



HAL
open science

Régulation d'une nouvelle GAP de Rho, ARHGAP19, dans la division des lymphocytes T humains et rôle dans l'hématopoïèse murine

Claire Marceaux

► **To cite this version:**

Claire Marceaux. Régulation d'une nouvelle GAP de Rho, ARHGAP19, dans la division des lymphocytes T humains et rôle dans l'hématopoïèse murine. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université Paris Saclay (COMUE), 2018. Français. NNT : 2018SACLS046 . tel-01762918

HAL Id: tel-01762918

<https://theses.hal.science/tel-01762918>

Submitted on 10 Apr 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Régulation d'une nouvelle GAP de RhoA, ARHGAP19, dans la division des lymphocytes T humains et rôle dans l'hématopoïèse murine

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay
préparée à l'Université Paris-Sud

École doctorale n°582 – Cancérologie : biologie – médecine – santé
(CBMS)

Spécialité de doctorat: aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Thèse présentée et soutenue à Villejuif, le 27 mars 2018, par

Claire Marceaux

Composition du Jury :

Fanny Jaulin Chargée de recherche, Gustave Roussy (INSERM-U981)	Présidente
Jérôme Delon Chargé de recherche, Institut Cochin (INSERM-U1016)	Rapporteur
Olivier Gavet Maître de conférences, Gustave Roussy (CNRS-UMR8200)	Rapporteur
Sandrine Etienne-Manneville Directrice de recherche, Institut Pasteur (CNRS-UMR3691)	Examinatrice
Mahel Zeghouf Chargée de recherche, ENS (CNRS-UMR8113)	Examinatrice
Jacques Bertoglio Directeur de recherche, Gustave Roussy (INSERM-U1170)	Directeur de thèse

REMERCIEMENTS

Les remerciements, probablement le moment le plus étrange de ces dernières semaines de thèse où on a beaucoup de choses à dire et où aucun mot ne sort. Ecrire ces quelques lignes c'est aussi se dire qu'une page est en train de se tourner et un petit pincement au cœur commence à surgir. La nostalgie vient se mêler à la joie et à la fierté grandissante d'être allée jusqu'au bout. Et si j'y suis arrivée c'est notamment grâce à vous tous, qui avez su être à mes côtés pendant ces années !

Je tiens à remercier tout d'abord très vivement *Jacques Bertoglio*, mon encadrant de master 2 et mon directeur de thèse depuis 3 ans et 6 mois exactement, qui m'a accueillie dans son laboratoire, dirigée et conseillée tout au long de ma thèse et surtout, qui m'a toujours soutenue. Merci également à *Muriel David* qui m'a convaincue que j'étais faite pour la recherche et qui m'a appris les bases de ce métier. Sans tes conseils je ne sais pas si j'aurais poursuivi en thèse. Tu as toujours été là lors de mes gros moments de doute et tu as su m'encourager. Merci pour ta présence et pour nos longues discussions scientifiques toujours très instructives. Enfin un grand merci à ma collègue de paillasse, *Khadidiatou Kouyate*. Merci pour ta bonne humeur et ton extrême gentillesse, merci d'avoir été à mes côtés pour les bons et les mauvais moments, tu vas me manquer !

Je souhaite également remercier l'ensemble des membres du jury :

Madame *Fanny Jaulin* pour en avoir accepté la présidence sans hésitation.

Messieurs *Jérôme Delon* et *Olivier Gavet*, mes rapporteurs pour avoir pris le temps d'évaluer rapidement la rédaction de ce manuscrit et contribué à son amélioration.

Mesdames *Sandrine Etienne-Manneville* et *Mahel Zeghouf* pour avoir accepté d'être mes examinatrices.

Je tiens aussi à remercier le *Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche* ainsi que *La ligue Nationale Contre le Cancer* pour avoir financé respectivement mes 3 premières et ma 4^{ème} année de thèse.

Merci aux anciens membres de *l'ex-U749* et plus particulièrement *Dominique* avec qui j'ai débuté mon travail sur GAP19, *Joël* pour nos grandes discussions existentielles, *Rama* ma copine du début avec qui j'ai partagé de nombreux moments, *Martine*, *Cathy* et *Michel* que j'ai eu le plaisir de rencontrer.

Merci à toute l'équipe 1 U1170. Merci à *Olivier Bernard* qui m'a accueillie dans son équipe et m'a permis de poursuivre mon travail de thèse, merci à *Laurianne S.* qui m'a formée sur les souris, merci à toute l'équipe pour leur gentillesse et bon courage à tous les thésards, you

can do it ! Merci également à *Lauriane C., Khadija et Paule* pour votre présence et les agréables moments qu'on a passés ensemble.

Merci à tous les membres sans exception de l'équipe 3 qui m'ont adoptée dans leur team. Merci à *Thomas, Sébastien et Muriel* pour leur présence, leur soutien et leur aide. Merci aux filles (*Cécile T, Aurélie, Cathy, Cécile L, Zakia, Julie*) pour leur bonne humeur, leur joie, leur présence, leur soutien, leur aide, les soirées et autres délires qui m'ont permis de tenir dans les moments difficiles. Un très grand merci pour mon *Anouchka* chérie qui va tellement me manquer. Garde toujours cette folie attachante et surtout prend confiance en toi !

Merci également à *Aishaa, Céline et Karine* pour avoir géré mes souris GAP19. Merci également aux membres de la plateforme de cytométrie et d'imagerie (*Yann, Philippe, Sophie et Frédéric*) pour leurs aides et conseils.

Merci à tous ceux que j'ai eu la chance de rencontrer, merci à *Imen, Hana* et tous les autres de l'IFSBM. Et surtout un très grand merci à *Bénédicte* qui a toujours été là pour moi ! Merci à tous mes amis (*Amel, Kouloud, Stéphanie, Chloé, Katy et Flo, Elisa et Benjamin...*) qui m'ont toujours soutenue et qui ont su accepter mon manque de temps ^^ . Merci à ma *belle-famille* pour leurs encouragements et leur soutien.

Enfin UN GRAND MERCI A MA *FAMILLE* sans qui tout ça n'aurait pas été possible. Vous avez toujours été là pour moi, pour m'encourager, me soutenir, m'accompagner, m'aider et me consoler. Vous avez toujours cru en moi et votre amour m'a permis d'être qui et où je suis aujourd'hui. Mes 4 neveux d'amour (*Raphaël, Louis, Cyril et Arthur*) ont été mes rayons de soleil pendant toutes ces années. Je vous aime !

Et pour finir, merci à toi *Clément*. Je ne pourrais jamais assez te remercier pour ta présence au quotidien et pour tout ce que tu as fait pour moi. Merci d'avoir accepté mes horaires compliqués et le peu de vacances ensemble. Merci de t'être occupé des repas quand je rentrais tard (c'est-à-dire presque tous les soirs de la semaine). Merci d'être venu avec moi me tenir compagnie au laboratoire un 24 décembre, un jour férié ou même des weekends entiers ! Merci d'avoir toujours cru en moi et de m'avoir écouté même quand tu ne comprenais rien. Et enfin, merci de me suivre à l'autre bout du monde !!!! Je t'aime !

Je vous souhaite à tous une bonne continuation et je vous embrasse. Vous allez me manquer !

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS	1
SOMMAIRE	3
Table des illustrations	7
Liste des abréviations	9
INTRODUCTION.....	11
Partie I – Les RhoGTPases	12
1) Présentation des RhoGTPases	12
a) Description.....	12
b) Structure	13
c) Effecteurs	15
2) Régulation des RhoGTPases	15
a) Régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle	16
b) Régulation post-traductionnelle.....	17
i) Régulation de la localisation.....	17
ii) Régulation de l'activité	19
iii) Régulation quantitative	20
c) Régulation via le cycle GDP/GTP	20
i) GEF	21
1. Leur structure	22
2. Leur régulation.....	23
ii) GAP	23
1. Leur structure	24
2. Leur régulation.....	24
3) Fonctions des RhoGTPases.....	25
a) Fonctions biochimiques	25
i) Les RhoGTPases et le cytosquelette	25
1. Le cytosquelette d'actine	26
2. Le cytosquelette de microtubules.....	30

ii) Les RhoGTPases et l'expression des gènes	31
b) Fonctions biologiques	32
i) Les RhoGTPases et la morphogénèse.....	32
ii) Les RhoGTPases et la migration.....	32
iii) Les RhoGTPases et le cycle cellulaire.....	33
1. Le cycle cellulaire	33
2. Les fonctions des RhoGTPases et leur régulation	36
4) RhoGTPases et cancers	38
a) Régulations directes des RhoGTPases dans les cancers.....	39
b) Régulations indirectes des RhoGTPases dans les cancers	40
Partie II – L'hématopoïèse	41
1) Les cellules souches et les progéniteurs hématopoïétiques	43
2) Les différenciations hématopoïétiques	45
a) La lymphopoïèse	45
i) La lymphopoïèse T.....	45
ii) La lymphopoïèse B	46
b) La mégacaryopoïèse et la thrombopoïèse	48
c) L'érythropoïèse.....	50
3) Les RhoGTPases et leurs régulateurs dans l'hématopoïèse	51
a) Implication dans la régulation des HSCs et progéniteurs	52
b) Implication dans la lymphopoïèse	53
c) Implication dans la mégacaryopoïèse	54
d) Implication dans l'érythropoïèse.....	54
Partie III – Les objectifs de thèse	56
RÉSULTATS.....	57
Partie I – Etude de la régulation d'ARHGAP19 par phosphorylation dans la division des lymphocytes T humains	58
Introduction	59
Results.....	61

ARHGAP19 is phosphorylated by CDK1 in early mitosis	61
ARHGAP19 is also phosphorylated by ROCK and AKT	63
Timing of ARHGAP19 phosphorylations	65
Phosphorylation of residues T404/T476 depends on phospho-S422	67
S422-phosphorylated ARHGAP19 interacts with 14-3-3 proteins	68
Binding of 14-3-3 proteins protects ARHGAP19 from dephosphorylation of the T404 and T476 residues	70
Phosphorylation of ARHGAP19 prevents its translocation to the cell cortex	70
Discussion.....	74
Materials and methods	76
Acknowledgments	78
References.....	79
Partie II – Etude du rôle d'ARHGAP19 dans l'hématopoïèse murine	81
1) Introduction	81
2) Matériels et méthodes	81
a) Les lignées murines.....	81
b) Extraction d'ADN génomique à partir de morceaux de queue et de sang	82
c) PCR de géotypage	83
d) PCR quantitative.....	84
e) Expérimentation animale	84
f) Analyses de la ploïdie des mégacaryocytes.....	85
g) Cultures in vitro.....	85
h) Analyses de la cytométrie et des statistiques.....	85
3) Résultats	86
a) Vérification de l'excision.....	86
b) Analyse phénotypique globale	87
c) Analyse des progéniteurs	92
d) Analyse de la lymphopoïèse	94
e) Analyse de l'érythropoïèse.....	96

f) Analyse de la mégacaryopoïèse	98
4) Conclusion et discussion	98
DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES	100
Introduction	101
Partie I – Régulation d'ARHGAP19 par phosphorylation	101
Partie II – Rôle d'ARHGAP19 dans l'hématopoïèse	105
RÉFÉRENCES	109
ANNEXE	124

Table des illustrations

Figure 1 : L'arbre phylogénétique de la superfamille Ras humaine.....	12
Figure 2 : Les membres de la famille Rho	13
Figure 3 : La structure des RhoGTPases.....	14
Figure 4 : La régulation des RhoGTPases.....	16
Figure 5: Isoprénylation des protéines RhoGTPases, applicable plus spécifiquement à la famille Rho	18
Figure 6 : Le cycle de régulation des RhoGTPases.....	21
Figure 7 : La composition du cytosquelette.....	26
Figure 8 : Les voies de signalisation activées par Rac1 et Cdc42 et impliquées dans la formation des lamellipodes et des filopodes	28
Figure 9 : Les voies de signalisation activées par RhoA et impliquées dans la formation des fibres de stress des cellules adhérentes.....	30
Figure 10 : Les voies de signalisation activées par RhoA, Rac1 et Cdc42 qui contrôlent la formation des microtubules	31
Figure 11 : Les phases du cycle cellulaire	34
Figure 12 : Les différentes phases de la mitose.....	34
Figure 13 : Complexe "centralspindlin"	38
Figure 14 : Les modifications des RhoGTPases impliquées dans les cancers.....	39
Figure 15 : Génération d'une souris transgénique par croisement d'une souris transgénique exprimant l'enzyme Cre et une souris floxée	42
Figure 16 : Modèles de l'hématopoïèse murine	44
Figure 17 : La lymphopoïèse T chez la souris	46
Figure 18 : La lymphopoïèse B chez la souris	48
Figure 19 : Récepteur pré-BCR	48
Figure 20 : La mégacaryopoïèse chez la souris.....	49
Figure 21 : Analyse en cytométrie de flux des cellules érythrocytaires	51
Figure 22 : L'érythropoïèse chez la souris	51
Figure 23: Structure du gène arhgap19 recombiné.....	82
Figure 24: Gel d'agarose de résultats de génotypage des souris et oligonucléotides utilisés pour les PCR	86
Figure 25: Expression du gène arhgap19 dans les souris à analyser	87
Figure 26: Analyse et comparaison de la numération et de la formule sanguine des souris arhgap19 ^{-/-} par rapport aux souris arhgap19 ^{+/+}	88
Figure 27: Nombre absolu de cellules dans la moelle osseuse et dans la rate des souris WT et KO.....	89

Figure 28: Nombre absolu de cellules matures dans la moelle osseuse des souris WT et KO	90
Figure 29: Nombre absolu de lymphocytes matures dans la rate des souris WT et KO en fonction de l'âge	91
Figure 30: Nombre absolu de myélocytes, mégacaryocytes (MKs) et érythrocytes dans la rate des souris WT et KO en fonction de l'âge.....	91
Figure 31 : Analyse représentative de la différenciation des HSCs dans la moelle osseuse obtenue par cytométrie en flux.	92
Figure 32 : Nombre absolu de progéniteurs lignage négatif dans la moelle osseuse des souris WT et KO de 4 à 8 mois.....	93
Figure 33 : Nombre absolu des différents progéniteurs présents dans la moelle osseuse chez des souris WT et KO de 4 mois	93
Figure 34: Analyse représentative de la différenciation des lymphocytes B dans la moelle osseuse obtenue par cytométrie en flux.	95
Figure 35: Analyse représentative de la différenciation des lymphocytes T dans le thymus obtenue par cytométrie en flux.	96
Figure 36: Fréquence des populations lymphocytaires T dans le thymus à 6 mois chez les souris WT et KO	96
Figure 37: Analyse représentative de la différenciation des érythrocytes dans la moelle osseuse, obtenue par cytométrie en flux	97
Figure 38: Nombre absolu d'érythroblastes basophiles dans la moelle des souris WT et KO de 2 à 8 mois.....	97
Figure 39 : Analyse de la ploïdie des mégacaryocytes matures issus des souris WT et KO de 6 mois	98
Figure 40: Expression du gène arhgap11A dans la moelle des souris WT et KO pour arhgap19 obtenue par qPCR.....	106

Liste des abréviations

A

ADN : acide désoxyribonucléique
AGM : aorte-gonade-mésonéphros
AMP : adénosine monophosphate
APC : adenomatous polyposis coli
ARN : acide ribonucléique
ARNm : ARN messenger
ARP 2/3 : Actin Related Protein 2/3
ATP : adenosine triphosphate

B

BCR : B cell receptor
BFU : burst forming unit
BH : bcr homology

C

Cdks : kinases cycline dépendante
CFU : colony forming unit
CLIP 170 : Cytoplasmic Linker Protein 170
CLP : progéniteurs lymphoïdes communs
CMH : complexe majeur
d'histocompatibilité
CMP : progéniteurs myéloïdes communs
CRIB : Cdc42/Rac interactive binding
CRISPR : Clustered Regularly Interspaced
Short Palindromic Repeats

D

DC : cellules dendritiques
DH : Dbl homology
DHR : Dock homology region
DN : double négatif
Dock : Dedicator of cytokinesis
DP : double positif

E

EB : érythroblaste
EB1 : End-Binding protein 1
ECT2 : Epithelial Cell Transforming gene2
EP : progéniteur érythroïde
ES : cellule souche embryonnaire
ERM : ezrine radixine moesine
ETP : progéniteurs T précoces

F

FACS : fluorescence-activated cell sorting
FH : formin-homology
FLP : flippase
FRT : FLP recombination target
FTase : farnésyltransferase

G

GAP : GTPase-Activating Proteins
GDI : guanine-nucleotide-dissociation
inhibitors
GDP : guanosine di-phosphate
GEF : Guanine nucleotide Exchange
Factors
GGTase : géranylgeranyltransférase
GMP : progéniteurs granulo-monocytaire
GST : glutathione-S-transferase
GTP : guanosine tri-phosphate

H

HC : chaîne lourde
HR1 : heptade repeat 1
HSC : cellule souche hématopoïétique

I

Ig : immunoglobuline
ITSN2 : intersectine 2

J

JNK : c-Jun N-terminal MAP kinase

K

KO : Knock-Out

L

LAL-T : leucémies aigües
lymphoblastiques T
LB : lymphocytes B
LC : chaîne légère
LIMK : kinase LIM
Lin : lignage négatif
LK : Lin⁻ Kit⁺
LMPP : progéniteur lymphoïde multipotent
LSK : Lin⁻ Sca-1⁺ Kit⁺
LT : lymphocytes T
LT-HSC : long term HSC

M

MAPs : microtubules associated proteins
mDia : mammalian homolog of Drosophila diaphanous
MEP : progéniteurs érythro-mégacaryocytaires
MgcRacGAP : Male Germ Cell RacGAP
MK : mégacaryocyte
MKB : mégacaryoblaste
MKP : progéniteurs mégacaryocytaires
MLC : Myosin Light Chain
MLCP : Myosin Light Chain Phosphatase
MO : moelle osseuse
MP-GAP : M-phase GAP
MPP : progéniteur multipotent
MRCK : Myotonic dystrophy kinase Related CDC42

N

NK : Natural Killer
NOX : NADPH oxydase

P

PBS : phosphate buffered saline
PGK : phosphoglycérate kinase
PH : pleckstrin homology
PKA : protéine kinase A
PKC ζ : Protein Kinase C atypique ζ
PMkB : promégacaryoblaste
Pre MegE : progéniteurs intermédiaires érythroïdes-mégacaryocytaires
PreB : précurseur lymphocytaire B
ProB : progéniteurs B
PrePro B : progéniteurs lymphocytaires B précoces

R

REM : Rho effector homology

S

S/T : sérine thréonine
SCF : stem cell factor
SLAM : signaling lymphocyte activation molecule
SLC : pseudo-chaîne légère
SP : simple positif
SRF : serum response factor

ST-HSC : short term HSC
SVF : sérum de veau foetal

T

TCR : T cell receptor
TGF- β : transforming growth factor beta

U

USP: ubiquitin-specific protease

W

WASP : Wiskott–Aldrich syndrome protein

INTRODUCTION

Partie I – Les RhoGTPases

1) Présentation des RhoGTPases

a) Description

Les RhoGTPases appartiennent à la superfamille Ras composée de plus de 150 membres identifiés aujourd’hui (Wennerberg, Rossman et al. 2005). Les gènes *Ras* ont été initialement découverts dans les années quatre-vingt comme ayant un rôle oncogénique entraînant de nombreuses recherches pour comprendre leur structure, composition et rôles (Cox and Der 2010). La superfamille Ras humaine est divisée en cinq branches majeures distinctes: Arf, Rab, Ran, Ras et Rho (Figure 1) grâce à leurs homologies de séquence et de fonction (Wennerberg, Rossman et al. 2005, Cox and Der 2010) et est exprimée dans tous les tissus (Chardin 1988).

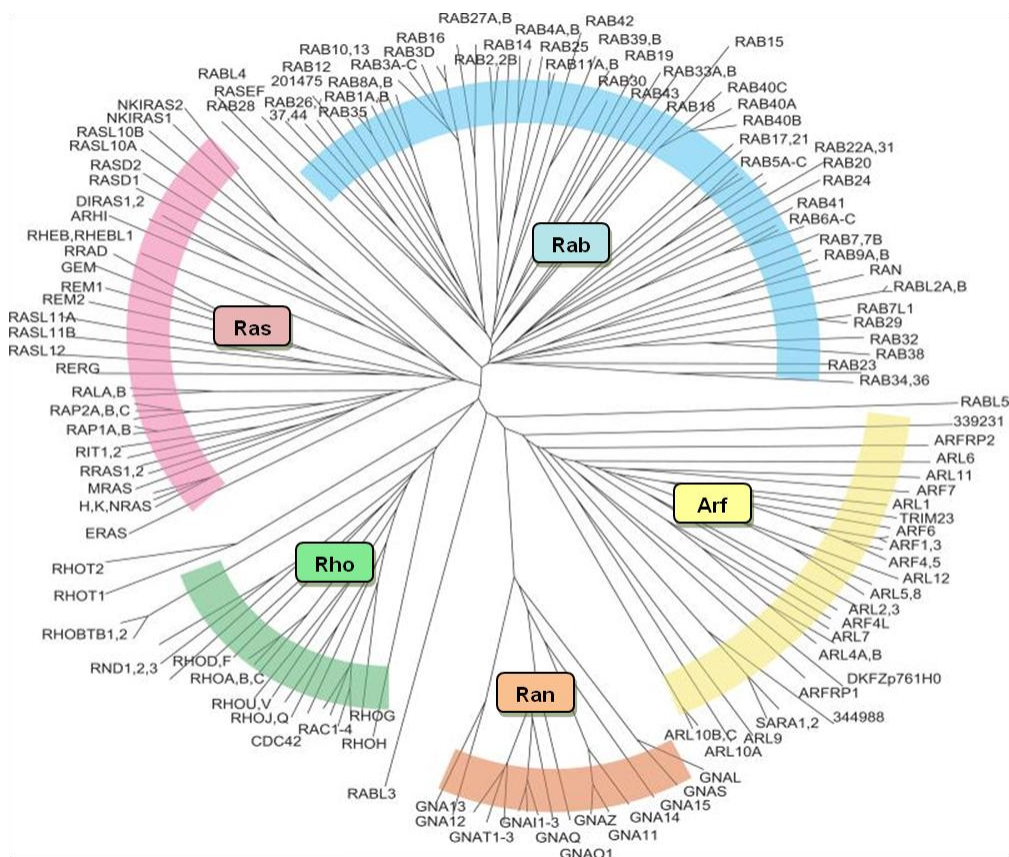


Figure 1 : L'arbre phylogénétique de la superfamille Ras humaine d'après (Colicelli 2004). La superfamille Ras est composée de 5 familles: Rab (en bleu), Arf (en jaune), Ran (en orange), Ras (en rose) et Rho (en vert).

Les premiers gènes de la famille Rho ont été découverts par Madaule et Axel en 1985 chez le mollusque marin *Aplysie*. Le gène initialement mis en évidence a été nommé

Rho pour Ras homologue, car il présente 35% d'homologie avec le gène humain *H-Ras*. En plus de motifs fortement homologues, les gènes *Rho* identifiés ont le même poids moléculaire de 21 kDa que les gènes *Ras* ainsi que des séquences C-terminales nécessaires aux liaisons membranaires suggérant des fonctions communes aux protéines traduites. Cependant, ces deux gènes possèdent des régions propres complètement différentes expliquant leur mode d'action singulier (Madaule and Axel 1985). La famille Rho est aujourd'hui composée de plus de 22 protéines hautement conservées et exprimées dans toutes les espèces eucaryotes (Wennerberg, Rossman et al. 2005, Hall 2012) et peut être divisée en huit sous-groupes (Figure 2) (Boureux, Vignal et al. 2007, Vega and Ridley 2008). À ce jour, les protéines RhoA, Rac1 et Cdc42 (en rouge sur la Figure 2) sont les mieux caractérisées (Wherlock and Mellor 2002).

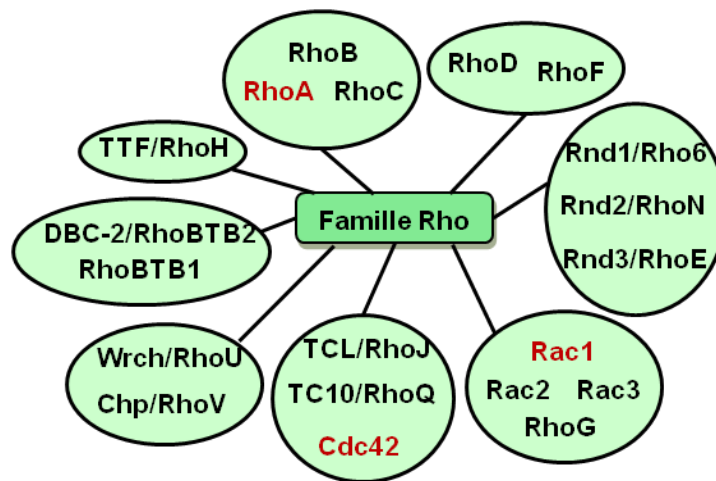


Figure 2 : Les membres de la famille Rho. La famille Rho est composée de 8 sous groupes.

b) Structure

Les RhoGTPases sont de petites protéines G monomériques constituées de trois régions majeures : un domaine G, une région insert et une région hypervariable en C-terminal (Figure 3).

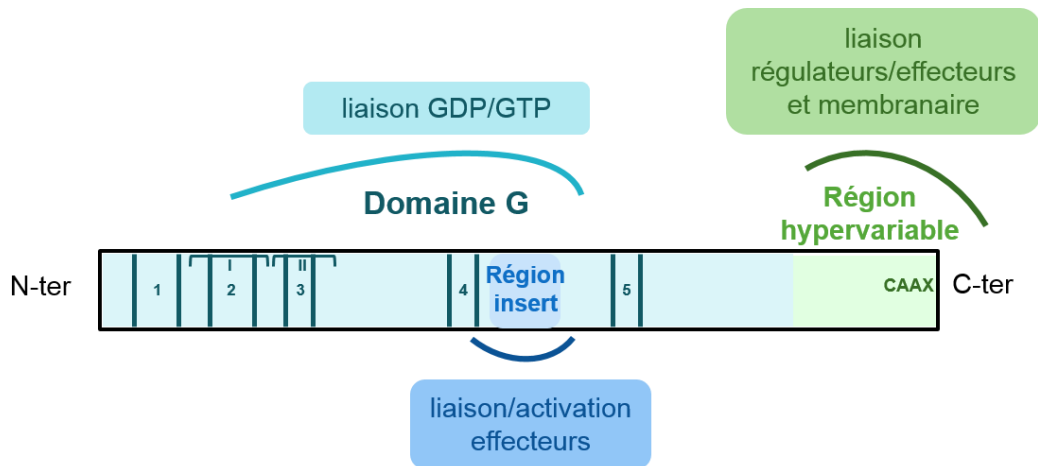


Figure 3 : La structure des RhoGTPases. Les RhoGTPases sont composées de 3 régions : un domaine G leur permettant de lier le GDP ou le GTP, une région insert qui se lie et active les effecteurs et une région hypervariable conduisant aux liaisons avec les régulateurs, certains effecteurs et à la membrane.

Le domaine G situé en N-terminal, commun à la majorité des membres de la superfamille Ras, est composé de cinq domaines à motifs conservés (G1 à G5) (Bourne, Sanders et al. 1991) avec deux régions Switch (I et II) et est structuré par six feuillets β entourés de cinq hélices α et d'une hélice formée par la région insert (Schaefer, Reinhard et al. 2014). Il permet de reconnaître et de fixer le nucléotide guanylique présent sous ses formes di et triphosphate. Les régions Switch permettent de détecter la forme de la molécule fixée (GTP ou GDP) et de changer leur conformation en conséquence. Les protéines de la superfamille Ras cyclent alors entre deux conformations : une conformation active liée au GTP et une conformation inactive liée au GDP (Bourne, Sanders et al. 1991).

La région insert, comprenant treize résidus localisés entre les motifs G4 et G5 du domaine conservé G, est spécifique des membres de la famille Rho. Elle permet la liaison et l'activation de protéines effectrices (Freeman, Abo et al. 1996). Sa composition en acides aminés varie pour les trois protéines Rho majoritairement étudiées (RhoA, Rac1 et Cdc42) afin de garantir une spécificité des effecteurs (Schaefer, Reinhard et al. 2014).

La partie C-terminale présente chez l'ensemble des protéines GTPases, se compose d'une région hypervariable d'environ 10 acides aminés et d'un motif CAAX (Schaefer, Reinhard et al. 2014). La région hypervariable abrite une partie polybasique qui permet la liaison à la couche interne de la membrane plasmique. Elle a également pour fonction de permettre les interactions spécifiques avec des protéines régulatrices ou effectrices. Le motif CAAX (C = cystéine, A = acide aminé aliphatique, X = acide aminé aléatoire (Wennerberg, Rossman et al. 2005) qui termine la séquence des protéines GTPases, leur permet une liaison membranaire grâce à une ancre lipidique fixée à ce motif.

c) Effecteurs

La conformation adoptée par les protéines GTPases actives liées au GTP grâce aux régions Switch, leur permet une liaison à leurs effecteurs. Cette interaction se fait classiquement au niveau de la région hypervariable en C-terminal, de la région insert et des régions Switch, mais également à d'autres endroits du domaine G (Schaefer, Reinhard et al. 2014). Cette grande diversité de zones d'accrochage augmente les possibilités d'interaction. L'identification des effecteurs ou cibles des RhoGTPases n'est pas simple, car ceux-ci ne possèdent pas toujours de domaine conservé reconnaissable. Cependant, grâce à différentes techniques combinées comme la chromatographie d'affinité, la purification protéique, le criblage double hybride, plus de 100 cibles ont été répertoriées pour les membres de la famille Rho. Environ 30 sont des kinases et des adaptateurs protéiques. Rho, Rac et Cdc42 semblent être capables d'interagir avec 20 ou 30 protéines différentes régulant un grand nombre de voies de signalisation distinctes (Hall 2012). Certains effecteurs de Rac ou de Cdc42 contiennent un motif consensus de 18 acides aminés, le domaine CRIB (Cdc42/Rac interactive binding) qui leur permet d'interagir avec ces GTPases. Les effecteurs de RhoA peuvent eux, posséder la région REM (Rho effector homology) qui contient 3 motifs répétés HR1 (heptade repeat 1), leur permettant une interaction (Bishop and Hall 2000).

Une fois liés aux RhoGTPases, les effecteurs vont être activés. Pour cela, le mécanisme commun le plus connu est la perturbation des interactions intramoléculaires auto-inhibitrices présentes chez ces protéines afin d'exposer leurs domaines fonctionnels. Après liaison avec les protéines GTPases, les protéines effectrices sont alors dans une conformation active et peuvent se lier à leur substrat pour cibler une cascade de signalisation et avoir une réponse cellulaire spécifique (Bishop and Hall 2000).

2) Régulation des RhoGTPases

Les RhoGTPases actives interagissent avec une multitude d'effecteurs provoquant un grand nombre de réponses en fonction des stimuli et des types cellulaires. Leur régulation spatiotemporelle est donc primordiale pour assurer leur spécificité. Différentes régulations entrent en jeu : une régulation de leur niveau d'expression génique suivi d'une régulation post-transcriptionnelle par des microARNs, des modifications post-traductionnelles par des enzymes (Figure 4), et une régulation cyclique (Figure 6).

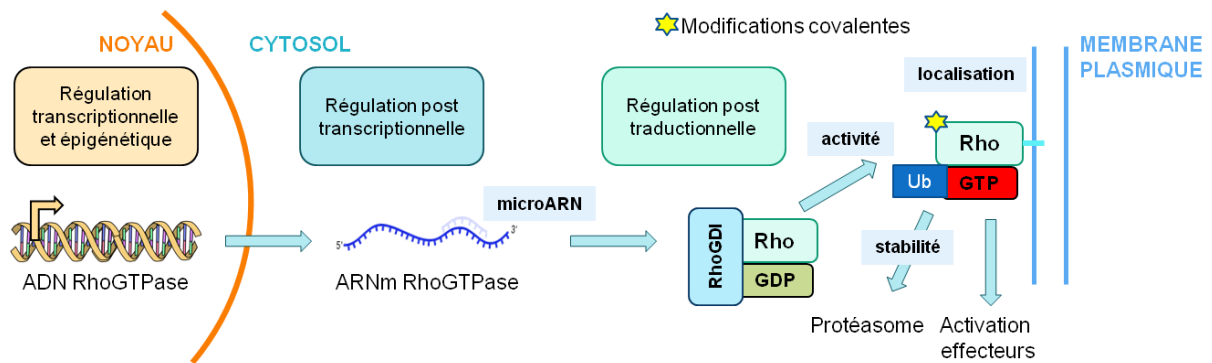


Figure 4 : La régulation des RhoGTPases. Les RhoGTPases subissent des modifications transcriptionnelles et épigénétiques dans le noyau et des modifications post-transcriptionnelles et post-traductionnelles dans le cytoplasme des cellules.

a) Régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle

Depuis le début des études réalisées sur la superfamille Ras, il est prouvé que ces gènes subissent une régulation complexe étant donné leur profil spécifique d'expression dans différents organes (Chardin 1988). L'expression des RhoGTPases apparaît comme étant régulée de manière tissu dépendant et en fonction de l'âge des individus. En effet, certains gènes comme *RhoB* ou *Rac2* sont exclusivement exprimés dans le système hématopoïétique ou encore *Rab3* qui est majoritairement détecté dans le système nerveux (Chardin 1988, Reibel, Dorseuil et al. 1991, Yoon, Choo et al. 2007). Nous pouvons classer en trois catégories les facteurs à l'origine des mécanismes transcriptionnels qui contrôlent l'expression physiologique des gènes RhoGTPases : les facteurs épigénétiques, intracellulaires et environnementaux. Les facteurs épigénétiques auxquels sont sujets les RhoGTPases peuvent être des modifications d'histones comme pour *RhoB* chez la souris avec une désacétylation des histones (Yoon, Choo et al. 2007). Les facteurs intracellulaires correspondent à des stimuli de la cellule comme des facteurs de croissance, de prolifération ou d'activation. L'expression de *RhoB* nécessite la liaison au niveau de son promoteur de Smad3 activé via le facteur de croissance TGF- β (Croft and Olson 2011). *Rac2* va être lui exprimé suite à l'activation des lymphocytes T (Yu, Leitenberg et al. 2001). Enfin, il existe des facteurs environnementaux qui régulent la transcription des gènes RhoGTPases comme la lumière UV qui stimule *RhoB* ou comme un stress génotoxique qui active le facteur de transcription p53 ciblant les gènes *RhoC* et *RhoE* (Croft and Olson 2011).

L'expression des gènes peut également être contrôlée post-transcriptionnellement par des microARNs. Les microARNs sont de petites molécules d'ARN non codants d'environ 22 nucléotides dont plus de 1500 ont été identifiés dans les cellules humaines. Les microARNs viennent diminuer l'expression des gènes cibles suivant deux mécanismes dépendants de cette cible : un clivage de l'ARNm ou une répression de la traduction en

protéine (Liu, Bi et al. 2012). Lorsque le microARN est fortement complémentaire à l'ARNm cible dans sa région codante ou non codante (régions UTR), il s'hybride à lui et entraîne son clivage provoquant sa dégradation. Si la complémentarité entre le microARN et l'ARNm cible n'est pas suffisante pour permettre un clivage, l'interaction généralement en 3' UTR (région non codante située après le codon stop) entraîne tout de même un arrêt de la synthèse protéique par inhibition de la traduction (Bartel 2004). En revanche, le ou les mécanismes de répression de la traduction mis en jeu sont encore discutés. Certains microARNs peuvent réguler négativement les fonctions cellulaires des RhoGTPases comme miR-137 en ciblant l'ARNm codant pour Cdc42 ou encore miR-185 qui touche les ARNm codant pour RhoA et Cdc42 (Liu, Bi et al. 2012).

b) Régulation post-traductionnelle

Les RhoGTPases sont principalement localisées dans le cytoplasme où elles vont subir de nombreuses modifications post-traductionnelles indispensables à leur activation de façon spatiotemporelle. En effet, ces protéines vont être sujettes à des modifications lipidiques cruciales pour leur localisation subcellulaire, à des modifications covalentes qui vont réguler leur activité GTPasique et à une ubiquitinylation qui va avoir un impact important sur leur stabilité.

i) Régulation de la localisation

Parmi les différentes modifications post-traductionnelles, la principale est l'isoprénylation C-terminale des protéines Rho. L'isoprénylation des protéines de la superfamille Ras a été démontrée dans les années 90 par Hancock et ses collègues qui décrivaient que les protéines Ras subissaient une farnésylation permettant une association avec les lipides membranaires. Puis il a été étudié qu'à l'exception des protéines de la famille Ran, les protéines de la superfamille Ras subissaient des modifications lipidiques pendant leur maturation post-traductionnelle incluant une myristoylation N-ter des protéines Arf et une isoprénylation de Rho, Rab et Ras. De plus, beaucoup peuvent également être palmitoylées (Boulter and Garcia-Mata 2012).

D'un point de vue mécanistique, l'isoprénylation (Figure 5) a lieu lorsque le motif CAAX en C-ter est détecté sur une protéine nouvellement synthétisée. C'est un procédé irréversible qui consiste en l'ajout d'un groupement prényl, couplé à un clivage C-terminal et une méthylation des RhoGTPases. Lorsque la protéine est synthétisée, un groupement lipidique (un farnésyl ou un géranylgeranyl) est ajouté au niveau de la Cystéine du motif CAAX par les enzymes prényltransférases (farnésyltransferase FTase ou

géranylgeranyltransférase GGTase I). La nature du lipide greffé dépend de la nature du dernier résidu du motif CAAX (si Leu, Phe, Ile ou Val = géranylgeranylation, si Gln, Cys, Ser, Thr ou Ala = farnésylation, Met = les 2). L'addition de ce lipide favorise la translocation de la protéine à la surface du réticulum endoplasmique où les trois autres résidus du motif (-AAX) sont clivés par la protéase Rce1, laissant le résidu Cystéine libre. Ce résidu est alors méthylé par l'enzyme Icmt constituant la dernière étape requise pour produire une protéine Rho complètement fonctionnelle. Cette protéine mature va être transloquée à la face interne de la membrane plasmique où elle pourra interagir avec ses effecteurs. Une protéine RhoGDI peut venir s'associer à cette RhoGTPase entraînant son inactivation et son extraction de la membrane. La RhoGTPase complexée à la RhoGDI se retrouvera alors dans le cytosol dans une conformation inactive (Konstantinopoulos, Karamouzis et al. 2007, Hodge and Ridley 2016).

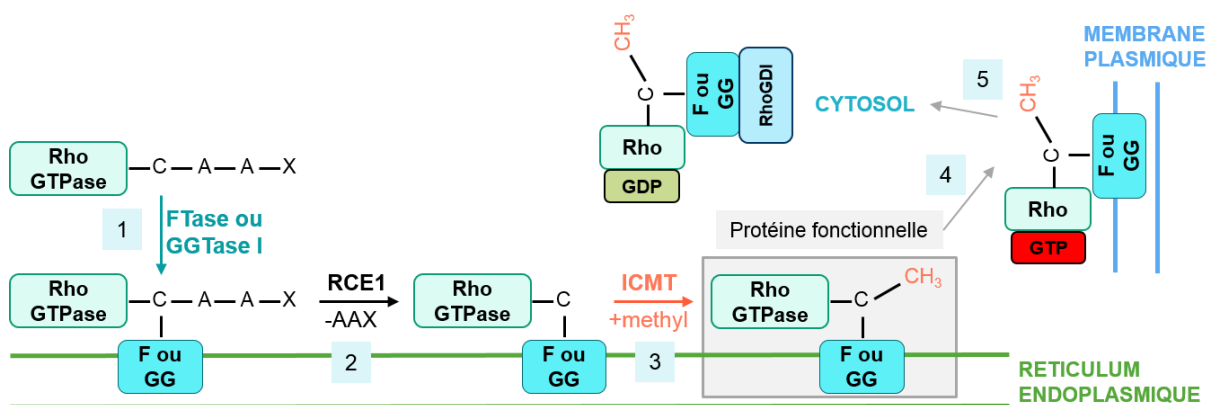


Figure 5: Isoprénylation des protéines RhoGTPases, applicable plus spécifiquement à la famille Rho, d'après (Hodge and Ridley 2016). L'isoprénylation qui permet la maturation des protéines Rho nouvellement synthétisées, consiste en 3 étapes : 1- ajout d'un lipide par les enzymes Ftase ou GGTase I qui entraîne une relocalisation de la protéine à la membrane du RE ; 2- suppression du groupement tripeptide AAX par l'enzyme RCE1, 3- ajout d'un groupement méthyl à la Cystéine libre par l'enzyme ICMT. 4- la protéine est alors fonctionnelle et va se localiser à la membrane plasmique dans un état actif lié au GTP. Cette étape peut être différente pour les autres familles de la superfamille Ras (les membres de la famille Ras subissent ensuite une palmitoylation). 5- Les protéines GDIs peuvent venir capter les RhoGTPases et les séquestrer dans une conformation inactive dans le cytoplasme.

L'isoprénylation, nécessaire à l'association des protéines de la famille Ras avec les lipides membranaires, n'est pas suffisante pour recruter ces protéines aux membranes. En effet, une particularité additionnelle est nécessaire : une séquence polybasique et/ou une modification par palmitoylation. Le recrutement membranaire se fait en deux étapes : premièrement, insertion du lipide dans la membrane et deuxièmement, interaction électrostatique avec les phospholipides à la surface membranaire chargés négativement et la région polybasique chargée positivement, qui stabilise l'interaction. Les modifications des propriétés électrostatiques de la queue à côté de la région polybasique peuvent altérer le recrutement membranaire. Également, les modifications de la composition lipidique des

membranes peuvent aussi modifier le recrutement des protéines prénylées et contribuer à restreindre la localisation protéique à des domaines spécifiques de la membrane ou déclencher l'association ou dissociation avec les protéines prénylées. Cette localisation spécifique a un impact sur les interactions avec les effecteurs et autres régulateurs. En plus de la prénylation, beaucoup de protéines Rho subissent une palmitoylation réversible (greffe covalente d'acide gras) qui active une interaction dynamique avec les membranes et les effecteurs. ([Hodge and Ridley 2016](#))

Donc la localisation membranaire constitue un élément clé dans la régulation de la signalisation des protéines Rho et semble également déterminer leur conformation (active ou non). En effet, il a été montré que les protéines Rho comme RhoA, Rac1 et Cdc42 cyclent simultanément entre la membrane plasmique et le cytosol et une conformation active (liée au GTP) ou inactive (liée au GDP). Les protéines Rho actives seraient localisées à la membrane plasmique alors que celles inactives se trouveraient dans le cytosol. ([Vega and Ridley 2008](#), [Boulter and Garcia-Mata 2012](#), [Hodge and Ridley 2016](#)).

ii) Régulation de l'activité

Différentes modifications post-traductionnelles régulent négativement ou positivement l'activité des RhoGTPases.

Il existe des modifications inhibitrices comme la glucosylation, l'AMPylation ou l'ADP-ribosylation causées par des toxines bactériennes ou des facteurs de virulence qui créent des liaisons covalentes entre des molécules volumineuses et des résidus des régions Switch, essentiels aux fonctions des RhoGTPases ([Boquet and Lemichez 2003](#)). En effet, la glucosylation (ajout d'un glucose) et l'AMPylation (ajout d'une molécule AMP par une liaison phosphodiester) du domaine Switch I des protéines RhoGTPases bloquent leur capacité d'interaction et d'activation des protéines effectrices. L'ADP-ribosylation (ajout d'ADP-ribose) et la phosphorylation (phénomène non induit par des facteurs de virulence) des protéines RhoGTPases peuvent déclencher une association étroite avec les protéines GDIs (guanine-nucleotide-dissociation inhibitors) suivie de la libération du complexe séquestré dans le cytosol ([Visvikis, Maddugoda et al. 2010](#), [Liu, Bi et al. 2012](#)). Les protéines GDIs interagissent avec les GTPases en deux étapes : premièrement, le domaine N-terminal des protéines GDIs se lie aux domaines Switch des RhoGTPases ce qui inhibe la transition vers une forme active, puis la protéine RhoGTPase prénylée est déplacée de la membrane vers la poche hydrophobe dans le domaine C-terminal des GDIs entraînant une dissociation membranaire ([Hodge and Ridley 2016](#)).

Certaines modifications sont quant à elles activatrices. En effet, il existe différents types de transglutamination au niveau de la région Switch II des RhoGTPases qui abolissent leur activité GTPase intrinsèque conduisant à leur activation permanente. En revanche ce phénomène est souvent suivi d'une ubiquitinylation (voir iii) ([Visvikis, Maddugoda et al. 2010](#)).

iii) Régulation quantitative

Les RhoGTPases sont régulées quantitativement, comme un grand nombre de protéines, par ubiquitinylation. C'est un procédé en 3 étapes qui implique l'addition covalente de polypeptides ubiquitines de 76 acides aminés à un résidu Lysine dans la protéine cible. Il débute par l'intermédiaire de l'enzyme E1 (ou ubiquitin-activating) qui contrôle le transfert dépendant d'ATP de l'ubiquitine à l'enzyme E2 (ou ubiquitin-conjugating). E2 avec l'enzyme E3 (ou ubiquitin-ligase) attache de manière covalente l'ubiquitine à la cible. Lorsqu'une ubiquitine est associée, elle peut servir de cible pour une poly-ubiquitinylation. Cette association est réversible et peut être supprimée par des protéases spécifiques USPs. Une chaîne d'au moins 4 monomères ubiquitines liés de façon covalente par leur résidu Lys48, marque les protéines cibles pour une dégradation par le protéasome 26S ce qui permet de réguler le niveau d'expression des protéines. La mono- ou la poly-ubiquitinylation a également d'autres effets. Généralement, une mono-ubiquitinylation conduit à une internalisation des protéines à partir de la membrane cellulaire périphérique alors que la poly-ubiquitinylation sert de premier signal pour une dégradation protéasomale qui, avec la voie de signalisation lysosomale, conduit au renouvellement protéique. ([Liu, Bi et al. 2012](#), [Hodge and Ridley 2016](#)) ([Nethe and Hordijk 2010](#))

Les protéines RhoGDI, en se liant aux RhoGTPases, les stabilisent et les protègent de la dégradation via ubiquitinylation ([Boulter, Garcia-Mata et al. 2010](#)).

c) Régulation via le cycle GDP/GTP

Les GTPases sont de petites protéines G qui fonctionnent comme des interrupteurs moléculaires de la transmission des signaux intracellulaires contrôlant ainsi un grand nombre de processus biologiques. Elles cyclent entre un état inactif lié au GDP, généralement cytosolique, et un état actif lié au GTP, souvent associé aux membranes où se trouvent les effecteurs cibles. Une forte concentration de Mg^{2+} dans le cytosol, empêche l'échange spontané du nucléotide guanylique diphosphate en triphosphate. C'est pourquoi la conversion d'une forme inactive en forme active nécessite l'intervention de facteurs d'échange GEFs (Guanine nucleotide Exchange Factors) qui catalysent l'échange du GDP

en GTP. De plus, l'hydrolyse du GTP pour inactiver les RhoGTPases étant très lente, des protéines GAPs (GTPase-Activating Proteins) interviennent pour accélérer cette hydrolyse et inactiver les GTPases cibles (Bourne, Sanders et al. 1991, DerMardirossian and Bokoch 2005). Les protéines GEFs et GAPs subissent elles aussi des modifications post-traductionnelles qui sont cruciales pour la régulation des RhoGTPases, c'est pourquoi un chapitre à part leur est consacré (Figure 6). Des listes de RhoGAP-GEF-GDI peuvent être trouvées dans plusieurs revues : (Moon and Zheng 2003, Bos, Rehmann et al. 2007, Hodge and Ridley 2016).

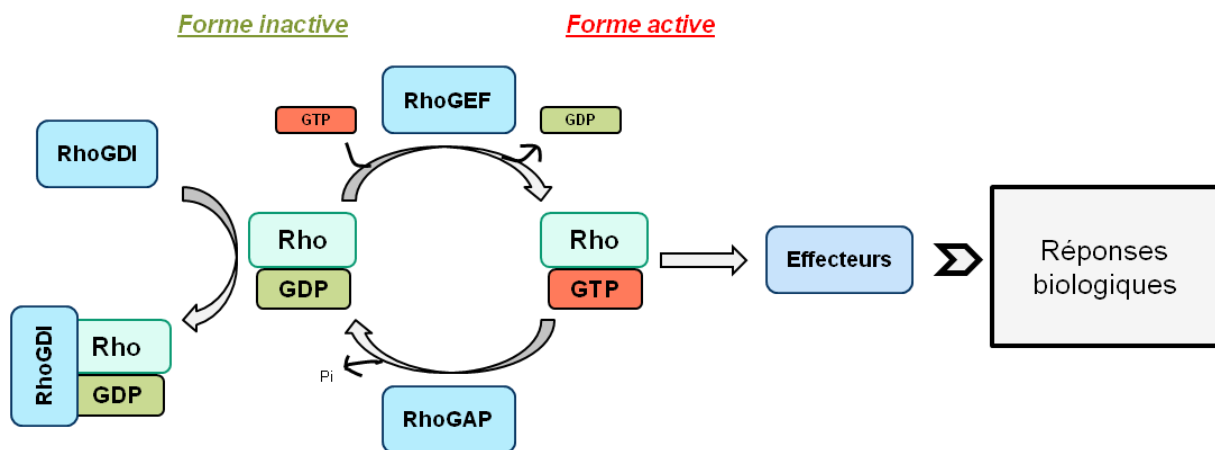


Figure 6 : Le cycle de régulation des RhoGTPases. La régulation du cycle GDP/GTP est assurée par les protéines GEFs qui échangent le GDP en GTP activant les RhoGTPases, les protéines GAPs qui accélèrent l'hydrolyse du GTP en GDP inactivant les RhoGTPases et les protéines GDIs qui séquestrent les RhoGTPases dans le cytoplasme. Les RhoGTPases actives, liées au GTP vont pouvoir activer leurs effecteurs et induire une réponse biologique spécifique.

i) GEF

Le premier gène *RhoGEF* mis en évidence chez les mammifères a été préalablement identifié comme étant un gène transformant dans les cellules de lymphomes B nommé Dbl (diffuse B-cell lymphoma) (Eva and Aaronson 1985). Puis Dbl a été découvert comme fonctionnant telle une protéine GEF en catalysant la dissociation du GDP de la RhoGTPase Cdc42 humaine (Hart, Eva et al. 1991). Les analyses du génome humain réalisées par la suite ont permis d'identifier 71 RhoGEFs ayant un domaine d'homologie avec une région centrale de la protéine Dbl nommée DH (Dbl homology). Ensuite, la caractérisation de la protéine Dock (Dedicator of cytokinesis) et de ses orthologues a permis l'identification d'une deuxième famille de GEFs composée de 11 membres dans le génome humain, classifiée en 4 sous-groupes caractérisés par la présence de deux domaines conservés DHR-1 et DHR-2 (Dock homology region 1 or 2). Les GEFs de la famille Dock sont souvent référencées comme des GEFs atypiques, car elles ne possèdent pas de domaine Dbl et activent seulement les membres des familles Rac et Cdc42.

Il y a environ quatre fois plus de RhoGEFs que de RhoGTPases. Cela signifie qu'une seule GTPase peut être activée par une multitude de GEFs selon le type cellulaire et/ou la nature des stimuli engendrés.

1. Leur structure

La famille Dbl est caractérisée par la présence d'un domaine catalytique DH suivi d'un domaine PH (pleckstrin homology) en C-terminal du domaine DH. Le domaine DH est responsable de l'accélération de l'échange du GDP en GTP des RhoGTPases alors que le domaine PH est impliqué dans la localisation intracellulaire du domaine DH.

Le domaine DH est sous forme d'hélice et possède trois régions conservées CR1-CR3 qui interagissent avec les régions Switch des RhoGTPases. Des substitutions dans ces régions affectent alors l'activité GEF ([Aghazadeh, Zhu et al. 1998](#)). Switch I interagit avec CR1 et CR3 grâce à un glutamate hautement conservé dans CR1 qui est crucial pour la formation du complexe et pour l'activité GEF. Switch II est majoritairement en contact avec CR3 et des portions de l'hélice C-terminale du domaine DH. Des résidus hydrophobiques conservés dans la région Switch II permettent l'accrochage à la surface de ce domaine. De plus, deux résidus dans ce domaine permettent également d'importantes interactions avec la région Switch II pour contribuer à l'échange potentiel. Le domaine DH provoque ainsi un remodelage des régions Switch pour modifier la poche de liaison au nucléotide guanylique sans perturber le reste de la GTPase ciblée. ([Hakoshima, Shimizu et al. 2003](#))

Le domaine PH est toujours retrouvé en C-terminal des régions DH et semble coopérer pour faciliter l'activation des RhoGTPases. En effet, il interagit avec les phosphoinositides de la bicouche lipidique membranaire ce qui oriente le domaine DH associé pouvant alors correctement attirer les RhoGTPases déjà fixées aux lipides membranaires via leur prénylation. Cette interaction peut également favoriser des conformations entre les domaines PH et DH qui améliorent l'activité GEF. Enfin, les domaines PH et DH associés fonctionnent comme des sites de liaison pour les protéines impliquées dans les cascades de signalisation régulées par les RhoGTPases. À l'extérieur du domaine DH-PH, les protéines de la famille Dbl contiennent d'autres domaines protéiques différents d'une famille à une autre, ce qui explique les fonctions cellulaires uniques des différents membres de la famille.

Les GEFs de la famille Dock découvertes plus tardivement ([Cote 2002](#)) sont structurellement et mécaniquement différentes de la famille Dbl. Elles sont caractérisées par la présence d'un domaine catalytique DHR2 et d'un domaine de liaison phospholipidique

DHR1 qui peut permettre la localisation membranaire. (Meller, Merlot et al. 2005, Cote and Vuori 2006)

2. Leur régulation

Beaucoup de RhoGEFs semblent exister dans une conformation inactive ou semi-active avant stimulation. Leur état de conformation basale peut être maintenu par quatre modes de régulation mettant en jeu des interactions intra et intermoléculaires. Cette régulation peut se faire par une interaction intramoléculaire entre les domaines PH et DH directement ou avec un domaine régulateur de la protéine comme intermédiaire, ce qui empêche les interactions membranaires ou avec les GTPases. Deux domaines DH peuvent également interagir entre eux entraînant une oligomérisation qui semble perturber la fonction GEF. Enfin, les interactions avec d'autres protéines peuvent avoir un rôle inhibiteur pour la fonction GEF. (Zheng 2001)

En réponse à des signaux extracellulaires, de nombreuses GEFs deviennent phosphorylées par des protéines kinases contribuant à leur activation. Elles peuvent également être constitutivement activées par une coupure N-terminale des séquences en amont du domaine DH. La région N-terminale agit donc comme un régulateur négatif intramoléculaire de la fonction du domaine DH. La régulation de la localisation subcellulaire des protéines Dbl est un moyen commun pour dicter l'activation spatio-temporelle des RhoGTPases en réponse à des stimuli distincts. (Schmidt and Hall 2002, Rossman, Der et al. 2005)

Les réactions d'échanges débutent lorsque les protéines GEFs reconnaissent les protéines Rho liées au GDP, se poursuivent par une stimulation de la dissociation du GDP et se terminent par la formation d'un complexe GEF-Rho dans lequel la petite protéine G existe dans un état sans nucléotide. Cet état intermédiaire s'achève par la liaison du GTP à la protéine Rho. (Zheng 2001)

ii) GAP

En 1987, Trahey et McCormick ont mis en évidence une protéine capable d'induire l'hydrolyse du GTP de la protéine G p21Ras (Trahey and McCormick 1987). C'est la première protéine à avoir été identifiée comme étant une GAP. Ensuite, la première GAP de Rho, p50RhoGAP a été découverte par Garrett et al en 1989 (Garrett, Self et al. 1989). Les analyses réalisées par la suite ont révélé la présence d'une région d'environ 170 acides aminés, responsable de l'activité GAP de cette protéine, nommée le domaine RhoGAP (ou domaine BH pour bcr homology). Depuis, de nombreuses protéines contenant un domaine

similaire ont été trouvées, faisant d'elles de potentiels candidats comme GAP des RhoGTPases. En effet, 67 protéines ayant un domaine BH sont des GAP de Rho (Hall 2012). Le nombre très élevé de RhoGAPs indique que chacune d'entre elles joue un rôle spécifique et que l'activité GAP doit être finement régulée spatialement et temporellement.

