



HAL
open science

Rôles d'Arpin dans la migration cellulaire et la réparation de l'ADN

Gleb Simanov

► **To cite this version:**

Gleb Simanov. Rôles d'Arpin dans la migration cellulaire et la réparation de l'ADN. Biologie cellulaire. Institut Polytechnique de Paris, 2021. Français. NNT : 2021IPPAX064 . tel-03767526

HAL Id: tel-03767526

<https://theses.hal.science/tel-03767526v1>

Submitted on 2 Sep 2022

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.

Rôles d'Arpin dans la migration cellulaire et la réparation de l'ADN

Thèse de doctorat de l'Institut Polytechnique de Paris
préparée à l'École Polytechnique

École doctorale n°626 de l'Institut Polytechnique de Paris (ED IPP)
Spécialité de doctorat : biologie

Thèse présentée et soutenue à Palaiseau, le 27 septembre 2021, par

Gleb Simanov

Composition du Jury :

Arnaud Echard Directeur de Recherche CNRS, UMR 3691, Dynamique cellulaire physiologique et pathologique Trafic membranaire et division cellulaire, Institut Pasteur	Président
Julie Gavard Directrice de Recherche CNRS, UMR_S 1232, Signalisation oncogénique, angiogenèse, et perméabilité, Centre de Recherche en Cancérologie et Immunologie Nantes-Angers	Rapporteur
Philippe Chavrier Directeur de Recherche CNRS, UMR 144, Biologie cellulaire et cancer, Dynamique de la membrane et du cytosquelette, Institut Curie	Rapporteur
Christine Tran-Quang Chargée de Recherche Inserm, UMR 1278, Biologie de l'ARN, signalisation et cancer, Institut Curie	Examineur
Alexis Gautreau Directeur de Recherche CNRS, UMR 7654, Biologie structurale de la cellule, Cytosquelette et morphogénèse cellulaire, l'École Polytechnique	Directeur de thèse

Rôles d'Arpin dans la migration cellulaire et la réparation de l'ADN

Sommaire

Liste d'abréviations	4
Introduction	6
I. Polymérisation de l'actine	7
1. Incorporation des monomères d'actine dans de filaments	7
2. Les protéines nucléatrices de l'actine	10
3. Activation du complexe Arp2/3	13
4. Rôle du complexe Arp2/3 dans le noyau.....	17
II. Régulation de l'activité d'Arp2/3 dans la migration cellulaire	20
1. Modes de migration cellulaire	20
2. Polarité cellulaire et initiation de la migration	24
3. Régulation négative du complexe Arp2/3 au lamellipode	26
4. Arpin contrôle la persistance de migration.....	28
Objectifs de la thèse.....	32
Résultats	34
I. Arpin Regulates Migration Persistence by Interacting with Both Tankyrases and the Arp2/3 Complex.....	35
II. Arpin se lie à la sous-unité Arp3 du complexe Arp2/3 via le motif A et l'hélice C.....	42
III. The Arp2/3 inhibitory protein Arpin inhibits homology-directed recombination.....	50
Discussion	66
I. Interaction d'Arpin avec Arp2/3 et la régulation de migration.....	67
1. Arpin régule la persistance de la migration via deux voies indépendantes.....	67
2. Arpin est capable d'empêcher la condensation des Tankyrases	68
3. Arpin se lie à Arp2/3 via la sous-unité Arp3 grâce à ses 2 motifs, C et A.....	68
II. Nouveau rôle d'Arpin dans la régulation de réparation d'ADN.....	70
1. La déplétion d'Arpin augmente l'efficacité de la réparation d'ADN par HDR	70
2. Les cassures d'ADN dans le contexte de migration.....	71
Conclusions	72
Références	73
Annexe	88
LIMCH1, un nouveau suppresseur de tumeurs et senseur de l'état d'actine branchée au cortex ..	88
Remerciements.....	108

Liste d'abréviations

53BP1	p53 binding protein 1
ADF	Actin Depolymerization Factor
ADP	Adenosine diphosphate
Arp	Actin Related Protein
Arp2/3	Actin-related protein 2 and 3
ATP	Adenosine triphosphate
Cdc42	Cell division control protein 42 homolog
ECM	Extra Cellular Matrix
EGF	Epidermal growth factor
GAP	GTPase-activating protein
GDP	Guanosine diphosphate
GEF	Guanine nucleotide exchange factor
GMF	Glia Maturation Factor
GTP	Guanosine triphosphate
HDR	Homology-directed recombination
JMY	Junction-Mediating and regulatory protein
MMEJ	Microhomology End Joining
MLC	Myosin Light Chain
NHEJ	Non-homologous End Joining
NPF	Nucleation Promoting Factor
PAK	p21-activated kinase
PDGF	Platelet-derived growth factor
PI3K	Phosphatidyl inositol-3-kinase
PICK1	Protein Interacting with C-Kinase
PIP2	Phosphatidylinositol (4,5) Diphosphate
PIP3	Phosphatidylinositol (3,4,5) Triphosphate
PRD	Proline Rich Domain
Rac1	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
RhoA	Ras homolog family member A
ROCK	Rho-associated protein kinase
SCAR	Suppressor of cAR
WASH	Wiskott-Aldrich Syndrom Protein and Scar Homolog
WASP	Wiskott-Aldrich Syndrom Protein
WAVE	WASP family Verprolin Homologous Protein
WCA	WH2, Connecting Region, Acidic domain
WDR63	WD repeat-containing protein 63
WH2	WASP homology domain 2
WHAMM	WASP homologue associated with actin, membranes and microtubules

Introduction

I. Polymérisation de l'actine

La motilité, la division, l'établissement de la polarité et la morphogenèse cellulaire sont des processus biologiques fondamentaux, dont la défaillance entraîne des anomalies du développement, des déficiences immunitaires et diverses formes de cancer. Ces processus sont rendus possibles grâce à l'assemblage et au désassemblage étroitement régulés de son cytosquelette. Les filaments d'actine, les microtubules et les filaments intermédiaires sont les trois types de polymères de propriétés variables qui constituent le cytosquelette cellulaire.

Au cœur de la migration, de l'endocytose et de la cytokinèse cellulaire, les réseaux des filaments d'actine sont des structures hautement dynamiques qui remplissent une multitude des fonctions spécifiques (Blanchoin et al. 2014). La dynamique de l'actine est finement régulés par tout un ensemble de protéines régulatrices (Molinie and Gautreau 2017; Schaks, Giannone, and Rottner 2019). En outre, les moteurs moléculaires associés aux filaments d'actine, les myosines, sont capables de générer les forces au long de filaments (Vicente-Manzanares et al. 2009). Ainsi, les myosines permettent de transformer les réseaux des filaments d'actine et générer les forces contractiles cellulaires.

1. Incorporation des monomères d'actine dans les filaments

L'actine est une protéine très conservée au cours de l'évolution et exprimée de manière abondante chez les eucaryotes. Les monomères d'actine sont des protéines globulaires de 42kDa (actine-G) qui sont capables de polymériser spontanément *in vitro* et de former un filament (actine-F) constitué de deux hélices enroulées (Pollard 2016) (Figure 1). Le monomère d'actine se lie à l'ATP ou à l'ADP, avec une affinité moindre (Kabsch et al. 1990). La réaction de la polymérisation est limitée par l'étape d'initiation très lente. En effet, à cause de l'affinité faible entre monomères, les dimères d'actine sont instables et ne sont stabilisés que par l'addition d'un troisième monomère qui permet de créer un « noyau » (Sept and McCammon 2001). Une fois cette étape de nucléation (formation du noyau) terminée, le polymère peut croître par ajouts consécutifs de monomères d'actine. On parle alors d'élongation du filament. Le filament d'actine est polarisé avec une extrémité + (appelée bout barbé) et une extrémité – (appelée bout pointu). L'addition de monomères d'actine est dix fois plus rapide à l'extrémité barbée qu'à l'extrémité pointue (Kuhn and Pollard 2005). Une fois que le monomère d'actine est incorporé dans le filament, l'ATP de l'actine est lentement hydrolysée et reste dans la forme intermédiaire ADP-P_i jusqu'à la libération du phosphate. C'est donc essentiellement de l'actine-ATP qui est polymérisée à l'extrémité barbée et de l'actine-ADP qui est dépolymérisée. (M. F. Carlier and Pantaloni 1986). La polymérisation d'actine est spontanée dans les bonnes conditions. L'hydrolyse de l'ATP ne fournit donc pas l'énergie à la réaction de polymérisation, mais fournit une sorte de minuteur intrinsèque qui renseigne sur l'âge du filament. Dans le cytoplasme, la molécule d'ADP liée à l'actine-G est échangée pour de l'ATP et ainsi le monomère d'actine est prêt à réintégrer le filament. A l'état d'équilibre, cette élongation de l'extrémité barbée équilibrée par la dissociation de monomères de l'extrémité pointue a été appelé « tapis roulant », ou treadmilling en anglais (Svitkina and Borisy 1999; Pollard 2007).

La dynamique de l'actine dans la cellule est différente des réactions qui se déroulent dans une expérience *in vitro*. Cette différence est due aux multiples protéines qui contrôlent la vitesse d'assemblage, le taux de renouvellement et la longueur des filaments d'actine dans des compartiments cellulaires différents.

La profiline se lie au monomère d'actine et accélère la réaction d'échange de l'ADP en l'ATP. La profiline favorise l'incorporation des monomères d'actine à l'extrémité barbée de filament mais empêche complètement leur incorporation à l'extrémité pointue. D'autre part, la profiline inhibe la nucléation spontanée de nouveaux filaments (Figure 1) (Pantaloni and Carlier 1993; Theriot and Mitchison 1993). Ayant une plus forte affinité pour l'actine-G/ATP, la profiline permet de garder la plupart de monomères d'actine prêts pour la polymérisation des filaments (Pollard, Blanchoin, and Mullins 2000; Pollard 2016).

Le renouvellement des filaments est régulé par les protéines de la famille ADF/cofiline (Actin Depolymerizing Factor) permettant d'accélérer leur désassemblage (Lappalainen and Drubin 1997; M.-F. Carlier et al. 1997). La cofiline se lie préférentiellement aux monomères d'actine et aux filaments d'actine sous forme ADP, donc « âgés » (Figure 1). Le filament est dépolymérisé via deux mécanismes : clivage du filament qui crée deux nouvelles extrémités et l'accélération de la dissociation des monomères de l'extrémité pointue (M.-F. Carlier et al. 1997). Les nouvelles extrémités peuvent aussi servir en tant que des nouveaux sites d'assemblage et renforcer la polymérisation.

Si toutes les extrémités barbées étaient accessibles de manière permanente pour la polymérisation, on aurait une déplétion rapide de la population d'actine-G. Dans la cellule, les extrémités barbées libres sont soumises à régulation par les protéines de coiffe (Edwards et al. 2014). La protéine de coiffe ubiquitaire (capping protein, CP) est un hétérodimère composé de deux sous-unités α et β qui occupe l'extrémité barbée du filament et empêche la dissociation et l'ajout des monomères d'actine (Wear and Cooper 2004). La dissociation de protéines de coiffe des extrémités barbées est très lente. Les molécules comme, par exemple, le Phosphatidyl 4,5- bisphosphate (PIP2) membranaire interagissent directement avec les protéines de coiffe et les inhibent en empêchant leur interaction avec les filaments (Schafer, Jennings, and Cooper 1996; Edwards et al. 2014). Également, les filaments peuvent être décoiffés activement (uncapping) par les protéines régulatrices contenant le motif CPI (capping protein interacting) comme par exemple, CARMIL, twinfiline ou FAM21, la sous-unité du complexe WASH (Yang et al. 2005; Hakala et al. 2021; Fokin et al. 2021).

Dans la cellule en mouvement, les protéines régulant la dynamique des filaments d'actine sont indispensables. En effet, l'absence de ces protéines régulatrices affecte l'architecture de l'actine dans la cellule, notamment, la formation des protrusions membranaires appelées lamellipodes, importantes pour la migration cellulaire dirigée. Ainsi, par exemple, la cofiline et la profiline jouent un rôle crucial dans le maintien de pool des monomères d'actine disponibles pour être rapidement intégré dans des filaments au sein d'une nouvelle protrusion (Kiuchi et al. 2007; Skruber et al. 2020). Les protéines de coiffe, ainsi que les protéines qui régulent l'interaction des protéines de coiffe avec l'extrémité barbée comme, par exemple, la twinfiline, déterminent la dynamique du lamellipode en contrôlant l'élongation de filaments d'actine (Hakala et al. 2021).

