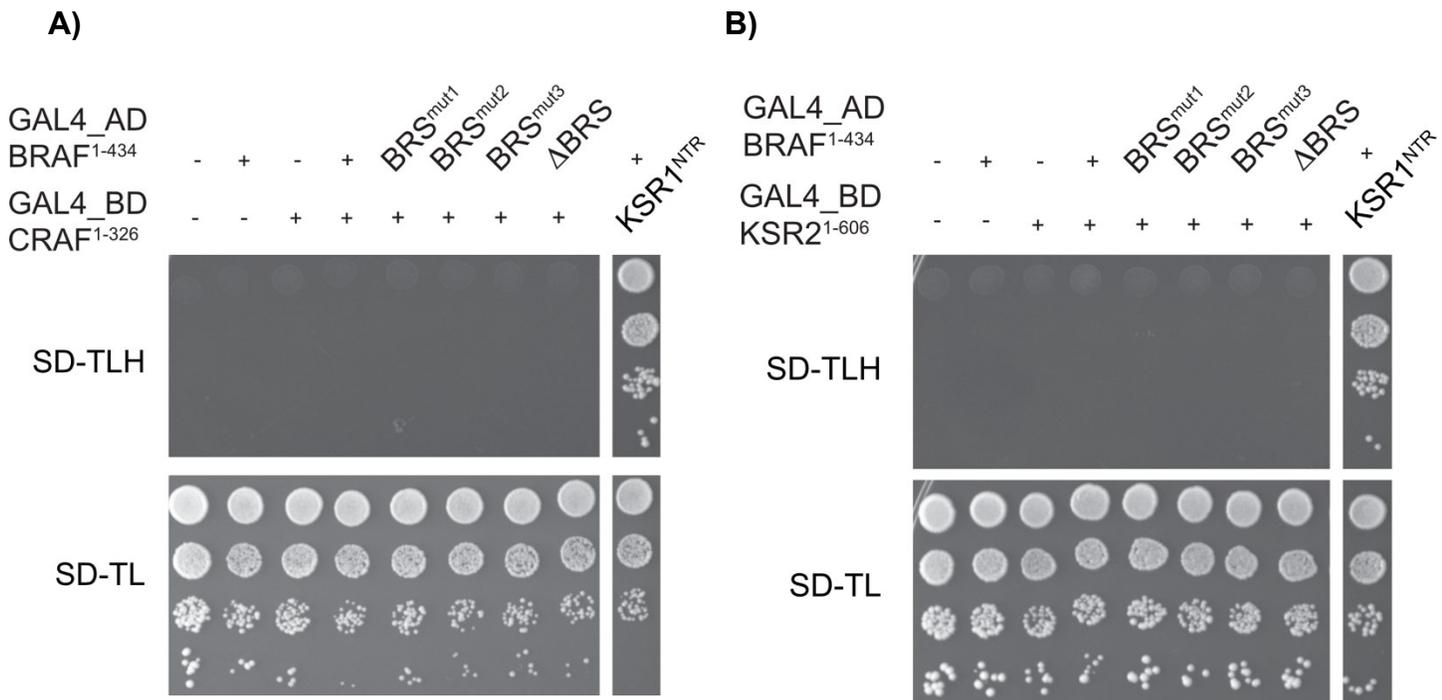


Figure 24 – Effet de mutations ou de la déplétion du BRS sur l'interaction de BRAF^{NTR} avec CRAF^{NTR} ou KSR2^{NTR}.

Les conditions 1 à 3 de chaque panneau sont des contrôles expérimentaux. La condition 4 mesure l'interaction BRAF^{NTR}/CRAF^{NTR} sauvage dans le panneau A) et BRAF^{NTR}/KSR2^{NTR} dans le panneau B). Pour chaque expérience, l'interaction BRAF^{NTR}/KSR1^{NTR} (condition 9) a également été testée. BRS^{mut1} à BRS^{mut3} : mutants du domaine BRS de BRAF^{NTR} ; ΔBRS : délétion du domaine BRS de BRAF^{NTR} ; CC-SAM^{mut1} : mutation du domaine CC-SAM de KSR1^{NTR}.

Les résultats impliquant la protéines KSR1 ont également été démontrés par co-IP et par BRET dans ces cellules de mammifères (Lavoie et al., 2018 : **Figure 3.b et Extended Data Figure 6.b**). Nous avons poursuivi l'étude du dimère KSR1^{NTR} /BRAFF^{NTR} pour déterminer quels sont les éléments de ces isoformes, responsables de leur spécificité d'interaction. Nous avons ainsi cherché à démontrer que la spécificité d'interaction de BRAF^{NTR} proviendrait de la présence du domaine BRS, absent des autres isoformes de RAF. Pour cela, une protéine chimère issue de la fusion du domaine BRS de BRAF avec CRAF^{NTR} a été générée. L'interaction de la chimère a été comparée aux formes sauvages de BRAF^{NTR} et de CRAF^{NTR}. La mutation du BRS (BRS^{mut1}) qui impacte l'interaction BRS/CC-SAM, a également été introduite dans la chimère (**Figure 25.A**).

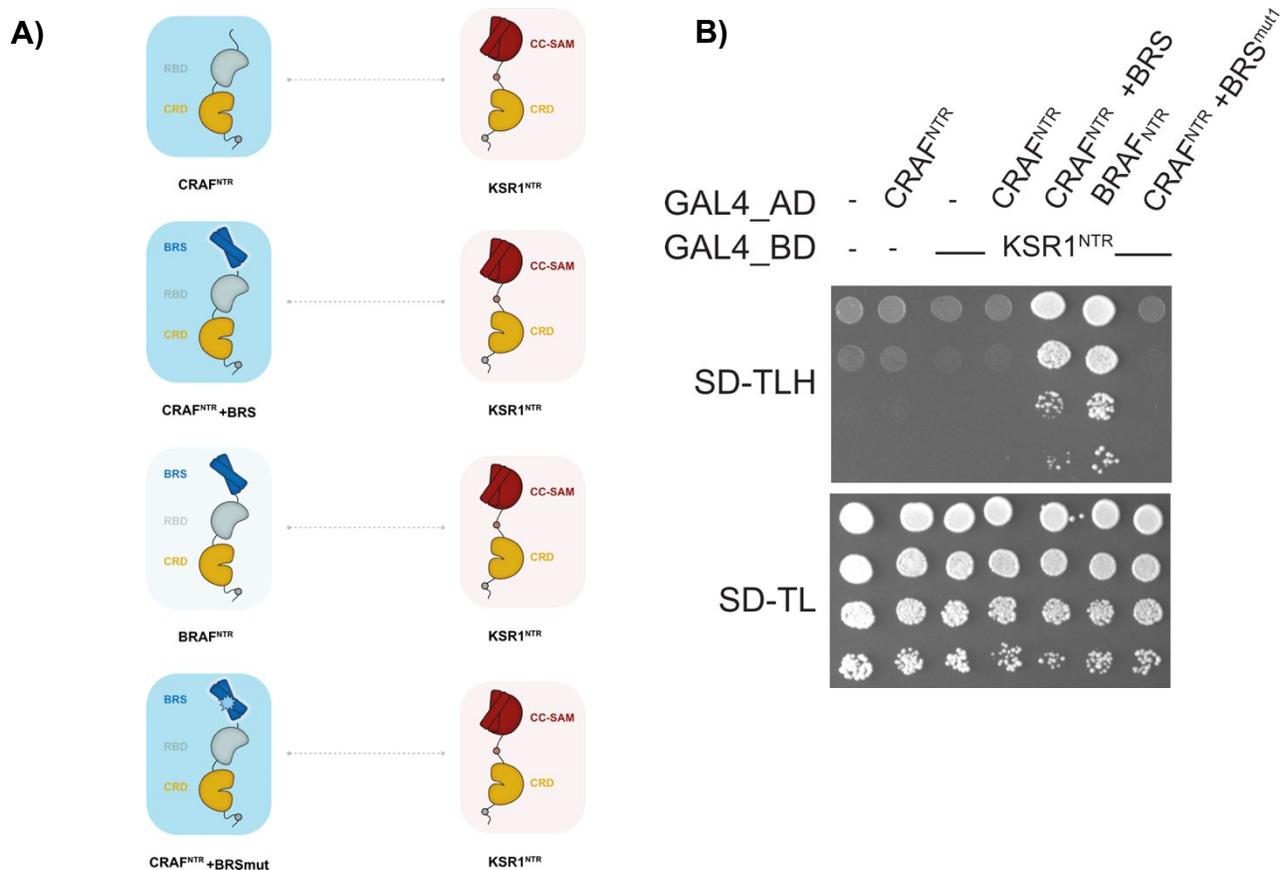


Figure 25 – Effet de l’ajout du domaine BRS à CRAF^{NTR} sur l’interaction de CRAF^{NTR} avec KSR1^{NTR}.

A) Schéma indiquant la localisation des mutations et des fusions générées dans cette expérience.

B) Les conditions 1 à 3 sont des contrôles expérimentaux. La condition 4 mesure l’interaction des formes sauvages de CRAF^{NTR} et KSR1^{NTR}.

+BRS : addition du domaine BRS; BRS^{mut1} : mutation du domaine BRS.

Alors qu’il n’y a pas d’interaction entre KSR1^{NTR} et CRAF^{NTR}, l’ajout du BRS à CRAF est suffisant pour permettre son interaction avec KSR1 (**Figure 25.B**). De plus, l’interaction CRAF^{NTR}+BRS/KSR1^{NTR} peut être affectée par l’introduction d’une mutation du domaine BRS, indiquant que c’est *via* ce domaine que l’interaction a lieu. Cette interaction CRAF^{NTR}+BRS/KSR1^{NTR} a également été démontrée en co-IP avec des constructions similaires (uniquement les NTR), mais aussi avec les protéines pleines longueurs (FL pour *Full Length*). Dans ce contexte, l’interaction CRAF^{FL}+BRS/ KSR1^{FL} conduit également à l’activation de MEK, indiquant que KSR1 a transactivé CRAF^{FL}+BRS. L’addition du BRS est suffisante pour que CRAF acquiert la même fonctionnalité que BRAF : CRAF est activable par KSR1 pour stimuler la voie RAS-ERK (Lavoie et al., 2018 : **Figure 3.C et Extended Data Figure 7.g**). BRAF interagit donc

spécifiquement avec KSR1 par le biais du BRS. Au vu de ces résultats, nous avons par la suite voulu déterminer avec quel domaine de KSR1 interagit le BRS et si cette interaction est directe ou si elle nécessite une protéine intermédiaire.

3.2.3 Le domaine BRS et le domaine CC-SAM interagissent directement

3.2.3.1 Le BRS interagit avec le CC-SAM lorsque ces domaines sont exprimés isolément

Nous avons souhaité déterminer les points de contact qui s'établissent lors de l'interaction de KSR1^{NTR} avec BRAF^{NTR}. Pour ce faire, chaque domaine qui constitue les NTR de BRAF et de KSR1 a été cloné et exprimé en levure. À la différence des précédentes expériences en Y2H, les résultats obtenus ne sont pas présentés sous forme de dilutions sériées de levures (où une seule interaction correspond à 4 « spots » verticaux tels que dans la **Figure 25.B**). Dans cette expérience, chaque « spot » correspond à une interaction protéique spécifique nous permettant de comparer 25 interactions en parallèle. Pour en simplifier la lecture, nous avons attribué un nom à chacune de ces interactions en fonction de son emplacement (**Figure 26.A**).

L'interaction KSR1^{NTR}/ BRAF^{NTR} déjà détectée précédemment (**Figure 21.B, 6^{ème} colonne**) sert ici de contrôle expérimental, l'interaction étant détectée sur le milieu de stringence faible (SD-TLH) uniquement (**Figure 26.B : carrés pointillés**). Contrairement à un essai de co-IP (données non présentées), le domaine BRS de BRAF interagit avec le domaine CC-SAM de KSR1 même lorsque ces domaines ont été isolés de leur NTR respective. Cette interaction est de niveau comparable voire légèrement supérieure à l'interaction BRAF^{NTR} /KSR1^{NTR} car seules quelques colonies sont présentes sur le milieu de stringence supérieure (**Figure 26.B, SD-TLA : B2**). Une expérience de BRET a également confirmé la détection d'une interaction entre le domaine BRS et le domaine CC-SAM (Lavoie et al., 2018 : **Figure 3.C et Extended Data Figure 7.e**). L'absence d'interaction des domaines BRS et CC-SAM respectivement isolés de BRAF et KSR1, en co-IP peut être justifiée de deux façons. L'interaction mesurée a une affinité trop faible pour permettre sa détection par cette technique. de cette interaction. Les techniques de BRET et le Y2H utilisent des fusions de protéines (Rluc et YFP pour le BRET ; GAL4 pour le Y2H) qui ont l'avantage de stabiliser les domaines et/ou de les protéger de la dégradation.

Au vu des résultats précédemment décrits suggérant que les CRD participent à l'interaction KSR1^{NTR}/ BRAF^{NTR}, nous avons donc testé l'interaction des CRD l'un avec l'autre. Dans cet essai, les domaines CRD de BRAF et de KSR1 n'interagissent pas. Nous avons envisagé que ces domaines globulaires pouvaient être dénaturés ou moins stables lorsque exprimés en un domaine isolé (Zhou et al., 2002). Des fusions de domaines ont donc été générées entre soit le BRS et le domaine CRD_{BRAF} (BRS+ CRD_{BRAF}) pour BRAF soit le domaine CC-SAM et le domaine CRD_{KSR1} (CC-SAM+ CRD_{KSR1}) pour KSR1. De façon surprenante, les constructions BRS+CRD_{BRAF} et CC-SAM+ CRD_{KSR1} interagissent fortement avec les autres domaines, à l'exception des CRD isolés (**Figure 26.B, C3**). En effet, contrairement aux interactions BRS/CC-SAM ou KSR1^{NTR}/ BRAF^{NTR}, ces interactions sont détectées sur le milieu de stringence élevé (SD-TLA).

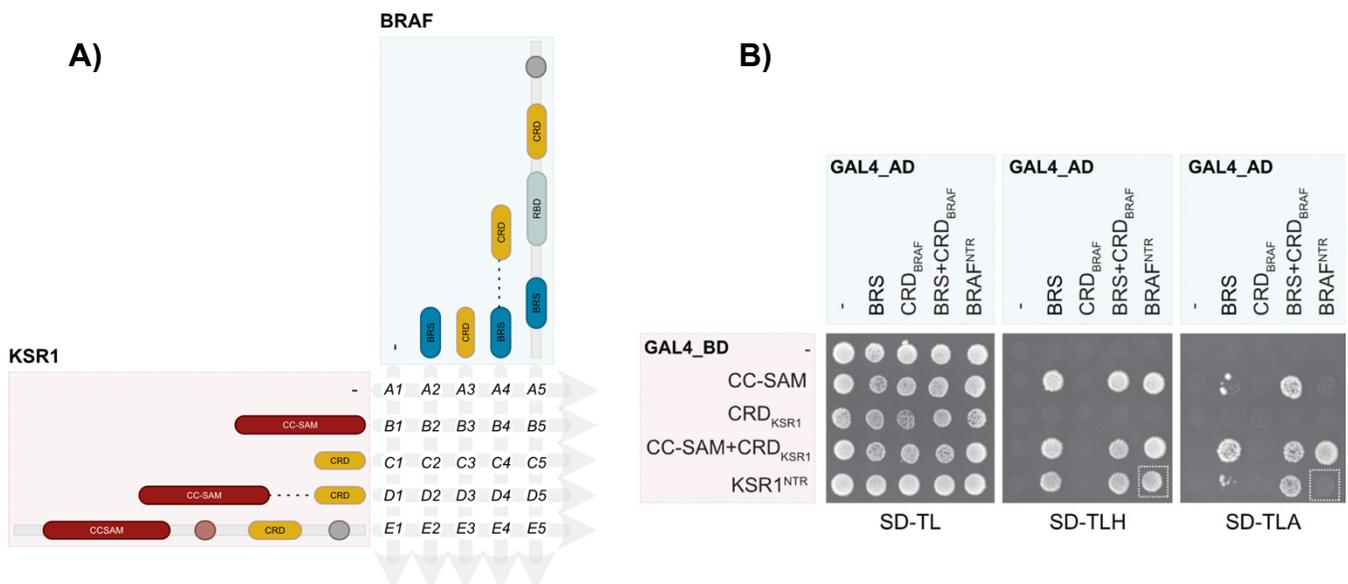


Figure 26 – Matrice d'interaction des domaines de BRAF^{NTR} et KSR1^{NTR}

A) Schéma représentant les interactions de différents domaines de KSR1^{NTR} et de BRAF^{NTR} testées en Y2H. Pour en simplifier la lecture, chaque interaction a reçu un code composé d'une lettre (pour la ligne) et d'un chiffre (pour la colonne). Cette matrice a été testée sur les trois milieux de sélection : SD-TL, SD-TLH et SD-TLA.

B) La ligne (A) et les colonnes (1) sont des contrôles expérimentaux. Chaque « spot » correspondant à une croisement de levures haploïdes, c'est-à-dire à une interaction.

BRS : BRAF specific Sequences; RBD : Ras-Binding Domain; CRD : Cysteine-Rich Domain; CC-SAM : Coiled-Coil Sterile Alpha Motif.

Il est intéressant de noter que la fusion BRS+CRD_{BRAF} interagit fortement avec le CC-SAM isolé (**Figure 26.B, SD-TLA : B4**) et la fusion CC-SAM+CRD_{KSR1} interagit fortement avec le BRS isolé (**Figure 26.B, SD-TLA : D2**). Ces résultats suggèrent que les domaines CRD respectifs de BRAF et de KSR1 renforcent l'interaction CC-SAM/BRS. En utilisant ces formes fusionnées artificielles (BRS+CRD_{BRAF} et CC-SAM+CRD_{KSR1}) des zones d'interaction seraient démasquées, notamment par l'absence du domaine RBD dans BRAF^{NTR}. Ces zones d'interaction pourraient être soit intermoléculaires (ex : un contact direct entre le domaine BRS de BRAF et le domaine CRD de KSR1) soit intramoléculaires (ex : un contact direct entre le domaine BRS de BRAF et le domaine CRD de BRAF). Des expériences de co-IP avec des formes tronquées de KSR1^{NTR} et BRAF^{NTR} ont confirmé l'importance des CRD dans l'interaction KSR1^{NTR}/ BRAF^{NTR} (Lavoie et al., 2018 : **Extended Data Fig.6d**). Les formes de BRAF ou KSR1 ne possédant plus de CRD n'interagissent plus ensemble, suggérant un rôle important de ce domaine dans l'interaction KSR1/BRAF.

Les résultats de Y2H et de BRET démontrant l'interaction BRS/CC-SAM n'indiquent en aucun cas une interaction directe mais ont permis la détection d'une interaction faible entre deux domaines qui n'avait jusqu'alors pas été identifiée par co-IP. Nous avons supposé que le domaine CC-SAM comporte une surface d'interaction lui permettant d'interagir directement avec BRS et inversement. Nous avons ensuite réalisé une étude structurale approfondie de chacun des domaines.

3.2.3.2 Purification du BRS et analyse structurale de l'interaction BRS/CC-SAM

Le domaine BRS n'ayant jamais été résolu par cristallographie aux rayons X ou en RMN, il a donc été exprimé puis purifié dans un système bactérien avec un rendement élevé et en l'absence de contaminations majeures (**Figure 27.A**).

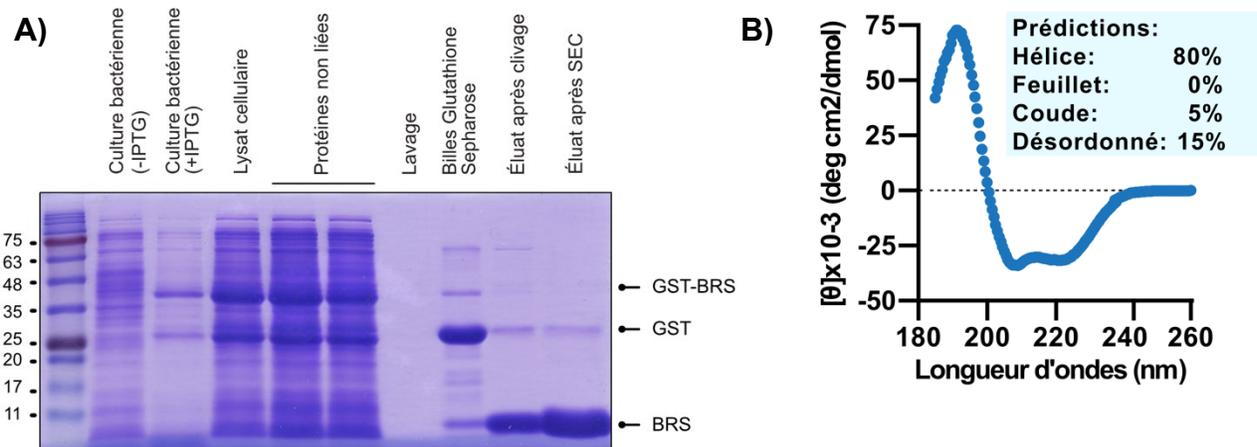


Figure 27 – Analyse du domaine BRS de BRAF.

A) Purification du domaine BRS de BRAF. Marquage au bleu de Coomassie des échantillons de chaque étape de la purification du BRS après migration sur gel SDS-PAGE.

B) Analyse du BRS par dichroïsme circulaire par L. Volpon. La répartition spectrale a pu être décomposée en les trois composantes structurales caractéristiques des protéines.

Chez la drosophile, le domaine BRS de dRAF a été analysé par dichroïsme circulaire révélant un spectre caractéristique « bilobé », indiquant la présence d'un domaine structuré ayant un contenu en hélices α de 77 % (Ding et al., 2010). Nous avons effectué une analyse similaire avec le domaine BRS issu de BRAF. Nous avons obtenu un profil spectral similaire ainsi qu'un contenu en hélices α proche de celui précédemment rapporté (80 %) (**Figure 27.B**). Ce résultat a donc corroboré l'hypothèse que le BRS est un domaine dont la structure est conservée entre espèces et possède un arrangement de type coiled-coil comme l'ont suggéré les analyses de bio-informatique.

La structure du CC-SAM a montré que ce domaine se compose d'un motif globulaire (SAM) et d'un motif « coiled-coil » d'hélices α (CC). Le domaine CC-SAM a également été purifié en suivant la méthodologie préalablement établie (Koveal et al., 2012). L'interaction *in vitro* du domaine BRS avec le domaine CC-SAM a été testé par RMN par l'équipe du Pr. Frank Sicheri à Toronto. Les domaines interagissent directement l'un avec l'autre avec une affinité faible (~ 100 à 200 μ M) en faisant intervenir le motif « coiled-coil » du CC-SAM (Lavoie et al., 2018 : **Extended Data Figure 8.a-g**). La structure du domaine BRS a ensuite été résolue par cristallographie aux rayons X, confirmant un repliement en deux hélices α antiparallèle en épingle à cheveux. Chacun des domaines ayant désormais une structure résolue, nous avons voulu identifier les résidus

directement impliqués dans l'interaction BRS/CC-SAM pour définir leur surface d'interaction. Pour surmonter la faible affinité des deux domaines l'un pour l'autre, le domaine BRS a été directement lié au domaine CC-SAM *via* un « linker » flexible composé d'une répétition de glycines et de sérines (GS). Chaque duplex de domaines a permis d'augmenter la probabilité d'interaction sans toutefois en entraver la dynamique de repliement. Ainsi un cristal composé de deux duplex a été obtenu. Les interactions BRS/CC-SAM sont en *trans* : le BRS du premier duplex interagissant avec le CC-SAM du second duplex et inversement (**Figure 28.A**). Cette structure a confirmé les résultats de RMN : le domaine CC-SAM engage les hélices de son motif « CC » (α 1-2 et α 3-4) qui sont stabilisées par un contact direct avec les hélices α antiparallèles (α 1 et α 2) du domaine BRS. (**Figure 28.B**).

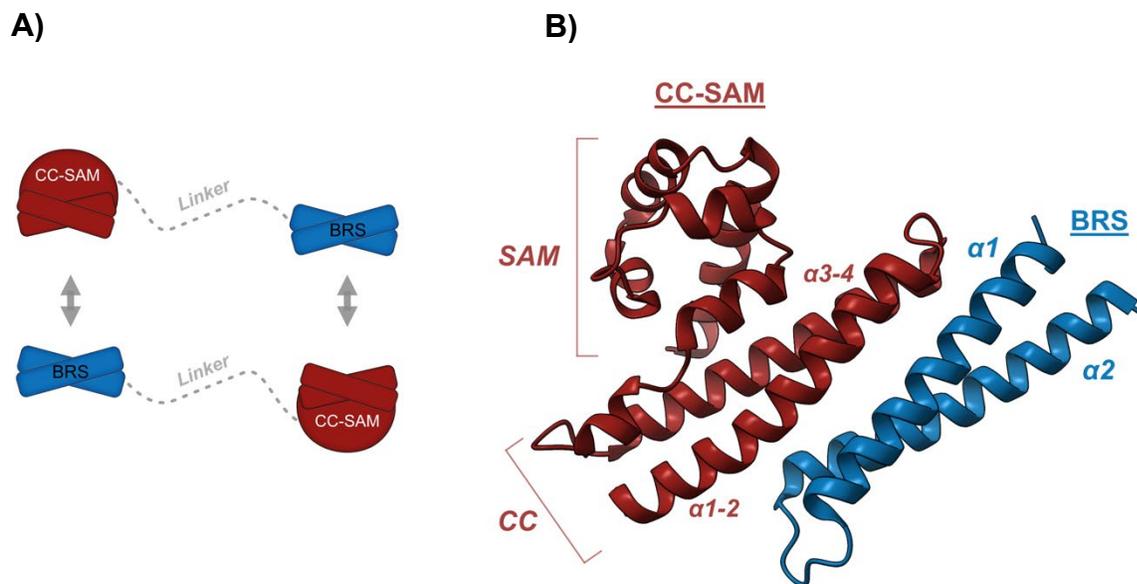


Figure 28 – Interaction du domaine CC-SAM de KSR1 avec le domaine BRS de BRAF

A) Schéma représentant les duplex CC-SAM-BRS qui ont été produits pour faciliter l'interaction CC-SAM/BRS.

B) Représentation de l'interaction CC-SAM/BRS d'après les données de cristallographie aux rayons X (Lavoie et al., 2018). Le domaine CC-SAM se compose d'un motif Coiled-coil (CC) constitué des hélices α 1-2 et α 3-4, et d'un motif SAM. Le domaine BRS est formé de deux hélices α 1 et α 2.

BRS : BRAF specific Sequences; CC-SAM : Coiled-Coil Sterile Alpha Motif.

Ces données de cristallographie ont par ailleurs été validées par l'introduction de mutations ponctuelles ciblant l'interface d'interaction entre les hélices α . Ces mutations ont pour effet d'impacter significativement l'interaction de BRAF et de KSR1 indiquant que l'interaction BRS/CC-SAM est essentielle pour le dimère BRAF/KSR1. Cette diminution d'interaction a également été couplé à une baisse des niveaux de pMEK indiquant que la transduction du signal qui découle du dimère BRAF/KSR1 est directement impactée (Lavoie et al., 2018 : **Figure 3.e et f**).

3.2.4 Conclusions et perspectives

Nous avons observé que le dimère BRAF/KSR1 se forme préférentiellement au dimère CRAF/KSR1. Nous avons voulu déterminer quels éléments de BRAF lui permettent de sélectivement interagir avec KSR1. Nous avons pu déterminer que la spécificité d'interaction de l'isoforme BRAF avec KSR1 repose sur leurs régions *N*-terminales respectives. L'isoforme BRAF a la particularité de posséder une extension contenant un domaine unique : le domaine BRS. Ce domaine permet à lui seul de forcer une interaction entre CRAF et KSR1, démontrant que c'est la présence de ce domaine dans BRAF qui lui donne sa spécificité d'interaction avec KSR1. Du côté de KSR1, nous avons montré que le domaine CC-SAM interagit avec le domaine BRS et ce, même en étant isolé du reste de KSR1. Nous avons pu en obtenir pour la première fois la structure du BRS et démontrer qu'il existe un contact direct entre le domaine BRS de BRAF et le domaine CC-SAM de KSR1. Cependant, cette interaction n'a été démontrée qu'à partir de domaines isolés et il n'existe aucune structure permettant de prendre en compte l'ensemble des domaines de la NTR. Ainsi, l'impact des domaines CRD sur l'interaction BRS/CC-SAM n'est pas intégré dans le contexte « intermoléculaire » de l'interaction BRAF/KSR1 (ex : influence du domaine RBD de BRAF sur le domaine CC-SAM de KSR1), ni dans un contexte « intramoléculaire » (ex : influence du domaine CRD_{KSR1} sur le domaine CC-SAM). Comme l'ensemble des protéines de la famille RAF, BRAF et KSR1 interagissent directement par leur domaine kinase, ce qui favorise la transactivation de BRAF par KSR1 (Lavoie et al., 2013; Rajakulendran et al., 2009; Thevakumaran et al., 2015). L'interaction BRS/CC-SAM constitue de ce fait un second point de contact direct qu'il est nécessaire, comme pour l'interaction KD/KD, de remettre dans le contexte global du dimère BRAF/KSR1 dont la structure complète reste à ce jour méconnue.

Chapitre 4 : Stabilisation du dimère BRAF/KSR1 en vue d'en obtenir la structure

4.1 Le rôle inattendu du CRD dans la formation du dimère BRAF/KSR1

4.1.1 Contexte

La découverte de la nouvelle interaction BRS/CC-SAM a mis à jour le rôle essentiel des régions NTR dans la sélectivité de l'isoforme BRAF pour la protéine KSR1. Dans le but de comprendre le rôle des autres domaines de la NTR de BRAF sur cette interaction, nous avons développé un crible de BRAF^{NTR}. La présence d'autres domaines, tels que le domaine RBD ou CRD_{BRAF} suppose qu'il existe des interfaces entre les domaines pouvant influencer l'interaction BRS/CC-SAM. Pour ce faire, l'interaction BRAF^{NTR}/KSR1^{NTR} observée en double hybride dans la levure a été utilisée comme point de départ au crible. Cette interaction modérée n'est visible que sur le milieu de stringence faible, il n'est donc pas techniquement possible d'identifier avec la même approche des interactions encore plus faibles. Le crible a donc été optimisé pour sélectionner des mutations de type « gain d'interaction » qui augmentent l'affinité de BRAF^{NTR} pour KSR1^{NTR} (**Figure 29.A**). Par ce crible, nous avons cherché à révéler des interfaces inhibitrices dont la déstabilisation peut favoriser l'interaction BRS/CC-SAM. L'approche a consisté à identifier des mutations pouvant renforcer l'interaction BRAF^{NTR}/KSR1^{NTR} et par extension, le dimère BRAF/KSR1. Ces mutations pourraient, de plus, être exploitées pour stabiliser artificiellement le dimère BRAF/KSR1 à des fins de purification. De façon surprenante, nous avons constaté que la majorité des mutations ayant la propriété recherchée identifiées et isolées lors du crible se concentrent dans le domaine CRD de BRAF.

Le CRD (Cysteine-Rich Domain) est un domaine commun aux 5 membres des protéines RAF. Sa caractéristique principale est la présence d'un motif de liaison au zinc composé de résidus histidines et cystéines qui est essentiel à son repliement (Mott et al., 1996). Il a été démontré que ce domaine joue un rôle dans l'ancrage membranaire des protéines RAF (Ghosh et al., 1996), soit par association directe aux lipides membranaires soit par stabilisation de l'interaction RAS/RAF (Tran et al., 2021). Les études de cryo-EM ont par ailleurs démontré que le CRD sert de point

d'ancrage pour les protéines 14-3-3 lors de leur liaison à BRAF et joue donc un rôle central dans la forme auto-inhibée inactive de BRAF.

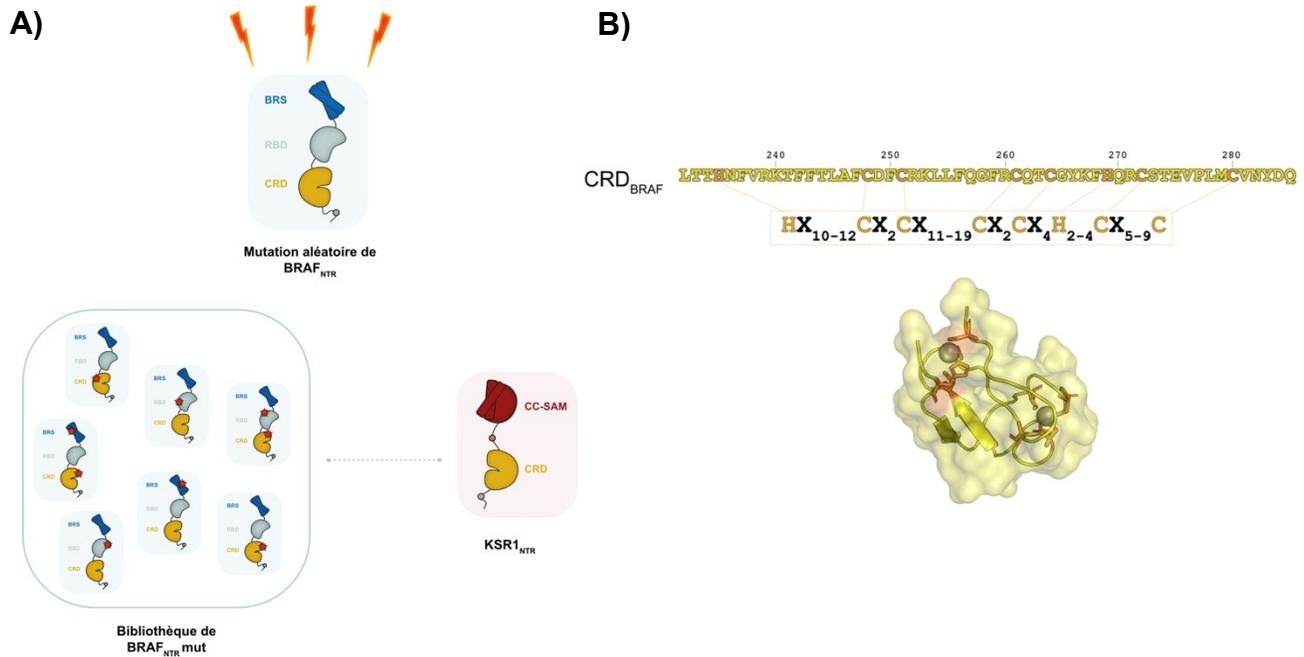


Figure 29 – Crible du domaine NTR de BRAF.

A) Représentation du crible de la librairie des mutants de BRAF^{NTR}.

B) Séquence numérotée des acides aminés du CRD de BRAF. En haut : les résidus en orange constituent le motif de liaison au zinc dont la séquence consensus est représentée en dessous. En bas : structure du domaine CRD de BRAF (PDB: 6Q0T) avec les ions zinc schématisés par des sphères grises et les chaînes latérales des résidus qui assurent leur coordination (orange).

BRS : BRAF specific Sequences; RBD : Ras-Binding Domain; CRD : Cysteine-Rich Domain; CC-SAM : Coiled-Coil Sterile Alpha Motif.