1. Leur structure

La famille des RhoGAPs est définie par la présence d'un domaine RhoGAP conservé avec au moins 20% d'homologie et composé de neuf hélices α et d'un résidu arginine hautement conservé présent dans une structure en boucle (Gamblin and Smerdon 1998). Ce domaine interagit avec les régions Switch des GTPases constituant le cœur de la liaison avec le GTP grâce à une rotation de 20° entre la GTPase et la GAP qui permet au résidu arginine (ou doigt arginine) d'entrer dans le site actif de la GTPase et de participer à la stabilisation de l'état de transition actif inactif. En effet, le doigt arginine stabilise les charges partielles négatives qui se développent à l'état de transition des GTPases (Rittinger, Walker et al. 1997). Ce domaine GAP est suffisant pour la liaison aux protéines G actives et pour l'accélération de l'hydrolyse du GTP en GDP (Moon and Zheng 2003).

En dehors du domaine GAP, les membres de la famille RhoGAP contiennent d'autres motifs fonctionnels incluant des domaines catalytiques comme des domaines à activité kinases (par exemple le domaine S/T kinase de la protéine GAP Bcr) ou GEF (par exemple les domaines DH-PH des protéines GAP Bcr et Abr) ou GAP (par exemple le domaine ArfGAP de la protéine GAP ARAP1) ainsi que des régions adaptatrices pour des interactions protéiques ou lipidiques. Les RhoGAPs peuvent donc catalyser d'autres réactions enzymatiques que l'hydrolyse du GTP des GTPases et parfois faciliter les voies de signalisation activées par les protéines Rho (Moon and Zheng 2003).

2. Leur régulation

Le nombre incroyablement élevé de RhoGAPs suggère fortement une régulation rigoureuse de leurs activités au niveau de sites spécifiques dans la cellule. Comme les GEFs, l'activité des GAP est finement régulée par une grande variété de mécanismes, y compris par des liaisons lipidiques, des interactions protéiques, des phosphorylations et des dégradations protéolytiques. (Ahmed, Lee et al. 1993, Roof, Haskell et al. 1998, Jenna, Hussain et al. 2002, Su, Agati et al. 2003, Tcherkezian, Danek et al. 2005).

3) Fonctions des RhoGTPases

C'est dans un état lié au GTP que les RhoGTPases activent des voies de signalisation spécifiques. Dans cette conformation spécifique, elles vont interagir avec leurs protéines cibles pour initier les voies de signalisation qui conduisent à une grande diversité de fonctions biochimiques et biologiques.

a) Fonctions biochimiques

Les premières fonctions des protéines de la famille Rho ont été mises en évidence en 1991 comme régulatrices du complexe enzymatique phagocytaire NOX (Abo, Pick et al. 1991) et en 1992 comme régulatrices de l'assemblage et de l'organisation des filaments d'actine en réponse à des signaux extracellulaires (Ridley and Hall 1992, Ridley, Paterson et al. 1992).

i) Les RhoGTPases et le cytosquelette

Le cytosquelette forme le squelette de la cellule eucaryote responsable de l'organisation spatiale de celle-ci. Il s'adapte aux différents changements morphologiques de la cellule et lui permet d'effectuer des mouvements coordonnés (Alfaro-Aco and Petry 2015). Il est composé d'un réseau complexe de filaments protéiques s'étendant dans tout le cytoplasme et classés en trois types : les microfilaments d'actine (7 à 9 nm de diamètre), les microtubules (25 nm de diamètre) et les filaments intermédiaires (10 nm de diamètre) (Figure 7). L'actine est présente dans la cellule sous deux formes : une forme monomérique globulaire ou actine G et une forme polymérique ou actine F (filamenteuse). Il y a un équilibre dynamique entre ces deux formes et la polymérisation de l'actine G en microfilaments d'actine F est régulée par des protéines associées à l'actine, en réponse à différents stimuli. Le réseau d'actine est situé à la fois sous la membrane plasmique où il forme un maillage bidimensionnel lié à la membrane, et dans la cellule où il constitue un réseau tridimensionnel. Les microtubules sont des tubes creux composés de 13 protofilaments de tubulines. Ils se dépolymérisent et se repolymérisent continuellement, constituant un réseau dynamique polarisé du centrosome à la périphérie de la cellule. Les filaments intermédiaires sont des fibres réparties dans la cellule selon une distribution similaire à celle des microtubules, c'est-à-dire concentrées autour du noyau et irradiant vers la périphérie de la cellule. Ces filaments ne présentent pas de polarité, n'ont donc pas de rôle dans le transport directionnel. Ils interviennent surtout dans le maintien de la morphologie cellulaire, dans la résistance aux stress mécaniques et dans le maintien d'une

cohésion entre les cellules via l'ancrage aux desmosomes et plaques d'adhérence. (Wickstead and Gull 2011)

Le cytosquelette intervient donc dans de nombreux processus dynamiques comme la migration, la phagocytose, l'endocytose, la morphogénèse, la mitose et la cytokinèse. Les premières études faites dans les années 90 sur les fibroblastes prouvent l'implication des RhoGTPases dans la régulation du cytosquelette. (Hall 2012)

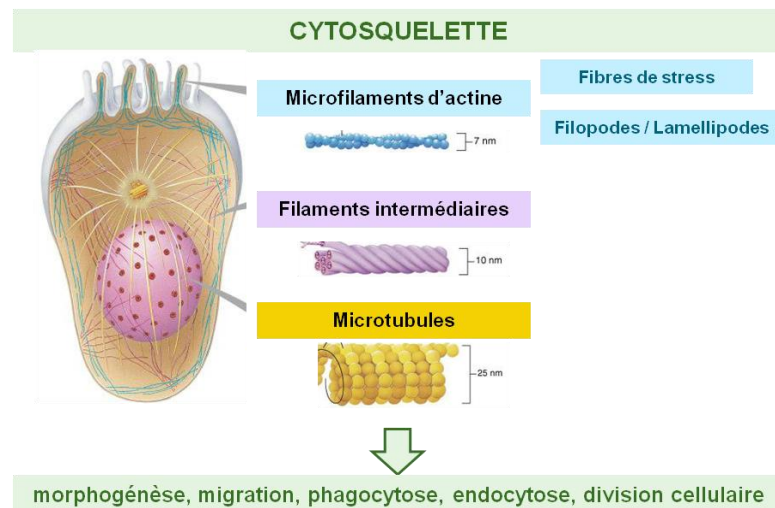


Figure 7 : La composition du cytosquelette. Le cytosquelette est constitué de filaments d'actine, eux-mêmes formant les fibres de stress et filopodes ou lamellipodes, les filaments intermédiaires et les microtubules en fonction du diamètre des fibres et de leur emplacement dans la cellule. Ce cytosquelette intervient dans de nombreuses fonctions cellulaires.

1. Le cytosquelette d'actine

Les analyses révèlent que RhoA, Rac1 et Cdc42 contrôlent la polymérisation de l'actine dans des compartiments cellulaires différents formant différentes fibres : des filopodes et des lamellipodes à l'avant des cellules en migration et des fibres de stress dans le corps cellulaire (Hall 2012, Letort, Ennomani et al. 2015) (Figure 7). Rac1 régule la formation de lamellipodes qui sont des extensions cytoplasmiques aplaties et larges formées de filaments d'actine entrecroisés en réseau (Ridley and Hall 1992) par notamment l'activation des protéines PAK, WAVE et PI-4-P5K (Figure 8). Cdc42 est lui responsable de la formation de filopodes ou faisceaux parallèles serrés fins et cylindriques d'actine fibrillaire (Nobes and Hall 1995) via l'activation entre autres des protéines PAK, WASP et MRCK (Figure 8). Enfin, RhoA contrôle la formation des fibres de stress (ou de tension) d'actine (Ridley and Hall 1992) des cellules adhérentes, qui sont des paquets de filaments d'actine associés avec la myosine de type II qui traversent la cellule et sont liés à la matrice extracellulaire par des intégrines et des complexes d'adhésion focale. RhoA favorise la polymérisation de l'actine en filaments linéaires via une interaction directe avec l'effecteur

mDia (Watanabe, Madaule et al. 1997). De plus, la liaison et l'activité de la myosine de type II sont régulées par la phosphorylation de la chaîne légère de myosine ou MLC (Myosin Light Chain) par la kinase ROCK, un effecteur de Rho (Kimura, Ito et al. 1996, Watanabe, Madaule et al. 1997). Donc, l'activation des deux effecteurs ROCK et mDia par RhoA actif est requise pour la formation des fibres de stress. (Figure 9)

L'activation de la protéine sérine/thréonine kinase PAK par liaison aux RhoGTPases Cdc42 et Rac1 actives, favorise le développement des filopodes et lamellipodes grâce à son domaine N-terminal riche en prolines (Sells, Knaus et al. 1997). PAK activée va s'associer et phosphoryler la protéine kinase LIM (LIMK), sérine/thréonine kinase impliquée dans la régulation de la dynamique des filaments d'actine. LIMK phosphorylée est activée ce qui augmente la phosphorylation de la protéine Cofiline. Cofiline est une protéine de liaison et de dépolymérisation de l'actine qui régule le renouvellement des filaments d'actine. La phosphorylation de Cofiline par LIMKs inactive son activité dépolymérisatrice de l'actine (Edwards, Sanders et al. 1999). Contrairement à ce qu'affirmaient Sanders et al en 1999, repris dans la revue de Bishop and Hall en 2000, PAK semble capable d'augmenter la phosphorylation de la chaîne légère de myosine (MLC) responsable de l'interaction de l'actine avec la chaîne lourde de la myosine II qui contrôle l'activité ATPasique de cette dernière, ce qui contribue à l'assemblage et la contraction des filaments d'acto-myosine (Kiosses, Daniels et al. 1999, Sells, Boyd et al. 1999, Brzeska, Szczepanowska et al. 2004). (Figure 8)

Les protéines WASP et WAVE respectivement activées par Cdc42 et Rac1 actifs appartiennent à la famille WASP (Wiskott–Aldrich syndrome protein) et forment un complexe protéique avec Arp2/3 (Actin Related Protein 2/3), l'actine G, la Profiline elle-même associée à de l'actine G et un cofacteur activateur (PI(4-5)P₂ pour WASP et PI(3,4,5)P₃ pour WAVE). Concernant WAVE, cette protéine se lie à Rac1 via la protéine IRSp53 qui participe à son activation (Takenawa and Suetsugu 2007). Ces complexes interviennent dans la formation et la polymérisation des filaments d'actine entraînant le développement de filopodes et lamellipodes nécessaires à la migration des cellules. (Bishop and Hall 2000, Alekhina, Burstein et al. 2017). (Figure 8)

PI-4-P5K est une kinase activée par Rac1 mais également par Cdc42 (Tolias, Cantley et al. 1995) qui intervient dans la stabilité du réseau filamentaire d'actine en synthétisant du phosphatidylinositol biphosphate PIP₂ (Weernink, Meletiadis et al. 2004). PIP₂ se lie à la protéine Profiline (Goldschmidt-Clermont, Machesky et al. 1990) capable d'interagir avec les composants membranaires et le réseau filamentaire d'actine (Buss,

Temm-Grove et al. 1992) et de réguler la stabilité et les propriétés cinétiques des filaments d'actine (Rothkegel, Mayboroda et al. 1996). (Figure 8)

MRCK (Myotonic dystrophy kinase Related CDC42 binding protein Kinase), activée par Cdc42 actif est une famille de sérine/thréonine kinases de 190kDa capable de phosphoryler MLC (Leung, Chen et al. 1998) l'impliquant alors dans la réorganisation de l'actine. MRCK peut également phosphoryler et activer la kinase LIM favorisant la formation de filopodes (Sumi, Matsumoto et al. 2001). (Figure 8)

De nombreuses autres protéines activées par Rac1 et/ou Cdc42 interviennent également dans la formation des lamellipodes et filopodes respectivement en fonction du type cellulaire comme Lis1 dans les neurones (Sudarov, Gooden et al. 2013), Kindlin-1 dans les kératinocytes (Has, Herz et al. 2009).

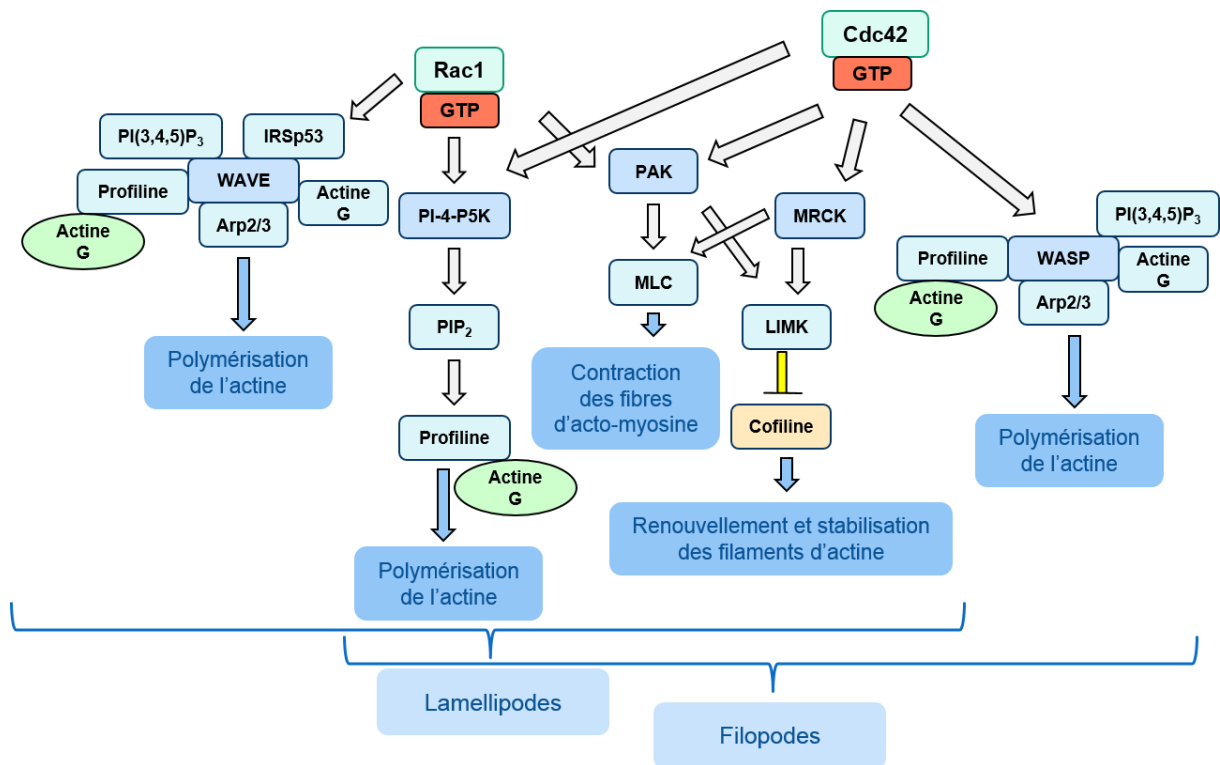


Figure 8 : Les voies de signalisation activées par Rac1 et Cdc42 et impliquées dans la formation des lamellipodes et des filopodes, d'après (Bishop and Hall 2000). Rac1 et Cdc42 interagissent et activent de nombreuses protéines cibles qui contrôlent la polymérisation de l'actine et entraînent la formations de protrusions.

La protéine ROCK est une sérine/thréonine kinase de 160kDa ubiquitaire qui existe sous deux isoformes : ROCK 1 (ou p160Rock ou ROK β) et ROCK 2 (Rho kinase, ROK α). ROCK 2 est majoritairement localisé dans le cytoplasme même si une faible portion est à la membrane ainsi qu'au niveau du sillon de clivage au cours de la division cellulaire, alors que ROCK 1 est situé au niveau des centrosomes. Ces kinases contiennent un domaine

catalytique aux extrémités de leur région N-terminale et en C-terminale, le domaine de liaison à Rho et un domaine PH riche en cystéines. La perte de la région C-terminale auto-inhibitrice de façon expérimentale ou *in vivo* lors de l'apoptose suite à l'action de caspases, rend les protéines ROCKs constitutivement actives (Riento and Ridley 2003), augmentant ainsi la formation des fibres de stress (Aspenstrom 1999). Les ROCKs phosphorylent beaucoup de substrats impliqués dans la régulation de l'assemblage et la contractilité des filaments d'actine notamment MLC, MLCP, LIMK et ERM. ROCK 1 phosphoryle les protéines LIMKs ce qui accélère leur capacité à phosphoryler Cofiline. La phosphorylation par ROCK des protéines LIMKs inhibe donc le désassemblage des filaments d'actine médié par la cofiline et conduit à une augmentation du nombre de filaments d'actine (Riento and Ridley 2003). De plus, les protéines ROCKs modulent le niveau de phosphorylation de MLC à la fois via une phosphorylation directe de MLC (Amano, Ito et al. 1996) et par une inactivation de la myosine phosphatase MLCP qui déphosphoryle cette protéine (Kimura, Ito et al. 1996). Les filaments d'actine sont liés à la membrane plasmique par certaines protéines « pont » qui leur sont nécessaires pour être régulées dynamiquement dans les cellules pendant les mouvements cellulaires et les phases de division. La famille ERM comprend 3 protéines apparentées : ezrine/radixine/moesine, concentrées au niveau de structures riches en actine comme le sillon de clivage, les microvilli, les filopodes, les lamellipodes... et font la liaison entre l'actine et la membrane. Leur domaine N-terminal est lié aux protéines membranaires et leur domaine C-terminal, aux filaments d'actine. Ces domaines terminaux sont capables d'interagir entre eux ce qui masque le site de liaison avec leurs partenaires membranaires. Les protéines kinases ROCKs phosphorylent alors les protéines ERMs ce qui inhibe leurs interactions intramoléculaires et les active (Amano, Fukata et al. 2000). (Figure 9)

mDia (mammalian homolog of *Drosophila diaphanous*) est un membre de la famille des protéines Formines contenant deux domaines FH (formin-homology). La séquence du domaine FH1, riche en motifs proline, permet la liaison avec la protéine Profiline elle-même associée à l'actine G contribuant à la polymérisation de l'actine et à l'organisation des filaments d'actine F en fibres de stress (Watanabe, Madaule et al. 1997). Mais cette interaction a lieu seulement lorsque mDia se lie à RhoA actif permettant ainsi la rupture d'une liaison intramoléculaire inactivatrice (Zigmond 2004). (Figure 9)

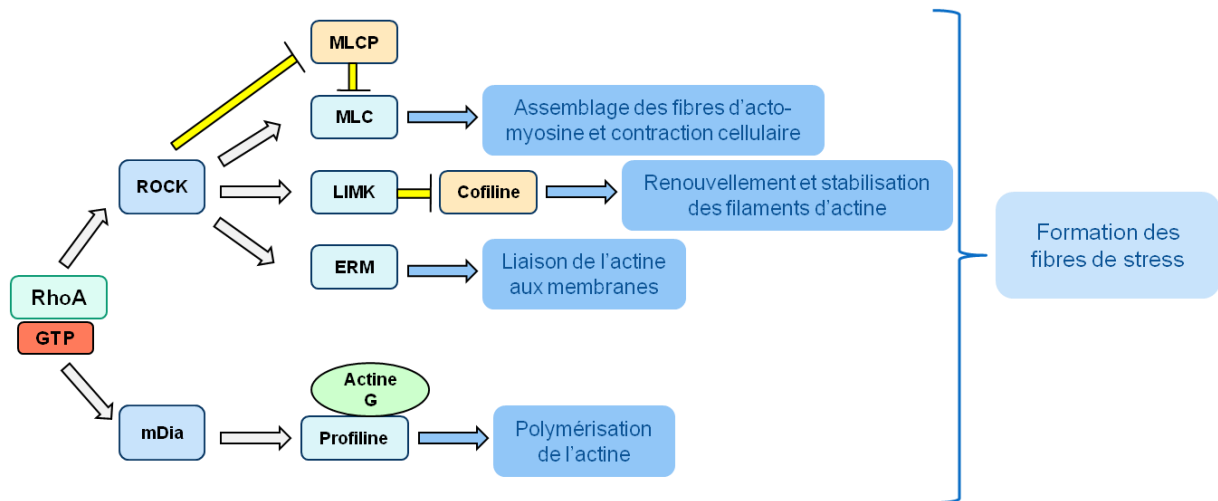


Figure 9 : Les voies de signalisation activées par RhoA et impliquées dans la formation des fibres de stress des cellules adhérentes, d'après (Bishop and Hall 2000). RhoA interagit et active ROCK et mDia qui contrôlent la polymérisation et la stabilisation de l'actine et entraînent la formation de fibres de stress.

2. Le cytosquelette de microtubules

Les microtubules jouent un rôle majeur dans la polarité et la forme des cellules, via l'interaction de leur extrémité (+) avec les protéines du cortex cellulaire dont l'activité est influencée par les RhoGTPases. Cette extrémité est également responsable de la dynamique des microtubules, c'est-à-dire leur élongation et leur stabilité. En effet, les protéines de la famille de Op18/stathmine interagissent avec cette extrémité (+) et avec les dimères de tubulines provoquant une inhibition de la polymérisation et un désassemblage des microtubules (Belmont and Mitchison 1996). Rac1 et Cdc42 vont intervenir dans cette dynamique en activant la protéine PAK qui va à son tour phosphoryler et inactiver Op18/stathmine (Daub, Gevaert et al. 2001) pour favoriser une élongation de l'extrémité des microtubules. Une autre protéine, CLIP-170 (Cytoplasmic Linker Protein 170), est capable de se lier aux extrémités des microtubules lorsqu'elle s'associe à la protéine IQGAP, un effecteur de Rac1 et Cdc42 concentré au niveau du front de migration des cellules. Ce complexe va favoriser l'élongation des microtubules (Kuroda, Fukata et al. 1996, Fukata, Watanabe et al. 2002). Le complexe EB1 (End-Binding protein 1) / APC (adenomatous polyposis coli) s'associe également aux extrémités des microtubules et via l'interaction avec mDia activé par RhoA, régule l'élongation des microtubules (Wen, Eng et al. 2004). (Figure 10)

En fonction du type cellulaire, d'autres protéines interviennent et facilitent l'élongation des microtubules. Dans les astrocytes en migration, Cdc42 lié au GTP active le complexe protéique Par6/PKC ζ (Protein Kinase C atypique ζ) qui phosphoryle et inactive GSK-3 β localisé au niveau du front de migration des astrocytes. Cette inactivation a pour conséquence la liaison de la protéine APC à l'extrémité (+) des microtubules ce qui est essentiel à la polarité cellulaire (Etienne-Manneville and Hall 2003). (Figure 10)

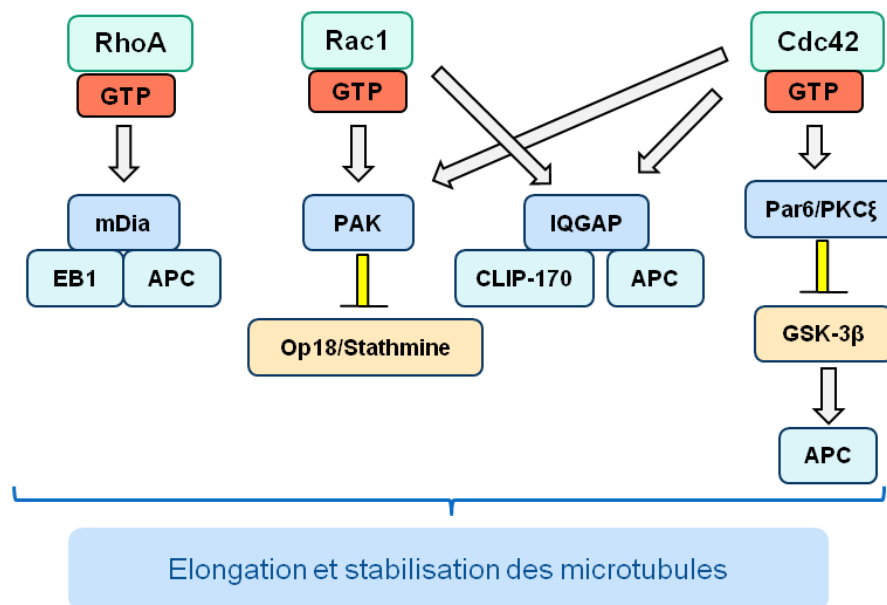


Figure 10 : Les voies de signalisation activées par RhoA, Rac1 et Cdc42 qui contrôlent la formation des microtubules. Les RhoGTPases interagissent avec différentes cibles qui entraînent l'élongation et la stabilisation des microtubules.

ii) Les RhoGTPases et l'expression des gènes

Les RhoGTPases régulent de nombreuses voies de signalisation, de manière actine-dépendant ou non, qui altèrent l'expression de certains gènes.

L'activation de RhoA entraînant la polymérisation de l'actine G cytoplasmique en filaments d'actine F va libérer et activer le cofacteur MRTK. Ce dernier va alors se déplacer dans le noyau et s'accumuler dans un état actif grâce à la polymérisation de l'actine nucléaire sous l'effet de la protéine activée mDia. Dans le noyau, MRTK actif va ensuite s'associer au facteur de transcription SRF (serum response factor) entraînant la transcription de gènes cibles (Hill, Wynne et al. 1995, Miralles, Posern et al. 2003, Baarlink, Wang et al. 2013).

Indépendamment de leurs effets sur le cytosquelette, les RhoGTPases peuvent conduire à l'expression de gènes spécifiques notamment en activant le facteur de transcription NF- κ B en réponse à divers stimuli (Perona, Montaner et al. 1997). Mais le mécanisme d'activation n'est aujourd'hui pas encore élucidé. De plus, en fonction du type

cellulaire, les RhoGTPases sont capables de réguler l'activation de voies de signalisation de MAP kinases comme JNK (c-Jun N-terminal MAP kinase) et p38/MKP2 (Coso, Chiariello et al. 1995, Minden, Lin et al. 1995). Les MAP kinases sont des sérine/thréonines kinases qui convertissent les stimuli extracellulaires en signaux intracellulaires contrôlant l'expression de gènes cibles essentiels à de nombreux processus cellulaires. Les RhoGTPases vont activer des protéines d'ancrage comme CNK, cible de RhoA ou POSH, cible de Rac1, qui vont s'associer à des protéines MAP kinases conduisant à l'expression de gènes d'intérêts (Jaffe and Hall 2005).

b) Fonctions biologiques

i) Les RhoGTPases et la morphogénèse

Les RhoGTPases contribuent à la morphogénèse des cellules c'est-à-dire à leur forme et à leur structure, en régulant le cytosquelette et les mécanismes impliqués dans l'établissement de la polarité cellulaire.

La morphogénèse des cellules épithéliales nécessite des interactions intercellulaires conduisant à la formation de domaines latéraux séparés par des jonctions adhérentes. L'assemblage de ces jonctions se fait notamment sous l'action des RhoGTPases qui induisent la formation de protrusions (lamellipodes et filopodes) permettant un contact entre deux cellules adjacentes. L'établissement d'une polarité cellulaire requiert également l'action des RhoGTPases, notamment Cdc42 qui régule la création des jonctions serrées situées au niveau du pôle apical des cellules (Etienne-Manneville and Hall 2002, Jaffe and Hall 2005).

ii) Les RhoGTPases et la migration

La migration des cellules épithéliales, que ce soit individuellement ou en groupe, est un mécanisme indispensable au développement, mais intervient également chez l'adulte lors des réponses immunitaires et lors du maintien de l'intégrité des tissus avec la différenciation et la migration des cellules souches. L'organisation asymétrique des cellules ainsi que le réarrangement du cytosquelette d'actine et des microtubules, régulés par les RhoGTPases, sont nécessaires à la mobilité cellulaire. Il existe deux types de migration : mésenchymale et amiboïde. La migration mésenchymale se réfère à la migration des fibroblastes. Ce mode de migration est le plus commun de la migration cellulaire. Une cellule qui va migrer avec un mouvement mésenchymal, va tout d'abord se polariser et étendre des protrusions, lamellipodes et filopodes, générées par la polymérisation de l'actine, au niveau du front de migration. Ces extensions membranaires sont stabilisées par des adhésions à la matrice extracellulaire ou à des cellules adjacentes via des récepteurs transmembranaires liés au

cytosquelette d'actine comme les intégrines. Ces adhésions servent de sites de traction pour la migration. En effet, le corps cellulaire va se contracter et l'arrière de la cellule va se détacher grâce aux filaments d'acto-myosine ce qui permet à la cellule de se mouvoir en direction des protrusions (Lauffenburger and Horwitz 1996, Ridley, Schwartz et al. 2003, Jaffe and Hall 2005). Le mouvement amiboïde est lui indépendant des protéases et entraîne un arrondissement des cellules dû à une augmentation de la contractilité des filaments d'acto-myosine. Il a été montré que les RhoGTPases et leurs régulateurs sont impliqués dans la migration cellulaire. En effet, la protéine GEF DOCK3, en association avec une molécule adaptatrice, régule Rac1 et WAVE2 pour conduire à un mouvement mésenchymal et inhiber le mouvement amiboïde. Au contraire, lors d'un mouvement amiboïde généré par ROCK, la protéine GAP ARHGAP22 va inactiver Rac1 et supprimer le mouvement mésenchymal. (Sanz-Moreno, Gadea et al. 2008)

iii) Les RhoGTPases et le cycle cellulaire

Les RhoGTPases, en contrôlant l'organisation du cytosquelette et la transcription de gènes cibles, sont impliquées dans le cycle cellulaire plus spécifiquement au cours de la phase G1 et de la mitose.

1. Le cycle cellulaire

Le cycle cellulaire (Figure 11) est un processus fondamental au cours duquel une cellule mère se divise en deux cellules filles identiques. Il est divisé en deux temps : l'interphase et la mitose. Lorsque les cellules ne se divisent pas, elles sont dites en quiescence ou G0. La durée du cycle cellulaire varie d'une espèce à l'autre et d'un type cellulaire à l'autre. Chez la plupart des mammifères, il dure entre 10 et 30 heures. En interphase, composée des stades G1, S et G2, les chromosomes sont répliqués alors qu'en mitose, ils sont répartis entre les deux cellules filles. La phase G1 (G pour gap ou intervalle) est une phase de croissance initiale de la cellule, c'est le temps entre le moment de la naissance d'une nouvelle cellule et le début de la réplication de l'ADN. Lorsque la cellule atteint une certaine taille, elle entre en phase S, phase de duplication du matériel génétique de durée constante entre 6 et 8 heures. La phase G2 est une phase de croissance et de préparation à la mitose (environ 3 heures). Pendant ces trois étapes, la cellule contrôle les dommages de l'ADN. Après l'interphase, se déroule la mitose, mécanisme de division cellulaire qui permet le maintien de l'information génétique dans son intégralité. À la fin de la division, les cellules filles se retrouvent en phase G1 et un nouveau cycle cellulaire démarre. (Rieder 2011)

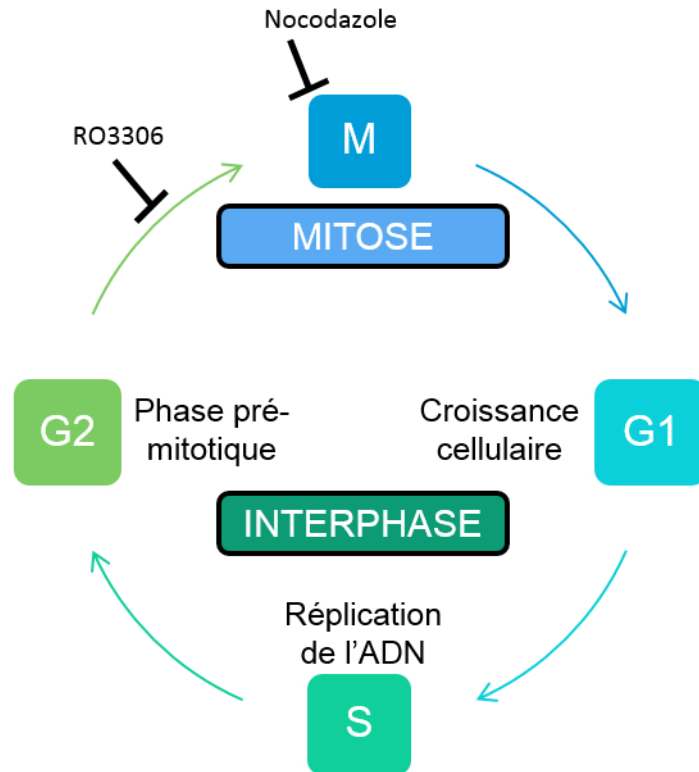


Figure 11 : Les phases du cycle cellulaire. Les cellules en division sont tout d'abord en interphase où elles passent d'une phase G1 ou croissance cellulaire, à une phase S où leur ADN est répliqué puis à une phase G2 pré-mitotique. Un traitement au RO3306 bloque les cellules avant l'entrée en mitose. Les cellules passent ensuite dans une phase de division cellulaire ou mitose. Le traitement au Nocodazole bloque les cellules en début de mitose.

La division cellulaire est composée de cinq étapes basées sur la morphologie des chromosomes et de l'enveloppe nucléaire (Figure 12) : prophase, prométaphase, métaphase, anaphase, télophase (Pines and Rieder 2001, Chircop 2014). La progression dans la division est hautement régulée et implique une modulation dynamique de la forme et de la morphologie de la cellule grâce à un remodelage essentiel du cytosquelette d'actine et de myosine.



Figure 12 : Les différentes phases de la mitose, d'après (Song, Liu et al. 2012). La mitose est la phase de division cellulaire. Elle est composée de 5 phases distinctes : la prophase, la prométaphase, la métaphase, l'anaphase et la télophase. En vert sont représentés les microtubules et centrosomes, en bleu les chromosomes et en rouge les kinétochores.

- La prophase

La prophase est le début de la mitose au cours de laquelle la cellule va subir de profonds changements structuraux pour se détacher de la matrice extracellulaire et s'arrondir grâce au remodelage du cytosquelette d'acto-myosine. Les chromosomes, constitués de deux chromatides sœurs reliées par leur centromère, vont s'individualiser, s'épaissir et se raccourcir. Les deux centrosomes avec leurs microtubules constituent des asters qui vont migrer vers deux pôles opposés de la cellule. En fin de prophase la membrane nucléaire commence à disparaître.

- La prométaphase

La membrane nucléaire a complètement disparu. Les chromosomes, dispersés dans le cytoplasme, s'orientent de manière à placer leur centromère associé à des kinétochores (plaques protéiques) en vis-à-vis des deux pôles de la cellule en division. Les microtubules se polymérisent et s'allongent vers les chromosomes jusqu'à se fixer aux kinétochores. Les chromosomes sont attachés de part et d'autre par les microtubules et placés à l'équateur du fuseau constitué par les microtubules et leurs protéines associées.

Un traitement au Nocodazole stoppe les cellules en prométaphase en bloquant la dépolymérisation des microtubules.

- La métaphase

Tous les chromosomes se positionnent au niveau de l'équateur du fuseau et forment la plaque équatoriale, à équidistance des deux pôles du fuseau, grâce aux tractions exercées par les microtubules kinétochoriens. L'ensemble du système est vérifié par un "checkpoint" et attend le feu vert pour déclencher l'anaphase.

- L'anaphase

Le début de cette étape est marqué par la séparation des 2 chromatides-sœurs d'un même chromosome au niveau des centromères. Chaque chromatide devient alors un chromosome fils indépendant. Les microtubules attachés aux kinétochores se dépolymérisent et les chromosomes migrent vers les pôles du fuseau, guidés par la cage de microtubules. Un cercle de fibres contractiles d'acto-myosine apparaît autour de la cellule dans le plan de l'équateur.

- La télophase

Les chromosomes séparés arrivent aux pôles et les microtubules kinétochoriens disparaissent. Les fibres d'acto-myosine au niveau de l'équateur se contractent et réalisent un sphincter qui resserre le diamètre de la cellule au niveau de l'équateur. Le processus se

poursuit et la cellule se partage en deux progressivement. La membrane nucléaire se reconstitue autour de chaque lot de chromosomes. Chaque aster disparaît, les chromosomes se décondensent progressivement et le pont cellulaire reliant les deux cellules filles se coupe et sépare la cellule en deux parties égales. Cette dernière étape correspond à la cytodierèse ou encore appelée cytokinèse.

2. Les fonctions des RhoGTPases et leur régulation

L'inhibition des RhoGTPases Rac1, Cdc42 et RhoA bloque le cycle cellulaire en phase G1 dans de nombreux types de cellules de mammifères (Yamamoto, Marui et al. 1993, Olson, Ashworth et al. 1995), mais les mécanismes dépendants du type cellulaire restent encore mal compris. La progression dans la phase G1 est contrôlée par deux types de kinases cycline dépendante (Cdks), Cdk4/Cdk6 et Cdk2 qui sont activées par la liaison avec les cyclines D et E respectivement et inhibées par association avec les protéines de la famille INK4A et Cip/Kip. Rac et Cdc42 stimulent la transcription des cyclines D (Westwick, Lambert et al. 1997, Gjoerup, Lukas et al. 1998, Joyce, Bouzahzah et al. 1999) et E (Chou, Masuda-Robens et al. 2003), mais le moment où apparaît ces expressions est régulé par RhoA qui inhibe l'expression des inhibiteurs de Cdks (Weber, Hu et al. 1997, Welsh, Roovers et al. 2001).

Les RhoGTPases interviennent ensuite et surtout en mitose où les activités de RhoA et de Cdc42 fluctuent alors que Rac1 reste inactif. RhoA est actif et joue un rôle en fin d'interphase/début de prophase et à partir de l'anaphase. Cdc42 intervient entre les deux, en métaphase.

En début de mitose, RhoA est fortement actif et se concentre au niveau du cortex cellulaire (Mali, Wirtz et al. 2010) où il déclenche le remodelage du cytosquelette d'actine nécessaire à l'arrondissement des cellules adhérentes et à la rigidité du cortex (Maddox and Burridge 2003) via l'activation de son effecteur ROCK. Cette augmentation de l'activité de RhoA est due à l'activité GEF d'Ect2 (Epithelial Cell Transforming gene2). Celui-ci se situe dans le noyau en interphase et se déplace en début de mitose dans le cytoplasme avant la rupture de l'enveloppe nucléaire où il est phosphorylé par CDK1-CyclinB1 lui permettant d'activer RhoA et d'induire la réorganisation du cytosquelette d'acto-myosine et le changement de forme cellulaire (Matthews, Delabre et al. 2012).

La division cellulaire se poursuit, RhoA redevient inactif alors que Cdc42 s'active en métaphase et contribue à l'orientation et à la formation du fuseau, à l'intégrité des centrosomes et à l'attachement des chromosomes aux microtubules kinétochoriens permettant l'alignement des chromosomes au niveau de la plaque métaphasique. En effet,

Cdc42 se localise au niveau du fuseau et des centrosomes où se situent la GEF spécifique ITS2 (intersectine 2) et son effecteur Pak1 et est impliqué dans la polarité du fuseau et dans l'alignement des chromosomes. Il forme également un complexe avec mDia3 et CENP-A au niveau des kinétochores permettant l'attachement et la stabilisation des microtubules (Yasuda, Ocegüera-Yanez et al. 2004, Rodriguez-Fraticelli, Vergarajauregui et al. 2010).

En anaphase, le sillon de clivage se forme et se contracte grâce à RhoA dont l'activation est restreinte spatialement à l'étroite zone équatoriale du cortex. Le lieu de l'ingression est déterminé par le recrutement de RhoA. Cette activation est permise par la localisation spécifique au fuseau des activateurs de RhoA (Kamijo, Ohara et al. 2006). Ect2 en métaphase et anaphase est localisé au niveau du fuseau mitotique et est associé au complexe « centralspindlin » qui est un complexe hétérotétramérique composé des protéines kinésine-like MKLP1 et MgcRacGAP (Male Germ Cell RacGAP). Ce complexe (Figure 13) se lie à l'extrémité « + » des microtubules non kinétochoriens du fuseau central et est requis pour le regroupement des microtubules. MgcRacGAP recrute et lie Ect2 de manière phosphodépendante. Ect2 est alors stabilisé dans une conformation active permettant l'interaction avec RhoA (Yuce, Piekny et al. 2005, Kamijo, Ohara et al. 2006). GEF-H1 (Birkenfeld, Nalbant et al. 2007) et MyoGEF (Wu, Asiedu et al. 2006), localisés aussi au niveau du fuseau mitotique, peuvent également activer RhoA. GEF-H1 accélère l'activation de RhoA en réponse à la localisation d'Ect2 et à l'initiation de la cytokinèse. Cette GEF est située à l'extrémité des microtubules corticaux et est impliquée dans la symétrie de l'ingression membranaire. Son activité est inhibée par la phosphorylation médiée par les kinases Aurora A/B et CDK1/CyclineB1. L'activation de RhoA à l'équateur semble donc coïncider avec une diminution de l'activité CDK1 au début de l'anaphase et/ou de la ségrégation des chromosomes. Ce phénomène est un point de contrôle temporel pour l'ingression membranaire. MyoGEF est requis pour la localisation d'Ect2 au fuseau central. La localisation de MyoGEF au fuseau est dépendante de CSPP et Plk1. Son activité est stimulée par phosphorylation. Ces trois GEFs (Ect2, GEF-H1 et MyoGEF) assurent une activation spatialement correcte de RhoA pour établir le site d'initiation de l'ingression membranaire coordonnée avec la ségrégation des chromosomes. Le rôle de MgcRacGAP n'est pas clair : il semblerait que ce soit une GAP de Rac1 et que cette protéine ait une action indirecte sur RhoA en recrutant et contribuant à l'activation d'Ect2. C'est un substrat de Plk1 et sa phosphorylation est nécessaire au recrutement et à la liaison avec Ect2. Les GAPs de RhoA pendant l'anaphase et la télophase seraient p190RhoGAP (Su, Agati et al. 2003) qui colocalise avec RhoA au cortex cellulaire en anaphase et MP-GAP (M-phase GAP) (Zanin, Desai et al. 2013).

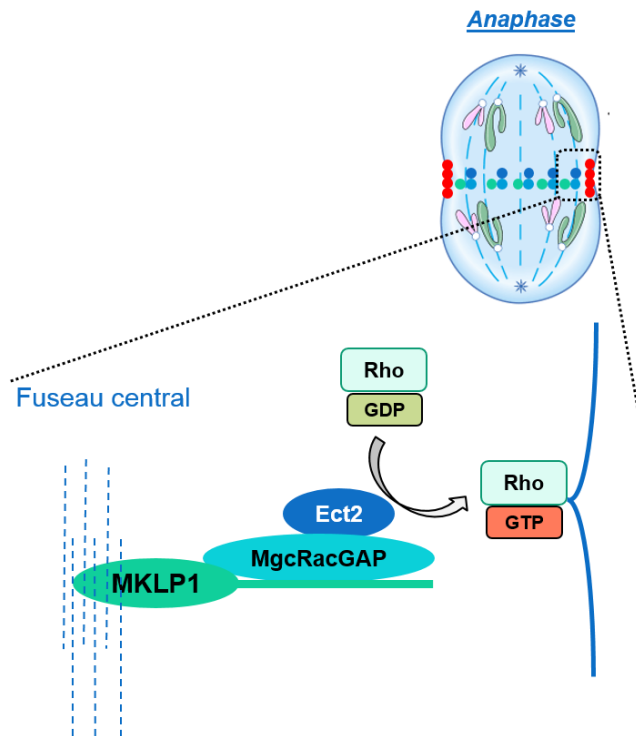


Figure 13 : Complexe "centralspindlin" d'après (Kamijo, Ohara et al. 2006). Les protéines Ect2, MgcRacGAP et MKLP1 s'accroient et forment ce complexe au niveau des microtubules du fuseau central. Les protéines Ect2 de ces complexes, à proximité du cortex, activent RhoA permettant l'ingression du sillon de clivage.

En résumé, les actions conjointes des GEFs (Ect2, GEF-H1 et MyoGEF) et des GAPs (MgcRacGAP, p190RhoGAP et MP-GAP) modulent l'activité de RhoA à l'équateur ce qui est essentiel pour une bonne organisation spatiale de l'ingression membranaire.

4) RhoGTPases et cancers

La transformation maligne est un processus multiforme complexe impliquant des altérations d'un grand nombre de propriétés cellulaires. Les cellules cancéreuses sont caractérisées par un cycle cellulaire dérégulé, une réduction de l'inhibition de contact, une indépendance par rapport aux facteurs de croissance, une perte de la dépendance vis-à-vis de l'ancrage, une augmentation de la survie cellulaire, une altération morphologique, une motilité accrue et l'acquisition de propriétés invasives et métastatiques. Les GTPases de la famille Rho agissent comme des régulateurs clés de tous ces processus cellulaires et une dérégulation de ces protéines est observée dans l'oncogenèse humaine. En effet, le niveau d'expression des RhoGTPases peut être altéré, les protéines peuvent subir des modifications post-traductionnelles, elles peuvent être mutées et leurs régulateurs peuvent être perturbés (Figure 14).

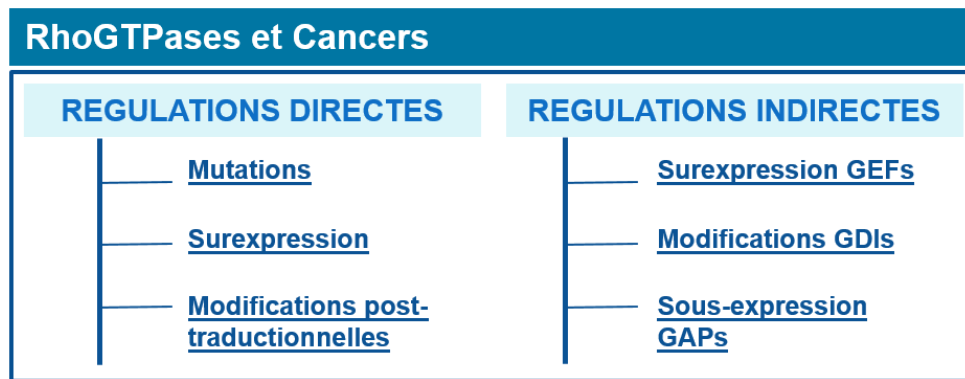


Figure 14 : Les modifications des RhoGTPases impliquées dans les cancers. Les RhoGTPases peuvent subir des modifications directes comme des mutations, une surexpression ou des modifications post-transcriptionnelles les impliquant dans des cancers. Leurs régulateurs peuvent également être touchés provoquant une modification indirecte de l'activité des RhoGTPases retrouvée chez certains patients cancéreux.

a) Régulations directes des RhoGTPases dans les cancers

De nombreuses RhoGTPases sont surexprimées lors de la formation, la croissance et la progression de tumeurs. Rac1 est surexprimé dans le cancer des testicules, du sein, de la prostate, du poumon, de l'estomac et dans les leucémies aigües myéloïdes (Kamai, Yamanishi et al. 2004, Engers, Ziegler et al. 2007, Wang, Yu et al. 2013). Plus Rac1 est exprimé dans le cancer de l'estomac, plus la tumeur est agressive et invasive et les chances de survie des patients sont diminuées (Ji, Feng et al. 2015). Dans les leucémies aigües myéloïdes, la surexpression de Rac1 améliore la migration et la croissance des cellules et est impliquée dans la chimiorésistance. Rac1b, un variant de Rac1, est fortement exprimé dans le cancer du côlon, du sein et des poumons (Schnelzer, Prechtel et al. 2000, Zhou, Licciulli et al. 2013). RhoA est surexprimé dans de nombreuses tumeurs, mais particulièrement pour celles ayant une origine épithéliale (Orgaz, Herraiz et al. 2014). Enfin, Cdc42 est surexprimé dans le cancer du poumon, du côlon, du sein, des testicules et de la peau (Kamai, Yamanishi et al. 2004, Tucci, Lucarini et al. 2007, Gomez Del Pulgar, Valdes-Mora et al. 2008).

Des études récentes ont mis en évidence la présence de RhoGTPases mutées dans certains cancers. En effet, une mutation de Rac1 dans le domaine de liaison à ses effecteurs a été découverte dans des tumeurs de cerveaux humains (Hwang, Hong et al. 2004). Une autre mutation de Rac1 (Rac1^{P29S}) a ensuite été retrouvée dans plus de 5% de mélanomes, faisant de Rac1 le 4^{ème} gène muté le plus commun dans le mélanome et une des mutations les plus courantes des RhoGTPases (Hodis, Watson et al. 2012, Krauthammer, Kong et al. 2012). Cdc42 est également muté dans le mélanome (Cdc42^{G12D}) (Hodis, Watson et al. 2012). Concernant RhoA, de nombreuses mutations ont été trouvées dans le cancer de

l'estomac (Kakiuchi, Nishizawa et al. 2014) et une mutation entraînant une perte de fonction (RhoA^{G17V}) a été identifiée dans 50 à 68% de lymphomes T angio-immunoblastiques (Sakata-Yanagimoto, Enami et al. 2014, Yoo, Sung et al. 2014).

Enfin, les modifications post-traductionnelles, comme l'ubiquitynilation et les phosphorylations, que subissent les RhoGTPases peuvent être inappropriées et participer à la migration de cellules tumorales et à la progression de cancer (Visvikis, Maddugoda et al. 2010).

b) Régulations indirectes des RhoGTPases dans les cancers

Une manière d'augmenter l'activité GTPasique est un changement de l'activité des régulateurs GEFs, GAPs et GDIs. Les GEFs comme Ect2, MyoGEF, Dock180, sont surexprimées dans un grand nombre de tumeurs humaines (Cook, Rossman et al. 2014). Les GAPs DLC1 (Xue, Krasnitz et al. 2008), DLC2 (Ching, Wong et al. 2003), p190RhoGAP (Wolf, Draghi et al. 2003) et ARHGAP8 (Johnstone, Castellvi-Bel et al. 2004) sont elles, sous-exprimées dans de nombreux cancers. En ce qui concerne les RhoGDIs, la situation est plus complexe et dépend du type de cancer. En effet, la RhoGDI1 est sous-exprimée dans certains cancers du sein (Jiang, Watkins et al. 2003) et surexprimée dans d'autres. La sous-expression de Rho GDI2 (gène *ARHGDIβ*) dans le cancer de la vessie est associée à une diminution de la survie des patients (Theodorescu, Sapinoso et al. 2004) alors que sa surexpression dans le cancer du pancréas est associée à l'invasion tumorale (Abiatari, DeOliveira et al. 2009).

Les voies de signalisation impliquant les RhoGTPases sont fréquemment modifiées lors des cancers humains. C'est pourquoi il est important d'étudier ces voies dans les différents types cellulaires et de comprendre l'impact de leur dérégulation.

Partie II – L'hématopoïèse

L'hématopoïèse est le processus physiologique qui conduit à la formation des composants cellulaires du sang. Le système sanguin contient plus de dix différents types de cellules sanguines (ou lignages) ayant différentes fonctions. Les leucocytes ou globules blancs sont des cellules très spécialisées présentes dans le sang, la lymphe, les organes lymphoïdes et les tissus conjonctifs de l'organisme et impliquées dans les réponses immunitaires innées et acquises. Il en existe différents types : les polynucléaires ou granulocytes, les lymphocytes et les monocytes. Les érythrocytes ou globules rouges sont des cellules anucléées chez les mammifères, riches en hémoglobines qui assurent le transport de l'oxygène et du dioxyde de carbone. Enfin, les mégacaryocytes génèrent des plaquettes qui régulent la fluidité plasmatique et la cicatrisation. Tous ces types cellulaires ont pour origine une cellule souche hématopoïétique (HSC) qui réside dans la moelle osseuse, lieu majeur de l'hématopoïèse adulte ([Rieger and Schroeder 2012](#)).

L'hématopoïèse se met en place principalement au cours de l'embryogenèse, en deux temps : tout d'abord avec une hématopoïèse primitive puis ensuite une hématopoïèse définitive qui a lieu au cours du développement fœtal et se poursuit à l'âge adulte. Ces deux phases successives diffèrent dans les types cellulaires produits et les lieux anatomiques de déroulement ([Galloway and Zon 2003](#)). En effet, la première étape se déroulant dans le sac vitellin de l'embryon, est transitoire et génère des érythrocytes nucléés exprimant des gènes codant pour des globines foetales, des macrophages embryonnaires afin de faciliter l'oxygénation des tissus et permettre une croissance rapide de l'embryon et des mégacaryocytes ([Orkin and Zon 2008](#), [Rieger and Schroeder 2012](#), [Jagannathan-Bogdan and Zon 2013](#)). La dernière étape émerge dans la région aorte-gonade-mésonephros (AGM) qui entoure l'aorte dorsale de l'embryon puis se déroule dans le foie foetal avant de s'établir de manière définitive dans la moelle osseuse et le thymus ([Orkin and Zon 2008](#)). Contrairement à la phase primitive, elle dure toute la vie de l'organisme et produit des HSCs multipotentes, capables de donner naissance à tous les types cellulaires sanguins de l'organisme adulte ([Galloway and Zon 2003](#)).

Les cellules hématopoïétiques possèdent certaines propriétés qui facilitent leur étude. En effet, elles peuvent être identifiées par des anticorps monoclonaux dirigés contre des marqueurs de surface ou sur la base de leurs propriétés métaboliques. Elles peuvent également être séparées par un tri cellulaire activé par fluorescence (ou FACS). De plus, l'isolement du sang périphérique est peu invasif et des millions de cellules peuvent facilement être récoltées. ([Orkin and Zon 2008](#), [Rieger and Schroeder 2012](#), [Crisan and Dzierzak 2016](#))

Le système hématopoïétique le plus étudié et le mieux compris est celui de la souris. Son étude *in vivo* est possible grâce à la génération de souris génétiquement modifiées avec l'analyse de perte ou de gain de fonctions de gènes ou avec des lignages ou cellules marquées. Il existe des systèmes conditionnels ou inductibles qui permettent de manipuler l'expression de gènes de manière globale ou tissu spécifique dans des conditions proches de l'homéostasie. Pour cela, le système de recombinaison Cre/LoxP découvert dans le bactériophage P1 (Sternberg and Hamilton 1981) est utilisé. Une souris transgénique exprimant le transgène Cre (séquence isolée du gène Cre, transférée du bactériophage P1 aux cellules souches embryonnaires (ES) d'une souris par recombinaison homologue) de manière constitutive ou tissu spécifique en fonction du promoteur utilisé, est croisée avec une souris dont le gène cible est entouré de sites LoxP (Figure 15). La recombinase Cre exprimée reconnaît spécifiquement les sites LoxP qui sont des séquences nucléotidiques de 34 paires de bases ayant deux séquences palindromiques de 13 paires de bases séparées par une séquence conservée de 8 paires de bases. La recombinaison entre deux sites de même orientation conduit à la délétion du fragment d'ADN. Le gène cible reste fonctionnel dans les cellules et autres tissus n'exprimant pas l'enzyme Cre (Gu, Marth et al. 1994, Kuhn, Schwenk et al. 1995). Le gène *vav1* murin étant exprimé spécifiquement dans toutes les cellules hématopoïétiques fœtales et adultes, il est utilisé pour générer des souris knock-out (KO) où le gène cible est seulement absent dans le système hématopoïétique. Pour cela, la souris transgénique employée dans le croisement exprime la Cre recombinase sous le promoteur *vav* (de Boer, Williams et al. 2003).