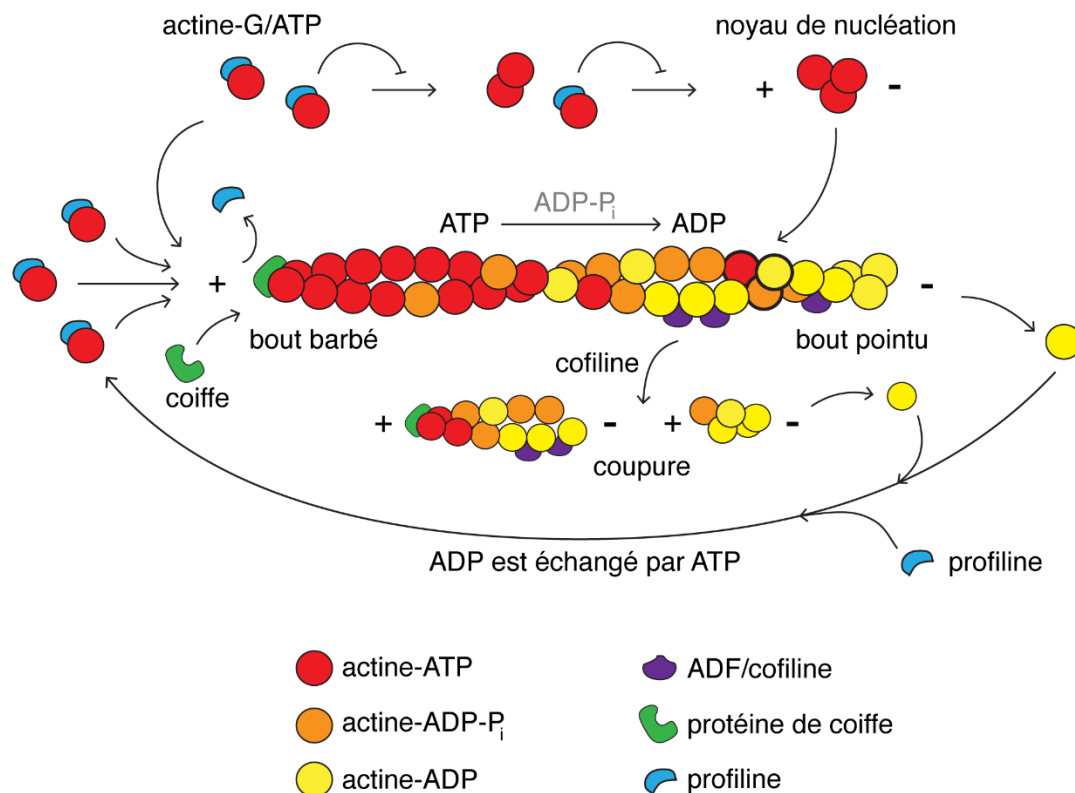


Figure 1. Dynamique de la polymérisation d'actine. Une fois qu'un noyau de nucléation trimérique est formé, le filament est rallongé par l'ajout consécutif des monomères d'actine liée à l'ATP à l'extrémité barbée. Au sein du filament l'actine « vieillit » progressivement en hydrolysant l'ATP et libérant le phosphate et finit par être dissociée à l'extrémité pointue. Les monomères d'actine-ADP sont rapidement liés par la profiline qui catalyse l'échange de l'ADP en l'ATP et permet la réintégration des monomères à l'extrémité barbée. Les filaments d'actine « âgés » sont reconnus par la cofiline qui provoque le clivage de filament en créant de nouvelles extrémités. Les protéines de coiffe régulent la polymérisation à l'extrémité barbée.

2. Les protéines nucléatrices de l'actine

La nucléation spontanée des filaments d'actine est une réaction cinétiquement extrêmement lente due à la faible affinité de deux monomères d'actine et inhibée par la liaison d'actine-G à la profiline (Pantaloni and Carlier 1993; Sept and McCammon 2001). Dans la cellule, les protéines nucléatrices permettent de passer cette étape limitante de nucléation en favorisant la polymérisation de filaments d'actine *de novo* (Campellone and Welch 2010). Les nucléateurs cellulaires, en fonction de leur mode d'action, sont capables de générer les filaments d'actine linaires ou branchés. Ayant des propriétés et des dynamiques variées, ces deux types de filaments remplissent une multitude de fonctions différentes dans la cellule et peuvent collaborer au sein d'un même processus cellulaire comme, par exemple, la migration. Les filaments linaires d'actine sont essentiels à la contractilité cellulaire, tandis que l'actine branchée est un acteur clé de remodelage des membranes cellulaires. Sachant que la formation d'une nouvelle branche nécessite un filament préexistant, la polymérisation d'actine branchée requiert généralement qu'un filament linaire soit polymérisé par des nucléateurs spécifiques en amont.

Le premier nucléateur d'actine découvert est **le complexe Arp2/3** composé de sept sous-unités très conservées, y compris deux sous-unités apparentées à l'actine, Arp2 et Arp3 (actin related protein, Arp) (L M Machesky et al. 1994). Le complexe Arp2/3 exerce trois fonctions majeures : la nucléation d'un nouveau filament orienté à 70% par rapport au filament préexistant (Blanchoin et al. 2000), la génération du réseau d'actine branché et la protection de l'extrémité pointue contre la dépolymérisation (Egile et al. 2005). Le complexe Arp2/3, par les réseaux branchés qu'il génère, participe à une multitude de processus qui nécessitent une force de poussée (Rotty, Wu, and Bear 2013). Le complexe Arp2/3 est essentiellement inactif dans sa conformation initiale (Rodal et al. 2005). Dans la cellule, de nombreux NPFs (nucleation promoting factor) peuvent l'activer. Les NPFs induisent le changement de conformation qui repositionne les sous-unités Arp2 et Arp3 en imitant le dimère d'actine dans un filament (Figure 2). Ce changement de conformation est une étape cruciale puisque les drogues qui l'empêchent inhibent l'initiation d'un nouveau filament (Nolen et al. 2009; Hetrick et al. 2013). Il a été rapporté que le complexe Arp2/3 possède deux sites d'interaction avec les NPFs et son activation complète nécessite deux interactions (Padrick et al. 2011; Boczkowska et al. 2014). Une étude récente (Zimmet et al. 2020) montre que chacun de deux sites d'interaction avec des NPFs joue un rôle différent. Le premier NPF se lie aux sous-unités Arp2-ArpC1 (site de forte affinité). Cette interaction suffirait pour induire le changement de conformation imitant le dimère d'actine et fournirait le premier monomère d'actine mais elle ne suffit pas pour l'activation complète du complexe. Le déplacement d'Arp2 permet ensuite de libérer la face barbée d'Arp3, engager le deuxième NPF sur Arp3 et d'initier la polymérisation. Une fois que la polymérisation est initiée, les NPFs se détachent d'Arp2/3.

Pour pouvoir créer des nouvelles branches le complexe Arp2/3 nécessite un filament préexistant. Ce filament peut être engendré par un autre complexe Arp2/3 activé. En outre, dans la cellule, il existe plusieurs familles de nucléateurs capables de générer des filaments linaires. Par exemple, les protéines nucléatrices Spire, Cordon-bleu et JMY possèdent plusieurs domaines WASp Homology 2 motif (WH2) capables de lier les monomères d'actine (Campellone and Welch 2010). Ces protéines peuvent ainsi elles-mêmes créer le

noyau de nucléation. D'autres nucléateurs de la famille WISH/DIP/SPIN90 (WDS) génèrent des filaments linéaires grâce à l'interaction directe avec Arp2/3. Ces protéines nucléatrices sont capables de favoriser le changement de la conformation d'Arp2/3 et l'activer (Wagner et al. 2013; Shaaban, Chowdhury, and Nolen 2020).

En étant associé à l'extrémité pointue du filament, le complexe Arp2/3 le protège contre la dépolymérisation mais ne peut pas accélérer la croissance de l'extrémité barbée. Ce sont des facteurs d'élongation qui s'associent à l'extrémité barbée de filament et favorisent l'intégration de nouveaux monomères d'actine. Ainsi, les formines stabilisent le noyau d'actine et, restant attachés à l'extrémité barbée, permettent l'association de nouveaux monomères de manière processive, tout en empêchant les protéines de coiffe de bloquer le filament (Campellone and Welch 2010). Outre l'accélération de l'élongation des filaments branchés générés par le complexe Arp2/3, les formines remplissent d'autres fonctions importantes dans la cellule (Breitsprecher and Goode 2013). Par exemple, les formines permettent d'engendrer des filopodes, des protrusions membranaires sous-tendues par des faisceaux de filaments linéaires d'actine (Mattila and Lappalainen 2008). Les filopodes permettent aux cellules de sonder leur environnement et, par conséquent, jouent un rôle important dans de nombreux processus cellulaires comme la migration et l'établissement des adhérences au substrat. Un autre rôle central des formines est de polymériser les filaments d'actine qui forment l'anneau de contraction pendant la cytokinèse grâce aux moteurs myosines.

Les protéines de la famille Ena/VASP (Enabled/vasodilator-stimulated phosphoprotein) possèdent des domaines de liaison à l'actine-G, similaires au WH2 (Chesarone and Goode 2009). Ces protéines s'associent aux extrémités barbées des filaments et les protègent contre les protéines de coiffe tout en favorisant l'élongation (Barzik et al. 2005). Dans la cellule, les protéines Ena/VASP sont localisées aux adhérences focales, les jonctions cellule-cellule et à l'extrémité du lamellipode (Damiano-Guercio et al. 2020). La perte d'Ena/VASP affecte la dynamique de lamellipode et la migration cellulaire.

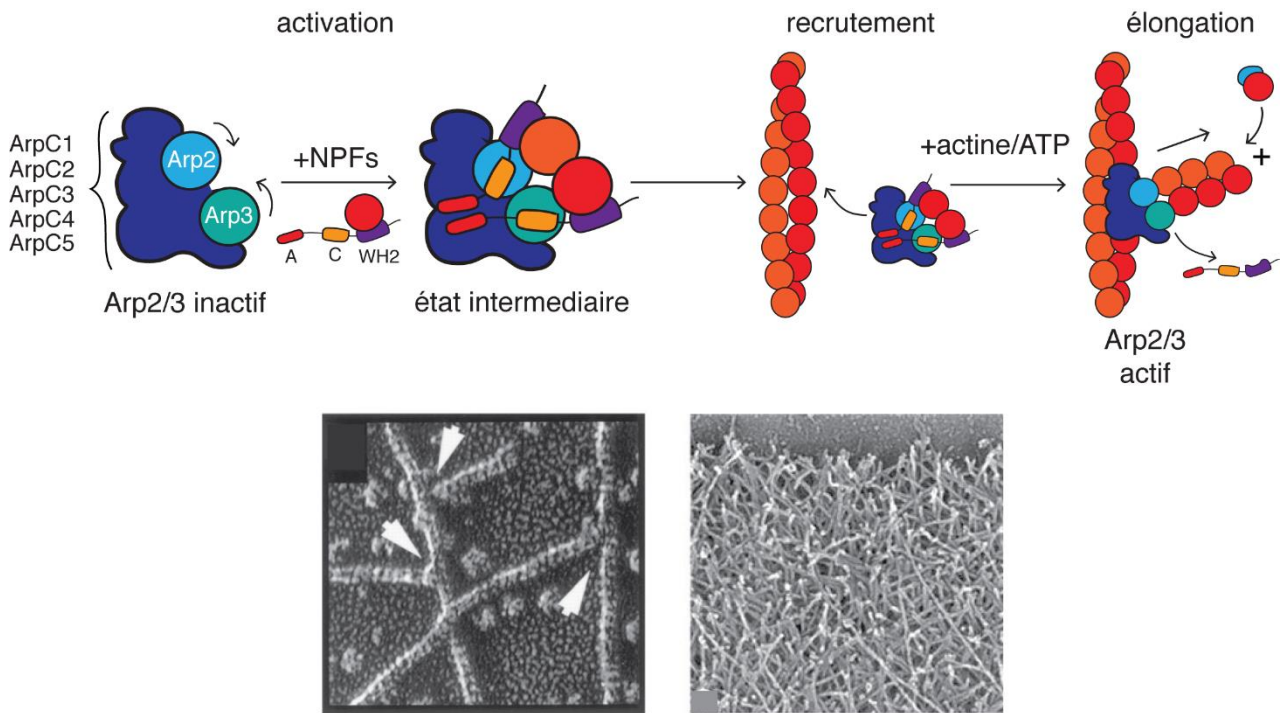


Figure 2. Polymérisation d'actine par le complexe Arp2/3. Le complexe Arp2/3 est activé par des NPFs et recruté sur un filament d'actine préexistant. Le changement de conformation d'Arp2/3 produit par les NPFs permet de créer un noyau de nucléation composé de deux sous-unités apparentées à l'actine, Arp2 et Arp3, et par des monomères d'actine amenés par les NPFs. En bas : images obtenues par microscopie électronique (EM) de la polymérisation des filaments branchés *in vitro* (à gauche, les flèches indiquent le complexe Arp2/3 sur le filament) et du réseau d'actine branché au cortex d'un kératocyte de poisson (à droite). Les images sont extraites de (Svitkina et al. 1997; Mullins, Heuser, and Pollard 1998).

3. Activation du complexe Arp2/3

La cellule utilise la force produite par la polymérisation du réseau d'actine branché pour remodeler ses membranes au cours de la migration et du trafic membranaire intérieur. Bien que la polymérisation d'actine branchée par Arp2/3 soit un phénomène universel partout dans la cellule, elle y est sous contrôle des activateurs NPFs localisés de manière spécifique (Molinie and Gautreau 2017). L'activité des NPFs est sous le contrôle de différents facteurs tels que les petites GTPases de la famille Rho et les phospholipides (Ridley 2015).

Les GTPases Rho sont au cœur de nombreux processus cellulaires et régulent, notamment, la dynamique du cytosquelette d'actine dans la migration cellulaire, l'endocytose, le trafic vésiculaire et la cytokinèse. Les GTPases Rho font partie d'une famille d'enzymes capables d'hydrolyser la guanosine triphosphate (GTP) en guanosine diphosphate (GDP). Selon le nucléotide lié, la conformation tridimensionnelle de la GTPase change. La GTPase liée au GTP est activée et recrutée aux membranes où elles interagissent avec leurs protéines effectrices comme les NPFs, WAVE et WASP pour Rac1 et Cdc42 respectivement, tandis que la GTPase liée au GDP est désactivée. L'activation des GTPases Rho est déclenchée par des stimuli extra- ou intracellulaires et leur activité est sous contrôle de trois types de régulateurs directs. Les facteurs d'échange de guanine (GEFs) activent les GTPases en favorisant l'échange de la GDP en GTP tandis que les GAPs (GTPase-activating proteins) les inhibent en catalysant l'hydrolyse de la GTP (Charest and Firtel 2006). Finalement, les GDIs (guanine-nucleotide dissociation inhibitors) sont capables d'empêcher l'interaction des GTPases avec les GEFs en les séquestrant dans le cytosol (Dovas and Couchman 2005).