Il est intéressant de rappeler que d'un point de vue clinique, des mutations congénitales du CRD ont été mises en lien avec un groupe de troubles du développement appelé « Rasopathies ». Bien que certaines de ces mutations impactent l'activité catalytique de BRAF, les conséquences de ces mutations sur la structure de BRAF ne sont pas connues (Tidyman and Rauen, 2016). Dans le chapitre précédent lorsque les domaines nécessaires à l'interaction BRAF^{NTR}/KSR1^{NTR} ont été identifiés, nous avons démontré que la délétion du CRD de BRAF diminue l'interaction de BRAF^{NTR} avec KSR1^{NTR}. De même, les résultats présentés dans la **Figure 26.B (p. 110)** montrent que l'addition du domaine CRD permet de renforcer l'interaction du domaine BRS avec le domaine

CC-SAM. Nous avons émis l'hypothèse que le CRD jouerait un rôle déterminant sur l'interaction BRAF^{NTR}/KSR1^{NTR}.

Ici, les résultats du crible suggèrent que l'introduction de mutations dans le domaine CRD, qui potentiellement perturbent ses interactions avec les autres domaines, renforce l'interaction BRAF^{NTR}/KSR1^{NTR}. Ces observations étant en contradiction avec ce que nous avons précédemment observé, nous avons souhaité les caractériser davantage.

4.1.2 La voie Ras/MAPK est activée par des mutations du domaine CRD de BRAF

4.1.2.1 Des mutations du CRD augmentent l'interaction BRAF^{NTR}/KSR1^{NTR}

Le crible nous a permis d'identifier 38 clones avec gain d'interaction et qui comportent au moins une mutation dans le domaine CRD de BRAF. Chaque substitution faux-sens identifiée par séquençage a été réintroduite individuellement nous permettant d'éliminer les mutations non causales ou les faux positifs. Nous avons isolé les mutants correspondant à des substitutions uniques dans le domaine CRD (**Figure 30.A**) Un nombre important de substitutions non-sens aboutissant à des formes tronquées de BRAF^{NTR} a également été isolé (7/38). Ces mutants avec codon STOP prématurés n'ont pas été pris en compte dans la suite des expériences et seront discutés plus en détails dans la discussion. Après validation, nous avons confirmé le gain d'interaction provoqué par chacune de ces substitutions sur l'interaction BRAF^{NTR}/KSR1^{NTR} (**Figure 30.B**) La croissance des diploïdes est visible sur le milieu de stringence le plus élevé (SD-TLA) comparativement à l'interaction BRAF^{NTR}/KSR1^{NTR} sauvage. Certaines mutations ont été identifiées chez plusieurs clones différents (ex : le mutant H269Y a été sélectionné 4 fois) pour d'autres, la nature de la substitution est variable d'un clone à l'autre (ex : l'acide aminé C251 a été permuté soit en R soit en Y). Les variations en acides aminés dans une même position n'ont pas été toutes présentées puisqu'elles aboutissent au même gain d'interaction (**Figure 30.C**).

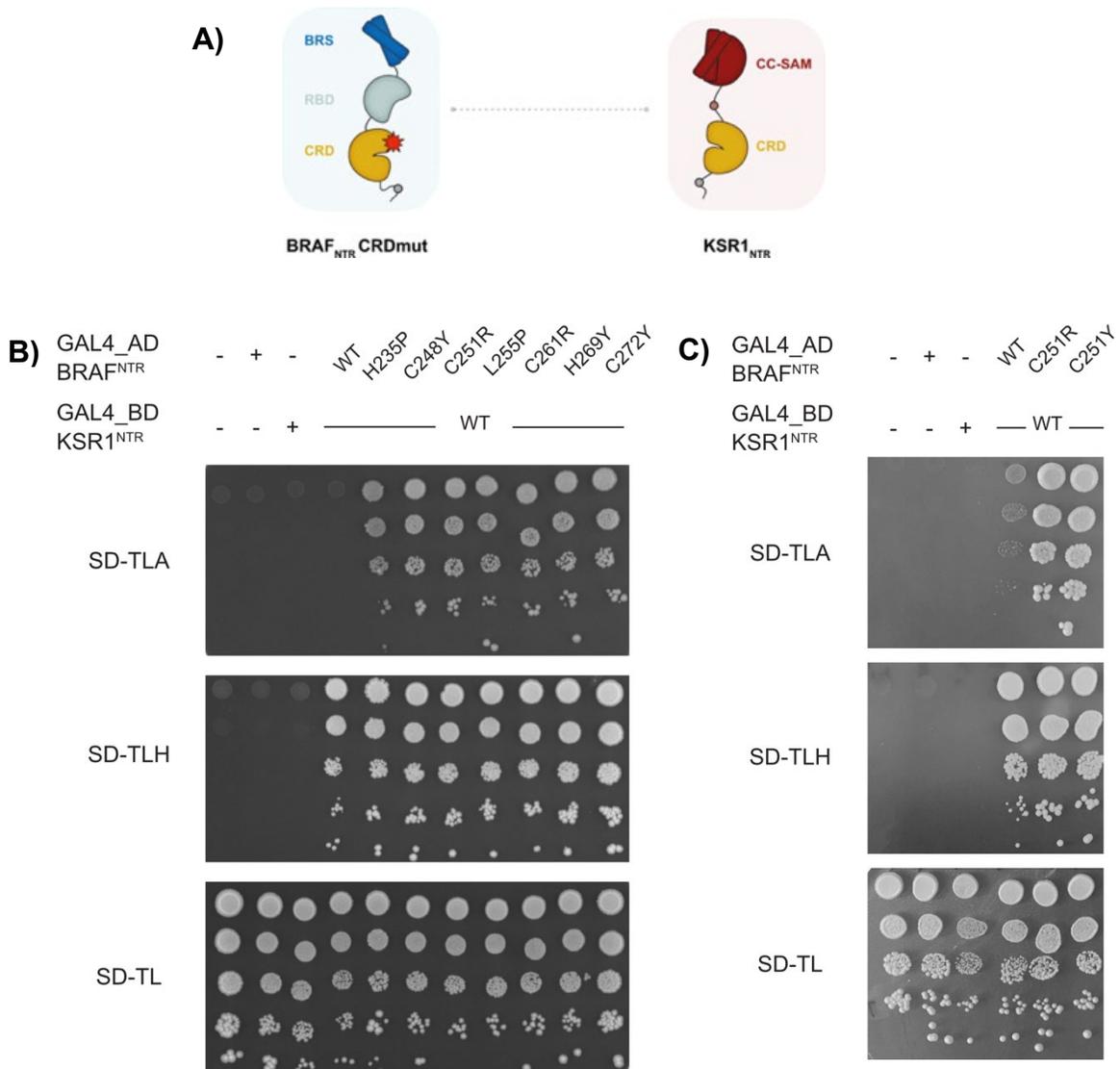


Figure 30 – Résultats du crible de « gain d’interaction » entre BRAF^{NTR} et KSR1^{NTR}.

A) Seules les substitutions uniques dans le domaine CRD de BRAF isolées à partir du crible ont été étudiées. B) Les conditions 1 à 3 sont des contrôles expérimentaux. La condition 4 mesure l’interaction des formes sauvages de BRAF^{NTR} et KSR1^{NTR}. Des mutations individuelles du CRD de BRAF induisent un gain d’interaction entre BRAF^{NTR} et KSR1^{NTR}. C) Des variations en acides aminés d’un même résidu provoquent des effets similaires sur l’interaction BRAF^{NTR}/KSR1^{NTR}.

BRS : BRAF specific Sequence; RBD : Ras-Binding Domain; CRD : Cysteine-Rich Domain; CC-SAM : Coiled-Coil Sterile Alpha Motif.

Il est intéressant de constater que la majorité des acides aminés concernés par les mutations gain d'interaction, sont des cystéines et des histidines qui appartiennent au motif de liaison au zinc (**Figure 29.B**) permettant la coordination des ions de zinc. En outre, l'équivalent du résidu L255 présent dans l'isoforme CRAF a été identifié comme faisant partie du cœur hydrophobe du CRD et donc essentiel à sa structure (Daub et al., 1998). Nous pouvons supposer que les mutations issues du crible ont un impact important sur l'intégrité du domaine CRD de BRAF, bien qu'aucune structure comportant naturellement ce type de mutation n'ait été obtenue. Cependant, dans CRAF, une double mutation des cystéines du CRD (le mutant « C2S » : Cys165Ser et Cys168Ser) augmente l'activité catalytique de CRAF (Cutler and Morrison, 1997; Michaud et al., 1995). Dans CRAF, cette mutation perturbe l'association de la NTR avec le KD qui est essentiel à l'inhibition de l'activité catalytique. De ce fait, CRAF^{C2S} est dans un état dé-reprimée et possède une activité kinase plus importante que sa forme sauvage (Cutler et al., 1998).

De façon surprenante, les mutations du motif de liaison au zinc de BRAF obtenues dans cette étude, proviennent d'un crible entre BRAF^{NTR} et KSR1^{NTR} qui sont des formes tronquées de BRAF et KSR1, dépourvues de leur KD. Nous avons évalué l'effet de la mutation C2S sur l'interaction BRAF^{NTR}/KSR1^{NTR}. Pour cela nous avons introduit des mutations équivalentes dans BRAF^{NTR} (C248S et C251S) (**Figure 31.A**). La mutation C2S provoque un gain d'interaction similaire à celui des mutations issues du crible permettant de détecter l'interaction sur le milieu de stringence élevée (non montré). Ce gain est également visible sur le milieu de stringence plus faible, notamment à la concentration plus faible de levures (**Figure 31.B : comparer colonne 4 et 5, deux derniers spots**). Pour comprendre l'effet de cette mutation C2S en lien avec l'interaction BRS/CC-SAM précédemment caractérisée (voir Section 3.2), nous avons muté le domaine CC-SAM de façon à moduler cette interaction : la forme CC-SAM^{mut} abolit l'effet de la mutation C2S dans BRAF. Ainsi, le gain d'interaction provoqué par C2S nécessite une interaction BRS/CC-SAM intacte.

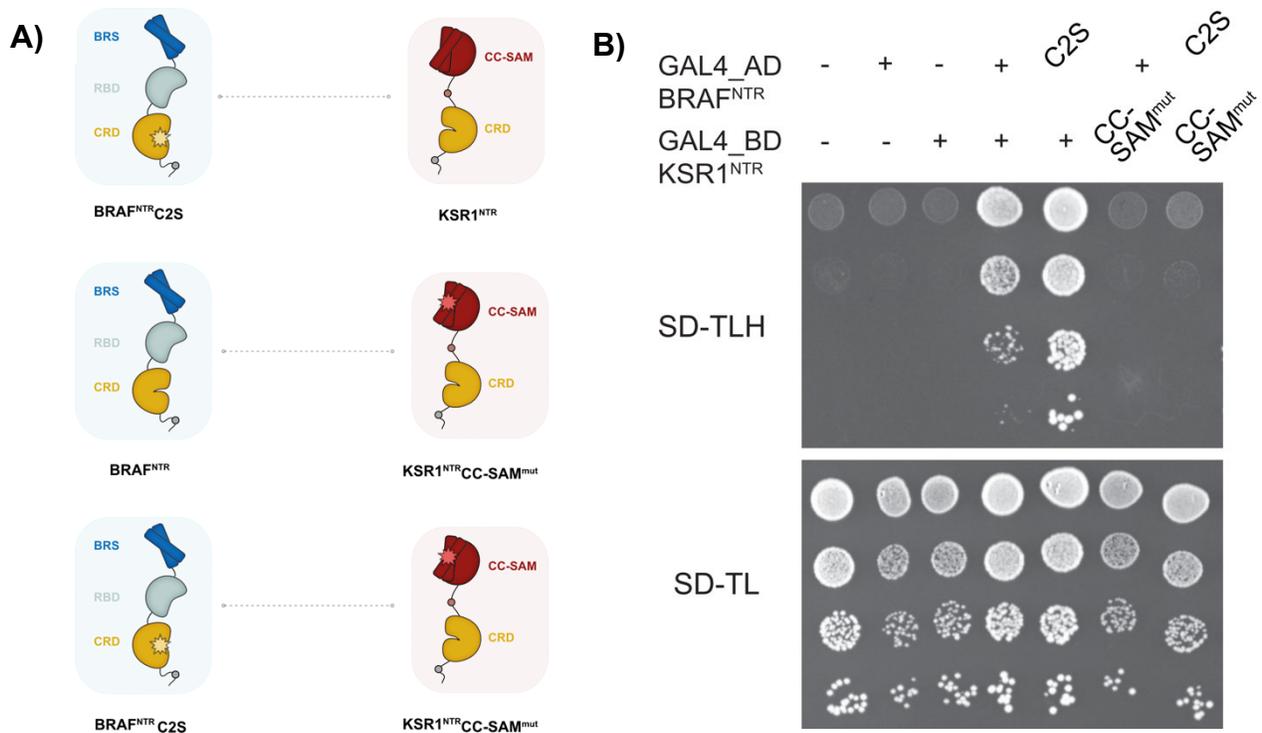


Figure 31 – Effet de la mutation C2S sur l’interaction BRAF^{NTR}/KSR1^{NTR}.

A) Schéma indiquant la localisation des mutations et des fusions générées dans cette expérience.

B) Les conditions 1 à 3 sont des contrôles expérimentaux. La condition 4 mesure l’interaction des formes sauvages de BRAF^{NTR} et KSR1^{NTR}. La double mutation (C248S et C251S ou C2S) a été insérée dans le CRD de BRAF^{NTR}. CC-SAM^{mut1} : mutation du domaine CC-SAM de KSR1^{NTR}.

BRS : BRAF specific Sequences; RBD : Ras-Binding Domain; CRD : Cysteine-Rich Domain; CC-SAM : Coiled-Coil Sterile Alpha Motif.

Pour confirmer le rôle fonctionnel de l’interaction BRS/CC-SAM, nous avons évalué l’effet de la mutation C2S sur l’interaction BRAF^{NTR}/CRAF^{NTR} et sur l’interaction BRAF^{NTR}/KSR2^{NTR}. Ces interactions ne sont pas détectables avec les formes sauvages (**Figure 32.A et B : colonne 5**). La mutation C2S a un impact minimal sur l’interaction BRAF^{NTR}/CRAF^{NTR} (**Figure 32.A : colonne 4**). Cependant, cette mutation provoque un gain d’interaction très net entre BRAF^{NTR} et KSR2^{NTR} (**Figure 32.B: colonne 4**). Le domaine CC-SAM de KSR2 a une séquence similaire au domaine CC-SAM de KSR1. L’interaction BRAF^{NTR}/KSR2^{NTR} n’est pas visible dans ce système de double hybride mais a cependant été détectée par co-IP (données du laboratoire non présentées). La mutation C2S potentialise l’interaction BRAF^{NTR}/KSR2^{NTR}. Ces résultats suggèrent que l’interaction BRS/CC-SAM est nécessaire pour observer l’effet des mutations du CRD de BRAF.

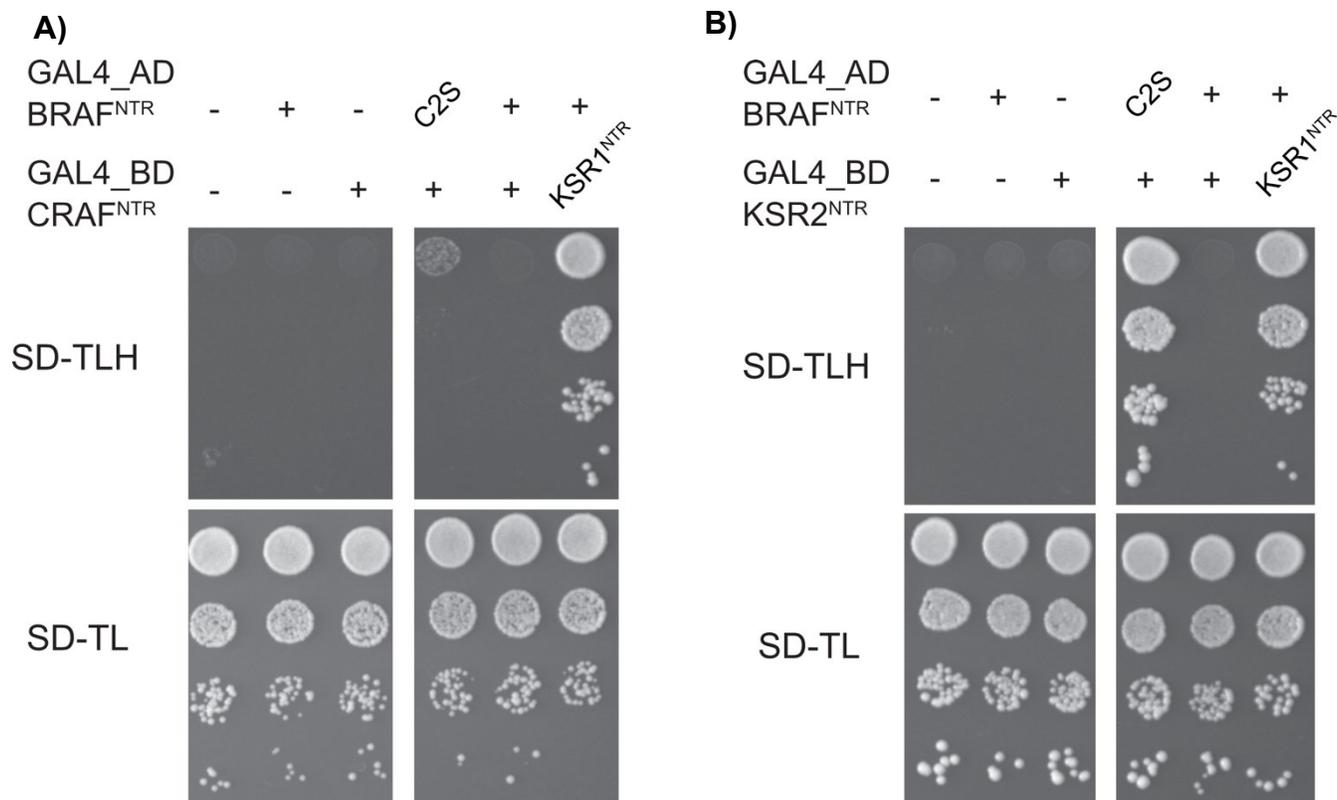


Figure 32 – Effet de la mutation C2S sur l’interaction BRAF^{NTR}/CRAF^{NTR} et BRAF^{NTR}/KSR2^{NTR}

Pour A) et B), les conditions 1 à 3 sont des contrôles expérimentaux réalisés au moment de l’expérience. La condition 7 mesure l’interaction des formes sauvages de BRAF^{NTR} avec KSR1^{NTR}. La double mutation (C248S et C251S ou C2S) a été insérée dans le CRD de BRAF^{NTR}.

Deux des mutations du CRD de BRAF isolées par le crible (H235P et C251Y) correspondent à des variants naturels dans les bases de données COSMIC (Tate et al., 2019) et le réseau TCGA (<https://www.cancer.gov/tcga>) qui regroupent des cohortes de patients atteints de cancers. Cependant, à ce jour, aucun lien de causalité entre la présence de ces mutations et la pathologie des patients n’a été établi. Inspirés par ces observations, nous avons voulu évaluer l’effet des substitutions isolées par le crible sur l’activité catalytique de BRAF, et par extension, sur l’activation de la voie RAS-ERK.

4.1.2.2 Les mutations du CRD de BRAF activent la voie RAS-ERK

Quatre substitutions issues du crible ont été intégrées à la forme pleine longueur de BRAF (**Figure 33.A**). Ces formes mutées munies d'une étiquette Flag ont été surexprimées en cellules de mammifères (HEK293T). L'impact de ces mutations sur la signalisation RAS-ERK a été évalué par la mesure des niveaux de pMEK et de pERK (où ERK est le substrat de pMEK). À l'état basal, la forme sauvage de BRAF ne provoque qu'une faible activation de la voie RAS-ERK, comme l'indiquent les niveaux de pMEK et de pERK. Cependant, aux mêmes niveaux d'expression, tous les mutants testés induisent une augmentation importante des niveaux de phosphorylation de MEK et ERK comparativement à la forme sauvage (**Figure 33.B**).

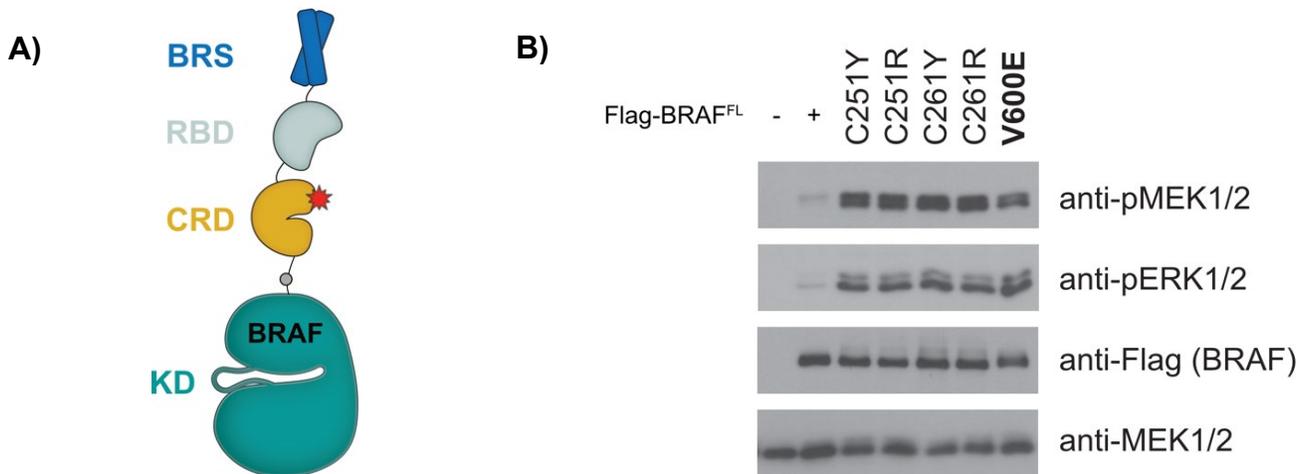


Figure 33 – Les mutations du domaine CRD de BRAF induisent l'activation de la voie RAS-ERK.

A) Les mutations issues du crible ont été introduites dans la forme pleine longueur de BRAF et surexprimées dans des cellules HEK293T.

B) L'effet de chaque mutation sur l'activation de la voie RAS-ERK est mesuré en comparant les niveaux de pMEK et de pERK comparativement à Flag-BRAF-WT par Western Blot. La condition 1 est un contrôle expérimental. La condition 2 correspond à la surexpression de la forme sauvage de BRAF pleine longueur.

BRAF^{FL}: BRAF Full-Length. BRS : BRAF specific Sequence; RBD : Ras-Binding Domain; CRD : Cysteine-Rich Domain; KD: Kinase Domain.

Ces résultats corroborent les effets de mutations du CRD de CRAF sur son activité kinase, qui ont été rapportés dans la littérature (Cutler and Morrison, 1997; Michaud et al., 1995). Ce gain de fonction est comparable à celui causé par la substitution V600E (**Figure 33.B : condition 7**) qui

est la mutation la plus fréquemment observée chez les patients atteints de cancers dépendants de BRAF (Davies et al., 2002). La mutation V600E du domaine kinase de BRAF conduit à une forme monomérique suractivée de la protéine *via* notamment, une augmentation de son activité catalytique intrinsèque (Patton et al., 2005; Vakiani and Solit, 2011). En revanche, les mutations du crible qui induisent une activation similaire de la voie RAS-ERK, ont été isolées à partir de l'interaction de BRAF^{NTR} et de KSR1^{NTR}. Cela suggère un effet sur la dimérisation et non sur l'activité intrinsèque de la kinase BRAF puisque les formes tronquées BRAF^{NTR} et KSR1^{NTR} sont dépourvues de domaine kinase. L'activation de la voie RAS-ERK par ces mutations pourrait être ainsi provoquée par une dimérisation accrue de BRAF, en particulier avec KSR1. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons déterminé l'impact de ces mutations sur l'association de BRAF avec KSR1 dans un contexte de cellules de mammifères.

4.1.3 Les mutations du CRD de BRAF ont une incidence sur la formation du dimère BRAF/KSR1

4.1.3.1 Les mutations du CRD de BRAF favorisent la formation du dimère BRAF/ KSR1

Nous avons testé l'effet des mutations du CRD sur deux interactions : l'interaction BRAF/KSR1^{NTR} et l'interaction BRAF/KSR1 pleine longueur (**Figure 34.A**). Pour cela, l'étiquette Flag a été accolée aux protéines BRAF^{FL} sauvage ou mutée et l'étiquette Pyo à KSR1^{NTR} ou KSR1^{FL}. Les protéines BRAF^{FL} et les formes de KSR1 ont été co-exprimées et leur association a été déterminée par co-IP. Seules les mutations H235P et C251Y du CRD de BRAF, répertoriées dans les bases de données et trouvées dans le crible, ont été utilisées pour ces expériences. Comme observé précédemment, l'expression des mutations H235P ou C251Y isolément conduisent bien à une augmentation des niveaux de pMEK et pERK. Chacun de ces mutants est suffisant pour stimuler l'activation de la voie RAS-ERK. (**Figure 34.B : comparer condition 2 aux conditions 3 et 4**).

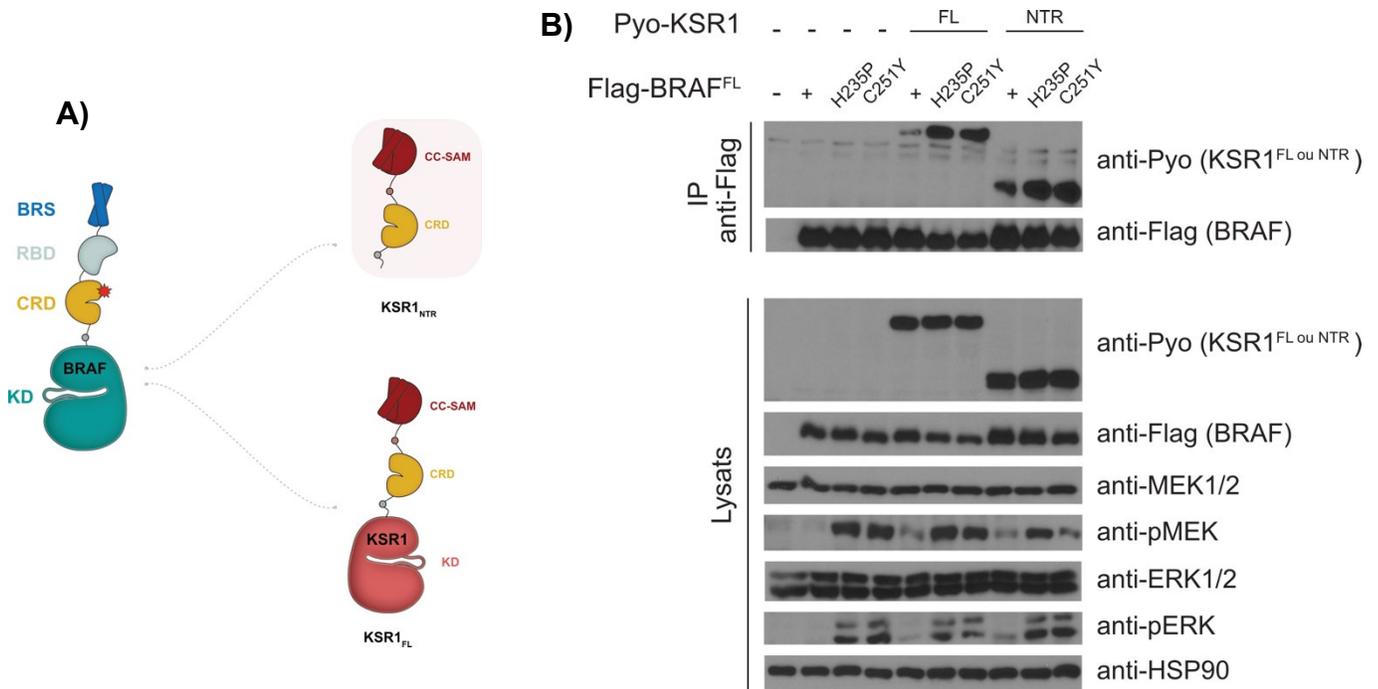


Figure 34 – Effets des mutations du CRD de BRAF sur son association à KSR1^{NTR} ou KSR1^{FL}.

A) L'effet de la mutation H235P (ou C251R) dans BRAF^{FL} a été testée sur l'interaction de BRAF^{FL} avec KSR1^{NTR} ou KSR1^{FL}.

B) Expérience de co-immunoprécipitation entre Flag-BRAF sauvage ou mutée avec Pyo-KSR1^{NTR} ou Pyo-KSR1^{FL}. La condition 1 est un contrôle expérimental. Les anticorps utilisés lors de la détection des niveaux protéiques par Western blot sont indiqués à droite. pMEK et de pERK sont précédés de leurs formes non phosphorylées (MEK1/2 et ERK 1/2) pour comparer les niveaux protéiques. La protéine HSP90 est utilisée comme témoin de charge.

FL : Full Length NTR: N-terminal Region, IP : Immunoprecipitation, « + » : forme sauvage de Flag-BRAF^{FL}. BRS : BRAF specific Sequence; RBD : Ras-Binding Domain; CRD : Cysteine-Rich Domain; CC-SAM : Coiled-Coil Sterile Alpha Moti, KD : Kinase Domain.

Lors de la co-expression avec KSR1 tronquée (NTR) ou pleine longueur (FL), une interaction est détectée avec BRAF sauvage comme rapporté précédemment (McKay et al., 2009). En comparaison à la forme sauvage de BRAF, les mutations H235P et C251Y provoquent un important gain d'interaction avec KSR1^{FL} et KSR1^{NTR} (**Figure 34.B : comparer la condition 5 aux conditions 6 et 7 et la condition 8 aux conditions 9 et 10**). Ces données confirment le gain d'interaction observé entre KSR1^{NTR} et BRAF^{NTR} suite aux mutations de son domaine CRD (**Figure 30, p. 118**).

Nous avons également évalué l'association de ces mutants de BRAF avec la protéine KSR1 endogène. Dans ce contexte, nous avons également observé un gain d'interaction entre KSR1 et

les formes mutées de BRAF, comparativement à sa forme sauvage. Comme pour les expériences de co-expression (**Figure 31.B, p. 120**), l'expression des mutants de BRAF est également associée à une stimulation de la voie RAS-ERK, comme l'indiquent les niveaux de pMEK et de pERK.

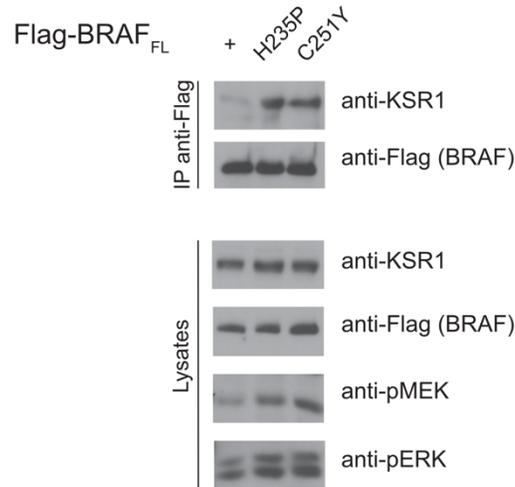


Figure 35 – Interaction des formes mutées de BRAF^{FL} avec KSR1^{FL} endogène.

Expérience de co-immunoprécipitation entre Flag-BRAF sauvage ou mutée avec KSR1^{FL} endogène. La condition 1 correspond à l'expression de Flag-BRAF sauvage. Les anticorps utilisés lors de la détection des niveaux protéiques par Western blot sont indiqués à droite.

Nous avons ensuite déterminé s'il existait une corrélation entre la stimulation de la voie RAS-ERK et le gain d'interaction de KSR1 avec BRAF provoqué par les mutations de son CRD.

4.1.3.2 Lien entre dimérisation de BRAF/KSR1 et activation de la voie RAS-ERK

L'activation de la voie RAS-ERK découle notamment de la dimérisation des protéines RAF. La dimérisation de BRAF dépend notamment du désengagement de sa NTR du domaine kinase pour permettre son association au KD d'un autre protomère. Les mutations du domaine CRD de BRAF, touchent les acides aminés du motif de liaison au zinc (**Figure 29.B, p. 116**). Bien qu'aucune étude structurale n'ait été entreprise avec ces mutations, nous pouvons raisonnablement supposer qu'elles perturbent le repliement du domaine en affectant la coordination au zinc. Des mutations semblables caractérisées dans CRAF, ont un effet sur la liaison aux protéines 14-3-3 et aux protéines RAS (Heidecker et al., 1990; Rapp et al., 1988). Ces mutations conduisent également à une augmentation de l'activité kinase de CRAF et ce, de façon indépendante de leur liaison aux

protéines RAS (Michaud et al., 1995). Nous pouvons supposer que dans un contexte de protéine pleine longueur, les mutations du CRD favorisent la désinhibition de BRAF en dissociant la NTR du KD.

Toutes les protéines de la famille RAF ont une interface de dimérisation commune localisée dans le domaine kinase. La kinase BRAF forme des homodimères et des hétérodimères avec la plupart des membres de la famille de protéines RAF (Rajakulendran et al., 2009). Compte tenu de ces observations, nous avons voulu étudier le lien entre l'activation accrue de la voie RAS-ERK et plus spécifiquement, l'augmentation de la dimérisation de BRAF avec KSR1. À partir de l'étude de l'interface de dimérisation située dans les KD, l'arginine 509 a été identifiée comme étant centrale pour l'interaction des KD des deux protomères. La mutation R509H a de ce fait, été utilisée comme outil pour inhiber la formation des dimères de RAF démontrant que l'association de deux domaines kinases est nécessaire pour la phosphorylation de MEK. (Röring et al., 2012). Nous avons donc évalué la combinaison des mutations du CRD (H235P ou C251Y ou les BRAF^{CRDmut}) avec la mutation R509H sur la dimérisation et l'activation de la voie RAS-ERK (**Figure 36.A**).

Pour cette expérience, la protéine MEK1 a également été surexprimée pour induire des niveaux de pMEK permettant une détection satisfaisante par Western Blot avec les quantités d'ADN transfectées. Les résultats indiquent que la mutation R509H inhibe complètement l'activation de la voie RAS-ERK comme le montrent les niveaux de pMEK (**Figure 36.B : comparer « pMEK » pour les conditions 1 et 2**). L'interaction BRAF/KSR1 n'est détectable qu'à partir d'une quantité seuil de protéines exprimées, qui n'est pas atteinte dans cette expérience (**Figure 36.B : « panneau anti-Pyo » condition 1**). De ce fait, bien que l'effet de la mutation R509H est constatée (i.e. la perte du signal de pMEK), la perte d'interaction qu'elle provoque ne peut pas être observée dans ce contexte **Figure 36.B : « panneau anti-Pyo » comparer condition 1 et 2**).