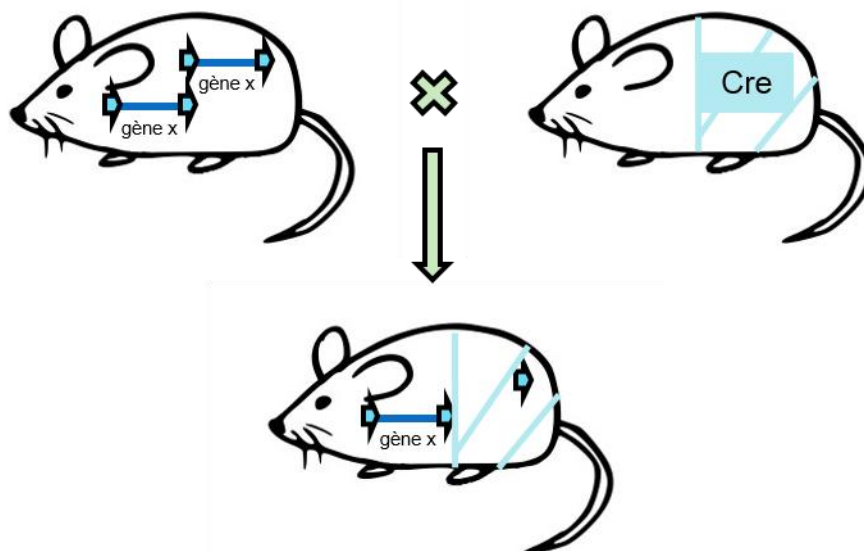


Figure 15 : Génération d'une souris transgénique par croisement d'une souris transgénique exprimant l'enzyme Cre et une souris floxée d'après (Gu, Marth et al. 1994). Une souris ayant le gène x d'intérêt (représenté par le trait bleu annoté gène x) floxé (entouré de sites LoxP représentés par les flèches bleues) est croisée avec une souris transgénique exprimant l'enzyme Cre recombinase dans un tissu spécifique (partie bleue de la souris) donnant naissance ainsi à une souris n'exprimant pas le gène x seulement dans le tissu d'intérêt (bleu).

1) Les cellules souches et les progéniteurs hématopoïétiques

L'hématopoïèse est classiquement représentée par un modèle hiérarchique depuis la démonstration faite en 1977 que les cellules myéloïdes et lymphocytaires T et B dérivent d'une HSC commune (Abramson, Miller et al. 1977). Dans la représentation classique du développement hématopoïétique, les HSCs sont en haut de la pyramide (Figure 16). Elles se divisent de manière symétrique et aussi asymétrique c'est-à-dire qu'elles génèrent deux cellules filles avec des fonctions différentes, une avec un potentiel souche d'autorenouvellement permettant de maintenir un lot de HSCs et l'autre ayant la capacité de se différencier (Wilson and Trumpp 2006). Il existe deux types d'HSCs, les LT-HSCs qui possèdent une capacité d'autorenouvellement à long terme (Spangrude, Heimfeld et al. 1988, Uchida and Weissman 1992) et les ST-HSCs qui elles, possèdent des capacités d'autorenouvellement plus limitées (Morrison, Wandycz et al. 1997, Reya, Morrison et al. 2001, Weissman, Anderson et al. 2001). Ensuite, apparaît les MPPs ou progéniteurs multipotents qui n'ont pas la possibilité de s'autorenouveler (Morrison, Wandycz et al. 1997, Reya, Morrison et al. 2001, Weissman, Anderson et al. 2001). Chez la souris, les HSCs sont caractérisées par l'expression des marqueurs de surface Sca-1 (Stem cell antigen-1) et Kit (récepteur du ligand SCF) et par l'absence des marqueurs des populations matures soit lignage négatif (Lin⁻ ou lineage⁻) (Okada, Nakauchi et al. 1992). Les cellules souches hématopoïétiques et MPPs sont donc également nommées LSK pour Lin⁻Sca-1⁺Kit⁺. La découverte de nouveaux marqueurs de surface a ensuite permis la distinction des deux types d'HSCs et d'identifier 4 sous populations de MPPs (Cabezas-Wallscheid, Klimmeck et al. 2014). En effet, contrairement aux autres populations, les LT-HSCs murins n'expriment pas le CD34 (Osawa, Hanada et al. 1996). De plus, les récepteurs CD150, CD244 et CD48 de la famille SLAM (signaling lymphocyte activation molecule) ont été découverts comme étant différentiellement exprimés par les LSK. Les HSCs (LT- et ST-) expriment le CD150 mais n'expriment pas le CD244 ni le CD48 (Kiel, Yilmaz et al. 2005). Des analyses postérieures permettent de subdiviser les MPPs en quatre populations (se distinguant par leurs marqueurs de surface CD48 CD150 et CD135) où les cellules MPP1 se différencient en MPP2, MPP3 et MPP4 (Wilson, Laurenti et al. 2008). Les MPPs s'engagent ensuite vers des progéniteurs myéloïdes communs (CMPs) (Akashi, Traver et al. 2000) ou lymphoïdes communs (CLPs) (Kondo, Weissman et al. 1997). Les CLPs vont générer par l'intermédiaire d'autres précurseurs, les lymphocytes T, B, les cellules Natural Killer (NK) et certaines cellules dendritiques (pDC). Les CMPs sont quant à elles à l'origine des progéniteurs érythro-mégacaryocytaires (MEP) et granulo-monocytaire (GMP) qui expriment différemment les marqueurs CD34 et FcγR. Ces progéniteurs donnent naissance respectivement aux mégacaryocytes et érythrocytes ainsi qu'aux monocytes, aux cellules dendritiques (DC) et

aux granulocytes. Ce modèle classique enrichi au fur et à mesure des années reste assez séquentiel. Cependant, d'autres découvertes faites récemment proposent des modèles alternatifs. Un nouveau progéniteur appelé LMPP (progéniteur lymphoïde multipotent) a été identifié comme étant capable de se différencier en CLP et GMP mais incapable de donner un MEP (Lu, Kawamoto et al. 2002, Adolfsson, Mansson et al. 2005). De plus, les MEPs pourraient provenir directement des ST-HSCs (Adolfsson, Mansson et al. 2005). Ensuite, l'utilisation des marqueurs CD150, CD105 et CD41 ont permis d'affiner la caractérisation des MEPs. Les progéniteurs CMPs donnent naissance à des progéniteurs intermédiaires érythroïdes-mégacaryocytaires (pre MegE) $CD150^+CD105^-CD41^-$ plutôt que des MEPs. Les Pre MegE se différencient soit en MkP $CD41^+$ qui génèrent les mégacaryocytes, soit en CFU-E $CD41^-$ qui sont à l'origine des érythrocytes (Pronk, Rossi et al. 2007). De nombreux autres modèles ont été proposés durant ces dernières années montrant la complexité du système et l'importance des découvertes qui enrichissent les connaissances. Le schéma proposé en Figure 16 reflète le modèle classique de l'hématopoïèse murine complété des modèles alternatifs ou complémentaires décrits ci-dessus.

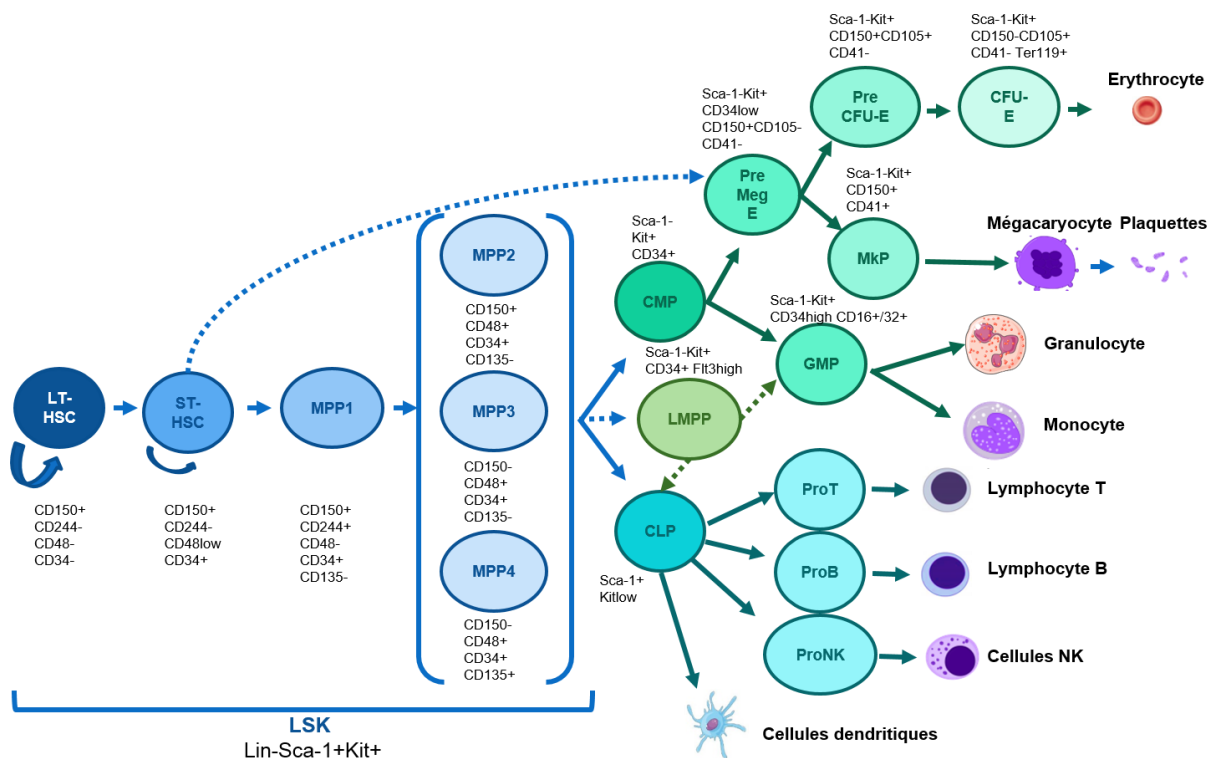


Figure 16 : Modèles de l'hématopoïèse murine. Ce schéma regroupe le modèle classique révisé (avec les flèches pleines) et les modèles alternatifs ou complémentaires (avec les flèches en pointillés). Les marqueurs de surface sont indiqués en-dessous ou au-dessus des populations. HSC=cellules souches hématopoïétiques, LT=Long Term, ST=short term, MPP=progéniteurs multipotents, CMP=progéniteur myéloïde commun, LMPP=progéniteur lymphoïde multipotent, CLP=progéniteur lymphoïde commun, PreMegE=progéniteur intermédiaire érythroïde-mégacaryocytaire, GMP=progéniteur granulo-monocytaire, ProT/B/NK=progéniteur T/B/NaturalKiller, MkP=progéniteur mégacaryocytaire, CFU=colony forming unit E=érythrocytaire.

2) Les différenciations hématopoïétiques

La différenciation des HSCs en progéniteurs lymphoïdes CLPs donnant naissance aux cellules matures, les lymphocytes T (LT) et les lymphocytes B (LB), s'appelle la lymphopoïèse T et B. Les mécanismes à l'origine des mégacaryocytes et des érythrocytes à partir des HSCs générant des progéniteurs myéloïdes communs CMPs sont respectivement la mégacaryopoïèse et l'érythropoïèse. Ces trois types de différenciation hématopoïétique sont détaillés par la suite contrairement à ceux générant les autres cellules matures (granulocytes, cellules NK, DCs, monocytes). ([Jagannathan-Bogdan and Zon 2013](#))

a) La lymphopoïèse

Contrairement aux monocytes, granulocytes, NK et DC qui interviennent dans le système immunitaire inné pour défendre l'organisme rapidement contre des pathogènes, les LT et LB appartiennent au système immunitaire adaptatif. Cette immunité, présente dès la naissance tout comme l'immunité innée, répond de manière antigène dépendant. En effet, les LT et LB mis en jeu, expriment à leur surface des récepteurs spécifiques aux antigènes. Une fois l'antigène reconnu par le récepteur, les lymphocytes vont proliférer, mais aussi former des cellules mémoires dans certains cas. Ces cellules mémoires sont capables de répondre plus rapidement lors d'une seconde rencontre avec le même antigène. ([Famili, Wiekmeijer et al. 2017](#))

i) La lymphopoïèse T

À la différence des autres cellules hématopoïétiques, la différenciation et la maturation des LT ne se déroulent pas dans la moelle osseuse, mais dans le thymus ([Figure 17](#)). Le thymus est donc un organe lymphoïde primaire, bilobé, situé à la base du cou, en arrière du sternum. Les cellules destinées à devenir des LT quittent la moelle osseuse, passent dans le sang et migrent ensuite dans le thymus. Elles deviennent alors des progéniteurs T précoces ETPs (early T-cell progenitor) ou également nommées cellules doubles négatives 1 (DN1) car elles n'expriment pas les marqueurs de surface matures CD4 et CD8. Ces cellules vont perdre progressivement l'expression du Kit et du CD44 et acquérir le CD25 ([Godfrey, Kennedy et al. 1993](#)) pour devenir des cellules DN2 (DN2a et DN2b), DN3 (DN3a et DN3b) et enfin DN4. La transition du stade DN1 à DN2 est marquée par le début du réarrangement génique des chaînes β , γ et δ du récepteur LT ou pré-TCR (T cell receptor) par recombinaison VDJ ; processus qui se termine au stade DN3 ([Livak, Tourigny et al. 1999](#)). Les cellules DN3a vont ensuite pouvoir subir deux différenciations : une sélection $\alpha\beta$ ou une sélection $\gamma\delta$ en fonction du réarrangement et de l'expression des

chaînes. Ces deux sélections sont des signaux pour empêcher l'apoptose des cellules et conduisent à la prolifération et à la différenciation thymocytaire. Les lymphocytes T $\gamma\delta$ sont beaucoup moins nombreux et n'expriment ni le pré-TCR ni les marqueurs CD4 ou CD8 et ne reconnaissent donc pas les antigènes peptidiques classiques (Ciofani and Zuniga-Pflucker 2010). La β -sélection conduit à la différenciation d'une cellule DN3b exprimant le pré-TCR en cellule DN4 ou pré-DP (pré-double positif) qui va poursuivre sa maturation pour donner une cellule DP (double positive) exprimant les marqueurs de surface CD4 et CD8, après expression et réarrangement d'un pré-TCR de chaîne α avec le pré-TCR β pour former un complexe pré-TCR fonctionnel (Fehling and von Boehmer 1997). Cette cellule DP migre dans le cortex thymique et subit un processus de sélection positive. Si elle possède un récepteur TCR fonctionnel capable de reconnaître avec suffisamment d'affinité le complexe majeur d'histocompatibilité CMH des cellules épithéliales, elle reçoit un signal de survie sinon, elle va mourir par apoptose. Une fois la sélection positive faite, la maturation des lymphocytes va se faire dans la médulla en fonction du type de CMH avec lequel les cellules ont interagi. Les lymphocytes ayant lié un CMH de type II deviennent CD4⁺ SP (simple positif) et ceux un CMH de type I, CD8⁺ SP. Les thymocytes SP sont de nouveau mis en présence de peptides du soi et si leur affinité est trop importante, ils seront éliminés par apoptose : c'est la sélection négative (Starr, Jameson et al. 2003).

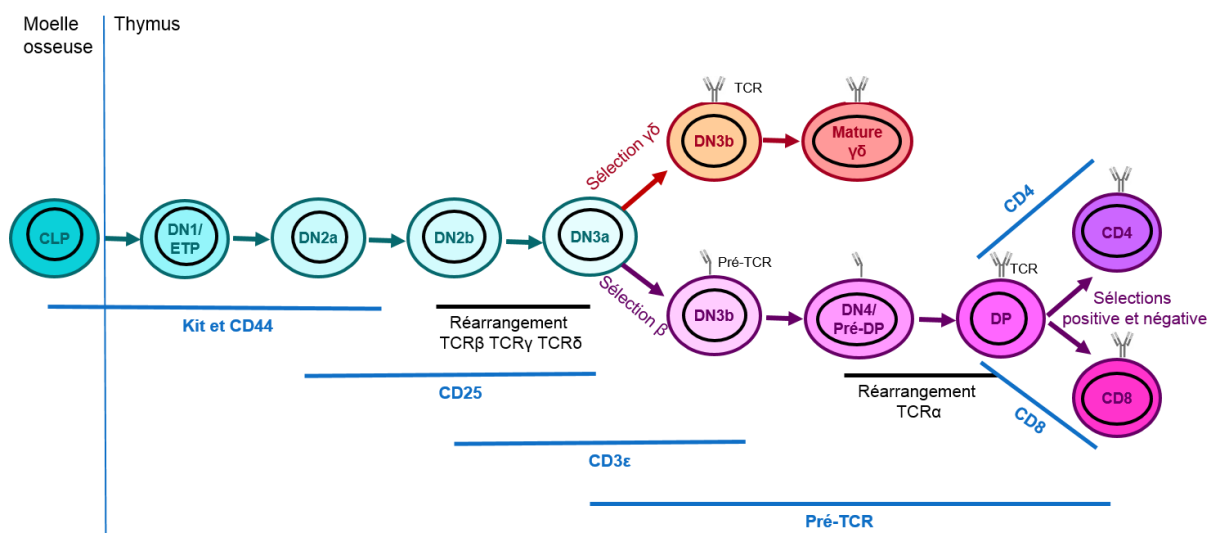


Figure 17 : La lymphopoïèse T chez la souris d'après (Ciofani and Zuniga-Pflucker 2010). Les progéniteurs lymphoïdes communs CLP de la moelle osseuse vont dans le thymus via la circulation sanguine et deviennent des progéniteurs thymiques précoces ETP. Les ETPs vont se différencier et maturer en DN puis DP et SP. Les marqueurs de surface exprimés sont notés en bleu sous les populations.

ii) La lymphopoïèse B

À partir de la naissance, la moelle osseuse chez la souris contient tout le lignage lymphoïde B, du progéniteur à la cellule mature B (Figure 18). Différentes approches

permettant d'identifier et d'isoler les cellules en fonction de leur étape dans la différenciation, ont été décrites grâce à l'utilisation de marqueurs intracellulaire et de surface et aux réarrangements faits des chaînes des immunoglobulines exprimées (Hardy, Carmack et al. 1991). Lorsque les progéniteurs CLPs s'engagent vers un lignage B, ils expriment toujours le Kit et commencent à exprimer l'isoforme B220, mais ne possèdent pas le marqueur CD19 caractéristique d'une maturation plus engagée (Ogawa, ten Boekel et al. 2000). Ils deviennent des précurseurs B ou Pre-Pro-B ou encore fraction A (Fr. A) (Hardy and Hayakawa 2001). Les Pre-Pro-B expriment ensuite le marqueur CD19 et deviennent des cellules Pro-B ou fraction B/C (Fr. B/C). Ces cellules expriment toujours le Kit et subissent un réarrangement des gènes des chaînes lourdes (HC) des immunoglobulines Ig par recombinaison DJ conduisant à l'expression d'une protéine liée à la membrane μ HC. Ensuite, par recombinaison VDJ, les cellules Pro-B perdent l'expression du Kit, acquièrent le CD25 et expriment un pré-BCR (B cell receptor). Ce pré-BCR (Figure 19) est l'association de la chaîne lourde μ avec la pseudo-chaîne légère (SLC) préexistante constituée de l'association des protéines λ -like et Vpré-B et avec les molécules de transduction Ig- α et Ig- β (Karasuyama, Kudo et al. 1990). Une fois que le pré-BCR est exprimé, la cellule sera soumise à une première sélection appelée positive. Cette dernière permettra à la cellule Pre-B dite large ou fraction C' (Fr. C'), dans le cas où l'expression est productive, de recevoir un signal de survie afin de poursuivre sa maturation où elle deviendra un cellule Pre-B dite small ou fraction D (Fr. D). Dans le cas contraire la cellule mourra (Melchers, Rolink et al. 1995). Ensuite, le réarrangement des chaînes légères conduit à l'expression d'un récepteur B (BCR) où les chaînes légères LC remplacent les chaînes SLC (Melchers, Rolink et al. 1995, LeBien 1998, Jumaa, Hendriks et al. 2005). Ce sont des cellules immatures B ou fraction E (Fr. E) qui expriment alors à leur surface l'immunoglobuline IgM si le réarrangement a été productif. La cellule va ensuite être soumise à une deuxième sélection, cette fois dite négative, en étant mise en présence de peptides du soi au niveau de la moelle osseuse par les cellules stromales qui les expriment à la surface des molécules du CMH. Si la cellule immature B a une trop forte affinité ou aucune affinité pour le peptide présenté, elle sera éliminée par apoptose (Carsetti, Kohler et al. 1995, Ceredig and Rolink 2012). Une fois que le récepteur BCR est correctement exprimé (et n'a pas d'auto-réaction), les cellules immatures B quittent la moelle osseuse et migrent vers les organes lymphoïdes secondaires comme la rate pour effectuer leur maturation et exprimer l'immunoglobuline IgD (Martensson and Ceredig 2000).

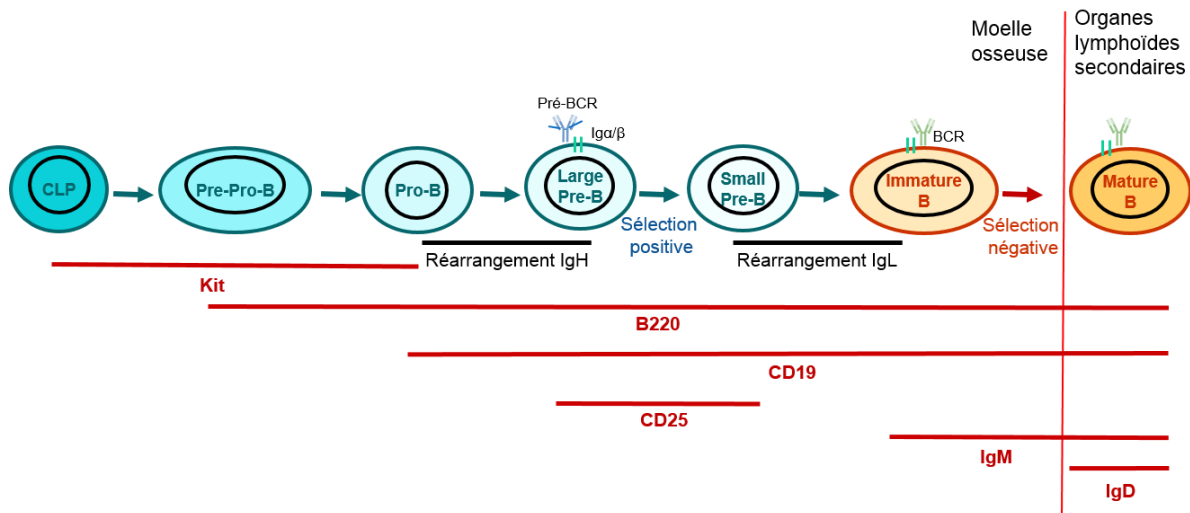


Figure 18 : La lymphopoïèse B chez la souris. Les progéniteurs lymphoïdes communs CLP de la moelle osseuse deviennent des progéniteurs B précoces Pre-Pro-B. Les Pre-Pro-B vont se différencier et mûrir en Pro-B, Pre-B puis en immatures B. Les cellules B vont devenir matures une fois dans les organes lymphoïdes secondaires. Les marqueurs de surface exprimés sont notés en rouge sous les populations.

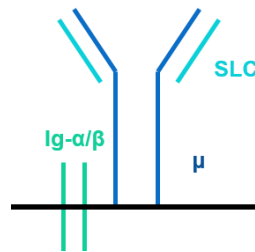


Figure 19 : Récepteur pré-BCR. Le pré-BCR est composé de deux chaînes lourdes μ et deux chaînes légères SLC qui s'associent aux Ig α et β .

b) La mégacaryopoïèse et la thrombopoïèse

Le processus par lequel les HSCs génèrent des mégacaryocytes matures (MKs) est appelé la mégacaryopoïèse (Figure 20). Les MKs sont de très grosses cellules (50-100 μ m de diamètre), peu nombreuses (moins de 1% dans la moelle osseuse), dont la fonction principale est de produire des plaquettes, phénomène appelé thrombopoïèse. Les plaquettes sanguines sont de petites cellules sans noyau circulant dans le sang et ayant un rôle essentiel dans la coagulation. La mégacaryopoïèse peut être divisée en deux grandes étapes : une phase de prolifération suivie d'une phase de maturation composée d'un phénomène d'endomitose et d'une maturation cytoplasmique. En effet, les progéniteurs mégacaryocytaires sont capables de proliférer et de générer des MKs matures *in vitro*. Des expérimentations clonales ont par la suite permis d'identifier de manière hiérarchique différents progéniteurs mégacaryocytaires (MkPs) grâce à leurs capacités de prolifération. Les progéniteurs BFU-MK sont les plus précoces avec une grande capacité de prolifération.

Ils se différencient en CFU-MK avec une prolifération plus limitée. Un troisième type de progéniteur apparaît ensuite (PMKB ou promégacaryoblaste) formant un nombre limité de mégacaryoblastes, mais ayant une haute ploïdie. Ces différents MkPs expriment tous le marqueur de surface CD34 à la différence des mégacaryoblastes et des MKs matures (Chang, Bluteau et al. 2007). Les mégacaryoblastes sont des MKs immatures qui subissent un phénomène d'endomitose augmentant leur taille et leur ploïdie. Elles font partie des rares cellules qui deviennent polyploïdes dans un contexte normal et non en réponse à un stress. L'endomitose correspond à une mitose incomplète où les cellules entrent en division, mais les étapes postérieures à l'anaphase échouent. Il n'y a donc pas de séparation des cellules filles, la cellule est 4N et poursuit sa division cellulaire pour ensuite rentrer dans un nouveau cycle mitotique. La ploïdie des MKs peut varier de 2 à 128N, mais 50% des MKs ont une ploïdie de 16N (Chang, Bluteau et al. 2007, Pandit, Westendorp et al. 2013). Les mégacaryoblastes subissent une maturation cytoplasmique dans la moelle osseuse au cours de laquelle des protéines plaquettaires sont synthétisées. Cette maturation s'accélère après les endomitoses, entraîne la formation de longues extensions cytoplasmiques ou proplaquettes autour du MK mature qui deviennent des plaquettes fonctionnelles suite à une fragmentation cytoplasmique, et achève la différenciation des MKs, dans la circulation sanguine (Szalai, LaRue et al. 2006). Alors que les MKs immatures perdent l'expression du CD34, ils acquièrent le CD41, une intégrine impliquée dans la liaison du fibrinogène formant un complexe avec la glycoprotéine CD61. Chez l'homme, il a été récemment découvert que le marqueur CD41 apparaît très tôt dans la différenciation et reste présent pour les MKs matures (Miyawaki, Iwasaki et al. 2017). Les MKs matures expriment en plus le CD42, une glycoprotéine exprimée à la surface des membranes plaquettaires (Szalai, LaRue et al. 2006).

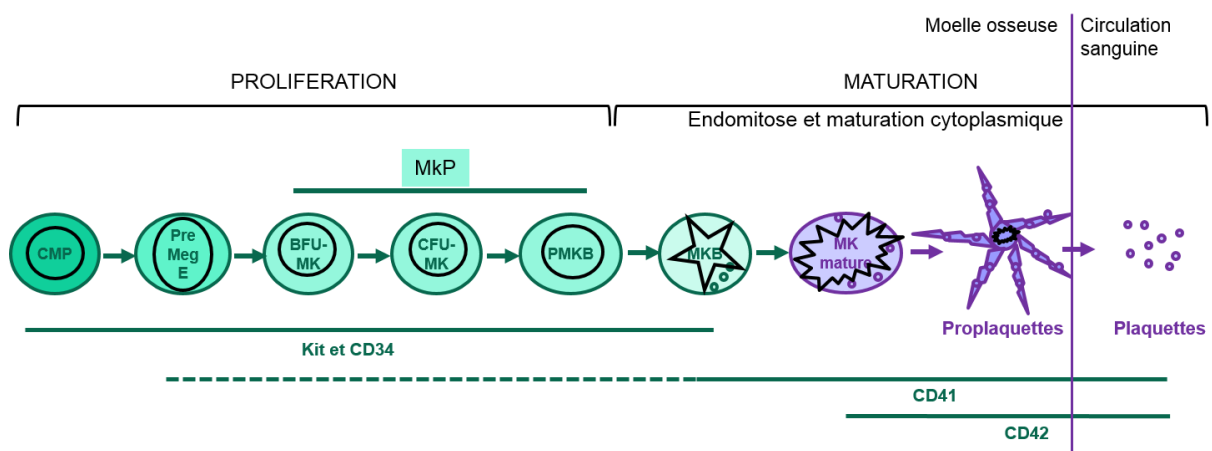


Figure 20 : La mégacaryopoïèse chez la souris. Les progéniteurs qui s'engagent dans la voie mégacaryocytaire prolifèrent et se différencient en MkP. Les MkPs mûrissent en mégacaryoblastes (MKB) puis en MK mature après des phénomènes d'endomitose. Ces derniers réalisent une thrombopoïèse et génèrent des

c) L'érythropoïèse

L'érythropoïèse qui se déroule dans la moelle osseuse, est le processus par lequel les progéniteurs érythroïdes nucléés prolifèrent et se différencient pour générer des millions d'érythrocytes ou globules rouges anucléés qui ont un rôle crucial dans le transport de l'oxygène des poumons vers les tissus périphériques via l'hémoglobine (Figure 22). Comme pour la mégacaryopoïèse, deux progéniteurs érythroïdes distincts ont été fonctionnellement définis par leur clonogénéicité : le progéniteur précoce BFU-E qui forme de large colonies rouges et le progéniteur plus tardif CFU-E (Gregory and Eaves 1978). Les progéniteurs BFU-E sont trouvés dans la fraction cellulaire dépourvue de cellules matures, exprimant le Kit, mais pas le CD16/32 ni le CD34 et très peu le CD71 (Akashi, Traver et al. 2000, Terszowski, Waskow et al. 2005) alors que les CFU-E expriment fortement le CD71 (Terszowski, Waskow et al. 2005). Le premier érythroblaste morphologiquement reconnaissable dans les tissus hématopoïétiques est le proérythroblaste. La transition des progéniteurs CFU-E aux proérythroblastes s'accompagne d'une perte de l'expression du Kit et d'un gain de l'expression du Ter119. Au cours de sa maturation, par des mitoses successives, l'érythroblaste va devenir de plus en plus petit, son noyau va se condenser et il va accumuler de l'hémoglobine dans son cytoplasme. Cinq étapes de maturation des érythroblastes sont identifiées en fonction de leur morphologie : le proérythroblaste puis l'érythroblaste basophile suivi de l'érythroblaste polychromatique et orthochromatique et enfin le réticulocyte (Chen, Liu et al. 2009). L'expression des marqueurs de surface CD71 et Ter119 ont été utilisés pour séparer les cellules érythroïdes de la moelle osseuse en différents compartiments (I à IV pour (Socolovsky, Nam et al. 2001) et de R1 à R5 pour (Zhang, Socolovsky et al. 2003)). En prenant en compte ces deux références, nous pouvons diviser en six compartiments les populations érythroïdes en fonction de leur expression des marqueurs Ter119 et CD71 : (1) Ter119⁻CD71^{low} (BFU-E), (2) Ter119⁻CD71^{high} (CFU-E), (3) Ter119^{med}CD71^{high} (proérythroblastes), (4) Ter119^{high}CD71^{high} (érythroblastes basophiles), (5) Ter119^{high}CD71^{med} (late érythroblastes basophiles et érythroblastes polychromatiques), (6) Ter119^{high}CD71^{low} (érythroblastes orthochromatiques et réticulocytes et érythrocytes matures) (Figure 21). Le marqueur de surface CD44 peut s'avérer utile pour permettre une distinction plus précise des populations érythrocytaires, particulièrement en fin de différenciation pour différencier les cellules du stade (6) (Liu, Zhang et al. 2013).

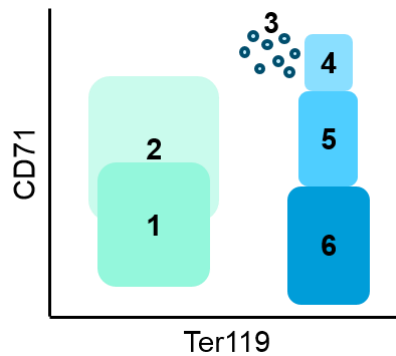


Figure 21 : Analyse en cytométrie de flux des cellules érythrocytaires. Analyse avec les marqueurs de surface CD71 et Ter119 qui séparent les cellules érythrocytaires en 6 populations.

Les proérythroblastes réalisent 4 mitoses et de manière séquentielle génèrent 2 érythroblastes basophiles, 4 érythroblastes polychromatiques, 8 érythroblastes orthochromatiques et 16 réticulocytes (Liu, Zhang et al. 2013). Au stade de l'érythroblaste orthochromatique, un processus d'énucléation va avoir lieu. En effet, le noyau condensé est polarisé d'un côté du cytoplasme puis éjecté formant un réticulocyte et un noyau entouré légèrement de cytoplasme et d'une membrane plasmique qui va être reconnu par des macrophages (Yoshida, Kawane et al. 2005). Après une brève période dans la moelle osseuse, les réticulocytes sont relargués dans la circulation sanguine où ils éliminent leur ARN résiduel et deviennent des érythrocytes matures (Ney 2011).

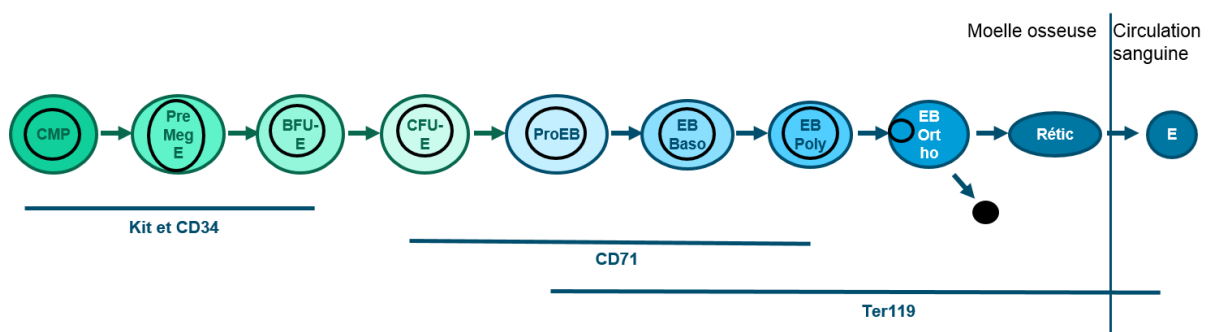


Figure 22 : L'érythropoïèse chez la souris. Les progéniteurs qui s'engagent dans la voie érythrocytaire prolifèrent et se différencient en progéniteurs érythroïdes (EPs). Les EPs mûrissent en Proérythroblastes (ProEB) puis en érythroblastes basophiles (EB Baso), polychromatiques (EB Poly), orthochromatiques (EB Ortho), réticulocytes (Rétic) puis en érythrocytes (E) dans le sang. L'expression des principaux marqueurs de surface est indiquée en bleu sous les populations.

3) Les RhoGTPases et leurs régulateurs dans l'hématopoïèse

L'implication des RhoGTPases dans le développement et la fonction des cellules sanguines a d'abord été mise en évidence grâce à l'étude du rôle de leurs régulateurs et effecteurs. Les premières analyses ont été réalisées en utilisant la surexpression de mutants constitutivement actifs ou dominants négatifs et l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques. À

cause d'un manque de spécificité, de problème de dosage et un contrôle spatio-temporel limité de ces mutants et inhibiteurs, les résultats apportés sont généralement à confirmer. Mais les expériences récentes de gène ciblé chez la souris ont permis d'analyser l'impact direct des RhoGTPases elles-mêmes sur l'hématopoïèse.

a) Implication dans la régulation des HSCs et progéniteurs

Les principales fonctions cellulaires impliquées dans le maintien, la prolifération, la migration des HSCs et des progéniteurs sont régulées par de nombreuses RhoGTPases comme RhoA, Rac1 et 2 et Cdc42. Les fonctions physiologiques de chaque GTPase peuvent être uniques et spécifiques du contexte.

Rac et Cdc42 ont principalement été décrits comme ayant un rôle de maintien et une implication dans la prise de greffe et de migration des cellules souches et des progéniteurs hématopoïétiques (HSPCs) (Cancelas, Lee et al. 2005, Yang, Wang et al. 2007) alors que RhoA serait essentielle pour la différenciation des HSCs, la régulation de la division des progéniteurs ainsi que leur survie (Zhou, Florian et al. 2013).

En effet, les souris Rac2^{-/-} présentent une diminution de l'adhésion des HSPCs ainsi qu'une augmentation de leur nombre circulant dans le sang et une migration cellulaire augmentée suggérant un rôle important de Rac2 dans le maintien des HSPCs dans la moelle osseuse. De plus, l'absence de Rac2 entraîne un mécanisme de compensation avec une augmentation de l'activité de Cdc42 et Rac1, mais qui ne change pas les défauts d'adhésion observés (Yang, Atkinson et al. 2001). Rac2 est donc indispensable pour l'adhésion des HSPCs et Rac1, Rac2 et Cdc42, pour le maintien du pool de HSPCs dans la moelle ainsi que leur migration dans le sang. Rac1 est également requis pour la relocalisation des HSPCs dans la moelle osseuse après transplantation. En effet, les HSPCs greffées provenant de souris Rac1^{-/-}, ne se relocalisent pas correctement dans la moelle osseuse (Cancelas, Lee et al. 2005).

Concernant Cdc42, il a été montré que cette GTPase régule et coordonne les signaux extrinsèques et intrinsèques qui contrôlent la localisation microanatomique, l'interaction avec le microenvironnement et l'induction du cycle cellulaire des HSPCs. En effet, les souris Cdc42^{-/-} inductibles montrent une diminution du nombre et de la fréquence des HSCs quiescents dans la moelle et une augmentation des HSPCs en division cellulaire. De plus, l'absence de Cdc42 provoque des problèmes d'adhésion, de localisation, de maintien des HSCs et une hématopoïèse défectueuse après transplantation (Yang, Wang et al. 2007).

L'effet de RhoA sur l'hématopoïèse a été beaucoup moins étudié que pour Rac et Cdc42. Son rôle a été montré indirectement par l'utilisation d'un mutant dominant négatif RhoAN19 où l'inhibition de l'activité de RhoA est associée à une amélioration de la prise de greffe *in vivo* (Ghiaur, Lee et al. 2006). Lorsque RhoA est suractivée suite à l'absence de la GAP p190B (souris où l'expression de p190B est réprimée), l'activité d'autorenouvellement des HSCs est augmentée après des greffes sériées (Xu, Eleswarapu et al. 2009). Ces résultats suggèrent une fine régulation de RhoA dans le maintien des HSCs. Cependant, les expériences récentes de Zhou et al. contredisent cette notion. En effet, il semblerait que l'absence de RhoA chez des souris déficientes (RhoA^{-/-}) n'affecte pas la prise de greffe des HSCs mais porte atteinte à la fonction des progéniteurs multipotents. Sans RhoA, il y a une diminution de l'activité de la protéine MLC dans les progéniteurs hématopoïétiques (HPCs) et des défauts dans la cytodivision et la migration cellulaire. RhoA est donc essentielle pour la prolifération des HPCs, mais également pour leur survie (Zhou, Florian et al. 2013).

b) Implication dans la lymphopoïèse

Comme pour les HSPCs, Rac1, Rac2 et Cdc42 semblent avoir des rôles similaires dans la lymphopoïèse contrairement à RhoA.

Le tandem Rac1 et Rac2 est indispensable pour le développement lymphocytaire T. En effet, en leur absence, le développement lymphocytaire T ainsi que la capacité des cellules matures à migrer vers les organes lymphoïdes secondaires sont fortement inhibés. Un système de compensation est mis en place lorsque l'une ou l'autre des GTPases est absente, suggérant un même rôle pour ces deux protéines G dans la lymphopoïèse T (Guo, Cancelas et al. 2008). Le rôle de Cdc42 dans la lymphopoïèse T murine a été pour le moment étudié grâce à sa suractivation par le mutant constitutivement actif Cdc42Q61L. Cdc42 a un rôle primordial dans le développement et la survie des lymphocytes T. En effet, lorsque Cdc42 est suractivé, un blocage dans la différenciation au niveau des DN ainsi qu'une suractivation de la voie de signalisation impliquée dans l'apoptose des thymocytes sont observés (Na, Li et al. 1999). RhoA a également été étudiée suite à sa suractivation (RhoAV14) chez la souris. Cette RhoGTPase intervient dans l'adhésion des thymocytes, mais également dans la sélection positive des thymocytes DP. En effet, la suractivation de RhoA révèle une sélection positive plus efficace (Corre, Gomez et al. 2001). Mais les études sur le rôle de RhoA sont encore limitées.

Concernant le rôle des RhoGTPases sur la lymphopoïèse B, les connaissances sont encore plus restreintes. Rac1 ne semble pas avoir d'action sur la lymphopoïèse B, mais les effets observés lors de l'absence de Rac2 sont accentués avec la non-expression de Rac1.

Rac1 et Rac2 ne semblent pas requis pour la génération et l'expansion des progéniteurs B, mais la présence concomitante de ces deux protéines est indispensable dans les dernières phases de la lymphopoïèse B. Lorsqu'elles ne sont pas exprimées dans le lignage B, le nombre de cellules matures présentes dans les organes lymphoïdes secondaires est fortement diminué. Ceci est dû à l'implication de ces deux protéines G dans la transduction du signal BCR conduisant à la survie et la prolifération des LB (Walmsley, Ooi et al. 2003). Le même rôle a été mis en évidence pour Cdc42 (Guo, Velu et al. 2009).

c) Implication dans la mégacaryopoïèse

La découverte majeure de l'implication des RhoGTPases lors de la mégacaryopoïèse est le rôle de la régulation de la voie de signalisation de RhoA dans l'endomitose et la formation des plaquettes. RhoA a un rôle crucial dans le développement des MKs. Cette RhoGTPase est peu active lors des endomitoses des MKs pour que le sillon de clivage régresse et que la séparation en deux cellules filles échoue permettant aux MKs d'être multinucléés. Cette faible activité de RhoA est corrélée à une sous-expression des GEFs Ect2 et GEF-H1. De plus, il a été observé que la polyploïdisation des MKs est inhibée si ces deux GEFs sont surexprimées (Gao, Smith et al. 2012). Lorsque l'expression de RhoA est inhibée, la ploïdie des MKs est augmentée (Suzuki, Shin et al. 2013). Mais l'inactivation ou l'absence de RhoA provoque une macrothrombocytopénie, une diminution de la survie des MKs et une diminution de la production plaquettaire suggérant un rôle et une régulation cruciaux de RhoA au cours de la mégacaryopoïèse et de la thrombopoïèse (Suzuki, Shin et al. 2013). Une suractivation de RhoA (mutant RhoAV14) inhibe la formation des proplaquettes alors qu'une non-activation de RhoA (mutant RhoN19) l'augmente. De plus, l'inhibition par un composé pharmacologique de l'effecteur de RhoA, ROCK, provoque également une augmentation de la formation des proplaquettes (Chang, Aurade et al. 2007). RhoA par son effecteur ROCK intervient donc dans la thrombopoïèse en limitant la formation des proplaquettes et en régulant le flux de relargage des plaquettes dans le sang.

d) Implication dans l'érythropoïèse

Les RhoGTPases jouent d'importants rôles régulateurs lors des différentes étapes de différenciation érythrocytaire et sont vitaux pour le processus d'énucléation des érythroblastes. En effet, l'absence conjointe de Rac1 et Rac2 entraîne une diminution significative du nombre de MEPs et de CFU-E dans la moelle ainsi qu'une diminution de leur prolifération. De plus, une activation excessive ou une inhibition des protéines Rac empêche l'énucléation des érythroblastes. Chez les souris délétées de Rac1 et Rac2, Rac3 est

surexprimée et permet l'énucléation ([Konstantinidis, George et al. 2010](#)). La délétion de Cdc42 entraîne également une diminution du nombre de MEPs et BFU-E et CFU-E conduisant à une forte anémie. Une suractivation de Cdc42 affecte l'érythropoïèse en déclenchant l'apoptose donc Cdc42 est aussi un important régulateur de l'érythropoïèse ([Wang, Yang et al. 2006](#), [Yang, Wang et al. 2007](#)). Enfin, l'étude du rôle de RhoA dans l'érythropoïèse n'a pas encore été directement analysée. L'inhibition de son effecteur ROCK provoque *in vitro*, une diminution de la maturation des érythroblastes ([Gabet, Coulon et al. 2011](#)) et l'absence de son effecteur Dia *in vivo* entraîne une diminution du nombre de BFU-E et CFU-E ainsi qu'une énucléation limitée dans le foie fœtal ([Watanabe, De Zan et al. 2013](#)) suggérant un rôle important de RhoA dans l'érythropoïèse et l'énucléation comme les autres RhoGTPases.

Les analyses des RhoGTPases et de leurs régulateurs suggèrent des rôles importants dans les différentes étapes de l'hématopoïèse, mais restent aujourd'hui encore peu nombreuses et nécessitent d'être poursuivies.

Partie III – Les objectifs de thèse

Une nouvelle RhoGAP, ARHGAP19, a été identifiée par le laboratoire (David, Petit et al. 2014). Cette protéine est préférentiellement synthétisée dans le système hématopoïétique et son rôle a tout d'abord été étudié dans des lignées lymphocytaires T. ARHGAP19 est une GAP de RhoA, mais pas de Rac1 ni de Cdc42. Elle intervient de manière cruciale pendant la division des lymphocytes T. En effet, sa surexpression entraîne un retard dans l'élongation cellulaire et dans la cytodierèse. De plus, une absence d'ARHGAP19 ou une inactivation de cette GAP provoque une élongation cellulaire et une ingression du sillon de clivage précoces ainsi que des défauts dans la ségrégation des chromosomes. Enfin, ARHGAP19 contrôle le recrutement des protéines Myosine II et Citron à la membrane plasmique des lymphocytes T en division, ainsi que la localisation de la protéine Vimentine phosphorylée par ROCK, ce qui est indispensable pour le maintien de la rigidité et de la forme des cellules en cours de division.

Le premier projet de ma thèse a été de poursuivre l'étude de la régulation d'ARHGAP19 par phosphorylation dans la division des lymphocytes T humains, débutée par le précédent doctorant Dominique Petit. Les analyses se sont portées sur deux thréonines (T404 et T476) qui sont phosphorylées par la kinase mitotique CDK1, et sur une sérine (S422) qui est phosphorylée par ROCK, l'effecteur de RhoA. Les résultats, publiés dans *Journal of Cell Science*, démontrent un rôle crucial des phosphorylations d'ARHGAP19 dans la régulation de la localisation de la protéine contribuant à une division cellulaire correcte.

Le gène *arhgap19* a été mis en évidence lors de l'analyse de gènes de la voie des RhoGTPases dont l'expression covariait dans des échantillons de patients atteints de leucémies aiguës lymphoblastiques T (LAL-T). L'expression relativement restreinte d'*arhgap19* aux cellules d'origine hématopoïétique ainsi que sa présence dans des LAL-T suggèrent un rôle spécifique d'ARHGAP19 dans le système hématopoïétique. C'est pourquoi le deuxième projet de ma thèse a consisté à étudier le rôle d'ARHGAP19 dans l'hématopoïèse murine en analysant les conséquences de l'absence de la protéine dans un modèle murin d'inactivation conditionnelle du gène *arhgap19*. Les résultats obtenus ne nous ont malheureusement pas permis de soumettre une publication.

RÉSULTATS

Partie I – Etude de la régulation d'ARHGAP19 par phosphorylation dans la division des lymphocytes T humains

Article: Phosphorylation of ARHGAP19 by CDK1 and ROCK regulates its subcellular localization and function during mitosis.

Claire Marceaux, Dominique Petit, Jacques Bertoglio and Muriel D. David

Les protéines impliquées dans la division cellulaire étant généralement finement régulées, nous nous sommes intéressés à la régulation par phosphorylation d'ARHGAP19 au cours de la division des lymphocytes T humains.

ARHGAP19 est tout d'abord phosphorylée par la kinase ROCK sur la sérine 422 avant l'entrée en mitose. Cette phosphorylation permet l'interaction avec la famille de protéines 14-3-3. Lorsque la membrane nucléaire se rompt en début de division cellulaire, la protéine ARHGAP19 se retrouve dans le cytoplasme où la kinase CDK1 active vient la phosphoryler sur les résidus thréonines 404 et 476. L'interaction avec 14-3-3 protège alors ARHGAP19 d'une déphosphorylation par des phosphatases présentes dans la cellule. Les phosphorylations d'ARHGAP19 apparaissent nécessaires pour sa localisation spécifique au cours de la mitose et sont cruciales pour une bonne division cellulaire. En effet, en absence de phosphorylation, ARHGAP19 est prématurément membranaire et les cellules deviennent multinucléées suite à des défauts de la cytodivision.

La régulation d'ARHGAP19 par phosphorylation est indispensable pour une juste localisation de la GAP au cours de la division des lymphocytes T afin de garantir une division cellulaire correcte.

Phosphorylation of ARHGAP19 by CDK1 and ROCK regulates its subcellular localization and function during mitosis.

ACCEPTED

Claire Marceaux¹, Dominique Petit¹, Jacques Bertoglio^{1,2} and Muriel D. David^{1,2}

¹Inserm U749 and Inserm U1170, Gustave Roussy, 94805 Villejuif, France

²Correspondence:jacques.bertoglio@gustaveroussy.fr or muriel.david@gustaveroussy.fr

Abstract

ARHGAP19 is a hematopoietic-specific RhoGAP that acts through the RhoA/ROCK pathway to critically regulate cell elongation and cytokinesis during lymphocyte mitosis. We report here that during mitosis progression, ARHGAP19 is sequentially phosphorylated by the RhoA-activated kinase ROCK on serine residue 422 and by CDK1 on threonine residues 404 and 476. The phosphorylation of ARHGAP19 by ROCK occurs before mitosis onset and generates a binding site for 14-3-3 family proteins. ARHGAP19 is then phosphorylated by CDK1 in prometaphase. The docking of 14-3-3 proteins to phosphorylated S422 protects ARHGAP19 from dephosphorylation of the threonine sites and prevents ARHGAP19 from relocating to the plasma membrane during prophase and metaphase, thus allowing RhoA to become activated. Disruption of these phosphorylation sites results in premature localization of ARHGAP19 at the cell membrane and in its enrichment to the equatorial cortex in anaphase leading to cytokinesis failure and cell multinucleation.

Introduction

Rho GTPases are small G proteins involved in a number of signaling pathways that control cell adhesion, migration and cytokinesis (Hall 2012, Chircop 2014). Through their ability to bind guanine nucleotide di- or tri-phosphate, GTPases act as molecular switches alternating between an inactive and active state, respectively. Signaling pathway activity is regulated by Guanine Exchange Factors (GEFs) that facilitate the nucleotide exchange from GDP to GTP, and GTPase Activating Proteins (GAPs) that catalyze GTP hydrolysis to GDP, resulting in signaling pathway activation and deactivation, respectively. Small GTPases of the Rho family play key regulatory roles during mammalian cell division. In particular, RhoA regulates cortical rigidity during cell rounding and constriction of the actomyosin contractile ring during

cytokinesis (Maddox and Burridge 2003, Kamijo, Ohara et al. 2006). Activity of Rho GTPases must be tightly regulated to insure that the various steps of the cell division process occur in a coordinated manner. Previous studies on Rho GTPases regulation during mitosis have underlined the importance of three GEFs, Ect2 (Tatsumoto, Xie et al. 1999), GEF-H1 (Birkenfeld, Nalbant et al. 2007) and MyoGEF (Wu, Asiedu et al. 2006) and two GAPs, RacGAP1 also known as MgcRacGAP and p190A RhoGAP (Hirose, Kawashima et al. 2001, Su, Agati et al. 2003). Recently ARHGAP11A, described as M-phase GAP, was shown to control the zone of active RhoA in mitotic HeLa cells (Zanin, Desai et al. 2013). We have previously shown that the novel hematopoietic cell-specific RhoGAP ARHGAP19 is involved in cell shape changes during lymphocyte mitosis by regulating RhoA activity and subsequent ROCK-mediated phosphorylation of myosin and vimentin (David, Petit et al. 2014).

Proteins that are active during cell cycle progression, including Rho-GEFs and -GAPs are tightly regulated during cell division (David, Petit et al. 2012). Expression levels of some of the Rho GTPase regulators involved in mitosis control (e.g. Ect2, MgcRacGAP or ARHGAP19) fluctuate during the cell cycle and reach their highest in G2/M (Seguin, Liot et al. 2009, Liot, Seguin et al. 2011, David, Petit et al. 2014). Another shared mode of regulation of these proteins is through phosphorylation. Such post-translational modifications often control their ability to interact with other proteins, and thereby affect their subcellular localization. In addition there are examples where phosphorylation directly regulates the activity of a GEF or a GAP by modifying their conformation (Hara, Abe et al. 2006, Tripathi, Qian et al. 2014). In our previous study on the role of ARHGAP19 in cytokinesis control, we gathered evidence that ARHGAP19 must be subject to post-translational regulations. First, while overexpression of ARHGAP19 delayed cytokinesis onset, it did not impact on the velocity of cleavage furrow ingression, suggesting that ARHGAP19 action was restricted to the early mitosis time window. Second, we noted that localization of ARHGAP19 during mitosis progression was highly dynamic, shuttling between the cytosol, the cell cortex and the nucleus of daughter cells. These observations suggested that one or several mitotic kinases may regulate ARHGAP19 sub-cellular localization. Among the numerous kinases that are at play during mitosis, CDK1 is believed to be one of the main coordinators insuring that cytokinesis does not occur before chromosome segregation (Lindon 2008). In this report, we show that ARHGAP19 is phosphorylated by CDK1 on two residues, T404 and T476 located in the C-Terminal region of the protein. Furthermore, ARHGAP19 is phosphorylated on S422 by the Rho effector kinase ROCK thus generating a binding site for 14-3-3 proteins.

We investigated whether these post-translational modifications have an influence on the function or localization of the ARHGAP19 protein during mitosis. Results from microscopy imaging experiments indicated that protein phosphorylation has an impact on its localization,

as we observed that non-phosphorylated mutant forms of ARHGAP19 are recruited at the cell cortex as soon as the prophase step, while wild-type ARHGAP19 does so only from the metaphase to anaphase transition. Cell cortex localization of the non-phosphorylated mutant forms of ARHGAP19 at later stages of mitosis was also more pronounced than that of the wild-type form. Finally, ARHGAP19 phosphorylation appeared to be essential during cell division. Mutation of either CDK1 or ROCK phosphorylation sites resulted in cytokinesis failure and cell multinucleation.