Les protrusions membranaires au front d'avant de la cellule, les lamellipodes et les filopodes, sont principalement induites par l'action finement régulée des trois GTPases de la famille Rho - Rac1, Cdc42 et RhoA (Ridley 2011). Lors de la migration cellulaire, on peut attribuer de manière simplifiée un rôle particulier distant à chaque GTPase. Ainsi, Rac1 induit l'extension des lamellipodes, tandis que RhoA est requise pour la contraction de l'actomyosine plutôt à l'arrière de la cellule. Les GTPases Rac1 et Cdc42 activent également les kinases de la famille PAK jouant un rôle clé dans la promotion du renouvellement des adhérences cellulaires (Ridley 2015). Le rôle joué par les GTPases Rho dans l'établissement de la polarité et dans la migration dirigée sera détaillé dans la deuxième partie de l'introduction.

Du point de vue structural, tous les NPFs ont en commun un domaine d'homologie C-terminal appelé WCA (ou parfois VCA) qui est composé de trois motifs importants pour l'activation du complexe Arp2/3 et son activité de nucléation. Ces motifs sont les suivants – le(s) motif(s) W (WASp homology 2, **WH2**), le motif **C**onnecteur C et le motif **A**cide A à l'extrémité C-terminal. Les NPFs s'associent au complexe Arp2/3 grâce aux motifs C et A, cette interaction permet le changement de conformation du complexe (Goley et al. 2004; Rodal et al. 2005). Le motif W (WH2) interagit avec le monomère d'actine (Chereau et al. 2005) qui, ensemble avec les sous-unités apparentées à l'actine Arp2 et Arp3, rapprochées par le changement de conformation, forme un noyau de nucléation. Vu l'affinité du motif W pour le monomère d'actine, les NPFs

peuvent être séquestrés par les extrémités barbées de filaments d'actine. Cette interaction est sous contrôle de la protéine de coiffe qui, en empêchant l'association des NPFs aux extrémités barbées, stimule de manière indirecte leur activité envers Arp2/3 (Funk et al. 2021).

Le domaine WCA est nécessaire et suffisant pour l'activation d'Arp2/3 *in vitro* et la polymérisation du réseau d'actine branché (Laura M. Machesky et al. 1999). Les parties N-terminales des NPFs, quant à elles, sont requises pour la régulation spatio-temporelle de l'activité d'Arp2/3. Généralement, ces parties définissent comment le domaine WCA, essentiel pour l'activation d'Arp2/3, sera maintenu dans son état inactif (Rotty, Wu, and Bear 2013). Selon les domaines présents sur la partie N-terminale, les NPFs peuvent être classés en quatre familles capables d'activer Arp2/3 dans des endroits différents de la cellule et ainsi remplir des fonctions variées (Molinie and Gautreau 2017).

Les membres de la première famille sont les activateurs WASP et N-WASP (Wiskott-Aldrich Syndrome Protein). Ces activateurs sont repliés sur eux-mêmes et rendus inactifs dans leur état initial par des interactions intramoléculaires. L'auto-inhibition de N-WASP est abolie par la petite GTPase Cdc42 et le PIP2 de manière coopérative (Rohatgi et al. 1999; Prehoda et al. 2000; Rohatgi, Ho, and Kirschner 2000). Durant l'endocytose, N-WASP régule la polymérisation d'actine branchée autour de l'invagination de la membrane recouverte de clathrine qui permet l'élongation de l'invagination et la vésicularisation (Lu, Drubin, and Sun 2016).

Au lamellipode l'intégration de nouveaux monomères d'actine dans le réseau branché pousse la membrane plasmique et permet à la cellule d'avancer. Le complexe Arp2/3 y est recruté et activé par un complexe multiprotéique stable, appelé simplement **complexe WAVE** ou parfois **WAVE-Regulatory Complex WRC** (Hahne et al. 2001; B. Chen et al. 2014). Une protéine WAVE (WASP-family Verproline-homologous protein, appelée aussi SCAR) est incorporée dans le complexe et est représentée par WAVE2 qui est ubiquitaire et ses paralogues WAVE1 et 3 d'expression plus restreinte (Molinie and Gautreau 2017). Le complexe WAVE est composé de cinq sous-unités : CYFIP (aussi appelée SRA1 pour specifically Rac1-associated protein 1), NCKAP1, ABI, WAVE et BRK1 (Gautreau et al. 2004). Quatre de ces sous-unités sont codées par plusieurs gènes paralogues ce qui se traduit par 36 assemblages possibles du complexe WAVE qui ne sont pas tout à fait équivalents quant à leur régulation et activité (Derivery and Gautreau 2010). La protéine WAVE possède le domaine WCA à son extrémité C-terminale masqué par des interactions intramoléculaires au sein du complexe WAVE (Derivery, Lombard, et al. 2009) (Figure 3). La sous-unité CYFIP possède deux sites d'interaction avec la petite GTPase Rac1 et les deux interactions sont nécessaires pour lever l'inhibition du domaine WCA (Derivery and Gautreau 2010; B. Chen et al. 2017). L'activité du complexe WAVE est aussi régulée par le PIP3 et certains récepteurs membranaires (Oikawa et al. 2004; B. Chen et al. 2014), les chaînes lourdes de clathrine (Gautier et al. 2011). La phosphorylation des sous-unités du complexe représente un moyen supplémentaire de régulation de son activité permettant soit de la renforcer, soit de l'inhiber (Pocha and Cory 2009; Z. Chen et al. 2010). La régulation de la voie Rac1-WAVE-Arp2/3 qui permet de générer le réseau d'actine branché au lamellipode sera décrit en détail dans le chapitre II.

Le complexe WASH est un complexe pentamérique stable ayant une certaine ressemblance au complexe WAVE (Derivery, Sousa, et al. 2009; Jia et al. 2010). La protéine WASH (WASP and Scar Homolog) y est associée aux quatre sous-unités, Strumpelline, SWIP, FAM21 et CCDC53 (les cinq sous-unités sont parfois appelées WASHC de 1 à 5). Tout comme la protéine WAVE, la protéine WASH possède le domaine WCA à son extrémité C-terminale qui est masquée par des interactions intramoléculaires et peut être exposée suite aux signaux activateurs intégrés par le complexe (Hao et al. 2013; Dong et al. 2016) (Figure 3). Ainsi le complexe WASH est activé *in vitro* via l'ubiquitination de WASH par la E3 ligase MAGE-L2/TRIM27. La phosphorylation de la protéine WASH et son interaction avec les phospholipides phosphatidylinositol-3-phosphate (PI3P) et Phosphatidylinositol-4-phosphate (PI4P) sont également importantes pour l'activité du complexe (Dong et al. 2016; Tsarouhas et al. 2019). Le complexe WASH active Arp2/3 à la surface des endosomes où il est recruté via sa sous-unité FAM21 (Helfer et al. 2013). Récemment, le laboratoire d'accueil a montré qu'à la surface des endosomes la sous-unité FAM21 est capable de recruter le hétérodimère de la protéine de coiffe CP associé au mini filament Arp1/11 du complexe dynactine. Ainsi, le complexe WASH permet de décoiffer le mini filament Arp1/11 et de fournir le premier filament « père » nécessaire pour déclencher la polymérisation du réseau d'actine branché par Arp2/3 à la surface des endosomes (Fokin et al. 2021).

Bien que le complexe WASH ait l'organisation et les modes d'assemblage et d'activation similaires à ceux du complexe WAVE, le complexe WASH se différencie de WAVE par des interactions qu'il a avec des complexes associés aux microtubules (Fokin and Gautreau 2021). En effet, les endosomes sont orchestrés par la coopération de la machinerie associée aux filaments d'actine et aux microtubules. Le complexe WASH permet à ces machineries de collaborer.

D'autres activateurs identifiés, WHAMM et JMY, sont associées à l'appareil Golgi et au réticulum endoplasmique (ER). Ces activateurs sont impliqués dans le transport membranaire et l'apoptose (Campellone et al. 2008; Schlüter et al. 2014; V. L. King et al. 2021). De manière intéressante, JMY possède une séquence de localisation nucléaire (NLS) et est relocalisée dans le noyau suite à dommage de l'ADN (Zuchero, Belin, and Mullins 2012). Elle y sert en tant que co-activateur des facteurs de transcription, y compris de la protéine p53, inductrice de l'apoptose (Coutts and La Thangue 2006).

Tandis que la polymérisation d'actine et la régulation d'Arp2/3 dans le cytoplasme font l'objet de nombreuses études, la présence et les fonctions éventuelles de l'actine dans le noyau sont longtemps resté insaisissables et hypothétiques. Toutefois, les études récentes rapportent le développement de nouvelles approches permettant la visualisation de la polymérisation d'actine dans le noyau qui, tout comme la polymérisation d'actine dans le cytoplasme, dépend des nucléateurs, y compris du complexe Arp2/3. Le chapitre suivant sera consacré au rôle et à la régulation du complexe Arp2/3 dans le noyau.

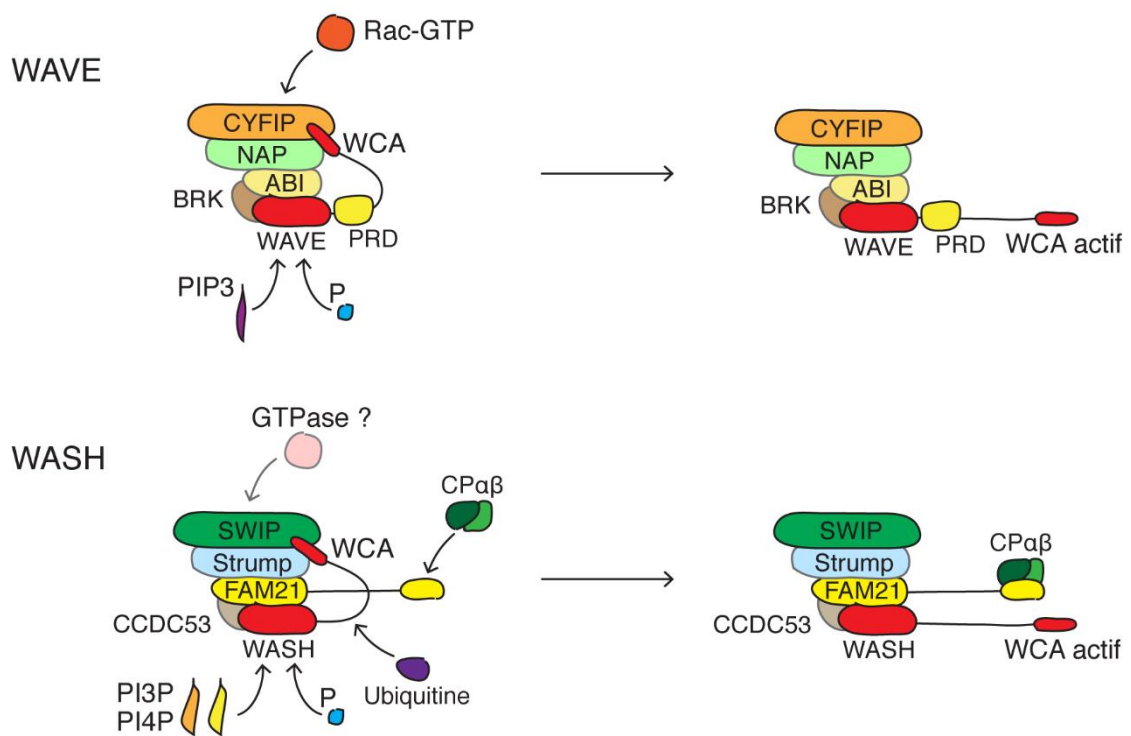


Figure 3. Activation des complexes WAVE et WASH, leurs structures et domaines essentiels. Les complexes WAVE et WASH présentent une ressemblance structurale. Ils sont composés de cinq sous-unités et possèdent un domaine WCA masqué par des interactions au sein du complexe. Leur activation permet d'exposer le domaine WCA. Leur recrutement dépend des modifications post-traductionnelles et nécessitent l'interaction avec les petites GTPases et les phospholipides.

4. Rôle du complexe Arp2/3 dans le noyau

Bien que l'actine soit polymérisée dans le cytoplasme, les monomères d'actine sont aussi activement transportés dans le noyau. Dans des conditions physiologiques, l'actine n'y forme pas de filaments stables visualisables par les techniques d'imagerie classiques comme le marquage avec la phalloïdine, par exemple (Grosse and Vartiainen 2013). Cependant, dans des conditions spécifiques, la polymérisation d'actine temporaire peut être saisie avec de la phalloïdine ou encore avec de nouvelles sondes fluorescentes spécifiques à l'actine, couplés à une séquence de localisation nucléaire (NLS) (Belin et al. 2013; Baarlink, Wang, and Grosse 2013; Plessner et al. 2015; Melak, Plessner, and Grosse 2017) (Figure 4).

Les fonctions de l'actine dans le noyau ont été tout d'abord associées aux monomères d'actine et différents complexes nucléaires dont les monomères d'actine font partie. Par exemple, les dimères que forme l'actine avec les protéines apparentées à l'actine Arp4-9 présentes dans le noyau ne peuvent pas servir en tant qu'un noyau de nucléation de filament mais forment des sous-unités de certains complexes impliqués dans la transcription et la réplication de l'ADN (Hurst, Shimada, and Gasser 2019).

La présence de différents régulateurs d'actine dans le noyau suggère que les polymères de structure variée peuvent y être assemblés. En effet, les molécules chimiques capables d'interrompre la polymérisation d'actine semblent d'empêcher certains processus nucléaires dépendants de l'actine comme, par exemple, la réparation d'ADN (Grosse and Vartiainen 2013). Des études rapportent la translocation du régulateur des formines, IQGAP1, et de l'activateur du complexe WAVE, Rac1, dans le noyau en réponse au stress qui survient lors de la réplication d'ADN (Johnson et al. 2013; Lamm et al. 2020). L'assemblage des filaments d'actine dans le noyau est induit suite au dommage d'ADN et dépend de la présence des formines et des nucléateurs Spire (Belin, Lee, and Mullins 2015).