L'introduction des mutations BRAF^{CRDmut} provoque 1) une augmentation des niveaux de pMEK et 2) un gain d'interaction avec KSR1 en comparaison à BRAF sauvage, comme vu précédemment. Dans ce contexte de BRAF^{CRDmut}, la mutation R509H provoque également l'inhibition complète de la voie RAS-ERK. Cette mutation R509H est également suffisante pour complètement abroger l'effet de gain d'activation des BRAF^{CRDmut} (**Figure 36.B : comparer « pMEK » pour les conditions 3 et 4 ou 5 et 6**). Cependant, nous n'observons qu'une perte

partielle de l'association de KSR1 avec cette forme doublement mutée de BRAF. Il existerait donc bien un corollaire entre le gain d'association des BRAF^{CRDmut} et le gain d'activation de la voie RAS-ERK.

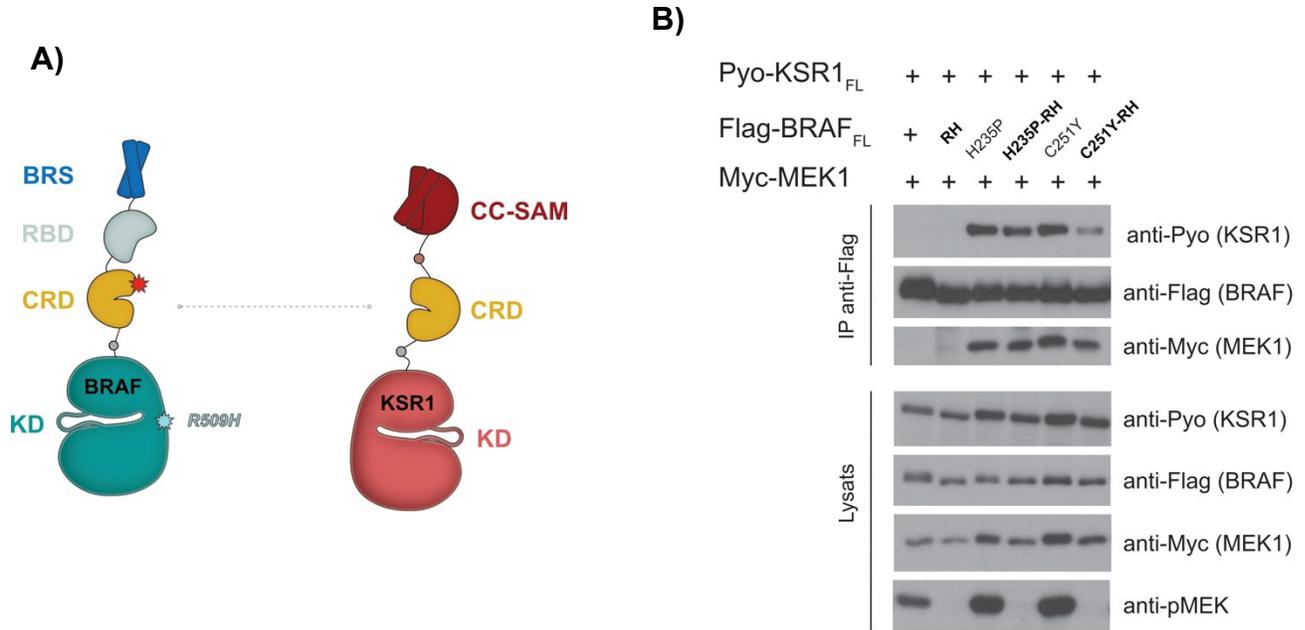


Figure 36 – Effet de la perturbation de l'interface de dimérisation de BRAF.

A) L'effet de la mutation H235P (ou C251R) en combinaison avec la mutation R509H dans BRAF^{FL} a été testée sur l'interaction^{FL}/KSR1^{FL}.

B) Expérience de co-immunoprécipitation entre Flag-BRAF sauvage ou mutée avec Pyo-KSR1^{FL} en présence de Myc-MEK1. Les anticorps utilisés lors de la détection des niveaux protéiques par Western blot sont indiqués.

FL : Full length, IP : Immunoprécipitation, + : forme sauvage de Pyo-KSR1^{FL}, Flag-BRAF^{FL} ou Myc-MEK1. RH : R509H, H235P-RH : H235P-R509H; C251Y-RH : C251Y-R509H. BRS : BRAF specific Sequences; RBD : Ras-Binding Domain; CRD : Cysteine-Rich Domain; CC-SAM : Coiled-Coil Sterile Alpha Moti, KD : Kinase Domain.

D'après ces résultats, nous pouvons donc conclure que l'activation de la voie RAS-ERK observée, après mutation du CRD, n'est probablement pas due à une augmentation générale de la dimérisation de BRAF, mais à une facilitation de la formation du dimère BRAF^{CRDmut}/KSR1. Des expériences complémentaires sont nécessaires pour confirmer cette hypothèse.

4.1.4 Conclusions et Perspectives

Dans cette partie, nos travaux nous ont permis d'isoler des mutations qui stimulent l'association de BRAF^{NTR} avec KSR1^{NTR}. Ces mutations se concentrent principalement dans le domaine CRD de BRAF, notamment au niveau du motif de liaison au zinc qui assure le repliement du domaine. Le gain d'interaction provoqué par ces mutations, nécessite l'interface BRS/CC-SAM et la présence du BRS. Lorsqu'elles ont été introduites dans BRAF^{FL}, ces mutations ont provoqué une augmentation de l'activation de la voie RAS-ERK. Elles induisent également une plus forte interaction de BRAF avec KSR1 exogène ou endogène. Enfin, la perturbation de l'interface de dimérisation du dimère BRAF^{CRDmut} / KSR1 n'est pas suffisante pour complètement dissocier le dimère, malgré la perte de phosphorylation de MEK1. Nous pouvons donc supposer que c'est bien l'augmentation spécifique de l'association de BRAF^{CRDmut} avec KSR1 qui conduit à une augmentation de l'activation de la voie RAS-ERK. Il semblerait donc que la mutation du domaine CRD ait un impact important sur l'interaction BRS/CC-SAM et, par extension, sur la formation du dimère BRAF/KSR1. Au vu de ces résultats, nous pouvons supposer qu'il existe une ou plusieurs interface(s) d'interaction entre le domaine CRD de BRAF et les autres domaines des NTRs de BRAF et/ou de KSR1.

4.2 Études structurales des protéines BRAF et KSR1

4.2.1 Contexte

Le dernier axe de ce travail de thèse s'est consacré aux études structurales des protéines BRAF et KSR1. Malgré la présence d'un nombre conséquent de structures du domaine kinase de BRAF résolues par cristallographie aux rayons X ou par RMN (Thevakumaran et al., 2015), les données structurales de la région NTR de BRAF restent parcellaires. De plus les études structurales réalisés se sont souvent focalisées sur un domaine isolé de cette région et ont été majoritairement effectuées à partir de l'isoforme CRAF (Athuluri-Divakar et al., 2016; Emerson et al., 1995; Mott et al., 1996). La région NTR de BRAF est extrêmement dynamique et difficile à stabiliser du fait de la présence de longues séquences déstructurées entre les domaines (Källberg et al., 2012). De ce fait, la structure globale de la NTR et en particulier la relation des domaines les uns par rapport aux autres ne sont pas connues. La situation est encore similaire pour la protéine KSR1 (Koveal et

al., 2012; Zhou et al., 2002). Au vu de l'importance de l'interaction BRAF^{NTR}/KSR1^{NTR} pour la formation du dimère BRAF/KSR1, il serait essentiel d'en obtenir une structure plus complète.

Il serait également intéressant d'intégrer les données structurales de l'interaction BRAF^{NTR}/KSR1^{NTR} au dimère BRAF/KSR1 pris dans sa totalité. En effet les domaines kinases, qui sont absents des formes BRAF^{NTR} et KSR1^{NTR}, interagissent via l'interface de dimérisation et participent à l'association de BRAF avec KSR1. Par ailleurs, la présence de partenaires d'interaction tels que le substrat MEK1 ou les protéines 14-3-3, stabilise le dimère BRAF/KSR1. L'obtention d'une structure globale intégrant des protéines pleine longueur permettrait d'obtenir des informations inédites sur le complexe de signalisation BRAF/KSR1/MEK1. Nous avons envisagé différentes techniques pour stabiliser spécifiquement ce complexe à partir de cellules bactériennes ou de cellules eucaryotes.

Les différentes techniques utilisées et les problématiques qui y sont associées, sont présentées dans ce chapitre. La plupart des stratégies présentées dans cette section n'ont finalement pas abouti à la résolution de nouvelles structures mais ont permis d'éliminer les méthodes jugées peu efficaces ou pas assez informatives.

4.2.2 Étude des interactions des domaines des protéines RAF

4.2.2.1 Interactions des domaines des NTRs de BRAF et KSR1

Les NTRs de BRAF et KSR1 sont composés de domaines déterminants pour la fonction de ces protéines. C'est notamment le cas du domaine RBD de BRAF, qui favorise sa liaison aux protéines RAS, ou de son CRD qui permet l'ancrage à la membrane plasmique (Bondeva et al., 2002). Nous avons précédemment déterminé que la spécificité de formation du dimère BRAF/KSR1 dépend tout particulièrement de l'interaction directe des domaines BRS et CC-SAM. Le CRD de BRAF semble également être impliqué dans l'interaction BRS/CC-SAM (voir section 4.1), d'autant que, le rôle du CRD de KSR1 sur cette interaction n'est pas connu à ce jour. En nous basant sur ces observations et d'après l'agencement général des domaines des NTRs (**Figure 37.A**), nous avons souhaité cartographier les différentes surfaces d'interactions qui existent entre BRAF^{NTR} et KSR1^{NTR}. La purification des NTR de BRAF et de KSR1 ne donnant pas un rendement satisfaisant, nous avons analysé les interactions de chacun de ces domaines les uns avec les autres. Pour cela, nous avons essayé de reconstituer ces interactions *in vitro* pour les analyser par RMN.

Chacun des domaines BRAF^{NTR} et KSR1^{NTR} a été exprimé et purifié selon une procédure établie précédemment (Goyal et al., 2015).

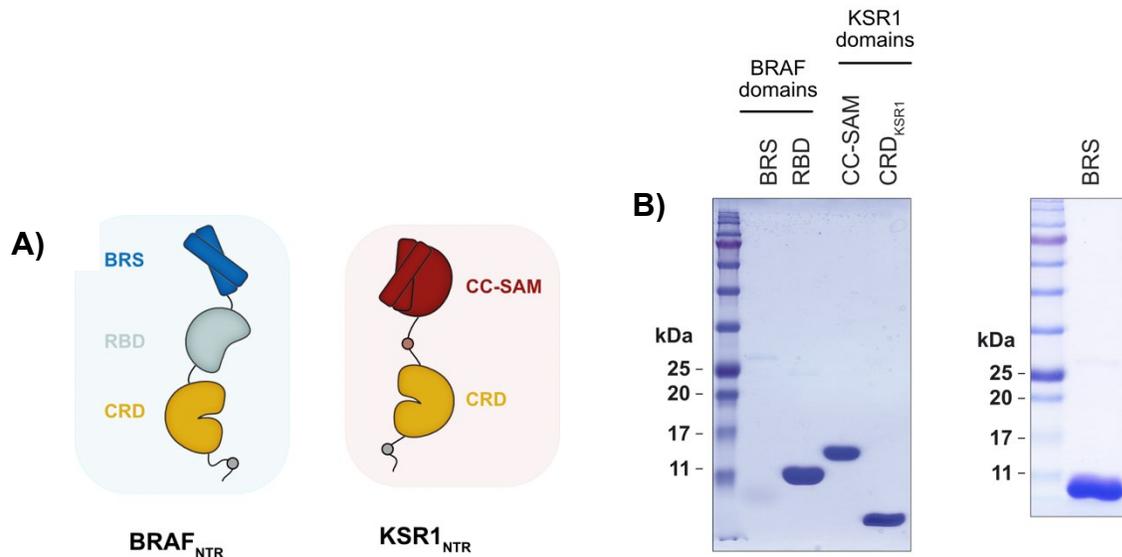


Figure 37 – Purification des domaines de BRAF^{NTR} et de KSR1^{NTR}.

A) Schéma des domaines qui composent les NTR de BRAF et KSR1.

B) Coloration au bleu de Coomassie des échantillons de protéines séparées sur gel SDS-PAGE après expression et purification en présence de [¹⁵N]NH₄Cl. Le domaine BRS ayant perdu sa coloration au bleu de Coomassie dans le gel de polyacrylamide, un nouvel échantillon a donc été coloré puis fixé au formaldéhyde.

BRS : BRAF specific Sequence; RBD : Ras-Binding Domain; CRD : Cysteine-Rich Domain; CC-SAM : Coiled-Coil Sterile Alpha Moti, KD : Kinase Domain.

Nous n'avons malheureusement pas pu obtenir le domaine CRD de BRAF. Afin de pallier ce problème, nous avons fait le choix d'utiliser le domaine CRD de CRAF (non montré) qui présente une forte homologie de séquence avec celui de BRAF et dont la structure a déjà été résolue (Mott et al., 1996).

Nous avons étudié une combinaison d'interactions intermoléculaires (entre un domaine de BRAF^{NTR} et un domaine de KSR1^{NTR}) et intramoléculaires (entre deux domaines de KSR1^{NTR} l'un avec l'autre ou entre deux domaines de BRAF^{NTR} l'un avec l'autre) par *Heteronuclear Single Quantum Correlation* (HSQC). Les expériences HSQC mesurent les apparitions et disparitions de pics d'hydrogène. En bref, le marquage isotopique de l'azote (¹⁵N) permet de corréler chaque pic observé à un résidu spécifique de la protéine considérée. Chaque protéine possède ainsi un spectre

HSQC qui lui est propre. Lorsque l'expérience est réalisée en présence d'un partenaire d'interaction, les apparitions et disparitions de pics d'hydrogène du spectre témoignent de mouvements d'acides aminés qui sont provoqués à la suite d'une interaction protéique (Douceff et al., 2011).

Nous avons évalué par HSQC les variations du spectre du domaine CC-SAM de KSR1 lorsqu'il est seul ou en présence de partenaires putatifs. Ainsi le spectre du domaine CC-SAM seul (**Figure 38.A : en noir**) ne se superpose pas avec celui de ce même domaine CC-SAM en présence du domaine BRS (**Figure 38.A : en vert**). Cette expérience, qui a déjà été utilisée pour déterminer l'interface BRS/CC-SAM (Lavoie et al., 2018 : **Extended data Figure 8**), constitue ici le contrôle expérimental. Les spectres du CC-SAM seul et du CC-SAM avec le CRD_{CRAF} présentent de légères variations, témoignant d'une interaction très faible (**Figure 38.B : comparer le noir au rouge**). De la même façon, une légère interaction est détectée entre le CC-SAM de KSR1 et son domaine CRD_{KSR1} (**Figure 38.D : comparer le noir au violet**). En revanche, les spectres du CC-SAM seul (**Figure 38.C : en noir**) ou en présence du RBD de BRAF (**Figure 38.C : en orange**) se superposent parfaitement, indiquant qu'aucune perturbation n'a été mesurée. Il n'y a donc pas d'interaction entre le domaine CC-SAM de KSR1 et le domaine RBD de BRAF. Seules une partie des différentes combinaisons testées sont présentées, la plupart ne présentant pas ou très peu d'interaction.

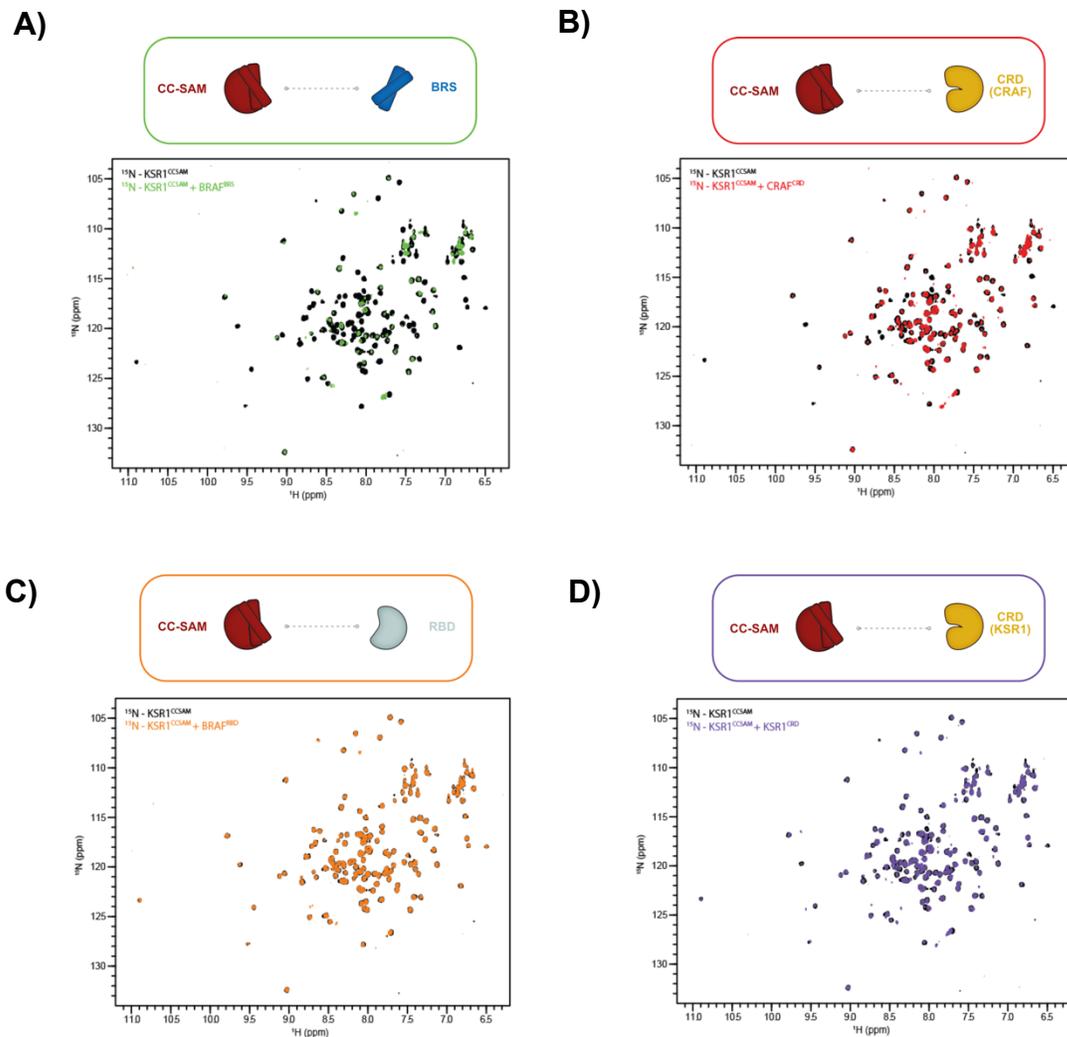


Figure 38 – Évaluation des interactions entre le domaine CC-SAM de KSR1 et les domaines CRD^{CRAF}, RBD et CRD^{KSR1}.

Superposition du spectre [^1H - ^{15}N] HSQC du domaine [^{15}N]CC-SAM de KSR1 seul (noir) et du spectre [^{15}N]CC-SAM en présence soit du domaine BRS de BRAF (A) vert), soit du domaine CRD de BRAF (B) rouge), soit du domaine RBD de BRAF (C) orange), soit du domaine CRD de KSR1 (D) en violet). Ces mesures d'interaction des différents domaines ont été évaluées par RMN par l'équipe du Pr. F. Sicheri à Toronto.

Ppm : parts per million. BRS : BRAF specific Sequences; RBD : Ras-Binding Domain; CRD : Cysteine-Rich Domain; CC-SAM : Coiled-Coil Sterile Alpha Moti, KD : Kinase Domain.

Ces données préliminaires ont donc permis l'identification de trois interactions potentielles : CC-SAM/CRD_{CRAF}, CC-SAM/CRD_{KSR1} et BRS/CRD_{KSR1}. Cependant, le faible niveau de fluctuation observé laisse supposer qu'elles sont soit causées par des interactions de très faible affinité, soit provoquées par un artefact expérimental. Il est apparu peu utile d'en faire une étude plus approfondie, car les interfaces précises d'interaction auraient été trop difficiles à établir dans ces conditions.

En parallèle à cette expérience de RMN, nous avons testé des outils nous permettant de spécifiquement isoler le dimère BRAF/KSR1 à partir de cellules bactériennes.

4.2.2.2 Stabilisation de l'interaction BRAF/ KSR1 par leurs domaines kinases

Il existe différents systèmes pour isoler des complexes protéiques spécifiques. Notamment le système de protéines de fusion FRB-FKBP a déjà été adapté avec succès pour analyser des oligomères (Inobe and Nukina, 2016). Son utilisation a permis, en particulier, l'étude de la dimérisation des domaines kinases dans l'hétérodimère RAF/KSR de drosophile (Rajakulendran et al., 2009). Dans le but de ne pas utiliser un système dépendant de l'ajout de rapamycine nécessaire dans le système FRB-FKBP, nous avons opté pour les peptides SYNZIP pour enrichir artificiellement le dimère BRAF/KSR1. Les SYNZIP sont des peptides synthétiques formés de courtes hélices α qui ont été élaborés dans le but de faciliter la formation de complexes oligomériques de protéines. Ces peptides présentent également l'avantage théorique de provoquer un encombrement stérique plus faible que celui existant dans le système de protéines de fusion FRB-FKBP (Thompson et al., 2012).

Nous avons donc utilisé des SYNZIP adaptés pour la formation d'homo- ou d'hétéro-dimères (SYNZIP14). Ces peptides ont été pour cela fusionnés aux extrémités des domaines kinases de BRAF et de KSR1 avec pour objectif d'améliorer la stabilité du dimère BRAF/KSR1. Le SYNZIP14 a ainsi été fusionné à l'extrémité C-terminale du KD de BRAF (KD_{SYNZIP14}) pour évaluer son effet sur la dimérisation du KD. Le domaine KD de BRAF seul ou comprenant le SYNZIP14 ont été purifiés et leur profil d'élution analysé par chromatographie d'exclusion (SEC) comparativement à une courbe standard (**Figure 39.A**).

Le domaine KD de BRAF a un poids moléculaire de 35 kDa ce qui correspond à un volume d'élution de 15,8 mL selon l'échelle moléculaire (**Figure 39.B**) et la méthodologie utilisée

dans le laboratoire (Lavoie et al., 2013). Les volumes d'éluion en deçà de 13 mL correspondent à des agrégats ou à des contaminants. Le profil du KD_{SYNZIP14} montre deux pics principaux entre 13 et 17 mL d'éluion. Le pic à 13,8 mL, selon l'échelle de poids moléculaire de la Superdex200 (Figure 39.A), est nettement supérieur à 35 kDa, et pourrait donc correspondre à un dimère de KD_{SYNZIP14} (2*35 kDa = 70 kDa). Le second pic, plus élevé, correspond vraisemblablement au monomère potentiel de KD_{SYNZIP14} mais montre également des contaminants autour de 25 kDa. (Figure 39. B : gel de Coomassie à droite).

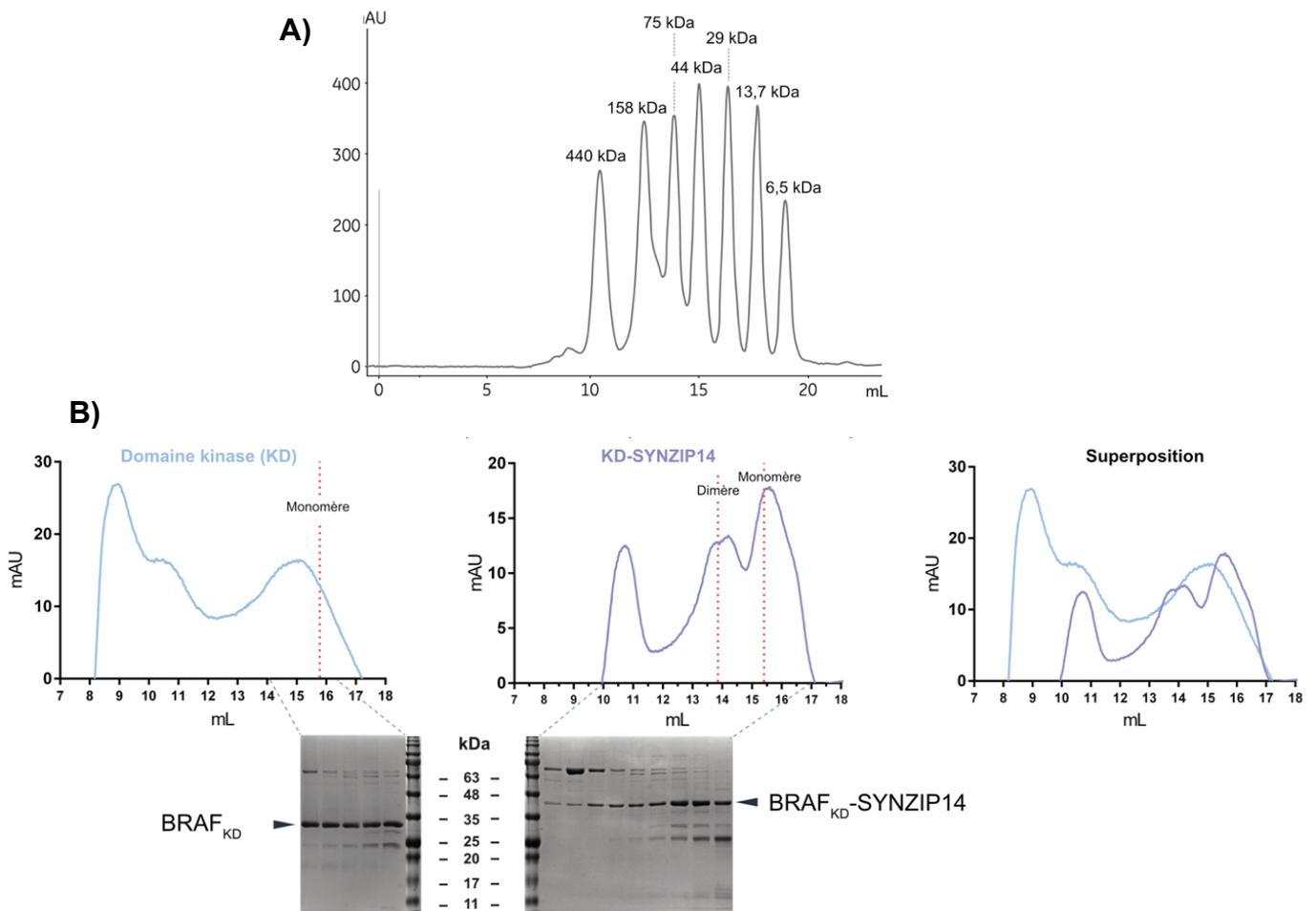


Figure 39 – Impact du peptide SYNZIP14 sur la dimérisation du domaine KD de BRAF

A) Courbe standard de chromatographie d'exclusion avec la colonne Superdex 200 10/300 G (<http://www.gelifesciences.com/protein-purification>).

B) En haut : Profils d'éluion du domaine kinase de BRAF seul (en bleu) ou fusionné au SYNZIP14 (en violet) en chromatographie d'exclusion. En bas : les fractions récoltées ont été déposées sur des gels SDS-PAGE qui ont été colorés par Coomassie.

mAU : milli Absorbance Unit, KD : Kinase Domain

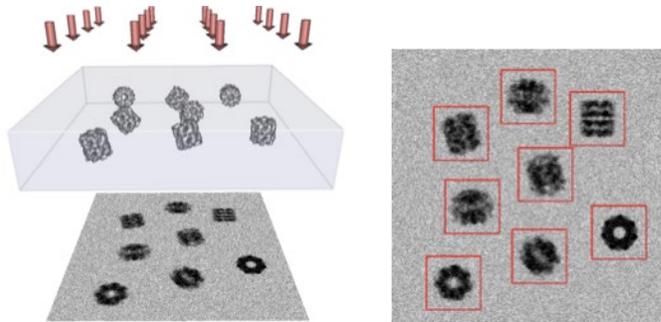
La présence d'une quantité importante de contaminants lors de la purification peut compliquer l'isolation spécifique du dimère. Dans ce contexte, le chevauchement partiel du pic « monomère » et du pic « dimère » ne permet pas une séparation idéale de ces deux formes. De plus, la fusion d'un peptide à l'extrémité C-terminale du KD pourrait perturber l'interaction des protéines 14-3-3 au dimère BRAF/KSR1 et perturber la stabilité du complexe (Rushworth et al., 2006). Nous avons donc conclu que cette stratégie n'était pas optimale et que la purification à partir de bactéries n'était pas adaptée à nos objectifs. Nous avons donc décidé de purifier le dimère BRAF/KSR1 à partir de cellules eucaryotes pour favoriser la formation de complexes plus physiologiques.

4.2.3 Vers l'obtention d'un complexe multiprotéique à partir de cellules eucaryotes

Lors de la réalisation de ces travaux de doctorat, il n'existait aucune structure de la forme pleine longueur d'une protéine de la famille RAF, du fait des problèmes de purification due à la solubilité, la pureté, ou la stœchiométrie de complexes d'intérêt. La stratégie la plus prometteuse de purification a semblé s'orienter vers les systèmes eucaryotes (cellules humains ou d'insectes) qui ont l'avantage d'exprimer naturellement certains des partenaires d'interaction essentiels à la stabilité des complexes. En particulier, la stabilisation des dimères de RAF nécessite la liaison à des partenaires d'interaction spécifiques tels que les protéines 14-3-3 (Adariani et al., 2018). De plus, MEK1 joue un rôle déterminant sur la formation du complexe BRAF/KSR1 comme nous l'avons vu dans le chapitre 1. De ce fait, le dimère BRAF/KSR1 pourrait exister sous forme d'un complexe multiprotéique constitué minimalement de 5 protéines : BRAF, KSR1, MEK1 et un tandem de protéines 14-3-3. L'obtention d'un complexe purifié aussi grand (environ 300 kDa) et dans des quantités suffisantes pour son analyse par cristallographie aux rayons X est difficilement envisageable. La technique de cryo-microscopie électronique (ou Cryo-EM) permet, quant à elle, l'analyse de complexes multiprotéiques de haut poids moléculaires à partir d'une plus faible quantité d'échantillon.

La cryogénération rapide de l'échantillon après purification permet de conserver la conformation des protéines et de pallier les problèmes de dénaturation et de changements conformationnels liés à la cristallographie. Une fois l'échantillon figé dans de la glace vitrifiée (*i.e.* sans cristaux), des images ou « photomicrographies » des macromolécules sont générées après acquisition en microscopie électronique. L'échantillon est composé de milliers de particules correspondant au complexe immobilisé dans une orientation aléatoire. La classification de ces orientations permet la reconstitution tridimensionnelle des complexes par traitement informatique (**Figure 40**) (Nogales and Scheres, 2015).

A) Rayons d'électrons



B)

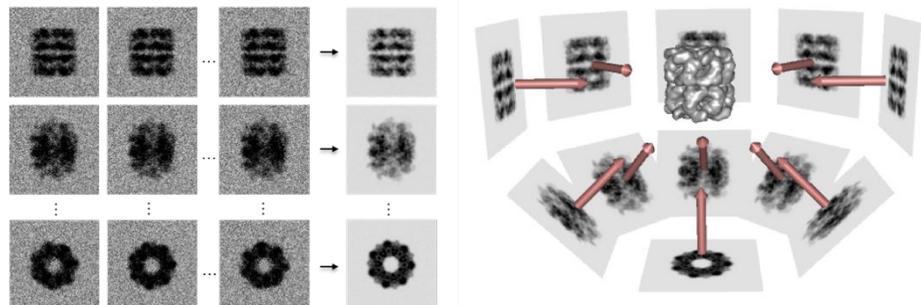


Figure 40 – Analyse d'un complexe protéique en Cryo-EM.

A) Les complexes purifiés sont soumis à un rayon d'électrons pour l'acquisition de photomicrographies. Chaque photomicrographie correspond à une projection 2D des particules présentes dans l'échantillon.
B) Chaque particule est ensuite classée selon l'orientation prise par le complexe au moment de la cryogénération. La compilation de ces collections de photomicrographies permet de reconstituer la structure tridimensionnelle du complexe protéique. Adapté de <https://people.csail.mit.edu/gdp/cryoem.html> - Laboratoire de Greg Pintilie.

Le succès de la reconstitution 3D repose notamment sur la superposition, par des algorithmes, des structures existantes des différentes protéines du complexe. Ainsi, le grand nombre de structures déjà résolues des domaines isolés de NTR de BRAF et KSR1, de leur domaines kinases, de MEK1 et des protéines 14-3-3 constitue un avantage non négligeable pour l'analyse et la reconstitution 3D finale du complexe multiprotéique (Carroni and Saibil, 2016).

Dans un premier temps, nous avons défini les conditions optimales de purification pour isoler le complexe BRAF/KSR1/MEK1/14-3-3. Nous avons opté pour une technique de purification en cellules de mammifères (HEK293T) permettant de conserver les modifications post-traductionnelles des protéines et de s'assurer de la liaison des protéines 14-3-3 stabilisant le complexe.

Les 5 protéines RAF (ARAF, BRAF, CRAF, KSR1 et KSR2) sont présentes de façon endogène dans les cellules de mammifères. Afin de privilégier la formation du dimère BRAF/KSR1 au dépend des autres dimères de RAF tels que BRAF/CRAF ou BRAF/BRAF, les protéines BRAF et KSR1 ont été co-exprimées à l'aide de plasmides d'expression. Au vu de son rôle de stabilisateur, le substrat MEK1 a également été exprimé en combinaison avec BRAF et KSR1. En se fixant sur le KD, les premières inhibiteurs pharmacologiques des kinases RAF stimulent la voie RAS-ERK par « activation paradoxale » en induisant la dimérisation des protéines de la voie (Hatzivassiliou et al., 2010; Heidorn et al., 2010; Poulikakos et al., 2010). Nous avons tiré avantage de ce phénomène et favoriser la formation du dimère BRAF/KSR1 en ajoutant un inhibiteur de RAF qui induit cet effet au procédé de purification. Plusieurs conditions d'élution ont également été testées et chaque produit de purification a été analysé sur gel après coloration au bleu de Coomassie. Les bandes de plus forte intensité ont été analysées par spectrométrie de masse (**Figure 41**).