Results

ARHGAP19 is phosphorylated by CDK1 in early mitosis

CDK1 phosphorylates its substrates on threonine or serine residues present in TP-x-R or SP-x-R motifs, respectively. Analysis of the protein sequence of ARHGAP19 revealed the presence of two potential phosphorylation sites for CDK1, namely the threonine residues at positions 404 and 476 (Fig. 1A). To assess whether ARHGAP19 is phosphorylated on one or both of these TP-x-R motifs, endogenous ARHGAP19 was immunoprecipitated from Kit225 lymphocytes synchronized in G1, S-G2, prometaphase or later mitotic stages. As shown in Fig. 1B, ARHGAP19 from nocodazole-treated prometaphasic cells is recognized by an anti-phospho-TP antibody. The level of ARHGAP19 phosphorylation on TP motifs decreased upon removal of the synchronizing agent which allowed cells to resume progression in mitosis. Of note, after cell release from the nocodazole-induced block in prometaphase, the phospho-TP signal decreased at a higher rate than that of ARHGAP19, suggesting the occurrence of an active dephosphorylation of ARHGAP19 by one or several phosphatases. Given that both the 404 and the 476 threonine residues of ARHGAP19 lay in motifs fitting the consensus of sites subject to CDK1-mediated phosphorylation, we tested whether active CDK1 can phosphorylate ARHGAP19. Using an *in vitro* kinase assay, we found that GST-ARHGAP19 can be phosphorylated on TP motifs in the presence of recombinant CDK1/CCN complex (Fig. 1C). This phosphorylation is abrogated by the double T404A/T476A mutation, but not by the single T404A or T476A mutations (Fig. 1D). To allow further investigation of the phosphorylation events occurring on the 404 and 476 threonine residues, we generated antibodies against the corresponding phospho-peptides. The *in vitro* kinase assay described above allowed us to confirm that these antibodies recognize their respective targets specifically (Fig. 1D).

To confirm the role of CDK1 on the T404/T476 phosphorylation, Kit225 lymphocytes were synchronized in prometaphase using a 16 hours nocodazole treatment (40 ng/ml) with the

RO3306 inhibitory compound (9 $\mu\text{g/ml}$) being added (or not) for the last 4 hours before cells were processed for western blot analysis. The phospho-T404/T476 signals are abrogated when CDK1 is inhibited by RO3306 treatment (Fig. 1E). This result indicates that threonines 404 and 476 of ARHGAP19 are targeted by the kinase CDK1 in cells.

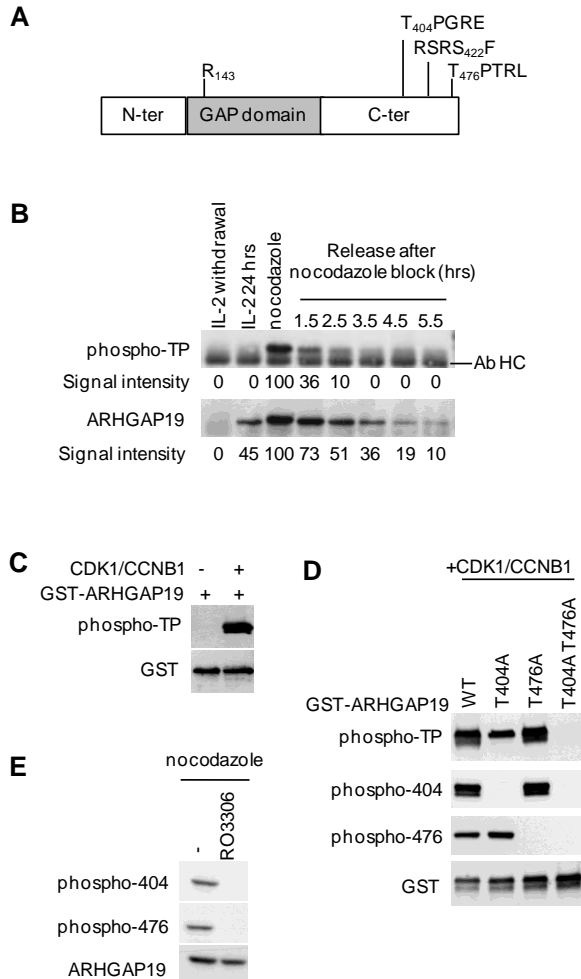


Fig. 1: ARHGAP19 is a substrate of CDK1, ROCK and AKT.

(A) The CDK1 and ROCK/AKT phosphorylation consensus motifs (S/T-P-x-R/K, R/K-x-x-S/T-x and R-x-R-x-x-S/T-x) are located in the C-terminal region of ARHGAP19 at position 404, 476 and 422, outside the GAP domain containing the catalytic Arginine R143. (B) IL-2-dependent Kit225 cells were synchronized in G1 by factor deprivation, then stimulated to re-enter cell cycle by adding back IL-2 for 24 hours. Where indicated, cells were blocked in prometaphase using nocodazole, washed, and cultured for up to 5.5 hours. Phosphorylation of ARHGAP19 is revealed by an anti-phospho-TP antibody and the signal rapidly decreases upon removal of nocodazole. As shown previously, endogenous ARHGAP19 levels are cell cycle-regulated and reach a maximal in mitosis. Numbers represent signal intensities quantified from the blots immediately above, and are expressed as percentages of the signal intensities measured for the nocodazole-treated sample. (C and D) *In vitro* kinase assays. GST-ARHGAP19 in its wild-type form, or with residues T404 and T476 mutated into non phosphorylatable Alanine, were incubated in the presence of recombinant CDK1/CCNB1. Western blots were performed using the anti-phospho-TP antibody, and antibodies specifically recognizing the phosphorylated forms of residues T404 and T476. (E) WT ARHGAP19-expressing cells were arrested in prometaphase by treatment with nocodazole and then incubated with the RO3306 CDK1 inhibitor. Western blot using the anti-phospho-404 and anti-phospho-476 antibodies indicated that CDK1 inhibition abrogates these phosphorylation events.

ARHGAP19 is also phosphorylated by ROCK and AKT

In addition to threonine residues 404 and 476, mass spectrometric analyses of human ARHGAP19 (our own studies, not shown, and (Mertins, Qiao et al. 2013)) indicate that ARHGAP19 is phosphorylated on multiple residues, including S422, which is conserved among species. S422 lies in a R/K-x-x-S/T-x motif (Fig. 1A) that represents a potential phosphorylation site for the RhoA effector kinase ROCK. To study phosphorylation of ARHGAP19 at this site we generated anti-phosphopeptide antibodies that specifically recognized the wild type but not the S422A mutant form of ARHGAP19 from nocodazole-arrested Kit225 cells (Fig. 1F). To analyze whether ROCK could be responsible for the phosphorylation of ARHGAP19, Kit225 lymphocytes were synchronized in prometaphase using nocodazole and then treated for 90 min with the ROCK inhibitory compounds Y39983 or H1152 (Ramachandran, Patil et al. 2011, Feng, LoGrasso et al. 2016). As shown in Fig. 1G, inhibition of ROCK, as assessed by the disappearance of the phospho-ROCK2 signal, strongly decreased phosphorylation of ARHGAP19 on S422. To confirm the impact of ROCK on S422 phosphorylation, we generated a plasmid encoding a constitutive active form of ROCK, Cherry-ROCK2 Δ , devoid of its autoinhibitory domain (Sebbagh, Hamelin et al. 2005). This plasmid was transfected in Kit225 cells that already expressed WT GFP-ARHGAP19. Activity of the ROCK2 Δ protein was confirmed by an increase in the phosphorylation of MLC; a parallel increase in the phosphorylation of ARHGAP19 on S422 was observed (Fig. 1H). Together, these results indicated that serine 422 of ARHGAP19 is a target for the ROCK kinase in cells.

The motif surrounding S422 is also a potential phosphorylation site for AKT (R-x-R-x-x-S/T-x). However, inhibiting AKT in nocodazole-arrested Kit225 using MK2206 did not affect ARHGAP19 phosphorylation on S422. We therefore turned to Jurkat cells, another human T cell line in which AKT is constitutively activated due to PTEN deficiency. In these cells, S422 phosphorylation was partially decreased by treatment with either the AKT or the ROCK inhibitors and combination of both compounds was required to completely abolish S422 phosphorylation (Fig. 1I). Thus ARHGAP19 is likely phosphorylated by both ROCK and AKT in Jurkat cells.

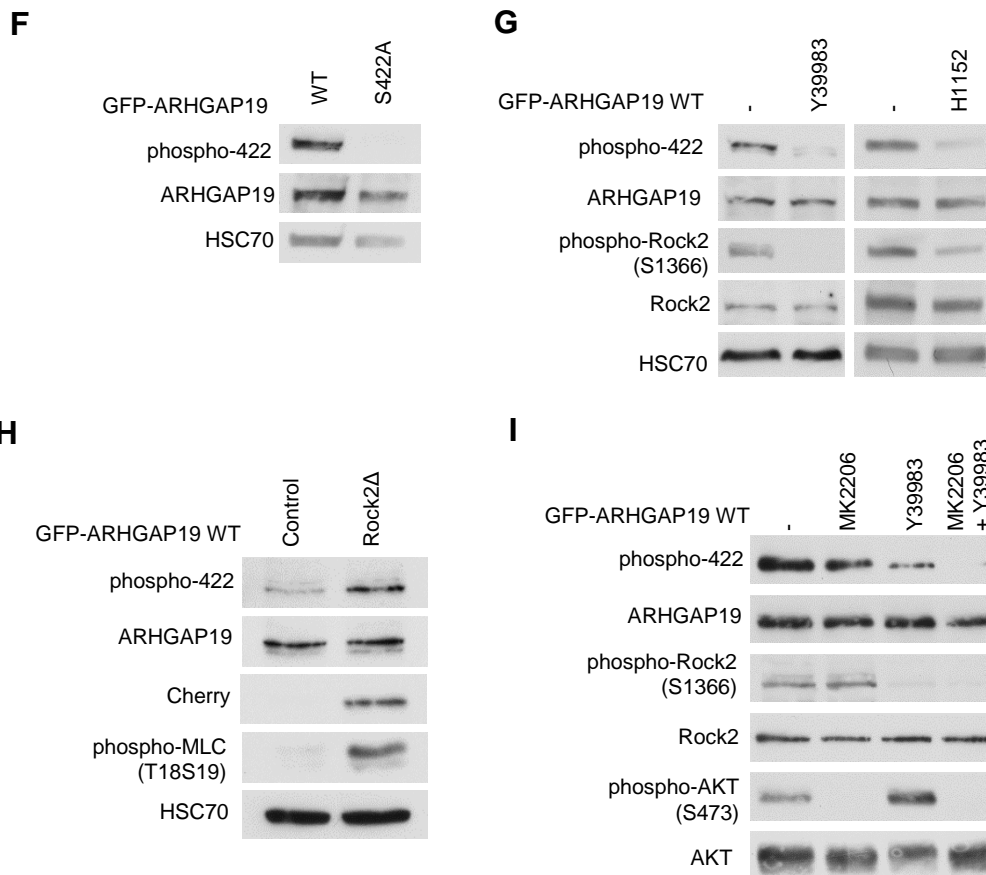


Fig. 1 continued: ARHGAP19 is a substrate of CDK1, ROCK and AKT.

(F) Specificity of the anti-phospho-422 antibody. WT GFP-ARHGAP19 but not S422A GFP-ARHGAP19 is recognized by this antibody in nocodazole-arrested Kit225 cells. (G) Inhibition of ROCK abolishes the phosphorylation of ARHGAP19 on S422. WT GFP-ARHGAP19-expressing Kit225 cells were synchronized using nocodazole and incubated in the presence or the absence of the Y39983 or the H1152 ROCK inhibitory compounds. The samples were analyzed by western blotting using anti-phospho-422, anti-ARHGAP19, anti-phospho-ROCK2 and anti-ROCK2 antibodies. HSC70 levels were assessed to control for equal protein loading. (H) ROCK activation leads to an increase in phospho-S422. WT GFP-ARHGAP19-expressing Kit225 cells were transfected with plasmids encoding mCherry-empty or mCherry-ROCK2 Δ and synchronized using nocodazole. The samples were analyzed by western blotting using anti-phospho-422, anti-ARHGAP19, anti-Cherry and anti-phospho-MLC antibodies. (I) Inhibition of both ROCK (using Y39983) and AKT (using MK2206) is necessary to abolish the phosphorylation of WT GFP-ARHGAP19 on S422 in nocodazole-synchronized Jurkat cells.

Timing of ARHGAP19 phosphorylations

In unsynchronized Kit225 cells, as well as in cells synchronized just before entry in mitosis through the use of the RO3306 CDK1 inhibitor, ARHGAP19 appears to only be significantly phosphorylated on S422 and not on T404/T476 (Fig. 2A). We noted a decrease in the level of S422 phosphorylation in cells treated with RO3306, as compared to unsynchronized cells. On the other hand, nocodazole treatment that allows cells to enter mitosis but arrest them in prometaphase is accompanied by increased levels of phospho-S422, as compared to unsynchronized cells, and phosphorylation of ARHGAP19 at positions 404 and 476. Thus, in early mitosis, ARHGAP19 is phosphorylated on all three residues.

We then analyzed more precisely the kinetics of ARHGAP19 phosphorylations during mitosis. Appearance and disappearance of the phospho-T404/T476 signals in cells synchronized by block and release with either RO3306 or nocodazole are reminiscent of those described for other CDK1 substrates. Indeed, phosphorylation on the 404 and 476 threonine residues increased after mitosis onset, reached a maximum in cells synchronized in prometaphase, and declined thereafter (Fig. 2B). Of note, kinetics of appearance and disappearance of the phosphorylation signals during mitosis progression are similar for the 404 and 476 threonine residues, suggesting common regulatory mechanisms. In contrast, phosphorylation on residue S422 decreased slower than phosphorylation on T404 and T476 and was still detectable at the end of mitosis. Furthermore, analyzing the complete cell cycle showed that the S422 of exogenous GFP-ARHGAP19 was phosphorylatable throughout the cell cycle (Fig. 2C) although, as endogenous ARHGAP19 is not expressed in the G1 phase, only phosphorylation from the S-phase and thereafter is of physiological relevance.

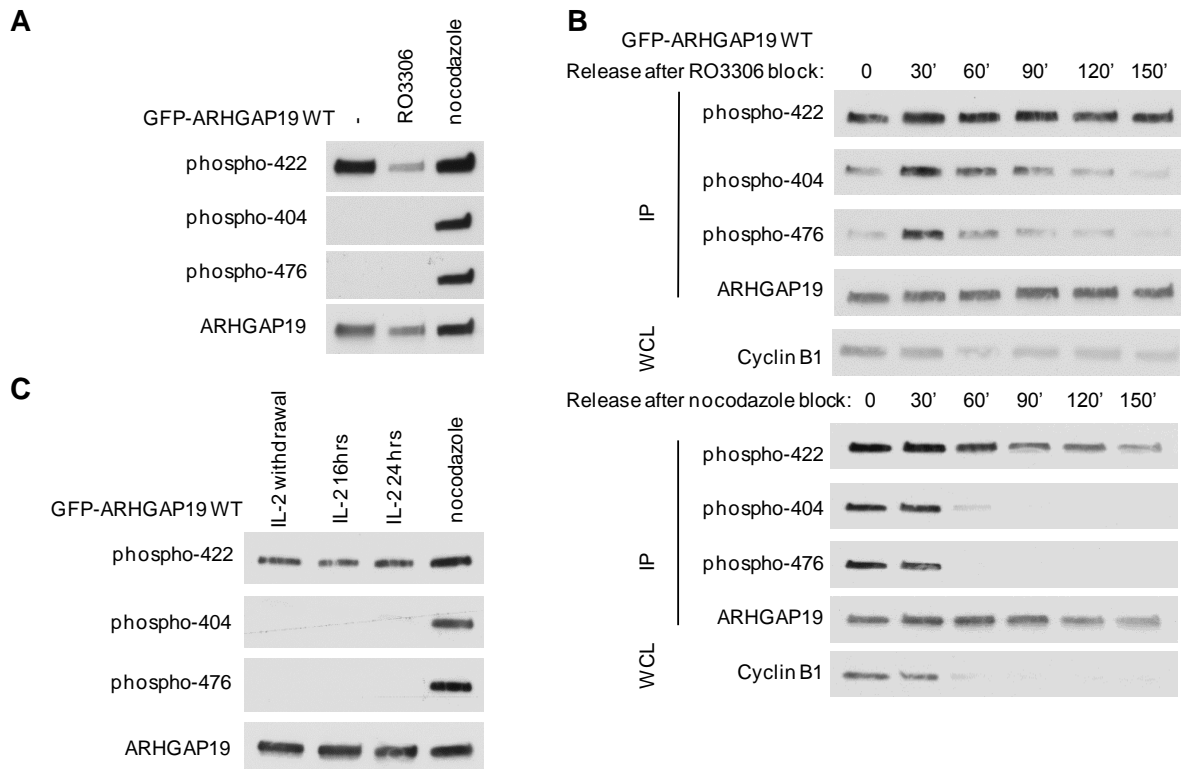


Fig. 2: ARHGAP19 phosphorylation kinetics.

(A) WT GFP-ARHGAP19 Kit225 cells were left unsynchronized (-) or synchronized at the G2/M transition using CDK1 inhibitor RO3306 or in prometaphase using nocodazole. In contrast to S422, T404 and T476 are only phosphorylated in mitosis. (B) WT GFP-ARHGAP19 cells were blocked at the G2/M transition or in prometaphase by RO3306 or nocodazole treatment, respectively and then released into mitosis for the indicated times. Phosphorylation of S422 is detectable during the entire mitosis while phosphorylation of T404 and T476 residues gradually decreases as cells progress through mitosis (as illustrated by the decrease in cyclin B1 levels, which occurs following the metaphase to anaphase transition). (C) Kit225 cells were synchronized in G1 by IL-2 deprivation. Addition of IL-2 to the deprived cells then allows them to progress through S phase after 16 hours of culture and to reach G2 by 24 hours. Prometaphase arrest was obtained using nocodazole. Phosphorylation of S422 of exogenous GFP-ARHGAP19 is detectable at all phases of the cell cycle while phosphorylation of T404 and T476 is detectable only in mitotic cells.

Phosphorylation of residues T404/T476 depends on phospho-S422

During the course of this study, we noticed that mutation of a given phosphorylation site (*i.e.* either S422, T404 or T476) into non-phosphorylatable Alanine residues also impacted on the phosphorylation levels of some of the others, suggesting that phosphorylation at a given site might influence phosphorylation of other residues. First, not only does RO3306 reduce phosphorylation of S422 (Fig. 2A), but mutation of the T404 and T476 residues into Alanines does so as well (Fig. 3A). Thus, absence of phosphorylation of T404 and T476 (whether due to cells not being in mitosis, to pharmacological inhibition of CDK1, or to mutation of these residues into Alanine) leads to decreased levels of S422 phosphorylation. Second, we observed that, in Kit225 cells, preventing phosphorylation of ARHGAP19 at position 422 either by mutating S422 (Fig. 3A) or by using the ROCK inhibitor (Fig. 3B) correlated with a reduced phosphorylation at positions 404 and 476. These experiments have also been performed in Jurkat cells (Fig. 3C) and led to similar results with the difference that, as described above, inhibition of both AKT and ROCK was required to fully abolish phosphorylation of S422 in Jurkat cells.

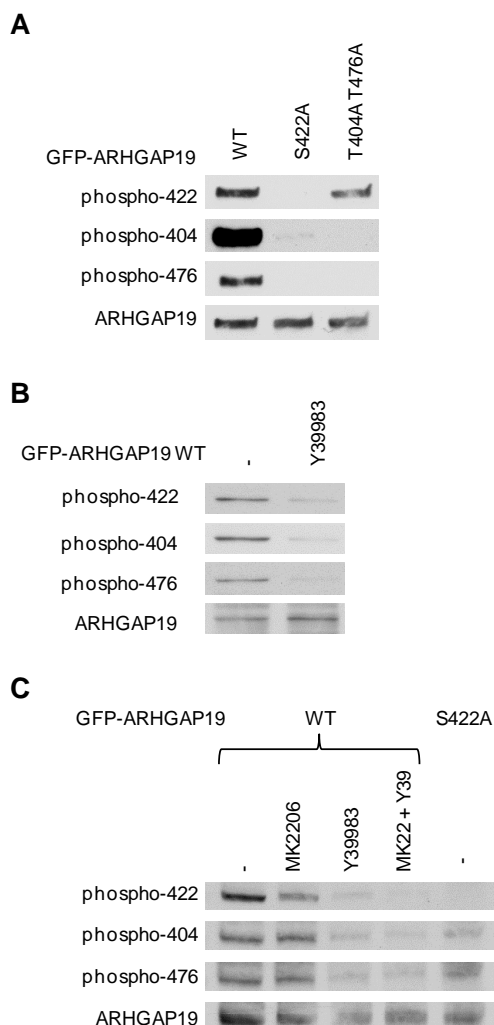


Fig. 3: Phosphorylation of S422 promotes T404/T476 phosphorylation and mediates interaction of ARHGAP19 with 14-3-3 proteins.

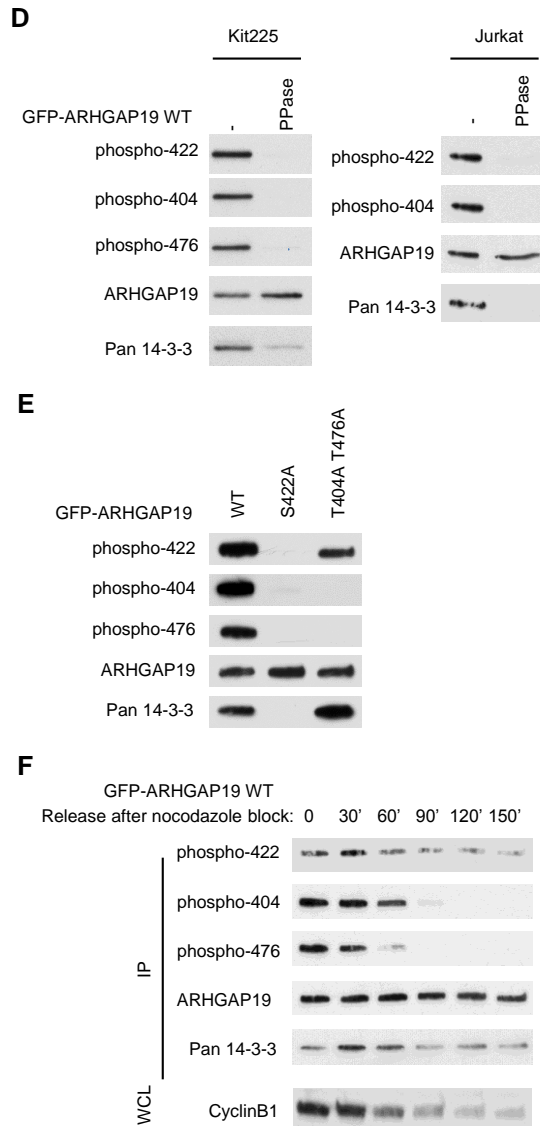
(A) Phosphorylation of T404 and T476 disappears when S422 is non phosphorylatable. Kit225 cells expressing either WT GFP-ARHGAP19 or the S422A or the T404A/T476A GFP-ARHGAP19 mutants were synchronized in prometaphase using nocodazole. GFP-ARHGAP19 was immunoprecipitated with GFP-Trap® and western blotting was performed using anti-phospho-422, anti-phospho-404, anti-phospho-476 and anti-ARHGAP19 antibodies. (B) Cell treatment with the ROCK inhibitor decreases the phosphorylation levels of the T404 and T476, in addition to that of S422. WT GFP-ARHGAP19-expressing Kit225 cells were synchronized by nocodazole and cultured for 1.5 hours in the absence or the presence of the ROCK inhibitor (Y39983). GFP-ARHGAP19 proteins were analysed by western blotting in total cell lysates, using the indicated antibodies. (C) In Jurkat cells, phosphorylation levels of T404/T476 drop when S422 phosphorylation is decreased in the presence of kinase inhibitors or when S422 is mutated into a non-phosphorylatable amino acid (S422A). Jurkat cells expressing WT or S422A GFP-ARHGAP19 were synchronized in prometaphase by nocodazole and cultured for 1.5 hours in the absence or the presence of inhibitors of ROCK (Y39983) or AKT (MK2206).

S422-phosphorylated ARHGAP19 interacts with 14-3-3 proteins

Mass spectrometric analysis of ARHGAP19 immune complexes as well as a yeast two-hybrid screen indicated that ARHGAP19 might interact with 14-3-3 family proteins (unpublished results). The 14-3-3 protein family is composed of seven proteins that are ubiquitously expressed and bind phosphoserine/phosphothreonine motifs (Aitken 1996). 14-3-3 proteins (recognized by a pan-14-3-3 antibody in western blots) are readily detectable in ARHGAP19 immunoprecipitates from nocodazole-treated Kit225 cells (Fig. 3D, left panel) or Jurkat cells (Fig. 3D, right panel). This interaction was abrogated, however, when the immunoprecipitates were dephosphorylated *in vitro* by incubation in the presence of a recombinant PP1 phosphatase. We then analyzed which of the ARHGAP19 phosphoresidues was implicated in this interaction with 14-3-3. 14-3-3 binding was detectable in ARHGAP19 mutated on both T404/T476 but disappeared with ARHGAP19 S422A (Fig. 3E). Similarly, binding of 14-3-3 to wild type ARHGAP19 was detectable in asynchronous cells, or in cells treated with the CDK1 inhibitor RO3306 in which S422 is phosphorylated but not T404/T476 (not shown). Thus binding of 14-3-3 proteins appeared to be mediated by phospho-S422 which indeed lies in a consensus motif for 14-3-3 proteins [RS-x-pS/T-x or R-xxx-pS/T-x] (Yaffe, Rittinger et al. 1997, Fernandez-Orth, Ehling et al. 2017). Furthermore, results shown in Fig. 3F demonstrate that, during mitosis, 14-3-3 proteins bind to ARHGAP19 as long as S422 is phosphorylated.

Fig. 3 continued: Phosphorylation of S422 promotes T404/T476 phosphorylation and mediates interaction of ARHGAP19 with 14-3-3 proteins.

(D) WT ARHGAP19 interacts with 14-3-3 proteins and this interaction is phospho-dependent. Kit225 cells (left) or Jurkat cells (right) expressing WT GFP-ARHGAP19 were synchronized in prometaphase using nocodazole and GFP-ARHGAP19 proteins were immunoprecipitated with GFP-Trap[®]. The GFP-ARHGAP19 immunoprecipitates were then treated with recombinant PP1 phosphatase (PPase), or not. Western blotting was performed using the indicated antibodies. (E and F) Phosphorylation of S422 mediates interaction of ARHGAP19 with 14-3-3 proteins. (E) Kit225 cells expressing either WT, S422A or T404A/T476A GFP-ARHGAP19 were synchronized in prometaphase. GFP-ARHGAP19 proteins were immunoprecipitated with GFP-Trap[®], and western blotting was performed with the indicated antibodies. (F) The interaction with 14-3-3 is detectable during the entire mitosis. Kit225 cells expressing WT GFP-ARHGAP19 were synchronized in prometaphase by nocodazole, washed and released in fresh culture medium for the indicated times. GFP-ARHGAP19 proteins were immunoprecipitated with GFP-Trap[®] and western blots performed with the indicated antibodies. Western blot analysis of cyclin B1 was performed on total cell lysates.



Binding of 14-3-3 proteins protects ARHGAP19 from dephosphorylation of the T404 and T476 residues

As shown in Fig. 3E, mutation of S422 of ARHGAP19 impedes both the ability of ARHGAP19 to interact with 14-3-3 proteins and the levels of phosphorylation of the T404 and T476 residues suggesting that both phenomena are linked. Either of two hypotheses can explain the role of 14-3-3 binding in regulating T404/T476 phosphorylations: a) 14-3-3 proteins could play the role of an adaptor protein and recruit the CDK1 kinase to phosphorylate ARHGAP19 or b) 14-3-3 proteins could protect ARHGAP19 from dephosphorylation through steric hindrance limiting access of protein phosphatases to the T404/T476 residues. To test these hypotheses, nocodazole-arrested Kit225 cells expressing WT ARHGAP19 or the S422A mutated form were treated with 100 nM of the S/T phosphatase inhibitor okadaic acid (OA) during 2.5 hours. We observed that cell treatment with OA led to only a little increase in phosphorylation of WT ARHGAP19 whereas phosphorylation of both threonines was totally rescued in ARHGAP19 S422A cells (Fig. 4A). These results suggest that binding of 14-3-3 to S422, rather than allowing the recruitment of CDK1, may prevent access of an okadaic acid-sensitive phosphatase to phospho-T404/476.

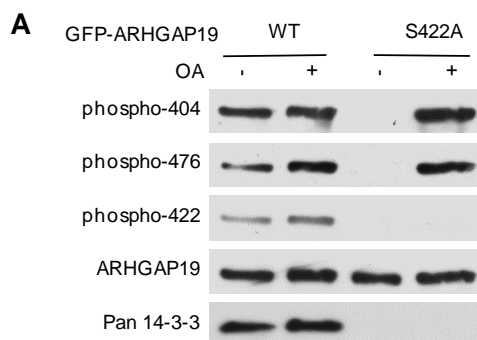


Fig. 4: Role of phosphorylations of ARHGAP19 and 14-3-3 binding.

(A) 14-3-3 binding protects ARHGAP19 from dephosphorylation on T404 and T476. Kit225 cells expressing either WT or S422A GFP-ARHGAP19 were synchronized in prometaphase and treated with OA, a protein phosphatase inhibitor. GFP-ARHGAP19 was immunoprecipitated using GFP-Trap[®], and the samples were analyzed by western blot using the anti-phospho-422, anti-phospho-404, anti-phospho-476 anti-ARHGAP19 and anti-pan-14-3-3 antibodies.

Phosphorylation of ARHGAP19 prevents its translocation to the cell cortex

An hypothesis that we first investigated was whether phosphorylation of ARHGAP19 modified its GAP activity. To assess ARHGAP19 GAP activity we had to immunoprecipitate the protein from cell lysates. Indeed, *E. Coli*-derived recombinant full length ARHGAP19 is inactive (either as a GST- or a MBP- fusion protein), even actually after *in vitro* phosphorylation by a mixture of CDK1 and ROCK (not shown). In initial experiments, we used cells synchronized with nocodazole or with the CDK1 inhibitor to compare the GAP activity of ARHGAP19 when phosphorylated on T404/T476 or not, respectively. Neither the level of GAP activity towards RhoA nor ARHGAP19 specificity towards RhoA and not Rac or

Cdc42 appeared to depend upon its phosphorylation status (Supplemental Fig. S1A). To further investigate this point, we compared activity of WT ARHGAP19 and ARHGAP19 that had been mutated on all three phosphorylation sites (Supplemental Fig. S1B) and again found no evidence that phosphorylation might regulate the GAP activity of ARHGAP19.

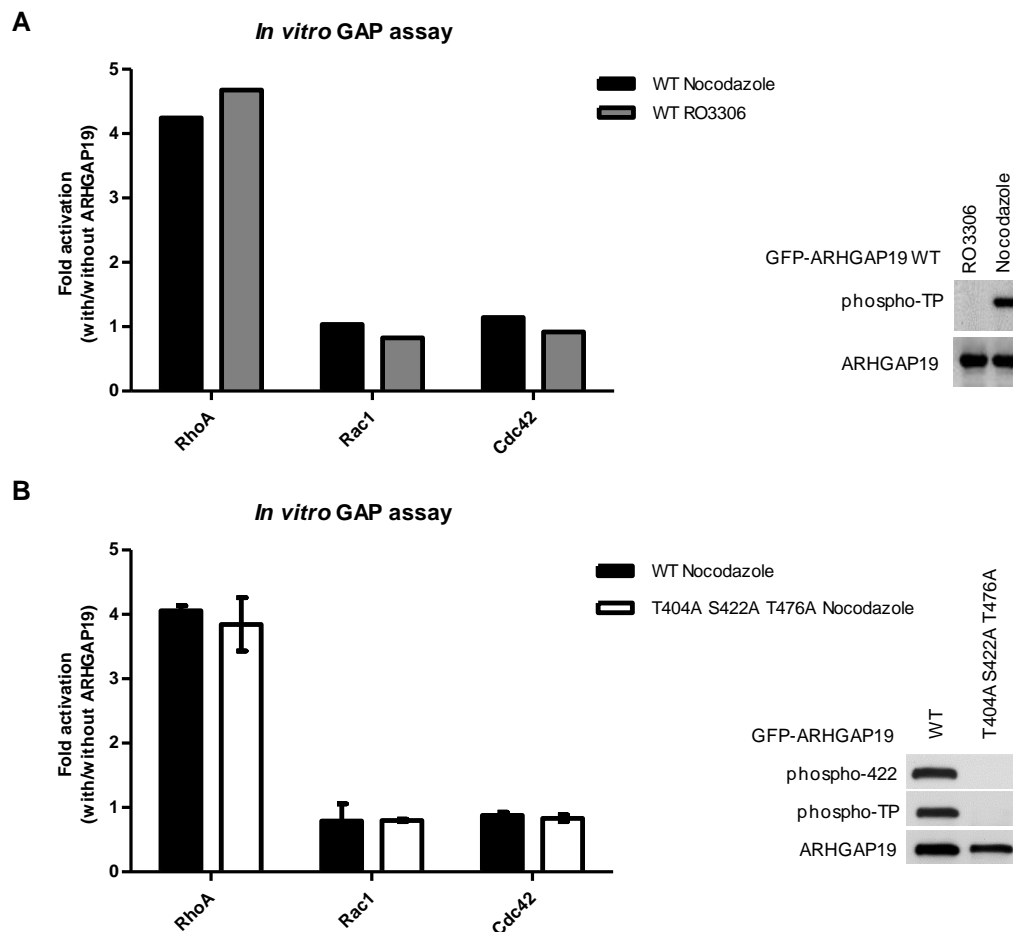


Fig. S1: *In vitro* GAP Assay

GFP-ARHGAP19 was immunoprecipitated using GFP-Trap® beads from doxycyclin-induced GFP-ARHGAP19-expressing Kit225 cells treated with RO3306 or nocodazole (A) or the WT and the triple A GFP-ARHGAP19 mutant in nocodazole arrested cells (B). Mock GFP-Trap® immunoprecipitates from cells that do not express GFP-ARHGAP19 was used to assess intrinsic GTP hydrolysis in the absence of GAP. GAP assay was performed by measuring inorganic phosphate release from GTP-loaded small GTPases as indicated. Fold activation represents the ratio of inorganic phosphate (iP) release in the presence of ARHGAP19 over iP release in its absence. Results are shown as the mean +/- SEM of three independent experiments. Immunoprecipitates were analyzed by western blotting with the phospho-specific antibodies (right hand side).

We next investigated localization of WT, T404A/T476A, S422A or T404A/S422A/T476A in Kit225 cells during mitosis using fluorescence microscopy. Following mitosis entry, WT ARHGAP19 was dispersed in the cytoplasm in prophase and metaphase, translocated to the cell cortex in early anaphase, and then concentrated at the cortical region of the ingression cleavage furrow at later stages and until the end of cell division (David, Petit et al. 2014). A striking observation is the modification of the localization of the mutated forms

(T404A/T476A, S422A or T404A/S422A/T476A) of ARHGAP19 during early mitosis (prophase and metaphase). Indeed, the mutant forms of ARHGAP19 were no longer in the cytoplasm but concentrated at the cell cortex (Fig. 4B and 4C), suggesting that all three residues contribute to the phenotype. Alternatively, this similarity in the effects of each mutation on ARHGAP19 localization may be the result of the above described interplay between the phosphorylation status of S422, on one hand, and T404/T476, on the other hand. Thus, phosphorylation of any of these three residues may contribute to sequester ARHGAP19 in the cytoplasm and prevent it from translocating prematurely to the cell cortex. Moreover, quantitative analyses of fluorescence intensities indicated that the recruitment to the cell cortex of the non-phosphorylated mutant forms of ARHGAP19 was also more pronounced than that of the wild-type form at later stages of mitosis (Fig. 4C).

We have previously reported that silencing ARHGAP19, or expressing a R143A GAP inactive mutant, induced precocious cleavage furrow ingression that, in some cells, lead to failure of cytokinesis and the appearance of binucleated cells (David, Petit et al. 2014). To assess whether phosphorylation of ARHGAP19 might have any effect on the outcome of cell division, Kit225 cells were induced to express either WT ARHGAP19 or its mutated forms and were analyzed 48 hours later for DNA content by FACS analysis. Cells expressing WT ARHGAP19 had a normal ploidy (between 2N and 4N). In contrast, cells that expressed any of the mutated forms of ARHGAP19 displayed a significant proportion of cells with 8N or even 16N DNA (Fig. 4D). These results demonstrate that phosphorylations of ARHGAP19, in addition to regulating its subcellular localization, have an impact on cell division.

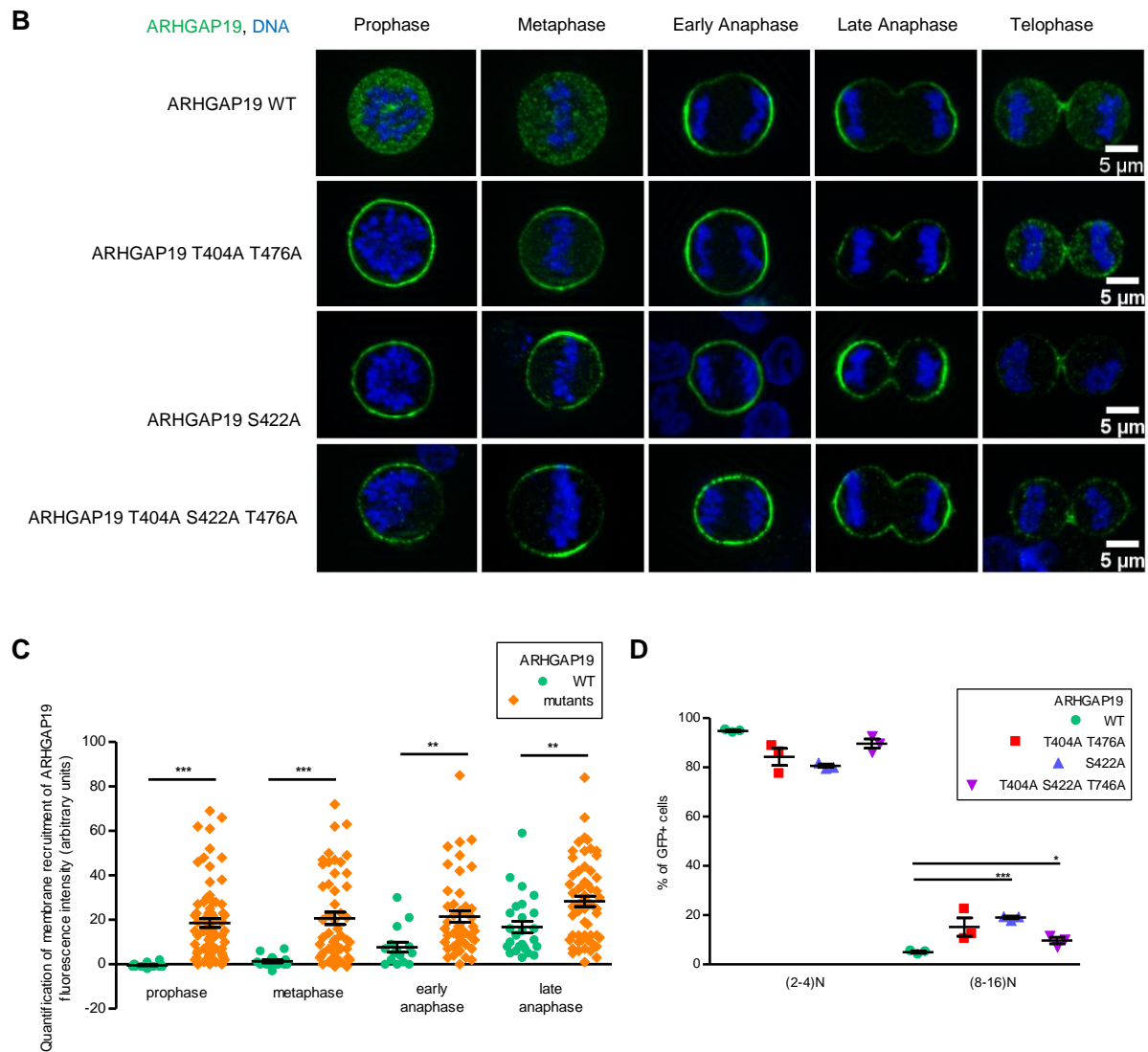


Fig. 4 continued: Role of phosphorylations of ARHGAP19 and 14-3-3 binding.

(B) Localization of ARHGAP19 during mitosis. Kit225 lymphocytes (expressing the WT, S422A, T404A/T476A or S422A/T404A/T476A forms of ARHGAP19) were fixed using TCA. Cells were labeled for DNA (Hoechst, blue) and GFP-ARHGAP19 (green) and observed by fluorescence microscopy. Representative pictures are shown. (C) Quantification of ARHGAP19 translocation to the cell cortex during mitosis for cells expressing WT GFP-ARHGAP19 or the S422A, T404A/T476A or the triple T404A/S422A/T476A mutant. Since no significant difference was observed between mutants, results are represented together on the graph under the label “mutants”. For cells in prophase, fluorescence intensities were measured at random membrane positions. For cells in metaphase or anaphase, fluorescence intensities were measured at the presumptive cleavage furrow or cleavage furrow membranes, respectively. Values corresponding to fluorescence intensities in the cytoplasm were subtracted from that measured at the membrane. Data are expressed as mean \pm SEM of these calculated values, with $n > 10$ for each mitotic stage of each cell population. (D) DNA content analysis. WT and mutant forms of GFP-ARHGAP19 were expressed for 48 hours in Kit255 cells. DNA content, assessed through staining with Hoechst 33342, was analyzed by flow cytometry. $n = 3$ for each conditions.

Discussion

In this study, we report that ARHGAP19 is phosphorylated by the Rho kinase ROCK on S422 and by CDK1 on T404 and T476. ARHGAP19 is localized in the nucleus before mitosis and is phosphorylated on S422 by the Rho kinase ROCK. This phosphorylation allows the interaction of ARHGAP19 with 14-3-3 proteins. At the beginning of mitosis, nuclear membrane breaks down and ARHGAP19 moves to the cytoplasm. The kinase CDK1 is then activated and cytoplasmic CDK1 molecules (Takizawa and Morgan 2000) phosphorylate ARHGAP19 on the two residues T404/T476. These phosphorylations persist until CDK1 is inactivated following degradation of cyclin B. Interestingly, phosphorylations on S422 on one hand and on T404/T476 on the other hand appear to influence each other. When ARHGAP19 is not phosphorylated on S422 (e.g. in the S422A mutant), the binding with 14-3-3 proteins is lost and the phosphorylation of T404 and T476 is decreased. Indeed, our results indicate that the interaction with 14-3-3 proteins protects ARHGAP19 from dephosphorylation by phosphatases, as previously reported for other phosphatase substrates (Gohla and Bokoch 2002, Hausser, Link et al. 2006). Dependency of the S422 phosphorylation on the status of T404/T476, as observed in RO3306-treated cells or in the T404A/T476A mutant ARHGAP19, is not clearly understood. So far, none of our attempts at investigating the underlying mechanism provided with any hints to explain it. One hypothesis could be that, S422 lying in between T404 and T476, the proximity of these three sites, may interfere with their respective phosphorylation.

In early mitosis, mutant ARHGAP19 where S422, T404/T476 or all three residues have been replaced by non phosphorylatable Alanine, ARHGAP19 localizes at the membrane and no longer in the cytoplasm. Thus, the phosphorylation of these residues prevents ARHGAP19 from interacting with the membrane, possibly due to an increase in the negative charges of the protein or through interaction with 14-3-3.

The precise localization of ARHGAP19 during mitosis progression appears to be crucial for cell division. Indeed, when some of these residues are not phosphorylated, multinucleated cells could be observed by microscopy (not shown) or through FACS analyses of their DNA content. It has been clearly established that interfering with RhoA activity during mitosis prevents contraction of the actomyosin ring and leads to failure of cytokinesis and multinucleation in various cell types (Yoshizaki, Ohba et al. 2004, Kamijo, Ohara et al. 2006). It is therefore likely that the premature membrane localization of non phosphorylatable ARHGAP19 impedes local RhoA activation and in turns alters and/or delays cortical contractility that is required for cell shape changes in early mitosis. Indeed most cells that express ARHGAP19 mutated on these residues do not elongate, a phenomenon that could

be directly responsible for delaying chromosome separation and for the subsequent failure of cell division. Moreover, in subsequent steps of mitosis, increased enrichment to the cell equatorial cortex of the mutated forms of ARHGAP19, as compared to the wild-type form, likely leads to defects in the RhoA-dependent contraction of the cleavage furrow without which cytokinesis cannot occur.

In summary, our data add ARHGAP19 to the list of mitosis related proteins that are substrates of CDK1 and provide evidence for a new regulatory pathway whereby RhoA-activated ROCK phosphorylates ARHGAP19 on S422 to recruit 14-3-3 proteins which, in turn, help maintaining phosphorylation of residues T404/T476 by CDK1 and impede the ability of ARHGAP19 from translocating prematurely to the cell cortex during mitosis (Fig. 5).

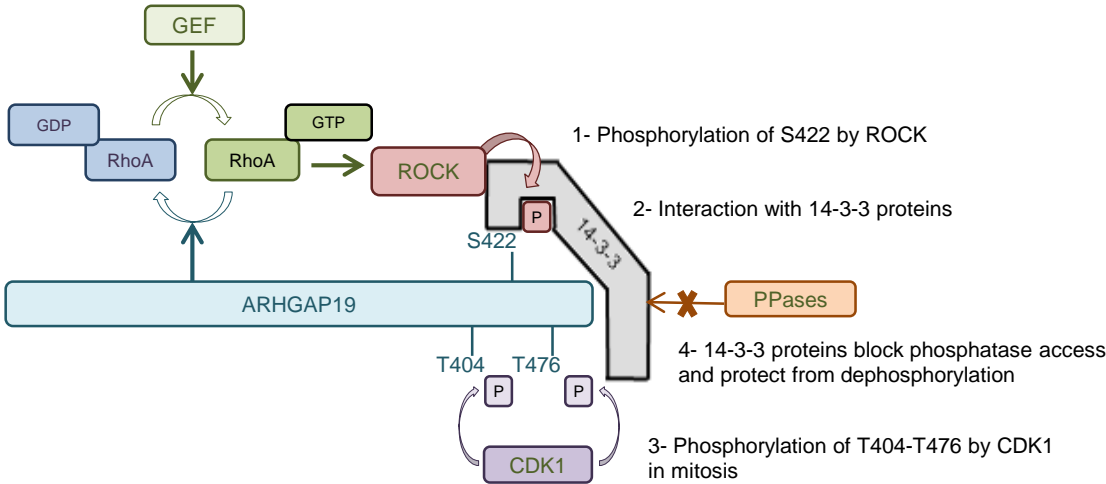


Fig. 5: Regulatory pathway whereby RhoA-activated ROCK phosphorylates ARHGAP19 on Ser422 (1) to recruit 14-3-3 proteins (2) which, in turn, help maintain the CDK1-mediated phosphorylation of the T404/476 residues (3) by blocking access of a phosphatase (4) and limits the ability of ARHGAP19 to translocate to the cell cortex during mitosis.

Materials and methods

Cell culture and transfection

Interleukin-2 (IL-2)-dependent human Kit225 lymphocytes and human leukemia Jurkat T cells (ACC 282) were grown and transfected as previously described (David, Petit et al. 2014). Stable transfectants were selected in the presence of 2 µg/ml puromycin (for GFP-ARHGAP19 plasmids) or 3.5 µg/ml geneticin (for the Cherry-ROCK2Δ plasmid). To synchronize cells in the G1 phase, lymphocytes were cultured in the absence of IL-2 for 48 hours. Cell cycle progression was then resumed by addition of IL-2 for 16 or 24 hours, at which time points most cells have reached the S and G2 phases, respectively. To enrich the population in prometaphase-blocked cells, 40 ng/ml nocodazole (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was added for 16 hours (starting 24 hours after IL-2 addition). Where indicated, cells were treated for 20 hours with 9 µM RO3306 (Calbiochem, CA, USA) to synchronize them at the end of the G2 phase. Cells were then washed thoroughly and placed in IL-2-containing culture medium to allow progression through mitosis. To inhibit ROCK, cells were treated for 1.5 hours with 20 µM Y39983 (Selleckchem, MD, USA) or 10 µM H1152 (Tocris Bioscience, Bio-technique Europe). AKT kinase inhibition was achieved with 1 µM MK2206 (Selleckchem, MD, USA). Cell treatment with 100 nM Okadaic Acid (#459618, Calbiochem) for 2.5 hours was used to inhibit S/T phosphatases.

Plasmids

To generate the mutated forms of ARHGAP19 described in this study, the plasmid encoding inducible GFP-ARHGAP19 (David, Petit et al. 2014) was used as a template for site-directed mutagenesis (QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit from Stratagene (La Jolla, CA, USA)) together with appropriate primers bearing Thr to Ala or Ser to Ala codon changes. To generate the plasmid allowing inducible Cherry-ROCK2Δ, the ROCK2Δ DNA sequence (Sebbagh, Hamelin et al. 2005) was inserted in frame in the pmCherry-C1 plasmid (Clontech). The CMV promoter was then replaced by an Asel-Sacl sequence containing the 6 tetracyclin responsive elements and the minimal CMV promoter from pTRIPZ (Open Biosystem).

***In vitro* assays**

For kinase assays, 2 µg of GST-ARHGAP19 recombinant proteins (David, Petit et al. 2014) were affinity-purified on glutathione-sepharose beads (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) and incubated with 0.16 Unit active Cdk1/CyclinB (Millipore, Billerica, MA, USA) in 40 µL kinase buffer (20 mM MOPS pH 7.2, 20 mM β-glycerophosphate, 0.1 mM Na₃VO₄, 20 mM

MgCl₂, 2 mM DTT, 50 μM ATP) for 30 min at 30°C. After poly-acrylamide gel electrophoresis and protein transfer onto PVDF membranes, presence of phosphorylated proteins was assessed using the indicated anti-phospho antibodies.

Dephosphorylation was performed for 30 min at 30°C with 12 units of recombinant PP1 phosphatase (P0754S, NEB).

In vitro GAP Assay: Doxycyclin-treated GFP-ARHGAP19 Kit225 cells (expressing either the wild-type or the T404A/S422A/T476A mutant) were synchronized in G2 or prometaphase using RO3306 (9 μg/ml) or nocodazole (40 ng/ml) for 20 hours and 16 hours, respectively. GFP-ARHGAP19 was then immunoprecipitated using GFP-Trap® beads (Chromotek GMBH, Planegg-Martinsried, Germany) and incubated in the presence of recombinant GTPases (His-tagged RhoA, Rac1, or Cdc42) and GTP, in an optimized buffer provided by Cytoskeleton (Denver, CO). The inorganic phosphate release resulting from the GTPase-dependent hydrolysis of GTP is then measured through a colorimetric assay, according to the manufacturer's instructions. Mock GFP-Trap® immunoprecipitates from cells that do not express GFP-ARHGAP19, which were processed in parallel, were used to assess intrinsic GTP hydrolysis in the absence of GAP. Data are expressed as a ratio of the inorganic phosphate released in ARHGAP19-containing samples over that released in mock GFP-Trap® immunoprecipitates-containing controls.

Antibodies

Rabbit SY1985 anti-ARHGAP19 antibody was home-made. Rabbit anti-phospho-S422, rabbit anti-phospho-T404 and rabbit anti-phospho-T476 antibodies were produced and purified by ProteoGenix (Schiltigheim, France), using phosphorylated peptides as immunogens. Rabbit anti-Cyclin B1 (sc-752), mouse anti-pan 14-3-3 (sc-1657), goat anti-ROCK2 (sc-1851) and mouse anti-HSC70 (sc-7298) were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). Rabbit anti-mCherry (ab183628) and mouse anti-mCherry (ab125096) were from Abcam (Cambridge, UK). Rabbit anti-AKT (9272), rabbit anti-phospho-Thr18/Ser19-MLC2 (3674), mouse anti-phospho-Thr/Pro (9391) were from Cell Signaling Technology (Ipswich, MA, USA). Goat anti-GST was from Pharmacia Biotech (Uppsala, Sweden). Rabbit anti-phospho-Ser473-AKT (05-1003) was from Merck Millipore. Rabbit anti-phospho-Ser1366-ROCK2 (GTX-122651) was from GeneTex (Irvine, CA, USA). HRP-conjugated anti-mouse, anti-rabbit and anti-goat secondary antibodies were purchased from GE Healthcare (Uppsala, Sweden), Cell Signaling Technology (Ipswich, MA, USA) and Dako (A/S, Denmark), respectively. The secondary antibody used for microscopy, conjugated to Alexa 488 was from Molecular Probes (Eugene, OR, USA).

Immunoprecipitations and western blots

For immunoprecipitation of GFP-ARHGAP19, GFP-trap_A (Chromotek) and 1 mg of whole cell lysates (performed as in (David, Petit et al. 2014)) were used. Poly-acrylamide gel electrophoresis, transfer onto PVDF membranes (GE Healthcare) and western blots were performed according to standard procedures. All western blots shown are representative of at least 3 independent experiments.

Microscopy on fixed cells

Lymphocytes were fixed (in suspension) for 10 min using a solution of 10 % trichloroacetic acid in water at 4°C and then processed as described in (David, Petit et al. 2014). Images of optical sections were acquired using a Zeiss AxioImager Z1 fluorescence upright microscope (Zeiss, Jena, Germany) equipped with motorized Z drive, apotome and 63 X/1.40 oil M27 objective. and the AxioVision Zeiss software. The illumination settings and acquisition parameters used (including the linear mode) were kept constant to allow faithful comparisons of the fluorescence intensities between cells. Images processing (cropping) and quantifications were performed using the ImageJ software. Fluorescence data were analyzed using the Prism software and statistical significance was calculated with Student's t test: * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.0001$. Contrast settings of the representative images shown in figure 4B were min/max adjusted (linear processing) for a better display.

Flow Cytometry

For multinucleation assays, GFP-ARHGAP19 expression was induced by 1 $\mu\text{g/ml}$ doxycyclin for 48 hours. 1 hour before analysis with the cytometer BD LSRFortessa™, cells were labeled at 37°C with 10 $\mu\text{g/ml}$ of Hoechst 33342 (B2261, Sigma). Fluorescence data from three independent experiments were analyzed using the Prism program and statistical significance was calculated with Student's t test: * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.0001$.

Acknowledgments

We thank Khadie Kouyate for expert technical assistance. This work has benefited from the facilities and expertise of the Imaging and Cytometry Platform (Yann Lecluse and Philippe Rameau, UMS AMMICA, Gustave Roussy Cancer Campus, Villejuif, France). This work was supported by institutional grants from INSERM and in its early phase by a grant from Ligue Nationale contre le Cancer (équipe labellisée to JB). CM was supported by doctoral grants from MESR and Ligue Nationale contre le Cancer.