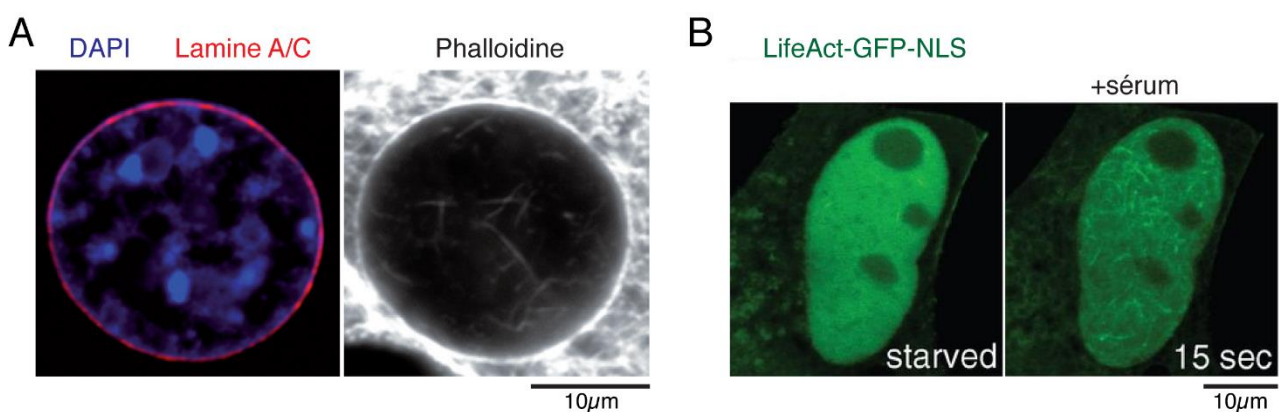


Figure 4. Les filaments d'actine nucléaires sont visualisés dans les cellules NIH 3T3 stimulées par le sérum. (A) Le marquage d'actine avec la phalloïdine (contrastée). Les images sont obtenues avec la microscopie confocale à fluorescence avec l'ADN en bleu, les lamines A/C en rouge. Extrait de (Grosse and Vartiainen 2013). (B) Les cellules ont été transfectées avec LifeAct-GFP-NLS, un peptide qui lie l'actine, fusionné avec la protéine fluorescente verte et la séquence de localisation nucléaire (NLS). Les images sont acquises avant et 15 s après la stimulation avec le sérum. Extrait de (Baarlink, Wang, and Grosse 2013).

Les cassures d'ADN double brin (DSB, pour double strand break) sont un type de dommages d'ADN particulièrement dangereux. Ces cassures doivent être prises en charge par la machinerie de la réparation de la cellule pour préserver l'intégrité du génome. Différentes signalisations sont déclenchées lors de la cassure d'ADN comme, par exemple, la phosphorylation sur la sérine-139 de l'histone H2AX (Mah, El-Osta, and Karagiannis 2010) ou encore le recrutement des protéines p53 et 53BP1 (p53 binding protein-1) (Williams and Schumacher 2016) qui sont habituellement utilisées en tant que marqueurs de DSBs.

Chez les eucaryotes, il existe plusieurs voies de réparation de coupures de l'ADN double brin et le choix de la voie dépend de la phase du cycle cellulaire, de la nature de coupure et des facteurs recrutés sur le site de coupure (Ciccio and Elledge 2010). La jonction d'extrémités non homologues canonique (c-NHEJ, pour canonical non-homologous end joining) est rapide et sujet à des erreurs de type délétion/insertion ; elle ne permet que de rétablir la continuité de la séquence génétique et opère dans toutes les phases du cycle cellulaire. Dans un premier temps les hétérodimères Ku70/Ku80 sont recrutés au site de cassure et orchestrent la suite d'évènements permettant la ligature des bouts d'ADN.

Alternativement, la réparation peut impliquer la dégradation des brins d'ADN dans le sens 5'-3', de part et d'autre de la cassure, appelée la résection. La résection est initiée par le complexe MRN (Mre11-Rad50-Nbs1) recruté sur les sites de cassure (Kanaar and Wyman 2008; Stracker and Petrini 2011). La voie de recombinaison homologues (HDR, pour homology-directed recombination) utilise la résection extensive. La résection permet d'exposer l'ADN simple brin pour la restauration de la séquence d'ADN lésée à partir d'une molécule intacte qui sert de matrice. Cette procédure est restreinte aux phases S/G2 du cycle cellulaire quand une copie intacte du génome est disponible. Une résection limitée peut générer les fragments de micro-homologie et orienter la réparation vers la jonctions d'extrémités par micro-homologie (MMEJ, pour microhomology end joining) (Syed and Tainer 2018).

Dans une étude publiée en 2012, les chercheurs ont rapporté que la dépolymérisation d'actine endogène avec du cytochalasine D ou l'introduction dans le noyau de l'actine mutée (incapable de polymériser) inhibait la réparation de cassures double brin (Andrin et al. 2012). Cette étude n'impliquait pas de manière directe Arp2/3 ou d'autres nucléateurs et ne permettait pas d'identifier la voie de réparation affectée.

En revanche, des études plus récentes ont proposé deux fonctions différentes pour le complexe Arp2/3 sur les sites de cassures d'ADN double brin qui sont réparés via les mécanismes de recombinaison homologues (HDR). La première fonction est décrite dans les cellules humaines et consiste à ressembler les sites endommagés dans de larges clusters (B. R. Schrank et al. 2018). Le complexe Arp2/3 ainsi que son activateur WASP (qui est relativement spécifique aux cellules hématopoïétiques) était recruté sur les sites de DSB. Les auteurs ont rapporté que WASP était associé avec les sites de DSB dans toutes les phases du cycle cellulaire tandis qu'Arp2/3 y était associé uniquement dans la phase S/G2 du cycle. Ainsi, Arp2/3 était spécifiquement requis pour la voie de réparation via HDR. Les chercheurs ont ensuite remarqué que l'induction de coupures d'ADN provoquait l'apparition de polymères d'actine dans le noyau qui se

rassemblaient en larges clusters, un processus préalablement décrit (Marnef and Legube 2017). L'inhibition ou la déplétion d'Arp2/3 empêchait cette clusterisation et, de manière surprenante, défavorisait aussi la résection. De l'autre côté, l'empêchement de la résection via l'inhibition de l'activité endonucléase d'une sous-unité du complexe MRN, Mre11, diminuait le mouvement des clusters d'actine. Un modèle a été suggéré selon lequel la polymérisation d'actine par Arp2/3 permettait le rassemblement des sites endommagés, augmentait localement la concentration des facteurs de réparation et de signalisation et favorisait la résection (Figure 5). Cette clusterisation renforcerait et multiplierait des interactions entre les facteurs de réparation au sein des foci DSB via une séparation de phases de type liquide-liquide (B. Schrank and Gautier 2019). Une hypothèse alternative suggère que la polymérisation d'actine par Arp2/3 ne favorise pas la réparation mais plutôt bloque ou retarde la réparation jusqu'à ce que la réparation via HDR soit possible (Hurst, Shimada, and Gasser 2019).

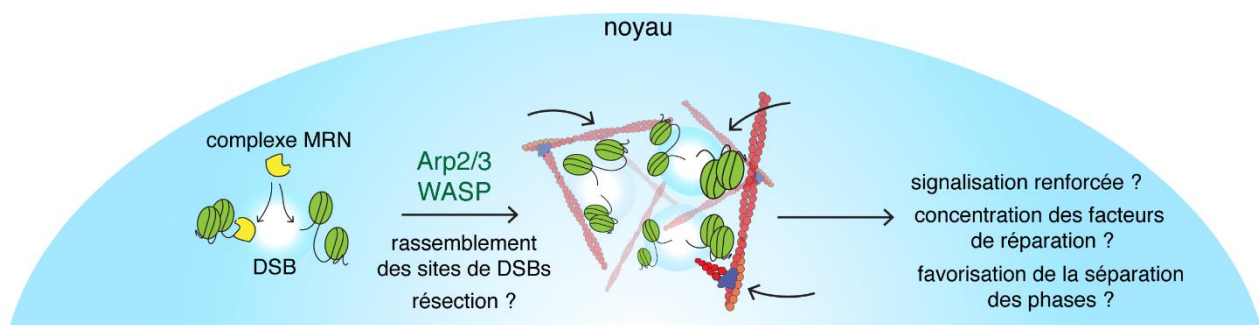


Figure 5. Rôle du complexe Arp2/3 dans la réparation de coupures d'ADN double brin. Dans un premier temps, le complexe MRN est recruté sur le site de coupure et y initie la résection. La polymérisation d'actine par Arp2/3 activé par WASP pourrait favoriser la résection et permettrait le rassemblement de sites de coupures dans des clusters de réparation.

La deuxième fonction d'Arp2/3 dans la réparation de l'ADN a été décrite chez *D.melanogaster*. Elle consiste à favoriser le déplacement des sites endommagés hors d'un environnement répressif vers un environnement qui permet la réparation fiable (Christopher P. Caridi et al. 2018). Dans les noyaux, la polymérisation d'actine par Arp2/3 sur les sites de cassures dans l'hétérochromatine permettait de les guider vers la périphérie du noyau. Selon le modèle proposé par les auteurs, la force générée par les myosines est nécessaire pour déplacer les sites de DSB au long de filaments d'actine (Christopher Patrick Caridi et al. 2019). De manière similaire, une autre étude suggère que le complexe Arp2/3 aussi que son activateur WASP est nécessaire pour la polymérisation d'actine transitoire en réponse à l'ADN endommagé lors de la réplication (Lamm et al. 2020). Les auteurs décrivent le mouvement de sites endommagés diffusif, mais aussi au long des filaments d'actine vers la périphérie du noyau orchestré par les myosines.

Il est clair à présent que le complexe Arp2/3 est capable de polymériser l'actine dans le noyau et impliqué dans les processus de réparation d'ADN. Cependant, les mécanismes impliqués, en particulier, lors de la réparation d'ADN ne sont pas encore bien compris.

II. Régulation de l'activité d'Arp2/3 dans la migration cellulaire

L'un des circuits de régulation d'Arp2/3 les mieux compris est probablement l'activation du complexe WAVE par la GTPase Rac1 au lamellipode (Krause and Gautreau 2014). Le complexe WAVE activé y permet de créer un réseau dense de filaments d'actine branchés dont les extrémités barbées sont orientées vers la membrane plasmique. Ces extrémités permettent l'ajout de monomères d'actine et la formation de protrusions stables (Svitkina and Borisy 1999; Pollard 2007). Cette machinerie de polymérisation d'actine permet ainsi d'avancer le front de migration de la cellule. Cependant, cette seule activation d'Arp2/3 par le complexe WAVE ne permet pas de comprendre la régulation fine de lamellipode. Le présent chapitre décrira d'autres régulateurs de polymérisation d'actine au lamellipode qui permettent à la cellule de réguler la stabilité des protrusions et, plus globalement, de réguler la vitesse et la direction de la migration.

1. Modes de migration cellulaire

La migration cellulaire est un phénomène central impliqué dans de nombreux processus physiologiques. Elle est indispensable lors du développement embryonnaire, pour le fonctionnement du système immunitaire, la réponse aux inflammations ou encore la cicatrisation des tissus. En vue de son importance la migration cellulaire fait l'objet d'une régulation stricte et fine et ses dérégulations mènent souvent à des pathologies diverses, dont les métastases cancéreuses. Les types de migration peuvent être définis en fonction de la morphologie de cellule en migration mais aussi en fonction de l'organisation de cytosquelette de la cellule, de son interaction avec le substrat et de la modification du substrat par la cellule.

Les migrations collectives dont des exemples spectaculaires sont rapportés au cours de développement embryonnaire chez des nombreuses espèces, sont caractérisées par un mouvement coordonné d'un groupe des cellules connectées via des interactions cellule-cellule (Friedl and Gilmour 2009). Un comportement collectif de migration est aussi rencontré dans de nombreux cancers. L'interruption ou la perte de protéines de jonctions adhérentes, telles que les cadhérines, ou des intégrines qui permettent, elles, de créer les adhérences au substrat, peut provoquer un détachement des cellules qui ensuite adaptent une migration individuelle de type amiboïde ou mésenchymateuse.

La migration amiboïde est caractéristique des cellules arrondies dépourvues de fibres de stress d'actine-myosine et d'adhérences focales matures comme, par exemple, des cellules immunitaires ou des cancéreuses métastatiques (Paluch, Aspalter, and Sixt 2016). Les cellules adoptant une migration amiboïde migrent en exerçant une pression contre les fibres d'ECM en absence d'interactions spécifiques. Ces cellules sont aussi capables d'utiliser des gonflements de la membrane spécifiques appelés « blebs » (Charras and Paluch 2008) (Figure 6). Un bleb est créé par la pression hydrostatique là où la membrane plasmique se

détache de manière temporaire du cortex d'actine. Le cytoplasme repousse alors la membrane et crée une protrusion sphérique qui permet à la cellule d'avancer.

La migration mésenchymateuse nécessite des interactions fortes avec la matrice extracellulaire. Elle est caractéristique de certains types cellulaires comme, par exemple, les fibroblastes (Figure 6). Le processus de migration mésenchymateuse peut être divisé en plusieurs étapes clés régulées par les GTPases de la famille Rho (Gardel et al. 2010; Ridley 2011; Haga and Ridley 2016). Le recrutement de la GTPase Rac1 au front de migration permet d'y activer le complexe Arp2/3, de déclencher la polymérisation d'actine et de créer ainsi la protrusion de la membrane plasmique. Certaines formines sont également suggérées de jouer un rôle dans la formation de lamellipode comme, par exemple la formine FMNL2 activée par la GTPase Cdc42 (Block et al. 2012). Alors que le lamellipode continue de se répandre vers l'avant, des nouvelles adhérences au substrat sont formées par intermédiaire des intégrines et des complexes associés aux adhérences focales. Les adhérences formées permettent de connecter le cytosquelette d'actine au substrat et de stabiliser le lamellipode. Les adhérences au substrat permettent à la cellule de détecter et de mesurer la rigidité de son substrat (Oakes et al. 2018). La formation de ces adhésions est un processus complexe, impliquant de nombreux acteurs moléculaires. Le renforcement (maturation) des adhérences focales est accompagnée par l'organisation de fibres de stress d'actine grâce à l'activité des moteurs moléculaires myosines (Hotulainen and Lappalainen 2006; Romero, Le Clainche, and Gautreau 2020). Ce processus est régulé par la GTPase RhoA dont la protéine effectrice, la kinase ROCK (Rho-associated protein kinase), est capable de phosphoryler et d'inactiver la phosphatase de la chaîne légère de myosine (MLC). Cela conduit à une augmentation de niveau de la chaîne légère de myosine phosphorylée (pMLC), qui stimule alors la contraction des filaments d'actine par les myosines et génère des forces contractiles. La contraction des fibres de stress par les myosines permet ensuite la génération de forces de traction contre le substrat et l'avancement de corps cellulaire dans la direction de mouvement. La contraction du front arrière de la cellule et le désassemblage des fibres de stress en arrière finissent le cycle. Ces étapes décomposées dans un but pédagogique sont concomitantes la plupart du temps. Une migration mésenchymateuse efficace nécessite donc une coordination équilibrée des activités de protrusion et de rétraction, et une dérégulation de ces activités mènent à une migration défectueuse et, potentiellement, à des pathologies associées.