La combinaison de ces paramètres nous a permis d'éluer avec succès BRAF avec KSR1 et MEK1, dans des conditions proches de ce que nous supposons être la stoechiométrie idéale (1 molécule de BRAF pour 1 molécule de KSR1). Par ailleurs, des protéines 14-3-3 endogènes ont également été détectées dans toutes les conditions et sont constituées d'un mélange des 7 isoformes présents en cellule de mammifère (Aitken et al., 2006). L'ajout de l'inhibiteur nous a ainsi permis de purifier une quantité plus importante de dimères BRAF/KSR1 (**Figure 41 : comparer condition 2 et 3**). Pour purifier les complexes par immunoprécipitation, une étiquette Flag a été ajoutée à la protéine BRAF. Ainsi, la protéine BRAF et ses partenaires d'interaction ont été fixés

sur une résine reconnaissant l'étiquette Flag (Anti-FLAG M2 resin, GE Healthcare). Deux conditions d'élution du complexe ont été testées. La première repose sur la compétition d'un peptide-Flag « libre » ajouté en excès, permettant le décrochage de BRAF et de ses protéines d'interaction de la résine (**Figure 41 : conditions 3 à 8**). La deuxième condition d'élution a été utilisée en combinaison avec la forme Flag-TEV-BRAF. Le site « TEV » est une séquence d'acides aminés reconnue par la protéase TEV, qui provoque l'élution du complexe par clivage (**Figure 41 : conditions 9 à 13**). Différentes concentrations de peptide-Flag ou de protéases TEV ont ainsi été évaluées pour la meilleure condition d'élution. De même, le volume idéal de résine M2 a également été déterminé pour s'assurer de capturer une quantité importante de protéines sans pour autant fixer de contaminants additionnels (**Figure 41 : conditions 14 à 16**). La protéase TEV est une enzyme aisée à produire en quantité importante. Par ailleurs, la technique d'élution par clivage à la TEV permet d'obtenir une quantité équivalente de protéines comparativement à l'élution par excès de peptide-Flag (**Figure 41 : comparer conditions 3 et 9**). En plaçant le site de clivage entre l'étiquette Flag et la protéine BRAF, le clivage présente l'avantage d'ôter l'étiquette qui pourrait être un obstacle à la reconstitution 3D. Les conditions 9 et 15 et la présence d'un inhibiteur de BRAF ont donc été considérées comme optimale pour réaliser l'expériences de purification du complexe.

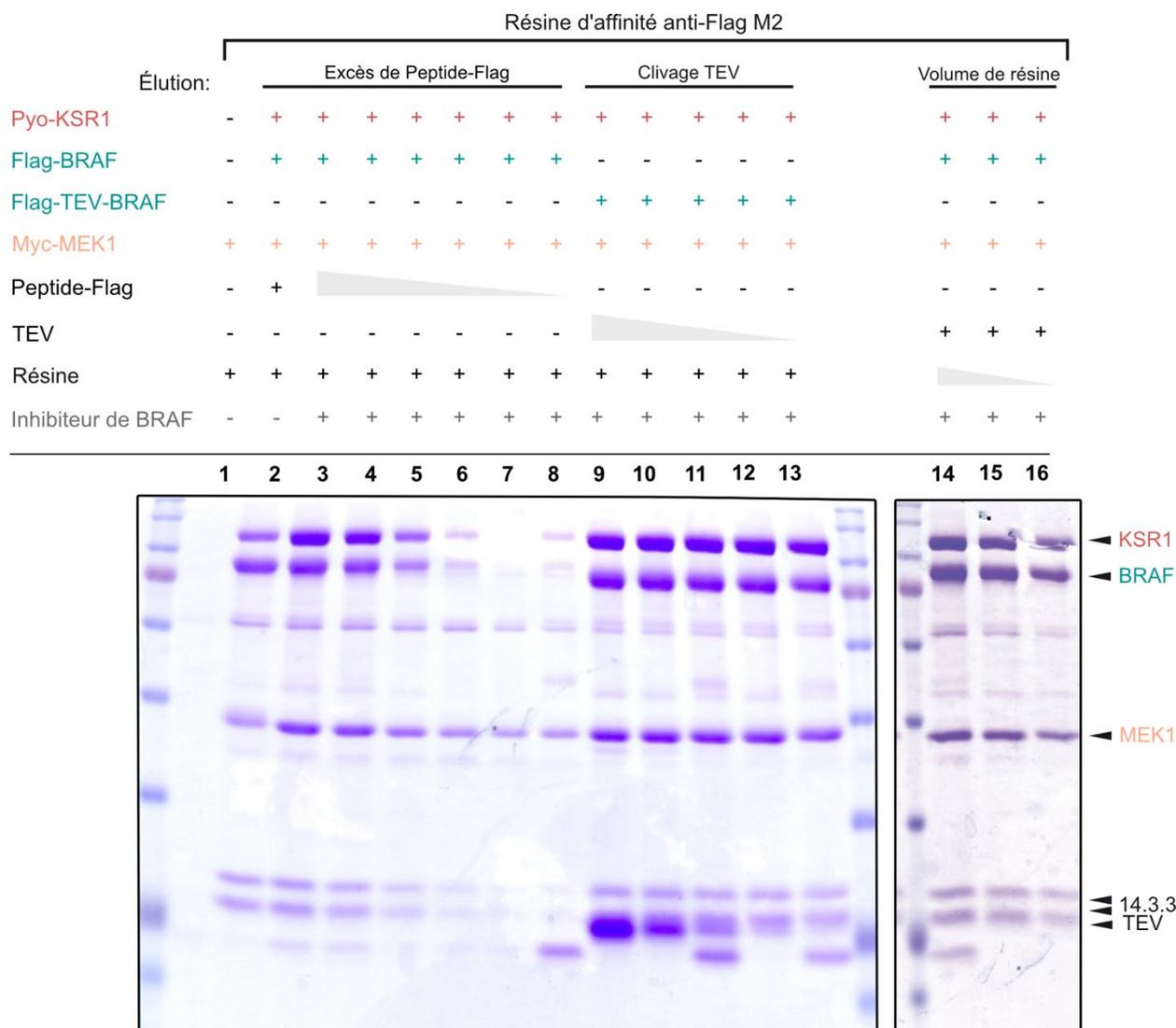


Figure 41 – Évaluation des conditions de purification du dimère KSR1/BRAF.

Les protéines *pyo-KSR1*, *Flag-BRAF*, *Flag-TEV-BRAF* ont été co-exprimées en cellules HEK293T dans plusieurs conditions. Les éluats des purifications ont été déposés sur gel SDS-PAGE et colorés par Coomassie. La condition 1 correspond à un contrôle expérimental. Les protéines indiquées par des flèches ont été identifiées par spectrométrie de masse après extraction de la bande correspondante.

Pour obtenir des photomicrographies optimales, il est nécessaire de s'assurer de la pureté et de l'homogénéité de l'échantillon. D'une part, la présence de contaminants peut créer un bruit de fond, rendant l'acquisition des images plus difficile. Ces contaminants peuvent également se lier non spécifiquement aux protéines d'intérêt et créer, de ce fait, un nouveau type artéfactuel de

complexe protéique. Aussi, un échantillon hétérogène composé de plusieurs types de complexes complique la classification des particules et, par extension, nuit à la reconstitution 3D. D'autre part, l'homogénéité dépend également de la stabilité des interactions des protéines d'intérêt: la dissociation de l'un des membres du complexe peut également conduire à différents sous-types de complexe (Glaeser et al. 2016).

La chromatographie d'exclusion (SEC) a été utilisée pour purifier le complexe BRAF/KSR1/MEK1/14-3-3. Malheureusement, le profil d'élution a révélé un échantillon hétérogène présentant des agrégats de haut poids moléculaire et une dissociation du complexe (présence de protéines individualisées). La quantité de complexe BRAF/KSR1/MEK1/14-3-3 obtenue dans ces conditions n'est pas suffisante pour envisager une analyse par cryo-EM, ce qui a été confirmé par les premières étapes d'analyse en microscopie électronique (données non montrées).

L'utilisation de formes mutantes de BRAF, KSR, ou MEK1 couplées à la présence d'un inhibiteur de MEK1 a été envisagée comme solution pour stabiliser le complexe. La co-expression des protéines a également été adaptée à des cellules de mammifères en suspension (HEK293F) pour augmenter le rendement du complexe et faciliter le procédé de transfection. Ces expériences sont en cours d'optimisation pour aboutir à un échantillon homogène. Une approche de purification similaire de l'homodimère BRAF/BRAF a démontré que, bien qu'isolé *in vitro*, ce complexe conserve une activité kinase (Cope et al., 2018). Un autre projet du laboratoire s'est par ailleurs focalisé sur l'optimisation des conditions de stabilisation d'un autre complexe de BRAF plus prometteur (la forme auto-inhibée de BRAF en présence d'un tandem de protéines 14-3-3 et/ou de MEK1).

Ces résultats nous confortent dans l'idée que cette approche en cellules de mammifères est un système prometteur pour aboutir à la purification d'un complexe BRAF/KSR1/MEK1 natif proche des conditions physiologiques. L'abondance relative des protéines au sein des cellules de mammifères, telles que les cellules HEK293, a une grande influence sur le succès d'une purification, notamment pour atteindre un rendement suffisant (Geiger et al., 2012).

Dans l'éventualité où ce système ne serait finalement pas adéquat pour la technique de Cryo-EM, la purification à partir de cellules d'insectes Sf9 a également été envisagée en parallèle. Ces cellules sont plus aisées à manipuler et possèdent un rendement protéique plus important. Ce

modèle eucaryote à l'avantage d'être proche des cellules de mammifères, notamment par la présence des analogues des protéines 14-3-3 pouvant se fixer aux complexes de protéines humaines (Fu et al., 1994). En particulier, de nombreuses études ont utilisé le système de vecteur de baculovirus pour exprimer et purifier des complexes protéiques de haut poids moléculaire (Fitzgerald et al., 2006). Dans ce système, chaque cassette d'expression contient un gène accompagné d'un promoteur et d'un terminateur, permettant l'expression conjointe de tous les partenaires d'un même complexe (Weissmann et al., 2016).

Nous avons donc utilisé cette technique pour générer des vecteurs d'expression comportant différents complexes de protéines RAF dont le dimère BRAF/KSR1. Les gènes de BRAF, KSR1, MEK1, 14-3-3 et/ou HRAS ont chacun été incorporés à des cassettes d'expression contenues dans un plasmide d'expression. Bien que des protéines 14-3-3 analogues soient présentes de façon endogène, nous avons choisi d'exprimer des isoformes humaines pour obtenir des complexes homogènes. Des formes mutées de certains gènes ont été utilisées pour favoriser la formation de complexes spécifiques. Ainsi, le gène *HRAS* contenant la mutation activatrice G12V a été choisi dans le but de stabiliser un homodimère de BRAF. Nous avons également intégré la forme mutée MEK1^{WLN}, isolée précédemment permettant à MEK1 de se lier de façon préférentielle à KSR1 (voir section 3.1.3.2), pour privilégier le complexe BRAF/KSR1/MEK1. Chaque construction a été séquencée et digérée par des enzymes de restriction pour confirmer la présence des gènes d'intérêt. Les produits de digestion ont été analysés sur un gel d'agarose (**Figure 42**). Les patrons de migration des produits de digestions ainsi que les résultats du séquençage nous ont permis de confirmer six constructions, contenant les gènes suivants : (1) Flag-TEV-BRAF/Myc-MEK1/HRAS^{G12V}, (2) Flag-TEV-BRAF, (3) HIS-TEV-KSR1/Flag-TEV-BRAF/Myc-MEK1, (4) HIS-TEV-KSR1/Flag-TEV-BRAF/MEK1^{WLN}, (5) KSR1/BRAF/MEK1^{WLN}/14-3-3 β et (6) KSR1/BRAF/MEK1^{WLN}/14-3-3 ϵ .

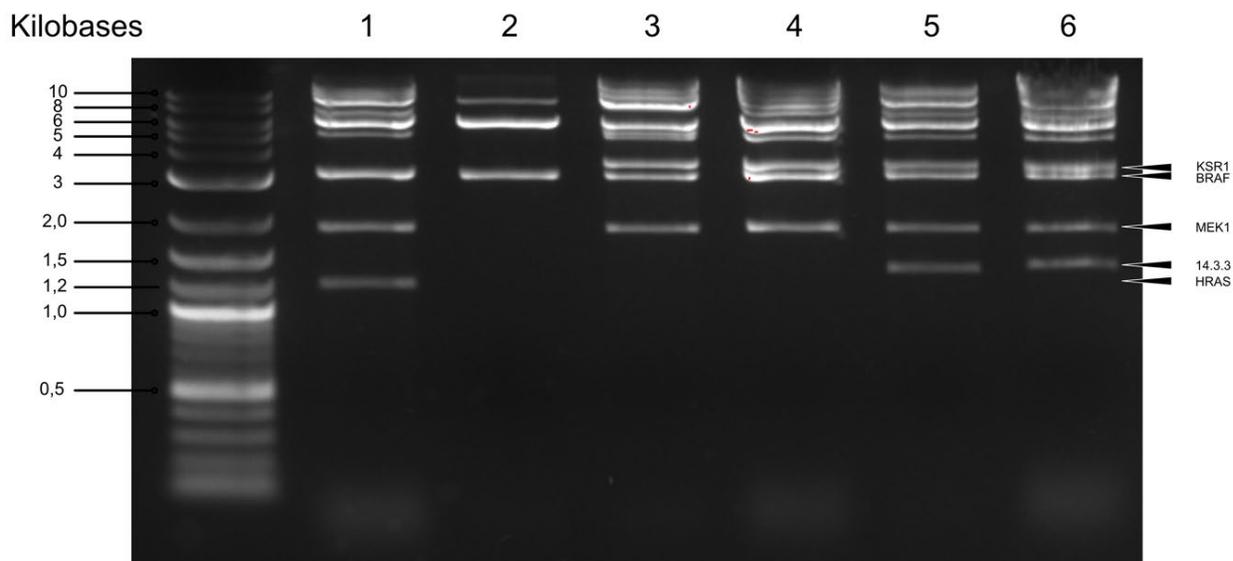


Figure 42 – Plasmides d’expressions pour l’expression de complexes de BRAF/KSR1.

Gel d’agarose 1 % après marquage au RedSafe. Chacune des constructions (1 à 6) comporte plusieurs gènes intégrés à un plasmide par clonage. Les protéines encodées par ces gènes sont indiquées sur la droite.

L’expression de ces complexes protéiques devra être évaluée en cellules d’insecte. Par la suite, si la purification permet l’isolement d’un complexe BRAF/KSR1/MEK1 en quantité suffisante, une analyse par la technique de cryo-EM pourra être enfin envisagée.

4.2.4 Conclusions et perspectives

Dans cette deuxième partie, nous nous sommes focalisés sur l’étude des interactions entre les différents domaines qui composent les NTRs de BRAF et de KSR1. Ces expériences nous ont permis de conclure qu’une approche par isolement des domaines seuls n’est pas envisageable du fait de la faible affinité de ces interactions. Nous avons également évalué des techniques pour purifier le dimère BRAF/KSR1 afin d’en obtenir la structure. L’utilisation d’outils moléculaires tels que les SYNZIP pour isoler le dimère BRAF/KSR1 à partir de bactéries ne nous a pas semblé être une approche réaliste du fait du faible rendement protéique et de la présence importante de contaminants. Par ailleurs, des difficultés rencontrées lors de la purification ont mis à jour les problèmes de solubilité inhérents à BRAF. Ceux-ci sont visibles aussi bien au niveau de domaines (le CRD) qu’à l’échelle du dimère (formation d’agrégats). En parallèle, nous nous sommes

également intéressés à l'isolement du dimère BRAF/KSR1 à partir d'un système eucaryote plus adapté à la purification de protéines humaines.

Les avantages de la technique de cryo-EM, nous ont conduit à favoriser l'isolement d'un complexe multiprotéique plutôt que le seul dimère BRAF/KSR1. Nous avons ainsi optimisé la purification du complexe BRAF/KSR1/MEK1 et, en particulier, son élution à partir de cellules de mammifères HEK293T. Nous avons obtenu des niveaux d'expression protéique satisfaisants et vraisemblablement stœchiométriques. Nous avons par ailleurs constaté la formation d'un complexe physiologique validé par la présence de partenaires d'interaction spécifiques (les protéines 14-3-3) et présents de façon endogène dans les cellules utilisées pour la purification. Les problèmes de stabilité et d'agrégation du complexe nous ont conduit à envisager la purification à partir de cellules d'insectes en tirant avantage d'un système d'expression multigénique. Nous avons obtenu plusieurs constructions prometteuses dont l'expression reste encore à tester.

L'optimisation de ces approches en cellules eucaryotes favorisera l'établissement d'une stratégie de purification idéale pour isoler des complexes de signalisation. Parmi eux, nous pourrions obtenir celui mettant en jeu le dimère BRAF/KSR1. L'étude de la relation structure/fonction permettra à terme d'améliorer notre compréhension du mode de fonctionnement de ce dimère.

Chapitre 5 : Discussion

La voie RAS-ERK est devenue l'archétype des voies de signalisation. Elle a été décrite chez de nombreuses espèces et de multiples fonctions lui ont été associées, notamment dans les cancers humains (pour revues : (Degirmenci et al., 2020; Simanshu et al., 2017; Yaeger and Corcoran, 2019). Bien que les prémices de sa découverte aient eu lieu il y a près de 40 ans, certains aspects de son fonctionnement restent encore à élucider.

La schématisation simplifiée de la voie RAS-ERK en une cascade linéaire et séquentielle ne reflète pas la complexité des mécanismes de régulation contrôlant l'activité des kinases (Roberts and Der, 2007). Un excellent exemple est celui de la transmission du signal au niveau des kinases RAF. En effet, celles-ci nécessitent une combinaison d'interactions protéiques, d'épisodes de (dé-) phosphorylations et de modifications structurales pour être catalytiquement compétentes. Chacun de ces événements est nécessaire à l'activation des kinases et constitue de ce fait, un moyen indépendant de régulation de l'activité kinasique (Lavoie and Therrien, 2015).

La dimérisation des kinases RAF joue un rôle central dans leur fonction catalytique (Garnett et al., 2005; Hu et al., 2013; Rushworth et al., 2006). Les pseudokinases KSR, évolutivement proches des kinases RAF, peuvent dimériser avec ces dernières. Ce phénomène aboutit à un hétérodimère RAF/KSR catalytiquement actif capable d'activer les kinases MEK (Brennan et al., 2011; McKay et al., 2009; Rajakulendran et al., 2009).

Les protéines KSR sont indispensables à la signalisation RAS-ERK chez *C. elegans* et *D. melanogaster* (Kornfeld et al., 1995; Therrien et al., 1995). Chez les mammifères, la délétion de l'isoforme KSR2 provoque d'importants troubles métaboliques (Costanzo-Garvey et al., 2009) tandis que celle de l'isoforme KSR1 atténue la transformation oncogénique des cellules suite à la mutation activatrice RAS (Lozano et al., 2003). Au sein de la voie RAS-ERK, les protéines KSR qui co-localisent avec les différents acteurs de la cascade et sont principalement des activateurs allostériques des kinases RAF (Kortum and Lewis, 2004; Roy et al., 2002). Cette propriété repose notamment sur l'établissement de plusieurs interactions clés entre les protéines RAF et KSR ainsi qu'avec la protéine MEK1, interactions que nous avons contribué à mettre à jour au cours de ce travail de thèse. Nos efforts se sont plus focalisés sur l'analyse du dimère BRAF/KSR1, notamment en raison de la place de BRAF dans le développement de cancers et de l'implication de KSR1 dans les phénomènes de résistance aux inhibiteurs (McKay, Ritt, et al., 2011).

Au cours de cette analyse, nous avons découvert trois processus importants qui interviennent dans la formation spécifique du dimère BRAF/KSR1. Premièrement, MEK1 est activateur de sa propre kinase, en amenant KSR1 à dimériser avec BRAF et en induisant la phosphorylation d'une autre molécule de MEK1. Deuxièmement, nous avons déterminé qu'il existe une interaction spécifique au sein du dimère BRAF/KSR1 entre le domaine BRS de BRAF et le domaine CC-SAM de KSR1. Pour finir, nous avons observé que le domaine CRD de BRAF influence la dimérisation de BRAF avec KSR1 par un mécanisme qui reste encore à déterminer.

5.1 Comment le domaine CRD de BRAF impacte-t-il l'interaction BRS/CC-SAM ?

Le domaine CRD est un domaine de liaison au zinc présent chez les cinq membres de la famille des protéines RAF dans leur région NTR (Ghosh et al., 1994; Mott et al., 1996). Ce domaine participe à l'ancrage membranaire des kinases RAF lors de leur association aux protéines RAS (Bondeva et al., 2002). Les protéines KSR ne possèdent pas de domaines pouvant s'associer à RAS; en revanche elles peuvent se lier aux phosphatidyl-sérines présentes dans la membrane plasmique par le biais de leur CRD (Zhou et al., 2002).

Au cours de nos travaux, nous avons mis à jour une interface d'interaction inédite entre les protéines BRAF et KSR1. Nos résultats ont ensuite suggéré à plusieurs reprises que ce domaine pourrait également jouer un rôle important dans la formation du dimère BRAF/KSR1 en impactant cette interaction.

La kinase BRAF établit en effet un point de contact direct avec la protéine KSR1 *via* l'interaction des domaines BRS et CC-SAM (**Figure 43.A, p. 149**). Cette interaction est unique et spécifique au dimère BRAF/KSR1 et elle est nécessaire à sa formation. En effet, la mutation de cette interface nuit à l'association de BRAF^{NTR} avec KSR1^{NTR} (**Figure 23, p. 106**) et diminue la capacité de KSR1 à transactiver BRAF (Lavoie et al., 2018 : **Figure 3 e et f**).

En outre, nous avons déterminé que la délétion du domaine CRD_{BRAF} diminue l'interaction de BRAF^{NTR} avec KSR1^{NTR} (Lavoie et al., 2018 : **Extended Data Figure 6.d**), laissant supposer que le domaine CRD_{BRAF} pourrait stabiliser l'association de BRAF avec KSR1. Cette stabilisation pourrait être la conséquence d'une interaction directe entre le domaine CRD_{BRAF} et le domaine CRD_{KSR1}. Aucune interaction CRD_{BRAF} /CRD_{KSR1} n'a cependant été détectée lors de nos

expériences de double hybride (**Figure 26, C3, p. 110**), ou de co-IP (données non présentées). De la même façon, nos données préliminaires de RMN n'ont fait état d'aucune d'interaction homotypique CRD_{CRAF}/CRD_{KSR1} (**Figure 38, p. 132**). Si elle existe, il est possible que cette interaction soit trop faible pour être détectée dans nos conditions expérimentales.

Afin d'étudier particulièrement les domaines NTR, nous avons créé une matrice d'interactions en Y2H, l'objectif étant de comprendre les interactions existant entre les différents domaines de BRAF^{NTR} et KSR1^{NTR}. De façon surprenante, les plus fortes interactions ont été détectées avec des fusions de domaines (BRS+CRD_{BRAF} et CC-SAM+CRD_{KSR1} : **Figure 26, colonne 4 et ligne D, p. 110**). Toutes ces interactions ont un point commun : leur formation repose minimalement sur la présence de l'interaction BRS/CC-SAM. Par exemple, une forte interaction est détectée entre le domaine CC-SAM seul et BRS+CRD_{BRAF} où le BRS pourrait effectivement interagir avec le domaine CC-SAM. Aucune interaction n'est détectée entre le domaine CRD_{KSR1} seul et BRS+CRD_{BRAF}, le domaine BRS ne pouvant pas établir de contact avec le domaine CC-SAM dans cette condition. Puisque la force de ces interactions est supérieure à celle de l'interaction BRS/CC-SAM, il est possible d'imaginer que dans ces configurations artificielles, le CRD_{BRAF} est positionné de façon à stabiliser l'interaction BRS/CC-SAM (**Figure 43.B**).

Dans les conditions physiologiques, BRAF s'associe aux protéines RAS lorsqu'elle est activée. Des données structurales récentes ont montré qu'il existe une collaboration du domaine CRD avec le domaine RBD pour permettre l'ancrage de CRAF aux protéines RAS et à la membrane plasmique (Cookis and Mattos, 2021; Tran et al., 2021). Si ces observations sont également valides pour l'isoforme BRAF, le domaine CRD_{BRAF} doit alors s'ancrer à deux endroits : à RAS et à la membrane plasmique. Dans ce contexte, le domaine CRD_{BRAF} serait bloqué dans une conformation spécifique unique lui permettant une faible interaction avec les autres domaines de la NTR (**Figure 43.C**).

L'équipe de Mariano Barbacid a récemment étudié l'hétérodimérisation de BRAF et de KSR1 dans des cellules « RAS-less », c'est-à-dire dépourvues de protéines RAS après déplétions géniques (Paniagua et al., 2022). Dans leur modèle, seul l'ancrage à la membrane plasmique de KSR1 et/ou de BRAF est requis pour permettre la transactivation de BRAF de façon indépendante des protéines RAS. L'adressage dépendrait alors uniquement des domaines CRD respectifs de BRAF et KSR1 (Zhou et al., 2002). En l'absence de RAS, on peut supposer que le domaine

CRD_{BRAF} pourrait stabiliser l'interaction BRS/CC-SAM ce qui serait en accord avec nos expériences en levures (**Figure 43.D**). En effet, puisque les interactions observées en Y2H ont lieu dans le noyau (voir le principe du Y2H dans le chapitre 2), l'association de BRAF^{NTR} avec KSR1^{NTR} s'effectue donc théoriquement en absence de protéines RAS (**Figure 23, p. 106**). De façon similaire, les expériences de surexpression de BRAF et KSR1 en cellules de mammifères ont été réalisées sans avoir recours à un stimulus induisant l'activation des protéines RAS, tels que l'ajout d'EGF ou à l'utilisation d'une forme suractivée de RAS (**Figure 20, p. 102**). Dans des conditions spécifiques d'expression, le dimère BRAF/KSR1 se formerait donc en l'absence de protéines RAS activées (*i.-e.* GTP-liées).

Lors de son association à la membrane plasmique, les mêmes auteurs mentionnent également que l'ancrage membranaire de KSR1, s'effectue par les hélices du motif « CC » du domaine CC-SAM (Koveal et al., 2012; Paniagua et al., 2022). La structure de l'interface BRS/CC-SAM montre que ces hélices du motif CC sont essentielles à l'interaction du CC-SAM avec le domaine BRS (Lavoie et al., 2018 : **Figure 3.e et 3.f**). Dans le contexte de la dimérisation de BRAF avec KSR1, il est donc peu probable que l'interaction BRS/CC-SAM ait lieu de façon simultanée à l'ancrage de KSR1 à la membrane plasmique par ce même domaine CC-SAM.

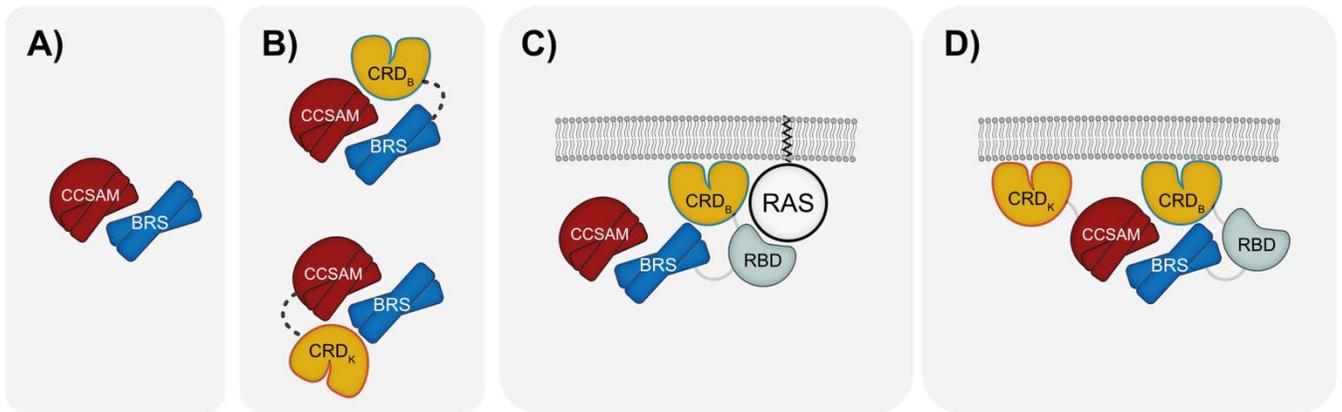


Figure 43 – Modèles de l'implication du domaine CRD_{BRAF} sur l'interaction BRS/-CC-SAM.

A) L'interaction BRS/CC-SAM engage les hélices du BRS et le motif « CC » du CC-SAM. B) Les fusions de domaines BRS+CRD_{BRAF} et CC-SAM+CRD_{KSR1} (indiquées par des pointillés) positionnent les domaines CRD de façon à stabiliser l'interaction BRS/CC-SAM. C) Dans un contexte où BRAF est ancrée à la membrane plasmique après activation de RAS, le CRD_{BRAF} est séquestré par association à la membrane plasmique et à la protéine RAS. D) L'ancrage des domaines CRD à la membrane plasmique stabilise l'interaction BRS/CC-SAM.

BRS: BRAF specific Sequences; RBD: Ras-Binding Domain; CRD: Cysteine-Rich Domain; CC-SAM: Coiled-Coil Sterile Alpha Motif.

5.2 Quel est le rôle du domaine CRD dans l'activation des kinases RAF?

Pour rappel, la kinase BRAF adopte deux états principaux lors son cycle d'activation : un état monomérique auto-inhibé et un état dimérique activé. Le domaine CRD_{BRAF} a depuis longtemps été reconnu comme essentiel à l'auto-inhibition de BRAF puisqu'il s'associe aux protéines 14-3-3 (Cutler et al., 1998; Freeman and Morrison, 2011; Guan et al., 2000). La résolution récente de la structure de la forme auto-inhibée de BRAF pleine longueur a étayé ces résultats, démontrant l'importance du CRD_{BRAF} dans cette conformation. Dans cette structure, le domaine CRD_{BRAF} est emboîté au sein du tandem de protéines 14-3-3 à qui il sert de support pour stabiliser la forme inactive monomérique de BRAF. Dans cette conformation, le domaine CRD_{BRAF} interagit donc directement avec le KD et bloque l'accès à son interface de dimérisation (Park et al., 2019).

La formation de l'hétérodimère BRAF/CRAF est assujettie à la stimulation des protéines RAS (Freeman et al., 2013b; Rushworth et al., 2006). L'association des kinases RAF aux protéines

RAS activées induit en effet « l'ouverture » des kinases RAF c'est-à-dire la dissociation des régions NTR d'avec les KD, rendant les kinases catalytiquement actives (Vojtek et al., 1993; Zhang et al., 1993) (**Figure 44.A**). Des mutations du domaine CRD_{BRAF} facilitent cette dissociation accrue de la NTR et contribuent à la formation du dimère BRAF/CRAF (Spencer-Smith et al., 2021). Le domaine CRD_{BRAF} est en effet la cible de mutations congénitales, responsables de Rasopathies qui sont un ensemble de maladies liées à des troubles du développement. Moléculairement, ces mutations induisent notamment une augmentation de l'activation de la voie RAS-ERK (Niihori et al., 2006; Rodriguez-Viciana et al., 2006). Plus précisément, elles influencent l'activité catalytique de BRAF, cependant les conséquences structurales de ces mutations de BRAF ne sont pas encore connues (Tidyman and Rauen, 2016).

Le domaine CRD_{BRAF} se caractérise par la présence de deux boucles pouvant s'insérer dans la bicouche lipidique (Medkova and Cho, 1999; Xu et al., 1997). L'intégrité structurale de ces boucles est assurée par un motif de liaison du zinc où des résidus cystéines et histidines coordonnent deux ions métalliques qui se situent à la surface du domaine (Mott et al., 1996) et **Figure 29, p. 116**). Dans ce cas, les Rasopathies sont provoquées par des mutations de surface qui ne perturberaient probablement pas ou peu le repliement du domaine CRD_{BRAF}. Ces mutations provoquent en revanche une dissociation accrue de la NTR d'avec le domaine kinase. Elles induisent également un ancrage plus important de BRAF aux phosphatidyl-sérines de la membrane plasmique et une plus grande association aux protéines RAS. Dans ce contexte, les auteurs postulent que ces mutations identifiées dans les Rasopathies favoriseraient la formation du dimère BRAF/CRAF (Spencer-Smith et al., 2021).

Pour le dimère BRAF/KSR1, ce serait l'action conjointe de MEK1 et l'association à RAS activée qui favoriserait l'ouverture de KSR1 et de BRAF respectivement. Ce modèle implique que l'activation de RAS induirait le recrutement de BRAF qui en retour, favoriserait le recrutement membranaire de KSR1 (**Figure 44.B**) (Lavoie et al., 2018). Il existerait ainsi un lien direct entre l'activation de RAS et la localisation de KSR1 à la membrane plasmique (Frolyma et al., 2017; Neilsen et al., 2017).

Dans le cas où la formation du dimère BRAF/KSR1 serait indépendante de l'activation des protéines RAS, un autre mécanisme devrait permettre l'ouverture de BRAF et son association à la membrane plasmique (**Figure 44.C**). L'indépendance de la dimérisation de BRAF avec KSR1 par

rapport aux protéines RAS modifie complètement la façon d'envisager le mécanisme régulateur permettant d'activer BRAF. Il est possible que l'ouverture de BRAF et son association membranaire ne soient pas provoquées par un signal spécifique d'adressage mais à partir d'une quantité seuil de KSR1 liée à MEK1. La formation du dimère BRAF/KSR1 aurait alors lieu spontanément par simple effet de proximité entre BRAF et KSR1. L'ancrage membranaire ne dépendrait donc que des domaines CRD de BRAF et KSR1.

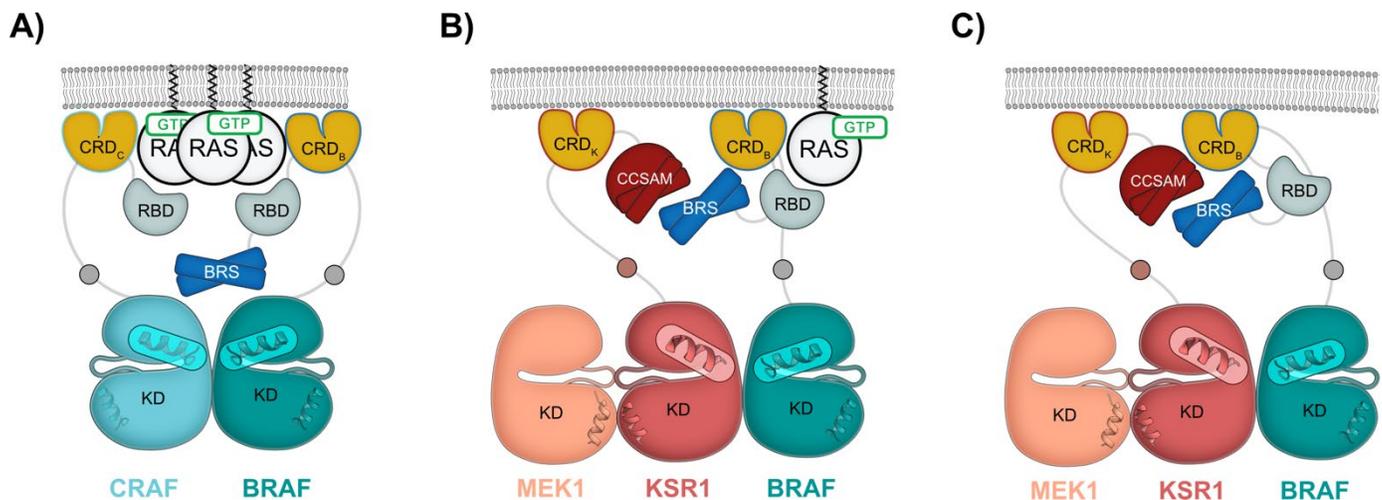


Figure 44 – Modèle de la formation des hétérodimères BRAF/CRAF et BRAF/KSR1.