References

- Aitken, A. (1996). 14-3-3 and its possible role in co-ordinating multiple signalling pathways. *Trends Cell Biol* 6, 341-347.
- Birkenfeld, J., Nalbant, P., Bohl, B. P., Pertz, O., Hahn, K. M., and Bokoch, G. M. (2007). GEF-H1 modulates localized RhoA activation during cytokinesis under the control of mitotic kinases. *Dev Cell* 12, 699-712.
- Chircop, M. (2014). Rho GTPases as regulators of mitosis and cytokinesis in mammalian cells. *Small GTPases* 5, e29770.
- David, M., Petit, D., and Bertoglio, J. (2012). Cell cycle regulation of Rho signaling pathways. *Cell Cycle* 11, 3003-3010.
- David, M. D., Petit, D., and Bertoglio, J. (2014). The RhoGAP ARHGAP19 controls cytokinesis and chromosome segregation in T lymphocytes. *J Cell Sci* 127, 400-410.
- Feng, Y., LoGrasso, P. V., Defert, O., and Li, R. (2016). Rho Kinase (ROCK) Inhibitors and Their Therapeutic Potential. *J Med Chem* 59, 2269-2300.
- Fernandez-Orth, J., Ehling, P., Ruck, T., Pankratz, S., Hofmann, M. S., Landgraf, P., Dieterich, D. C., Smalla, K. H., Kahne, T., Seebohm, G., *et al.* (2017). 14-3-3 Proteins regulate K2P 5.1 surface expression on T lymphocytes. *Traffic* 18, 29-43.
- Gohla, A., and Bokoch, G. M. (2002). 14-3-3 regulates actin dynamics by stabilizing phosphorylated cofilin. *Curr Biol* 12, 1704-1710.
- Hall, A. (2012). Rho family GTPases. *Biochem Soc Trans* 40, 1378-1382.
- Hara, T., Abe, M., Inoue, H., Yu, L. R., Veenstra, T. D., Kang, Y. H., Lee, K. S., and Miki, T. (2006). Cytokinesis regulator ECT2 changes its conformation through phosphorylation at Thr-341 in G2/M phase. *Oncogene* 25, 566-578.
- Hausser, A., Link, G., Hoene, M., Russo, C., Selchow, O., and Pfizenmaier, K. (2006). Phospho-specific binding of 14-3-3 proteins to phosphatidylinositol 4-kinase III beta protects from dephosphorylation and stabilizes lipid kinase activity. *J Cell Sci* 119, 3613-3621.
- Hirose, K., Kawashima, T., Iwamoto, I., Nosaka, T., and Kitamura, T. (2001). MgcRacGAP is involved in cytokinesis through associating with mitotic spindle and midbody. *J Biol Chem* 276, 5821-5828.
- Kamijo, K., Ohara, N., Abe, M., Uchimura, T., Hosoya, H., Lee, J. S., and Miki, T. (2006). Dissecting the role of Rho-mediated signaling in contractile ring formation. *Mol Biol Cell* 17, 43-55.
- Lindon, C. (2008). Control of mitotic exit and cytokinesis by the APC/C. *Biochem Soc Trans* 36, 405-410.
- Liot, C., Seguin, L., Siret, A., Crouin, C., Schmidt, S., and Bertoglio, J. (2011). APC(cdh1) mediates degradation of the oncogenic Rho-GEF Ect2 after mitosis. *PLoS One* 6, e23676.
- Maddox, A. S., and Burrige, K. (2003). RhoA is required for cortical retraction and rigidity during mitotic cell rounding. *J Cell Biol* 160, 255-265.
- Mertins, P., Qiao, J. W., Patel, J., Udeshi, N. D., Clauser, K. R., Mani, D. R., Burgess, M. W., Gillette, M. A., Jaffe, J. D., and Carr, S. A. (2013). Integrated proteomic analysis of post-translational modifications by serial enrichment. *Nat Methods* 10, 634-637.

Ramachandran, C., Patil, R. V., Combrink, K., Sharif, N. A., and Srinivas, S. P. (2011). Rho-Rho kinase pathway in the actomyosin contraction and cell-matrix adhesion in immortalized human trabecular meshwork cells. *Mol Vis* 17, 1877-1890.

Sebbagh, M., Hamelin, J., Bertoglio, J., Solary, E., and Breard, J. (2005). Direct cleavage of ROCK II by granzyme B induces target cell membrane blebbing in a caspase-independent manner. *J Exp Med* 201, 465-471.

Seguin, L., Liot, C., Mzali, R., Harada, R., Siret, A., Nepveu, A., and Bertoglio, J. (2009). CUX1 and E2F1 regulate coordinated expression of the mitotic complex genes Ect2, MgcRacGAP, and MKLP1 in S phase. *Mol Cell Biol* 29, 570-581.

Su, L., Agati, J. M., and Parsons, S. J. (2003). p190RhoGAP is cell cycle regulated and affects cytokinesis. *J Cell Biol* 163, 571-582.

Takizawa, C. G., and Morgan, D. O. (2000). Control of mitosis by changes in the subcellular location of cyclin-B1-Cdk1 and Cdc25C. *Curr Opin Cell Biol* 12, 658-665.

Tatsumoto, T., Xie, X., Blumenthal, R., Okamoto, I., and Miki, T. (1999). Human ECT2 is an exchange factor for Rho GTPases, phosphorylated in G2/M phases, and involved in cytokinesis. *J Cell Biol* 147, 921-928.

Tripathi, B. K., Qian, X., Mertins, P., Wang, D., Papageorge, A. G., Carr, S. A., and Lowy, D. R. (2014). CDK5 is a major regulator of the tumor suppressor DLC1. *J Cell Biol* 207, 627-642.

Wu, D., Asiedu, M., Adelstein, R. S., and Wei, Q. (2006). A novel guanine nucleotide exchange factor MyoGEF is required for cytokinesis. *Cell Cycle* 5, 1234-1239.

Yaffe, M. B., Rittinger, K., Volinia, S., Caron, P. R., Aitken, A., Leffers, H., Gamblin, S. J., Smerdon, S. J., and Cantley, L. C. (1997). The structural basis for 14-3-3:phosphopeptide binding specificity. *Cell* 91, 961-971.

Yoshizaki, H., Ohba, Y., Parrini, M. C., Dulyaninova, N. G., Bresnick, A. R., Mochizuki, N., and Matsuda, M. (2004). Cell type-specific regulation of RhoA activity during cytokinesis. *J Biol Chem* 279, 44756-44762.

Zanin, E., Desai, A., Poser, I., Toyoda, Y., Andree, C., Moebius, C., Bickle, M., Conradt, B., Piekny, A., and Oegema, K. (2013). A conserved RhoGAP limits M phase contractility and coordinates with microtubule asters to confine RhoA during cytokinesis. *Dev Cell* 26, 496-510.

Partie II – Etude du rôle d'ARHGAP19 dans l'hématopoïèse murine

1) Introduction

Arhgap19 étant un gène exprimé majoritairement dans le système hématopoïétique, nous avons décidé d'étudier le rôle de la protéine ARHGAP19 dans ce système. La déplétion du gène *arhgap19* par un sh-ARN dans des lignées lymphocytaires T humaines conduit à des défauts majeurs dans la ségrégation des chromosomes et dans la division cellulaire (David, Petit et al. 2014). La stratégie d'inactivation génique dans des souris nous a donc paru la meilleure solution pour étudier le rôle d'ARHGAP19. Des souris knock-out (KO) pour *arhgap19* ont tout d'abord été générées de manière constitutive à l'aide du promoteur *pgk*. Les souris homozygotes KO sont viables et ne présentent aucun défaut majeur du développement. Nous avons laissé vieillir les souris afin de mettre en évidence l'apparition d'une éventuelle leucémie, conséquence des défauts de ségrégation des chromosomes. Les résultats des analyses phénotypiques ont été trop hétérogènes pour conclure et aucune hémopathie n'a été détectée (résultats non présentés ici). Nous avons alors décidé d'analyser plus précisément le rôle d'ARHGAP19 dans un système murin plus ciblé où *arhgap19* est invalidé seulement dans le système hématopoïétique. Les résultats obtenus suggèrent qu'ARHGAP19 a un rôle transitoire aux âges de 4 et 6 mois des souris. ARHGAP19 a un effet sur la différenciation des cellules progénitrices qui touche l'ensemble des différentes populations hématopoïétiques. En revanche, la variabilité interindividuelle détectée ne nous permet pas, avec ce modèle, de mettre en évidence un rôle précis d'ARHGAP19.

2) Matériels et méthodes

a) Les lignées murines

Un allèle *arhgap19* recombiné (Figure 23) a été créé et transfecté dans des cellules souches embryonnaires murines de fond génétique SV129. Cet allèle recombiné est composé d'une partie du gène exprimant le domaine GAP de la protéine, floxée et d'une cassette de gène de résistance à l'hygromycine entourée des sites de recombinaison FRT. Les cellules souches ayant bien intégré l'allèle recombiné sont ensuite sélectionnées grâce à leur résistance à l'hygromycine. Enfin, par action de la recombinase FT, la cassette de résistance est éliminée. Les cellules souches retenues sont ensuite réimplantées chez des femelles C57Bl/6 donnant naissance à des bébés hétérozygotes ARHGAP19 WT/Lox. Par croisement

entre deux souris ARHGAP19 WT/Lox, nous obtenons des souris homozygotes ARHGAP19 Lox/Lox. Dans un premier temps les souris homozygotes floxées ont été croisées avec des souris transgéniques PGK-Cre afin d'exciser le domaine GAP floxé de manière ubiquitaire et obtenir des souris ARHGAP19 KO/KO. En parallèle, les souris hétérozygotes ayant un fond génétique mixte (SV129 et C57Bl/6) ont subi des croisements assistés par l'analyse des microsatellites pour générer une colonie de souris *Arhgap19* floxées à fond génétique pur (C57Bl6/N). Ces souris ont ensuite été croisées avec des souris transgéniques exprimant la Cre recombinase, sous le contrôle du promoteur hématopoïétique spécifique VAV1 exprimé dans le foie fœtal, permettant d'obtenir par la suite des souris homozygotes *Arhgap19* flox/flox+VAV-CRE viables.

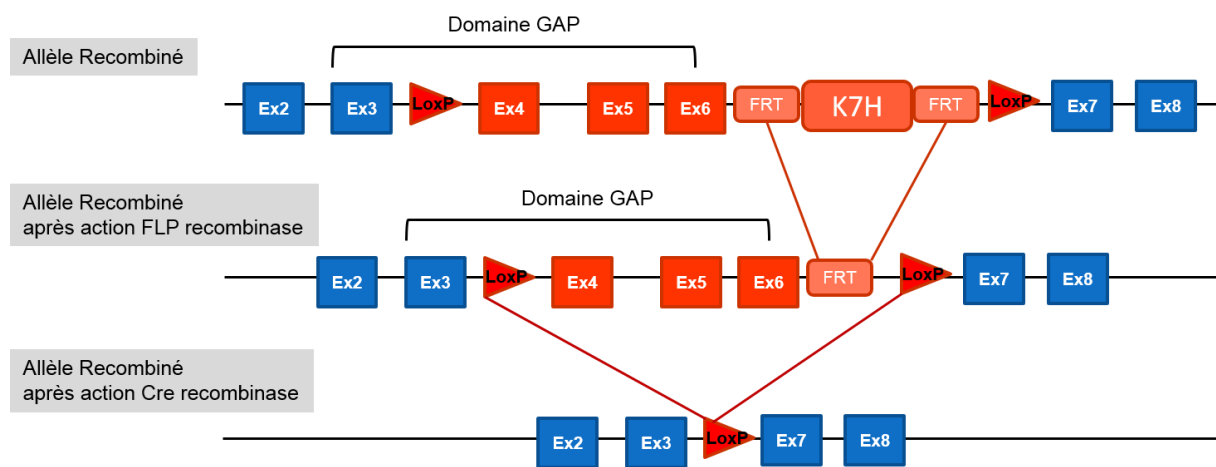


Figure 23: Structure du gène *arhgap19* recombiné.

Les petits obtenus à partir des divers croisements ont été génotypés à 3 semaines par PCR sur l'ADN extrait d'un morceau de queue puis sevrés à 4 semaines et génotypés une deuxième fois par PCR sur l'ADN extrait du sang. Les analyses décrites ci-après concernent celles faites sur les souris obtenues après croisements avec les souris transgéniques VAV-Cre.

b) Extraction d'ADN génomique à partir de morceaux de queue et de sang

Les globules rouges du sang prélevé sont lysés par l'ajout de chlorure d'ammonium 0.8% (StemCell Technologies) (environ 10 fois le volume de sang prélevé) et incubés pendant 5 minutes à température ambiante ou à 4°C. Les culots cellulaires sont resuspendus 3 fois dans 1ml de PBS après 5 minutes de centrifugation à 1200 rpm. Les culots (ou les queues de souris) sont ensuite lysés (tampon composé de 100mM de Tris-HCl pH 8, 5mM d'EDTA, 200mM de NaCl, 0.2% de SDS et 10µg/ml de PK si c'est des queues) toute la nuit dans un

bain-marie à 56°C. L'ajout d'isopropanol précipite l'ADNg présent qui sera ensuite centrifugé à 14000rpm puis lavé avec 70% d'éthanol et séché avant d'être resuspendu dans de l'eau.

c) PCR de géotypage

Les PCR faites sur les queues de souris permettent de vérifier la présence des allèles *arhgap19* WT et floxés ainsi que la Cre. Pour cela, les primers 2for, 3rev, VavCrefor et VavCre433rev ont été utilisés à une concentration finale de 0.5µM.

2for: 5'-gctgtgaattcacatggatgtg-3'

3rev: 5'-agctggaaaggacatggacc-3'

VavCrefor: 5'-ctgaccgtacacaaaattgcctg-3'

VavCre433rev: 5'-gaaatcagtgcgttcgaacgctag-3'

La Taq Phire hot start II a été utilisée avec une concentration finale de 1.5mM de MgCl₂ et 125µM de dNTPs.

Les PCR réalisées à partir du sang de souris précédemment détectées comme étant Cre⁺, permettent de mettre en évidence les allèles WT et KO pour le gène *arhgap19* grâce à l'utilisation des primers 2for, 4rev et 1for à 0.5µM final.

2for: 5'-gctgtgaattcacatggatgtg-3'

4rev: 5'-caacgatgagaaaataagcaccag-3'

1for: 5'-caggcaccacaaattttcatag-3'

La Taq polymérase (Invitrogen) à 0.5U a été utilisée avec une concentration finale de 2.5mM de MgCl₂ et 125µM de dNTPs.

Le programme de PCR utilisé est le même pour les deux types de PCR (celle réalisée sur les queues de souris et celle sur le sang) : 94°C (5min) ; [94°C (30sec), 60°C (30sec), 72°C (30sec)] * 35 ; 72°C (5min).

Les bandes détectées pour la première PCR sur les queues sont : 433 pb pour la Cre, 306 pb pour les allèles floxés et 204 pour les allèles wt d'*arhgap19*.

Les bandes détectées pour la deuxième PCR sur les sangs sont : 239 pb pour les allèles wt et 207 pb pour les allèles excisés (ko) d'*arhgap19*.

d) PCR quantitative

À partir des cellules de moelle osseuse de souris homozygotes WT/WT et KO/KO, les ARNs ont été extraits suivant le protocole du kit d'extraction RNeasy Mini Kit de Qiagen puis dosés au nanodrop. Ils ont ensuite été rétrotranscrits en ADNc en utilisant la Superscript II d'Invitrogen et des hexamères. Les PCRs quantitatives ont été réalisées sur une machine de type 7500 Fast Real-time (Applied Biosystem) en utilisant le mix Power SYBR Green PCR Master Mix (Thermo Fisher) et les primers suivants : *gapdh*, *arhgap19* (MP212767) et *arhgap11a* (MP212762) (Origene). L'expression des échantillons a été normalisée par rapport au gène de ménage *gapdh*.

e) Expérimentation animale

Tous les deux mois, la numération sanguine des animaux est contrôlée et analysée grâce au numérateur sanguin MS9. Pour l'analyse des cellules matures et progénitrices, le thymus, la rate et les os (fémurs, tibia et hanches) sont prélevés lors des sacrifices des animaux. La moelle des os est récupérée par « flushage » dans du PBS-2%SVF et filtration. Les cellules de la rate et du thymus sont récupérées après broyage des organes et filtration. Les globules rouges présents sont ensuite lysés par $9/10^{\text{ème}}$ de chlorure d'ammonium 0.8% (StemCell Technologies). Les cellules sont lavées avec du PBS-2%SVF et filtrées. Un comptage à la cellule de Mallassez est effectué pour estimer le nombre de cellules dans chaque tissu. Les cellules sont ensuite marquées à l'aide d'anticorps couplés à des fluorochromes provenant de BD Biosciences, Life Tech et Emfret : CD42b/PE, Ter119/PE Cyanine 7 (PECy7), CD41/APC, Gr1/PerCPCy5.5, Kit/APCCy7, CD71/FITC, Mac-1/BV510, CD8a/PE, CD19/PECy7 ou BV510, B220/APC ou FITC, CD4/APCCy7, CD43/PE, CD25/PECy7, IgD/APC, IgM/PerCPCy5.5, CD44/APC. Le marqueur de viabilité Sytox en Pacifique Blue (PB) a été utilisé. Une fois marquées, les cellules sont analysées par cytométrie en flux au FACS Canto II.

Pour étudier les progéniteurs lignage négatif, un kit de déplétion physique est utilisé (Mouse Hematopoietic Progenitor Stem Cell Enrichment Set, BD Biosciences). Pour cela, un mélange d'anticorps monoclonaux biotinylés ($3\mu\text{l}$ pour 10^6 cellules) comprenant des anticorps monoclonaux anti-CD3, anti-B220, anti-CD11b, anti-Gr1, anti-Ter119, marque les cellules matures (pendant 30min). Ensuite, la streptavidine couplées à des billes magnétiques ($5\mu\text{l}$ pour 10^6 cellules) reconnaît les anticorps biotinylés et cela permet, après action d'un aimant, d'enlever les cellules matures Lin^+ . Les cellules souches et progénitrices récupérées sont marquées à l'aide des anticorps : CD150/PE, Sca-1/PECy7, CD41/APC,

Kit/APCCy7, CD16/32/PerCPCy5.5, CD34/FITC et Strepta/PB puis analysées au FACS Canto II.

f) Analyses de la ploïdie des mégacaryocytes

La ploïdie des mégacaryocytes peut être analysée sur cellules directement issues de la souris ou sur cellules mises en culture liquide.

Pour l'analyse *in vivo*, un fémur est récupéré et « flushé » dans du tampon CATCH (PBS 1X EDTA 10%, Albumine 10%, Hepès 25mM) à 4°C. Le culot cellulaire est marqué au CD41/APC pendant 30min. Puis, après lavage, le culot est incubé toute la nuit (ou 4h au minimum) dans une solution de 0.1% de citrate de sodium et 50µg/ml d'iodure de propidium (Invitrogen). Les cellules sont ensuite traitées à la RNase (50µg/ml) puis analysées au FACS Canto I.

Pour l'analyse sur cellules en culture, 4×10^6 de cellules de moelle sont placées en culture pendant 5 jours dans du milieu RPMI-10%SVF avec de la glutamine, des antibiotiques (pénicilline et streptomycine), 50ng/ml de TPO et 10ng/ml de SCF. À l'issue des 5j, les cellules sont récupérées et marquées au CD41/APC pendant 30min à 4°C. Après rinçage, les cellules sont incubées 30min dans une solution de 0.1% de citrate de sodium, 50µg/ml d'iodure de propidium et 50µg/ml de RNase puis analysées directement au FACS.

g) Cultures in vitro

Pour analyser la clonogénicité des progéniteurs Lin⁻ et des progéniteurs lymphoïdes B des cultures semi-liquides en méthylcellulose ont été réalisées, respectivement en méthylcellulose M3434 (supplémentée de mTPO et contenant les cytokines IL6/IL3/SCF/EPO) et M3630 (contenant de l'IL7) (StemCell Technologies). Pour cela, 5000 cellules Lin⁻ sont mélangées à la M3434 avec 10ng/ml de TPO et étalées dans des boîtes de culture de 35mm. Concernant les méthylcelluloses M3630, 0.3×10^6 de cellules de moelle totale sont mixées à celles-ci puis étalées. Les colonies obtenues au bout de 7 jours sont comptées au microscope puis repiquées.

h) Analyses de la cytométrie et des statistiques

Les résultats obtenus au FACS ont été analysés grâce au logiciel FlowJo. Les graphiques et les tests statistiques (t test de Student) ont été faits à l'aide du logiciel GraphPad et la significativité des différences est définie par la p-value (*p<0.05 **p<0.01 ***p<0.0001).

3) Résultats

Seuls les résultats obtenus à partir des souris issues des croisements entre les souris transgéniques Vav-Cre et les souris *arhgap19* floxées sont présentés ci-après.

a) Vérification de l'excision

Afin d'étudier les souris ARHGAP19 KO et WT dans le système hématopoïétique, j'ai vérifié la conformité des génotypes attendus par PCR sur l'ADN du sang des souris après sélection des souris homozygotes Cre+ WT (*arhgap19* +/+) ou Cre+ Lox (*arhgap19* fl/fl) à partir de l'ADN extrait des queues de souris (Figure 24). Une vérification a également été faite une fois sur de l'ADN extrait des cellules de moelle osseuse des différentes souris.

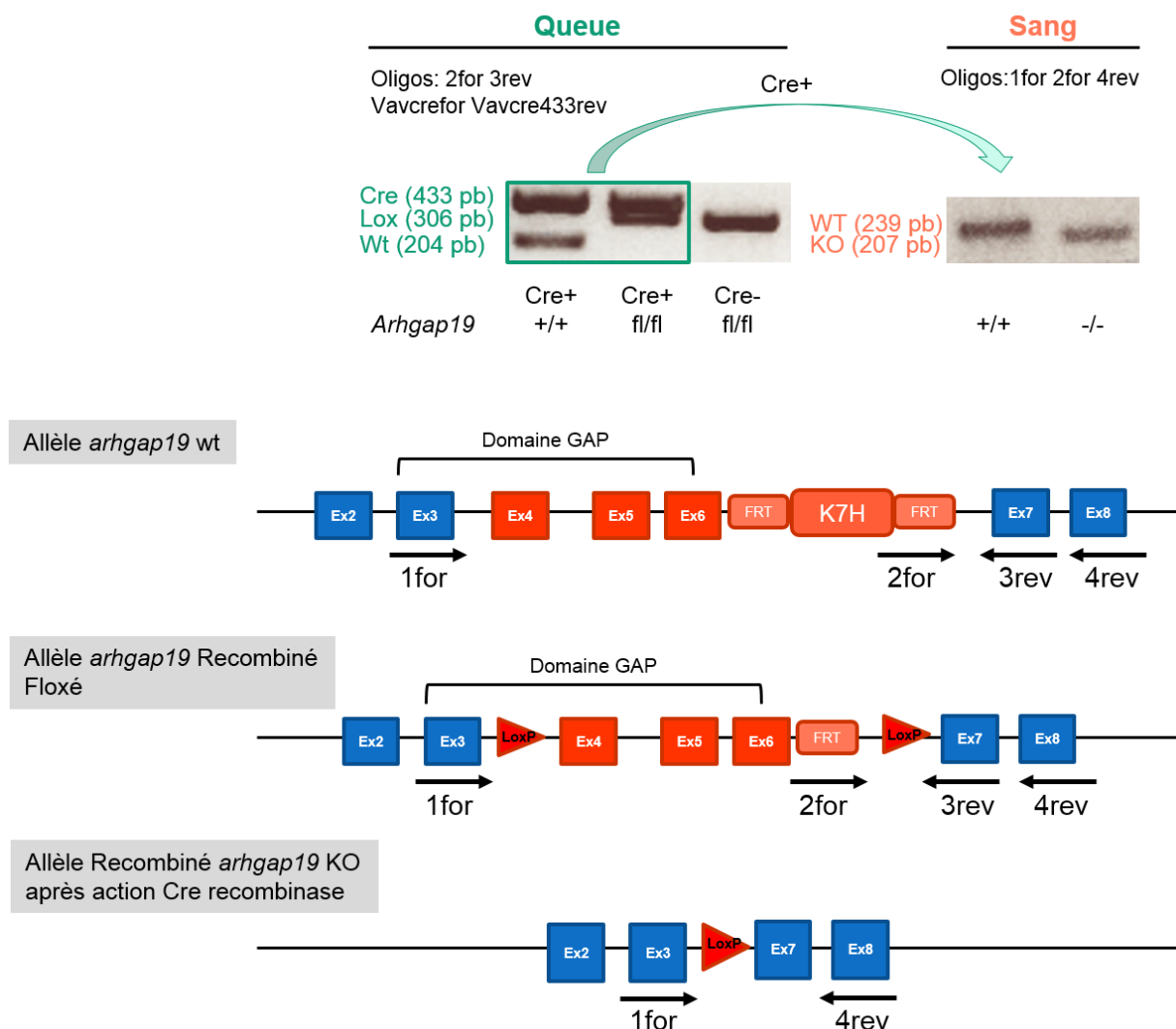


Figure 24: Gel d'agarose de résultats de génotypage des souris et oligonucléotides utilisés pour les PCR. Une première PCR est réalisée sur l'ensemble de l'ADN extrait des queues de souris générées pour ne garder que les souris qui expriment la Cre recombinase avec les oligonucléotides 2for/3rev et vavcrefor/vavcre433rev. La présence d'*arhgap19* wt ou floxé est vérifiée et nous donne un premier génotypage. Ensuite, une deuxième PCR est réalisée à partir de l'ADN extrait du sang des souris Cre⁺ pour vérifier l'excision du gène *arhgap19* dans

le système hématopoïétique (ici le sang) et confirmer le génotypage obtenu, WT ou KO pour *arhgap19*, en utilisant les trois oligonucléotides 1for/2for/4rev.

Par la suite, j'ai analysé le niveau d'expression d'*arhgap19* dans les souris homozygotes WT et KO à partir d'ARN extrait de leur moelle osseuse par PCR quantitative (Figure 25). Pour cela deux PCR quantitatives ont été réalisées avec une souris WT et trois souris KO en triplicata. L'expression d'*arhgap19* a été normalisée par rapport à l'expression du gène de ménage *gapdh*. Nous pouvons remarquer que l'expression d'*arhgap19* dans les souris KO est très fortement diminuée, mais il reste 20% d'expression résiduelle. L'inactivation de ce gène est globalement validée. L'expression restante détectée peut provenir d'une sous-population non délétée ou d'ARN tronqué instable (l'absence de la séquence oligonucléotidique commerciale utilisée nous empêche de conclure). Il aurait été intéressant de vérifier la délétion du gène dans chaque sous-population hématopoïétique.

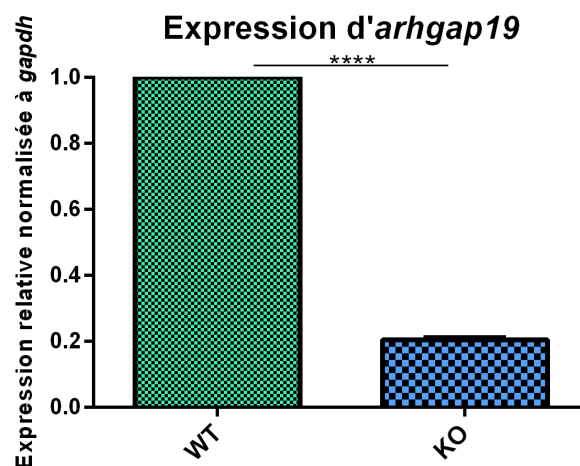


Figure 25: Expression du gène *arhgap19* dans les souris à analyser. L'ARN des cellules de moelle d'une souris WT et de trois souris KO a été extrait et analysé par deux qPCR en triplicata.

b) Analyse phénotypique globale

Depuis l'âge de 1 mois jusqu'à 10 mois le sang des souris ARHGAP19 WT et KO a été prélevé et les cellules ont été analysées quantitativement. On observe que le nombre de globules blancs est significativement diminué ce qui semble dû à une diminution du nombre de lymphocytes. En revanche, cette diminution reste peu importante. De plus, on remarque que la quantité de globules rouges n'est pas modifiée. Enfin, les souris ARHGAP19 KO présentent à partir de l'âge de 6 mois une thrombocytose accompagnée d'une augmentation du volume plaquettaire moyen (Figure 26).

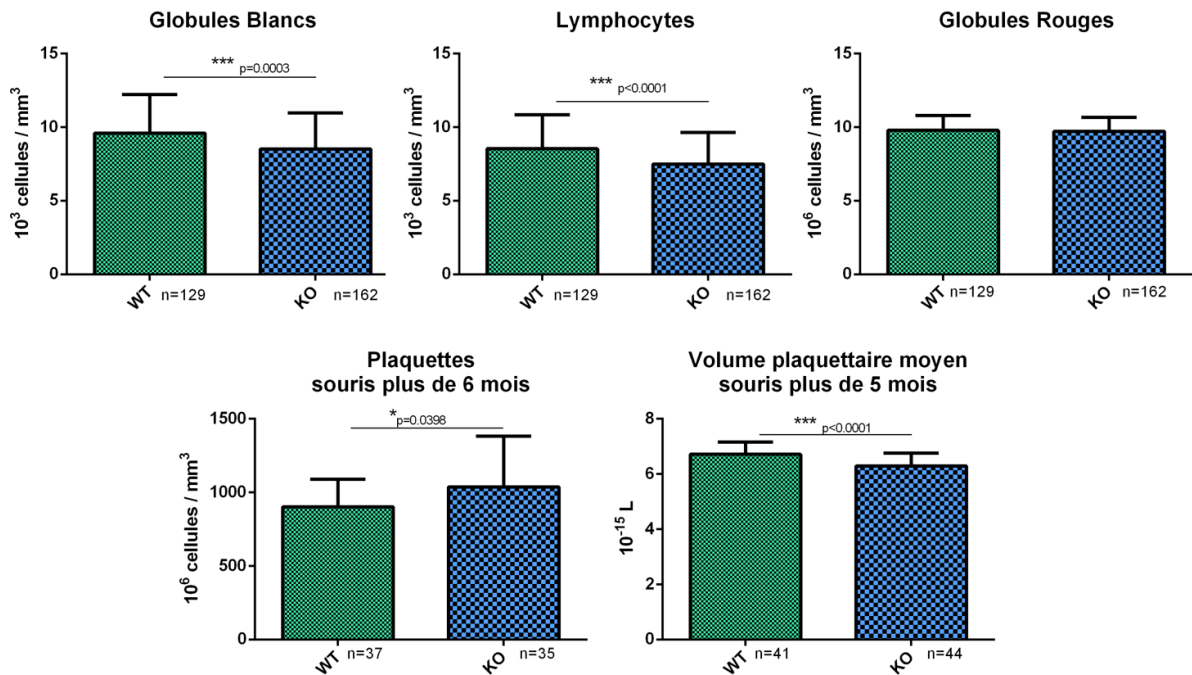


Figure 26: Analyse et comparaison de la numération et de la formule sanguine des souris *arhgap19*^{-/-} par rapport aux souris *arhgap19*^{+/+}. Pour 162 souris KO par rapport à 129 souris WT de 1 à 10 mois, les globules blancs sont diminués à cause d'une diminution des lymphocytes, les globules rouges ne sont pas atteints. À partir de 6 mois, le nombre de plaquettes des souris KO (35 souris) est augmenté, mais leur volume moyen est diminué.

La survie des animaux KO est intacte, aucune dysplasie n'a été mise en évidence ainsi qu'aucune leucémie. Des analyses plus précises sont nécessaires afin de révéler le rôle d'ARHGAP19.

Après extraction des cellules de la moelle osseuse et de la rate, j'ai observé une différence du nombre de ces cellules entre les souris exprimant *arhgap19* et les souris où l'expression de ce gène est réprimée dans le système hématopoïétique. En effet, sans distinction de l'âge des souris, nous pouvons remarquer une hypercellularité médullaire significative et une hypocellularité splénique non significative des souris KO par rapport aux souris WT (Figure 27). Étant donné cette différence, l'ensemble des résultats seront par la suite présentés en nombre absolu de cellules et non en pourcentage.

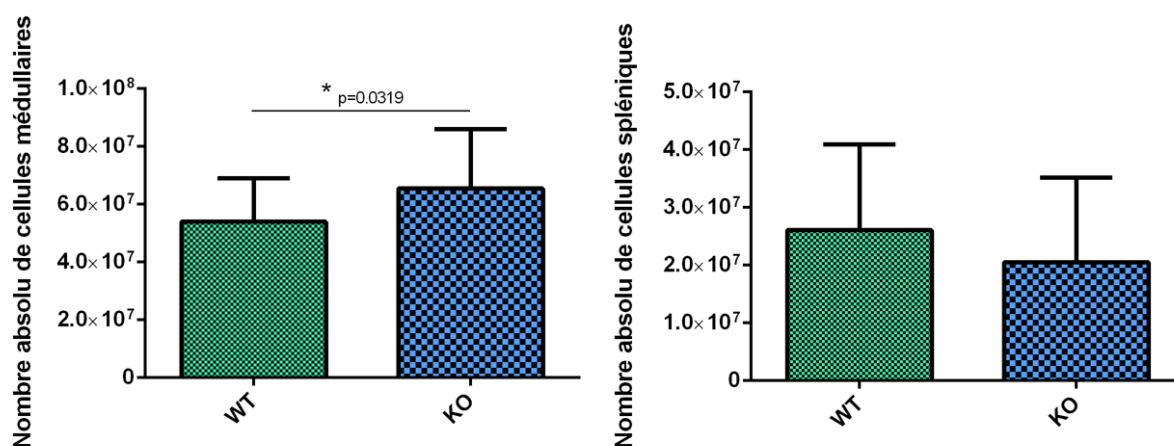


Figure 27: Nombre absolu de cellules dans la moelle osseuse et dans la rate des souris WT et KO. Analyse sur des souris de 2 à 8 mois. Pour la moelle n=24 pour les souris WT et KO. Pour la rate n=23 pour les souris WT et n=28 pour les souris KO.

Pour chaque groupe de souris WT et KO (au minimum 5 souris par groupe) de 2, 4, 6, 8 et 10 mois, j'ai réalisé une analyse globale des cellules matures dans la moelle osseuse (MO) et dans la rate : les lymphocytes T exprimant le CD8 ou CD4, les lymphocytes B B220⁺CD19⁺, les myélocytes Mac-1⁺Gr1⁺, les mégacaryocytes CD41⁺CD42⁺ et les érythrocytes KitTer119⁺. On observe une tendance à une augmentation des cellules matures dans la moelle osseuse, mais non significative sauf pour les souris KO âgées de 6 mois qui présentent un nombre significativement augmenté de LB (Figure 28). En revanche, dans la rate, le nombre de l'ensemble des populations matures est significativement diminué dans les souris KO âgées de 6 mois (Figure 29 et Figure 30). Mais cette diminution drastique est compensée après 6 mois.

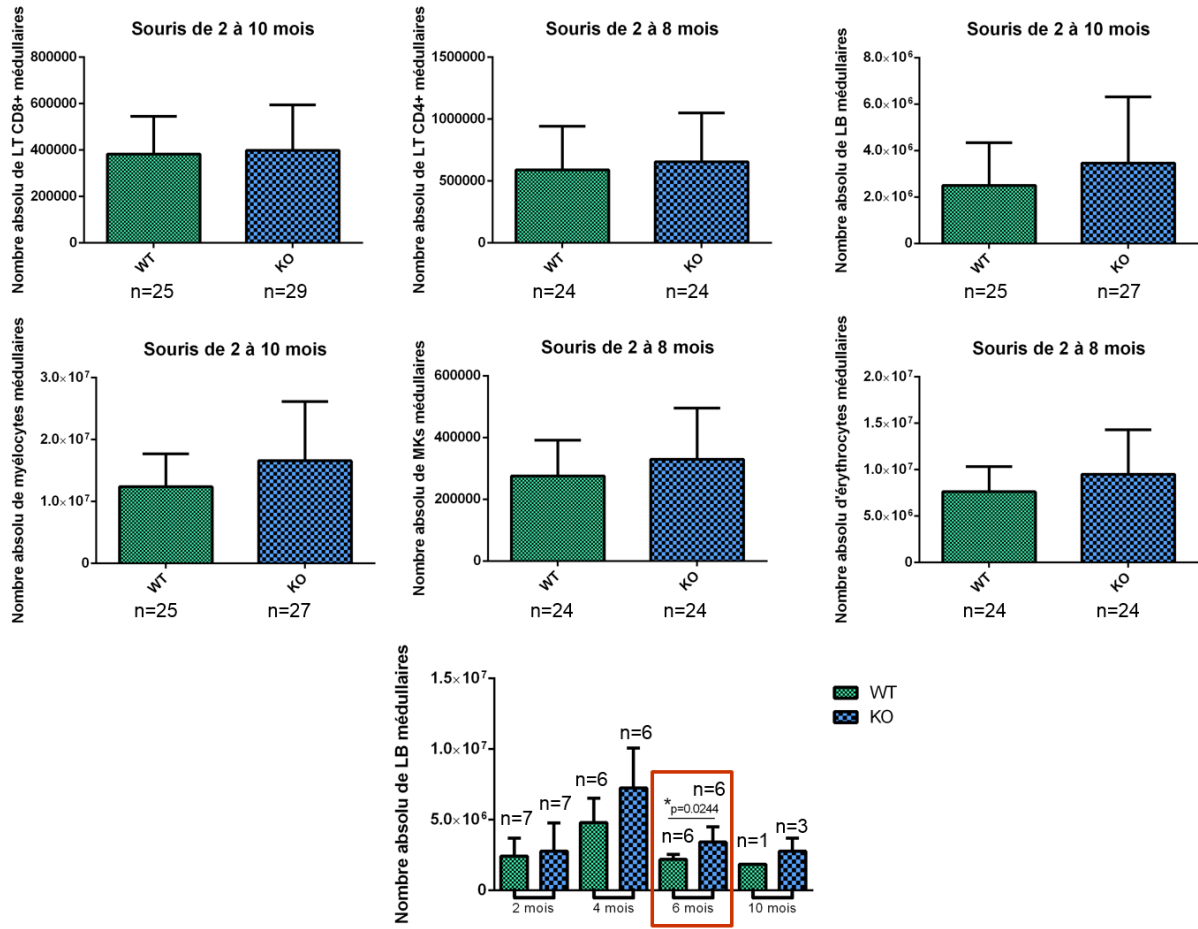


Figure 28: Nombre absolu de cellules matures dans la moelle osseuse des souris WT et KO.

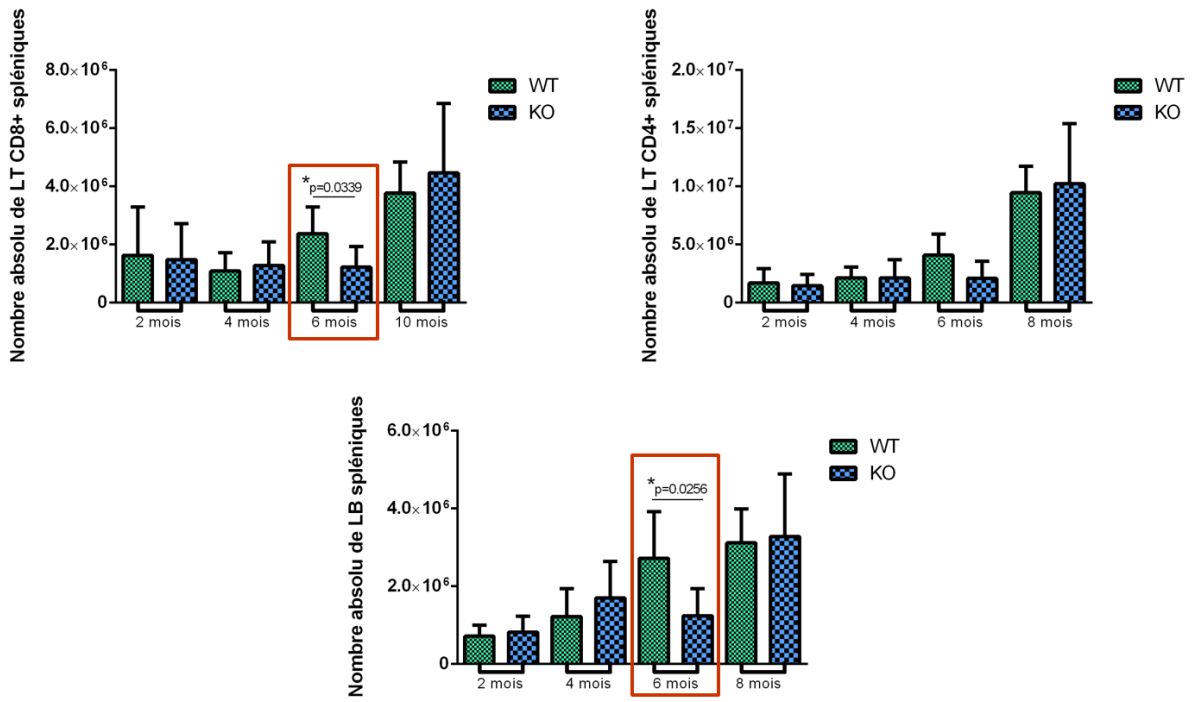


Figure 29: Nombre absolu de lymphocytes matures dans la rate des souris WT et KO en fonction de l'âge. Pour l'étude à 2 mois, n=7WT/7KO ; à 4 mois n= 3WT/6KO ; à 6 mois n=6WT/6KO ; à 8 et 10 mois n=5WT/5KO.

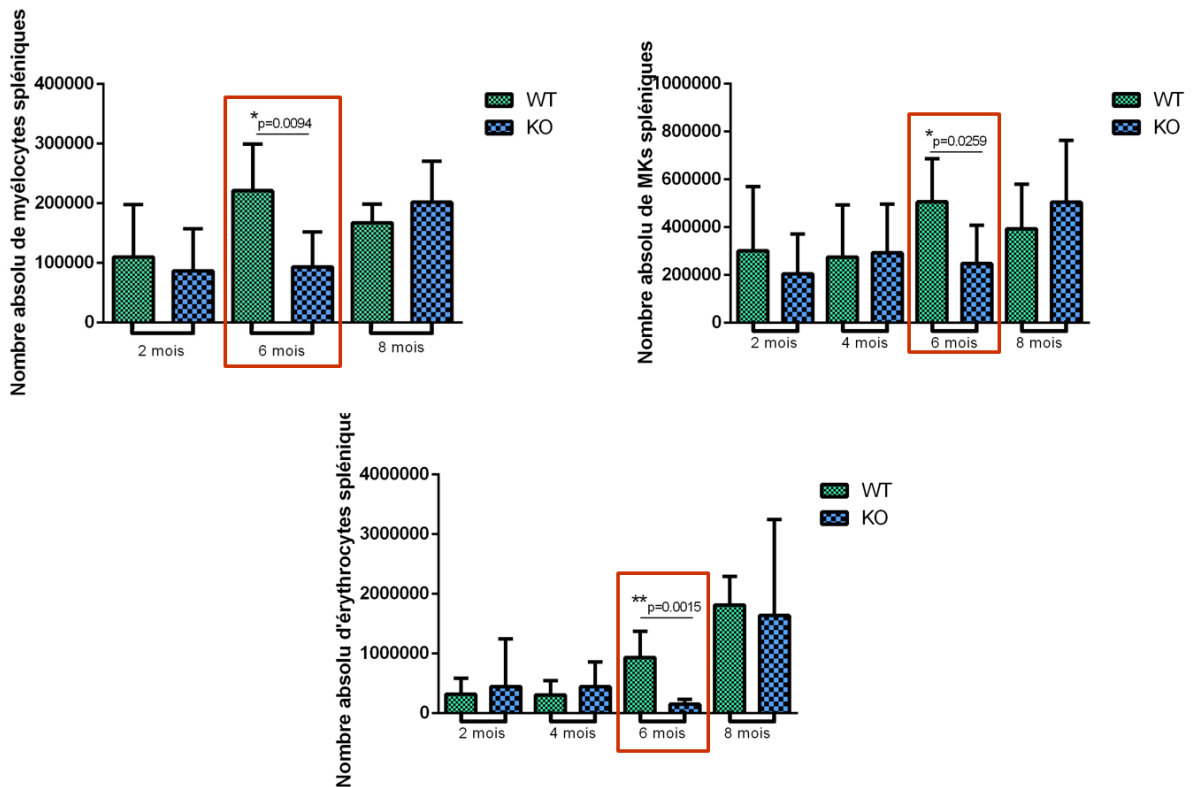


Figure 30: Nombre absolu de myélocytes, mégacaryocytes (MKs) et érythrocytes dans la rate des souris WT et KO en fonction de l'âge. Pour l'étude à 2 mois, n=7WT/7KO ; à 4 mois n= 3WT/6KO ; à 6 mois n=6WT/6KO ; à 8 mois n=5WT/5KO.

Pour comprendre le rôle d'ARHGAP19 et découvrir les phénomènes à l'origine des résultats observés, j'ai réalisé des analyses plus précises en étudiant les cellules souches et progéniteurs hématopoïétiques dans la moelle osseuse, la différenciation lymphocytaire T dans le thymus, B dans la moelle osseuse, l'érythropoïèse et la mégacaryopoïèse.

c) Analyse des progéniteurs

J'ai analysé en cytométrie en flux la proportion des progéniteurs hématopoïétiques grâce aux marqueurs d'immaturité Kit et Sca-1 à partir des cellules n'exprimant pas les marqueurs de surface de maturité (lignage négatif). Les progéniteurs sont eux-mêmes divisés en progéniteurs GMP, CMP et MEP à l'aide des marqueurs de surface CD16/32 et CD34. Les progéniteurs mégacaryocytaires (MkPs) sont distingués à l'aide de l'expression du CD150 et CD41 (Figure 31).

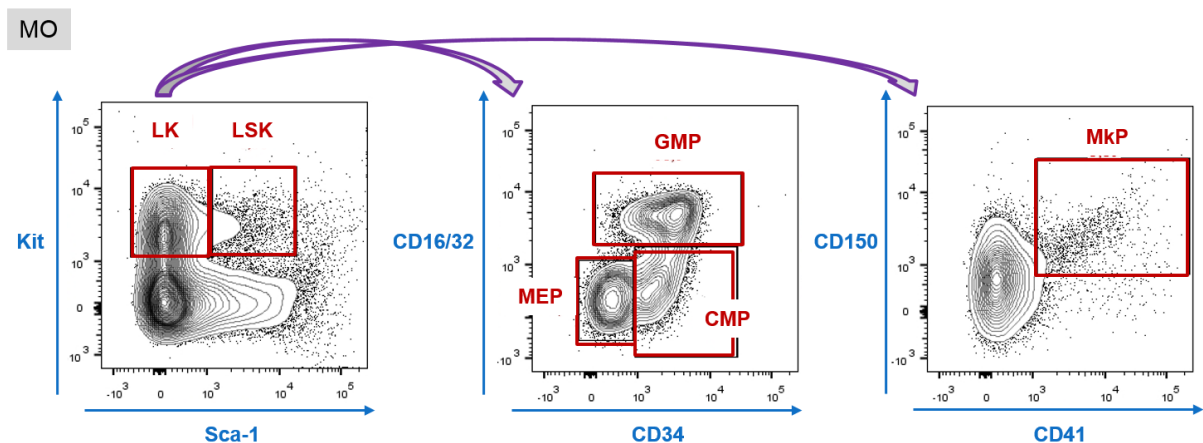


Figure 31 : Analyse représentative de la différenciation des HSCs dans la moelle osseuse obtenue par cytométrie en flux.

Nous avons remarqué que le nombre absolu de progéniteurs (lignage négatif) est augmenté dans les souris KO de 4 mois par rapport aux souris WT, mais non significativement. Cette différence est par la suite compensée et disparaît lorsque les souris ont 8 mois. (Figure 32)

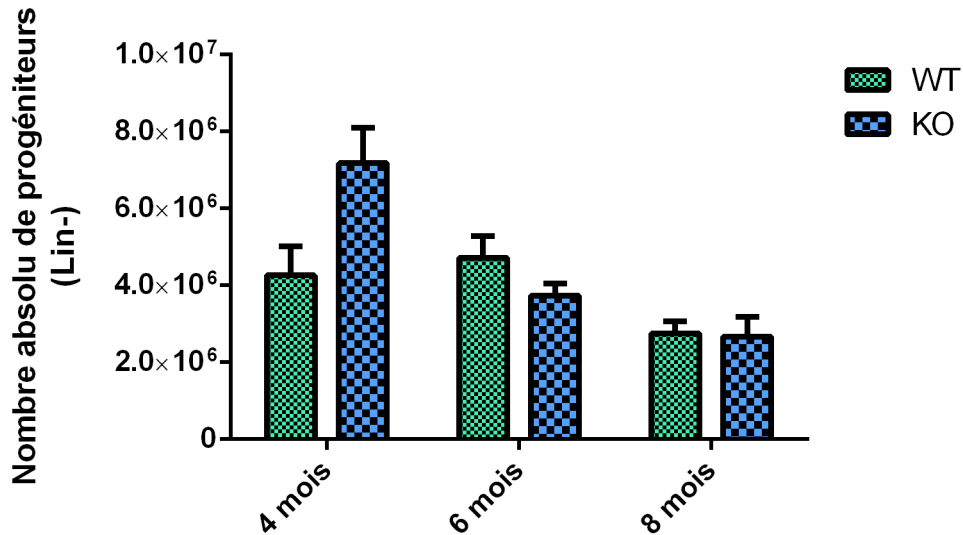


Figure 32 : Nombre absolu de progéniteurs lignage négatif dans la moelle osseuse des souris WT et KO de 4 à 8 mois. Pour l'étude à 4 mois n= 4WT/6KO ; à 6 mois n=6WT/6KO ; à 8 mois n=6WT/4KO.

L'étude des progéniteurs a été poursuivie et nous observons que l'origine de l'augmentation de cellules immatures des souris KO de 4 mois est due à une augmentation globale de tous les progéniteurs : les LSK (GMP et CMP) et les LK sont en quantité plus importante chez les souris KO. Les progéniteurs mégacaryocytaires sont eux aussi plus présents (Figure 33). Cette différence observée devient non significative lorsque les souris ont 6 mois et s'égalise à 8 mois.

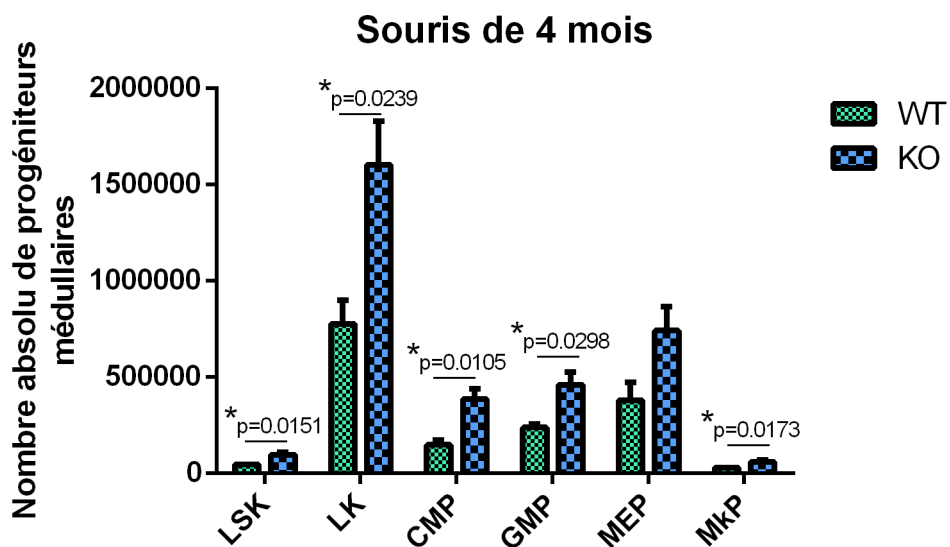


Figure 33 : Nombre absolu des différents progéniteurs présents dans la moelle osseuse chez des souris WT et KO de 4 mois. n=4WT/6KO.

Les études réalisées sur la clonogénicité des progéniteurs ne m'ont pas permis de conclure à cause d'une grande hétérogénéité entre les souris. En effet, des cellules issues des colonies provenant d'une souris KO se sont différenciées majoritairement en érythroblastes au détriment des myélocytes. Alors que les cellules issues des colonies provenant d'une autre souris KO se sont différenciées dans des proportions équivalentes à celles des souris WT, mais leur capacité d'autorenouveaulement était plus longue.

Ces résultats laissent suggérer l'implication d'ARHGAP19 dans la différenciation hématopoïétique c'est pourquoi j'ai étudié en détail l'impact de l'absence d'ARHGAP19 dans les différents lignages.

d) Analyse de la lymphopoïèse

Pour analyser et différencier les différentes populations lymphocytaires B, j'ai tout d'abord utilisé le marqueur d'immaturité CD43 et le marqueur spécifique des LB, le B220. Les progéniteurs lymphocytaires B expriment à la fois le CD43 et le B220. Les PreProB (CD43⁺B220⁺) n'expriment pas le CD19 contrairement aux ProB permettant alors de les distinguer (Figure 34). Ensuite, pour les populations plus matures, il suffit de sélectionner les populations B220⁺CD19⁺ puis CD25⁺ pour isoler les PreB ou IgM⁺ pour isoler les LB les plus matures. En fonction de l'expression du B220, les populations IgM⁺ peuvent être séparées en deux : les immatures n'exprimant pas les IgD (B220^{med}) et les matures (B220^{high}) qui expriment l'IgD (Figure 34).

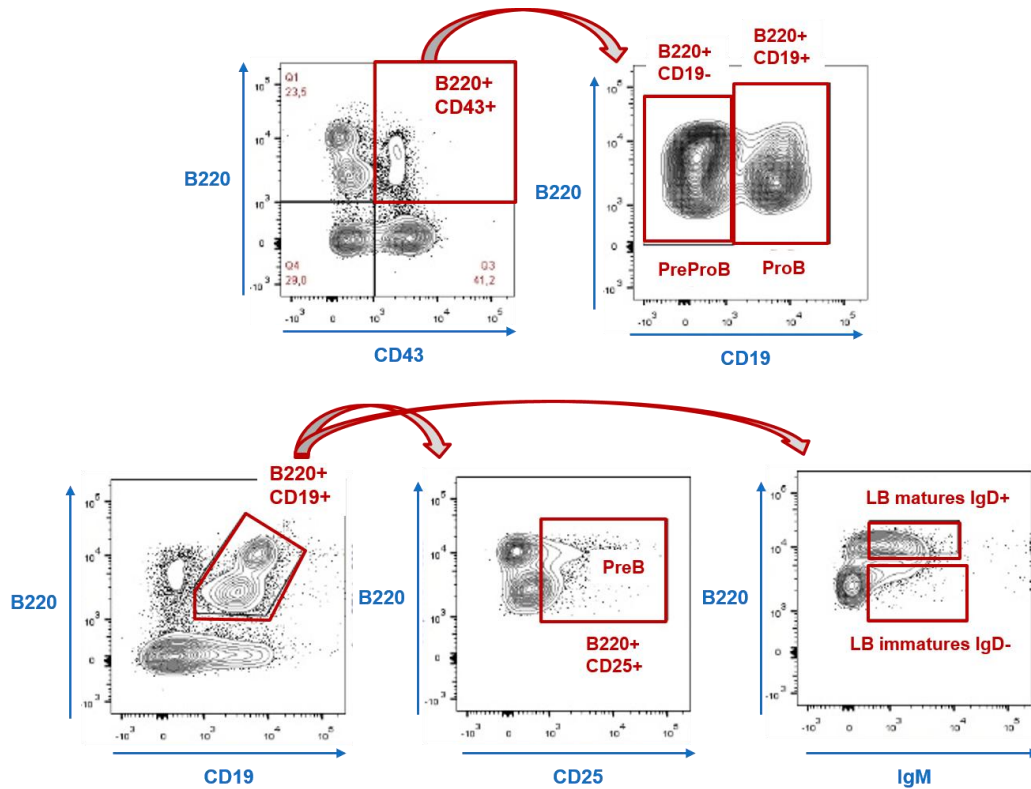


Figure 34: Analyse représentative de la différenciation des lymphocytes B dans la moelle osseuse obtenue par cytométrie en flux.