Ce modèle simplifié des étapes de migration ne décrit pas la dynamique des microtubules et des filaments intermédiaires qui sont également impliqués dans le processus de migration (Etienne-Manneville 2013; Leduc and Etienne-Manneville 2015). La principale fonction des microtubules lors de la migration cellulaire est d'établir et de maintenir la polarité. Le réseau de microtubules influence, en particulier, le renouvellement et la distribution des adhésions focales ainsi que la localisation et l'activité des GTPases de la famille Rho. Les microtubules participent à plusieurs étapes du cycle de la migration. Cependant, dans certains types cellulaires les microtubules ne sont pas requis pour la migration. Les filaments intermédiaires, quant à eux, forment un réseau étendu et élaboré qui relie le cytosquelette cellulaire aux organelles intracellulaires, régule l'activité des intégrines ainsi que la maturation des adhésions focales en agissant sur différentes voies de signalisation.

Les modes de migration amiboïde et mésenchymateux peuvent être considérés mutuellement exclusifs parce qu'ils sont contrôlés par deux voies de signalisation antagonistes, qui tendent à s'inhiber l'une l'autre (Parri and Chiarugi 2010). Une forte tension du cortex due à la contractilité des myosines, nécessaire à la formation de blebs, est le résultat de l'activation de la voie de signalisation de la petite GTPase RhoA, tandis que la génération de lamellipode nécessite l'activation de la voie Rac1 qui permet de recruter le complexe WAVE et générer des réseaux d'actine branchée. La signalisation RhoA est capable d'inhiber Rac1 via l'activation de son régulateur négatif, ARHGAP22, qui provoque l'échange de la GTP en GDP sur Rac1. Réciproquement, WAVE diminue la contractilité d'actine-myosine en inhibant la phosphorylation de la chaîne légère de la myosine. Cette double inhibition réciproque oriente rapidement la cellule dans un mode ou un autre.

Dans les conditions physiologiques, les cellules sont amenées à avancer à travers des structures extracellulaires denses et complexes et à utiliser des modes de migration multiples. Les cellules mésenchymateuses alignent leurs fibres de stress avec les fibres de la matrice extracellulaire et sont capables de remodeler l'ECM via la sécrétion des protéases pour avancer dans un environnement dense (Yamada and Sixt 2019). En outre, les cellules cancéreuses ont des protrusions spécifiques dépendantes de l'activité de N-WASP appelées invadopodes qui dégradent l'ECM et permettent aux cellules de s'échapper à travers la membrane basale (Molinie and Gautreau 2017). Les cellules amiboïdes, quant à elles, cherchent le passage de moindre résistance et tirent avantage de la topographie 3D des fibres d'ECM pour remplir les pores via création des blebs ou générer une pression contre l'ECM par le flux rétrograde d'actine.

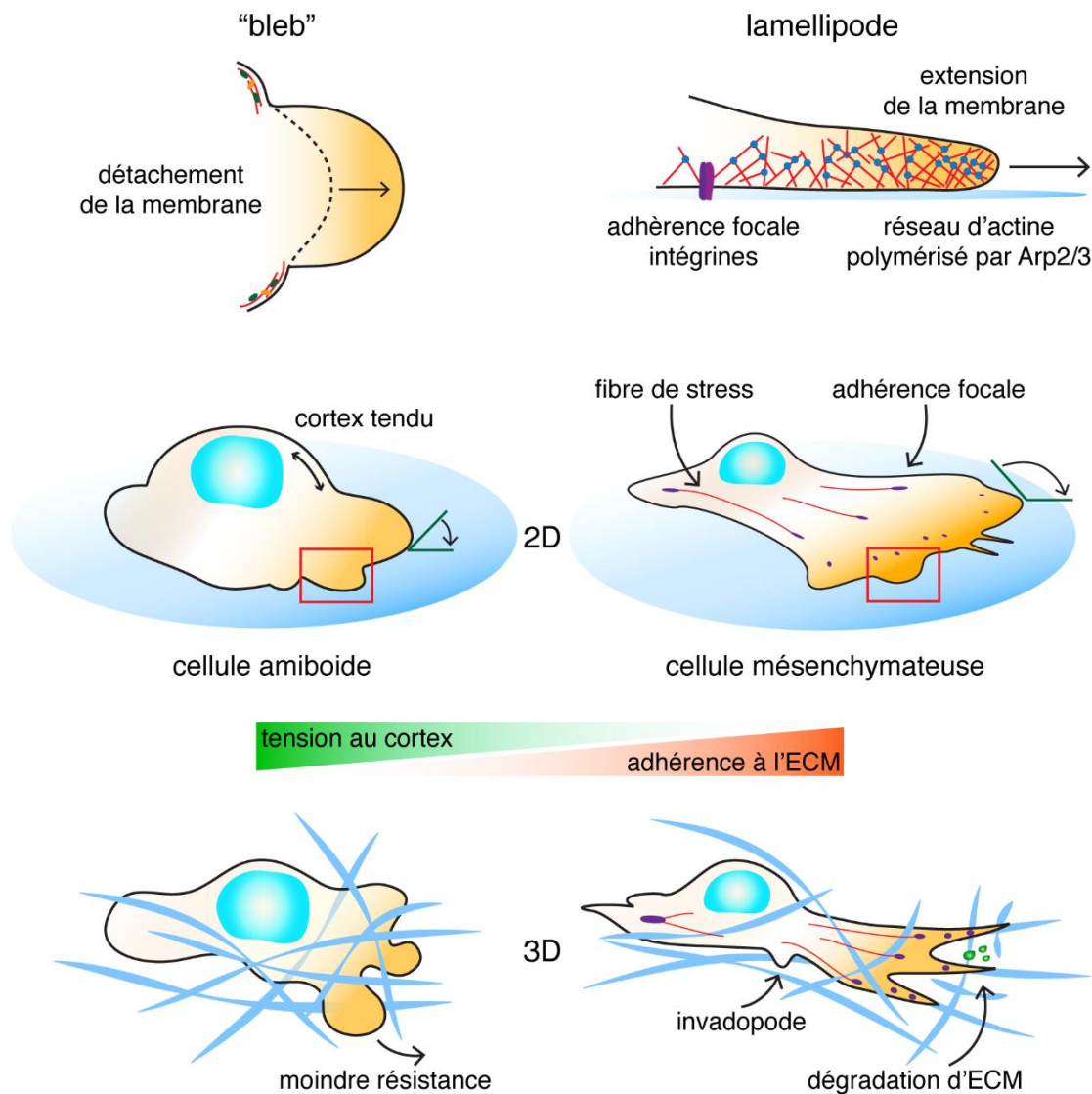


Figure 6. Modes de migration. La migration individuelle amiboïde est caractérisée par une forte tension corticale. Les cellules ne forment que des adhérences faibles au substrat et ne développent pas de fibres contractiles d'actine-myosine. Elles développent des protrusions spécifiques appelés « blebs » qui s'adaptent à leur environnement 3D en cherchant le passage de moindre résistance. Les cellules mésenchymateuses, au contraire, adhèrent fortement au substrat et migrent grâce au renouvellement continu des protrusions membranaires générées par la polymérisation d'actine et des ancrages au substrat via les intégrines. Elles sont capables de remodeler leur environnement via la dégradation protéolytique des fibres d'ECM.

2. Polarité cellulaire et initiation de la migration

La polarisation cellulaire s'installe de manière biochimique et morphologique et permet aux cellules de prendre diverses formes optimisées pour des fonctions tout aussi variées. Par exemple, les cellules épithéliales ont des membranes apicales en contact avec le milieu extérieur, des membranes latérales ancrées aux cellules voisines et des membranes basales ancrées aux molécules de matrice extracellulaire.

Les migrations mésenchymateuses orientées nécessitent préalablement l'établissement d'une polarité avant-arrière de la cellule. Ainsi, les facteurs de polarité sont relocalisés spécifiquement au front de la cellule en expansion au niveau de la protrusion membranaire ou à l'arrière de la cellule en contraction (Campanale, Sun, and Montell 2017) (Figure 7). La polarisation des cellules de mammifères est orchestrée par la famille de petites GTPases Rho, en particulier, les trois GTPases canoniques - RhoA, Rac1 et Cdc42 qui sont distribuées de manière asymétrique lors de la migration (Charest and Firtel 2006).

La mise en place de la polarité peut être décrite de manière très simplifiée comme suit. Les signaux extérieurs sont perçus et transmis par des récepteurs à la surface de la cellule qui initient des cascades de signalisation internes. La phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) est relocalisée au front de migration où elle phosphoryle le PIP2 en PIP3 (Funamoto et al. 2002). La GTPase Rac1 et le complexe WAVE y sont ensuite recrutés par le PIP3 (Oikawa et al. 2004). Rac1, dans sa forme liée au GTP, est capable d'activer le complexe WAVE à la membrane plasmique (Molinie and Gautreau 2017). Puis, le complexe WAVE active Arp2/3 et déclenche la formation de réseau d'actine branchée qui génèrent des protrusions de la membrane plasmique et forment un lamellipode (Stradal et al. 2004). RhoA est recrutée à l'arrière de la cellule où elle contrôle l'activité de la kinase ROCK et, par conséquent, la contractilité de l'acto-myosine nécessaire à la rétraction arrière (Raftopoulou and Hall 2004). Cependant, des études postérieures rapportent une signalisation plus compliquée des GTPases de la famille Rho au cours de ce processus (Machacek et al. 2009; Pertz 2010). Ainsi, les GTPases RhoA et Cdc42 sont proposées d'être également impliquées dans l'initiation de protrusions à l'avant de la cellule. Cependant, cela fait l'objet d'un vif débat étant donné, notamment, l'inhibition mutuelle entre les signalisations de Rac1 et de RhoA (Schaks, Giannone, and Rottner 2019).

Une fois que la polarité est initiée, elle a besoin d'être conservée afin de maintenir un mouvement dirigé. Pour ce faire, de nombreuses boucles de rétroaction positives ont été impliquées, au niveau des GTPases, de la PI3K, des intégrines, des microtubules et du transport vésiculaire (Ridley et al. 2003). Par exemple, Rac1 favorise le recrutement à la membrane plasmique et l'activation de la PI3K qui augmente la concentration de PIP3. Le PIP3 est, à son tour, capable de recruter des GEFs qui activent Rac1 (Krause and Gautreau 2014). Ainsi, Rac1 participe également à la régulation de l'asymétrie des phospholipides.

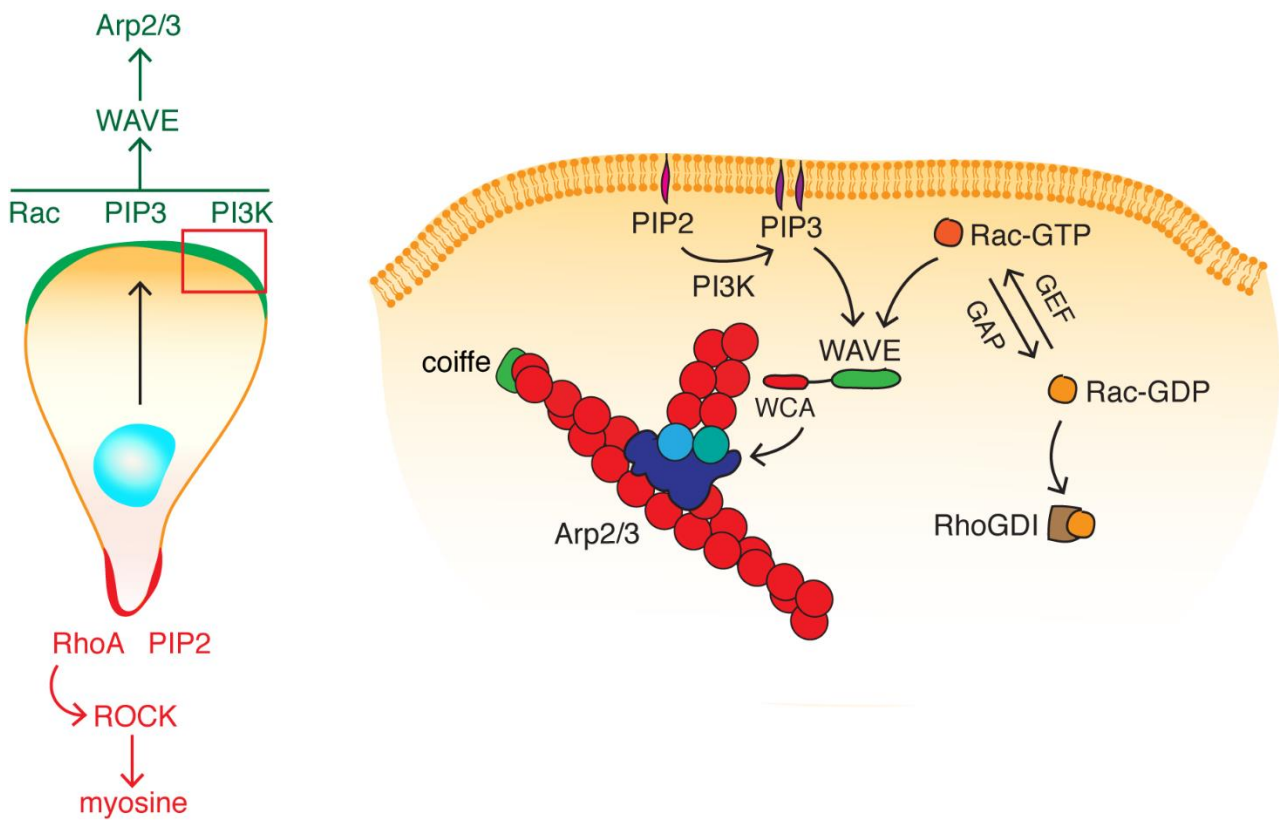


Figure 7. La polarité installée de manière biochimique permet la réorganisation morphologique nécessaire pour la migration dirigée. La polarité est caractérisée par l'activation des petites GTPases de la famille Rho et leur distribution spécifique au sein de la cellule. Le complexe WAVE est recruté à la membrane plasmique par les phospholipides et la GTPase Rac1 et y active le complexe Arp2/3.