A) La formation du dimère BRAF/CRAF repose sur l'interaction des domaines RBD avec les protéines RAS activées ce qui favorise la dissociation de la NTR (composée des domaines BRS, RBD et CRD chez BRAF) d'avec le KD. B) L'association de BRAF à RAS-GTP favorise sa désinhibition et son ancrage à la membrane plasmique via son domaine CRD. L'association de MEK1 avec KSR1 permet d'ouvrir KSR1 qui est recrutée à la membrane plasmique par BRAF induisant la formation du dimère BRAF/KSR1. C) En l'absence de protéines RAS, l'interaction MEK1/KSR1 est suffisante pour ouvrir BRAF et recruter BRAF à la membrane plasmique indépendamment de RAS et uniquement via l'ancrage des domaines CRD. Pour simplifier les schémas, les tandems de protéines 14-3-3 qui s'associent aux dimères n'ont pas été représentés.

BRS: BRAF specific Sequence; RBD: Ras-Binding Domain; CRD: Cysteine-Rich Domain; CC-SAM: Coiled-Coil Sterile Alpha Motif, KD: Kinase Domain.

5.3 Que provoquent les mutations du domaine CRD de BRAF, découvertes par le crible ?

Lors de nos travaux, nous avons utilisé l'interaction BRAF^{NTR}/KSR1^{NTR} comme point de départ d'un crible visant à identifier des mutations de type « gain d'interaction ». Les mutations identifiées se sont principalement concentrées dans le domaine CRD_{BRAF} et notamment au niveau du motif de liaison au zinc qui assure le repliement du domaine (**Figure 29, p. 116**). Nous avons constaté que le gain d'interaction de BRAF^{NTR} avec KSR1^{NTR} provoqué par ces mutations nécessite une interface BRS/CC-SAM intacte (**Figure 31.B, p. 120**). Ces résultats nous confortent dans l'idée que le domaine CRD_{BRAF} stabiliserait l'interaction BRS/CC-SAM.

Des mutations similaires dans les domaines CRD de CRAF et KSR1 ont déjà été rapportées dans la littérature sous le nom de mutations « CRM » (de « *Cysteine-Rich Motif* ») (Michaud et al., 1995; Michaud et al., 1997). D'après les études structurales du domaine CRD de l'isoforme CRAF, ces mutations CRM affectent probablement le repliement général du domaine, contrairement aux mutations de surface liées aux Rasopathies (Cutler et al., 1998; Winkler et al., 1998). Les tentatives de purification du domaine CRD_{BRAF} n'ont abouti qu'à la précipitation du domaine, suggérant que même en l'absence de mutations le domaine est peu soluble et nécessite la présence obligatoire de zinc lors de l'expérience (**Figure 37, p.130**). De ce fait, la forme mutée CRM du domaine CRD_{BRAF} ne pourrait ni s'insérer dans la membrane plasmique, ni se lier aux protéines RAS. En ce sens, il a été montré que l'introduction de mutations CRM dans domaine CRD_{KSR1} ne permettent plus à KSR1 d'être ancrée dans la bicouche lipidique (Michaud et al., 1997). Dans ce contexte, ils observent qu'en ne pouvant plus s'ancrer à la membrane plasmique, KSR1 ne peut plus « répondre » à l'effet stimulateur de RAS. Ces résultats sont en accord avec le modèle de formation du dimère BRAF/KSR1 dépendant de la présence de RAS proposé plus haut (**Figure 45.A**). Le dimère BRAF/KSR1 pourrait également se former et être catalytiquement actif même en l'absence de RAS, lorsque la concentration de KSR1 est suffisamment importante (**Figure 45.B**).

Dans nos travaux, les mutations CRM du domaine CRD_{BRAF} ont provoqué une augmentation de l'activation de la voie RAS-ERK lorsqu'elles ont été introduites dans BRAF^{FL} et ce, en l'absence d'une forme suractivée de RAS (**Figure 33.B, p. 122**). Dans ce contexte, le domaine CRD_{BRAF} ne serait ni ancré à la membrane plasmique, ni associé aux protéines RAS au vu des effets destructurants des mutations CRM. Nous pouvons aussi supposer que les mutations CRM dans le

domaine CRD_{BRAF} induisent l'ouverture de BRAF en facilitant la dissociation de la NTR d'avec le KD (Spencer-Smith et al., 2021). Par ailleurs, en déstructurant le domaine CRD_{BRAF}, ces mutations mettraient à jour des résidus habituellement enfouis, qui stabiliseraient l'interaction BRS/CC-SAM en établissant un contact « collant » avec les deux domaines Cette hypothèse expliquerait la présence du nombre important dans notre crible de l'interaction BRAF^{NTR}/KSR1^{NTR} de formes tronquées de BRAF^{NTR} présentant des codons STOP prématurés dans le domaine CRD (voir Chapitre 4).

L'association de BRAF^{CRM} avec KSR1 pourrait: 1) être stabilisée par le domaine CRD_{BRAF} déstructuré et 2) s'effectuer de façon indépendante de RAS. Le dimère BRAF^{CRM}/KSR1 s'ancrerait alors à la membrane uniquement *via* le domaine CRD_{KSR1} (**Figure 45.C**) qui contribue également à l'interaction de BRAF avec KSR1 (Lavoie et al., 2018 : **Extended Data Figure 6.d et Figure 26, p. 110**). La phosphorylation de MEK serait donc bien provoquée par une l'augmentation spécifique de l'interaction BRAF^{CRM}/KSR1. Des expériences complémentaires de co-IP pourraient être envisagées pour nous assurer que le gain d'activation est directement dû à la stabilisation du dimère BRAF/KSR1. Nous aurions ainsi la certitude que l'activation de la voie découle uniquement de la dimérisation accrue de BRAF avec KSR1, et non des autres dimères comprenant BRAF (BRAF/BRAF, BRAF/CRAF, BRAF/ARAF et BRAF/KSR2).

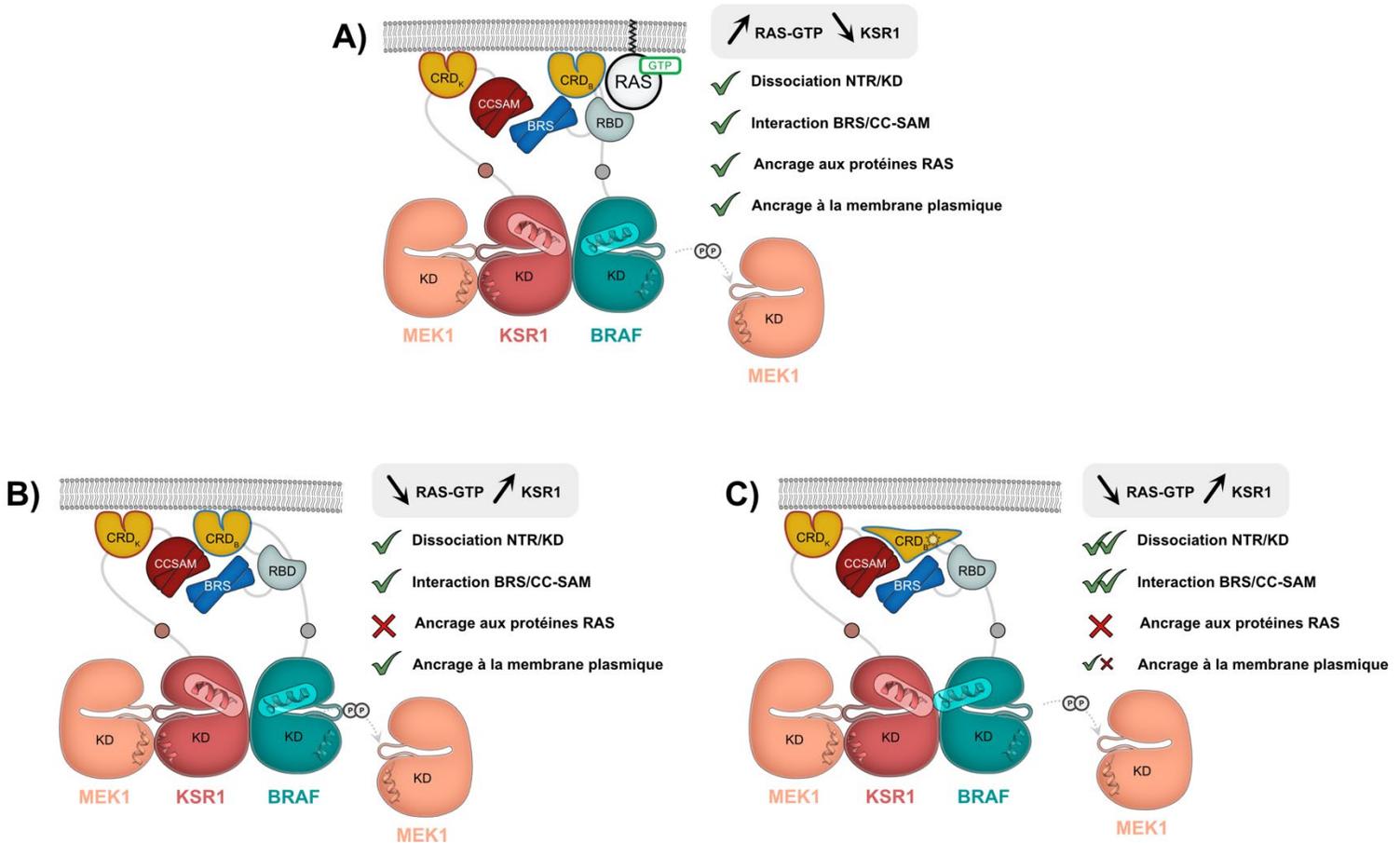


Figure 45 – Modèles d’activation du dimère BRAF/KSR1 et effets des mutations du CRD de BRAF.

Dans les trois modèles, MEK1 favoriserait l’ouverture de KSR1. A) En présence de RAS activée, l’association conjointe du domaine RBD et CRD à RAS favoriserait l’ouverture de BRAF qui recruterait KSR1 à la membrane plasmique. L’ancrage membranaire des deux domaines CRD stabiliserait le dimère BRAF/KSR1. B) En l’absence de RAS activée, l’ancrage membranaire de BRAF et KSR1 permettrait son ouverture et serait indépendant de RAS en s’effectuant uniquement par les domaines CRD à partir d’une concentration seuil de KSR1. C) Dans ce même contexte, la mutation CRM du CRD de BRAF faciliterait l’ouverture de BRAF et aurait un stabilisateur sur l’interaction BRS/CC-SAM et l’ancrage membranaire dépendrait uniquement de CRD_{KSR1}.

BRS : *BRAF* specific Sequence; RBD : *Ras*-Binding Domain; CRD : *Cysteine*-Rich Domain; CC-SAM : *Coiled-Coil Sterile Alpha Motif*, KD : *Kinase Domain*.

Certaines mutations CRM que nous avons isolées dans le crible (**Figure 30, p. 118**) correspondent à des variants naturels recensés dans les bases de données de patients atteints de cancers : COSMIC (Tate et al., 2019) et le réseau TCGA (<https://www.cancer.gov/tcga>). Il n’existe à ce jour aucun lien de corrélation entre les mutations CRM et les cancers. Nous pouvons néanmoins supposer que des mutations CRM pourraient participer à la survenue ou à la progression

tumorale au vu des effets qu'elles engendreraient sur la régulation de BRAF. Cependant, en raison du faible nombre de cas rapportée de patients porteurs de ces mutations, il est probable que ces mutations aient un impact trop important sur la viabilité cellulaire ou que les effets des CRM soient compensés par un autre mécanisme.

Les résultats présentés jusqu'ici soutiennent l'idée que le domaine CRD_{BRAF} pourrait favoriser la dimérisation BRAF/KSR1 en stabilisant l'interaction BRS/CC-SAM de façon indépendante de RAS et que les domaines CRD jouent un rôle régulateur essentiel sur la formation spécifique du dimère. Des études structurales en ce sens seraient nécessaires pour valider ou infirmer cette hypothèse. L'influence des protéines RAS sur la formation ou la stabilisation de l'interaction BRAF^{NTR} et KSR1^{NTR} pourrait être démontrée par des expériences de colocalisation en présence ou non des protéines RAS par FLIM-FRET (Parkkola et al., 2021). Ainsi en l'absence d'un signal spécifique d'adressage membranaire par les protéines RAS, l'accès à la membrane plasmique pourrait être régulé par la séquestration des protéines KSR1. Ce mécanisme empêcherait par exemple l'interaction BRS/CC-SAM de se former ou permettrait de masquer le domaine CRD_{KSR1} en régulant négativement la formation du dimère BRAF/KSR1.

5.4 Quels sont les mécanismes de régulation de l'interaction BRAF/KSR1 ?

Dans la forme auto-inhibée de BRAF pleine longueur; le domaine CRD_{BRAF} est séquestré par un tandem de protéines 14-3-3 stabilisant la forme inactive monomérique de BRAF (**Figure 46.A**). Dans cette conformation, ni le domaine CRD_{BRAF}, ni le domaine RBD ne peuvent s'associer à RAS ou s'ancrer à la membrane plasmique (Park et al., 2019). Nous pouvons supposer qu'il existe un mécanisme semblable pour KSR1.

Il existe différentes protéines qui interagissent avec KSR1 au niveau de sa région NTR et qui pourraient notamment impacter l'interaction BRS/CC-SAM. La protéine IMP (*Impedes Mitogenic signal Propagation*) est une E3 ligase qui régule négativement le signal RAS-ERK. IMP s'associe au complexe KSR/MEK et participe à sa séquestration en s'associant directement à la NTR de KSR. En réponse à la stimulation des protéines RAS activées, IMP est auto-ubiquitinylée et libère KSR (Chen et al., 2008; Matheny et al., 2004). Il a été proposé que dans le contexte où les protéines RAS sont absentes, une quantité suffisamment importante de KSR1 pourrait saturer l'effet

inhibiteur d'IMP. KSR1 serait ainsi disponible pour dimériser avec BRAF et la recruter à la membrane plasmique (Paniagua et al., 2022). Il est possible que l'interaction de la protéine IMP avec KSR1 s'effectue *via* son domaine CC-SAM, l'empêchant de s'associer avec le domaine BRS de BRAF. En parallèle, un mécanisme similaire pourrait s'opérer avec les protéines 14-3-3 qui inhibent KSR1 en s'associant au domaine CRD_{KSR1} (Cacace et al., 1999; Müller et al., 2001; Razidlo et al., 2009). En s'associant à ce domaine, les protéines 14-3-3 contribueraient à l'inhibition de l'interaction BRAF/KSR1 en masquant les surfaces d'interactions du domaine CRD_{KSR1} avec la membrane plasmique (**Figure 46.B**).

Une étude plus générale de la capacité des NTR à interagir avec d'autres partenaires d'interactions est donc essentielle puisqu'elle pourrait donner lieu à la caractérisation d'autant de moyens supplémentaires de régulation de la voie de signalisation. Une stratégie expérimentale basée sur le BioID ainsi que les approches dérivées (Turbo-ID ou APEX), pourrait être mise au point pour déterminer ces partenaires d'interaction (Cho et al., 2020; Roux et al., 2012). L'obtention de la structure de KSR1 pleine longueur dans sa forme inactivée contribuerait également à parfaire nos connaissances des interactions établies par KSR1 au niveau de sa NTR.

En complément de la séquestration de la protéine KSR1, des événements de phosphorylations au niveau du domaine CC-SAM de KSR1 pourraient également inhiber la formation du dimère BRAF/KSR1. Nous avons donc voulu déterminer si des événements de phosphorylation pouvaient par exemple perturber l'interaction BRS/CC-SAM. Une analyse des séquences protéiques du BRS et du CC-SAM a révélé la présence de sites putatifs de phosphorylation (Peri et al., 2004). Lors de la purification du dimère BRAF/KSR1, nous avons effectivement détecté en spectrométrie de masse des peptides phosphorylés du CC-SAM, en accord avec les bases de données répertoriant les événements de phosphorylations détectés par MS/MS (Hornbeck et al., 2012).

Parmi ces peptides se trouve un motif putatif de phosphorylation « S/T-x-x-E/D/pY/pS/ pT » de la Casein-Kinase II (CK2) (Meggio and Pinna, 2003). Ce motif est localisé dans la région « CC » du CC-SAM (⁵¹SIGS⁵⁴) qui est en interaction directe avec le domaine BRS (**Figure 28, p. 113**). La kinase CK2 est par ailleurs un interacteur connu de KSR1 (Ritt et al., 2007). La présence de ce motif putatif de phosphorylation pourrait ainsi être responsable de la régulation négative de l'interaction BRS/CC-SAM *via* ce, ou plusieurs, site(s) de phosphorylations présent(s) dans le domaine CC-SAM (**Figure 46.C**).

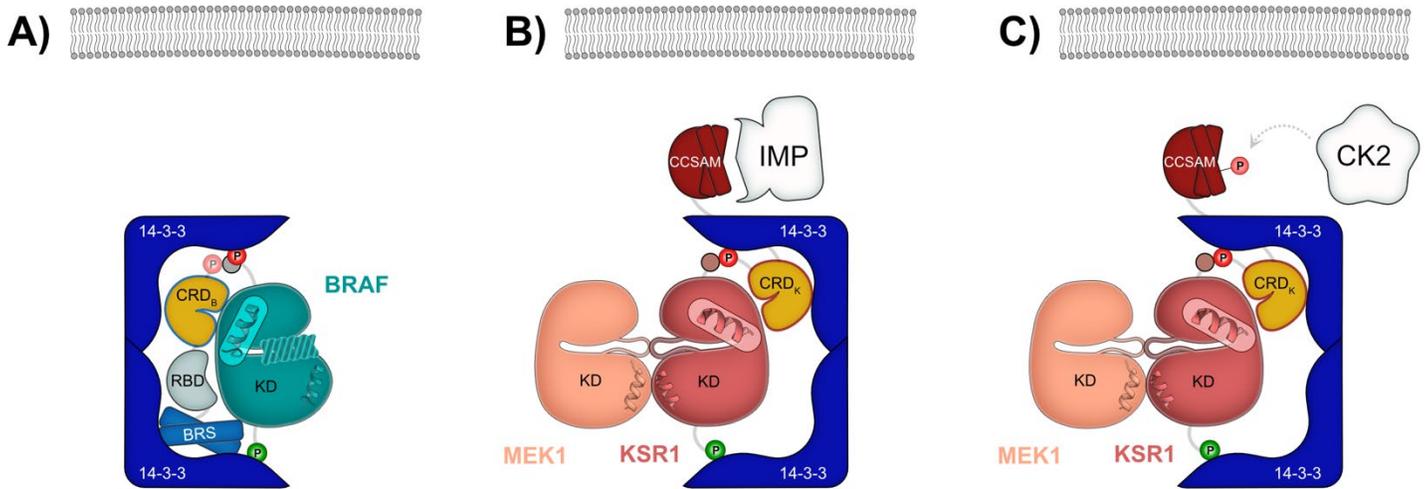


Figure 46 – Régulation de l'interaction BRS/CC-SAM.

A) Dans sa forme auto-inhibée la kinase BRAF est dans une conformation monomérique où le KD est inhibé par la région NTR. Cette conformation est stabilisée par la liaison d'un tandem de protéines 14-3-3 qui s'ancrent via des sites de phosphorylations médié par un contact direct avec le CRD_{BRAF}. B) Par analogie, un système équivalent pourrait contribuer à l'inhibition de KSR1 qui possède également des sites de reconnaissance de protéines 14-3-3. Une régulation supplémentaire pourrait exister au niveau du domaine CC-SAM. : soit par la liaison de la protéine IMP (B), soit par un évènement de phosphorylation par la kinase CK2.

BRS: BRAF specific Sequence; RBD: Ras-Binding Domain; CRD: Cysteine-Rich Domain; CC-SAM : Coiled-Coil Sterile Alpha Motif, KD : Kinase Domain, IMP: Impedes Mitogenic signal Propagation, CK2: Casein-Kinase 2

Par ailleurs, nous avons également constaté une association KSR1^{NTR} / KSR1^{NTR} par Y2H (**Figure 21, p. 103**). En utilisant la technique de BRET, la mesure de cette association est plus importante que celle de BRAF^{NTR}/KSR1^{NTR} (Lavoie et al., 2018 : **Extended Data Figure 6.b**). Ces données suggèrent que le domaine CC-SAM présent dans KSR1^{NTR} pourrait former une interaction homotypique CC-SAM/CC-SAM, favorisant des homodimères stables de KSR1. Dans ce sens il a été montré que l'interaction KSR1/MEK1 est de forte affinité et que les complexes KSR^{KD}/MEK1^{KD} cristallisés sont majoritairement présents sous forme d'hétérotétramères MEK1/KSR1/KSR1/MEK1 (Brennan et al., 2011; Dhawan et al., 2016; Khan et al., 2020).

Les fonctions des homodimères, KSR1/KSR1 ou KSR2/KSR2, et de l'hétérodimère KSR1/KSR2 ne sont jusqu'à présent pas connue bien que chacun de ces dimères puisse se former

in vitro (données du laboratoire issues d'un autre projet de recherche). Ces dimères pourraient réguler la formation des dimères BRAF/KSR1 dans un contexte oncogénique. Il existe ainsi différentes stratégies visant à cibler les protéines KSR au vu de leur importance dans la régulation d'un signal de RAS oncogénique (Kortum and Lewis, 2004; Lozano et al., 2003). L'une d'entre elles repose sur le développement d'une molécule inhibitrice qui stabiliserait le complexe KSR2/MEK1 dans un état inactif avec afin de diminuer l'activation RAS-dépendante du dimère BRAF/KSR1 (Chow et al., 2022; Dhawan et al., 2016).

5.5 Conclusion générale et perspectives

Au cours de ce travail de thèse nous avons mis en évidence un tout nouveau mécanisme pouvant expliquer la formation spécifique du BRAF/KSR1. Nous avons également élucidé le système permettant à KSR1 de transactiver la kinase BRAF par un phénomène d'activation allostérique stimulé par MEK1. Par ailleurs, la découverte de l'interaction BRS/CC-SAM nous conduit à envisager que nous pourrions disposer d'un mode inédit de régulation sélective du dimère BRAF/KSR1, ouvrant la voie vers de nouvelles perspectives thérapeutiques.

La protéine KSR2 est principalement exprimée dans le système nerveux central et est relativement peu présentes dans les autres tissus du corps (mise à part dans le tissu adipeux brun, le foie et le pancréas). En revanche, la protéine KSR1 a une expression ubiquitaire. Des études des niveaux d'expression et de demi-vie de KSR1 dans les cellules cancéreuses permettraient d'évaluer l'effet de la dégradation de KSR1 au cours du temps sur la formation du dimère BRAF/KSR1 et sur la signalisation RAS-ERK. Il a notamment déjà été rapporté qu'il y a une régulation des niveaux de KSR1 par protéolyse suite à son ubiquitinylation par praja2 influençant la signalisation RAS-ERK qui en découle (Rinaldi et al., 2016). La régulation spatio-temporel de KSR1 jouerait ainsi un rôle essentiel dans la formation du dimère BRAF/KSR1.

La découverte du rôle prépondérant des NTR des protéines de la famille RAF ouvre un nouveau champ de régulation encore peu exploré sur les modes de formation des dimères RAF/RAF ou RAF/KSR. La variabilité des différents NTR influencerait directement les fonctions propres à chacune des isoformes de kinases RAF. Ainsi les isoformes de RAF n'interagissent pas de la même façon avec les différentes isoformes de RAS ce qui modulerait dans un contexte oncogénique leurs réponses aux protéines RAS (Terrell et al., 2019). De la même façon, la protéine suppresseur de tumeur DiRas3, membre de la famille des GTPase RAS, influence la formation

spécifique d'hétérodimères CRAF/KSR1 par association directe avec la NTR de KSR1 empêchant ainsi la formation du dimère BRAF/CRAF plus actif (Baljuls et al., 2016). L'absence de l'interaction BRAF/KSR2 dans nos travaux tend également à confirmer que la variabilité entre les NTR de KSR1 et KSR2 est suffisante pour influencer la spécificité de formation des dimères RAF/KSR. Cependant, ces résultats sont en contradiction avec des expériences de co-immunoprécipitation qui détecte une interaction stable entre BRAF et KSR2.

Des composants d'autres voies de signalisation exerce également une influence l'activation de la voie RAS-ERK en interagissant spécifiquement avec la région NTR des isoformes. Ainsi un complexe composé de la protéine β -arrestine et d'un RCPG stimule spécifiquement l'activation de CRAF et probablement sa dimérisation en interagissant directement avec sa NTR (Zang et al., 2021). Il serait donc indispensable de déterminer l'interactome des différentes NTR et d'établir avec précision les différentes surfaces d'interaction qui régissent ces associations.

Nous avons démontré que l'interaction entre les domaines des NTR de BRAF et KSR1 exerce une influence considérable sur la formation du dimère BRAF/KSR1 et par extension sur son activation. Bien que très prometteuse, il est important de réintégrer l'interaction BRS/CC-SAM dans le cadre plus large des protéines pleines longueurs, notamment pour intégrer le rôle des domaines CRD sur cette interaction. Il est ainsi primordial d'isoler le dimère BRAF/KSR1 dans le but d'en obtenir des informations structurales, en particulier au regard de l'importance de ce dimère dans la signalisation RAS-ERK. Au vu de l'influence de l'ancrage membranaire des domaines CRD sur la formation du dimère, il serait particulièrement intéressant de purifier le dimère BRAF/KSR1 en présence de nanodisques imitant la bicouche lipidique de la membrane plasmique. Cette approche a été utilisée avec succès pour étudier l'interaction des domaines RBD et CRD de CRAF avec la protéine KRAS et a révélé l'influence de la nature des lipides choisis sur la stabilité de cette interaction (Denisov and Sligar, 2016; Fang et al., 2020).

La compréhension globale de la dynamique des interactions des protéines de la famille RAF reposera principalement sur l'obtention des structures des différents complexes protéiques composés des isoformes de RAF et de leurs interacteurs. La résolution de ces structures nous apportera des informations considérables sur les différentes étapes d'activation et d'inhibition des protéines RAF et KSR. À terme, dans le contexte de la recherche menée contre des cancers issus

de dérégulations de la voie de signalisation RAS-ERK, ces données pourraient apporter des solutions aux conséquences inattendues apparues à la suite de traitements anticancéreux.

Références bibliographiques

- Adari, H., Lowy, D. R., Willumsen, B. M., Der, C. J. and McCormick, F. (1988). Guanosine Triphosphatase Activating Protein (GAP) Interacts with the p21 ras Effector Binding Domain. *Science*, 240(4851), 518–521. <https://doi.org/10.1126/science.2833817>
- Adariani, S. R., Buchholzer, M., Akbarzadeh, M., Nakhaei-Rad, S., Dvorsky, R. and Ahmadian, M. R. (2018). Structural snapshots of RAF kinase interactions. *Biochemical Society Transactions*, 46(6), 1393–1406. <https://doi.org/10.1042/bst20170528>
- Aelst, L. V., Barr, M., Marcus, S., Polverino, A. and Wigler, M. (1993). Complex formation between RAS and RAF and other protein kinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(13), 6213–6217. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.13.6213>
- Ahearn, I. M., Haigis, K., Bar-Sagi, D. and Philips, M. R. (2012). Regulating the regulator: post-translational modification of RAS. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13(1), 39–51. <https://doi.org/10.1038/nrm3255>
- Aitken, A. (2006). 14-3-3 proteins: a historic overview. *Seminars in cancer biology*, 16(3), 162–72. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2006.03.005>
- Aitken, A., Collinge, D. B., Heusden, B. P. H. van, Isobe, T., Roseboom, P. H., Rosenfeld, G. and Soll, J. (1992). 14-3-3 proteins: a highly conserved, widespread family of eukaryotic proteins. *Trends in Biochemical Sciences*, 17(12), 498–501. [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(92\)90339-b](https://doi.org/10.1016/0968-0004(92)90339-b)
- Alessi, D. R., Saito, Y., Campbell, D. G., Cohen, P., Sithanandam, G., Rapp, U., Ashworth, A., Marshall, C. J. and Cowley, S. (1994). Identification of the sites in MAP kinase kinase-1 phosphorylated by p74raf-1. *The EMBO Journal*, 13(7), 1610–1619. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1994.tb06424.x>
- Aoki, Y., Niihori, T., Narumi, Y., Kure, S. and Matsubara, Y. (2008). The RAS/MAPK syndromes: novel roles of the RAS pathway in human genetic disorders. *Human Mutation*, 29(8), 992–1006. <https://doi.org/10.1002/humu.20748>
- Athuluri-Divakar, S. K., Vasquez-Del Carpio, R., Dutta, K., Baker, S. J., Cosenza, S. C., Basu, I., Gupta, Y. K., Reddy, M. V. R., Ueno, L., Hart, J. R., Vogt, P. K., Mulholland, D., Guha, C., Aggarwal, A. K. and Reddy, E. P. (2016). A Small Molecule RAS-Mimetic Disrupts RAS Association with Effector Proteins to Block Signaling. *Cell*, 165(3), 643–655. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.03.045>
- Avraham, R. and Yarden, Y. (2011). Feedback regulation of EGFR signalling: decision making by early and delayed loops. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 12(2), 104–117. <https://doi.org/10.1038/nrm3048>

- Bagnato, A. and Rosanò, L. (2019). New Routes in GPCR/ β -Arrestin-Driven Signaling in Cancer Progression and Metastasis. *Frontiers in Pharmacology*, 10, 114. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00114>
- Baljuls, A., Dobrzyński, M., Rauch, J., Rauch, N. and Kolch, W. (2016). Stabilization of C-RAF:KSR1 complex by DiRas3 reduces availability of C-RAF for dimerization with B-RAF. *Cellular Signalling*, 28(10), 1451–1462. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2016.06.019>
- Baljuls, A., Schmitz, W., Mueller, T., Zahedi, R. P., Sickmann, A., Hekman, M. and Rapp, U. R. (2008). Positive Regulation of A-RAF by Phosphorylation of Isoform-specific Hinge Segment and Identification of Novel Phosphorylation Sites. *Journal of Biological Chemistry*, 283(40), 27239–27254. <https://doi.org/10.1074/jbc.m801782200>
- Baljuls, A., Schmitz, W., Mueller, T., Zahedi, R. P., Sickmann, A., Hekman, M. and Rapp, U. R. (2009). Positive Regulation of A-RAF by Phosphorylation of Isoform-specific Hinge Segment and Identification of Novel Phosphorylation Sites.
- Barbosa, R., Acevedo, L. A. and Marmorstein, R. (2021). The MEK/ERK Network as a Therapeutic Target in Human Cancer. *Molecular Cancer Research*, 19(3), 361–374. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.mcr-20-0687>
- Barnier, J. V., Papin, C., Eychène, A., Lecoq, O. and Calothy, G. (1995). The Mouse B-raf Gene Encodes Multiple Protein Isoforms with Tissue-specific Expression. *Journal of Biological Chemistry*, 270(40), 23381–23389. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.40.23381>
- Beck, T. W., Huleihel, M., Gunnell, M., Bonner, T. I. and Rapp, U. R. (1987). The complete coding sequence of the human A-raf-1 oncogene and transforming activity of a human A-raf carrying retrovirus. *Nucleic Acids Research*, 15(2), 595–609. <https://doi.org/10.1093/nar/15.2.595>
- Bergeron, J. J. M., Guglielmo, G. M. D., Dahan, S., Dominguez, M. and Posner, B. I. (2015). Spatial and Temporal Regulation of Receptor Tyrosine Kinase Activation and Intracellular Signal Transduction. *Annual Review of Biochemistry*, 85(1), 1–25. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060815-014659>
- Black, A. C., Bailey, M. C., Ruane-Foster, M., Opazo, J. C. and Hoffmann, F. G. (2019). The RAF oncogenes of vertebrates are ohnologs that derive from the two rounds of whole genome duplications early in vertebrate evolution. *bioRxiv*, 767913. <https://doi.org/10.1101/767913>
- Blasco, M. T., Navas, C., Martín-Serrano, G., Graña-Castro, O., Lechuga, C. G., Martín-Díaz, L., Djurec, M., Li, J., Morales-Cacho, L., Esteban-Burgos, L., Perales-Patón, J., Bousquet-Mur, E., Castellano, E., Jacob, H. K. C., Cabras, L., Musteanu, M., Drosten, M., Ortega, S., Mulero, F., ... Barbacid, M. (2019). Complete Regression of Advanced Pancreatic Ductal Adenocarcinomas upon Combined Inhibition of EGFR and C-RAF. *Cancer cell*, 35(4), 573–587.e6. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2019.03.002>

- Blasco, R. B., Francoz, S., Santamaría, D., Cañamero, M., Dubus, P., Charron, J., Baccarini, M. and Barbacid, M. (2011). c-Raf, but not B-Raf, is essential for development of K-Ras oncogene-driven non-small cell lung carcinoma. *Cancer cell*, 19(5), 652–63. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.04.002>
- Bondeva, T., Balla, A., Várnai, P. and Balla, T. (2002). Structural Determinants of Ras-Raf Interaction Analyzed in Live Cells. *Molecular Biology of the Cell*, 13(7), 2323–2333. <https://doi.org/10.1091/mbc.e02-01-0019>
- Bos, J. L. (1989). ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer research*, 49(17), 4682–9.
- Boulton, T. G., Nye, S. H., Robbins, D. J., Ip, N. Y., Radzlejewska, E., Morgenbesser, S. D., DePinho, R. A., Panayotatos, N., Cobb, M. H. and Yancopoulos, G. D. (1991). ERKs: A family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. *Cell*, 65(4), 663–675. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90098-j](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90098-j)
- Bourne, H. R., Sanders, D. A. and McCormick, F. (1991). The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature*, 349(6305), 117–127. <https://doi.org/10.1038/349117a0>
- Bourquard, T., Landomiel, F., Reiter, E., Crépieux, P., Ritchie, D. W., Azé, J. and Poupon, A. (2015). Unraveling the molecular architecture of a G protein-coupled receptor/ β -arrestin/Erk module complex. *Scientific Reports*, 5(1), 10760. <https://doi.org/10.1038/srep10760>
- Boussif, O., Lezoualc'h, F., Zanta, M. A., Mergny, M. D., Scherman, D., Demeneix, B. and Behr, J. P. (1995). A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(16), 7297–7301. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.16.7297>
- Braicu, C., Buse, M., Busuioc, C., Drula, R., Gulei, D., Raduly, L., Rusu, A., Irimie, A., Atanasov, A. G., Slaby, O., Ionescu, C. and Berindan-Neagoe, I. (2019). A Comprehensive Review on MAPK: A Promising Therapeutic Target in Cancer. *Cancers*, 11(10), 1618. <https://doi.org/10.3390/cancers11101618>
- Brennan, D. F., Dar, A. C., Hertz, N. T., Chao, W. C. H., Burlingame, A. L., Shokat, K. M. and Barford, D. (2011). A Raf-induced allosteric transition of KSR stimulates phosphorylation of MEK. *Nature*, 472(7343), 366–369. <https://doi.org/10.1038/nature09860>
- Brtva, T. R., Drugan, J. K., Ghosh, S., Terrell, R. S., Campbell-Burk, S., Bell, R. M. and Der, C. J. (1995). Two Distinct Raf Domains Mediate Interaction with Ras. *Journal of Biological Chemistry*, 270(17), 9809–9812. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.17.9809>
- Buhrman, G., Wink, G. and Mattos, C. (2007). Transformation Efficiency of RasQ61 Mutants Linked to Structural Features of the Switch Regions in the Presence of Raf. *Structure*, 15(12), 1618–1629. <https://doi.org/10.1016/j.str.2007.10.011>