Les résultats obtenus pour les souris analysées de 4 et 6 mois présentent une augmentation du nombre absolu de l'ensemble des populations lymphocytaires B pour les souris KO par rapport aux souris contrôles, avec beaucoup d'hétérogénéité à 4 mois qui s'estompe à l'âge de 6 mois, mais qui reste non significative.

Les analyses faites en méthylcellulose sur la capacité de différenciation des progéniteurs vers le lignage lymphocytaire B suggèrent qu'ARHGAP19 limite la prolifération vers ce lignage. En effet, les progéniteurs des souris KO pour *arhgap19* présentent une clonogénicité plus importante et une capacité d'autorenouvellement plus longue. Mais les résultats sont très hétérogènes d'une souris KO à l'autre.

L'étude de la différenciation des lymphocytes T a été faite sur des souris de 4 et 6 mois, dans le thymus. Pour cela, les populations sont différenciées en fonction de leur expression du CD8 et CD4. Les populations négatives sont les populations DN, celles qui expriment le CD4 et le CD8 sont les DP et on retrouve les populations SP CD8⁺ et SP CD4⁺ (Figure 35). Les populations DN sont ensuite séparées grâce aux marqueurs de surface CD44 et CD25. Les populations qui expriment le CD44, mais pas le CD25 sont les DN1. Celles qui expriment le CD25 sont les DN2 et DN3 et celles qui n'expriment aucun des deux marqueurs sont les DN4 (Figure 35).

Thymus

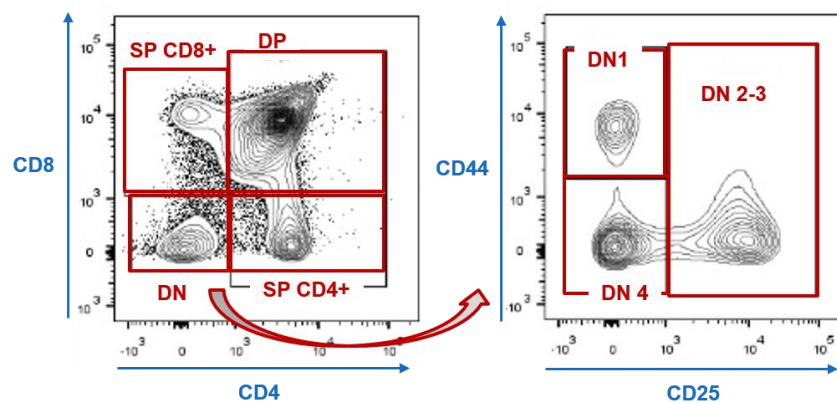


Figure 35: Analyse représentative de la différenciation des lymphocytes T dans le thymus obtenue par cytométrie en flux.

Seulement à l'âge de 6 mois, des différences sont observées. En effet, une augmentation significative de la fréquence des DN2-3 (non significative en nombre absolu) est observée chez les souris KO par rapport aux souris WT. Cette augmentation est suivie d'une diminution significative de la fréquence des DN4 dans les souris KO suggérant un blocage de la différenciation à la transition entre les populations doubles négatives 3 et 4. Une compensation a ensuite lieu rétablissant une part égale des DP et des SP entre les souris WT et KO (Figure 36).

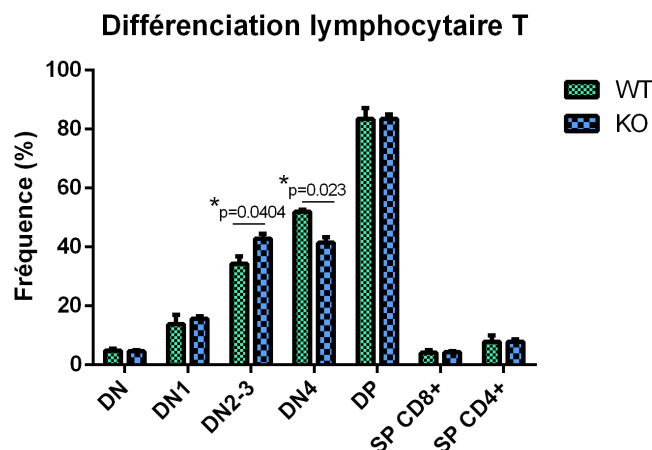


Figure 36: Fréquence des populations lymphocytaires T dans le thymus à 6 mois chez les souris WT et KO. n=2WT/4KO.

e) Analyse de l'érythropoïèse

Les différentes populations qui entrent en jeu dans l'érythropoïèse peuvent être singularisées grâce aux marqueurs de surface CD71 et Ter119. Les populations n'exprimant pas le Ter119 et peu le CD71 sont les BFU-E. Ensuite apparaissent les CFU-E qui expriment le CD71 de

façon intermédiaire et n'expriment toujours pas le Ter119. Les Pro-érythroblastes (ProEB) sont Ter119^{med} et CD71^{high}. Les populations suivantes expriment fortement le Ter119 et le CD71 de manière élevée (pour les érythroblastes basophiles), intermédiaire (pour les érythroblastes basophiles tardifs et les polychromatiques) ou faible (pour les érythroblastes orthochromatiques et les réticulocytes) (Figure 37).

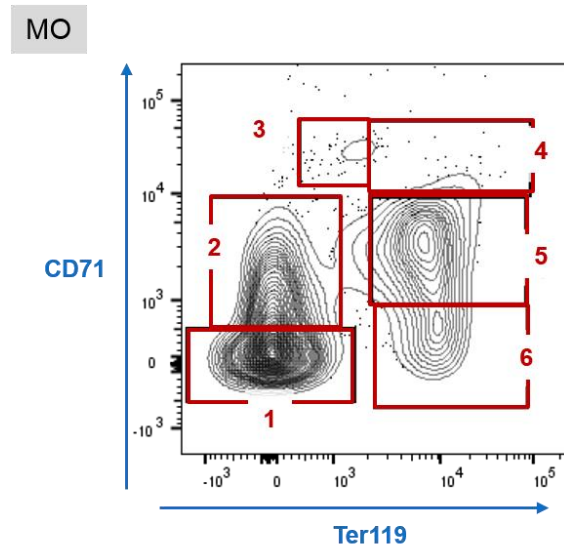


Figure 37: Analyse représentative de la différenciation des érythrocytes dans la moelle osseuse, obtenue par cytométrie en flux. 1=BFU-E, 2=CFU-E, 3=ProEB, 4=EB basophiles, 5=EB basophiles tardifs et polychromatiques, 6=EB orthochromatiques et réticulocytes.

L'analyse des populations issues de la différenciation érythrocytaire révèle une augmentation du nombre absolu d'érythroblastes basophiles dans la moelle osseuse des souris KO à l'âge de 6 mois, par rapport aux souris contrôles (Figure 38).

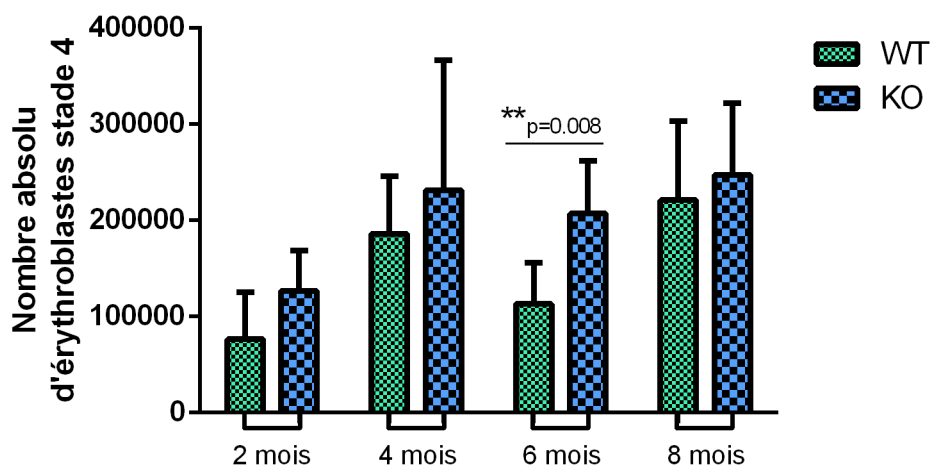


Figure 38: Nombre absolu d'érythroblastes basophiles dans la moelle des souris WT et KO de 2 à 8 mois. Pour l'étude à 2 mois, n=7WT/7KO ; à 4 mois n= 6WT/6KO ; à 6 mois n=6WT/6KO ; à 8 mois n=5WT/5KO.

f) Analyse de la mégacaryopoïèse

Les progéniteurs mégacaryocytaires (MkPs) sont augmentés dans les souris KO à l'âge de 4 mois, mais aucune différence significative du nombre de mégacaryocytes matures n'est observée avec les marqueurs CD41 et CD42 dans la moelle, quelque soit l'âge des souris.

La ploïdie globale ainsi que la haute ploïdie définie par les mégacaryocytes >4N des souris KO commencent à diminuer à l'âge de 4 mois et cette différence devient significative à 6 mois (Figure 39). En revanche, cette diminution disparaît lorsque les souris ont 10 mois. Elle reste présente sur des cellules mises en culture liquide, mais est non significative.

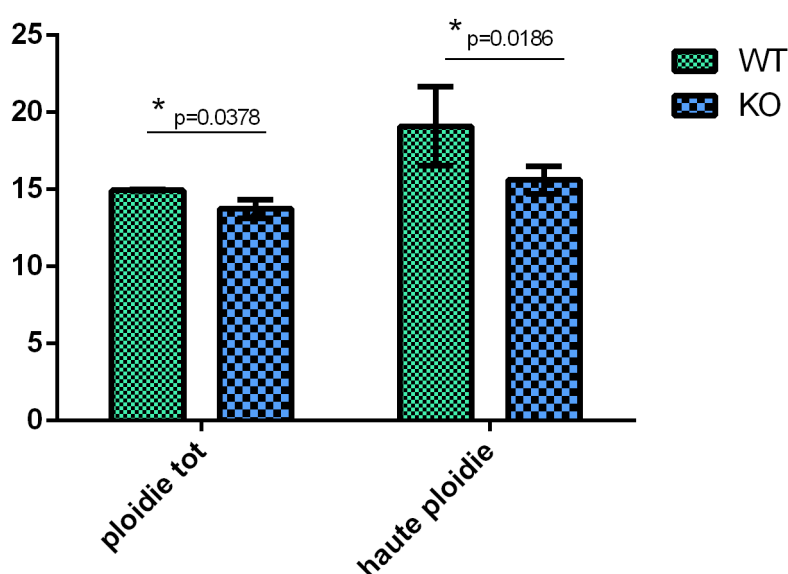


Figure 39 : Analyse de la ploïdie des mégacaryocytes matures issus des souris WT et KO de 6 mois. $n=2$ pour les WT et $n=6$ pour les KO. La haute ploïdie correspond à la ploïdie des MKs de 8, 16, 32 et 64N.

4) Conclusion et discussion

Afin d'étudier le rôle d'*arhgap19* dans l'hématopoïèse murine, nous avons généré un modèle murin d'inactivation conditionnelle de ce gène reposant sur le système Cre/Lox dans lequel l'expression de la recombinaison est sous la dépendance du promoteur hématopoïétique *Vav*. Les souris inactivées pour *arhgap19* dans le système hématopoïétique sont viables et aucune atteinte physiologique n'est détectée. L'étude détaillée des différentes populations impliquées dans le système hématopoïétique ne nous a pas permis de mettre en évidence une fonction claire d'ARHGAP19. En effet, les résultats obtenus suggèrent qu'ARHGAP19 est capable d'agir aux différents stades de la différenciation hématopoïétique et de toucher l'ensemble des populations de ce système.

C'est vers l'âge de 4 mois que les souris KO pour *arhgap19* présentent leurs premières anomalies. À ce stade, la proportion des populations les plus immatures est atteinte. En absence d'ARHGAP19, le nombre de progéniteurs médullaires et thymiques est augmenté (augmentation significative des LSK, LK, CMP, GMP, MkP, thymocytes DN2-3 et des pro-érythroblastes). Ce phénomène est transitoire, disparaît ensuite, mais se répercute dans les étapes plus tardives de la différenciation hématopoïétique à l'âge de 6 mois des souris. Les souris KO de 6 mois présentent une augmentation significative du nombre de lymphocytes B avancés dans la différenciation (B220⁺CD19⁺), un nombre de plaquettes significativement supérieur à celui des souris WT avec une diminution du volume plaquettaire probablement justifiée par une diminution importante de la ploïdie des mégacaryocytes. Enfin, l'ensemble des populations matures est drastiquement diminué dans la rate. Ce phénomène pourrait être la conséquence d'un blocage des cellules dans la moelle, mais leur nombre n'est pas fortement augmenté. De même que pour les progéniteurs, l'ensemble des anomalies mis en évidence à 6 mois est compensé par la suite.

En plus des analyses phénotypiques, les études de clonogénicité réalisées, suggèrent un rôle polyvalent d'*arhgap19* qui semble être individu dépendant. Cette hétérogénéité individuelle et fonctionnelle pourrait expliquer l'absence d'évidence quant à la spécificité cellulaire d'*arhgap19*.

ARHGAP19 a donc un rôle transitoire dans l'hématopoïèse murine. Cette protéine intervient à la fois dans des stades précoces, mais également en fin de différenciation hématopoïétique, que ce soit dans la moelle osseuse, le thymus et la rate. Les variations interindividuelles ne nous ont pas permis, avec ce modèle, de définir clairement l'implication du gène *arhgap19* dans le système immunitaire, mais n'exclut pas néanmoins sa contribution. En revanche, ARHGAP19 ne semble pas jouer un rôle majeur sans doute parce qu'elle n'est pas la seule RhoGAP impliquée.

DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

Introduction

La protéine ARHGAP19 a été mise en évidence par le laboratoire comme étant une GAP de RhoA contrôlant les changements de forme cellulaire et la ségrégation des chromosomes lors de la mitose des LT. Le niveau d'expression de cette protéine fluctue au cours de la division cellulaire suggérant une fine régulation de celle-ci. Nous nous sommes donc intéressés à la phosphorylation d'ARHGAP19, modification post-traductionnelle classique pouvant modifier l'activité, la localisation ou la fonction d'une protéine.

D'autre part, ARHGAP19 est une GAP exprimée spécifiquement dans le système hématopoïétique. Cette expression tissu-spécifique suggère un rôle particulier de cette protéine dans ce système, c'est pourquoi nous avons entrepris d'identifier sa fonction. Pour cela, nous avons étudié les conséquences de l'absence d'expression du gène *arhgap19* dans l'hématopoïèse dans des souris KO pour *arhgap19* par rapport à des souris WT.

Partie I – Régulation d'ARHGAP19 par phosphorylation

La phosphorylation est un phénomène régulateur qui touche un grand nombre de protéines et en particulier celles impliquées dans la division cellulaire. Cette modification post-traductionnelle permet de contrôler la localisation subcellulaire des protéines, leur activité et parfois leurs interactions protéiques. Les protéines kinases mitotiques généralement impliquées sont : CDK1, Aurora et Polo kinases. Ces kinases subissent elles-mêmes des phosphorylations qui régulent leurs activités (Archambault and Glover 2009, Petsalaki, Akoumianaki et al. 2011, Schmidt, Rohe et al. 2017). Les régulateurs des RhoGTPases intervenant dans la division cellulaire sont également des cibles importantes de ces kinases. En effet, la GEF Ect2 et la GAP MgcRacGAP sont phosphorylées sur un grand nombre de leurs résidus au cours de la mitose, par les trois protéines kinases citées précédemment. Cela permet de contrôler leur localisation, mais également leurs conformations, leurs activités et leurs interactions protéiques (David, Petit et al. 2012). Compte tenu des changements de localisation et du rôle au cours de la mitose des lymphocytes T, la protéine ARHGAP19 semble également sujette à ce type de régulation.

D'après la spectrométrie de masse réalisée au début du projet, ARHGAP19 est potentiellement phosphorylée sur différents résidus situés majoritairement en C-terminal. L'équipe s'est tout d'abord concentrée sur les phosphorylations potentiellement effectuées par des kinases impliquées dans la division cellulaire étant donné la fonction d'ARHGAP19 dans la mitose des lymphocytes T. ARHGAP19 étant une GAP de RhoA, il nous a paru intéressant d'étudier également les sites potentiels de phosphorylation par ROCK, protéine

kinase activée par RhoA, pour mettre en évidence une éventuelle boucle de rétrocontrôle. Nous nous sommes donc concentrés sur l'étude des phosphorylations des résidus Thréonines 404 et 476 et de la Sérine 422 d'ARHGAP19. Nous avons ensuite confirmé que les Thréonines 404 et 476 sont phosphorylées par la protéine kinase mitotique CDK1 et la Sérine 422, par l'effecteur de RhoA, la protéine kinase ROCK. La première question soulevée fut : les phosphorylations étudiées ont-elles un impact direct sur l'activité GAP? D'après le test GAP *in vitro* réalisé, l'absence de phosphorylation sur T404/476 et S422 n'a pas d'effet sur l'activité RhoGAP d'ARHGAP19. Ce résultat n'est pas surprenant car les modifications post-traductionnelles de ce type qui provoquent une perturbation de l'activité GAP de la protéine, ont généralement lieu sur des résidus situés dans le domaine GAP. C'est par exemple le cas de la phosphorylation de la Sérine 387 présente dans le domaine RhoGAP de MgcRacGAP par la protéine kinase Aurora B (Minoshima, Kawashima et al. 2003). Mais il n'est pas impossible de voir qu'une phosphorylation hors du domaine GAP peut modifier l'activité GAP de la protéine. En effet, la phosphorylation par ERK de la protéine CdGAP dans un domaine riche en proline non localisé dans le domaine GAP, entraîne une augmentation de son activité GAP envers Rac1 (Tcherkezian, Danek et al. 2005). La phosphorylation de DLC1 par la protéine kinase A (PKA), provoque une dimérisation de la GAP et améliore l'activité GAP envers RhoA (Ko, Chan et al. 2013). En revanche, la phosphorylation peut avoir un effet indirect sur l'activité. La phosphorylation de la protéine p190RhoGAP par ROCK n'affecte pas en soi son activité GAP, mais empêche la liaison avec la protéine Rnd ce qui inactive son domaine RhoGAP (Mori, Amano et al. 2009). De même pour la protéine GEF AKAP-Lbc, la phosphorylation de la Sérine 1565 permet une interaction avec la famille de protéines 14-3-3 qui entraîne une inhibition de son activité GEF envers RhoA (Diviani, Abuin et al. 2004). ARHGAP19 est phosphorylée avant l'entrée en mitose par ROCK sur la Sérine 422 et cette modification entraîne également une interaction avec la famille de protéines 14-3-3. Mais cette interaction ne semble pas avoir d'effet sur l'activité RhoGAP car le mutant non phosphorylable qui ne se lie pas à 14-3-3, hydrolyse le GTP lié à RhoA de la même manière que la protéine WT. Il a été souvent décrit que les interactions avec les protéines 14-3-3 provoquent une séquestration des protéines liées. L'interaction de la protéine GAP DLC1 avec la famille de protéines 14-3-3 la bloque dans le cytoplasme (Scholz, Regner et al. 2009). L'étude de l'interaction d'ARHGAP19 avec 14-3-3 au cours de la division cellulaire montre que cette liaison a lieu tout au long du cycle avec une augmentation lorsque la Sérine 422 est fortement phosphorylée en début de mitose. En parallèle, l'analyse de la localisation d'ARHGAP19 pendant le cycle cellulaire en microscopie indique que la protéine est nucléaire en interphase, puis cytoplasmique en début de mitose et devient membranaire à partir de l'anaphase. Cette variation de localisation ne corrèle pas avec la liaison avec 14-3-3, donc l'interaction avec 14-3-3 ne séquestre pas ARHGAP19

dans un endroit donné. Lorsqu'ARHGAP19 ne peut plus interagir avec 14-3-3 (quand la Sérine est mutée en site non phosphorylable), la phosphorylation des Thréonines 404 et 476 est fortement diminuée voir absente. Donc soit 14-3-3 permet d'apporter la kinase CDK1 pour phosphoryler les Thréonines, soit elle protège de la déphosphorylation. Nous avons mis en évidence que cette liaison empêche les protéines phosphatases de déphosphoryler ARHGAP19, phénomène déjà décrit pour d'autres protéines (Hausser, Link et al. 2006). Donc la Sérine 422 permet à ARHGAP19 d'interagir avec 14-3-3 la protégeant d'éventuelles déphosphorylations en début de mitose. En début de mitose, apparaissent ensuite les phosphorylations des Thréonines par CDK1 active. Sans ces phosphorylations, ARHGAP19 se localise prématurément à la membrane cellulaire. Il semblerait donc que la phosphorylation des Thréonines régule la localisation de la protéine. Ce phénomène a été observé pour la protéine FilGAP qui est relocalisée suite à sa phosphorylation sur la sérine 402 (Morishita, Tsutsumi et al. 2015). Les Thréonines 404 et 476 d'ARHGAP19, phosphorylées, empêcheraient le recrutement membranaire en début de mitose. Une fois en anaphase, CDK1 n'étant plus active, T404-T476 ne sont plus phosphorylées et ARHGAP19 devient membranaire. Les groupements phosphates par leurs charges négatives peuvent gêner les interactions ou bloquer des interactions avec les phospholipides. Il a été montré que la phosphorylation par la protéine kinase C (PKC) de la protéine p190RhoGAP, affecte son interaction avec les phospholipides (Levay, Settleman et al. 2009). Des expériences préliminaires suggèrent que seule la partie C-terminale d'ARHGAP19 contenant les résidus phosphorylés étudiés, permet une interaction avec les phospholipides membranaires. Il serait intéressant d'étudier plus en détail le mécanisme mis en place et analyser si ce sont les Thréonines non phosphorylées qui permettent l'interaction avec les phospholipides et donc qui sont responsables de la localisation membranaire d'ARHGAP19. Enfin, l'absence de phosphorylation d'ARHGAP19 sur les trois résidus étudiés conduit à des cellules multinucléées. Or, il a été montré qu'interférer avec l'activité de RhoA lors de la mitose entraîne la multinucléation. Ce n'est pas directement l'absence de phosphorylation qui atteint la fonction GAP d'ARHGAP19 (cf. Test GAP *in vitro*) ni l'interaction avec 14-3-3 (car le mutant T404A-T476A interagit toujours avec 14-3-3 et provoque la multinucléation). La seule différence entre les cellules exprimant ARHGAP19 contrôle et celles exprimant les mutants non phosphorylable est la localisation de la protéine. En effet, ARHGAP19 muté se retrouve prématurément à la membrane cellulaire et perdure jusqu'en télophase. La quantité d'ARHGAP19 mutée présente est supérieure lorsque la protéine colocalise avec RhoA et le phénomène d'inactivation de la GTPase est donc plus important. Lorsqu'ARHGAP19 n'est pas phosphorylée, un nombre plus important de protéines RhoA est inactivé conduisant donc à des défauts de cytodivision et provoque la multinucléation. Les phosphorylations d'ARHGAP19 ont donc un effet indirect sur son activité RhoGAP via la régulation de sa

localisation. Mais les défauts de la cytodièrese conduisant à des cellules multinucléées n'ont pas encore été élucidés. Des résultats préliminaires obtenus par vidéomicroscopie sur les mutants d'ARHGAP19 suggèrent des défauts de ségrégation chromosomiques et une défaillance de l'ingression du sillon de clivage. En effet, des ponts de chromatines semblent se former en anaphase empêchant le sillon de clivage d'ingresser. Il serait intéressant de quantifier ce phénomène dans les différents mutants en vidéomicroscopie. De plus, il serait utile de se pencher sur les problèmes de ségrégation des chromosomes. Certaines immunoprécipitations réalisées au début du projet montrent qu'ARHGAP19 est capable d'interagir avec les protéines SMC1, SMC2 et CKAP5. Les protéines SMC sont nécessaires lors de la mitose pour assurer une ségrégation optimale du matériel génétique et CKAP5 est impliquée dans la régulation de la dynamique des MTs lors de la mitose. Ces interactions sont peut-être modifiées lorsque ARHGAP19 n'est pas phosphorylée et pourraient être une piste à explorer pour expliquer les phénomènes observés. On pourrait également étudier les protéines MAPs (microtubules associated proteins) cruciales pour un fonctionnement correct du fuseau mitotique.

Pour aller plus loin sur la protéine ARHGAP19 endogène, il serait intéressant d'étudier la dégradation de la protéine. En effet, on observe que l'expression de la protéine endogène diminue au fur et à mesure de la division cellulaire et disparaît au bout de quelques heures. L'ajout de MG132 pour inhiber le protéasome bloque la dégradation d'ARHGAP19, mais cet inhibiteur a un impact non négligeable sur la division. En effet, les cellules traitées au MG132 sont bloquées en mitose. Donc l'absence de dégradation d'ARHGAP19 peut être la conséquence de l'effet de l'inhibiteur sur le cycle et sur les protéines mitotiques ou sur le blocage du protéasome. Il serait donc intéressant de procéder à des tests d'ubiquitinylation *in vitro* et *in cellulo* comme réalisés par (Su, Agati et al. 2003).

Enfin, notre modèle d'étude de la surexpression et des phosphorylations d'ARHGAP19 a aujourd'hui ses limites. En effet, à cause de problèmes techniques de transfection notamment, nous avons étudié la régulation d'ARHGAP19 grâce à une protéine exogène surexprimée dans des LT humains exprimant toujours la protéine endogène. Il aurait été plus rigoureux de supprimer l'expression d'ARHGAP19 endogène afin d'étudier exclusivement l'effet de la surexpression de la protéine. Pour cela, le système CRISPR/Cas9 aurait pu être utilisé. Cette technique développée récemment est un outil génétique permettant d'induire classiquement des cassures double brin dans l'ADN pouvant conduire à l'inactivation du gène cible. La deuxième limite de notre étude est un manque de corrélation d'expression entre la protéine exogène et endogène. En effet, la protéine surexprimée est synthétisée dès la phase G1 alors qu'ARHGAP19 endogène s'exprime qu'à partir de la phase G2. Il aurait été intéressant d'observer les conséquences phénotypiques engendrées par les mutants non

phosphorylables tout en conservant la régulation de la protéine au cours du cycle cellulaire. Il serait aujourd'hui possible de le faire à l'aide du système CRISPR-Cas9 amélioré qui peut induire la mutation voulue sur le gène d'intérêt sans passer par l'expression d'une protéine exogène.

Partie II – Rôle d'ARHGAP19 dans l'hématopoïèse

Par l'étude des conséquences de l'absence d'expression du gène *arhgap19*, nous souhaitons mettre en évidence le rôle de cette nouvelle RhoGAP dans le système hématopoïétique où elle est principalement exprimée. ARHGAP19 intervient dans les stades précoces de la différenciation hématopoïétique vers l'âge de 4 mois des souris puis joue un rôle en fin de différenciation à 6 mois qui disparaît ensuite. ARHGAP19 a donc un rôle transitoire dans l'hématopoïèse murine suggérant un ou des phénomènes de compensation comme précédemment observés pour les souris *arhgap21^{+/-}* et les souris KO pour les GEFs Swap-70 et Def6 (Ripich, Chacon-Martinez et al. 2016, Xavier-Ferrucio, Ricon et al. 2017). Une autre GAP pourrait remplacer la fonction d'ARHGAP19 dans nos souris KO. Suite aux effets biologiques similaires observés entre ARHGAP19 et ARHGAP11A, nous nous sommes intéressés à l'expression de cette protéine dans nos souris. En effet, ARHGAP11A (ou MP-GAP) est une GAP de RhoA intervenant également dans la division cellulaire. Comme pour ARHGAP19, l'absence d'expression ou l'inactivation d'ARHGAP11A entraîne une suractivation de RhoA et des défauts majeurs lors de la cytodierèse des cellules (Zanin, Desai et al. 2013). Nous avons donc regardé par qPCR dans nos souris KO si la protéine GAP ARHGAP11A dont le gène a une expression équivalente à celle d'*arhgap19*, était surexprimée dans la moelle osseuse des souris *arhgap19* KO par rapport aux souris WT. *Arhgap11A* n'est pas surexprimée dans les souris *arhgap19* KO et est même moins exprimée que dans la moelle des souris contrôles (Figure 40). Ce n'est sans doute pas ARHGAP11A qui joue le rôle de GAP à la place d'ARHGAP19 dans la moelle osseuse. Il serait intéressant d'analyser l'expression d'autres GAPs pour découvrir laquelle compense l'absence d'ARHGAP19 et d'invalider les deux gènes.

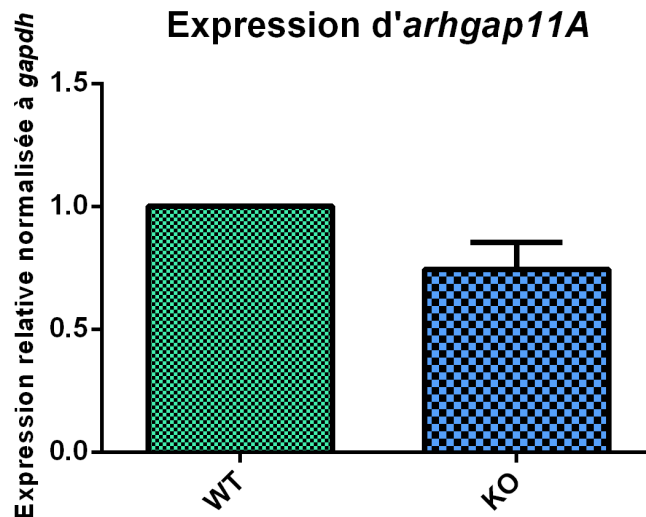


Figure 40: Expression du gène *arhgap11A* dans la moelle des souris WT et KO pour *arhgap19* obtenue par qPCR.

D'autre part, l'absence de résultats flagrants pourrait être dû à une absence de stress. En effet, le système hématopoïétique murin est plus robuste que celui de l'homme et les souris sont élevées dans des environnements bien plus protecteurs que les nôtres (absence de stress et de prédateur ; luminosité, humidité et température maîtrisées et constantes ; alimentation régulière et adaptée ; absence de contact avec des pathogènes, des bactéries ou des virus ni même avec des substances toxiques, alcool, tabac, pollution ...). C'est pourquoi il serait intéressant de se placer dans des conditions stressantes comme une irradiation partielle des souris ou de stimuler le système par des greffes compétitives. Pour tester les capacités fonctionnelles des cellules *Arhgap19* KO in vivo, le travail effectué pourrait se poursuivre en réalisant des greffes compétitives de populations de progéniteurs enrichies en cellules souches hématopoïétiques. La greffe de cellules LSK provenant de souris *arhgap19* KO (CD45.2+) en compétition avec des LSK de moelle sauvage (CD45.1+CD45.2+) dans des souris receveuses (CD45.1+) préalablement irradiées (irradiation létale) permettrait d'estimer leur capacité de reconstitution et un éventuel avantage compétitif. Dans ces expériences, le devenir des cellules WT et KO greffées seraient identifiées respectivement par les marqueurs CD45.1+CD45.2+ et CD45.1-CD45.2+. Si l'absence d'ARHGAP19 n'a pas d'impact sur les capacités de reconstitution des LSK, les souris présenteront une proportion similaire de cellules CD45.1+CD45.2+ et CD45.1-CD45.2+ dans toutes les lignées hématopoïétiques identifiées par cytométrie en flux. En revanche, si l'absence d'ARHGAP19 a un effet sur la prolifération et le maintien des progéniteurs, nous observerions alors une contribution plus importante des cellules provenant des souris KO par rapport à celles des souris WT d'après les résultats

préliminaires. Dans le cas d'un effet sur la différenciation d'un lignage en particulier, les cellules KO montreraient un déséquilibre uniquement dans un type cellulaire.

Étant donné l'implication d'ARHGAP19 dans la division des lymphocytes T humains préalablement étudiée *in vitro*, nous avons étudié *in vivo* en détail le lignage lymphoïde dans le thymus et la moelle osseuse par des analyses de cytométrie en flux. Suite aux résultats observés dans la différenciation lymphocytaire T, nous n'avons pas poursuivi l'étude. En revanche après induction d'un stress ou après greffe, il serait intéressant d'analyser le cycle cellulaire des différentes populations lymphocytaires T *in vitro* en marquant les cellules triées au BrDU. Les cellules pourraient être également mises en culture liquide pour un suivi de la prolifération par comptage.

Concernant la mégacaryopoïèse, l'activation de RhoA est diminuée pour réaliser des endomitoses. Il a été décrit que l'expression des GEFs GEF-H1 et Ect2 est diminuée pour que RhoA soit moins active afin de permettre la polypléidisation des MKs (Gao, Smith et al. 2012). ARHGAP19 étant une GAP de RhoA, notre hypothèse fut qu'ARHGAP19 pourrait être impliqué dans ce phénomène, être plus actif afin d'inactiver RhoA lors des endomitoses. C'est pourquoi nous avons étudié la ploïdie des MKs en absence d'ARHGAP19 afin de mettre en évidence une importante diminution de la ploïdie. La diminution est visible seulement lorsque les souris ont 4 mois, mais elle n'est pas flagrante. Après stress des souris ou greffe de progéniteurs, il sera important de vérifier si ce phénomène n'est pas accentué.

À terme, si les résultats sont satisfaisants après stress ou greffe, l'anti-phosphoS422 pourrait être testé en cytométrie en flux afin d'observer le niveau de phosphorylation d'ARHGAP19 sur la sérine 422, dans les différentes populations hématopoïétiques. En effet, la phosphorylation sur la sérine 422 est retrouvée chez la souris (mais phospho-T404 et phospho-T476 n'ont pas encore été décrits). Un lien avec les résultats observés dans les lymphocytes T humains pourrait être mis en évidence. Le mutant non phosphorylable S422A pourrait être introduit dans les souris WT et KO pour *arhgap19* afin d'identifier le rôle de la phosphorylation de la sérine 422 dans le système hématopoïétique.

Si les résultats nous avaient permis d'identifier l'implication d'ARHGAP19 dans une voie de différenciation hématopoïétique spécifique, nous aurions pu étudier en détail cette voie en regardant l'expression du gène par qPCR après tri des cellules.

Enfin, nous avons commencé l'analyse de l'effet d'ARHGAP19 et de son absence sur la sollicitation des LT lors d'une immunisation. Pour cela, nous avons injecté du sang de mouton par voie intrapéritonéale à J0 puis J28 aux souris WT et KO *pour arhgap19*. Nous

avons étudié par prélèvements sanguins à J14, J25 et J32 les différents lignages hématopoïétiques et nous avons sacrifié les animaux à J33. Au sacrifice, la rate a été récupérée et les cellules analysées. La proportion de cellules matures dans le sang des souris KO n'est pas ou peu différente de celle des souris contrôles. Les résultats obtenus sont significatifs seulement en pourcentage et indiquent qu'ARHGAP19 semble restreindre la proportion de lymphocytes T CD4+ folliculaires TFH (T Follicular Helper) mis en jeu lors du phénomène d'immunisation.

Le rôle d'ARHGAP19 dans l'hématopoïèse murine n'a certes pas été encore élucidé, mais ce travail a tout de même permis de mettre en évidence son implication. Il n'est pas exclu qu'une coopération génique entre *arhgap19* et d'autres gènes se mettent en place et que la perturbation de l'expression de ces gènes soit à l'origine de leucémies. Il serait intéressant dans l'avenir d'étudier de manière plus poussée le rôle des régulateurs des RhoGTPases dans l'hématopoïèse murine en réalisant peut-être des doubles KO. C'est pourquoi, nous avons cryoconservé des embryons de souris *arhgap19* *Lox/Lox* au centre de recherche Alexander Fleming en Grèce pour permettre à quiconque de générer et travailler sur les souris *arhgap19* KO.

RÉFÉRENCES

- Abiatari, I., T. DeOliveira, V. Kerkadze, C. Schwager, I. Esposito, N. A. Giese, P. Huber, F. Bergman, A. Abdollahi, H. Friess and J. Kleeff (2009). "Consensus transcriptome signature of perineural invasion in pancreatic carcinoma." Mol Cancer Ther **8**(6): 1494-1504.
- Abo, A., E. Pick, A. Hall, N. Totty, C. G. Teahan and A. W. Segal (1991). "Activation of the NADPH oxidase involves the small GTP-binding protein p21rac1." Nature **353**(6345): 668-670.
- Abramson, S., R. G. Miller and R. A. Phillips (1977). "The identification in adult bone marrow of pluripotent and restricted stem cells of the myeloid and lymphoid systems." J Exp Med **145**(6): 1567-1579.
- Adolfsson, J., R. Mansson, N. Buza-Vidas, A. Hultquist, K. Liuba, C. T. Jensen, D. Bryder, L. Yang, O. J. Borge, L. A. Thoren, K. Anderson, E. Sitnicka, Y. Sasaki, M. Sigvardsson and S. E. Jacobsen (2005). "Identification of Flt3+ lympho-myeloid stem cells lacking erythro-megakaryocytic potential a revised road map for adult blood lineage commitment." Cell **121**(2): 295-306.
- Aghazadeh, B., K. Zhu, T. J. Kubiseski, G. A. Liu, T. Pawson, Y. Zheng and M. K. Rosen (1998). "Structure and mutagenesis of the Dbl homology domain." Nat Struct Biol **5**(12): 1098-1107.
- Ahmed, S., J. Lee, R. Kozma, A. Best, C. Monfries and L. Lim (1993). "A novel functional target for tumor-promoting phorbol esters and lysophosphatidic acid. The p21rac-GTPase activating protein n-chimaerin." J Biol Chem **268**(15): 10709-10712.
- Aitken, A. (1996). "14-3-3 and its possible role in co-ordinating multiple signalling pathways." Trends Cell Biol **6**(9): 341-347.
- Akashi, K., D. Traver, T. Miyamoto and I. L. Weissman (2000). "A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages." Nature **404**(6774): 193-197.
- Alekhina, O., E. Burstein and D. D. Billadeau (2017). "Cellular functions of WASP family proteins at a glance." J Cell Sci **130**(14): 2235-2241.
- Alfaro-Aco, R. and S. Petry (2015). "Building the Microtubule Cytoskeleton Piece by Piece." J Biol Chem **290**(28): 17154-17162.
- Amano, M., Y. Fukata and K. Kaibuchi (2000). "Regulation and functions of Rho-associated kinase." Exp Cell Res **261**(1): 44-51.
- Amano, M., M. Ito, K. Kimura, Y. Fukata, K. Chihara, T. Nakano, Y. Matsuura and K. Kaibuchi (1996). "Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase)." J Biol Chem **271**(34): 20246-20249.
- Archambault, V. and D. M. Glover (2009). "Polo-like kinases: conservation and divergence in their functions and regulation." Nat Rev Mol Cell Biol **10**(4): 265-275.
- Aspenstrom, P. (1999). "Effectors for the Rho GTPases." Curr Opin Cell Biol **11**(1): 95-102.
- Baarlink, C., H. Wang and R. Grosse (2013). "Nuclear actin network assembly by formins regulates the SRF coactivator MAL." Science **340**(6134): 864-867.
- Bartel, D. P. (2004). "MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function." Cell **116**(2): 281-297.
- Belmont, L. D. and T. J. Mitchison (1996). "Identification of a protein that interacts with tubulin dimers and increases the catastrophe rate of microtubules." Cell **84**(4): 623-631.

- Birkenfeld, J., P. Nalbant, B. P. Bohl, O. Pertz, K. M. Hahn and G. M. Bokoch (2007). "GEF-H1 modulates localized RhoA activation during cytokinesis under the control of mitotic kinases." Dev Cell **12**(5): 699-712.
- Bishop, A. L. and A. Hall (2000). "Rho GTPases and their effector proteins." Biochem J **348 Pt 2**: 241-255.
- Boquet, P. and E. Lemichez (2003). "Bacterial virulence factors targeting Rho GTPases: parasitism or symbiosis?" Trends Cell Biol **13**(5): 238-246.
- Bos, J. L., H. Rehmann and A. Wittinghofer (2007). "GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins." Cell **129**(5): 865-877.
- Boulter, E. and R. Garcia-Mata (2012). "Analysis of the role of RhoGDI1 and isoprenylation in the degradation of RhoGTPases." Methods Mol Biol **827**: 97-105.
- Boulter, E., R. Garcia-Mata, C. Guilluy, A. Dubash, G. Rossi, P. J. Brenwald and K. Burridge (2010). "Regulation of Rho GTPase crosstalk, degradation and activity by RhoGDI1." Nat Cell Biol **12**(5): 477-483.
- Boureaux, A., E. Vignal, S. Faure and P. Fort (2007). "Evolution of the Rho family of ras-like GTPases in eukaryotes." Mol Biol Evol **24**(1): 203-216.
- Bourne, H. R., D. A. Sanders and F. McCormick (1991). "The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism." Nature **349**(6305): 117-127.
- Brzeska, H., J. Szczepanowska, F. Matsumura and E. D. Korn (2004). "Rac-induced increase of phosphorylation of myosin regulatory light chain in HeLa cells." Cell Motil Cytoskeleton **58**(3): 186-199.
- Buss, F., C. Temm-Grove, S. Henning and B. M. Jockusch (1992). "Distribution of profilin in fibroblasts correlates with the presence of highly dynamic actin filaments." Cell Motil Cytoskeleton **22**(1): 51-61.
- Cabezas-Wallscheid, N., D. Klimmeck, J. Hansson, D. B. Lipka, A. Reyes, Q. Wang, D. Weichenhan, A. Lier, L. von Paleske, S. Renders, P. Wunsche, P. Zeisberger, D. Brocks, L. Gu, C. Herrmann, S. Haas, M. A. G. Essers, B. Brors, R. Eils, W. Huber, M. D. Milsom, C. Plass, J. Krijgsveld and A. Trumpp (2014). "Identification of regulatory networks in HSCs and their immediate progeny via integrated proteome, transcriptome, and DNA methylome analysis." Cell Stem Cell **15**(4): 507-522.
- Cancelas, J. A., A. W. Lee, R. Prabhakar, K. F. Stringer, Y. Zheng and D. A. Williams (2005). "Rac GTPases differentially integrate signals regulating hematopoietic stem cell localization." Nat Med **11**(8): 886-891.
- Carsetti, R., G. Kohler and M. C. Lamers (1995). "Transitional B cells are the target of negative selection in the B cell compartment." J Exp Med **181**(6): 2129-2140.
- Ceredig, R. and A. G. Rolink (2012). "The key role of IL-7 in lymphopoiesis." Semin Immunol **24**(3): 159-164.
- Chang, Y., F. Aurade, F. Larbret, Y. Zhang, J. P. Le Couedic, L. Momeux, J. Larghero, J. Bertoglio, F. Louache, E. Cramer, W. Vainchenker and N. Debili (2007). "Proplatelet formation is regulated by the Rho/ROCK pathway." Blood **109**(10): 4229-4236.
- Chang, Y., D. Bluteau, N. Debili and W. Vainchenker (2007). "From hematopoietic stem cells to platelets." J Thromb Haemost **5 Suppl 1**: 318-327.
- Chardin, P. (1988). "The ras superfamily proteins." Biochimie **70**(7): 865-868.
- Chen, K., J. Liu, S. Heck, J. A. Chasis, X. An and N. Mohandas (2009). "Resolving the distinct stages in erythroid differentiation based on dynamic changes in membrane protein expression during erythropoiesis." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(41): 17413-17418.

- Ching, Y. P., C. M. Wong, S. F. Chan, T. H. Leung, D. C. Ng, D. Y. Jin and I. O. Ng (2003). "Deleted in liver cancer (DLC) 2 encodes a RhoGAP protein with growth suppressor function and is underexpressed in hepatocellular carcinoma." J Biol Chem **278**(12): 10824-10830.
- Chircop, M. (2014). "Rho GTPases as regulators of mitosis and cytokinesis in mammalian cells." Small GTPases **5**: e29770.
- Chircop, M. (2014). "Rho GTPases as regulators of mitosis and cytokinesis in mammalian cells." Small GTPases **5**.
- Chou, M. M., J. M. Masuda-Robens and M. L. Gupta (2003). "Cdc42 promotes G1 progression through p70 S6 kinase-mediated induction of cyclin E expression." J Biol Chem **278**(37): 35241-35247.
- Ciofani, M. and J. C. Zuniga-Pflucker (2010). "Determining gammadelta versus alphass T cell development." Nat Rev Immunol **10**(9): 657-663.
- Colicelli, J. (2004). "Human RAS superfamily proteins and related GTPases." Sci STKE **2004**(250): RE13.
- Cook, D. R., K. L. Rossman and C. J. Der (2014). "Rho guanine nucleotide exchange factors: regulators of Rho GTPase activity in development and disease." Oncogene **33**(31): 4021-4035.
- Corre, I., M. Gomez, S. Vielkind and D. A. Cantrell (2001). "Analysis of thymocyte development reveals that the GTPase RhoA is a positive regulator of T cell receptor responses in vivo." J Exp Med **194**(7): 903-914.
- Coso, O. A., M. Chiariello, J. C. Yu, H. Teramoto, P. Crespo, N. Xu, T. Miki and J. S. Gutkind (1995). "The small GTP-binding proteins Rac1 and Cdc42 regulate the activity of the JNK/SAPK signaling pathway." Cell **81**(7): 1137-1146.
- Cote, J. F. (2002). "Identification of an evolutionarily conserved superfamily of DOCK180-related proteins with guanine nucleotide exchange activity." Journal of Cell Science **115**(24): 4901-4913.
- Cote, J. F. and K. Vuori (2006). "In vitro guanine nucleotide exchange activity of DHR-2/DOCKER/CZH2 domains." Methods Enzymol **406**: 41-57.
- Cox, A. D. and C. J. Der (2010). "Ras history: The saga continues." Small GTPases **1**(1): 2-27.
- Crisan, M. and E. Dzierzak (2016). "The many faces of hematopoietic stem cell heterogeneity." Development **143**(24): 4571-4581.
- Croft, D. R. and M. F. Olson (2011). "Transcriptional regulation of Rho GTPase signaling." Transcription **2**(5): 211-215.
- Daub, H., K. Gevaert, J. Vandekerckhove, A. Sobel and A. Hall (2001). "Rac/Cdc42 and p65PAK regulate the microtubule-destabilizing protein stathmin through phosphorylation at serine 16." J Biol Chem **276**(3): 1677-1680.
- David, M., D. Petit and J. Bertoglio (2012). "Cell cycle regulation of Rho signaling pathways." Cell Cycle **11**(16): 3003-3010.
- David, M. D., D. Petit and J. Bertoglio (2014). "The RhoGAP ARHGAP19 controls cytokinesis and chromosome segregation in T lymphocytes." J Cell Sci **127**(Pt 2): 400-410.
- de Boer, J., A. Williams, G. Skavdis, N. Harker, M. Coles, M. Tolaini, T. Norton, K. Williams, K. Roderick, A. J. Potocnik and D. Kioussis (2003). "Transgenic mice with hematopoietic and lymphoid specific expression of Cre." Eur J Immunol **33**(2): 314-325.
- DerMardirossian, C. and G. M. Bokoch (2005). "GDIs: central regulatory molecules in Rho GTPase activation." Trends Cell Biol **15**(7): 356-363.

Diviani, D., L. Abuin, S. Cotecchia and L. Pansier (2004). "Anchoring of both PKA and 14-3-3 inhibits the Rho-GEF activity of the AKAP-Lbc signaling complex." EMBO J **23**(14): 2811-2820.

Edwards, D. C., L. C. Sanders, G. M. Bokoch and G. N. Gill (1999). "Activation of LIM-kinase by Pak1 couples Rac/Cdc42 GTPase signalling to actin cytoskeletal dynamics." Nat Cell Biol **1**(5): 253-259.

Engers, R., S. Ziegler, M. Mueller, A. Walter, R. Willers and H. E. Gabbert (2007). "Prognostic relevance of increased Rac GTPase expression in prostate carcinomas." Endocr Relat Cancer **14**(2): 245-256.

Etienne-Manneville, S. and A. Hall (2002). "Rho GTPases in cell biology." Nature **420**(6916): 629-635.

Etienne-Manneville, S. and A. Hall (2003). "Cdc42 regulates GSK-3beta and adenomatous polyposis coli to control cell polarity." Nature **421**(6924): 753-756.

Eva, A. and S. A. Aaronson (1985). "Isolation of a new human oncogene from a diffuse B-cell lymphoma." Nature **316**(6025): 273-275.

Famili, F., A. S. Wiekmeijer and F. J. Staal (2017). "The development of T cells from stem cells in mice and humans." Future Sci OA **3**(3): FSO186.

Fehling, H. J. and H. von Boehmer (1997). "Early alpha beta T cell development in the thymus of normal and genetically altered mice." Curr Opin Immunol **9**(2): 263-275.

Feng, Y., P. V. LoGrasso, O. Defert and R. Li (2016). "Rho Kinase (ROCK) Inhibitors and Their Therapeutic Potential." J Med Chem **59**(6): 2269-2300.

Fernandez-Orth, J., P. Ehling, T. Ruck, S. Pankratz, M. S. Hofmann, P. Landgraf, D. C. Dieterich, K. H. Smalla, T. Kahne, G. Seebohm, T. Budde, H. Wiendl, S. Bittner and S. G. Meuth (2017). "14-3-3 Proteins regulate K2P 5.1 surface expression on T lymphocytes." Traffic **18**(1): 29-43.

Freeman, J. L., A. Abo and J. D. Lambeth (1996). "Rac "insert region" is a novel effector region that is implicated in the activation of NADPH oxidase, but not PAK65." J Biol Chem **271**(33): 19794-19801.

Fukata, M., T. Watanabe, J. Noritake, M. Nakagawa, M. Yamaga, S. Kuroda, Y. Matsuura, A. Iwamatsu, F. Perez and K. Kaibuchi (2002). "Rac1 and Cdc42 capture microtubules through IQGAP1 and CLIP-170." Cell **109**(7): 873-885.

Gabet, A. S., S. Coulon, A. Fricot, J. Vandekerckhove, Y. Chang, J. A. Ribeil, L. Lordier, Y. Zermati, V. Asnafi, Z. Belaid, N. Debili, W. Vainchenker, B. Varet, O. Hermine and G. Courtois (2011). "Caspase-activated ROCK-1 allows erythroblast terminal maturation independently of cytokine-induced Rho signaling." Cell Death Differ **18**(4): 678-689.

Galloway, J. L. and L. I. Zon (2003). "Ontogeny of hematopoiesis: examining the emergence of hematopoietic cells in the vertebrate embryo." Curr Top Dev Biol **53**: 139-158.

Gamblin, S. J. and S. J. Smerdon (1998). "GTPase-activating proteins and their complexes." Curr Opin Struct Biol **8**(2): 195-201.

Gao, Y., E. Smith, E. Ker, P. Campbell, E. C. Cheng, S. Zou, S. Lin, L. Wang, S. Halene and D. S. Krause (2012). "Role of RhoA-specific guanine exchange factors in regulation of endomitosis in megakaryocytes." Dev Cell **22**(3): 573-584.

Garrett, M. D., A. J. Self, C. van Oers and A. Hall (1989). "Identification of distinct cytoplasmic targets for ras/R-ras and rho regulatory proteins." J Biol Chem **264**(1): 10-13.

Ghiaur, G., A. Lee, J. Bailey, J. A. Cancelas, Y. Zheng and D. A. Williams (2006). "Inhibition of RhoA GTPase activity enhances hematopoietic stem and progenitor cell proliferation and engraftment." Blood **108**(6): 2087-2094.

Gjoerup, O., J. Lukas, J. Bartek and B. M. Willumsen (1998). "Rac and Cdc42 are potent stimulators of E2F-dependent transcription capable of promoting retinoblastoma susceptibility gene product hyperphosphorylation." J Biol Chem **273**(30): 18812-18818.

Godfrey, D. I., J. Kennedy, T. Suda and A. Zlotnik (1993). "A developmental pathway involving four phenotypically and functionally distinct subsets of CD3-CD4-CD8- triple-negative adult mouse thymocytes defined by CD44 and CD25 expression." J Immunol **150**(10): 4244-4252.

Gohla, A. and G. M. Bokoch (2002). "14-3-3 regulates actin dynamics by stabilizing phosphorylated cofilin." Curr Biol **12**(19): 1704-1710.

Goldschmidt-Clermont, P. J., L. M. Machesky, J. J. Baldassare and T. D. Pollard (1990). "The actin-binding protein profilin binds to PIP2 and inhibits its hydrolysis by phospholipase C." Science **247**(4950): 1575-1578.

Gomez Del Pulgar, T., F. Valdes-Mora, E. Bandres, R. Perez-Palacios, C. Espina, P. Cejas, M. A. Garcia-Cabezas, M. Nistal, E. Casado, M. Gonzalez-Baron, J. Garcia-Foncillas and J. C. Lacal (2008). "Cdc42 is highly expressed in colorectal adenocarcinoma and downregulates ID4 through an epigenetic mechanism." Int J Oncol **33**(1): 185-193.

Gregory, C. J. and A. C. Eaves (1978). "Three stages of erythropoietic progenitor cell differentiation distinguished by a number of physical and biologic properties." Blood **51**(3): 527-537.

Gu, H., J. D. Marth, P. C. Orban, H. Mossmann and K. Rajewsky (1994). "Deletion of a DNA polymerase beta gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting." Science **265**(5168): 103-106.

Guo, F., J. A. Cancelas, D. Hildeman, D. A. Williams and Y. Zheng (2008). "Rac GTPase isoforms Rac1 and Rac2 play a redundant and crucial role in T-cell development." Blood **112**(5): 1767-1775.

Guo, F., C. S. Velu, H. L. Grimes and Y. Zheng (2009). "Rho GTPase Cdc42 is essential for B-lymphocyte development and activation." Blood **114**(14): 2909-2916.

Hakoshima, T., T. Shimizu and R. Maesaki (2003). "Structural basis of the Rho GTPase signaling." J Biochem **134**(3): 327-331.

Hall, A. (2012). "Rho family GTPases." Biochem Soc Trans **40**(6): 1378-1382.

Hara, T., M. Abe, H. Inoue, L. R. Yu, T. D. Veenstra, Y. H. Kang, K. S. Lee and T. Miki (2006). "Cytokinesis regulator ECT2 changes its conformation through phosphorylation at Thr-341 in G2/M phase." Oncogene **25**(4): 566-578.

Hardy, R. R., C. E. Carmack, S. A. Shinton, J. D. Kemp and K. Hayakawa (1991). "Resolution and characterization of pro-B and pre-pro-B cell stages in normal mouse bone marrow. 1991." J Immunol **189**(7): 3271-3283.

Hardy, R. R. and K. Hayakawa (2001). "B cell development pathways." Annu Rev Immunol **19**: 595-621.

Hart, M. J., A. Eva, T. Evans, S. A. Aaronson and R. A. Cerione (1991). "Catalysis of guanine nucleotide exchange on the CDC42Hs protein by the dbl oncogene product." Nature **354**(6351): 311-314.