3. Régulation négative du complexe Arp2/3 au lamellipode

Dans la cellule, il existe des mécanismes de régulation fine de l'activité d'Arp2/3 au lamellipode. Des régulateurs négatifs d'Arp2/3, au mode d'action différent, ont été décrits. Certains, comme les facteurs de maturation gliale (GMFs) et les coronines sont capables de déstabiliser la jonction de branche (Luan and Nolen 2013; Ydenberg et al. 2013; Chan, Creed, and Bear 2011). En décorant les filaments d'actine, la transgeline-2 empêche le recrutement d'Arp2/3 sur les filaments (Kim et al. 2018). D'autres, comme Gadkin, sont suggérés de séquestrer Arp2/3 (Maritzen et al. 2012). Ce paragraphe sera consacré à l'inhibiteur direct du complexe Arp2/3 au lamellipode appelé Arpin qui a été découvert et extensivement étudié dans le laboratoire d'accueil.

Arpin (**Arp2/3 Inhibitory protein**) a été identifiée dans un crible bioinformatique qui cherchait de nouvelles protéines contenant un motif acide A. Cette protéine a été nommée en hommage au Dr. Monique Arpin, la directrice de thèse d'Alexis Gautreau (Dang et al. 2013). Il s'agissait d'une protéine inconnue auparavant qui possédait un motif A à son extrémité C-terminale mais à laquelle il manquait le motif WH2 des NPFs classiques. Le motif acide A d'Arpin (représenté par les 20 acides aminés C-terminaux) était suffisant pour lier et inhiber le complexe Arp2/3 et réduire le branchement d'actine *in vitro*. Mais ce peptide était moins efficace que la protéine complète (Figure 8A-B) (Dang et al. 2013).

Les études structurales ont décrit Arpin en tant qu'une protéine globulaire avec une queue C-terminale exposée, nécessaire à l'interaction avec Arp2/3 (Fetics et al. 2016). Les résultats du laboratoire d'accueil ont suggéré qu'Arpin entre en compétition avec les domaines WCA des NPFs pour l'interaction avec Arp2/3 (Dang et al. 2013). Ainsi, Arpin se lie probablement aux mêmes sites à la surface d'Arp2/3 que les NPFs. En se liant à Arp2/3, Arpin empêche son changement de sa conformation activateur (Sokolova et al. 2017) comme le fait l'inhibiteur chimique d'Arp2/3, CK666 (Nolen et al. 2009). Ainsi, Arpin agit en amont de la formation de nouvelles branches et n'a pas d'activité déstabilisatrice vis-à-vis la jonction formée, contrairement aux GMFs ou aux coronines. Deux sites probables à la surface d'Arp2/3 qui permettent l'interaction avec Arpin ont été proposés – à proximité des sous-unités Arp3-ArpC2 ou Arp2-Arp3 (Sokolova et al. 2017) (Figure 8C), mais cette cartographie à basse résolution ne permettait pas de trancher. De plus, cette étude a été réalisée avec de l'Arpin humaine liée à du complexe Arp2/3 de levure, alors même que la levure n'a pas d'Arpin.

Le motif A C-terminal est le domaine clé pour la fonction inhibitrice d'Arpin (Dang et al. 2013). D'autres protéines possédant des motifs A, telles que Gadkin et PICK1 (Protein Interacting with C-Kinase) ont été suggérées comme protéines inhibitrices d'Arp2/3. Cependant une étude postérieure a contredit leurs capacités d'inhibiteurs directs (Madasu et al. 2015). Néanmoins, Arpin n'est vraisemblablement pas la seule protéine inhibitrice d'Arp2/3 dans la cellule. Une étude récente rapporte que la protéine WDR63 (WD repeat-containing protein 63) se lie au complexe Arp2/3 en rentrant en compétition avec les domaines WCA des NPFs et inhibe l'activité du complexe Arp2/3 en empêchant son recrutement au lamellipode (Zhao et al. 2020).

Récemment, des études ont révélé que l'efficacité de la polymérisation d'actine par Arp2/3 dépend de sa composition en isoformes et de la phosphorylation de ses sous-unités (Abella et al. 2016; Pizarro-Cerdá et al. 2017). Les différents complexes Arp2/3 possèdent différentes stabilités (Abella et al. 2016; Galloni et al. 2021). Ainsi, la cortactine a été montré de stabiliser préférentiellement les complexes contenant les sous-unités ArpC1B et ArpC5L. De plus, MICAL2 est capable d'oxyder et de déstabiliser spécifiquement les complexes contenant Arp3B. Outre les complexes construits avec des isoformes différentes, il existe aussi des complexes Arp2/3 hybrides assemblés avec certaines sous-unités du complexe Arp2/3 et des protéines des adhérences focales, la vinculine et l' α -actinine (Chorev et al. 2014). Il n'est pas encore connu si la capacité inhibitrice d'Arpin varie en fonction de la composition exacte des complexes Arp2/3 et de leurs phosphorylations.

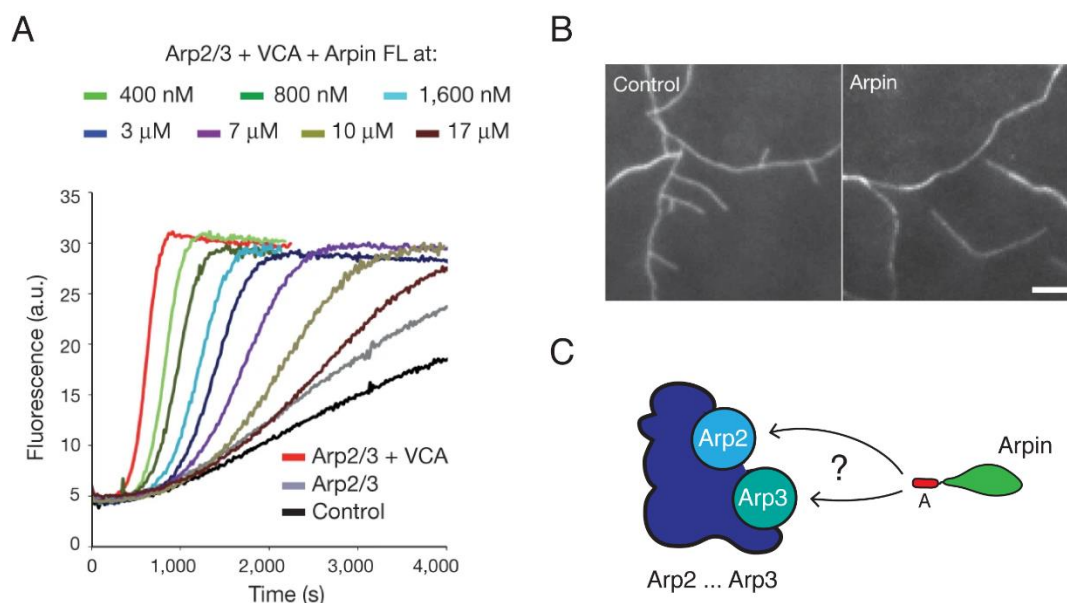


Figure 8. Caractérisation de l'activité inhibitrice d'Arpin. (A) Dans une expérience *in vitro* avec le pyrène-actine, Arpin rentre en compétition avec le domaine WCA d'un NPF et inhibe le complexe Arp2/3 de manière dose-dépendante. (B) Arpin réduit le branchement du réseau d'actine dans une expérience *in vitro* visualisée par microscopie TIRF. Extrait de (Dang et al. 2013), échelle : 5 μ m. (C) Les études suggèrent deux sites d'interaction d'Arpin avec le complexe Arp2/3 (Sokolova et al. 2017).

4. Arpin contrôle la persistance de migration

Lors de la migration, la cellule contrôle sa vitesse et sa persistance directionnelle décrite comme le temps caractéristique pendant lequel la cellule se déplace dans la même direction (Petrie, Doyle, and Yamada 2009). Ces deux paramètres sont vraisemblablement interconnectés (Maiuri et al. 2015). La persistance directionnelle des cellules mésenchymateuses est corrélée avec la persistance de lamellipode qui dépend de la formation des protrusions via la polymérisation d'actine au front de migration et de la stabilisation des adhérences de lamellipode au substrat (Krause and Gautreau 2014).

De nombreux types cellulaires sont capables d'orienter leur migration mésenchymateuse en réponse à divers facteurs de l'environnement comme, par exemple, un gradient de concentration des molécules chimiques attractantes (chimiotaxie), de densité de matrice extracellulaire ECM (haptotaxie) ou de rigidité du substrat (durotaxie). Le complexe Arp2/3 est indispensable pour la formation des lamellipodes (Suraneni et al. 2012; Wu et al. 2012; Dimchev et al. 2021). Des nombreuses études ont été menées afin d'élucider si l'activité d'Arp2/3 au lamellipode soit cruciale pour les migrations dirigées (les différents types de « taxie »).

La chimiotaxie est probablement un mode de migration dirigée le mieux compris. La déplétion d'Arp2/3 dans les fibroblastes empêche la formation de lamellipodes et favorise la formation de filopodes (Suraneni et al. 2012; Wu et al. 2012), probablement, via la surexpression des formines (Dimchev et al. 2021). Les cellules dépourvues du complexe Arp2/3 perdent la capacité de migration dirigée dans le gradient de facteur de croissance épidermique EGF (Epidermal growth factor) (Suraneni et al. 2012) mais, de manière surprenante, migrent de manière orientée dans le gradient de facteur de croissance dérivé des plaquettes PDGF (Platelet-derived growth factor) (Wu et al. 2012). Cette contradiction a été expliquée par la comparaison de profils transcriptionnels des cellules dépourvues d'Arp2/3 et des cellules contrôles (Wu et al. 2013). Ainsi, une conséquence indirecte de la déplétion d'Arp2/3 est la surexpression des facteurs sécrétés par les cellules qui affectent la chimiotaxie dans le gradient de EGF. Il semble alors que le complexe Arp2/3 n'est pas indispensable pour la chimiotaxie. Un cas particulier est représenté par les cellules dendritiques dont la migration se fait en mode amiboïde. Dépourvues du complexe WAVE, les cellules dendritiques adoptent un mode de migration très persistant mais incontrôlé et donc perdent également leur capacité pour la chimiotaxie (Leithner et al. 2016).

Contrairement à la chimiotaxie, lors de laquelle les cellules s'orientent vers la source de chimio-attractant venant de manière passive par diffusion, l'haptotaxie exige que les cellules se projettent et migrent dans le gradient d'ECM lié au substrat. Ce processus nécessite l'établissement et la maturation des contacts focaux. Les cellules dépourvues du complexe Arp2/3, et donc des lamellipodes, sont incapables de migrer de manière dirigée dans le gradient d'ECM (Wu et al. 2012; S. J. King et al. 2016). De manière similaire, la déplétion d'Arp2/3 affecte la migration dirigée dans le gradient de rigidité du substrat (DuChez et al. 2019). Ainsi, l'activité du complexe Arp2/3 est nécessaire pour les deux « taxies » associées au gradient des propriétés de substrat, la haptotaxie et la durotaxie.

Arpin, en inhibant l'activité d'Arp2/3 au lamellipode, s'oppose à l'action du complexe WAVE (Figure 9). Cependant, au lieu d'empêcher la formation des protrusions, Arpin tend à réguler leur temps de vie (Dang et al. 2013). En effet, la déplétion d'Arpin stabilise le lamellipode et augmente la persistance de la migration des cellules en absence de facteurs attractants. Arpin joue donc le rôle d'un « frein » des protrusions et permet à la cellule de s'arrêter et de changer la direction de mouvement (Gorelik and Gautreau 2015). Arpin n'est cependant pas nécessaire à la chimiotaxie (Dang et al. 2017) comme le complexe Arp2/3 lui-même (Wu et al. 2012). Quant aux autres types de « taxies » qui nécessitent l'activité d'Arp2/3, il n'est pas encore connu si Arpin y soit nécessaire.

Récemment, un nouveau régulateur négatif de la voie Rac1-WAVE, CYRI, a été identifié (Fort et al. 2018; Le et al. 2021). De manière surprenante, CYRI est nécessaire à la chimiotaxie de cellules de mélanomes. La protéine CYRI-B se lie à Rac1 activée et empêche son interaction avec le complexe WAVE (Figure 9). CYRI est ainsi considéré comme un inhibiteur local qui contrôle la formation des protrusions dépendantes du complexe WAVE. Récemment, un nouveau rôle dans la régulation de la macropinocytose a été suggéré pour son isoforme CYRI-A (Le et al. 2021).