- Buscà, R., Pouysségur, J. and Lenormand, P. (2016). ERK1 and ERK2 Map Kinases: Specific Roles or Functional Redundancy? *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 4, 53. <https://doi.org/10.3389/fcell.2016.00053>
- Byrne, D. P., Foulkes, D. M. and Eyers, P. A. (2017). Pseudokinases: update on their functions and evaluation as new drug targets. *Future Medicinal Chemistry*, 9(2), 245–265. <https://doi.org/10.4155/fmc-2016-0207>
- Cacace, A., Michaud, N., Therrien, M., Mathes, K., Copeland, T., Rubin, G. and Morrison, D. (1999). Identification of constitutive and Ras-inducible phosphorylation sites of KSR: Implications for 14-3-3 binding, mitogen-activated protein kinase binding, and KSR overexpression. *Molecular and Cellular Biology*, 19(1), 229–240.
- Canagarajah, B. J., Khokhlatchev, A., Cobb, M. H. and Goldsmith, E. J. (1997). Activation Mechanism of the MAP Kinase ERK2 by Dual Phosphorylation. *Cell*, 90(5), 859–869. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80351-7](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80351-7)
- Canon, J., Rex, K., Saiki, A. Y., Mohr, C., Cooke, K., Bagal, D., Gaida, K., Holt, T., Knutson, C. G., Koppada, N., Lanman, B. A., Werner, J., Rapaport, A. S., Miguel, T. S., Ortiz, R., Osgood, T., Sun, J.-R., Zhu, X., McCarter, J. D., ... Lipford, J. R. (2019). The clinical KRAS(G12C) inhibitor AMG 510 drives anti-tumour immunity. *Nature*, 575(7781), 217–223. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1694-1>
- Carrera, A. C., Alexandrov, K. and Roberts, T. M. (1993). The conserved lysine of the catalytic domain of protein kinases is actively involved in the phosphotransfer reaction and not required for anchoring ATP. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(2), 442–446. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.2.442>
- Carriere, A., Romeo, Y., Acosta-Jaquez, H. A., Moreau, J., Bonneil, E., Thibault, P., Fingar, D. C. and Roux, P. P. (2011). ERK1/2 Phosphorylate Raptor to Promote Ras-dependent Activation of mTOR Complex 1 (mTORC1). *Journal of Biological Chemistry*, 286(1), 567–577. <https://doi.org/10.1074/jbc.m110.159046>
- Carroni, M. and Saibil, H. R. (2016). Cryo electron microscopy to determine the structure of macromolecular complexes. *Methods (San Diego, Calif.)*, 95, 78–85. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2015.11.023>
- Casar, B. and Crespo, P. (2016). ERK Signals: Scaffolding Scaffolds? *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 4, 49. <https://doi.org/10.3389/fcell.2016.00049>
- Castellano, E. and Santos, E. (2011). Functional Specificity of Ras Isoforms: So Similar but So Different. *Genes & Cancer*, 2(3), 216–231. <https://doi.org/10.1177/1947601911408081>
- Chardin, P., Camonis, J. H., Gale, N. W., Aelst, L. van, Schlessinger, J., Wigler, M. H. and Bar-Sagi, D. (1993). Human Sos1: a Guanine Nucleotide Exchange Factor for Ras that Binds to GRB2. *Science*, 260(5112), 1338–1343. <https://doi.org/10.1126/science.8493579>

- Chen, C., Lewis, R. E. and White, M. A. (2008). IMP Modulates KSR1-dependent Multivalent Complex Formation to Specify ERK1/2 Pathway Activation and Response Thresholds. *Journal of Biological Chemistry*, 283(19), 12789–12796. <https://doi.org/10.1074/jbc.m709305200>
- Chen, D., Waters, S. B., Holt, K. H. and Pessin, J. E. (1996). SOS Phosphorylation and Disassociation of the Grb2-SOS Complex by the ERK and JNK Signaling Pathways. *Journal of Biological Chemistry*, 271(11), 6328–6332. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.11.6328>
- Cho, K. F., Branon, T. C., Udeshi, N. D., Myers, S. A., Carr, S. A. and Ting, A. Y. (2020). Proximity labeling in mammalian cells with TurboID and split-TurboID. *Nature Protocols*, 15(12), 3971–3999. <https://doi.org/10.1038/s41596-020-0399-0>
- Chong, H. and Guan, K.-L. (2003). Regulation of Raf through Phosphorylation and N Terminus-C Terminus Interaction. *Journal of Biological Chemistry*, 278(38), 36269–36276. <https://doi.org/10.1074/jbc.m212803200>
- Chong, H., Lee, J. and Guan, K. (2001). Positive and negative regulation of Raf kinase activity and function by phosphorylation. *The EMBO Journal*, 20(14), 3716–3727. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.14.3716>
- Chow, A., Khan, Z. M., Marsiglia, W. M. and Dar, A. C. (2022). Conformational control and regulation of the pseudokinase KSR via small molecule binding interactions. *Methods in Enzymology*, 667, 365–402. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2022.03.039>
- Chuang, E., Barnard, D., Hettich, L., Zhang, X. F., Avruch, J. and Marshall, M. S. (1994). Critical binding and regulatory interactions between Ras and Raf occur through a small, stable N-terminal domain of Raf and specific Ras effector residues. *Molecular and Cellular Biology*, 14(8), 5318–5325. <https://doi.org/10.1128/mcb.14.8.5318>
- Chuderland, D., Konson, A. and Seger, R. (2008). Identification and Characterization of a General Nuclear Translocation Signal in Signaling Proteins. *Molecular Cell*, 31(6), 850–861. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.08.007>
- Cisowski, J., Sayin, V. I., Liu, M., Karlsson, C. and Bergo, M. O. (2016). Oncogene-induced senescence underlies the mutual exclusive nature of oncogenic KRAS and BRAF. *Oncogene*, 35(10), 1328–1333. <https://doi.org/10.1038/onc.2015.186>
- Cisowski, Jaroslaw and Bergo, M. O. (2016). What makes oncogenes mutually exclusive? *Small GTPases*, 8(3), 187–192. <https://doi.org/10.1080/21541248.2016.1212689>
- Clapéron, A. and Therrien, M. (2007). KSR and CNK: two scaffolds regulating RAS-mediated RAF activation. *Oncogene*, 26(22), 3143–3158. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210408>
- Cleghon, V. and Morrison, D. (1994). Raf-1 interacts with Fyn and Src in a non-phosphotyrosine-dependent manner. *Journal of biological chemistry*, 269(26), 17749–17755.

- Cohen, S. (1965). The stimulation of epidermal proliferation by a specific protein (EGF). *Developmental biology*, 12(3), 394–407.
- Colón-González, F. and Kazanietz, M. G. (2006). C1 domains exposed: From diacylglycerol binding to protein–protein interactions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1761(8), 827–837. <https://doi.org/10.1016/j.bbali.2006.05.001>
- Cook, S. J. and McCormick, F. (1993). Inhibition by cAMP of Ras-Dependent Activation of Raf. *Science*, 262(5136), 1069–1072. <https://doi.org/10.1126/science.7694367>
- Cookis, T. and Mattos, C. (2021). Crystal Structure Reveals the Full Ras–Raf Interface and Advances Mechanistic Understanding of Raf Activation. *Biomolecules*, 11(7), 996. <https://doi.org/10.3390/biom11070996>
- Cope, N., Candelora, C., Wong, K., Kumar, S., Nan, H., Grasso, M., Novak, B., Li, Y., Marmorstein, R. and Wang, Z. (2018). Mechanism of BRAF Activation through Biochemical Characterization of the Recombinant Full-Length Protein. *ChemBioChem*, 19(18), 1988–1997. <https://doi.org/10.1002/cbic.201800359>
- Costanzo-Garvey, D. L., Pfluger, P. T., Dougherty, M. K., Stock, J. L., Boehm, M., Chaika, O., Fernandez, M. R., Fisher, K., Kortum, R. L., Hong, E.-G., Jun, J. Y., Ko, H. J., Schreiner, A., Volle, D. J., Treece, T., Swift, A. L., Winer, M., Chen, D., Wu, M., ... Lewis, R. E. (2009). KSR2 Is an Essential Regulator of AMP Kinase, Energy Expenditure, and Insulin Sensitivity. *Cell Metabolism*, 10(5), 366–378. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2009.09.010>
- Crews, C. M. and Erikson, R. L. (1992). Purification of a murine protein-tyrosine/threonine kinase that phosphorylates and activates the Erk-1 gene product: relationship to the fission yeast byr1 gene product. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(17), 8205–8209. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.17.8205>
- Cutler, R E and Morrison, D. K. (1997). Mammalian Raf-1 is activated by mutations that restore Raf signaling in *Drosophila*. *The EMBO Journal*, 16(8), 1953–1960. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.8.1953>
- Cutler, Richard E., Stephens, R. M., Saracino, M. R. and Morrison, D. K. (1998). Autoregulation of the Raf-1 serine/threonine kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(16), 9214–9219. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.16.9214>
- Davies, H., Bignell, G. R., Cox, C., Stephens, P., Edkins, S., Clegg, S., Teague, J., Woffendin, H., Garnett, M. J., Bottomley, W., Davis, N., Dicks, E., Ewing, R., Floyd, Y., Gray, K., Hall, S., Hawes, R., Hughes, J., Kosmidou, V., ... Futreal, P. A. (2002). Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*, 417(6892), 949–954. <https://doi.org/10.1038/nature00766>
- Degirmenci, U., Wang, M. and Hu, J. (2020). Targeting Aberrant RAS/RAF/MEK/ERK Signaling for Cancer Therapy. *Cells*, 9(1), 198. <https://doi.org/10.3390/cells9010198>

- Denisov, I. G. and Sligar, S. G. (2016). Nanodiscs for structural and functional studies of membrane proteins. *Nature Structural & Molecular Biology*, 23(6), 481–486. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3195>
- Denouel-Galy, A., Douville, E. M., Warne, P. H., Papin, C., Laugier, D., Calothy, G., Downward, J. and Eychène, A. (1998). Murine Ksr interacts with MEK and inhibits Ras-induced transformation. *Current Biology*, 8(1), 46–55. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(98\)70019-3](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(98)70019-3)
- Dephoure, N., Zhou, C., Villén, J., Beausoleil, S. A., Bakalarski, C. E., Elledge, S. J. and Gygi, S. P. (2008). A quantitative atlas of mitotic phosphorylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(31), 10762–10767. <https://doi.org/10.1073/pnas.0805139105>
- Desideri, E., Cavallo, A. L. and Baccarini, M. (2015). Alike but Different: RAF Paralogs and Their Signaling Outputs. *Cell*, 161(5), 967–970. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.04.045>
- DeWire, S. M., Ahn, S., Lefkowitz, R. J. and Shenoy, S. K. (2007). β -Arrestins and Cell Signaling. *Physiology*, 69(1), 483–510. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.69.022405.154749>
- Dhanasekaran, D., Kashef, K., Lee, C. M., Xu, H. and Reddy, E. P. (2007). Scaffold proteins of MAP-kinase modules. *Oncogene*, 26(22), 3185–3202. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210411>
- Dhanasekaran, N. and Reddy, E. P. (1998). Signaling by dual specificity kinases. *Oncogene*, 17(11), 1447–1455. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1202251>
- Dhawan, N. S., Scopton, A. P. and Dar, A. C. (2016). Small molecule stabilization of the KSR inactive state antagonizes oncogenic Ras signalling. *Nature*, 537(7618), 112–116. <https://doi.org/10.1038/nature19327>
- Dhillon, A S, Hagan, S., Rath, O. and Kolch, W. (2007). MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene*, 26(22), 3279–3290. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210421>
- Dhillon, Amardeep S., Meikle, S., Yazici, Z., Eulitz, M. and Kolch, W. (2002). Regulation of Raf-1 activation and signalling by dephosphorylation. *The EMBO Journal*, 21(1–2), 64–71. <https://doi.org/10.1093/emboj/21.1.64>
- Dhomen, N. and Marais, R. (2007). New insight into BRAF mutations in cancer. *Current Opinion in Genetics & Development*, 17(1), 31–39. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2006.12.005>
- Dhomen, N., Reis-Filho, J. S., Dias, S. da R., Hayward, R., Savage, K., Delmas, V., Larue, L., Pritchard, C. and Marais, R. (2009). Oncogenic Braf Induces Melanocyte Senescence and Melanoma in Mice. *Cancer Cell*, 15(4), 294–303. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.02.022>
- Diamond, E. L., Durham, B. H., Haroche, J., Yao, Z., Ma, J., Parikh, S. A., Wang, Z., Choi, J., Kim, E., Cohen-Aubart, F., Lee, S. C.-W., Gao, Y., Micol, J.-B., Campbell, P., Walsh, M. P.,

- Sylvester, B., Dolgalev, I., Aminova, O., Heguy, A., ... Abdel-Wahab, O. (2016). Diverse and Targetable Kinase Alterations Drive Histiocytic Neoplasms. *Cancer Discovery*, 6(2), 154–165. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.cd-15-0913>
- Diaz, B., Barnard, D., Filson, A., MacDonald, S., King, A. and Marshall, M. (1997). Phosphorylation of Raf-1 serine 338-serine 339 is an essential regulatory event for Ras-dependent activation and biological signaling. *Molecular and Cellular Biology*, 17(8), 4509–4516. <https://doi.org/10.1128/mcb.17.8.4509>
- Ding, J., Tchaicheeyan, O. and Ambrosio, L. (2010). Drosophila Raf's N Terminus Contains a Novel Conserved Region and Can Contribute to Torso RTK Signaling. *Genetics*, 184(3), 717–729. <https://doi.org/10.1534/genetics.109.111344>
- Doucleff, M., Hatcher-Skeers, M. and Crane, N. J. (2011). Pocket guide to biomolecular NMR. *Springer Science & Business Media*.
- Dougherty, M. K., Müller, J., Ritt, D. A., Zhou, M., Zhou, X. Z., Copeland, T. D., Conrads, T. P., Veenstra, T. D., Lu, K. P. and Morrison, D. K. (2005). Regulation of Raf-1 by Direct Feedback Phosphorylation. *Molecular Cell*, 17(2), 215–224. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.11.055>
- Dougherty, M. K., Ritt, D. A., Zhou, M., Specht, S. I., Monson, D. M., Veenstra, T. D. and Morrison, D. K. (2009). KSR2 Is a Calcineurin Substrate that Promotes ERK Cascade Activation in Response to Calcium Signals. *Molecular Cell*, 34(6), 652–662. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.06.001>
- Drugan, J. K., Khosravi-Far, R., White, M. A., Der, C. J., Sung, Y.-J., Hwang, Y.-W. and Campbell, S. L. (1996). Ras Interaction with Two Distinct Binding Domains in Raf-1 5 Be Required for Ras Transformation. *Journal of Biological Chemistry*, 271(1), 233–237. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.1.233>
- Eblen, S. T., Slack-Davis, J. K., Tarcsafalvi, A., Parsons, J. T., Weber, M. J. and Catling, A. D. (2004). Mitogen-Activated Protein Kinase Feedback Phosphorylation Regulates MEK1 Complex Formation and Activation during Cellular Adhesion. *Molecular and Cellular Biology*, 24(6), 2308–2317. <https://doi.org/10.1128/mcb.24.6.2308-2317.2004>
- Eisenhardt, A. E., Sprenger, A., Röring, M., Herr, R., Weinberg, F., Köhler, M., Braun, S., Orth, J., Diedrich, B., Lanner, U., Tscherwinski, N., Tscherwinski, S., Schuster, S., Dumaz, N., Schmidt, E., Baumeister, R., Schlosser, A., Dengjel, J. and Brummer, T. (2016). Phosphoproteomic analyses of B-Raf protein complexes reveal new regulatory principles. *Oncotarget*, 7(18), 26628–26652. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.8427>
- Emerson, S. D., Madison, V. S., Palermo, R. E., Waugh, D. S., Scheffler, J. E., Tsao, K. L., Kiefer, S. E., Liu, S. P. and Fry, D. C. (1995). Solution structure of the Ras-binding domain of c-Raf-1 and identification of its Ras interaction surface. *Biochemistry*, 34(21), 6911–8. <https://doi.org/10.1021/bi00021a001>

- Emuss, V., Garnett, M., Mason, C., Project, T. C. G. and Marais, R. (2005). Mutations of C-RAF Are Rare in Human Cancer because C-RAF Has a Low Basal Kinase Activity Compared with B-RAF. *Cancer Research*, 65(21), 9719–9726. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-05-1683>
- Enggebraaten, O., Bjerkvig, R., Pedersen, P.-H. and Laerum, O. D. (1993). Effects of EGF, BFGF, NGF and PDGF(bb) on cell proliferative, migratory and invasive capacities of human brain-tumour biopsies In Vitro. *International Journal of Cancer*, 53(2), 209–214. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910530206>
- Erhardt, P., Schremser, E. J. and Cooper, G. M. (1999). B-Raf Inhibits Programmed Cell Death Downstream of Cytochrome c Release from Mitochondria by Activating the MEK/Erk Pathway. *Molecular and Cellular Biology*, 19(8), 5308–5315. <https://doi.org/10.1128/mcb.19.8.5308>
- Fabian, J. R., Daar, I. O. and Morrison, D. K. (1993). Critical tyrosine residues regulate the enzymatic and biological activity of Raf-1 kinase. *Molecular and Cellular Biology*, 13(11), 7170–7179. <https://doi.org/10.1128/mcb.13.11.7170>
- Fang, Z., Lee, K.-Y., Huo, K.-G., Gasmi-Seabrook, G., Zheng, L., Moghal, N., Tsao, M.-S., Ikura, M. and Marshall, C. B. (2020). Multivalent assembly of KRAS with the RAS-binding and cysteine-rich domains of CRAF on the membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(22), 12101–12108. <https://doi.org/10.1073/pnas.1914076117>
- Fantl, W. J., Muslin, A. J., Kikuchi, A., Martin, J. A., MacNicol, A. M., Grosst, R. W. and Williams, L. T. (1994). Activation of Raf-1 by 14-3-3 proteins. *Nature*, 371(6498), 612–614. <https://doi.org/10.1038/371612a0>
- Farrar, M. A., Alberola-Illa, J. and Perlmutter, R. M. (1996). Activation of the Raf-1 kinase cascade by coumermycin-induced dimerization. *Nature*, 383(6596), 178–181. <https://doi.org/10.1038/383178a0>
- Fernandez, M. R., Henry, M. D. and Lewis, R. E. (2012). Kinase Suppressor of Ras 2 (KSR2) Regulates Tumor Cell Transformation via AMPK. *Molecular and Cellular Biology*, 32(18), 3718–3731. <https://doi.org/10.1128/mcb.06754-11>
- Fernandez-Medarde, A. and Santos, E. (2011). Ras in Cancer and Developmental Diseases. *Genes & Cancer*, 2(3), 344–358. <https://doi.org/10.1177/1947601911411084>
- Ferrell, J. E. (1996). Tripping the switch fantastic: how a protein kinase cascade can convert graded inputs into switch-like outputs. *Trends in Biochemical Sciences*, 21(12), 460–466. [https://doi.org/10.1016/s0968-0004\(96\)20026-x](https://doi.org/10.1016/s0968-0004(96)20026-x)

- Fetics, S. K., Guterres, H., Kearney, B. M., Buhrman, G., Ma, B., Nussinov, R. and Mattos, C. (2015). Allosteric Effects of the Oncogenic RasQ61L Mutant on Raf-RBD. *Structure*, 23(3), 505–516. <https://doi.org/10.1016/j.str.2014.12.017>
- Fiordalisi, J. J., Johnson, R. L., Weinbaum, C. A., Sakabe, K., Chen, Z., Casey, P. J. and Cox, A. D. (2003). High Affinity for Farnesyltransferase and Alternative Prenylation Contribute Individually to K-Ras4B Resistance to Farnesyltransferase Inhibitors. *Journal of Biological Chemistry*, 278(43), 41718–41727. <https://doi.org/10.1074/jbc.m305733200>
- Fisher, K. W., Das, B., Kim, H. S., Clymer, B. K., Gehring, D., Smith, D. R., Costanzo-Garvey, D. L., Fernandez, M. R., Brattain, M. G., Kelly, D. L., MacMillan, J., White, M. A. and Lewis, R. E. (2015). AMPK Promotes Aberrant PGC1 β Expression To Support Human Colon Tumor Cell Survival. *Molecular and Cellular Biology*, 35(22), 3866–79. <https://doi.org/10.1128/mcb.00528-15>
- Fitzgerald, D. J., Berger, P., Schaffitzel, C., Yamada, K., Richmond, T. J. and Berger, I. (2006). Protein complex expression by using multigene baculoviral vectors. *Nature Methods*, 3(12), 1021–32. <https://doi.org/10.1038/nmeth983>
- Forbes, S. A., Bindal, N., Bamford, S., Cole, C., Kok, C. Y., Beare, D., Jia, M., Shepherd, R., Leung, K., Menzies, A., Teague, J. W., Campbell, P. J., Stratton, M. R. and Futreal, P. A. (2011). COSMIC: mining complete cancer genomes in the Catalogue of Somatic Mutations in Cancer. *Nucleic Acids Research*, 39, D945–D950. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq929>
- Fransén, K., Klintenäs, M., Österström, A., Dimberg, J., Monstein, H.-J. and Söderkvist, P. (2004). Mutation analysis of the BRAF, ARAF and RAF-1 genes in human colorectal adenocarcinomas. *Carcinogenesis*, 25(4), 527–533. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgh049>
- Freed, E., Symons, M., Macdonald, S. G., McCormick, F. and Ruggieri, R. (1994). Binding of 14-3-3 Proteins to the Protein Kinase Raf and Effects on Its Activation. *Science*, 265(5179), 1713–1716. <https://doi.org/10.1126/science.8085158>
- Freeman, A. K. and Morrison, D. K. (2011). 14-3-3 Proteins: Diverse functions in cell proliferation and cancer progression. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 22(7), 681–687. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2011.08.009>
- Freeman, A. K., Ritt, D. A. and Morrison, D. K. (2013a). Effects of Raf Dimerization and Its Inhibition on Normal and Disease-Associated Raf Signaling. *Molecular Cell*, 49(4), 751–758. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.12.018>
- Freeman, A. K., Ritt, D. A. and Morrison, D. K. (2013b). The importance of Raf dimerization in cell signaling. *Small GTPases*, 4(3), 180–185. <https://doi.org/10.4161/sgtp.26117>
- Frodyma, D., Neilsen, B., Costanzo-Garvey, D., Fisher, K. and Lewis, R. (2017). Coordinating ERK signaling via the molecular scaffold Kinase Suppressor of Ras. *F1000 Research*, 6, 1621. <https://doi.org/10.12688/f1000research.11895.1>

- Fu, H., Xia, K., Pallas, D. C., Cui, C., Conroy, K., Narsimhan, R. P., Mamon, H., Collier, R. J. and Roberts, T. M. (1994). Interaction of the Protein Kinase Raf-1 with 14-3-3 Proteins. *Science*, 266(5182), 126–129. <https://doi.org/10.1126/science.7939632>
- Galabova-Kovacs, G., Matzen, D., Piazzolla, D., Meissl, K., Plyushch, T., Chen, A. P., Silva, A. and Baccarini, M. (2006). Essential role of B-Raf in ERK activation during extraembryonic development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(5), 1325–1330. <https://doi.org/10.1073/pnas.0507399103>
- Galluzzi, L., Yamazaki, T. and Kroemer, G. (2018). Linking cellular stress responses to systemic homeostasis. *Nature reviews. Molecular Cell Biology*, 19(11), 731–745. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0068-0>
- Garnett, M. J., Rana, S., Paterson, H., Barford, D. and Marais, R. (2005). Wild-Type and Mutant B-RAF Activate C-RAF through Distinct Mechanisms Involving Heterodimerization. *Molecular Cell*, 20(6), 963–969. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.10.022>
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M. R., Appel, R. D. and Bairoch, A. (2005). The Proteomics Protocols Handbook, 571–607. <https://doi.org/10.1385/1-59259-890-0:571>
- Geiger, T., Wehner, A., Schaab, C., Cox, J. and Mann, M. (2012). Comparative Proteomic Analysis of Eleven Common Cell Lines Reveals Ubiquitous but Varying Expression of Most Proteins. *Molecular & Cellular Proteomics*, 11(3), M111.014050. <https://doi.org/10.1074/mcp.m111.014050>
- Germino, E. A., Miller, J. P., Diehl, L., Swanson, C. J., Durinck, S., Modrusan, Z., Miner, J. H. and Shaw, A. S. (2018). Homozygous KSR1 deletion attenuates morbidity but does not prevent tumor development in a mouse model of RAS-driven pancreatic cancer. *PLoS ONE*, 13(3), e0194998. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194998>
- Ghosh, S, Xie, W. Q., Quest, A. F., Mabrouk, G. M., Strum, J. C. and Bell, R. M. (1994). The cysteine-rich region of raf-1 kinase contains zinc, translocates to liposomes, and is adjacent to a segment that binds GTP-ras. *The Journal of biological chemistry*, 269(13), 10000–7.
- Ghosh, Sujoy, Moore, S., Bell, R. M. and Dush, M. (2003). Functional Analysis of a Phosphatidic Acid Binding Domain in Human Raf-1 Kinase Mutations in the Phosphatidate Binding Domain Lead to Tail and Trunk Abnormalities in Developing Zebrafish Embryos. *Journal of Biological Chemistry*, 278(46), 45690–45696. <https://doi.org/10.1074/jbc.m302933200>
- Ghosh, Sujoy, Strum, J. C., Sciorra, V. A., Daniel, L. and Bell, R. M. (1996). Raf-1 Kinase Possesses Distinct Binding Domains for Phosphatidylserine and Phosphatidic Acid Phosphatidic Acid Regulates the Translocation of Raf-1 in 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetate-Stimulated Madin-Darby Canine Kidney Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 271(14), 8472–8480. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.14.8472>

- Glaeser, R. M. (2016). How good can cryo-EM become? *Nature Methods*, 13(1), 28–32. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3695>
- Goettel, J. A., Liang, D., Hilliard, V. C., Edelblum, K. L., Broadus, M. R., Gould, K. L., Hanks, S. K. and Polk, D. B. (2011). KSR1 is a functional protein kinase capable of serine autophosphorylation and direct phosphorylation of MEK1. *Experimental Cell Research*, 317(4), 452–463. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2010.11.018>
- Golfeshan, F., Mosaddad, S. A., Babavalian, H., Tebyanian, H., Mehrjuyan, E. and Shakeri, F. (2021). A Summary of Planarian Signaling Pathway for Regenerative Medicine. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, 1–6. <https://doi.org/10.1007/s40011-021-01267-6>
- Gomperts, B. D., Kramer, Ij. M. and Tatham, P. E. R. (2009a). Signal Transduction (Second Edition), 599–639. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-369441-6.00020-9>
- Gomperts, B. D., Kramer, Ij. M. and Tatham, P. E. R. (2009b). Signal Transduction (Second Edition), 641–698. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-369441-6.00021-0>
- Goyal, S., Qin, H., Lim, L. and Song, J. (2015). Insoluble protein characterization by circular dichroism (CD) spectroscopy and nuclear magnetic resonance (NMR). *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1258, 371–85. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2205-5_21
- Greenman, C., Stephens, P., Smith, R., Dalgliesh, G. L., Hunter, C., Bignell, G., Davies, H., Teague, J., Butler, A., Stevens, C., Edkins, S., O’Meara, S., Vastrik, I., Schmidt, E. E., Avis, T., Barthorpe, S., Bhamra, G., Buck, G., Choudhury, B., ... Stratton, M. R. (2007). Patterns of somatic mutation in human cancer genomes. *Nature*, 446(7132), 153–158. <https://doi.org/10.1038/nature05610>
- Guan, K.-L. (2000). Negative regulation of the serine/threonine kinase B-Raf by Akt. *Journal of Biological Chemistry*, 275(35). <https://doi.org/10.1074/jbc.m004371200>
- Guo, L., Costanzo-Garvey, D. L., Smith, D. R., Neilsen, B. K., MacDonald, R. G. and Lewis, R. E. (2016). Kinase Suppressor of Ras 2 (KSR2) expression in the brain regulates energy balance and glucose homeostasis. *Molecular Metabolism*, 6(2), 194–205. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2016.12.004>
- Gwinn, D. M., Shackelford, D. B., Egan, D. F., Mihaylova, M. M., Mery, A., Vasquez, D. S., Turk, B. E. and Shaw, R. J. (2008). AMPK Phosphorylation of Raptor Mediates a Metabolic Checkpoint. *Molecular Cell*, 30(2), 214–226. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.03.003>
- Haling, J. R., Sudhamsu, J., Yen, I., Sideris, S., Sandoval, W., Phung, W., Bravo, B. J., Giannetti, A. M., Peck, A., Masselot, A., Morales, T., Smith, D., Brandhuber, B. J., Hymowitz, S. G. and Malek, S. (2014). Structure of the BRAF-MEK Complex Reveals a Kinase Activity Independent Role for BRAF in MAPK Signaling. *Cancer Cell*, 26(3), 402–413. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2014.07.007>

- Harvey, J. J. (1964). An Unidentified Virus which causes the Rapid Production of Tumours in Mice. *Nature*, 204(4963), 1104–1105. <https://doi.org/10.1038/2041104b0>
- Hatzivassiliou, G., Song, K., Yen, I., Brandhuber, B. J., Anderson, D. J., Alvarado, R., Ludlam, M. J. C., Stokoe, D., Gloor, S. L., Vigers, G., Morales, T., Aliagas, I., Liu, B., Sideris, S., Hoeflich, K. P., Jaiswal, B. S., Seshagiri, S., Koeppen, H., Belvin, M., ... Malek, S. (2010). RAF inhibitors prime wild-type RAF to activate the MAPK pathway and enhance growth. *Nature*, 464(7287), 431–435. <https://doi.org/10.1038/nature08833>
- Hauschild, A., Grob, J.-J., Demidov, L. V., Jouary, T., Gutzmer, R., Millward, M., Rutkowski, P., Blank, C. U., Miller, W. H., Kaempgen, E., Martín-Algarra, S., Karaszewska, B., Mauch, C., Chiarion-Sileni, V., Martin, A.-M., Swann, S., Haney, P., Mirakhur, B., Guckert, M. E., ... Chapman, P. B. (2012). Dabrafenib in BRAF-mutated metastatic melanoma: a multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial. *The Lancet*, 380(9839), 358–365. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(12\)60868-x](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(12)60868-x)
- Heidecker, G., Huleihel, M., Cleveland, J. L., Kolch, W., Beck, T. W., Lloyd, P., Pawson, T. and Rapp, U. R. (1990). Mutational activation of c-raf-1 and definition of the minimal transforming sequence. *Molecular and Cellular Biology*, 10(6), 2503–2512. <https://doi.org/10.1128/mcb.10.6.2503>
- Heidorn, S. J., Milagre, C., Whittaker, S., Nourry, A., Niculescu-Duvas, I., Dhomen, N., Hussain, J., Reis-Filho, J. S., Springer, C. J., Pritchard, C. and Marais, R. (2010). Kinase-Dead BRAF and Oncogenic RAS Cooperate to Drive Tumor Progression through CRAF. *Cell*, 140(2), 209–221. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.12.040>
- Hekman, M., Hamm, H., Villar, A. V., Bader, B., Kuhlmann, J., Nickel, J. and Rapp, U. R. (2002). Associations of B- and C-Raf with Cholesterol, Phosphatidylserine, and Lipid Second Messengers Preferential Binding of Raf to Artificial Lipid Rafts. *Journal of Biological Chemistry*, 277(27), 24090–24102. <https://doi.org/10.1074/jbc.m200576200>
- Heppner, D. E. and Eck, M. J. (2021). A structural perspective on targeting the RTK/Ras/MAP kinase pathway in cancer. *Protein Science*, 30(8), 1535–1553. <https://doi.org/10.1002/pro.4125>
- Hernandez, M. A., Patel, B., Hey, F., Giblett, S., Davis, H. and Pritchard, C. (2016). Regulation of BRAF protein stability by a negative feedback loop involving the MEK–ERK pathway but not the FBXW7 tumour suppressor. *Cellular Signalling*, 28(6), 561–571. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2016.02.009>
- Hmitou, I., Druillennec, S., Valluet, A., Peyssonnaud, C. and Eychène, A. (2007). Differential Regulation of B-Raf Isoforms by Phosphorylation and Autoinhibitory Mechanisms. *Molecular and Cellular Biology*, 27(1), 31–43. <https://doi.org/10.1128/mcb.01265-06>
- Hornbeck, P. V., Kornhauser, J. M., Tkachev, S., Zhang, B., Skrzypek, E., Murray, B., Latham, V. and Sullivan, M. (2012). PhosphoSitePlus: a comprehensive resource for investigating the

structure and function of experimentally determined post-translational modifications in man and mouse. *Nucleic Acids Research*, 40, D261–D270. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr1122>

Hornbeck, P. V., Zhang, B., Murray, B., Kornhauser, J. M., Latham, V. and Skrzypek, E. (2015). PhosphoSitePlus, 2014: mutations, PTMs and recalibrations. *Nucleic Acids Research*, 43(D1), D512–D520. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1267>

Hoshino, R., Chatani, Y., Yamori, T., Tsuruo, T., Oka, H., Yoshida, O., Shimada, Y., Ari-i, S., Wada, H., Fujimoto, J. and Kohno, M. (1999). Constitutive activation of the 41-/43-kDa mitogen-activated protein kinase signaling pathway in human tumors. *Oncogene*, 18(3), 813–822. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1202367>

Hu, C.-D., Kariya, K., Tamada, M., Akasaka, K., Shirouzu, M., Yokoyama, S. and Kataoka, T. (1995). Cysteine-rich Region of Raf-1 Interacts with Activator Domain of Post-translationally Modified Ha-Ras. *Journal of Biological Chemistry*, 270(51), 30274–30277. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.51.30274>

Hu, J., Stites, E. C., Yu, H., Germino, E. A., Meharena, H. S., Stork, P. J. S., Kornev, A. P., Taylor, S. S. and Shaw, A. S. (2013). Allosteric Activation of Functionally Asymmetric RAF Kinase Dimers. *Cell*, 154(5), 1036–1046. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.07.046>

Hu, J., Yu, H., Kornev, A. P., Zhao, J., Filbert, E. L., Taylor, S. S. and Shaw, A. S. (2011). Mutation that blocks ATP binding creates a pseudokinase stabilizing the scaffolding function of kinase suppressor of Ras, CRAF and BRAF. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(15), 6067–6072. <https://doi.org/10.1073/pnas.1102554108>

Huleihel, M., Goldsborough, M., Cleveland, J., Gunnell, M., Bonner, T. and Rapp, U. R. (1986). Characterization of murine A-raf, a new oncogene related to the v-raf oncogene. *Molecular and Cellular Biology*, 6(7), 2655–2662. <https://doi.org/10.1128/mcb.6.7.2655>

Hymowitz, S. G. and Malek, S. (2018). Targeting the MAPK Pathway in RAS Mutant Cancers. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 8(11), a031492. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a031492>