Has, C., C. Herz, E. Zimina, H. Y. Qu, Y. He, Z. G. Zhang, T. T. Wen, Y. Gache, M. Aumailley and L. Bruckner-Tuderman (2009). "Kindlin-1 Is required for RhoGTPase-mediated lamellipodia formation in keratinocytes." Am J Pathol **175**(4): 1442-1452.

Hausser, A., G. Link, M. Hoene, C. Russo, O. Selchow and K. Pfizenmaier (2006). "Phospho-specific binding of 14-3-3 proteins to phosphatidylinositol 4-kinase III beta protects from dephosphorylation and stabilizes lipid kinase activity." J Cell Sci **119**(Pt 17): 3613-3621.

- Hill, C. S., J. Wynne and R. Treisman (1995). "The Rho family GTPases RhoA, Rac1, and CDC42Hs regulate transcriptional activation by SRF." Cell **81**(7): 1159-1170.
- Hirose, K., T. Kawashima, I. Iwamoto, T. Nosaka and T. Kitamura (2001). "MgcRacGAP is involved in cytokinesis through associating with mitotic spindle and midbody." J Biol Chem **276**(8): 5821-5828.
- Hodge, R. G. and A. J. Ridley (2016). "Regulating Rho GTPases and their regulators." Nat Rev Mol Cell Biol **17**(8): 496-510.
- Hodis, E., I. R. Watson, G. V. Kryukov, S. T. Arold, M. Imielinski, J. P. Theurillat, E. Nickerson, D. Auclair, L. Li, C. Place, D. Dicara, A. H. Ramos, M. S. Lawrence, K. Cibulskis, A. Sivachenko, D. Voet, G. Saksena, N. Stransky, R. C. Onofrio, W. Winckler, K. Ardlie, N. Wagle, J. Wargo, K. Chong, D. L. Morton, K. Stemke-Hale, G. Chen, M. Noble, M. Meyerson, J. E. Ladbury, M. A. Davies, J. E. Gershenwald, S. N. Wagner, D. S. Hoon, D. Schadendorf, E. S. Lander, S. B. Gabriel, G. Getz, L. A. Garraway and L. Chin (2012). "A landscape of driver mutations in melanoma." Cell **150**(2): 251-263.
- Hwang, S. L., Y. R. Hong, W. D. Sy, A. S. Lieu, C. L. Lin, K. S. Lee and S. L. Howng (2004). "Rac1 gene mutations in human brain tumours." European Journal of Surgical Oncology (EJSO) **30**(1): 68-72.
- Jaffe, A. B. and A. Hall (2005). "Rho GTPases: biochemistry and biology." Annu Rev Cell Dev Biol **21**: 247-269.
- Jagannathan-Bogdan, M. and L. I. Zon (2013). "Hematopoiesis." Development **140**(12): 2463-2467.
- Jenna, S., N. K. Hussain, E. I. Danek, I. Triki, S. Wasiak, P. S. McPherson and N. Lamarche-Vane (2002). "The activity of the GTPase-activating protein CdGAP is regulated by the endocytic protein intersectin." J Biol Chem **277**(8): 6366-6373.
- Ji, J., X. Feng, M. Shi, Q. Cai, Y. Yu, Z. Zhu and J. Zhang (2015). "Rac1 is correlated with aggressiveness and a potential therapeutic target for gastric cancer." Int J Oncol **46**(3): 1343-1353.
- Jiang, W. G., G. Watkins, J. Lane, G. H. Cunnick, A. Douglas-Jones, K. Mokbel and R. E. Mansel (2003). "Prognostic value of rho GTPases and rho guanine nucleotide dissociation inhibitors in human breast cancers." Clin Cancer Res **9**(17): 6432-6440.
- Johnstone, C. N., S. Castellvi-Bel, L. M. Chang, X. Bessa, H. Nakagawa, H. Harada, R. K. Sung, J. M. Pique, A. Castells and A. K. Rustgi (2004). "ARHGAP8 is a novel member of the RHOGAP family related to ARHGAP1/CDC42GAP/p50RHOGAP: mutation and expression analyses in colorectal and breast cancers." Gene **336**(1): 59-71.
- Joyce, D., B. Bouzahzah, M. Fu, C. Albanese, M. D'Amico, J. Steer, J. U. Klein, R. J. Lee, J. E. Segall, J. K. Westwick, C. J. Der and R. G. Pestell (1999). "Integration of Rac-dependent regulation of cyclin D1 transcription through a nuclear factor-kappaB-dependent pathway." J Biol Chem **274**(36): 25245-25249.
- Jumaa, H., R. W. Hendriks and M. Reth (2005). "B cell signaling and tumorigenesis." Annu Rev Immunol **23**: 415-445.
- Kakiuchi, M., T. Nishizawa, H. Ueda, K. Gotoh, A. Tanaka, A. Hayashi, S. Yamamoto, K. Tatsuno, H. Katoh, Y. Watanabe, T. Ichimura, T. Ushiku, S. Funahashi, K. Tateishi, I. Wada, N. Shimizu, S. Nomura, K. Koike, Y. Seto, M. Fukayama, H. Aburatani and S. Ishikawa (2014). "Recurrent gain-of-function mutations of RHOA in diffuse-type gastric carcinoma." Nat Genet **46**(6): 583-587.
- Kamai, T., T. Yamanishi, H. Shirataki, K. Takagi, H. Asami, Y. Ito and K. Yoshida (2004). "Overexpression of RhoA, Rac1, and Cdc42 GTPases is associated with progression in testicular cancer." Clin Cancer Res **10**(14): 4799-4805.

Kamijo, K., N. Ohara, M. Abe, T. Uchimura, H. Hosoya, J. S. Lee and T. Miki (2006). "Dissecting the role of Rho-mediated signaling in contractile ring formation." Mol Biol Cell **17**(1): 43-55.

Karasuyama, H., A. Kudo and F. Melchers (1990). "The proteins encoded by the VpreB and lambda 5 pre-B cell-specific genes can associate with each other and with mu heavy chain." J Exp Med **172**(3): 969-972.

Kiel, M. J., O. H. Yilmaz, T. Iwashita, O. H. Yilmaz, C. Terhorst and S. J. Morrison (2005). "SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells." Cell **121**(7): 1109-1121.

Kimura, K., M. Ito, M. Amano, K. Chihara, Y. Fukata, M. Nakafuku, B. Yamamori, J. Feng, T. Nakano, K. Okawa, A. Iwamatsu and K. Kaibuchi (1996). "Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase)." Science **273**(5272): 245-248.

Kiosses, W. B., R. H. Daniels, C. Otey, G. M. Bokoch and M. A. Schwartz (1999). "A role for p21-activated kinase in endothelial cell migration." J Cell Biol **147**(4): 831-844.

Ko, F. C., L. K. Chan, K. M. Sze, Y. S. Yeung, E. Y. Tse, P. Lu, M. H. Yu, I. O. Ng and J. W. Yam (2013). "PKA-induced dimerization of the RhoGAP DLC1 promotes its inhibition of tumorigenesis and metastasis." Nat Commun **4**: 1618.

Kondo, M., I. L. Weissman and K. Akashi (1997). "Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow." Cell **91**(5): 661-672.

Konstantinidis, D. G., A. George and T. A. Kalfa (2010). "Rac GTPases in erythroid biology." Transfus Clin Biol **17**(3): 126-130.

Konstantinopoulos, P. A., M. V. Karamouzis and A. G. Papavassiliou (2007). "Post-translational modifications and regulation of the RAS superfamily of GTPases as anticancer targets." Nat Rev Drug Discov **6**(7): 541-555.

Krauthammer, M., Y. Kong, B. H. Ha, P. Evans, A. Bacchicchi, J. P. McCusker, E. Cheng, M. J. Davis, G. Goh, M. Choi, S. Ariyan, D. Narayan, K. Dutton-Regester, A. Capatana, E. C. Holman, M. Bosenberg, M. Sznol, H. M. Kluger, D. E. Brash, D. F. Stern, M. A. Materin, R. S. Lo, S. Mane, S. Ma, K. K. Kidd, N. K. Hayward, R. P. Lifton, J. Schlessinger, T. J. Boggon and R. Halaban (2012). "Exome sequencing identifies recurrent somatic RAC1 mutations in melanoma." Nat Genet **44**(9): 1006-1014.

Kuhn, R., F. Schwenk, M. Aguet and K. Rajewsky (1995). "Inducible gene targeting in mice." Science **269**(5229): 1427-1429.

Kuroda, S., M. Fukata, K. Kobayashi, M. Nakafuku, N. Nomura, A. Iwamatsu and K. Kaibuchi (1996). "Identification of IQGAP as a putative target for the small GTPases, Cdc42 and Rac1." J Biol Chem **271**(38): 23363-23367.

Lauffenburger, D. A. and A. F. Horwitz (1996). "Cell migration: a physically integrated molecular process." Cell **84**(3): 359-369.

LeBien, T. W. (1998). "B-cell lymphopoiesis in mouse and man." Curr Opin Immunol **10**(2): 188-195.

Letort, G., H. Ennomani, L. Gressin, M. Thery and L. Blanchoin (2015). "Dynamic reorganization of the actin cytoskeleton." F1000Res **4**.

Leung, T., X. Q. Chen, I. Tan, E. Manser and L. Lim (1998). "Myotonic dystrophy kinase-related Cdc42-binding kinase acts as a Cdc42 effector in promoting cytoskeletal reorganization." Mol Cell Biol **18**(1): 130-140.

Levy, M., J. Settleman and E. Ligeti (2009). "Regulation of the substrate preference of p190RhoGAP by protein kinase C-mediated phosphorylation of a phospholipid binding site." Biochemistry **48**(36): 8615-8623.

Lindon, C. (2008). "Control of mitotic exit and cytokinesis by the APC/C." Biochem Soc Trans **36**(Pt 3): 405-410.

Liot, C., L. Seguin, A. Siret, C. Crouin, S. Schmidt and J. Bertoglio (2011). "APC(cdh1) mediates degradation of the oncogenic Rho-GEF Ect2 after mitosis." PLoS One **6**(8): e23676.

Liu, J., J. Zhang, Y. Ginzburg, H. Li, F. Xue, L. De Franceschi, J. A. Chasis, N. Mohandas and X. An (2013). "Quantitative analysis of murine terminal erythroid differentiation in vivo: novel method to study normal and disordered erythropoiesis." Blood **121**(8): e43-49.

Liu, M., F. Bi, X. Zhou and Y. Zheng (2012). "Rho GTPase regulation by miRNAs and covalent modifications." Trends Cell Biol **22**(7): 365-373.

Livak, F., M. Tourigny, D. G. Schatz and H. T. Petrie (1999). "Characterization of TCR gene rearrangements during adult murine T cell development." J Immunol **162**(5): 2575-2580.

Lu, M., H. Kawamoto, Y. Katsube, T. Ikawa and Y. Katsura (2002). "The common myelolymphoid progenitor: a key intermediate stage in hemopoiesis generating T and B cells." J Immunol **169**(7): 3519-3525.

Madaule, P. and R. Axel (1985). "A novel ras-related gene family." Cell **41**(1): 31-40.

Maddox, A. S. and K. BurrIDGE (2003). "RhoA is required for cortical retraction and rigidity during mitotic cell rounding." J Cell Biol **160**(2): 255-265.

Mali, P., D. Wirtz and P. C. Searson (2010). "Interplay of RhoA and motility in the programmed spreading of daughter cells postmitosis." Biophys J **99**(11): 3526-3534.

Martensson, I. L. and R. Ceredig (2000). "Review article: role of the surrogate light chain and the pre-B-cell receptor in mouse B-cell development." Immunology **101**(4): 435-441.

Matthews, H. K., U. Delabre, J. L. Rohn, J. Guck, P. Kunda and B. Baum (2012). "Changes in Ect2 localization couple actomyosin-dependent cell shape changes to mitotic progression." Dev Cell **23**(2): 371-383.

Melchers, F., A. Rolink, U. Grawunder, T. H. Winkler, H. Karasuyama, P. Ghia and J. Andersson (1995). "Positive and negative selection events during B lymphopoiesis." Curr Opin Immunol **7**(2): 214-227.

Meller, N., S. Merlot and C. Guda (2005). "CZH proteins: a new family of Rho-GEFs." J Cell Sci **118**(Pt 21): 4937-4946.

Mertins, P., J. W. Qiao, J. Patel, N. D. Udeshi, K. R. Clauser, D. R. Mani, M. W. Burgess, M. A. Gillette, J. D. Jaffe and S. A. Carr (2013). "Integrated proteomic analysis of post-translational modifications by serial enrichment." Nat Methods **10**(7): 634-637.

Minden, A., A. Lin, F. X. Claret, A. Abo and M. Karin (1995). "Selective activation of the JNK signaling cascade and c-Jun transcriptional activity by the small GTPases Rac and Cdc42Hs." Cell **81**(7): 1147-1157.

Minoshima, Y., T. Kawashima, K. Hirose, Y. TonoZuka, A. Kawajiri, Y. C. Bao, X. Deng, M. Tatsuka, S. Narumiya, W. S. May, Jr., T. Nosaka, K. Semba, T. Inoue, T. Satoh, M. Inagaki and T. Kitamura (2003). "Phosphorylation by aurora B converts MgcRacGAP to a RhoGAP during cytokinesis." Dev Cell **4**(4): 549-560.

Miralles, F., G. Posern, A. I. Zaromytidou and R. Treisman (2003). "Actin dynamics control SRF activity by regulation of its coactivator MAL." Cell **113**(3): 329-342.

Miyawaki, K., H. Iwasaki, T. Jiromaru, H. Kusumoto, A. Yurino, T. Sugio, Y. Uehara, J. Odawara, S. Daitoku, Y. Kunisaki, Y. Mori, Y. Arinobu, H. Tsuzuki, Y. Kikushige, T. Iino, K. Kato, K. Takenaka, T. Miyamoto, T. Maeda and K. Akashi (2017). "Identification of unipotent megakaryocyte progenitors in human hematopoiesis." Blood **129**(25): 3332-3343.

- Moon, S. Y. and Y. Zheng (2003). "Rho GTPase-activating proteins in cell regulation." Trends Cell Biol **13**(1): 13-22.
- Mori, K., M. Amano, M. Takefuji, K. Kato, Y. Morita, T. Nishioka, Y. Matsuura, T. Murohara and K. Kaibuchi (2009). "Rho-kinase contributes to sustained RhoA activation through phosphorylation of p190A RhoGAP." J Biol Chem **284**(8): 5067-5076.
- Morishita, Y., K. Tsutsumi and Y. Ohta (2015). "Phosphorylation of Serine 402 Regulates RacGAP Protein Activity of FilGAP Protein." J Biol Chem **290**(43): 26328-26338.
- Morrison, S. J., A. M. Wandycz, H. D. Hemmati, D. E. Wright and I. L. Weissman (1997). "Identification of a lineage of multipotent hematopoietic progenitors." Development **124**(10): 1929-1939.
- Na, S., B. Li, I. S. Grewal, H. Enslin, R. J. Davis, J. H. Hanke and R. A. Flavell (1999). "Expression of activated CDC42 induces T cell apoptosis in thymus and peripheral lymph organs via different pathways." Oncogene **18**(56): 7966-7974.
- Nethe, M. and P. L. Hordijk (2010). "The role of ubiquitylation and degradation in RhoGTPase signalling." J Cell Sci **123**(Pt 23): 4011-4018.
- Ney, P. A. (2011). "Normal and disordered reticulocyte maturation." Curr Opin Hematol **18**(3): 152-157.
- Nobes, C. D. and A. Hall (1995). "Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia." Cell **81**(1): 53-62.
- Ogawa, M., E. ten Boekel and F. Melchers (2000). "Identification of CD19(-)B220(+)c-Kit(+)Flt3/Flk-2(+) cells as early B lymphoid precursors before pre-B-I cells in juvenile mouse bone marrow." Int Immunol **12**(3): 313-324.
- Okada, S., H. Nakauchi, K. Nagayoshi, S. Nishikawa, Y. Miura and T. Suda (1992). "In vivo and in vitro stem cell function of c-kit- and Sca-1-positive murine hematopoietic cells." Blood **80**(12): 3044-3050.
- Olson, M. F., A. Ashworth and A. Hall (1995). "An essential role for Rho, Rac, and Cdc42 GTPases in cell cycle progression through G1." Science **269**(5228): 1270-1272.
- Orgaz, J. L., C. Herraiz and V. Sanz-Moreno (2014). "Rho GTPases modulate malignant transformation of tumor cells." Small GTPases **5**: e29019.
- Orkin, S. H. and L. I. Zon (2008). "Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology." Cell **132**(4): 631-644.
- Osawa, M., K. Hanada, H. Hamada and H. Nakauchi (1996). "Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell." Science **273**(5272): 242-245.
- Pandit, S. K., B. Westendorp and A. de Bruin (2013). "Physiological significance of polyploidization in mammalian cells." Trends Cell Biol **23**(11): 556-566.
- Perona, R., S. Montaner, L. Saniger, I. Sanchez-Perez, R. Bravo and J. C. Lacal (1997). "Activation of the nuclear factor-kappaB by Rho, CDC42, and Rac-1 proteins." Genes Dev **11**(4): 463-475.
- Petsalaki, E., T. Akoumianaki, E. J. Black, D. A. Gillespie and G. Zachos (2011). "Phosphorylation at serine 331 is required for Aurora B activation." J Cell Biol **195**(3): 449-466.
- Pines, J. and C. L. Rieder (2001). "Re-staging mitosis: a contemporary view of mitotic progression." Nat Cell Biol **3**(1): E3-6.

- Pronk, C. J., D. J. Rossi, R. Mansson, J. L. Attema, G. L. Norddahl, C. K. Chan, M. Sigvardsson, I. L. Weissman and D. Bryder (2007). "Elucidation of the phenotypic, functional, and molecular topography of a myeloerythroid progenitor cell hierarchy." Cell Stem Cell **1**(4): 428-442.
- Ramachandran, C., R. V. Patil, K. Combrink, N. A. Sharif and S. P. Srinivas (2011). "Rho-Rho kinase pathway in the actomyosin contraction and cell-matrix adhesion in immortalized human trabecular meshwork cells." Mol Vis **17**: 1877-1890.
- Reibel, L., O. Dorseuil, R. Stancou, J. Bertoglio and G. Gacon (1991). "A hemopoietic specific gene encoding a small GTP binding protein is overexpressed during T cell activation." Biochem Biophys Res Commun **175**(2): 451-458.
- Reya, T., S. J. Morrison, M. F. Clarke and I. L. Weissman (2001). "Stem cells, cancer, and cancer stem cells." Nature **414**(6859): 105-111.
- Ridley, A. J. and A. Hall (1992). "The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors." Cell **70**(3): 389-399.
- Ridley, A. J., H. F. Paterson, C. L. Johnston, D. Diekmann and A. Hall (1992). "The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling." Cell **70**(3): 401-410.
- Ridley, A. J., M. A. Schwartz, K. Burridge, R. A. Firtel, M. H. Ginsberg, G. Borisy, J. T. Parsons and A. R. Horwitz (2003). "Cell migration: integrating signals from front to back." Science **302**(5651): 1704-1709.
- Rieder, C. L. (2011). "Mitosis in vertebrates: the G2/M and M/A transitions and their associated checkpoints." Chromosome Res **19**(3): 291-306.
- Rieger, M. A. and T. Schroeder (2012). "Hematopoiesis." Cold Spring Harb Perspect Biol **4**(12).
- Riento, K. and A. J. Ridley (2003). "Rocks: multifunctional kinases in cell behaviour." Nat Rev Mol Cell Biol **4**(6): 446-456.
- Ripich, T., C. A. Chacon-Martinez, L. Fischer, A. Pernis, N. Kiessling, A. I. Garbe and R. Jessberger (2016). "SWEF Proteins Distinctly Control Maintenance and Differentiation of Hematopoietic Stem Cells." PLoS One **11**(8): e0161060.
- Rittinger, K., P. A. Walker, J. F. Eccleston, S. J. Smerdon and S. J. Gamblin (1997). "Structure at 1.65 Å of RhoA and its GTPase-activating protein in complex with a transition-state analogue." Nature **389**(6652): 758-762.
- Rodriguez-Fraticelli, A. E., S. Vergarajauregui, D. J. Eastburn, A. Datta, M. A. Alonso, K. Mostov and F. Martin-Belmonte (2010). "The Cdc42 GEF Intersectin 2 controls mitotic spindle orientation to form the lumen during epithelial morphogenesis." J Cell Biol **189**(4): 725-738.
- Roof, R. W., M. D. Haskell, B. D. Dukes, N. Sherman, M. Kinter and S. J. Parsons (1998). "Phosphotyrosine (p-Tyr)-dependent and -independent mechanisms of p190 RhoGAP-p120 RasGAP interaction: Tyr 1105 of p190, a substrate for c-Src, is the sole p-Tyr mediator of complex formation." Mol Cell Biol **18**(12): 7052-7063.
- Rossman, K. L., C. J. Der and J. Sondek (2005). "GEF means go: turning on RHO GTPases with guanine nucleotide-exchange factors." Nat Rev Mol Cell Biol **6**(2): 167-180.
- Rothkegel, M., O. Mayboroda, M. Rohde, C. Wucherpfennig, R. Valenta and B. M. Jockusch (1996). "Plant and animal profilins are functionally equivalent and stabilize microfilaments in living animal cells." J Cell Sci **109** (Pt 1): 83-90.
- Sakata-Yanagimoto, M., T. Enami, K. Yoshida, Y. Shiraishi, R. Ishii, Y. Miyake, H. Muto, N. Tsuyama, A. Sato-Osubo, Y. Okuno, S. Sakata, Y. Kamada, R. Nakamoto-Matsubara, N. B.

Tran, K. Izutsu, Y. Sato, Y. Ohta, J. Furuta, S. Shimizu, T. Komeno, Y. Sato, T. Ito, M. Noguchi, E. Noguchi, M. Sanada, K. Chiba, H. Tanaka, K. Suzukawa, T. Nanmoku, Y. Hasegawa, O. Nureki, S. Miyano, N. Nakamura, K. Takeuchi, S. Ogawa and S. Chiba (2014). "Somatic RHOA mutation in angioimmunoblastic T cell lymphoma." Nat Genet **46**(2): 171-175.

Sanz-Moreno, V., G. Gadea, J. Ahn, H. Paterson, P. Marra, S. Pinner, E. Sahai and C. J. Marshall (2008). "Rac activation and inactivation control plasticity of tumor cell movement." Cell **135**(3): 510-523.

Schaefer, A., N. R. Reinhard and P. L. Hordijk (2014). "Toward understanding RhoGTPase specificity: structure, function and local activation." Small GTPases **5**(2): 6.

Schmidt, A. and A. Hall (2002). "Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch." Genes Dev **16**(13): 1587-1609.

Schmidt, M., A. Rohe, C. Platzer, A. Najjar, F. Erdmann and W. Sippl (2017). "Regulation of G2/M Transition by Inhibition of WEE1 and PKMYT1 Kinases." Molecules **22**(12).

Schnelzer, A., D. Prechtel, U. Knaus, K. Dehne, M. Gerhard, H. Graeff, N. Harbeck, M. Schmitt and E. Lengyel (2000). "Rac1 in human breast cancer: overexpression, mutation analysis, and characterization of a new isoform, Rac1b." Oncogene **19**(26): 3013-3020.

Scholz, R. P., J. Regner, A. Theil, P. Erlmann, G. Holeiter, R. Jahne, S. Schmid, A. Hausser and M. A. Olayioye (2009). "DLC1 interacts with 14-3-3 proteins to inhibit RhoGAP activity and block nucleocytoplasmic shuttling." J Cell Sci **122**(Pt 1): 92-102.

Sebbagh, M., J. Hamelin, J. Bertoglio, E. Solary and J. Breard (2005). "Direct cleavage of ROCK II by granzyme B induces target cell membrane blebbing in a caspase-independent manner." J Exp Med **201**(3): 465-471.

Seguin, L., C. Liot, R. Mzali, R. Harada, A. Siret, A. Nepveu and J. Bertoglio (2009). "CUX1 and E2F1 regulate coordinated expression of the mitotic complex genes Ect2, MgcRacGAP, and MKLP1 in S phase." Mol Cell Biol **29**(2): 570-581.

Sells, M. A., J. T. Boyd and J. Chernoff (1999). "p21-activated kinase 1 (Pak1) regulates cell motility in mammalian fibroblasts." J Cell Biol **145**(4): 837-849.

Sells, M. A., U. G. Knaus, S. Bagrodia, D. M. Ambrose, G. M. Bokoch and J. Chernoff (1997). "Human p21-activated kinase (Pak1) regulates actin organization in mammalian cells." Curr Biol **7**(3): 202-210.

Socolovsky, M., H. Nam, M. D. Fleming, V. H. Haase, C. Brugnara and H. F. Lodish (2001). "Ineffective erythropoiesis in Stat5a(-/-)5b(-/-) mice due to decreased survival of early erythroblasts." Blood **98**(12): 3261-3273.

Song, B., X. S. Liu and X. Liu (2012). "Polo-like kinase 1 (Plk1): an Unexpected Player in DNA Replication." Cell Div **7**: 3.

Spangrude, G. J., S. Heimfeld and I. L. Weissman (1988). "Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells." Science **241**(4861): 58-62.

Starr, T. K., S. C. Jameson and K. A. Hogquist (2003). "Positive and negative selection of T cells." Annu Rev Immunol **21**: 139-176.

Sternberg, N. and D. Hamilton (1981). "Bacteriophage P1 site-specific recombination. I. Recombination between loxP sites." J Mol Biol **150**(4): 467-486.

Su, L., J. M. Agati and S. J. Parsons (2003). "p190RhoGAP is cell cycle regulated and affects cytokinesis." J Cell Biol **163**(3): 571-582.

Sudarov, A., F. Gooden, D. Tseng, W. B. Gan and M. E. Ross (2013). "Lis1 controls dynamics of neuronal filopodia and spines to impact synaptogenesis and social behaviour." EMBO Mol Med **5**(4): 591-607.

Sumi, T., K. Matsumoto, A. Shibuya and T. Nakamura (2001). "Activation of LIM kinases by myotonic dystrophy kinase-related Cdc42-binding kinase alpha." J Biol Chem **276**(25): 23092-23096.

Suzuki, A., J. W. Shin, Y. Wang, S. H. Min, M. Poncz, J. K. Choi, D. E. Discher, C. L. Carpenter, L. Lian, L. Zhao, Y. Wang and C. S. Abrams (2013). "RhoA is essential for maintaining normal megakaryocyte ploidy and platelet generation." PLoS One **8**(7): e69315.

Szalai, G., A. C. LaRue and D. K. Watson (2006). "Molecular mechanisms of megakaryopoiesis." Cell Mol Life Sci **63**(21): 2460-2476.

Takenawa, T. and S. Suetsugu (2007). "The WASP-WAVE protein network: connecting the membrane to the cytoskeleton." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(1): 37-48.

Takizawa, C. G. and D. O. Morgan (2000). "Control of mitosis by changes in the subcellular location of cyclin-B1-Cdk1 and Cdc25C." Curr Opin Cell Biol **12**(6): 658-665.

Tatsumoto, T., X. Xie, R. Blumenthal, I. Okamoto and T. Miki (1999). "Human ECT2 is an exchange factor for Rho GTPases, phosphorylated in G2/M phases, and involved in cytokinesis." J Cell Biol **147**(5): 921-928.

Tcherkezian, J., E. I. Danek, S. Jenna, I. Triki and N. Lamarche-Vane (2005). "Extracellular signal-regulated kinase 1 interacts with and phosphorylates CdGAP at an important regulatory site." Mol Cell Biol **25**(15): 6314-6329.

Terszowski, G., C. Waskow, P. Conradt, D. Lenze, J. Koenigsmann, D. Carstanjen, I. Horak and H. R. Rodewald (2005). "Prospective isolation and global gene expression analysis of the erythrocyte colony-forming unit (CFU-E)." Blood **105**(5): 1937-1945.

Theodorescu, D., L. M. Sapinoso, M. R. Conaway, G. Oxford, G. M. Hampton and H. F. Frierson, Jr. (2004). "Reduced expression of metastasis suppressor RhoGDI2 is associated with decreased survival for patients with bladder cancer." Clin Cancer Res **10**(11): 3800-3806.

Tolias, K. F., L. C. Cantley and C. L. Carpenter (1995). "Rho family GTPases bind to phosphoinositide kinases." J Biol Chem **270**(30): 17656-17659.

Trahey, M. and F. McCormick (1987). "A cytoplasmic protein stimulates normal N-ras p21 GTPase, but does not affect oncogenic mutants." Science **238**(4826): 542-545.

Tripathi, B. K., X. Qian, P. Mertins, D. Wang, A. G. Papageorge, S. A. Carr and D. R. Lowy (2014). "CDK5 is a major regulator of the tumor suppressor DLC1." J Cell Biol **207**(5): 627-642.

Tucci, M. G., G. Lucarini, D. Brancorsini, A. Zizzi, A. Pugnali, A. Giacchetti, G. Ricotti and G. Biagini (2007). "Involvement of E-cadherin, beta-catenin, Cdc42 and CXCR4 in the progression and prognosis of cutaneous melanoma." Br J Dermatol **157**(6): 1212-1216.

Uchida, N. and I. L. Weissman (1992). "Searching for hematopoietic stem cells: evidence that Thy-1.1^{lo} Lin⁻ Sca-1⁺ cells are the only stem cells in C57BL/Ka-Thy-1.1 bone marrow." J Exp Med **175**(1): 175-184.

Vega, F. M. and A. J. Ridley (2008). "Rho GTPases in cancer cell biology." FEBS Lett **582**(14): 2093-2101.

Visvikis, O., M. P. Maddugoda and E. Lemichez (2010). "Direct modifications of Rho proteins: deconstructing GTPase regulation." Biol Cell **102**(7): 377-389.

Walmsley, M. J., S. K. Ooi, L. F. Reynolds, S. H. Smith, S. Ruf, A. Mathiot, L. Vanes, D. A. Williams, M. P. Cancro and V. L. Tybulewicz (2003). "Critical roles for Rac1 and Rac2 GTPases in B cell development and signaling." Science **302**(5644): 459-462.

- Wang, J. Y., P. Yu, S. Chen, H. Xing, Y. Chen, M. Wang, K. Tang, Z. Tian, Q. Rao and J. Wang (2013). "Activation of Rac1 GTPase promotes leukemia cell chemotherapy resistance, quiescence and niche interaction." Mol Oncol **7**(5): 907-916.
- Wang, L., L. Yang, M. D. Filippi, D. A. Williams and Y. Zheng (2006). "Genetic deletion of Cdc42GAP reveals a role of Cdc42 in erythropoiesis and hematopoietic stem/progenitor cell survival, adhesion, and engraftment." Blood **107**(1): 98-105.
- Watanabe, N., P. Madaule, T. Reid, T. Ishizaki, G. Watanabe, A. Kakizuka, Y. Saito, K. Nakao, B. M. Jockusch and S. Narumiya (1997). "p140mDia, a mammalian homolog of Drosophila diaphanous, is a target protein for Rho small GTPase and is a ligand for profilin." EMBO J **16**(11): 3044-3056.
- Watanabe, S., T. De Zan, T. Ishizaki, S. Yasuda, H. Kamijo, D. Yamada, T. Aoki, H. Kiyonari, H. Kaneko, R. Shimizu, M. Yamamoto, G. Goshima and S. Narumiya (2013). "Loss of a Rho-regulated actin nucleator, mDia2, impairs cytokinesis during mouse fetal erythropoiesis." Cell Rep **5**(4): 926-932.
- Weber, J. D., W. Hu, S. C. Jefcoat, Jr., D. M. Raben and J. J. Baldassare (1997). "Ras-stimulated extracellular signal-related kinase 1 and RhoA activities coordinate platelet-derived growth factor-induced G1 progression through the independent regulation of cyclin D1 and p27." J Biol Chem **272**(52): 32966-32971.
- Weernink, P. A., K. Meletiadis, S. Hommeltenberg, M. Hinz, H. Ishihara, M. Schmidt and K. H. Jakobs (2004). "Activation of type I phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase isoforms by the Rho GTPases, RhoA, Rac1, and Cdc42." J Biol Chem **279**(9): 7840-7849.
- Weissman, I. L., D. J. Anderson and F. Gage (2001). "Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations." Annu Rev Cell Dev Biol **17**: 387-403.
- Welsh, C. F., K. Roovers, J. Villanueva, Y. Liu, M. A. Schwartz and R. K. Assoian (2001). "Timing of cyclin D1 expression within G1 phase is controlled by Rho." Nat Cell Biol **3**(11): 950-957.
- Wen, Y., C. H. Eng, J. Schmoranzler, N. Cabrera-Poch, E. J. Morris, M. Chen, B. J. Wallar, A. S. Alberts and G. G. Gundersen (2004). "EB1 and APC bind to mDia to stabilize microtubules downstream of Rho and promote cell migration." Nat Cell Biol **6**(9): 820-830.
- Wennerberg, K., K. L. Rossman and C. J. Der (2005). "The Ras superfamily at a glance." J Cell Sci **118**(Pt 5): 843-846.
- Westwick, J. K., Q. T. Lambert, G. J. Clark, M. Symons, L. Van Aelst, R. G. Pestell and C. J. Der (1997). "Rac regulation of transformation, gene expression, and actin organization by multiple, PAK-independent pathways." Mol Cell Biol **17**(3): 1324-1335.
- Wherlock, M. and H. Mellor (2002). "The Rho GTPase family: a Racs to Wrchs story." J Cell Sci **115**(Pt 2): 239-240.
- Wickstead, B. and K. Gull (2011). "The evolution of the cytoskeleton." J Cell Biol **194**(4): 513-525.
- Wilson, A., E. Laurenti, G. Oser, R. C. van der Wath, W. Blanco-Bose, M. Jaworski, S. Offner, C. F. Dunant, L. Eshkind, E. Bockamp, P. Lio, H. R. Macdonald and A. Trumpp (2008). "Hematopoietic stem cells reversibly switch from dormancy to self-renewal during homeostasis and repair." Cell **135**(6): 1118-1129.
- Wilson, A. and A. Trumpp (2006). "Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches." Nat Rev Immunol **6**(2): 93-106.
- Wolf, R. M., N. Draghi, X. Liang, C. Dai, L. Uhrbom, C. Eklof, B. Westermark, E. C. Holland and M. D. Resh (2003). "p190RhoGAP can act to inhibit PDGF-induced gliomas in mice: a

putative tumor suppressor encoded on human chromosome 19q13.3." Genes Dev **17**(4): 476-487.

Wu, D., M. Asiedu, R. S. Adelstein and Q. Wei (2006). "A novel guanine nucleotide exchange factor MyoGEF is required for cytokinesis." Cell Cycle **5**(11): 1234-1239.

Xavier-Ferruccio, J., L. Ricon, K. Vieira, A. L. Longhini, M. Lazarini, C. L. Bigarella, G. Franchi, Jr., D. S. Krause and S. T. O. Saad (2017). "Hematopoietic defects in response to reduced Arhgap21." Stem Cell Res **26**: 17-27.

Xu, H., S. Eleswarapu, H. Geiger, K. Szczur, D. Daria, Y. Zheng, J. Settleman, E. F. Srour, D. A. Williams and M. D. Filippi (2009). "Loss of the Rho GTPase activating protein p190-B enhances hematopoietic stem cell engraftment potential." Blood **114**(17): 3557-3566.

Xue, W., A. Krasnitz, R. Lucito, R. Sordella, L. Vanaelst, C. Cordon-Cardo, S. Singer, F. Kuehnel, M. Wigler, S. Powers, L. Zender and S. W. Lowe (2008). "DLC1 is a chromosome 8p tumor suppressor whose loss promotes hepatocellular carcinoma." Genes Dev **22**(11): 1439-1444.

Yaffe, M. B., K. Rittinger, S. Volinia, P. R. Caron, A. Aitken, H. Leffers, S. J. Gamblin, S. J. Smerdon and L. C. Cantley (1997). "The structural basis for 14-3-3:phosphopeptide binding specificity." Cell **91**(7): 961-971.

Yamamoto, M., N. Marui, T. Sakai, N. Morii, S. Kozaki, K. Ikai, S. Imamura and S. Narumiya (1993). "ADP-ribosylation of the rhoA gene product by botulinum C3 exoenzyme causes Swiss 3T3 cells to accumulate in the G1 phase of the cell cycle." Oncogene **8**(6): 1449-1455.

Yang, F. C., S. J. Atkinson, Y. Gu, J. B. Borneo, A. W. Roberts, Y. Zheng, J. Pennington and D. A. Williams (2001). "Rac and Cdc42 GTPases control hematopoietic stem cell shape, adhesion, migration, and mobilization." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(10): 5614-5618.

Yang, L., L. Wang, H. Geiger, J. A. Cancelas, J. Mo and Y. Zheng (2007). "Rho GTPase Cdc42 coordinates hematopoietic stem cell quiescence and niche interaction in the bone marrow." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(12): 5091-5096.

Yang, L., L. Wang, T. A. Kalfa, J. A. Cancelas, X. Shang, S. Pushkaran, J. Mo, D. A. Williams and Y. Zheng (2007). "Cdc42 critically regulates the balance between myelopoiesis and erythropoiesis." Blood **110**(12): 3853-3861.

Yasuda, S., F. Ocegüera-Yanez, T. Kato, M. Okamoto, S. Yonemura, Y. Terada, T. Ishizaki and S. Narumiya (2004). "Cdc42 and mDia3 regulate microtubule attachment to kinetochores." Nature **428**(6984): 767-771.

Yoo, H. Y., M. K. Sung, S. H. Lee, S. Kim, H. Lee, S. Park, S. C. Kim, B. Lee, K. Rho, J. E. Lee, K. H. Cho, W. Kim, H. Ju, J. Kim, S. J. Kim, W. S. Kim, S. Lee and Y. H. Ko (2014). "A recurrent inactivating mutation in RHOA GTPase in angioimmunoblastic T cell lymphoma." Nat Genet **46**(4): 371-375.

Yoon, Y. S., J. H. Choo, T. Yoo, K. Kang and J. H. Chung (2007). "RhoB is epigenetically regulated in an age- and tissue-specific manner." Biochem Biophys Res Commun **362**(1): 164-169.

Yoshida, H., K. Kawane, M. Koike, Y. Mori, Y. Uchiyama and S. Nagata (2005). "Phosphatidylserine-dependent engulfment by macrophages of nuclei from erythroid precursor cells." Nature **437**(7059): 754-758.

Yoshizaki, H., Y. Ohba, M. C. Parrini, N. G. Dulyaninova, A. R. Bresnick, N. Mochizuki and M. Matsuda (2004). "Cell type-specific regulation of RhoA activity during cytokinesis." J Biol Chem **279**(43): 44756-44762.

Yu, H., D. Leitenberg, B. Li and R. A. Flavell (2001). "Deficiency of small GTPase Rac2 affects T cell activation." J Exp Med **194**(7): 915-926.

- Yuce, O., A. Piekny and M. Glotzer (2005). "An ECT2-centralspindlin complex regulates the localization and function of RhoA." J Cell Biol **170**(4): 571-582.
- Zanin, E., A. Desai, I. Poser, Y. Toyoda, C. Andree, C. Moebius, M. Bickle, B. Conradt, A. Piekny and K. Oegema (2013). "A conserved RhoGAP limits M phase contractility and coordinates with microtubule asters to confine RhoA during cytokinesis." Dev Cell **26**(5): 496-510.
- Zhang, J., M. Socolovsky, A. W. Gross and H. F. Lodish (2003). "Role of Ras signaling in erythroid differentiation of mouse fetal liver cells: functional analysis by a flow cytometry-based novel culture system." Blood **102**(12): 3938-3946.
- Zheng, Y. (2001). "Dbl family guanine nucleotide exchange factors." Trends Biochem Sci **26**(12): 724-732.
- Zhou, C., S. Licciulli, J. L. Avila, M. Cho, S. Troutman, P. Jiang, A. V. Kossenkov, L. C. Showe, Q. Liu, A. Vachani, S. M. Albelda and J. L. Kissil (2013). "The Rac1 splice form Rac1b promotes K-ras-induced lung tumorigenesis." Oncogene **32**(7): 903-909.
- Zhou, X., M. C. Florian, P. Arumugam, X. Chen, J. A. Cancelas, R. Lang, P. Malik, H. Geiger and Y. Zheng (2013). "RhoA GTPase controls cytokinesis and programmed necrosis of hematopoietic progenitors." J Exp Med **210**(11): 2371-2385.
- Zigmond, S. H. (2004). "Formin-induced nucleation of actin filaments." Curr Opin Cell Biol **16**(1): 99-105.

RESEARCH ARTICLE

Phosphorylation of ARHGAP19 by CDK1 and ROCK regulates its subcellular localization and function during mitosis

Claire Marceaux, Dominique Petit, Jacques Bertoglio* and Muriel D. David*

ABSTRACT

ARHGAP19 is a hematopoietic-specific Rho GTPase-activating protein (RhoGAP) that acts through the RhoA/ROCK pathway to critically regulate cell elongation and cytokinesis during lymphocyte mitosis. We report here that, during mitosis progression, ARHGAP19 is sequentially phosphorylated by the RhoA-activated kinases ROCK1 and ROCK2 (hereafter ROCK) on serine residue 422, and by CDK1 on threonine residues 404 and 476. The phosphorylation of ARHGAP19 by ROCK occurs before mitosis onset and generates a binding site for 14-3-3 family proteins. ARHGAP19 is then phosphorylated by CDK1 in prometaphase. The docking of 14-3-3 proteins to phosphorylated S422 protects ARHGAP19 from dephosphorylation of the threonine sites and prevents ARHGAP19 from relocating to the plasma membrane during prophase and metaphase, thus allowing RhoA to become activated. Disruption of these phosphorylation sites results in premature localization of ARHGAP19 at the cell membrane and in its enrichment to the equatorial cortex in anaphase leading to cytokinesis failure and cell multinucleation.

KEY WORDS: ARHGAP19, CDK1, Mitosis, ROCK, Rho GTPase

INTRODUCTION

Rho GTPases are small G proteins involved in a number of signaling pathways that control cell adhesion, migration and cytokinesis (Chircop, 2014; Hall, 2012). Through their ability to bind guanine nucleotide di- or tri-phosphate, GTPases act as molecular switches alternating between an inactive and active state, respectively. Signaling pathway activity is regulated by guanine exchange factors (GEFs) that facilitate the nucleotide exchange from GDP to GTP, and GTPase-activating proteins (GAPs) that catalyze GTP hydrolysis to GDP, resulting in signaling pathway activation and deactivation, respectively. Small GTPases of the Rho family play key regulatory roles during mammalian cell division. In particular, RhoA regulates cortical rigidity during cell rounding and constriction of the actomyosin contractile ring during cytokinesis (Kamijo et al., 2006; Maddox and Burridge, 2003). The activity of Rho GTPases must be tightly regulated to ensure that the various steps of the cell division process occur in a coordinated manner. Previous studies on Rho GTPase regulation during mitosis have underlined the importance of three GEFs, Ect2 (Tatsumoto et al., 1999), GEF-H1 (also known as ARHGEF2) (Birkenfeld et al., 2007) and MyoGEF

(also known as PLEKHG6) (Wu et al., 2006) and two GAPs, RacGAP1 (also known as MgcRacGAP) and p190A RhoGAP (also known as ARHGAP35) (Hirose et al., 2001; Su et al., 2003). Recently ARHGAP11A, described as an M-phase GAP, was shown to control the zone of active RhoA in mitotic HeLa cells (Zanin et al., 2013). We have previously shown that the novel hematopoietic cell-specific RhoGAP ARHGAP19 is involved in cell shape changes during lymphocyte mitosis by regulating RhoA activity and subsequent ROCK-mediated phosphorylation of myosin and vimentin (David et al., 2014).

Proteins that are active during cell cycle progression, including Rho-GEFs and -GAPs are tightly regulated during cell division (David et al., 2012). Expression levels of some of the Rho GTPase regulators involved in mitosis control (e.g. Ect2, RacGAP1 or ARHGAP19) fluctuate during the cell cycle and reach their highest level in G2/M (David et al., 2014; Liot et al., 2011; Seguin et al., 2009). Another shared mode of regulation of these proteins is through phosphorylation. Such post-translational modifications often control their ability to interact with other proteins, and thereby affect their subcellular localization. In addition there are examples where phosphorylation directly regulates the activity of a GEF or a GAP by modifying their conformation (Hara et al., 2006; Tripathi et al., 2014). In our previous study on the role of ARHGAP19 in cytokinesis control, we gathered evidence that ARHGAP19 must be subject to post-translational regulations. First, while overexpression of ARHGAP19 delayed cytokinesis onset, it did not impact on the velocity of cleavage furrow ingression, suggesting that ARHGAP19 action was restricted to the early mitosis time window. Second, we noted that localization of ARHGAP19 during mitosis progression was highly dynamic, shuttling between the cytosol, the cell cortex and the nucleus of daughter cells. These observations suggested that one or several mitotic kinases may regulate the subcellular localization of ARHGAP19. Among the numerous kinases that are at play during mitosis, CDK1 is believed to be one of the main coordinators ensuring that cytokinesis does not occur before chromosome segregation (Lindon, 2008). In this paper, we show that ARHGAP19 is phosphorylated by CDK1 on two residues, T404 and T476 located in the C-terminal region of the protein. Furthermore, ARHGAP19 is phosphorylated on S422 by the Rho effector kinases proteins ROCK1 and ROCK2 (hereafter ROCK) thus generating a binding site for 14-3-3 proteins.

We investigated whether these post-translational modifications have an influence on the function or localization of the ARHGAP19 protein during mitosis. Results from microscopy imaging experiments indicated that protein phosphorylation has an impact on its localization, as we observed that the non-phosphorylated mutant forms of ARHGAP19 are recruited at the cell cortex as soon as the prophase step, while wild-type (WT) ARHGAP19 is only recruited at the metaphase to anaphase transition. Cell cortex localization of the non-phosphorylated mutant forms of

Insertm U749 and Insertm U1170, Gustave Roussy, 94805 Villejuif, France.

*Authors for correspondence (jacques.bertoglio@gustaveroussy.fr; muriel.david@gustaveroussy.fr)

© C.M., 0000-0002-9107-8772; D.P., 0000-0002-7388-1668; J.B., 0000-0002-9834-376X; M.D.D., 0000-0003-1392-2701

Received 12 July 2017; Accepted 24 January 2018

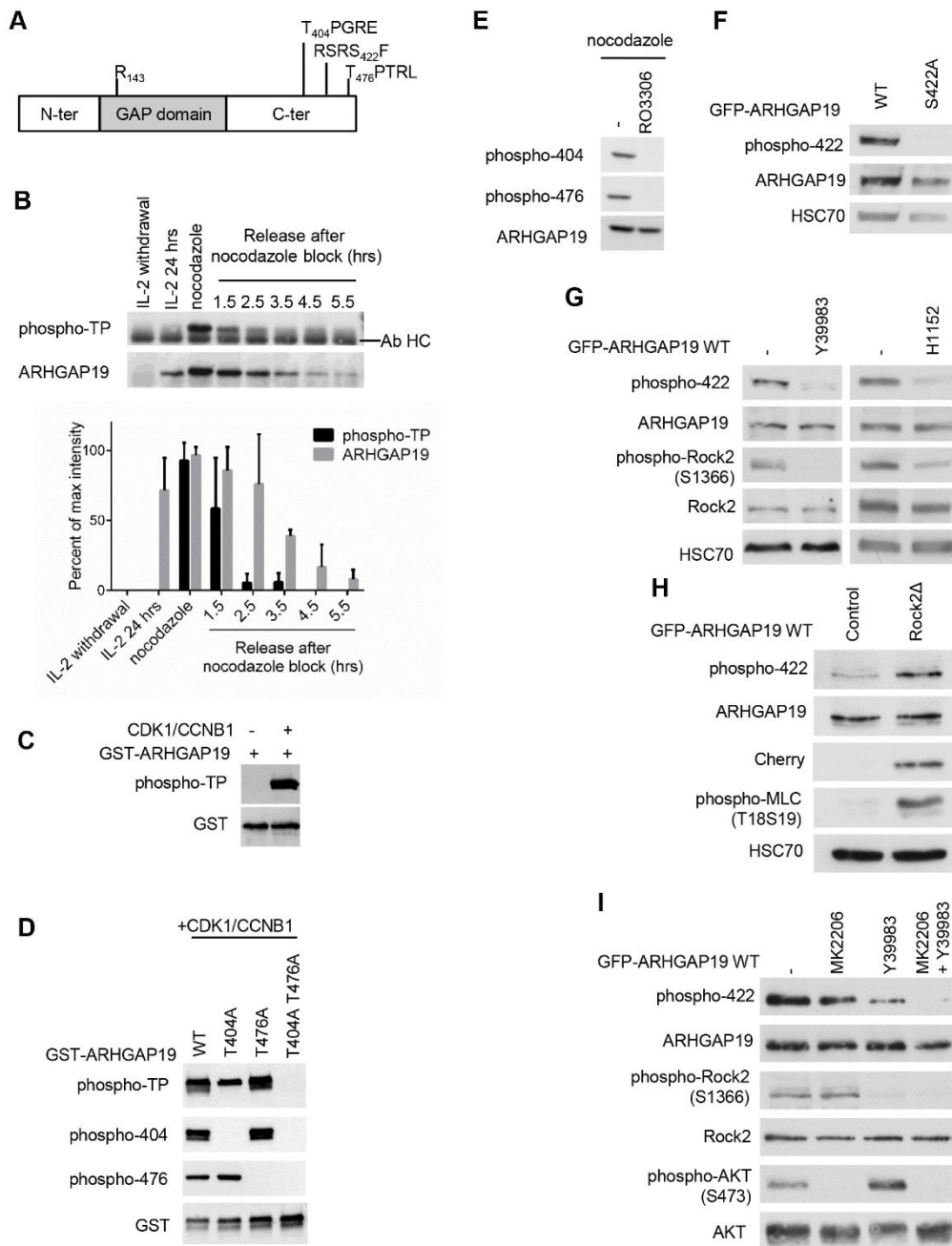


Fig. 1. See next page for legend.

ARHGAP19 at later stages of mitosis was also more pronounced than that of the WT form. Finally, ARHGAP19 phosphorylation appeared to be essential during cell division. Mutation of either the CDK1 or ROCK phosphorylation sites resulted in cytokinesis failure and cell multinucleation.

RESULTS

ARHGAP19 is phosphorylated by CDK1 in early mitosis

CDK1 phosphorylates its substrates on threonine or serine residues present in TP-x-R or SP-x-R motifs, respectively. Analysis of the protein sequence of ARHGAP19 revealed the presence of two

Fig. 1. ARHGAP19 is a substrate of CDK1, ROCK and AKT. (A) The CDK1 and ROCK/AKT phosphorylation consensus motifs (S/T-P-x-R/K, R/K-x-x-S/T-x and R-x-R-x-x-S/T-x) are located in the C-terminal region of ARHGAP19 at positions 404, 476 and 422, outside the GAP domain containing the catalytic arginine, R143. (B) IL-2-dependent Kit225 cells were synchronized in G1 by factor deprivation, then stimulated to re-enter the cell cycle by adding back IL-2 for 24 h. Where indicated, cells were blocked in prometaphase by treatment with nocodazole, washed and cultured for up to 5.5 h. Phosphorylation of ARHGAP19 is revealed by an anti-phospho-TP antibody, and the signal rapidly decreases upon removal of nocodazole. As shown previously, endogenous ARHGAP19 levels are cell cycle regulated and reach a maximum in mitosis. The bar graph represents intensities of the phospho-TP and ARHGAP19 signals as mean \pm s.d. from three independent experiments, expressed as percentages of the maximal signal intensity obtained in each experiment. Ab HC, heavy chain of the anti-ARHGAP19 antibodies used for immunoprecipitation. (C,D) *In vitro* kinase assays. GST-ARHGAP19 in its WT form, or with residues T404 and T476 mutated into non phosphorylatable alanine residues, were incubated in the presence of recombinant CDK1-CCNB1. Western blots were performed using the anti-phospho-TP antibody, and antibodies specifically recognizing the phosphorylated forms of residues T404 and T476. (E) WT ARHGAP19-expressing cells were arrested in prometaphase by treatment with nocodazole and were then incubated with the RO3306 CDK1 inhibitor. Western blotting using the anti-phospho-404 and anti-phospho-476 antibodies indicated that CDK1 inhibition abrogates these phosphorylation events. (F) Specificity of the anti-phospho-422 antibody. WT GFP-ARHGAP19 but not S422A GFP-ARHGAP19 is recognized by this antibody in nocodazole-arrested Kit225 cells. (G) Inhibition of ROCK abolishes the phosphorylation of ARHGAP19 on S422. WT GFP-ARHGAP19-expressing Kit225 cells were synchronized by treatment with nocodazole and incubated in the presence or the absence of the Y39983 or the H1152 ROCK inhibitory compounds. The samples were analyzed by western blotting using anti-phospho-422, anti-ARHGAP19, anti-phospho-ROCK2 and anti-ROCK2 antibodies. HSC70 levels were assessed to control for equal protein loading. (H) ROCK activation leads to an increase in phospho-S422. WT GFP-ARHGAP19-expressing Kit225 cells were transfected with vectors encoding mCherry or mCherry-ROCK2 Δ and synchronized by treatment with nocodazole. The samples were analyzed by western blotting using anti-phospho-422, anti-ARHGAP19, anti-Cherry and anti-phospho-MLC antibodies. (I) Inhibition of both ROCK (using Y39983) and AKT (using MK2206) is necessary to abolish the phosphorylation of WT GFP-ARHGAP19 on S422 in nocodazole-synchronized Jurkat cells.

potential phosphorylation sites for CDK1, namely the threonine residues at positions 404 and 476 (Fig. 1A). To assess whether ARHGAP19 is phosphorylated on one or both of these TP-x-R motifs, endogenous ARHGAP19 was immunoprecipitated from Kit225 lymphocytes synchronized in G1, S-G2, prometaphase or later mitotic stages. As shown in Fig. 1B, ARHGAP19 from nocodazole-treated prometaphasic cells is recognized by an anti-phospho-TP-motif antibody. The level of ARHGAP19 phosphorylation on TP motifs decreased upon removal of the synchronizing agent, which allowed cells to resume progression in mitosis. Like Ect2 and MgcRacGAP (Liot et al., 2011; Seguin et al., 2009), ARHGAP19 becomes degraded when cells enter the G1 phase of the next cycle. However, after cell release from the nocodazole-induced block in prometaphase, the phospho-TP signal decreased at a higher rate than that of ARHGAP19, suggesting that there is active dephosphorylation of ARHGAP19 by one or several phosphatases. Given that both T404 and T476 of ARHGAP19 are in motifs fitting the consensus of sites subject to CDK1-mediated phosphorylation, we tested whether active CDK1 can phosphorylate ARHGAP19. In an *in vitro* kinase assay, we found that GST-ARHGAP19 could be phosphorylated on TP motifs in the presence of a recombinant CDK1-CCNB1 complex (Fig. 1C). This phosphorylation is abrogated by the double T404A/T476A mutation, but not by the single T404A or T476A mutations (Fig. 1D). To allow further investigation of the phosphorylation events occurring on T404 and T476, we

generated antibodies against the corresponding phosphopeptides. The *in vitro* kinase assay described above allowed us to confirm that these antibodies recognize their respective targets specifically (Fig. 1D).