Dans la cellule, Arpin n'est pas le seul facteur négatif capable de réguler la persistance de migration cellulaire. La persistance peut être aussi dictée par l'activité des complexes WAVE et Arp2/3 qui est définie par la composition en isoformes de leurs sous-unités. Par exemple, la sous-unité CYFIP2 incorporée dans le complexe WAVE le rend moins capable d'activer Arp2/3 et jouerait ainsi un rôle d'inhibiteur de la migration de manière similaire à Arpin (Polesskaya et al. 2020). La déplétion de la sous-unité ArpC1B du complexe Arp2/3, mais pas de son paralogue ArpC1A, empêche la formation de lamellipode (Molinie et al. 2019a).

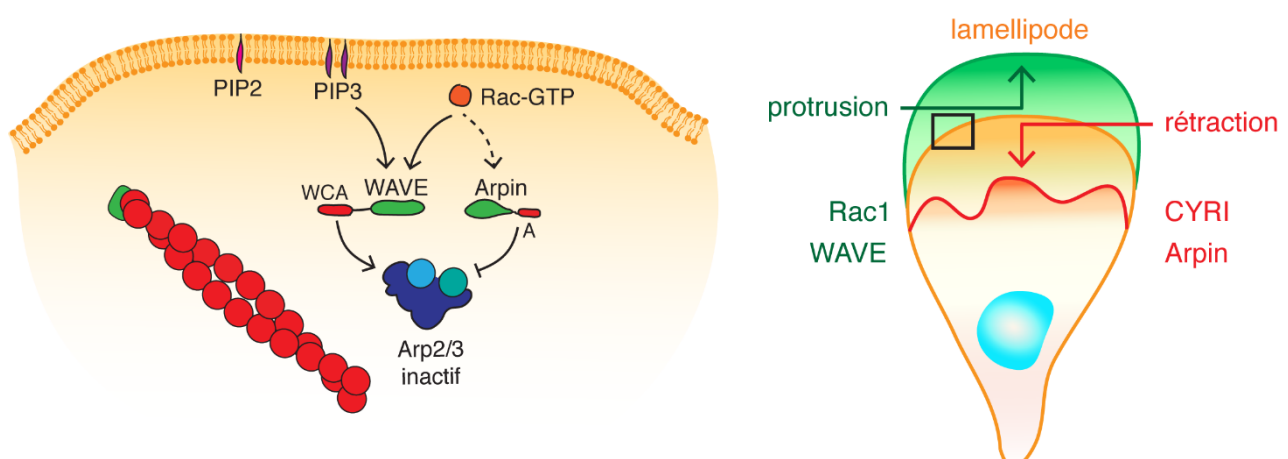


Figure 9. Régulateurs positifs et négatifs contrôlent l'activité d'Arp2/3 au lamellipode. La GTPase Rac1 liée au GTP active le complexe WAVE mais aussi indirectement Arpin qui s'oppose à l'action activatrice de WAVE. La dynamique du lamellipode est contrôlée par des régulateurs positifs (en vert) et négatifs (en rouge).

La polymérisation d'actine branchée par Arp2/3 est également au cœur de la migration cellulaire dans des processus pathologiques comme, par exemple, la dissémination de cellules tumorales lors de la formation de métastases cancéreuses. Les cellules cancéreuses sont souvent caractérisées par l'augmentation d'activité du complexe Arp2/3 qui leur fournit une capacité accrue de migration et d'invasion. Le régulateur négatif de la persistance de migration, Arpin est souvent sous exprimée dans des tissus tumoraux par rapport à des tissus contrôles et la perte d'Arpin est associée à un mauvais pronostic dans différents cancers (L. Lomakina et al. 2016; Liu et al. 2016; T. Li et al. 2017; S.-R. Zhang et al. 2019). La surexpression d'Arpin dans les cellules cancéreuses permet de diminuer la prolifération et la capacité d'invasion (Y. Li et al. 2017).

Récemment, le laboratoire d'accueil a révélé l'implication de la voie Rac1-WAVE-Arp2/3 au cortex dans le contrôle de progression du cycle cellulaire (Molinie et al. 2019a). La déplétion d'Arpin provoque le renforcement de la polymérisation d'actine au cortex et rend les cellules non transformées moins dépendantes des signaux permettant l'entrée en phase S du cycle cellulaire. Ainsi, les cellules déplétées d'Arpin ne perdent pas la capacité de proliférer dans les conditions déplacées d'optimales comme la basse concentration des facteurs de croissance ou la basse rigidité de substrat. Au contraire, l'inhibition d'Arp2/3 diminue le taux de prolifération des cellules non transformées.

Bien qu'Arpin soit le régulateur de la persistance de migration, Arpin remplit vraisemblablement d'autres fonctions dans la cellule. Par exemple, dans les macrophages, Arpin sert en tant qu'un régulateur de la polymérisation d'actine important pendant le phagocytose (Jubrail et al. 2020). En outre, dans les cellules épithéliales d'intestin, le complexe Arp2/3 aussi qu'Arpin sont nécessaires pour le maintien de l'intégrité de la barrière intestinale (Cháñez-Paredes et al. 2021).

Objectifs de la thèse

La migration cellulaire est impliquée dans un grand nombre de processus physiologiques et pathologiques. Pour se propulser en avant, une cellule en migration forme une protrusion membranaire appelée lamellipode. Cette protrusion est créée par la polymérisation d'un réseau d'actine branché qui génère la force de poussée. Le complexe Arp2/3, une machinerie unique dans la cellule capable de polymériser l'actine de manière branchée est finement régulée au lamellipode. Arp2/3 est activé par un NPF spécifique, le complexe WAVE, et est inhibé par Arpin, alors que ces deux activités sont régulées par une petite GTPase, Rac1, essentielle à la formation des lamellipodes. Ce circuit est essentiel au contrôle de la persistance de la migration.

Dans le but de trouver de nouveaux partenaires d'Arpin et d'élucider sa régulation dans la cellule, le laboratoire d'accueil a effectué un crible double hybride et une immunoprécipitation avec Arpin en tant qu'« appât ». Les Tankyrases 1 et 2 ont été identifiées en tant que nouveaux partenaires d'Arpin. Le laboratoire d'accueil a défini le site nécessaire pour l'interaction avec les Tankyrases. Il s'agissait de la séquence acide A à l'extrémité C-terminale d'Arpin en chevauchement avec le site d'interaction d'Arp2/3. Plusieurs mutations du motif A d'Arpin permettant d'interrompre l'interaction d'Arpin avec les Tankyrases ou avec le complexe Arp2/3 ont été caractérisées.

Dans ma thèse, je me suis initialement engagé dans un projet prometteur qui m'amenait à élucider le rôle de la protéine LIMCH1, un nouveau senseur potentiel de l'actine branchée identifié par le laboratoire d'accueil. Ce projet a été progressivement abandonné suite à de nombreuses difficultés et de résultats négatifs. Il est décrit en détail dans l'Annexe pour garder une trace mise en forme de ces tentatives. Je me suis alors focalisé sur Arpin dans le but d'**étudier le rôle de son interaction avec les Tankyrases dans la régulation de la migration**, la fonction phare d'Arpin décrite auparavant. De manière surprenante cette étude a suggéré l'existence de deux voies indépendantes par lesquelles Arpin régule la persistance de la migration (Simanov et al. 2021). En parallèle, nous avons participé dans la recherche menée dans le laboratoire de R. Dominguez à l'Université de Pennsylvanie qui visait à **identifier le mécanisme précis d'interaction d'Arpin avec le complexe Arp2/3**.

Au cours de ces études nous avons revisité des résultats d'une analyse des niveaux d'expression protéiques dans des tissus tumoraux que le laboratoire d'accueil avait entreprise avec des collègues à l'Institut Curie. L'analyse concernait une soixantaine de protéines impliquées dans la régulation du cytosquelette, du cycle cellulaire et de la réparation de l'ADN et a montré que l'expression d'Arpin corrèle avec l'expression de certains marqueurs de dommage d'ADN et de sa réparation. Plusieurs études récentes ont suggéré que la polymérisation d'actine par le complexe Arp2/3 pourrait jouer un rôle important dans le mécanisme de réparation d'ADN via la recombinaison homologue (HDR). J'ai **évalué l'effet de la déplétion d'Arpin sur l'efficacité de l'HDR et la réponse de la cellule au dommage d'ADN**.

Résultats

I. Arpin Regulates Migration Persistence by Interacting with Both Tankyrases and the Arp2/3 Complex

Simanov Gleb, Irene Dang, Artem I. Fokin, Ksenia Oguievetskaia, Valérie Campanacci, Jacqueline Cherfils, Alexis M. Gautreau.

Int J Mol Sci. 2021 Apr 16 ; 22(8):4115. doi : 10.3390/ijms22084115.

La polymérisation d'actine branchée par le complexe Arp2/3 permet de générer les protrusions de la membrane plasmique au front d'avant de la cellule appelées les lamellipodes. Une fois couplé au substrat, ces protrusions permettent à la cellule d'avancer. La persistance de la migration cellulaire est contrôlée de manière négative par Arpin, la protéine inhibitrice d'Arp2/3. Dans le but de comprendre la régulation d'Arpin dans la cellule nous avons recherché ses partenaires d'interaction et avons identifié les Tankyrases 1 et 2 dans le crible double hybride et par l'immunoprécipitation avec Arpin.

Nous avons montré qu'Arpin se lie aux répétitions ankyrine des Tankyrases via son motif acide A à son extrémité C-terminale. Nous avons aussi étudié la nature des agrégats que les Tankyrases formaient quand elles étaient surexprimées. Ces agrégats résultent d'une séparation de phases de type liquide-liquide. La surexpression d'Arpin empêche cette condensation des Tankyrases, en occupant leurs répétitions ankyrine.

Afin de séparer les interactions d'Arpin avec les Tankyrases et Arp2/3 de manière spécifique, nous avons introduit des mutations dans le motif A d'Arpin. Nous avons ensuite étudié l'effet de ces mutations sur la persistance de la migration cellulaire. En partant d'une lignée cellulaire knock-out pour Arpin nous avons généré les lignées exprimant les mutants d'Arpin de manière stable par l'intégration aléatoire de plasmide et par la technique de knock-in. Nous avons étudié la capacité des mutants d'Arpin de restaurer le niveau de persistance de migration correspondant aux cellules sauvages. De manière surprenante, les mutants d'Arpin qui ont perdu l'interaction uniquement avec Arp2/3 ou avec les Tankyrases n'étaient pas capables d'éteindre complètement l'activité d'Arpin. Seul le mutant qui perdait les deux interactions à la fois s'est avéré complètement inactif. Ainsi, nos résultats suggèrent l'existence de deux voies indépendantes par lesquelles Arpin régulerait la persistance de la migration.



Article

Arpin Regulates Migration Persistence by Interacting with Both Tankyrases and the Arp2/3 Complex

Gleb Simanov ¹, Irene Dang ¹, Artem I. Fokin ¹, Ksenia Oguievetskaia ¹, Valérie Campanacci ^{2,†} ,
Jacqueline Cherfils ^{2,‡} and Alexis M. Gautreau ^{1,*}

¹ CNRS UMR7654, Institut Polytechnique de Paris, 91120 Palaiseau, France; gleb.simanov@polytechnique.edu (G.S.); idang@mail.med.upenn.edu (I.D.); artem.fokin@polytechnique.edu (A.I.F.); oguieve@gmail.com (K.O.)

² Laboratoire d'Enzymologie et Biochimie Structurales, CNRS, 91190 Gif-sur-Yvette, France; valerie.campanacci@i2bc.paris-saclay.fr (V.C.); jacqueline.cherfils@ens-paris-saclay.fr (J.C.)

* Correspondence: alexis.gautreau@polytechnique.edu; Tel.: +33-169334870

† Current Address: Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), Université Paris-Saclay, CEA, CNRS, 91190 Gif-sur-Yvette, France.

‡ Current Address: Laboratoire de Biologie et Pharmacologie Appliquée, CNRS and Ecole Normale Supérieure Paris-Saclay, 91190 Gif-sur-Yvette, France.

Abstract: During cell migration, protrusion of the leading edge is driven by the polymerization of Arp2/3-dependent branched actin networks. Migration persistence is negatively regulated by the Arp2/3 inhibitory protein Arpin. To better understand Arpin regulation in the cell, we looked for its interacting partners and identified both Tankyrase 1 and 2 (TNKS) using a yeast two-hybrid screening and coimmunoprecipitation with full-length Arpin as bait. Arpin interacts with ankyrin repeats of TNKS through a C-terminal-binding site on its acidic tail, which overlaps with the Arp2/3-binding site. Arpin was found to dissolve the liquid–liquid phase separation of TNKS upon overexpression. To uncouple the interactions of Arpin with TNKS and Arp2/3, we introduced point mutations in the Arpin tail and attempted to rescue the increased migration persistence of the Arpin knockout cells using random plasmid integration or compensating knock-ins at the *ARPIN* locus. Arpin mutations impairing interactions with either Arp2/3 or TNKS were insufficient to fully abolish Arpin activity. Only the mutation that affected both interactions rendered Arpin completely inactive, suggesting the existence of two independent pathways, whereby Arpin controls the migration persistence.

Keywords: cell migration; migration persistence; Arpin; Tankyrase; Arp2/3



Citation: Simanov, G.; Dang, I.; Fokin, A.I.; Oguievetskaia, K.; Campanacci, V.; Cherfils, J.; Gautreau, A.M. Arpin Regulates Migration Persistence by Interacting with Both Tankyrases and the Arp2/3 Complex. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 4115. <https://doi.org/10.3390/ijms22084115>

Academic Editor: Muh-Hwa Yang

Received: 17 March 2021

Accepted: 13 April 2021

Published: 16 April 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Cell migration depends on various types of membrane protrusions. Most membrane protrusions are driven by cortical actin polymerization [1]. In migrating cells, adherent membrane protrusions at the leading edge fuel the cell movement. Actin networks at the leading edge are branched by the Arp2/3 complex that nucleates new actin filaments from the side of pre-existing ones. Arp2/3 activation in membrane protrusions is under the control of the WAVE complex, which, in turn, is regulated by the small GTPase Rac1 [2,3].