Ieguchi, K., Fujita, M., Ma, Z., Davari, P., Taniguchi, Y., Sekiguchi, K., Wang, B., Takada, Y. K. and Takada, Y. (2010). Direct Binding of the EGF-like Domain of Neuregulin-1 to Integrins ($\alpha\beta3$ and $\alpha\beta4$) Is Involved in Neuregulin-1/ErbB Signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 285(41), 31388–31398. <https://doi.org/10.1074/jbc.m110.113878>

Ikawa, S., Fukui, M., Ueyama, Y., Tamaoki, N., Yamamoto, T. and Toyoshima, K. (1988). B-raf, a new member of the raf family, is activated by DNA rearrangement. *Molecular and Cellular Biology*, 8(6), 2651–2654. <https://doi.org/10.1128/mcb.8.6.2651>

Imielinski, M., Greulich, H., Kaplan, B., Araujo, L., Amann, J., Horn, L., Schiller, J., Villalona-Calero, M. A., Meyerson, M. and Carbone, D. P. (2014). Oncogenic and sorafenib-sensitive

ARAF mutations in lung adenocarcinoma. *The Journal of Clinical Investigation*, 124(4), 1582–6. <https://doi.org/10.1172/jci72763>

Improta-Brears, T., Ghosh, S. and Bell, R. M. (1999). Mutational analysis of Raf-1 cysteine rich domain: Requirement for a cluster of basic aminoacids for interaction with phosphatidylserine. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 198(1–2), 171–178. <https://doi.org/10.1023/a:1006981411691>

Inobe, T. and Nukina, N. (2016). Rapamycin-induced oligomer formation system of FRB–FKBP fusion proteins. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 122(1), 40–46. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2015.12.004>

Irie, K., Gotoh, Y., Yashar, B. M., Errede, B., Nishida, E. and Matsumoto, K. (1994). Stimulatory Effects of Yeast and Mammalian 14-3-3 Proteins on the Raf Protein Kinase. *Science*, 265(5179), 1716–1719. <https://doi.org/10.1126/science.8085159>

Jacobs, D., Glossip, D., Xing, H., Muslin, A. J. and Kornfeld, K. (1999). Multiple docking sites on substrate proteins form a modular system that mediates recognition by ERK MAP kinase. *Genes & Development*, 13(2), 163–175. <https://doi.org/10.1101/gad.13.2.163>

Jagemann, L. R., Pérez-Rivas, L. G., Ruiz, E. J., Ranea, J. A., Sánchez-Jiménez, F., Nebreda, Á. R., Alba, E. and Lozano, J. (2008). The Functional Interaction of 14-3-3 Proteins with the ERK1/2 Scaffold KSR1 Occurs in an Isoform-specific Manner. *Journal of Biological Chemistry*, 283(25), 17450–17462. <https://doi.org/10.1074/jbc.m709185200>

Jain, P., Fierst, T. M., Han, H. J., Smith, T. E., Vakil, A., Storm, P. B., Resnick, A. C. and Waanders, A. J. (2017). CRAF gene fusions in pediatric low-grade gliomas define a distinct drug response based on dimerization profiles. *Oncogene*, 36(45), 6348–6358. <https://doi.org/10.1038/onc.2017.276>

Jambrina, P. G., Bohuszewicz, O., Buchete, N.-V., Kolch, W. and Rosta, E. (2014). Molecular mechanisms of asymmetric RAF dimer activation. *Biochemical Society Transactions*, 42(4), 784–790. <https://doi.org/10.1042/bst20140025>

Jambrina, P. G., Rauch, N., Pilkington, R., Rybakova, K., Nguyen, L. K., Kholodenko, B. N., Buchete, N., Kolch, W. and Rosta, E. (2016). Phosphorylation of RAF Kinase Dimers Drives Conformational Changes that Facilitate Transactivation. *Angewandte Chemie*, 128(3), 995–998. <https://doi.org/10.1002/ange.201509272>

Jameson, K. L., Mazur, P. K., Zehnder, A. M., Zhang, J., Zarnegar, B., Sage, J. and Khavari, P. A. (2013). IQGAP1 scaffold-kinase interaction blockade selectively targets RAS-MAP kinase-driven tumors. *Nature Medicine*, 19(5), 626–630. <https://doi.org/10.1038/nm.3165>

Janes, M. R., Zhang, J., Li, L.-S., Hansen, R., Peters, U., Guo, X., Chen, Y., Babbar, A., Firdaus, S. J., Darjania, L., Feng, J., Chen, J. H., Li, S., Li, S., Long, Y. O., Thach, C., Liu, Y., Zariwih,

- A., Ely, T., ... Liu, Y. (2018). Targeting KRAS Mutant Cancers with a Covalent G12C-Specific Inhibitor. *Cell*, 172(3), 578-589.e17. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.01.006>
- Jin, T., Lavoie, H., Sahmi, M., David, M., Hilt, C., Hammell, A. and Therrien, M. (2017). RAF inhibitors promote RAS-RAF interaction by allosterically disrupting RAF autoinhibition. *Nature Communications*, 8(1), 1211. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01274-0>
- Jones, D. T. W., Gronych, J., Lichter, P., Witt, O. and Pfister, S. M. (2012). MAPK pathway activation in pilocytic astrocytoma. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 69(11), 1799–1811. <https://doi.org/10.1007/s00018-011-0898-9>
- Joneson, T., Fulton, J. A., Volle, D. J., Chaika, O. V., Bar-Sagi, D. and Lewis, R. E. (1998). Kinase Suppressor of Ras Inhibits the Activation of Extracellular Ligand-regulated (ERK) Mitogen-activated Protein (MAP) Kinase by Growth Factors, Activated Ras, and Ras Effectors. *Journal of Biological Chemistry*, 273(13), 7743–7748. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.13.7743>
- Källberg, M., Wang, H., Wang, S., Peng, J., Wang, Z., Lu, H. and Xu, J. (2012). Template-based protein structure modeling using the RaptorX web server. *Nature Protocols*, 7(8), 1511–22. <https://doi.org/10.1038/nprot.2012.085>
- Karoulia, Z., Gavathiotis, E. and Poulikakos, P. I. (2017). New perspectives for targeting RAF kinase in human cancer. *Nature Reviews Cancer*, 17(11), 676–691. <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.79>
- Kazanietz, M. G., Bustelo, X. R., Barbacid, M., Kolch, W., Mischak, H., Wong, G., Pettit, G. R., Bruns, J. D. and Blumberg, P. M. (1994). Zinc finger domains and phorbol ester pharmacophore. Analysis of binding to mutated form of protein kinase C zeta and the vav and c-raf proto-oncogene products. *The Journal of Biological Chemistry*, 269(15), 11590–4.
- Khan, Z. M., Real, A. M., Marsiglia, W. M., Chow, A., Duffy, M. E., Yerabolu, J. R., Scopton, A. P. and Dar, A. C. (2020). Structural basis for the action of the drug trametinib at KSR-bound MEK. *Nature*, 588(7838), 509–514. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2760-4>
- Kidger, A. M., Siphthorp, J. and Cook, S. J. (2018). ERK1/2 inhibitors: New weapons to inhibit the RAS-regulated RAF-MEK1/2-ERK1/2 pathway. *Pharmacology & Therapeutics*, 187, 45–60. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2018.02.007>
- Kidger, A. M. and Keyse, S. M. (2016). The regulation of oncogenic Ras/ERK signalling by dual-specificity mitogen activated protein kinase phosphatases (MKPs). *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 50, 125–132. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2016.01.009>
- Kiel, C., Matallanas, D. and Kolch, W. (2021). The Ins and Outs of RAS Effector Complexes. *Biomolecules*, 11(2), 236. <https://doi.org/10.3390/biom11020236>

- Kirsten, W. H. and Mayer, L. A. (1967). Morphologic responses to a murine erythroblastosis virus. *Journal of the National Cancer Institute*, 39(2), 311–35.
- Klutho, P. J., Costanzo-Garvey, D. L. and Lewis, R. E. (2011). Regulation of Glucose Homeostasis by KSR1 and MARK2. *PLoS ONE*, 6(12), e29304. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029304>
- Kobayashi, T., Aoki, Y., Niihori, T., Cavé, H., Verloes, A., Okamoto, N., Kawame, H., Fujiwara, I., Takada, F., Ohata, T., Sakazume, S., Ando, T., Nakagawa, N., Lapunzina, P., Meneses, A. G., Gillissen-Kaesbach, G., Wiczorek, D., Kurosawa, K., Mizuno, S., ... Matsubara, Y. (2010). Molecular and clinical analysis of RAF1 in Noonan syndrome and related disorders: dephosphorylation of serine 259 as the essential mechanism for mutant activation. *Human Mutation*, 31(3), 284–294. <https://doi.org/10.1002/humu.21187>
- Köhler, M., Röring, M., Schorch, B., Heilmann, K., Stickel, N., Fiala, G. J., Schmitt, L. C., Braun, S., Ehrenfeld, S., Uhl, F. M., Kaltenbacher, T., Weinberg, F., Herzog, S., Zeiser, R., Schamel, W. W., Jumaa, H. and Brummer, T. (2016). Activation loop phosphorylation regulates B-Raf in vivo and transformation by B-Raf mutants. *The EMBO Journal*, 35(2), 143–161. <https://doi.org/10.15252/embj.201592097>
- Kolch, W. (2000). Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochemical Journal*, 351(2), 289–305. <https://doi.org/10.1042/bj3510289>
- Kolch, W., Heidecker, G., Lloyd, P. and Rapp, U. R. (1991). Raf-1 protein kinase is required for growth of induced NIH/3T3 cells. *Nature*, 349(6308), 426–428. <https://doi.org/10.1038/349426a0>
- Kondo, Y., Ognjenović, J., Banerjee, S., Karandur, D., Merk, A., Kulhanek, K., Wong, K., Roose, J. P., Subramaniam, S. and Kuriyan, J. (2019). Cryo-EM structure of a dimeric B-Raf:14-3-3 complex reveals asymmetry in the active sites of B-Raf kinases. *Science*, 366(6461), 109–115. <https://doi.org/10.1126/science.aay0543>
- Kornev, A. P. and Taylor, S. S. (2010). Defining the conserved internal architecture of a protein kinase. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 1804(3), 440–444. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2009.10.017>
- Kornfeld, K., Hom, D. B. and Horvitz, H. R. (1995). The ksr-1 gene encodes a novel protein kinase involved in Ras-mediated signaling in *C. elegans*. *Cell*, 83(6), 903–913. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90206-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90206-6)
- Kortum, R. L., Johnson, H. J., Costanzo, D. L., Volle, D. J., Razidlo, G. L., Fusello, A. M., Shaw, A. S. and Lewis, R. E. (2006). The Molecular Scaffold Kinase Suppressor of Ras 1 Is a Modifier of RasV12-Induced and Replicative Senescence. *Molecular and Cellular Biology*, 26(6), 2202–2214. <https://doi.org/10.1128/mcb.26.6.2202-2214.2006>

- Kortum, R. L. and Lewis, R. E. (2004). The Molecular Scaffold KSR1 Regulates the Proliferative and Oncogenic Potential of Cells. *Molecular and Cellular Biology*, 24(10), 4407–4416. <https://doi.org/10.1128/mcb.24.10.4407-4416.2004>
- Koveal, D., Pinheiro, A. S., Peti, W. and Page, R. (2011). Backbone and side chain 1H, 15N and 13C assignments of the KSR1 CA1 domain. *Biomolecular NMR Assignments*, 5(1), 39–41. <https://doi.org/10.1007/s12104-010-9262-5>
- Koveal, D., Schuh-Nuhfer, N., Ritt, D., Page, R., Morrison, D. K. and Peti, W. (2012). A CC-SAM, for Coiled Coil–Sterile α Motif, Domain Targets the Scaffold KSR-1 to Specific Sites in the Plasma Membrane. *Science Signaling*, 5(255), ra94–ra94. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2003289>
- Kozak, C., Gunnell, M. A. and Rapp, U. R. (1984). A new oncogene, c-raf, is located on mouse chromosome 6. *Journal of Virology*, 49(1), 297–299. <https://doi.org/10.1128/jvi.49.1.297-299.1984>
- Kung, J. E. and Jura, N. (2019). Prospects for pharmacological targeting of pseudokinases. *Nature Reviews Drug Discovery*, 18(7), 501–526. <https://doi.org/10.1038/s41573-019-0018-3>
- Kwon, J. J., Hajian, B., Bian, Y., Young, L. C., Amor, A. J., Fuller, J. R., Fraley, C. V., Sykes, A. M., So, J., Pan, J., Baker, L., Lee, S. J., Wheeler, D. B., Mayhew, D. L., Persky, N. S., Yang, X., Root, D. E., Barsotti, A. M., Stamford, A. W., ... Aguirre, A. J. (2022). Structure–function analysis of the SHOC2–MRAS–PP1C holophosphatase complex. *Nature*, 609(7926), 408–415. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04928-2>
- Kyriakis, J. M., App, H., Zhang, X., Banerjee, P., Brautigan, D. L., Rapp, U. R. and Avruch, J. (1992). Raf-1 activates MAP kinase-kinase. *Nature*, 358(6385), 417–421. <https://doi.org/10.1038/358417a0>
- Kyriakis, J. M. and Avruch, J. (2012). Mammalian MAPK Signal Transduction Pathways Activated by Stress and Inflammation: A 10-Year Update. *Physiological Reviews*, 92(2), 689–737. <https://doi.org/10.1152/physrev.00028.2011>
- Lavoie, H., Gagnon, J. and Therrien, M. (2020). ERK signalling: a master regulator of cell behaviour, life and fate. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 21(10), 607–632. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0255-7>
- Lavoie, H., Sahmi, M., Maisonneuve, P., Marullo, S. A., Thevakumaran, N., Jin, T., Kurinov, I., Sicheri, F. and Therrien, M. (2018). MEK drives BRAF activation through allosteric control of KSR proteins. *Nature*, 554(7693), 549–553. <https://doi.org/10.1038/nature25478>
- Lavoie, H. and Therrien, M. (2015). Regulation of RAF protein kinases in ERK signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 16(5), 281–298. <https://doi.org/10.1038/nrm3979>

- Lavoie, H., Thevakumaran, N., Gavory, G., Li, J., Padeganeh, A., Guiral, S., Duchaine, J., Mao, D. Y. L., Bouvier, M., Sicheri, F. and Therrien, M. (2013). Inhibitors that stabilize a closed RAF kinase domain conformation induce dimerization. *Nature Chemical Biology*, 9(7), 428–436. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1257>
- Leevers, S. J., Paterson, H. F. and Marshall, C. J. (1994). Requirement for Ras in Raf activation is overcome by targeting Raf to the plasma membrane. *Nature*, 369(6479), 411–414. <https://doi.org/10.1038/369411a0>
- Lemmon, M. A. and Schlessinger, J. (2010). Cell Signaling by Receptor Tyrosine Kinases. *Cell*, 141(7), 1117–1134. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.06.011>
- Levchenko, A., Bruck, J. and Sternberg, P. W. (2000). Scaffold proteins may biphasically affect the levels of mitogen-activated protein kinase signaling and reduce its threshold properties. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(11), 5818–5823. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.11.5818>
- Li, D., March, M. E., Gutierrez-Uzquiza, A., Kao, C., Seiler, C., Pinto, E., Matsuoka, L. S., Battig, M. R., Bhoj, E. J., Wenger, T. L., Tian, L., Robinson, N., Wang, T., Liu, Y., Weinstein, B. M., Swift, M., Jung, H. M., Kaminski, C. N., Chiavacci, R., ... Hakonarson, H. (2019). ARAF recurrent mutation causes central conducting lymphatic anomaly treatable with a MEK inhibitor. *Nature Medicine*, 25(7), 1116–1122. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0479-2>
- Li, S., Jang, H., Zhang, J. and Nussinov, R. (2018). Raf-1 Cysteine-Rich Domain Increases the Affinity of K-Ras/Raf at the Membrane, Promoting MAPK Signaling. *Structure*, 26(3), 513–525.e2. <https://doi.org/10.1016/j.str.2018.01.011>
- Light, Y., Paterson, H. and Marais, R. (2002). 14-3-3 Antagonizes Ras-Mediated Raf-1 Recruitment to the Plasma Membrane to Maintain Signaling Fidelity. *Molecular and Cellular Biology*, 22(14), 4984–4996. <https://doi.org/10.1128/mcb.22.14.4984-4996.2002>
- Lowenstein, E. J., Daly, R. J., Batzer, A. G., Li, W., Margolis, B., Lammers, R., Ullrich, A., Skolnik, E. Y., Bar-Sagi, D. and Schlessinger, J. (1992). The SH2 and SH3 domain-containing protein GRB2 links receptor tyrosine kinases to ras signaling. *Cell*, 70(3), 431–442. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90167-b](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90167-b)
- Lozano, J., Xing, R., Cai, Z., Jensen, H. L., Trempus, C., Mark, W., Cannon, R. and Kolesnick, R. (2003). Deficiency of kinase suppressor of Ras1 prevents oncogenic ras signaling in mice. *Cancer research*, 63(14), 4232–8.
- Luo, Z., Diaz, B., Marshall, M. S. and Avruch, J. (1997). An intact Raf zinc finger is required for optimal binding to processed Ras and for ras-dependent Raf activation in situ. *Molecular and Cellular Biology*, 17(1), 46–53. <https://doi.org/10.1128/mcb.17.1.46>

- Luttrell, L. M., Roudabush, F. L., Choy, E. W., Miller, W. E., Field, M. E., Pierce, K. L. and Lefkowitz, R. J. (2001). Activation and targeting of extracellular signal-regulated kinases by β -arrestin scaffolds. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(5), 2449–2454. <https://doi.org/10.1073/pnas.041604898>
- Malaquias, A. C. and Jorge, A. A. L. (2020). Activation of the MAPK pathway (RASopathies) and partial growth hormone insensitivity. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 519, 111040. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2020.111040>
- Manning, G., Whyte, D. B., Martinez, R., Hunter, T. and Sudarsanam, S. (2002). The Protein Kinase Complement of the Human Genome. *Science*, 298(5600), 1912–1934. <https://doi.org/10.1126/science.1075762>
- Marais, R., Light, Y., Paterson, H. F. and Marshall, C. J. (1995). Ras recruits Raf-1 to the plasma membrane for activation by tyrosine phosphorylation. *The EMBO Journal*, 14(13), 3136–3145. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1995.tb07316.x>
- Marais, Richard, Light, Y., Paterson, H. F., Mason, C. S. and Marshall, C. J. (1997). Differential Regulation of Raf-1, A-Raf, and B-Raf by Oncogenic Ras and Tyrosine Kinases. *Journal of Biological Chemistry*, 272(7), 4378–4383. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.7.4378>
- Marshall, C. J. (1995). Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: Transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell*, 80(2), 179–185. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90401-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90401-8)
- Mason, C. S., Springer, C. J., Cooper, R. G., Superti-Furga, G., Marshall, C. J. and Marais, R. (1999). Serine and tyrosine phosphorylations cooperate in Raf-1, but not B-Raf activation. *The EMBO Journal*, 18(8), 2137–2148. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.8.2137>
- Matallanas, D., Birtwistle, M., Romano, D., Zebisch, A., Rauch, J., Kriegsheim, A. von and Kolch, W. (2011). Raf Family Kinases: Old Dogs Have Learned New Tricks. *Genes & Cancer*, 2(3), 232–260. <https://doi.org/10.1177/1947601911407323>
- Matheny, S. A., Chen, C., Kortum, R. L., Razidlo, G. L., Lewis, R. E. and White, M. A. (2004). Ras regulates assembly of mitogenic signalling complexes through the effector protein IMP. *Nature*, 427(6971), 256–260. <https://doi.org/10.1038/nature02237>
- Mathien, S., Tesnière, C. and Meloche, S. (2021). Regulation of Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling Pathways by the Ubiquitin-Proteasome System and Its Pharmacological Potential. *Pharmacological Reviews*, 73(4), 263–296. <https://doi.org/10.1124/pharmrev.120.000170>
- Matsuda, S., Gotoh, Y. and Nishida, E. (1993). Phosphorylation of Xenopus mitogen-activated protein (MAP) kinase kinase by MAP kinase kinase kinase and MAP kinase. *The Journal of biological chemistry*, 268(5), 3277–81.

- McCall, J. L., Gehring, D., Clymer, B. K., Fisher, K. W., Das, B., Kelly, D. L., Kim, H., White, M. A. and Lewis, R. E. (2016). KSR1 and EPHB4 Regulate Myc and PGC1 β To Promote Survival of Human Colon Tumors. *Molecular and Cellular Biology*, 36(17), 2246–2261. <https://doi.org/10.1128/mcb.00087-16>
- McCormick, F. (2021). A brief history of RAS and the RAS Initiative. *Advances in Cancer Research*. <https://doi.org/10.1016/bs.acr.2021.07.003>
- McKay, M. M., Freeman, A. K. and Morrison, D. K. (2011). Complexity in KSR function revealed by Raf inhibitor and KSR structure studies. *Small GTPases*, 2(5), 276–281. <https://doi.org/10.4161/sgtp.2.5.17740>
- McKay, M. M., Ritt, D. A. and Morrison, D. K. (2009). Signaling dynamics of the KSR1 scaffold complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(27), 11022–11027. <https://doi.org/10.1073/pnas.0901590106>
- McKay, M. M., Ritt, D. A. and Morrison, D. K. (2011). RAF Inhibitor-Induced KSR1/B-RAF Binding and Its Effects on ERK Cascade Signaling. *Current Biology*, 21(7), 563–568. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.02.033>
- Medkova, M. and Cho, W. (1999). Interplay of C1 and C2 domains of protein kinase C-alpha in its membrane binding and activation. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(28), 19852–61. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.28.19852>
- Meggio, F. and Pinna, L. A. (2003). One-thousand-and-one substrates of protein kinase CK2? *The FASEB Journal*, 17(3), 349–368. <https://doi.org/10.1096/fj.02-0473rev>
- Mendoza, M. C., Er, E. E. and Blenis, J. (2011). The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: cross-talk and compensation. *Trends in Biochemical Sciences*, 36(6), 320–328. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2011.03.006>
- Michaloglou, C., Vredeveld, L. C. W., Soengas, M. S., Denoyelle, C., Kuilman, T., Horst, C. M. A. M. van der, Majoor, D. M., Shay, J. W., Mooi, W. J. and Peepers, D. S. (2005). BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature*, 436(7051), 720–724. <https://doi.org/10.1038/nature03890>
- Michaud, N R, Fabian, J. R., Mathes, K. D. and Morrison, D. K. (1995). 14-3-3 is not essential for Raf-1 function: identification of Raf-1 proteins that are biologically activated in a 14-3-3- and Ras-independent manner. *Molecular and Cellular Biology*, 15(6), 3390–3397. <https://doi.org/10.1128/mcb.15.6.3390>
- Michaud, Neil R, Therrien, M., Cacace, A., Edsall, L. C., Spiegel, S., Rubin, G. M. and Morrison, D. K. (1997). KSR stimulates Raf-1 activity in a kinase-independent manner. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(24), 12792–12796.

- Mikula, M., Schreiber, M., Husak, Z., Kucerova, L., R uth, J., Wieser, R., Zatloukal, K., Beug, H., Wagner, E. F. and Baccarini, M. (2001). Embryonic lethality and fetal liver apoptosis in mice lacking the c-raf-1 gene. *The EMBO Journal*, 20(8), 1952–1962. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.8.1952>
- Minden, A., Lin, A., Smeal, T., D erijard, B., Cobb, M., Davis, R. and Karin, M. (1994). c-Jun N-terminal phosphorylation correlates with activation of the JNK subgroup but not the ERK subgroup of mitogen-activated protein kinases. *Molecular and Cellular Biology*, 14(10), 6683–6688. <https://doi.org/10.1128/mcb.14.10.6683>
- Moelling, K., Heimann, B., Beimling, P., Rapp, U. R. and Sander, T. (1984). Serine- and threonine-specific protein kinase activities of purified gag–mil and gag–raf proteins. *Nature*, 312(5994), 558–561. <https://doi.org/10.1038/312558a0>
- Molzan, M. and Ottmann, C. (2012). Synergistic Binding of the Phosphorylated S233- and S259-Binding Sites of C-RAF to One 14-3-3 ζ Dimer. *Journal of Molecular Biology*, 423(4), 486–495. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2012.08.009>
- Molzan, M., Schumacher, B., Ottmann, C., Baljuls, A., Polzien, L., Weyand, M., Thiel, P., Rose, R., Rose, M., Kuhenne, P., Kaiser, M., Rapp, U. R., Kuhlmann, J. and Ottmann, C. (2010). Impaired Binding of 14-3-3 to C-RAF in Noonan Syndrome Suggests New Approaches in Diseases with Increased Ras Signaling. *Molecular and Cellular Biology*, 30(19), 4698–4711. <https://doi.org/10.1128/mcb.01636-09>
- Moore, A. R. and Malek, S. (2021). The promise and peril of KRAS G12C inhibitors. *Cancer Cell*, 39(8), 1059–1061. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2021.07.011>
- Morrish, F., Neretti, N., Sedivy, J. M. and Hockenbery, D. M. (2008). The oncogene c-Myc coordinates regulation of metabolic networks to enable rapid cell cycle entry. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 7(8), 1054–66. <https://doi.org/10.4161/cc.7.8.5739>
- Morrison, D K, Kaplan, D. R., Rapp, U. and Roberts, T. M. (1988). Signal transduction from membrane to cytoplasm: growth factors and membrane-bound oncogene products increase Raf-1 phosphorylation and associated protein kinase activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85(23), 8855–8859. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.23.8855>
- Morrison, Deborah K. (2009). The 14-3-3 proteins: integrators of diverse signaling cues that impact cell fate and cancer development. *Trends in Cell Biology*, 19(1), 16–23. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2008.10.003>
- Morrison, Deborah K., Kaplan, D. R., Escobedo, J. A., Rapp, U. R., Roberts, T. M. and Williams, L. T. (1989). Direct activation of the serine/threonine kinase activity of raf-1 through tyrosine phosphorylation by the PDGF β -receptor. *Cell*, 58(4), 649–657. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90100-1](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90100-1)

- Mott, H. R., Carpenter, J. W., Zhong, S., Ghosh, S., Bell, R. M. and Campbell, S. L. (1996). The solution structure of the Raf-1 cysteine-rich domain: a novel ras and phospholipid binding site. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(16), 8312–8317. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.16.8312>
- Mukhopadhyay, S., Heiden, M. G. V. and McCormick, F. (2021). The metabolic landscape of RAS-driven cancers from biology to therapy. *Nature Cancer*, 2(3), 271–283. <https://doi.org/10.1038/s43018-021-00184-x>
- Müller, J., Cacace, A. M., Lyons, W. E., McGill, C. B. and Morrison, D. K. (2000). Identification of B-KSR1, a Novel Brain-Specific Isoform of KSR1 That Functions in Neuronal Signaling. *Molecular and Cellular Biology*, 20(15), 5529–5539. <https://doi.org/10.1128/mcb.20.15.5529-5539.2000>
- Müller, J., Ory, S., Copeland, T., Piwnicka-Worms, H. and Morrison, D. K. (2001). C-TAK1 Regulates Ras Signaling by Phosphorylating the MAPK Scaffold, KSR1. *Molecular Cell*, 8(5), 983–993. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(01\)00383-5](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(01)00383-5)
- Mulner-Lorillon, O., Chassé, H., Morales, J., Bellé, R. and Cormier, P. (2017). MAPK/ERK activity is required for the successful progression of mitosis in sea urchin embryos. *Developmental Biology*, 421(2), 194–203. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2016.11.018>
- Murphy, L. O., MacKeigan, J. P. and Blenis, J. (2004). A Network of Immediate Early Gene Products Propagates Subtle Differences in Mitogen-Activated Protein Kinase Signal Amplitude and Duration. *Molecular and Cellular Biology*, 24(1), 144–153. <https://doi.org/10.1128/mcb.24.1.144-153.2004>
- Muslin, A. J., Tanner, J. W., Allen, P. M. and Shaw, A. S. (1996). Interaction of 14-3-3 with Signaling Proteins Is Mediated by the Recognition of Phosphoserine. *Cell*, 84(6), 889–897. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81067-3](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81067-3)
- Nan, X., Tamgüney, T. M., Collisson, E. A., Lin, L.-J., Pitt, C., Galeas, J., Lewis, S., Gray, J. W., McCormick, F. and Chu, S. (2015). Ras-GTP dimers activate the Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(26), 7996–8001. <https://doi.org/10.1073/pnas.1509123112>
- Neilsen, B. K., Frodyma, D. E., Lewis, R. E. and Fisher, K. W. (2017). KSR as a therapeutic target for Ras-dependent cancers. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 21(5), 499–509. <https://doi.org/10.1080/14728222.2017.1311325>
- Nelson, D. L. and Cox, M. M. (2008). *Lehninger principles of biochemistry* (5th ed.). W.H. Freeman and Company.
- Newlaczyl, A. U., Coulson, J. M. and Prior, I. A. (2017). Quantification of spatiotemporal patterns of Ras isoform expression during development. *Scientific Reports*, 7(1), 41297. <https://doi.org/10.1038/srep41297>

- Nguyen, A., Burack, W. R., Stock, J. L., Kortum, R., Chaika, O. V., Afkarian, M., Muller, W. J., Murphy, K. M., Morrison, D. K., Lewis, R. E., McNeish, J. and Shaw, A. S. (2002). Kinase Suppressor of Ras (KSR) is a Scaffold Which Facilitates Mitogen-Activated Protein Kinase Activation In Vivo. *Molecular and Cellular Biology*, 22(9), 3035–3045. <https://doi.org/10.1128/mcb.22.9.3035-3045.2002>
- Nguyen, L. K., Matallanas, D. G., Romano, D., Kholodenko, B. N. and Kolch, W. (2015). Competing to coordinate cell fate decisions: the MST2-Raf-1 signaling device. *Cell Cycle*, 14(2), 189–199. <https://doi.org/10.4161/15384101.2014.973743>
- Niihori, T., Aoki, Y., Narumi, Y., Neri, G., Cavé, H., Verloes, A., Okamoto, N., Hennekam, R. C. M., Gillesen-Kaesbach, G., Wiczorek, D., Kavamura, M. I., Kurosawa, K., Ohashi, H., Wilson, L., Heron, D., Bonneau, D., Corona, G., Kaname, T., Naritomi, K., ... Matsubara, Y. (2006). Germline KRAS and BRAF mutations in cardio-facio-cutaneous syndrome. *Nature Genetics*, 38(3), 294–296. <https://doi.org/10.1038/ng1749>
- Nogales, E. and Scheres, S. H. W. (2015). Cryo-EM: A Unique Tool for the Visualization of Macromolecular Complexity. *Molecular Cell*, 58(4), 677–689. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.02.019>
- Ohmachi, M., Rocheleau, C. E., Church, D., Lambie, E., Schedl, T. and Sundaram, M. V. (2002). *C. elegans* ksr-1 and ksr-2 Have Both Unique and Redundant Functions and Are Required for MPK-1 ERK Phosphorylation. *Current Biology*, 12(5), 427–433. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(02\)00690-5](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(02)00690-5)
- Okada, T., Hu, C.-D., Jin, T.-G., Kariya, K., Yamawaki-Kataoka, Y. and Kataoka, T. (1999). The Strength of Interaction at the Raf Cysteine-Rich Domain Is a Critical Determinant of Response of Raf to Ras Family Small GTPases. *Molecular and Cellular Biology*, 19(9), 6057–6064. <https://doi.org/10.1128/mcb.19.9.6057>
- Olayioye, M. A., Neve, R. M., Lane, H. A. and Hynes, N. E. (2000). NEW EMBO MEMBERS' REVIEW: The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *The EMBO Journal*, 19(13), 3159–3167. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.13.3159>
- O'Neill, E. and Kolch, W. (2004). Conferring specificity on the ubiquitous Raf/MEK signalling pathway. *British Journal of Cancer*, 90(2), 283–288. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6601488>
- Ory, S., Zhou, M., Conrads, T. P., Veenstra, T. D. and Morrison, D. K. (2003). Protein Phosphatase 2A Positively Regulates Ras Signaling by Dephosphorylating KSR1 and Raf-1 on Critical 14-3-3 Binding Sites. *Current Biology*, 13(16), 1356–1364. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(03\)00535-9](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(03)00535-9)
- Oughtred, R., Rust, J., Chang, C., Breitkreutz, B., Stark, C., Willems, A., Boucher, L., Leung, G., Kolas, N., Zhang, F., Dolma, S., Coulombe-Huntington, J., Chatr-aryamontri, A., Dolinski, K. and Tyers, M. (2021). The BioGRID database: A comprehensive biomedical resource of

curated protein, genetic, and chemical interactions. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*, 30(1), 187–200. <https://doi.org/10.1002/pro.3978>

Pandit, B., Sarkozy, A., Pennacchio, L. A., Carta, C., Oishi, K., Martinelli, S., Pogna, E. A., Schackwitz, W., Ustaszewska, A., Landstrom, A., Bos, J. M., Ommen, S. R., Esposito, G., Lepri, F., Faul, C., Mundel, P., Sigüero, J. P. L., Tenconi, R., Selicorni, A., ... Gelb, B. D. (2007). Gain-of-function RAF1 mutations cause Noonan and LEOPARD syndromes with hypertrophic cardiomyopathy. *Nature Genetics*, 39(8), 1007–1012. <https://doi.org/10.1038/ng2073>

Paniagua, G., Jacob, H. K. C., Brehey, O., García-Alonso, S., Lechuga, C. G., Pons, T., Musteanu, M., Guerra, C., Drosten, M. and Barbacid, M. (2022). KSR induces RAS-independent MAPK pathway activation and modulates the efficacy of KRAS inhibitors. *Molecular Oncology*. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.13213>

Papke, B. and Der, C. J. (2017). Drugging RAS: Know the enemy. *Science*, 355(6330), 1158–1163. <https://doi.org/10.1126/science.aam7622>

Paraiso, K. H. T., Haarberg, H. E., Wood, E., Rebecca, V. W., Chen, Y. A., Xiang, Y., Ribas, A., Lo, R. S., Weber, J. S., Sondak, V. K., John, J. K., Sarnaik, A. A., Koomen, J. M. and Smalley, K. S. M. (2012). The HSP90 Inhibitor XL888 Overcomes BRAF Inhibitor Resistance Mediated through Diverse Mechanisms. *Clinical Cancer Research*, 18(9), 2502–2514. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-11-2612>

Park, E., Rawson, S., Li, K., Kim, B.-W., Ficarro, S. B., Pino, G. G.-D., Sharif, H., Marto, J. A., Jeon, H. and Eck, M. J. (2019). Architecture of autoinhibited and active BRAF/MEK1/14-3-3 complexes. *Nature*, 575(7783), 545–550. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1660-y>

Parkkola, H., Siddiqui, F. A., Oetken-Lindholm, C. and Abankwa, D. (2021). Ras Activity and Signaling, Methods and Protocols. *Methods in Molecular Biology*, 2262, 233–250. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1190-6_13

Patton, E. E., Widlund, H. R., Kutok, J. L., Kopani, K. R., Amatruda, J. F., Murphey, R. D., Berghmans, S., Mayhall, E. A., Traver, D., Fletcher, C. D. M., Aster, J. C., Granter, S. R., Look, A. T., Lee, C., Fisher, D. E. and Zon, L. I. (2005). BRAF Mutations Are Sufficient to Promote Nevi Formation and Cooperate with p53 in the Genesis of Melanoma. *Current Biology*, 15(3), 249–254. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.01.031>