To confirm the role of CDK1 on the T404/T476 phosphorylation, Kit225 lymphocytes were synchronized in prometaphase by performing a 16 h nocodazole treatment (40 ng/ml) with the RO3306 inhibitory compound (9 μ g/ml) being added (or not) for the last 4 h before the cells were processed for western blot analysis. The phospho-T404/T476 signals were abrogated when CDK1 is inhibited by RO3306 treatment (Fig. 1E). This result indicates that T404 and T476 of ARHGAP19 are targeted by the kinase CDK1 in cells.

ARHGAP19 is also phosphorylated by ROCK and AKT

In addition to T404 and T476, mass spectrometric analyses of human ARHGAP19 [our own studies, not shown, and Mertins et al. (2013)] indicate that ARHGAP19 is phosphorylated on multiple residues, including S422, which is conserved among species. S422 lies in an R/K-x-x-S/T-x motif (Fig. 1A) that represents a potential phosphorylation site for the RhoA effector kinase ROCK. To study phosphorylation of ARHGAP19 at this site, we generated anti-phosphopeptide antibodies that specifically recognized the WT but not the S422A mutant form of ARHGAP19 from nocodazole-arrested Kit225 cells (Fig. 1F). To analyze whether ROCK could be responsible for the phosphorylation of ARHGAP19, Kit225 lymphocytes were synchronized in prometaphase using nocodazole and then treated for 90 min with the ROCK inhibitory compounds Y39983 or H1152 (Feng et al., 2016; Ramachandran et al., 2011). As shown in Fig. 1G, inhibition of ROCK, as assessed by the disappearance of the phospho-ROCK2 signal, strongly decreased phosphorylation of ARHGAP19 on S422. To confirm the impact of ROCK on S422 phosphorylation, we generated a plasmid encoding a constitutive active form of ROCK, Cherry-ROCK2 Δ , where ROCK2 is devoid of its autoinhibitory domain (Sebbagh et al., 2005). This plasmid was transfected in Kit225 cells that already expressed WT GFP-ARHGAP19. Activity of the ROCK2 Δ protein was confirmed by an increase in the phosphorylation of myosin light chain 2 (MLC2, also known as MYL2); a parallel increase in the phosphorylation of ARHGAP19 on S422 was observed (Fig. 1H). Taken together, these results indicated that S422 of ARHGAP19 is a target for ROCK in cells.

The motif surrounding S422 is also a potential phosphorylation site for AKT family proteins (R-x-R-x-x-S/T-x). However, inhibiting AKT in nocodazole-arrested Kit225 using MK2206 did not affect ARHGAP19 phosphorylation on S422. We therefore turned to Jurkat cells, another human T cell line in which AKT is constitutively activated due to PTEN deficiency. In these cells, S422 phosphorylation was partially decreased by treatment with either AKT or the ROCK inhibitors, and the combination of both compounds was required to completely abolish S422 phosphorylation (Fig. 1I). Thus ARHGAP19 is likely phosphorylated by both ROCK and AKT in Jurkat cells.

Timing of ARHGAP19 phosphorylations

In unsynchronized Kit225 cells, as well as in cells synchronized just before entry in mitosis through the use of the RO3306 CDK1 inhibitor, ARHGAP19 appears to only be significantly phosphorylated on S422 and not on T404 or T476 (Fig. 2A). We noted a decrease in the level of S422 phosphorylation in cells treated with RO3306, as compared to what was seen in unsynchronized cells. On the other hand, nocodazole treatment, which allows cells to enter

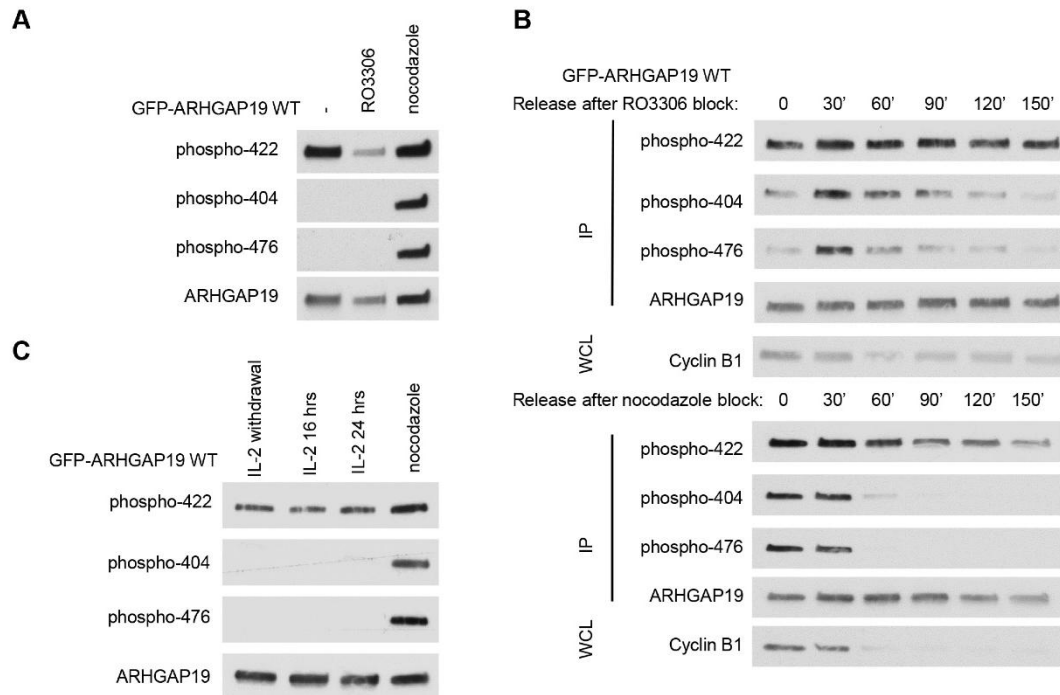


Fig. 2. ARHGAP19 phosphorylation kinetics. (A) WT GFP-ARHGAP19 Kit225 cells were left unsynchronized (–) or synchronized at the G2/M transition by using the CDK1 inhibitor RO3306, or in prometaphase by using nocodazole. In contrast to S422, T404 and T476 are only phosphorylated during mitosis. (B) WT GFP-ARHGAP19 cells were blocked at the G2/M transition or in prometaphase by RO3306 or nocodazole treatment, respectively, and then released into mitosis for the indicated times (minutes). Phosphorylation of S422 is detectable during the entire mitosis while phosphorylation of T404 and T476 residues gradually decreases as cells progress through mitosis (as illustrated by the decrease in cyclin B1 levels, which occurs following the metaphase to anaphase transition). IP, immunoprecipitation; WCL, whole-cell lysates. (C) Kit225 cells were synchronized in G1 by IL-2 deprivation. Addition of IL-2 to the deprived cells then allows them to progress through S phase after 16 h of culture and to reach G2 by 24 h. Prometaphase arrest was achieved by using nocodazole. Phosphorylation of S422 of exogenous GFP-ARHGAP19 is detectable at all phases of the cell cycle while phosphorylation of T404 and T476 is detectable only in mitotic cells.

mitosis but causes arrest in prometaphase, is accompanied by increased levels of phospho-S422, as compared to what was seen in unsynchronized cells, and phosphorylation of ARHGAP19 at positions 404 and 476. Thus, in early mitosis, ARHGAP19 is phosphorylated on all three residues.

We then analyzed more precisely the kinetics of the ARHGAP19 phosphorylations during mitosis. Appearance and disappearance of the phospho-T404/T476 signals in cells synchronized by block and release with either RO3306 or nocodazole are reminiscent of those described for other CDK1 substrates. Indeed, phosphorylation on T404 and T476 increased after mitosis onset, reached a maximum in cells synchronized in prometaphase, and declined thereafter (Fig. 2B). Of note, kinetics of appearance and disappearance of the phosphorylation signals during mitosis progression are similar for T404 and T476 residues, suggesting common regulatory mechanisms. In contrast, phosphorylation on residue S422 decreased slower than phosphorylation on T404 and T476 and was still detectable at the end of mitosis. Furthermore, analyzing the complete cell cycle showed that the S422 of exogenous GFP-ARHGAP19 was phosphorylatable throughout the cell cycle (Fig. 2C) although, as endogenous ARHGAP19 is not expressed in the G1 phase, only phosphorylation from the S-phase and thereafter is of physiological relevance.

Phosphorylation of residues T404/T476 depends on phospho-S422

During the course of this study, we noticed that mutation of a given phosphorylation site (i.e. either S422, T404 or T476) into non-phosphorylatable alanine residues also impacted on the phosphorylation levels of some of the other sites, suggesting that phosphorylation at a given site might influence phosphorylation of other residues. First, not only does RO3306 reduce phosphorylation of S422 (Fig. 2A), but mutation of the T404 and T476 residues into alanine residues does so as well (Fig. 3A). Thus, absence of phosphorylation of T404 and T476 (whether due to cells not being in mitosis, to pharmacological inhibition of CDK1 or to mutation of these residues into alanine) leads to decreased levels of S422 phosphorylation. Second, we observed that, in Kit225 cells, preventing phosphorylation of ARHGAP19 at position 422 either by mutating S422 (Fig. 3A) or by using the ROCK inhibitor (Fig. 3B) correlated with a reduced phosphorylation at positions 404 and 476. These experiments have also been performed in Jurkat cells (Fig. 3C) and led to similar results with the difference that, as described above, inhibition of both AKT and ROCK was required to fully abolish phosphorylation of S422 in Jurkat cells.

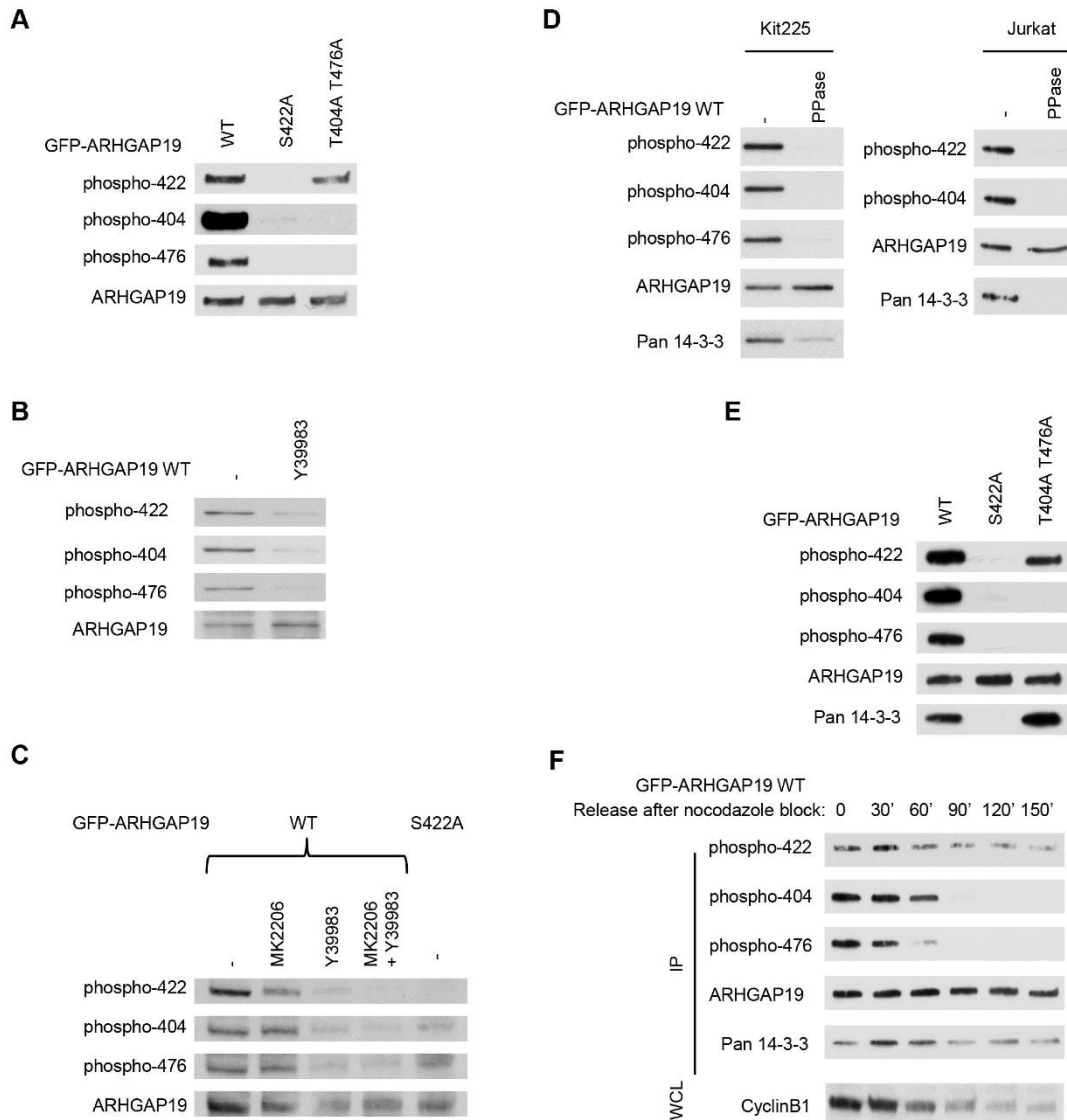


Fig. 3. See next page for legend.

S422-phosphorylated ARHGAP19 interacts with 14-3-3 proteins

Mass spectrometric analysis of ARHGAP19 immune complexes as well as a yeast two-hybrid screen indicated that ARHGAP19 might interact with 14-3-3 family proteins (J.B. and M.D.D., unpublished results). The 14-3-3 protein family is composed of seven proteins that are ubiquitously expressed and bind to phosphoserine and phosphothreonine motifs (Aitken, 1996). 14-3-3 proteins (recognized by a pan-14-3-3 antibody in western blots) are readily detectable in ARHGAP19 immunoprecipitates from nocodazole-treated Kit225 cells (Fig. 3D, left panel) or Jurkat cells (Fig. 3D, right panel). This interaction was abrogated, however, when the immunoprecipitates

were dephosphorylated *in vitro* by incubation in the presence of a recombinant PP1 phosphatase. We then analyzed which of the ARHGAP19 phosphoresidues was implicated in this interaction with 14-3-3. 14-3-3 binding was detectable in ARHGAP19 mutated on both T404 and T476 but disappeared with ARHGAP19 S422A (Fig. 3E). Similarly, binding of 14-3-3 to WT ARHGAP19 was detectable in asynchronous cells, or in cells treated with the CDK1 inhibitor RO3306 in which S422 is phosphorylated but T404/T476 are not phosphorylated (data not shown). Thus, binding of 14-3-3 proteins appeared to be mediated by phospho-S422, which indeed lies in a consensus motif for 14-3-3 proteins (RS-x-pS/T-x or R-xxx-pS/T-x) (Fernández-Orth et al., 2017; Yaffe et al., 1997).

Fig. 3. Phosphorylation of S422 promotes T404/T476 phosphorylation and mediates interaction of ARHGAP19 with 14-3-3 proteins.

(A) Phosphorylation of T404 and T476 disappears when S422 is non-phosphorylatable. Kit225 cells expressing either WT GFP-ARHGAP19 or the S422A or the T404A/T476A GFP-ARHGAP19 mutants were synchronized in prometaphase by using nocodazole. GFP-ARHGAP19 was immunoprecipitated with GFP-Trap[®], and western blotting was performed using anti-phospho-422, anti-phospho-404, anti-phospho-476 and anti-ARHGAP19 antibodies. (B) Cell treatment with the ROCK inhibitor decreases the phosphorylation levels of T404 and T476, in addition to that of S422. WT GFP-ARHGAP19-expressing Kit225 cells were synchronized by using nocodazole and cultured for 1.5 h in the absence or the presence of the ROCK inhibitor (Y39983). GFP-ARHGAP19 proteins were analyzed by western blotting in total cell lysates, using the indicated antibodies. (C) In Jurkat cells, phosphorylation levels of T404/T476 drop when S422 phosphorylation is decreased in the presence of kinase inhibitors or when S422 is mutated into a non-phosphorylatable amino acid (S422A). Jurkat cells expressing WT or S422A GFP-ARHGAP19 were synchronized in prometaphase by using nocodazole, and cultured for 1.5 h in the absence or the presence of inhibitors of ROCK (Y39983) or AKT (MK2206). (D) WT ARHGAP19 interacts with 14-3-3 proteins and this interaction is phosphorylation dependent. Kit225 cells (left) or Jurkat cells (right) expressing WT GFP-ARHGAP19 were synchronized in prometaphase by using nocodazole, and GFP-ARHGAP19 proteins were immunoprecipitated with GFP-Trap[®]. The GFP-ARHGAP19 immunoprecipitates were then treated with recombinant PP1 phosphatase (PPase), or were left untreated. Western blotting was performed with the indicated antibodies. (E,F) Phosphorylation of S422 mediates the interaction of ARHGAP19 with 14-3-3 proteins. (E) Kit225 cells expressing either WT, S422A or T404A/T476A GFP-ARHGAP19 were synchronized in prometaphase. GFP-ARHGAP19 proteins were immunoprecipitated with GFP-Trap[®], and western blotting was performed with the indicated antibodies. (F) The interaction with 14-3-3 is detectable throughout all mitosis stages. Kit225 cells expressing WT GFP-ARHGAP19 were synchronized in prometaphase by using nocodazole, and were then washed and released in fresh culture medium for the indicated times. GFP-ARHGAP19 proteins were immunoprecipitated (IP) with GFP-Trap[®] and western blotting was performed with the indicated antibodies. Western blot analysis of cyclin B1 was performed on whole-cell lysates (WCL).

Furthermore, results shown in Fig. 3F demonstrate that, during mitosis, 14-3-3 proteins bind to ARHGAP19 as long as S422 is phosphorylated.

Binding of 14-3-3 proteins protects ARHGAP19 from dephosphorylation of the T404 and T476 residues

As shown in Fig. 3E, mutation of S422 of ARHGAP19 impedes both the ability of ARHGAP19 to interact with 14-3-3 proteins and the levels of phosphorylation of the T404 and T476 residues, suggesting that both phenomena are linked. Two hypotheses can explain the role of 14-3-3 binding in regulating the T404 and T476 phosphorylations: (1) 14-3-3 proteins could play the role of an adaptor protein and recruit the CDK1 kinase to phosphorylate ARHGAP19, or (2) 14-3-3 proteins could protect ARHGAP19 from dephosphorylation through steric hindrance, limiting access of protein phosphatases to the T404/T476 residues. To test these hypotheses, nocodazole-arrested Kit225 cells expressing WT ARHGAP19 or the S422A mutated form were treated with 100 nM of the serine/threonine phosphatase inhibitor okadaic acid (OA) for 2.5 h. We observed that cell treatment with OA only led to a small increase in phosphorylation of WT ARHGAP19 whereas phosphorylation of both threonine residues was totally rescued in ARHGAP19 S422A cells (Fig. 4A). These results suggest that binding of 14-3-3 to S422, rather than allowing the recruitment of CDK1, may prevent access of an okadaic acid-sensitive phosphatase to phospho-T404/T476.

Phosphorylation of ARHGAP19 prevents its translocation to the cell cortex

A hypothesis that we first investigated was whether phosphorylation of ARHGAP19 modified its GAP activity. To assess ARHGAP19 GAP activity we had to immunoprecipitate the protein from cell lysates. Indeed, *E. coli*-derived recombinant full-length ARHGAP19 is inactive (both as a GST and an MBP fusion protein), even after *in vitro* phosphorylation by a mixture of CDK1 and ROCK (data not shown). In initial experiments, we used cells synchronized with nocodazole or with the CDK1 inhibitor to compare the GAP activity of ARHGAP19 when phosphorylated on T404/T476 or not, respectively. Neither the level of GAP activity towards RhoA nor ARHGAP19 specificity towards RhoA and not Rac or Cdc42 appeared to depend upon its phosphorylation status (Fig. S1A). To further investigate this point, we compared activity of WT ARHGAP19 and ARHGAP19 that had been mutated on all three phosphorylation sites (Fig. S1B) and again found no evidence that phosphorylation might regulate the GAP activity of ARHGAP19.

We next investigated localization of WT, T404A/T476A, S422A or T404A/S422A/T476A in Kit225 cells during mitosis by performing fluorescence microscopy. Following mitosis entry, WT ARHGAP19 was dispersed in the cytoplasm in prophase and metaphase, translocated to the cell cortex in early anaphase, and then concentrated at the cortical region of the ingression cleavage furrow at later stages and until the end of cell division (David et al., 2014). A striking observation is the modification of the localization of the mutated forms (T404A/T476A, S422A or T404A/S422A/T476A) of ARHGAP19 during early mitosis (prophase and metaphase). Indeed, the mutant forms of ARHGAP19 were no longer in the cytoplasm but concentrated at the cell cortex (Fig. 4B,C), suggesting that all three residues contribute to the phenotype. Alternatively, this similarity in the effects of each mutation on ARHGAP19 localization may be the result of the above-described interplay between the phosphorylation status of S422, on one hand, and T404/T476, on the other hand. Thus, phosphorylation of any of these three residues may contribute to the sequestering of ARHGAP19 in the cytoplasm and prevent it from translocating prematurely to the cell cortex. Moreover, quantitative analyses of fluorescence intensities indicated that the recruitment to the cell cortex of the non-phosphorylated mutant forms of ARHGAP19 was also more pronounced than that of the WT form at later stages of mitosis (Fig. 4C).

We have previously reported that silencing ARHGAP19, or expressing its R143A GAP inactive mutant, induced precocious cleavage furrow ingression that, in some cells, leads to failure of cytokinesis and the appearance of binucleated cells (David et al., 2014). To assess whether phosphorylation of ARHGAP19 might have any effect on the outcome of cell division, Kit225 cells were induced to express either WT ARHGAP19 or its mutated forms and were analyzed 48 h later for DNA content by FACS analysis. Cells expressing WT ARHGAP19 had a normal ploidy (between 2N and 4N). In contrast, cells that expressed any of the mutated forms of ARHGAP19 displayed a significant proportion of cells with 8N or even 16N DNA (Fig. 4D). These results demonstrate that the phosphorylations of ARHGAP19, in addition to regulating its subcellular localization, have an impact on cell division.

DISCUSSION

In this study, we report that ARHGAP19 is phosphorylated by the Rho kinase ROCK on S422 and by CDK1 on T404 and T476. ARHGAP19 is localized in the nucleus before mitosis and is phosphorylated on S422 by the Rho kinase ROCK. This

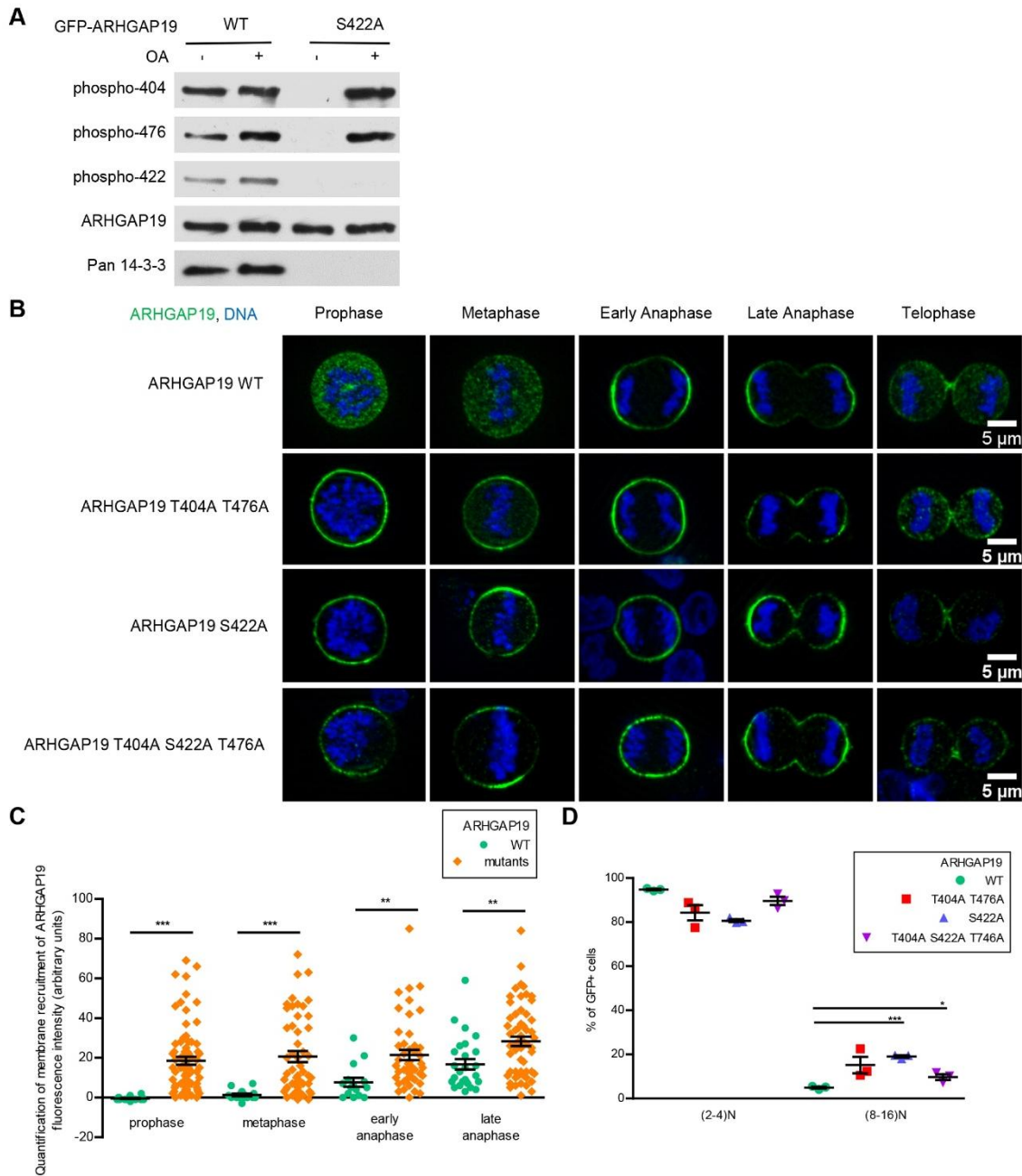


Fig. 4. See next page for legend.

phosphorylation allows the interaction of ARHGAP19 with 14-3-3 proteins. At the beginning of mitosis, the nuclear membrane breaks down and ARHGAP19 moves to the cytoplasm. The kinase CDK1 is then activated, and cytoplasmic CDK1 molecules (Takizawa and Morgan, 2000) phosphorylate ARHGAP19 on the two residues T404

and T476. These phosphorylations persist until CDK1 is inactivated following degradation of cyclin B. Interestingly, phosphorylation on S422 on one hand and on T404/T476 on the other hand appear to influence each other. When ARHGAP19 is not phosphorylated on S422 (e.g. in the S422A mutant), the binding to 14-3-3 proteins is lost

Fig. 4. Role of phosphorylations of ARHGAP19 and 14-3-3 binding. (A) 14-3-3 binding protects ARHGAP19 from dephosphorylation on T404 and T476. Kit225 cells expressing either WT or S422A GFP-ARHGAP19 were synchronized in prometaphase and treated with OA, a protein phosphatase inhibitor. GFP-ARHGAP19 was immunoprecipitated using GFP-Trap[®], and the samples were analyzed by western blotting using the anti-phospho-422, anti-phospho-404, anti-phospho-476, anti-ARHGAP19 and anti-pan-14-3-3 antibodies. (B) Localization of ARHGAP19 during mitosis. Kit225 lymphocytes (expressing the WT, S422A, T404A/T476A or S422A/T404A/T476A forms of ARHGAP19) were fixed with trichloroacetic acid (TCA). Cells were labeled for DNA (Hoechst 33342, blue) and GFP-ARHGAP19 (green) and observed by fluorescence microscopy. Representative pictures are shown. (C) Quantification of ARHGAP19 translocation to the cell cortex during mitosis for cells expressing WT GFP-ARHGAP19 or the S422A, T404A/T476A or the triple T404A/S422A/T476A mutant. Since no significant difference was observed between mutants, results are represented together on the graph under the label 'mutants'. For cells in prophase, fluorescence intensities were measured at random membrane positions. For cells in metaphase or anaphase, fluorescence intensities were measured at the presumptive cleavage furrow or cleavage furrow membranes, respectively. Values corresponding to fluorescence intensities in the cytoplasm were subtracted from that measured at the membrane. Data are expressed as mean \pm s.e.m. of these calculated values, with $n > 10$ for each mitotic stage of each cell population. (D) DNA content analysis. WT and mutant forms of GFP-ARHGAP19 were expressed for 48 h in Kit255 cells. DNA content, assessed through staining with Hoechst 33342, was analyzed by flow cytometry. Results are mean \pm s.e.m.; $n = 3$ for each condition. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.0001$ (Student's *t*-test).

and the phosphorylation of T404 and T476 is decreased. Indeed, our results indicate that the interaction with 14-3-3 proteins protects ARHGAP19 from dephosphorylation by phosphatases, as previously reported for other phosphatase substrates (Gohla and Bokoch, 2002; Hausser et al., 2006). Dependency of the S422 phosphorylation on the status of T404/T476, as observed in RO3306-treated cells or in the T404A/T476A mutant ARHGAP19, is not clearly understood. So far, none of our attempts at investigating the underlying mechanism provided us with any hints to explain it. One hypothesis could be that, because S422 lies in between T404 and T476, the proximity of these three sites might interfere with their respective phosphorylation.

In early mitosis, the mutant ARHGAP19 proteins where S422, T404/T476 or all three residues have been replaced by non-phosphorylatable alanine residues, localize at the membrane and no longer reside in the cytoplasm. Thus, the phosphorylation of these

residues prevents ARHGAP19 from interacting with the membrane, possibly due to an increase in the negative charges of the protein or through interaction with 14-3-3.

The precise localization of ARHGAP19 during mitosis progression appears to be crucial for cell division. Indeed, when some of the residues are not phosphorylated, multinucleated cells could be observed by microscopy (data not shown) or through FACS analyses of their DNA content. It has been clearly established that interfering with RhoA activity during mitosis prevents contraction of the actomyosin ring and leads to failure of cytokinesis and multinucleation in various cell types (Kamijo et al., 2006; Yoshizaki et al., 2004). It is therefore likely that the premature membrane localization of non-phosphorylatable ARHGAP19 impedes local RhoA activation and in turn alters and/or delays the cortical contractility that is required for cell shape changes in early mitosis. Indeed, most cells that express ARHGAP19 mutated on these residues do not elongate, a phenomenon that could be directly responsible for delaying chromosome separation and for the subsequent failure of cell division. Moreover, in subsequent steps of mitosis, increased enrichment to the cell equatorial cortex of the mutated forms of ARHGAP19, as compared to the WT form, likely leads to defects in the RhoA-dependent contraction of the cleavage furrow without which cytokinesis cannot occur.

In summary, our data add ARHGAP19 to the list of mitosis related proteins that are substrates of CDK1 and provide evidence for a new regulatory pathway whereby RhoA-activated ROCK phosphorylates ARHGAP19 on S422 to recruit 14-3-3 proteins which, in turn, help to maintain the phosphorylation of residues T404/T476 by CDK1 and impede the ability of ARHGAP19 to translocate prematurely to the cell cortex during mitosis (Fig. 5).

MATERIALS AND METHODS

Cell culture and transfection

Interleukin-2 (IL-2)-dependent human Kit225 lymphocytes and human leukemia Jurkat T cells (ACC 282) were grown and transfected as previously described (David et al., 2014). Stable transfectants were selected in the presence of 2 μ g/ml puromycin (for GFP-ARHGAP19 plasmids) or 3.5 μ g/ml geneticin (for the Cherry-ROCK2 Δ plasmid). To synchronize cells in the G1 phase, lymphocytes were cultured in the absence of IL-2 for 48 h. Cell cycle progression was then resumed by addition of IL-2 for 16 or 24 h, at which time points most cells have reached the S and G2 phases, respectively.

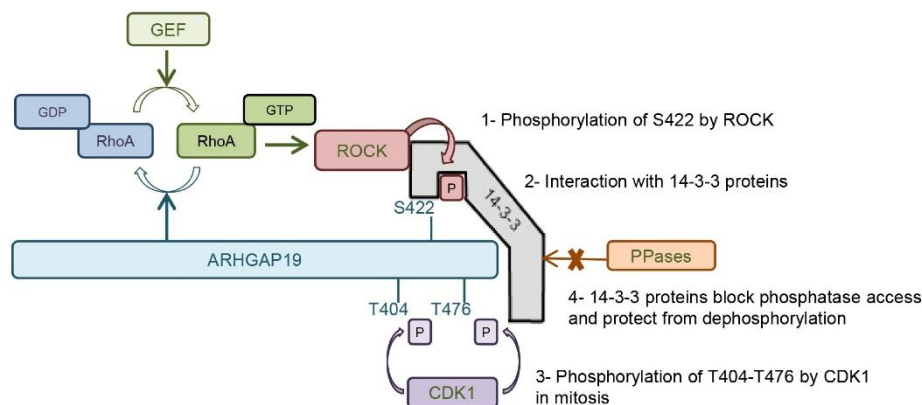


Fig. 5. A schematic model summarizing the regulation of ARHGAP19. Regulatory pathway whereby RhoA-activated ROCK phosphorylates ARHGAP19 on Ser422 (1) to recruit 14-3-3 proteins (2), which, in turn, help maintain the CDK1-mediated phosphorylation of the T404/T476 residues (3) by blocking access of a phosphatase (4) and limiting the ability of ARHGAP19 to translocate to the cell cortex during mitosis.

To enrich the population in prometaphase-blocked cells, 40 ng/ml nocodazole (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) was added for 16 h (starting 24 h after IL-2 addition). Where indicated, cells were treated for 20 h with 9 μ M RO3306 (Calbiochem, CA) to synchronize them at the end of the G2 phase. Cells were then washed thoroughly and placed in IL-2-containing culture medium to allow progression through mitosis. To inhibit ROCK, cells were treated for 1.5 h with 20 μ M Y39983 (Selleckchem, MD) or 10 μ M H1152 (Tocris Bioscience, Bio-techne Europe). AKT kinase inhibition was achieved with 1 μ M MK2206 (Selleckchem, MD). Cell treatment with 100 nM okadaic acid (#459618, Calbiochem) for 2.5 h was used to inhibit serine/threonine phosphatases.

Plasmids

To generate the mutated forms of ARHGAP19 described in this study, the plasmid encoding inducible GFP-ARHGAP19 (David et al., 2014) was used as a template for site-directed mutagenesis (QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit from Stratagene, La Jolla, CA) together with appropriate primers bearing threonine to alanine, or serine to alanine codon changes. To generate the plasmid allowing inducible Cherry-ROCK2A expression, the ROCK2A DNA sequence (Sebbagh et al., 2005) was inserted in frame in the pmCherry-C1 plasmid (Clontech). The CMV promoter was then replaced by an AseI-SacI sequence containing the six tetracyclin responsive elements and the minimal CMV promoter from pTRIPZ (Open Biosystem).

In vitro assays

For kinase assays, 2 μ g of GST-ARHGAP19 recombinant proteins (David et al., 2014) was affinity purified on glutathione-Sepharose beads (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) and incubated with 0.16 U active Cdk1-CyclinB (Millipore, Billerica, MA) in 40 μ l kinase buffer (20 mM MOPS pH 7.2, 20 mM β -glycerophosphate, 0.1 mM Na_2VO_4 , 20 mM MgCl_2 , 2 mM DTT, 50 μ M ATP) for 30 min at 30°C. After poly-acrylamide gel electrophoresis and protein transfer onto PVDF membranes, the presence of phosphorylated proteins was assessed using the indicated anti-phospho antibodies.

Dephosphorylation was performed for 30 min at 30°C with 12 U recombinant PP1 phosphatase (P0754S, NEB).

In vitro GAP assay

Doxycyclin-treated GFP-ARHGAP19 Kit225 cells (expressing either the WT or the T404A/S422A/T476A mutant) were synchronized in G2 or prometaphase by treatment with RO3306 (9 μ g/ml) or nocodazole (40 ng/ml) for 20 h and 16 h, respectively. GFP-ARHGAP19 was then immunoprecipitated using GFP-Trap[®] beads (Chromotek GMBH, Planegg-Martinsried, Germany) and incubated in the presence of recombinant GTPases (His-tagged RhoA, Rac1 or Cdc42) and GTP, in an optimized buffer provided by Cytoskeleton (Denver, CO). The inorganic phosphate release resulting from the GTPase-dependent hydrolysis of GTP is then measured through a colorimetric assay, according to the manufacturer's instructions. Mock GFP-Trap[®] immunoprecipitates from cells that do not express GFP-ARHGAP19, which were processed in parallel, were used to assess intrinsic GTP hydrolysis in the absence of the GAP. Data are expressed as a ratio of the inorganic phosphate released in ARHGAP19-containing samples over that released in mock GFP-Trap[®] immunoprecipitate-containing controls.

Antibodies

Rabbit SY1985 anti-ARHGAP19 antibody was produced in-house and used at 1 μ g/ml. Rabbit anti-phospho-S422, rabbit anti-phospho-T404 and rabbit anti-phospho-T476 antibodies were produced and purified by ProteoGenix (Schiltigheim, France), using phosphorylated peptides as immunogens, and were used at 1 μ g/ml. Rabbit anti-Cyclin B1 (1:1000, sc-752), mouse anti-pan 14-3-3 (1:100, sc-1657), goat anti-ROCK2 (1 μ g/ml, sc-1851) and mouse anti-HSC70 (1:2000, sc-7298) were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Rabbit anti-mCherry (1:1000, ab183628) and mouse anti-mCherry (1:1000, ab125096) were from Abcam (Cambridge, UK). Rabbit anti-AKT (1:2000, 9272), rabbit anti-phospho-Thr18/Ser19-MLC2 (1:1000, 3674), mouse anti-phospho-Thr/Pro (1:5000, 9391) were from Cell Signaling Technology (Ipswich, MA). Goat anti-GST antibody (1:1000,

GE27-4577-01) was from Pharmacia Biotech (Uppsala, Sweden). Rabbit anti-phospho-Ser473-AKT (1:2000, 05-1003) was from Merck Millipore. Rabbit anti-phospho-Ser1366-ROCK2 (1 μ g/ml, GTX-122651) was from GeneTex (Irvine, CA). Horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-mouse-IgG anti-rabbit-IgG and anti-goat-IgG secondary antibodies were purchased from GE Healthcare (Uppsala, Sweden), Cell Signaling Technology (Ipswich, MA) and Dako (A/S, Denmark), respectively. The secondary antibody used for microscopy, conjugated to Alexa Fluor 488 was from Molecular Probes (Eugene, OR).

Immunoprecipitation and western blotting

For immunoprecipitation of GFP-ARHGAP19, GFP-trap_A (Chromotek) and 1 mg of whole-cell lysates were used as described in David et al. (2014). Poly-acrylamide gel electrophoresis, transfer onto PVDF membranes (GE Healthcare) and western blots were performed according to standard procedures. All western blots shown are representative of at least three independent experiments.

Microscopy on fixed cells

Lymphocytes were fixed (in suspension) for 10 min using a solution of 10% trichloroacetic acid in water at 4°C and then processed as described in David et al. (2014). Images of optical sections were acquired using a Zeiss AxioImager Z1 fluorescence upright microscope (Zeiss, Jena, Germany) equipped with motorized Z drive, apotome and a 63 \times /1.40 NA oil M27 objective, and the AxioVision Zeiss software. The illumination settings and acquisition parameters used (including the linear mode) were kept constant to allow faithful comparisons of the fluorescence intensities between cells. Images processing (cropping) and quantifications were performed with ImageJ software. Fluorescence data were analyzed using the Prism software and statistical significance was calculated with Student's *t*-test and denoted as **P*<0.05, ***P*<0.01, ****P*<0.0001. Contrast settings of the representative images shown in Fig. 4B were minimum and maximum adjusted (linear processing) for a better display.

Flow cytometry

For multinucleation assays, GFP-ARHGAP19 expression was induced by 1 μ g/ml doxycyclin for 48 h. At 1 h before analysis with the cytometer BD LSRFortessa[™], cells were labeled at 37°C with 10 μ g/ml of Hoechst 33342 (B2261, Sigma). Fluorescence data from three independent experiments were analyzed using the Prism program and statistical significance was calculated with Student's *t*-test and denoted as **P*<0.05, ***P*<0.01, ****P*<0.0001.

Acknowledgements

We thank Khadija Kouyate for expert technical assistance. This work has benefited from the facilities and expertise of the Imaging and Cytometry Platform (Yann Lecluse and Philippe Rameau, UMS AMMICA, Gustave Roussy Cancer Campus, Villejuif, France).

Competing interests

The authors declare no competing or financial interests.

Author contributions

Conceptualization: J.B., M.D.D.; Methodology: C.M., D.P. M.D.D.; Validation: C.M., D.P., M.D.D.; Formal analysis: C.M., D.P., M.D.D.; Investigation: C.M., D.P., M.D.D.; Writing - original draft: C.M., D.P., M.D.D.; Writing - review & editing: J.B., M.D.D.; Supervision: J.B., M.D.D.

Funding

This work was supported by institutional grants from Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) and, in its early phase, by a grant from Ligue Contre le Cancer (équipe labellisée to J.B.). C.M. was supported by doctoral grants from Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (MESR) and Ligue Contre le Cancer.

Supplementary information

Supplementary information available online at <http://jcs.biologists.org/lookup/doi/10.1242/jcs.208397.supplemental>

References

Aitken, A. (1996). 14-3-3 and its possible role in co-ordinating multiple signalling pathways. *Trends Cell Biol.* **6**, 341-347.

- Birkenfeld, J., Nalbant, P., Bohl, B. P., Pertz, O., Hahn, K. M. and Bokoch, G. M. (2007). GEF-H1 modulates localized RhoA activation during cytokinesis under the control of mitotic kinases. *Dev. Cell* **12**, 699-712.
- Chircop, M. (2014). Rho GTPases as regulators of mitosis and cytokinesis in mammalian cells. *Small GTPases* **5**, e29770.
- David, M., Petit, D. and Bertoglio, J. (2012). Cell cycle regulation of Rho signaling pathways. *Cell Cycle* **11**, 3003-3010.
- David, M. D., Petit, D. and Bertoglio, J. (2014). The RhoGAP ARHGAP19 controls cytokinesis and chromosome segregation in T lymphocytes. *J. Cell Sci.* **127**, 400-410.
- Feng, Y., LoGrasso, P. V., Defert, O. and Li, R. (2016). Rho Kinase (ROCK) inhibitors and their therapeutic potential. *J. Med. Chem.* **59**, 2269-2300.
- Fernández-Orth, J., Ehling, P., Ruck, T., Pankratz, S., Hofmann, M.-S., Landgraf, P., Dieterich, D. C., Smalla, K.-H., Kähne, T., Seebohm, G. et al. (2017). 14-3-3 Proteins regulate K2P 5.1 surface expression on T lymphocytes. *Traffic* **18**, 29-43.
- Gohla, A. and Bokoch, G. M. (2002). 14-3-3 regulates actin dynamics by stabilizing phosphorylated cofilin. *Curr. Biol.* **12**, 1704-1710.
- Hall, A. (2012). Rho family GTPases. *Biochem. Soc. Trans.* **40**, 1378-1382.
- Hara, T., Abe, M., Inoue, H., Yu, L.-R., Veenstra, T. D., Kang, Y. H., Lee, K. S. and Miki, T. (2006). Cytokinesis regulator ECT2 changes its conformation through phosphorylation at Thr-341 in G2/M phase. *Oncogene* **25**, 566-578.
- Hausser, A., Link, G., Hoene, M., Russo, C., Selchow, O. and Pfizenmaier, K. (2006). Phospho-specific binding of 14-3-3 proteins to phosphatidylinositol 4-kinase III beta protects from dephosphorylation and stabilizes lipid kinase activity. *J. Cell Sci.* **119**, 3613-3621.
- Hirose, K., Kawashima, T., Iwamoto, I., Nosaka, T. and Kitamura, T. (2001). MgcRacGAP is involved in cytokinesis through associating with mitotic spindle and midbody. *J. Biol. Chem.* **276**, 5821-5828.
- Kamijo, K., Ohara, N., Abe, M., Uchimura, T., Hosoya, H., Lee, J.-S. and Miki, T. (2006). Dissecting the role of Rho-mediated signaling in contractile ring formation. *Mol. Biol. Cell* **17**, 43-55.
- Lindon, C. (2008). Control of mitotic exit and cytokinesis by the APC/C. *Biochem. Soc. Trans.* **36**, 405-410.
- Liot, C., Seguin, L., Siret, A., Crouin, C., Schmidt, S. and Bertoglio, J. (2011). APC(cdh1) mediates degradation of the oncogenic Rho-GEF Ect2 after mitosis. *PLoS ONE* **6**, e23676.
- Maddox, A. S. and Burridge, K. (2003). RhoA is required for cortical retraction and rigidity during mitotic cell rounding. *J. Cell Biol.* **160**, 255-265.
- Mertins, P., Qiao, J. W., Patel, J., Udeshi, N. D., Clauser, K. R., Mani, D. R., Burgess, M. W., Gillette, M. A., Jaffe, J. D. and Carr, S. A. (2013). Integrated proteomic analysis of post-translational modifications by serial enrichment. *Nat. Methods* **10**, 634-637.
- Ramachandran, C., Patil, R. V., Combrink, K., Sharif, N. A. and Srinivas, S. P. (2011). Rho-Rho kinase pathway in the actomyosin contraction and cell-matrix adhesion in immortalized human trabecular meshwork cells. *Mol. Vis.* **17**, 1877-1890.
- Sebbagh, M., Hamelin, J., Bertoglio, J., Solary, E. and Bréard, J. (2005). Direct cleavage of ROCK II by granzyme B induces target cell membrane blebbing in a caspase-independent manner. *J. Exp. Med.* **201**, 465-471.
- Seguin, L., Liot, C., Mzali, R., Harada, R., Siret, A., Nepveu, A. and Bertoglio, J. (2009). CUX1 and E2F1 regulate coordinated expression of the mitotic complex genes Ect2, MgcRacGAP, and MKLP1 in S phase. *Mol. Cell Biol.* **29**, 570-581.
- Su, L., Agati, J. M. and Parsons, S. J. (2003). p190RhoGAP is cell cycle regulated and affects cytokinesis. *J. Cell Biol.* **163**, 571-582.
- Takizawa, C. G. and Morgan, D. O. (2000). Control of mitosis by changes in the subcellular location of cyclin-B1-Cdk1 and Cdc25C. *Curr. Opin. Cell Biol.* **12**, 658-665.
- Tatsumoto, T., Xie, X., Blumenthal, R., Okamoto, I. and Miki, T. (1999). Human ECT2 is an exchange factor for Rho GTPases, phosphorylated in G2/M phases, and involved in cytokinesis. *J. Cell Biol.* **147**, 921-928.
- Tripathi, B. K., Qian, X., Mertins, P., Wang, D., Papageorge, A. G., Carr, S. A. and Lowy, D. R. (2014). CDK5 is a major regulator of the tumor suppressor DLC1. *J. Cell Biol.* **207**, 627-642.
- Wu, D., Asiedu, M., Adelstein, R. S. and Wei, Q. (2006). A novel guanine nucleotide exchange factor MyoGEF is required for cytokinesis. *Cell Cycle* **5**, 1234-1239.
- Yaffe, M. B., Rittinger, K., Volinia, S., Caron, P. R., Aitken, A., Leffers, H., Gambliin, S. J., Smerdon, S. J. and Cantley, L. C. (1997). The structural basis for 14-3-3: phosphopeptide binding specificity. *Cell* **91**, 961-971.
- Yoshizaki, H., Ohba, Y., Parrini, M.-C., Dulyaninova, N. G., Bresnick, A. R., Mochizuki, N. and Matsuda, M. (2004). Cell type-specific regulation of RhoA activity during cytokinesis. *J. Biol. Chem.* **279**, 44756-44762.
- Zanin, E., Desai, A., Poser, I., Toyoda, Y., Andree, C., Moebius, C., Bickle, M., Conradt, B., Plekny, A. and Oegema, K. (2013). A conserved RhoGAP limits M phase contractility and coordinates with microtubule asters to confine RhoA during cytokinesis. *Dev. Cell* **26**, 496-510.

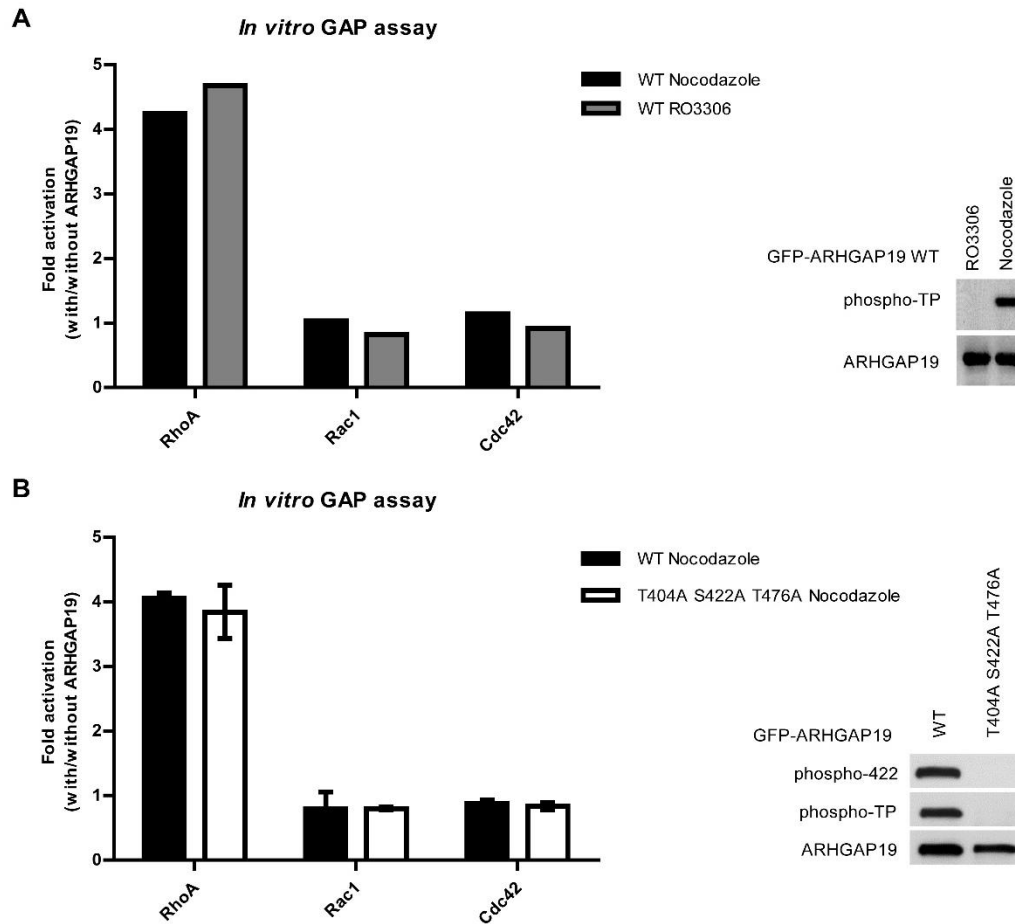


Fig. S1 shows that phosphorylation of ARHGAP19 does not affect its activity as a GAP for RhoA.

Fig. S1: *In vitro* GAP Assay: GFP-ARHGAP19 was immunoprecipitated using GFP-Trap[®] beads from doxycyclin-induced GFP-ARHGAP19-expressing Kit225 cells treated with RO3306 or nocodazole (A) or the WT and the triple A GFP-ARHGAP19 mutant in nocodazole arrested cells (B). Mock GFP-Trap[®] immunoprecipitates from cells that do not express GFP-ARHGAP19 was used to assess intrinsic GTP hydrolysis in the absence of GAP. GAP assay was performed by measuring inorganic phosphate release from GTP-loaded small GTPases as indicated. Fold activation represents the ratio of inorganic phosphate (iP) release in the presence of ARHGAP19 over iP release in its absence. Results are shown as the mean \pm SEM of three independent experiments. Immunoprecipitates were analyzed by western blotting with the phospho-specific antibodies (right hand side).

Titre Régulation d'une nouvelle GAP de RhoA, ARHGAP19, dans la division des lymphocytes T humains et rôle dans l'hématopoïèse murine

Mots clés : RhoGTPases, RhoGAP, mitose, ROCK et CDK1, hématopoïèse murine, LT

Résumé : L'équipe a identifié une nouvelle GAP de RhoA, ARHGAP19, majoritairement exprimée dans le système hématopoïétique. Le projet a consisté à étudier la régulation de cette protéine dans des lymphocytes T humains. Pour cela, les analyses se sont portées sur la phosphorylation d'ARHGAP19 et sur sa localisation au cours de la division des lymphocytes T. ARHGAP19 est phosphorylée par l'effecteur de RhoA, la protéine kinase ROCK, sur la Sérine 422 et par la protéine kinase mitotique CDK1 sur les Thréonines 404 et 476. La phosphorylation par ROCK permet à ARHGAP19 d'interagir avec la famille de protéines 14-3-3 qui la protège des déphosphorylations pouvant avoir lieu au cours de la division cellulaire. L'ensemble des phosphorylations est primordial pour la régulation de la localisation cellulaire d'ARHGAP19 et contribue à une division cellulaire correcte. En effet, en absence de phosphorylation, on observe des défauts lors de la cytodivision entraînant la formation de cellules multinucléées.

De plus, des dérégulations de RhoGTPases comme l'absence de GAP, sont aujourd'hui mises en évidence dans les cancers. C'est pourquoi nous avons généré des souris *arhgap19* KO pour étudier les conséquences de l'absence du gène codant pour ARHGAP19, dans le système hématopoïétique murin. L'ensemble des cellules progénitrices et matures intervenant dans l'hématopoïèse murine a été analysé. Par ce modèle d'inactivation conditionnelle d'*arhgap19*, aucun rôle majeur de la protéine n'a été mis en évidence mais les résultats suggèrent une implication aux différents stades de la différenciation hématopoïétique et un impact sur l'ensemble des populations de ce système.

Title : Regulation of a novel GAP of RhoA, ARHGAP19, in the division of human T-cell and role in murine hematopoiesis

Keywords : RhoGTPases, RhoGAP, mitosis, ROCK and CDK1, murine hematopoiesis, LT

Abstract : The team identified a new GAP of RhoA, ARHGAP19, mostly expressed in the hematopoietic system. The project consisted in studying the regulation of this protein in human T lymphocytes. For this, the analyzes focused on the phosphorylation of ARHGAP19 and on its localization during the division of the T lymphocytes. ARHGAP19 is phosphorylated by the effector of RhoA, the protein kinase ROCK, on the Serine 422 and by the protein CDK1 mitotic kinase on Threonines 404 and 476. ROCK phosphorylation allows ARHGAP19 to interact with the 14-3-3 family of proteins that protects it from dephosphorylations that occur during cell division. All phosphorylations are essential for regulating the subcellular localization of ARHGAP19 and contribute to correct cell division. Indeed, in the absence of phosphorylation, defects are observed during cytokinesis resulting in the formation of multinucleate cells.

In addition, deregulation of RhoGTPases, such as the absence of GAP, are now highlighted in cancers. This is why we generated *arhgap19* KO mice to study the consequences of the absence of the gene coding for ARHGAP19, in the murine hematopoietic system. All progenitor and mature cells involved in murine hematopoiesis were analyzed. By this model of conditional inactivation of *arhgap19*, no major role of the protein has been demonstrated but the results suggest an involvement at different stages of hematopoietic differentiation and an impact on all cell sub-populations of this system.