Pearce, L. R., Atanassova, N., Banton, M. C., Bottomley, B., Klaauw, A. A. van der, Revelli, J.-P., Hendricks, A., Keogh, J. M., Henning, E., Doree, D., Jeter-Jones, S., Garg, S., Bochukova, E. G., Bounds, R., Ashford, S., Gayton, E., Hindmarsh, P. C., Shield, J. P. H., Crowne, E., ... Farooqi, I. S. (2013). KSR2 Mutations Are Associated with Obesity, Insulin Resistance, and Impaired Cellular Fuel Oxidation. *Cell*, 155(4), 765–777. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.09.058>

- Pearson, G., Robinson, F., Gibson, T. B., Xu, B., Karandikar, M., Berman, K. and Cobb, M. H. (2001). Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinase Pathways: Regulation and Physiological Functions. *Endocrine Reviews*, 22(2), 153–183. <https://doi.org/10.1210/edrv.22.2.0428>
- Peri, S., Navarro, J. D., Kristiansen, T. Z., Amanchy, R., Surendranath, V., Muthusamy, B., Gandhi, T. K. B., Chandrika, K. N., Deshpande, N., Suresh, S., Rashmi, B. P., Shanker, K., Padma, N., Niranjana, V., Harsha, H. C., Talreja, N., Vrushabendra, B. M., Ramya, M. A., Yatish, A. J., ... Pandey, A. (2004). Human protein reference database as a discovery resource for proteomics. *Nucleic Acids Research*, 32(suppl_1), D497–D501. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh070>
- Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C. and Ferrin, T. E. (2004). UCSF Chimera—A visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry*, 25(13), 1605–1612. <https://doi.org/10.1002/jcc.20084>
- Plowman, G. D., Culouscou, J. M., Whitney, G. S., Green, J. M., Carlton, G. W., Foy, L., Neubauer, M. G. and Shoyab, M. (1993). Ligand-specific activation of HER4/p180erbB4, a fourth member of the epidermal growth factor receptor family. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(5), 1746–1750. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.5.1746>
- Pollock, P. M., Harper, U. L., Hansen, K. S., Yudt, L. M., Stark, M., Robbins, C. M., Moses, T. Y., Hostetter, G., Wagner, U., Kakareka, J., Salem, G., Pohida, T., Heenan, P., Duray, P., Kallioniemi, O., Hayward, N. K., Trent, J. M. and Meltzer, P. S. (2003). High frequency of BRAF mutations in nevi. *Nature Genetics*, 33(1), 19–20. <https://doi.org/10.1038/ng1054>
- Poulikakos, P. I., Persaud, Y., Janakiraman, M., Kong, X., Ng, C., Moriceau, G., Shi, H., Atefi, M., Titz, B., Gabay, M. T., Salton, M., Dahlman, K. B., Tadi, M., Wargo, J. A., Flaherty, K. T., Kelley, M. C., Misteli, T., Chapman, P. B., Sosman, J. A., ... Solit, D. B. (2011). RAF inhibitor resistance is mediated by dimerization of aberrantly spliced BRAF(V600E). *Nature*, 480(7377), 387–390. <https://doi.org/10.1038/nature10662>
- Poulikakos, P. I., Zhang, C., Bollag, G., Shokat, K. M. and Rosen, N. (2010). RAF inhibitors transactivate RAF dimers and ERK signaling in cells with wild-type BRAF. *Nature*, 464(7287), 427–430. <https://doi.org/10.1038/nature08902>
- Pritchard, C. A., Bolin, L., Slattery, R., Murray, R. and McMahon, M. (1996). Post-natal lethality and neurological and gastrointestinal defects in mice with targeted disruption of the A-Raf protein kinase gene. *Current Biology*, 6(5), 614–617. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(02\)00548-1](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(02)00548-1)
- Qu, C., Park, J. Y., Yun, M. W., He, Q., Yang, F., Kim, K., Ham, D., Li, R., Iverson, T. M., Gurevich, V. V., Sun, J.-P. and Chung, K. Y. (2021). Scaffolding mechanism of arrestin-2 in the cRaf/MEK1/ERK signaling cascade. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(37). <https://doi.org/10.1073/pnas.2026491118>

- Rajakulendran, T., Sahmi, M., Lefrançois, M., Sicheri, F. and Therrien, M. (2009). A dimerization-dependent mechanism drives RAF catalytic activation. *Nature*, *461*(7263), 542–545. <https://doi.org/10.1038/nature08314>
- Rajalingam, K., Schreck, R., Rapp, U. R. and Albert, Š. (2007). Ras oncogenes and their downstream targets. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, *1773*(8), 1177–1195. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2007.01.012>
- Rao, C., Frodyma, D. E., Southeikal, S., Svoboda, R. A., Black, A. R., Guda, C., Mizutani, T., Clevers, H., Johnson, K. R., Fisher, K. W. and Lewis, R. E. (2021). KSR1- and ERK-dependent translational regulation of the epithelial-to-mesenchymal transition. *eLife*, *10*, e66608. <https://doi.org/10.7554/elife.66608>
- Rapp, U. R., Goldsborough, M. D., Mark, G. E., Bonner, T. I., Groffen, J., Reynolds, F. H. and Stephenson, J. R. (1983). Structure and biological activity of v-raf, a unique oncogene transduced by a retrovirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *80*(14), 4218–4222. <https://doi.org/10.1073/pnas.80.14.4218>
- Rapp, U. R., Heidecker, G., Huleihel, M., Cleveland, J. L., Choi, W. C., Pawson, T., Ihle, J. N. and Anderson, W. B. (1988). raf Family Serine/Threonine Protein Kinases in Mitogen Signal Transduction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, *53*(0), 173–184. <https://doi.org/10.1101/sqb.1988.053.01.023>
- Ratner, N. and Miller, S. J. (2015). A RASopathy gene commonly mutated in cancer: the neurofibromatosis type 1 tumour suppressor. *Nature Reviews Cancer*, *15*(5), 290–301. <https://doi.org/10.1038/nrc3911>
- Rauen, K. A. (2013). The RASopathies. In Chakravarti, A. and Green E. (dir.), *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, *14*, 355–369. <https://doi.org/10.1146/annurev-genom-091212-153523>
- Razidlo, G. L., Johnson, H. J., Stoeger, S. M., Cowan, K. H., Bessho, T. and Lewis, R. E. (2009). KSR1 Is Required for Cell Cycle Reinitiation Following DNA Damage. *Journal of Biological Chemistry*, *284*(11), 6705–6715. <https://doi.org/10.1074/jbc.m806457200>
- Razzaque, M. A., Nishizawa, T., Komoike, Y., Yagi, H., Furutani, M., Amo, R., Kamisago, M., Momma, K., Katayama, H., Nakagawa, M., Fujiwara, Y., Matsushima, M., Mizuno, K., Tokuyama, M., Hirota, H., Muneuchi, J., Higashinakagawa, T. and Matsuoka, R. (2007). Germline gain-of-function mutations in RAF1 cause Noonan syndrome. *Nature Genetics*, *39*(8), 1013–1017. <https://doi.org/10.1038/ng2078>
- Rebocho, A. P. and Marais, R. (2013). ARAF acts as a scaffold to stabilize BRAF:CRAF heterodimers. *Oncogene*, *32*(26), 3207–3212. <https://doi.org/10.1038/onc.2012.330>
- Revelli, J., Smith, D., Allen, J., Jeter-Jones, S., Shadoan, M. K., Desai, U., Schneider, M., Slightenhorst, I., Kirkpatrick, L., Platt, K. A., Suwanichkul, A., Savelieva, K., Gerhardt, B.,

- Mitchell, J., Syrewicz, J., Zambrowicz, B., Hamman, B. D., Vogel, P. and Powell, D. R. (2011). Profound Obesity Secondary to Hyperphagia in Mice Lacking Kinase Suppressor of Ras 2. *Obesity*, *19*(5), 1010–1018. <https://doi.org/10.1038/oby.2010.282>
- Rinaldi, L., Donne, R. D., Sepe, M., Porpora, M., Garbi, C., Chiuso, F., Gallo, A., Parisi, S., Russo, L., Bachmann, V., Huber, R. G., Stefan, E., Russo, T. and Feliciello, A. (2016). praja2 regulates KSR1 stability and mitogenic signaling. *Cell Death & Disease*, *7*(5), e2230. <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.109>
- Ritt, D. A., Monson, D. M., Specht, S. I. and Morrison, D. K. (2010). Impact of Feedback Phosphorylation and Raf Heterodimerization on Normal and Mutant B-Raf Signaling. *Molecular and Cellular Biology*, *30*(3), 806–819. <https://doi.org/10.1128/mcb.00569-09>
- Ritt, D. A., Zhou, M., Conrads, T. P., Veenstra, T. D., Copeland, T. D. and Morrison, D. K. (2007). CK2 Is a Component of the KSR1 Scaffold Complex that Contributes to Raf Kinase Activation. *Current Biology*, *17*(2), 179–184. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.11.061>
- Roberts, P. J. and Der, C. J. (2007). Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene*, *26*(22), 3291–3310. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210422>
- Robinson, J. D. and Pitcher, J. A. (2013). G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) is a Rho-activated scaffold protein for the ERK MAP kinase cascade. *Cellular Signalling*, *25*(12), 2831–2839. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2013.08.031>
- Rodriguez-Viciana, P., Sabatier, C. and McCormick, F. (2004). Signaling Specificity by Ras Family GTPases Is Determined by the Full Spectrum of Effectors They Regulate. *Molecular and Cellular Biology*, *24*(11), 4943–4954. <https://doi.org/10.1128/mcb.24.11.4943-4954.2004>
- Rodriguez-Viciana, P., Tetsu, O., Tidyman, W. E., Estep, A. L., Conger, B. A., Cruz, M. S., McCormick, F. and Rauen, K. A. (2006). Germline Mutations in Genes Within the MAPK Pathway Cause Cardio-facio-cutaneous Syndrome. *Science*, *311*(5765), 1287–1290. <https://doi.org/10.1126/science.1124642>
- Romano, D., Nguyen, L. K., Matallanas, D., Halasz, M., Doherty, C., Kholodenko, B. N. and Kolch, W. (2014). Protein interaction switches coordinate Raf-1 and MST2/Hippo signalling. *Nature Cell Biology*, *16*(7), 673–684. <https://doi.org/10.1038/ncb2986>
- Romeo, Y., Moreau, J., Zindy, P.-J., Saba-El-Leil, M., Lavoie, G., Dandachi, F., Baptissart, M., Borden, K. L. B., Meloche, S. and Roux, P. P. (2013). RSK regulates activated BRAF signalling to mTORC1 and promotes melanoma growth. *Oncogene*, *32*(24), 2917–2926. <https://doi.org/10.1038/onc.2012.312>
- Rommel, C., Radziwill, G., Lovric, J., Noeldeke, J., Heinicke, T., Jones, D., Aitken, A. and Moelling, K. (1996). Activated Ras displaces 14-3-3 protein from the amino terminus of c-Raf-1. *Oncogene*, *12*(3), 609–619.

- Röring, M., Herr, R., Fiala, G. J., Heilmann, K., Braun, S., Eisenhardt, A. E., Halbach, S., Capper, D., Deimling, A. von, Schamel, W. W., Saunders, D. N. and Brummer, T. (2012). Distinct requirement for an intact dimer interface in wild-type, V600E and kinase-dead B-Raf signalling. *The EMBO Journal*, 31(11), 2629–2647. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.100>
- Roskoski, R. (2010). RAF protein-serine/threonine kinases: Structure and regulation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 399(3), 313–317. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.07.092>
- Ross, J. S., Wang, K., Chmielecki, J., Gay, L., Johnson, A., Chudnovsky, J., Yelensky, R., Lipson, D., Ali, S. M., Elvin, J. A., Vergilio, J., Roels, S., Miller, V. A., Nakamura, B. N., Gray, A., Wong, M. K. and Stephens, P. J. (2016). The distribution of BRAF gene fusions in solid tumors and response to targeted therapy. *International Journal of Cancer*, 138(4), 881–890. <https://doi.org/10.1002/ijc.29825>
- 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. *The Journal of Cell Biology*, 196(6), 801–810. <https://doi.org/10.1083/jcb.201112098>
- Roy, F., Laberge, G., Douziech, M., Ferland-McCollough, D. and Therrien, M. (2002). KSR is a scaffold required for activation of the ERK/MAPK module. *Genes & Development*, 16(4), 427–438. <https://doi.org/10.1101/gad.962902>
- Rubinfeld, H. and Seger, R. (2005). The ERK cascade: a prototype of MAPK signaling. *Molecular biotechnology*, 31(2), 151–74. <https://doi.org/10.1385/mb:31:2:151>
- Rushworth, L. K., Hindley, A. D., O'Neill, E. and Kolch, W. (2006). Regulation and Role of Raf-1/B-Raf Heterodimerization†. *Molecular and Cellular Biology*, 26(6), 2262–2272. <https://doi.org/10.1128/mcb.26.6.2262-2272.2006>
- Sacco, F., Tinti, M., Palma, A., Ferrari, E., Nardozza, A. P., Huijsduijnen, R. H. van, Takahashi, T., Castagnoli, L. and Cesareni, G. (2009). Tumor Suppressor Density-enhanced Phosphatase-1 (DEP-1) Inhibits the RAS Pathway by Direct Dephosphorylation of ERK1/2 Kinases. *Journal of Biological Chemistry*, 284(33), 22048–22058. <https://doi.org/10.1074/jbc.m109.002758>
- Salomoni, P., Wasik, M. A., Riedel, R. F., Reiss, K., Choi, J. K., Skorski, T. and Calabretta, B. (1998). Expression of Constitutively Active Raf-1 in the Mitochondria Restores Antiapoptotic and Leukemogenic Potential of a Transformation-deficient BCR/ABL Mutant. *The Journal of Experimental Medicine*, 187(12), 1995–2007. <https://doi.org/10.1084/jem.187.12.1995>
- Sambrook, J. and Russell, D. W. (2006). Preparation and Transformation of Competent E. coli Using Calcium Chloride. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2006(1). <https://doi.org/10.1101/pdb.prot3932>

- Sanchez, J. N., Subramanian, C., Chanda, M., Shanguan, G., Zhang, N., Wang, T., Timmermann, B. N., Blagg, B. S. J. and Cohen, M. S. (2021). A novel C-terminal Hsp90 inhibitor KU758 synergizes efficacy in combination with BRAF or MEK inhibitors and targets drug-resistant pathways in BRAF-mutant melanomas. *Melanoma Research*, 31(3), 197–207. <https://doi.org/10.1097/cmr.0000000000000734>
- Sancllemente, M., Francoz, S., Esteban-Burgos, L., Bousquet-Mur, E., Djurec, M., Lopez-Casas, P. P., Hidalgo, M., Guerra, C., Drosten, M., Musteanu, M. and Barbacid, M. (2018). c-RAF Ablation Induces Regression of Advanced Kras/Trp53 Mutant Lung Adenocarcinomas by a Mechanism Independent of MAPK Signaling. *Cancer Cell*, 33(2), 217–228.e4. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2017.12.014>
- Santarpia, L., Lippman, S. M. and El-Naggar, A. K. (2012). Targeting the MAPK–RAS–RAF signaling pathway in cancer therapy. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 16(1), 103–119. <https://doi.org/10.1517/14728222.2011.645805>
- Santos, E. (2014). Dimerization Opens New Avenues into Ras Signaling Research. *Science Signaling*, 7(324). <https://doi.org/10.1126/scisignal.2005318>
- Saxton, R. A. and Sabatini, D. M. (2017). mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell*, 168(6), 960–976. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.02.004>
- Schlessinger, J. (2014). Receptor Tyrosine Kinases: Legacy of the First Two Decades. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 6(3), a008912. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008912>
- Shaw, A. S., Kornev, A. P., Hu, J., Ahuja, L. G. and Taylor, S. S. (2014). Kinases and Pseudokinases: Lessons from RAF. *Molecular and Cellular Biology*, 34(9), 1538–1546. <https://doi.org/10.1128/mcb.00057-14>
- Shin, S.-Y., Rath, O., Choo, S.-M., Fee, F., McFerran, B., Kolch, W. and Cho, K.-H. (2009). Positive- and negative-feedback regulations coordinate the dynamic behavior of the Ras-Raf-MEK-ERK signal transduction pathway. *Journal of Cell Science*, 122(3), 425–435. <https://doi.org/10.1242/jcs.036319>
- Silva, J. M., Bulman, C. and McMahon, M. (2014). BRAFV600E Cooperates with PI3K Signaling, Independent of AKT, to Regulate Melanoma Cell Proliferation. *Molecular Cancer Research*, 12(3), 447–463. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.mcr-13-0224-t>
- Simanshu, D. K., Nissley, D. V. and McCormick, F. (2017). RAS Proteins and Their Regulators in Human Disease. *Cell*, 170(1), 17–33. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.06.009>
- Sneath, P. H. A. (1966). Relations between chemical structure and biological activity in peptides. *Journal of Theoretical Biology*, 12(2), 157–195. [https://doi.org/10.1016/0022-5193\(66\)90112-3](https://doi.org/10.1016/0022-5193(66)90112-3)

- Sosman, J. A., Kim, K. B., Schuchter, L., Gonzalez, R., Pavlick, A. C., Weber, J. S., McArthur, G. A., Hutson, T. E., Moschos, S. J., Flaherty, K. T., Hersey, P., Kefford, R., Lawrence, D., Puzanov, I., Lewis, K. D., Amaravadi, R. K., Chmielowski, B., Lawrence, H. J., Shyr, Y., ... Ribas, A. (2012). Survival in BRAF V600–Mutant Advanced Melanoma Treated with Vemurafenib. *The New England Journal of Medicine*, 366(8), 707–714. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1112302>
- Spee, J. H., Vos, W. M. de and Kuipers, O. P. (1993). Efficient random mutagenesis method with adjustable mutation frequency by use of PCR and dITP. *Nucleic Acids Research*, 21(3), 777–778. <https://doi.org/10.1093/nar/21.3.777>
- Spencer-Smith, R., Terrell, E. M., Insinna, C., Agamasu, C., Wagner, M. E., Ritt, D. A., Stauffer, J., Stephen, A. G. and Morrison, D. K. (2021). RASopathy Mutations Demonstrate the Critical Function of the Cysteine-rich Domain in Maintaining BRAF in an Autoinhibited State to Prevent Aberrant Signaling. *bioRxiv*, 2021.10.01.462773. <https://doi.org/10.1101/2021.10.01.462773>
- Stacey, D. W. and Kung, H.-F. (1984). Transformation of NIH 3T3 cells by microinjection of Ha-ras p21 protein. *Nature*, 310(5977), 508–511. <https://doi.org/10.1038/310508a0>
- Stancato, L., Chow, Y., Hutchison, K., Perdew, G., Jove, R. and Pratt, W. (1993). RAF exists in a native heterocomplex with HSP90 and p50 that can be reconstituted in a cell-free system. *Journal of Biological Chemistry*, 268(29), 21711–21716
- Stanton, V. P. and Cooper, G. M. (1987). Activation of human raf transforming genes by deletion of normal amino-terminal coding sequences. *Molecular and Cellular Biology*, 7(3), 1171–1179. <https://doi.org/10.1128/mcb.7.3.1171>
- Stewart, S., Sundaram, M., Zhang, Y., Lee, J., Han, M. and Guan, K.-L. (1999). Kinase Suppressor of Ras Forms a Multiprotein Signaling Complex and Modulates MEK Localization. *Molecular and Cellular Biology*, 19(8), 5523–5534. <https://doi.org/10.1128/mcb.19.8.5523>
- Stokoe, D., Macdonald, S. G., Cadwallader, K., Symons, M. and Hancock, J. F. (1994). Activation of Raf as a Result of Recruitment to the Plasma Membrane. *Science*, 264(5164), 1463–1467. <https://doi.org/10.1126/science.7811320>
- Sundaram, M. and Han, M. (1995). The *C. elegans* ksr-1 gene encodes a novel raf-related kinase involved in Ras-mediated signal transduction. *Cell*, 83(6), 889–901. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90205-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90205-8)
- Tate, J. G., Bamford, S., Jubb, H. C., Sondka, Z., Beare, D. M., Bindal, N., Boutselakis, H., Cole, C. G., Creatore, C., Dawson, E., Fish, P., Harsha, B., Hathaway, C., Jupe, S. C., Kok, C. Y., Noble, K., Ponting, L., Ramshaw, C. C., Rye, C. E., ... Forbes, S. A. (2019). COSMIC: the Catalogue of Somatic Mutations In Cancer. *Nucleic Acids Research*, 47, D941–D947. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1015>

- Terai, K. and Matsuda, M. (2006). The amino-terminal B-Raf-specific region mediates calcium-dependent homo- and hetero-dimerization of Raf. *The EMBO Journal*, 25(15), 3556–3564. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601241>
- Terrell, E. M., Durrant, D. E., Ritt, D. A., Sealover, N. E., Sheffels, E., Spencer-Smith, R., Esposito, D., Zhou, Y., Hancock, J. F., Kortum, R. L. and Morrison, D. K. (2019). Distinct Binding Preferences between Ras and Raf Family Members and the Impact on Oncogenic Ras Signaling. *Molecular Cell*, 76(6), 872-884.e5. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.09.004>
- Therrien, M, Michaud, N. R., Rubin, G. M. and Morrison, D. K. (1996). KSR modulates signal propagation within the MAPK cascade. *Genes & Development*, 10(21), 2684–2695. <https://doi.org/10.1101/gad.10.21.2684>
- Therrien, M., Chang, H. C., Solomon, N. M., Karim, F. D., Wassarman, D. A. and Rubin, G. M. (1995). KSR, a novel protein kinase required for RAS signal transduction. *Cell*, 83(6), 879–888. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90204-x](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90204-x)
- Thevakumaran, N., Lavoie, H., Critton, D. A., Tebben, A., Marinier, A., Sicheri, F. and Therrien, M. (2015). Crystal structure of a BRAF kinase domain monomer explains basis for allosteric regulation. *Nature Structural & Molecular Biology*, 22(1), 37–43. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2924>
- Thompson, K. E., Bashor, C. J., Lim, W. A. and Keating, A. E. (2012). SYNZIP Protein Interaction Toolbox: in Vitro and in Vivo Specifications of Heterospecific Coiled-Coil Interaction Domains. *ACS Synthetic Biology*, 1(4), 118–129. <https://doi.org/10.1021/sb200015u>
- Tian, T., Harding, A., Inder, K., Plowman, S., Parton, R. G. and Hancock, J. F. (2007). Plasma membrane nanoswitches generate high-fidelity Ras signal transduction. *Nature Cell Biology*, 9(8), 905–914. <https://doi.org/10.1038/ncb1615>
- Tidyman, W. E. and Rauen, K. A. (2016). Pathogenetics of the RASopathies. *Human molecular genetics*, 25(R2), R123–R132. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddw191>
- Tran, N. H., Wu, X. and Frost, J. A. (2005). B-Raf and Raf-1 Are Regulated by Distinct Autoregulatory Mechanisms. *Journal of Biological Chemistry*, 280(16), 16244–16253. <https://doi.org/10.1074/jbc.m501185200>
- Tran, T. H., Chan, A. H., Young, L. C., Bindu, L., Neale, C., Messing, S., Dharmiah, S., Taylor, T., Denson, J.-P., Esposito, D., Nissley, D. V., Stephen, A. G., McCormick, F. and Simanshu, D. K. (2021). KRAS interaction with RAF1 RAS-binding domain and cysteine-rich domain provides insights into RAS-mediated RAF activation. *Nature Communications*, 12(1), 1176. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21422-x>
- Tzivion, G., Luo, Z. and Avruch, J. (1998). A dimeric 14-3-3 protein is an essential cofactor for Raf kinase activity. *Nature*, 394(6688), 88–92. <https://doi.org/10.1038/27938>

- Übersax, J. A. and Ferrell, J. E. Jr. (2007). Mechanisms of specificity in protein phosphorylation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(7), 530–541. <https://doi.org/10.1038/nrm2203>
- Ünal, E. B., Uhlitz, F. and Blüthgen, N. (2017). A Compendium of ERK Targets. *FEBS letters*, 591(17), 2607–2615. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12740>
- Vakiani, E. and Solit, D. B. (2011). KRAS and BRAF: drug targets and predictive biomarkers. *The Journal of Pathology*, 223(2), 220–230. <https://doi.org/10.1002/path.2796>
- Valet, M., Siggia, E. D. and Brivanlou, A. H. (2021). Mechanical regulation of early vertebrate embryogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00424-z>
- Valluet, A., Druillennec, S., Barbotin, C., Dorard, C., Monsoro-Burq, A. H., Larcher, M., Pouponnot, C., Baccarini, M., Larue, L. and Eychène, A. (2012). B-Raf and C-Raf Are Required for Melanocyte Stem Cell Self-Maintenance. *Cell Reports*, 2(4), 774–780. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.08.020>
- Vojtek, A. B., Hollenberg, S. M. and Cooper, J. A. (1993). Mammalian Ras interacts directly with the serine/threonine kinase raf. *Cell*, 74(1), 205–214. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90307-c](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90307-c)
- Walker, J. M. (2009). *The Protein Protocols Handbook* (3rd ed.). Humana Press, Totowa, NJ. <https://doi.org/10.1007/978-1-59745-198-7>
- Wan, P. T. C., Garnett, M. J., Roe, S. M., Lee, S., Niculescu-Duvaz, D., Good, V. M., Project, C. G., Jones, C. M., Marshall, C. J., Springer, C. J., Barford, D. and Marais, R. (2004). Mechanism of Activation of the RAF-ERK Signaling Pathway by Oncogenic Mutations of B-RAF. *Cell*, 116(6), 855–867. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(04\)00215-6](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(04)00215-6)
- Wang, H.-G., Rapp, U. R. and Reed, J. C. (1996). Bcl-2 Targets the Protein Kinase Raf-1 to Mitochondria. *Cell*, 87(4), 629–638. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81383-5](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81383-5)
- Wang, X. and Kim, J. (2012). Conformation-Specific Effects of Raf Kinase Inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*, 55(17), 7332–7341. <https://doi.org/10.1021/jm300613w>
- Weber, C. K., Slupsky, J. R., Kalmes, H. A. and Rapp, U. R. (2001). Active Ras induces heterodimerization of cRaf and BRaf. *Cancer research*, 61(9), 3595–8.
- Weber, C., Slupsky, J., Kalmes, H. and Rapp, U. (2001). Active Ras induces heterodimerization of cRaf and BRaf. *Cancer Research*, 61(9), 3595–3598.
- Weissmann, F. and Peters, J.-M. (2018). Protein Complex Assembly. *Methods in Molecular Biology*, 1764, 329–343. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7759-8_21

- Weissmann, F., Petzold, G., VanderLinden, R., Veld, P. J. H. in 't, Brown, N. G., Lampert, F., Westermann, S., Stark, H., Schulman, B. A. and Peters, J.-M. (2016). biGBac enables rapid gene assembly for the expression of large multisubunit protein complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(19), E2564–E2569. <https://doi.org/10.1073/pnas.1604935113>
- Wellbrock, C., Karasarides, M. and Marais, R. (2004). The RAF proteins take centre stage. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5(11), 875–885. <https://doi.org/10.1038/nrm1498>
- Wells, A. (1999). EGF receptor. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 31(6), 637–643. [https://doi.org/10.1016/s1357-2725\(99\)00015-1](https://doi.org/10.1016/s1357-2725(99)00015-1)
- Widmann, C., Gibson, S., Jarpe, M. B. And Johnson, G. L. (1999). Mitogen-Activated Protein Kinase: Conservation of a Three-Kinase Module From Yeast to Human. *Physiological Reviews*, 79(1), 143–180. <https://doi.org/10.1152/physrev.1999.79.1.143>
- Wimmer, R. and Baccarini, M. (2010). Partner exchange: protein–protein interactions in the Raf pathway. *Trends in Biochemical Sciences*, 35(12), 660–668. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2010.06.001>
- Winkler, D. G., Cutler, R. E., Drugan, J. K., Campbell, S., Morrison, D. K. and Cooper, J. A. (1998). Identification of Residues in the Cysteine-rich Domain of Raf-1 That Control Ras Binding and Raf-1 Activity. *Journal of Biological Chemistry*, 273(34), 21578–21584. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.34.21578>
- Wojnowski, L., Stancato, L. F., Larner, A. C., Rapp, U. R. and Zimmer, A. (2000). Overlapping and specific functions of Braf and Craf-1 proto-oncogenes during mouse embryogenesis. *Mechanisms of Development*, 91(1–2), 97–104. [https://doi.org/10.1016/s0925-4773\(99\)00276-2](https://doi.org/10.1016/s0925-4773(99)00276-2)
- Wortzel, I. and Seger, R. (2011). The ERK Cascade: Distinct Functions within Various Subcellular Organelles. *Genes & Cancer*, 2(3), 195–209. <https://doi.org/10.1177/1947601911407328>
- Wu, X., Yin, J., Simpson, J., Kim, K.-H., Gu, S., Hong, J. H., Bayliss, P., Backx, P. H., Neel, B. G. and Araki, T. (2012). Increased BRAF Heterodimerization Is the Common Pathogenic Mechanism for Noonan Syndrome-Associated RAF1 Mutants. *Molecular and Cellular Biology*, 32(19), 3872–3890. <https://doi.org/10.1128/mcb.00751-12>
- Xu, G., O'Connell, P., Viskochil, D., Cawthon, R., Robertson, M., Culver, M., Dunn, D., Stevens, J., Gesteland, R., White, R. and Weiss, R. (1990). The neurofibromatosis type 1 gene encodes a protein related to GAP. *Cell*, 62(3), 599–608. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90024-9](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90024-9)

- Xu, R. X., Pawelczyk, T., Xia, T. H. and Brown, S. C. (1997). NMR structure of a protein kinase C-gamma phorbol-binding domain and study of protein-lipid micelle interactions. *Biochemistry*, 36(35), 10709–17. <https://doi.org/10.1021/bi970833a>
- Yaeger, R. and Corcoran, R. B. (2019). Targeting Alterations in the RAF–MEK Pathway. *Cancer Discovery*, 9(3), 329–341. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.cd-18-1321>
- Yamaguchi, O., Watanabe, T., Nishida, K., Kashiwase, K., Higuchi, Y., Takeda, T., Hikoso, S., Hirotani, S., Asahi, M., Taniike, M., Nakai, A., Tsujimoto, I., Matsumura, Y., Miyazaki, J., Chien, K. R., Matsuzawa, A., Sadamitsu, C., Ichijo, H., Baccarini, M., ... Otsu, K. (2004). Cardiac-specific disruption of the c-raf-1 gene induces cardiac dysfunction and apoptosis. *Journal of Clinical Investigation*, 114(7), 937–943. <https://doi.org/10.1172/jci20317>
- Yan, J., Roy, S., Apolloni, A., Lane, A. and Hancock, J. F. (1998). Ras Isoforms Vary in Their Ability to Activate Raf-1 and Phosphoinositide 3-Kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 273(37), 24052–24056. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.37.24052>
- Yarden, Y. and Sliwkowski, M. X. (2001). Untangling the ErbB signalling network. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2(2), 127–137. <https://doi.org/10.1038/35052073>
- Yeagle, P. L. (2016). The Membranes of Cells, 401–425. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-800047-2.00015-2>
- Yu, Z., Ye, S., Hu, G., Lv, M., Tu, Z., Zhou, K. and Li, Q. (2015). The RAF-MEK-ERK pathway: targeting ERK to overcome obstacles to effective cancer therapy. *Future Medicinal Chemistry*, 7(3), 269–289. <https://doi.org/10.4155/fmc.14.143>
- Zang, Y., Kahsai, A. W., Pakharukova, N., Huang, L. and Lefkowitz, R. J. (2021). The GPCR– β -arrestin complex allosterically activates C-Raf by binding its amino terminus. *Journal of Biological Chemistry*, 297(6), 101369. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.101369>
- Zhang, B.-H. and Guan, K.-L. (2000). Activation of B-Raf kinase requires phosphorylation of the conserved residues Thr598 and Ser601. *The EMBO Journal*. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.20.5429>
- Zhang, C., Spevak, W., Zhang, Y., Burton, E. A., Ma, Y., Habets, G., Zhang, J., Lin, J., Ewing, T., Matusow, B., Tsang, G., Marimuthu, A., Cho, H., Wu, G., Wang, W., Fong, D., Nguyen, H., Shi, S., Womack, P., ... Bollag, G. (2015). RAF inhibitors that evade paradoxical MAPK pathway activation. *Nature*, 526(7574), 583–586. <https://doi.org/10.1038/nature14982>
- Zhang, X.-F., Settleman, J., Kyriakis, J., Takeuchi-Suzuki, E., Elledge, S. J., Marshall, M. S., Bruder, J. T., Rapp, U. R. and Avruch, J. (1993). Normal and oncogenic p21ras proteins bind to the amino-terminal regulatory domain of c-Raf-1. *Nature*, 364(6435), 308–313. <https://doi.org/10.1038/364308a0>

- Zhang, X.-Y., Guo, H., Huang, Y., Hao, P.-Q., Yang, Y., Liu, Y., Guo, X.-X., Hao, Q., An, S. and Xu, T.-R. (2019). Comparative interactome analysis reveals distinct and overlapping properties of Raf family kinases. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 514(4), 1217–1223. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.05.089>
- Zhao, Z., Zhu, L., Xing, Y. and Zhang, Z. (2021). Praja2 suppresses the growth of gastric cancer by ubiquitylation of KSR1 and inhibiting MEK-ERK signal pathways. *Aging*, 12(3), 3886–3897. <https://doi.org/10.18632/aging.202356>
- Zheng, C. F. and Guan, K. L. (1994). Activation of MEK family kinases requires phosphorylation of two conserved Ser/Thr residues. *The EMBO Journal*, 13(5), 1123–1131. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1994.tb06361.x>
- Zheng, L., Baumann, U. and Reymond, J.-L. (2004). An efficient one-step site-directed and site-saturation mutagenesis protocol. *Nucleic Acids Research*, 32(14), e115–e115. <https://doi.org/10.1093/nar/gnh110>
- Zhou, M, Horita, D., Waugh, D. and molecular ..., B. R. of. (2002). Solution structure and functional analysis of the cysteine-rich C1 domain of kinase suppressor of Ras (KSR).
- Zhou, Ming, Horita, D. A., Waugh, D. S., Byrd, R. A. and Morrison, D. K. (2002). Solution structure and functional analysis of the cysteine-rich C1 domain of kinase suppressor of ras (KSR)11 Edited by P. E. Wright. *Journal of Molecular Biology*, 315(3), 435–446. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.5263>
- Zimmermann, S. and Moelling, K. (1999). Phosphorylation and Regulation of Raf by Akt (Protein Kinase B). *Science*, 286(5445), 1741–1744. <https://doi.org/10.1126/science.286.5445.1741>

Annexe

Lavoie, H., Sahmi, M., Maisonneuve, P., Marullo, S. A., Thevakumaran, N., Jin, T., Kurinov, I., Sichi, F. and Therrien, M. (2018). MEK drives BRAF activation through allosteric control of KSR proteins. *Nature*, 554(7693), 549–553. <https://doi.org/10.1038/nature25478>