Arpin was identified as an Arp2/3 inhibitory protein that antagonizes WAVE activity [4]. Arpin is composed of a folded domain and of a C-terminal acidic tail extending from this core [5]. Through its acidic tail, Arpin competes with the nucleation-promoting factors (NPFs), such as WAVE [4]. Arpin thus acts earlier than other Arp2/3 inhibitory proteins, such as coronins or GMFs, which remove Arp2/3 from junctions of branched actin networks [3].

Migration persistence is the result of feedback loops that sustain Rac1 activation in the cell regions, where Rac1 earlier induced the formation of branched actin [6,7]. By inhibiting Arp2/3, Arpin interrupts this positive feedback and decreases the migration persistence, thus allowing the cells to pause and change direction [4,8].

To better understand how Arpin is regulated in the cell, we searched for additional Arpin interacting partners and identified Tankyrase 1 and 2 (TNKS) as major Arpin partners. TNKS are pleiotropic regulators of many cell functions through binding, modification, and the downregulation of various proteins. However, TNKS did not appear to regulate Arpin's Arp2/3 inhibitory function but, rather, to serve as another Arpin effector in the regulation of migration persistence.

2. Results

2.1. Arpin Binds to Tankyrase 1 and 2

To identify the proteins that bind to Arpin, we first immunoprecipitated Arpin from a 293-cell line stably expressing a Protein C (PC)-tagged version of Arpin through its epitope tag. Arpin was efficiently immunoprecipitated from the lysate prepared from cells stably expressing tagged Arpin but not from a control cell line transfected with the empty plasmid. Silver staining was used to identify the potential interacting partners (Figure 1A). In single-step immunoprecipitation, many bands were detected, including immunoglobulin light and heavy chains. However, two specific bands between the 120- and 150-kDa markers were clearly detected when Arpin was immunoprecipitated but not in the control lane. These two proteins were identified by LC-MS/MS as Tankyrase1 (TNKS1, 142 kDa) and Tankyrase2 (TNKS2, 127 kDa). With the expectation of identifying additional potential interacting partners of the Arpin protein, we performed a yeast two-hybrid screening of a library containing random primed human placenta cDNAs, with full-length Arpin as bait. More than 10^8 clones were analyzed by yeast mating. Out of the 187 clones selected, 177 corresponded to either TNKS1 or TNKS2 (Figure 1B). The remaining 10 clones were comparatively of low confidence, as they corresponded to out-of-frame fusions or to DNA sequences that were not annotated as protein-encoding genes. These two approaches thus point at TNKS as major Arpin-interacting partners.

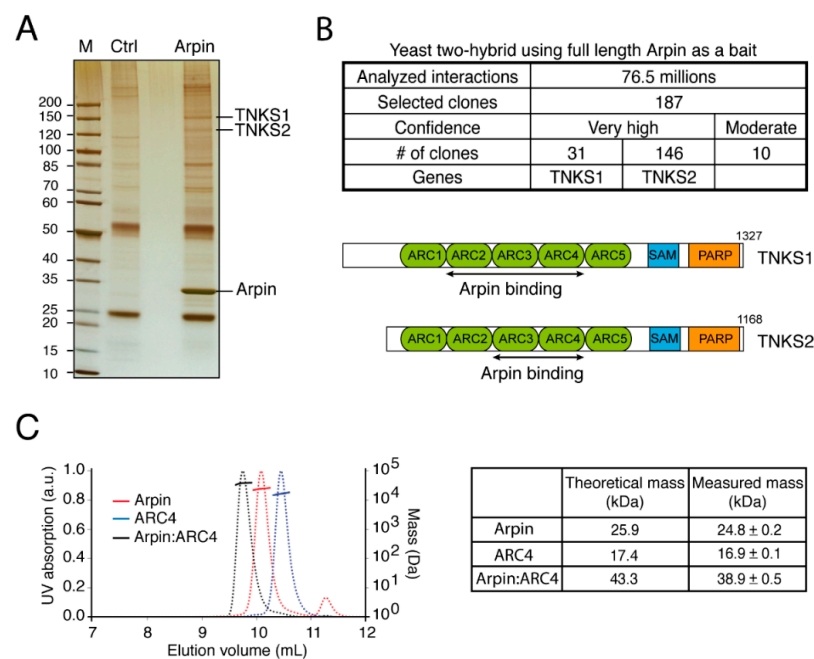


Figure 1. Tankyrases are major Arpin-interacting partners. **(A)** A 293-cell line stably expressing tagged Arpin was used to immunoprecipitate Arpin and its associated proteins (silver staining). Proteins were identified by mass spectrometry. **(B)** Full-length Arpin was used as bait in a yeast two-hybrid screening. The retrieved clones of TNKS were mapped to regions indicated with black arrows within the region containing Ankyrin Repeat Clusters (ARCs). **(C)** The molecular species obtained by mixing purified Arpin and purified ARC4 of TNKS were analyzed by SEC-MALS.

Both TNKS are composed of three regions. In order from the N- to C-terminus, these proteins contain ankyrin repeats organized into Ankyrin Repeat Clusters (ARCs), a Sterile Alpha Motif (SAM), which mediates oligomerization, and a C-terminal Poly ADP Ribosyl Polymerase (PARP) catalytic domain [9]. Since all yeast two-hybrid clones interacting with full-length Arpin are mapped to the N-terminal region composed of ARCs, we produced and purified full-length Arpin and the ARC4 of TNKS2 (Figure S1), which had been previously crystallized [10]. When the two proteins were mixed, a new molecular species was detected by Size Exclusion Chromatography–Multi-Angle Light Scattering (SEC-MALS). This species displayed a mass corresponding to a 1:1 complex (Figure 1C).

2.2. TNKS Do Not Regulate Arpin Levels

TNKS are pleiotropic regulators of various cellular functions, including telomere maintenance, mitosis regulation, Wnt signaling, insulin-dependent glucose uptake, and the Hippo–YAP pathway [11–17]. These multiple TNKS functions usually require binding to substrates through ARCs and poly ADP ribosylation, also called PARylation, through the catalytic PARP domain [18]. In most cases, PARylated proteins are ubiquitinated by the E3 ubiquitin ligase RNF146, which recognizes the poly-ADP ribose chain through its WWE domain, and then degraded by proteasomes [19].

The TNKS turnover is fast, because they PARylate themselves. To investigate whether the Arpin turnover occurs through a similar mechanism, we blocked TNKS catalytic activity with the XAV939 inhibitor [16]. As expected, this treatment resulted in increased levels of both TNKS and of their substrate Axin1. The Arpin levels were, however, not affected by the XAV939 treatment (Figure 2A). This observation is in line with proteomics analyses of the TNKS function: Levels of Arpin (referred to in these large-scale studies as C15ORF38) were also found to be unchanged in TNKS double-knockout versus control 293T cells [20], and the Arpin–TNKS interaction was unaffected irrespective of whether the TNKS PARylation activity was blocked by XAV939 [21]. We nonetheless attempted to detect the potential PARylation of Arpin. To this end, we used the WWE domain of E3 ligase RNF146 (Figure S1) to pull down the PARylated proteins [19]. In the WWE pulldown, TNKS1, but not Arpin, was retrieved (Figure 2B).

Together, these experiments indicated that Arpin is a direct TNKS partner that is unlikely to be subjected to PARylation-mediated degradation. This is different from the majority of TNKS-binding partners; however, several other TNKS-interacting partners that are not PARylated have been previously identified, such as Mcl-1L, GDP Mannose 4,6 Dehydratase, CD2AP, and SSSCA1 [22–25].

2.3. Arpin Binds to TNKS via Its C-Terminal Acidic Tail

ARCs recognize a consensus motif, the octapeptide RXXXXGXX, defined through the screening of a peptide library [10]. Arpin contains three putative TNKS-binding sites, which were examined by substituting the required G residue by A at positions 8, 189, and 218. We expressed PC-tagged Arpin mutant forms in 293T cells and found that the G218 residue is the only critical one for Arpin association with TNKS (Figure 2C). This TNKS-binding motif is located within the acidic tail of Arpin and overlaps with the previously described Arp2/3 interaction site (Figure 2D) [4]. We therefore investigated a possible competition between the Arp2/3 complex and TNKS binding. GST pulldown with Arpin in lysates from mouse embryonic fibroblasts (MEF) retrieved both TNKS and the Arp2/3 complex (Figure 2E). Adding an excess of purified ARC4 displaced not only TNKS but, also, the Arp2/3 complex, due to overlapping binding sites. In order to understand whether TNKS could influence Arpin–Arp2/3 interactions in cells, we immunoprecipitated endogenous Arpin from 293T wild type and TNKS double-knockout (KO) cells [20]. The same amount of Arp2/3 complex coprecipitated with Arpin irrespective of the presence of TNKS (Figure 2F). Thus, the Arpin–TNKS interaction does not appear to modulate the Arpin–Arp2/3 interaction *in vivo*. Since TNKS does not regulate the levels of Arpin, nor

its Arp2/3 inhibitory function, we then investigated what might be the possible outcome of the Arpin–TNKS interaction.

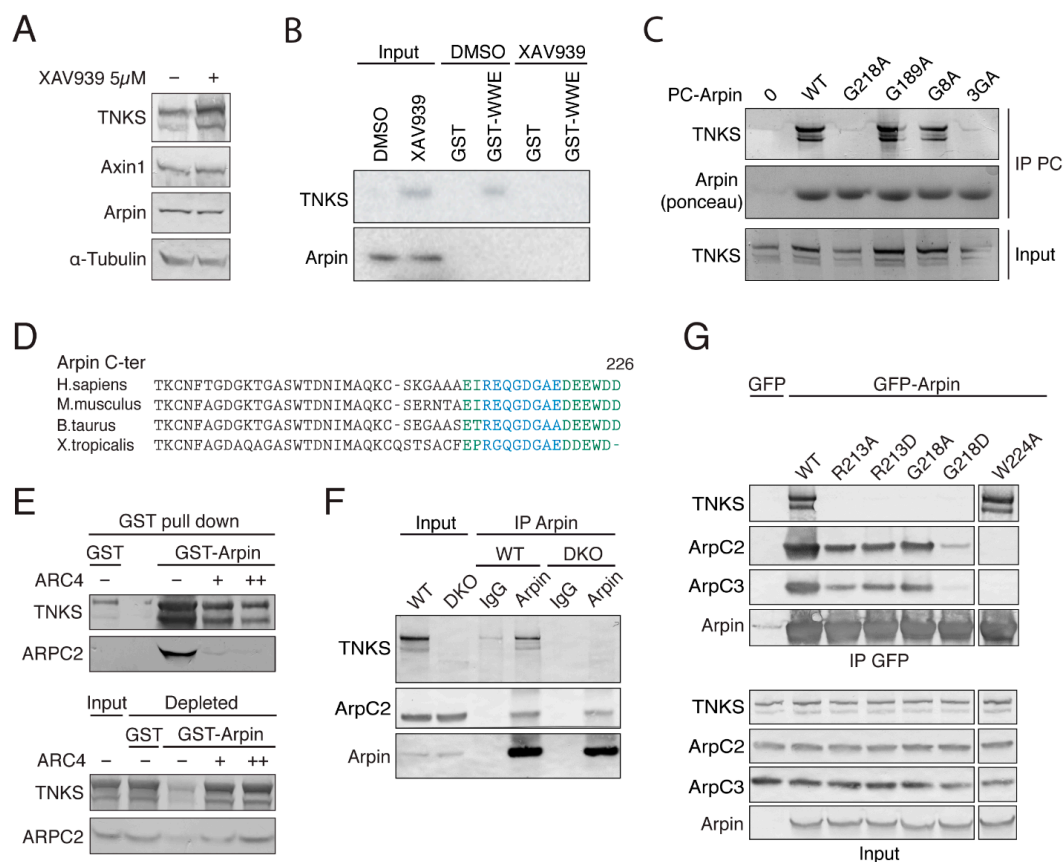


Figure 2. The Arpin–TNKS interaction does not appear to regulate the Arpin levels and requires a C-terminal consensus motif for TNKS binding. This consensus motif overlaps with the Arp2/3 interaction site, but TNKS does not modulate the Arpin–Arp2/3 interaction in cells. **(A)** The Arpin–TNKS interaction does not appear to regulate the Arpin levels. The 293T cells were treated with the TNKS inhibitor XAV939 or the vehicle for 24 h, and the lysates were analyzed by Western blots. **(B)** MEF lysates were subjected to GST pull-down using the WWE domain of E3 ligase RNF146, which recognizes PARylated proteins. XAV939 (1 μ M) was used to block TNKS catalytic activity. **(C)** The mapping of TNKS binding to Arpin. PC-tagged Arpin WT, G8A, G189A, G218A, and a triple-mutant G8A-G189A-G218A were transiently expressed in 293T cells. Anti-PC agarose beads were used to immunoprecipitate tagged Arpin. **(D)** TNKS (blue) and Arp2/3 (green)-binding sites overlap in the C-terminus acidic tail of Arpin. **(E)** TNKS binding competes with Arp2/3 binding in vitro. MEF lysates were incubated with purified GST or GST-Arpin immobilized on glutathione beads. Increasing concentrations of purified ARC4 were added to the lysate as indicated. GST beads, input lysate, and depleted lysates were analyzed by Western blots. **(F)** Lysates from WT and TNKS double-KO 293T cells were analyzed by Arpin immunoprecipitations with non-immune IgG as the control. **(G)** GFP-Arpin WT, R213A, R213D, G218A, G218D, and W224A were transiently expressed in 293T cells and immunoprecipitated.

We attempted to uncouple TNKS and Arp2/3 binding using mutations in the Arpin acidic tail. To prevent TNKS binding, we replaced R213 and G218 with A or D residues. Alanine substitutions are the most widely used ones to impair binding sites, but introducing aspartate increases the negative charge of the Arpin tail, a requisite for Arp2/3 binding [26]. To impair Arp2/3 binding, we substituted the conserved C-terminal tryptophan of Arpin with alanine (W224A). We expressed these mutant forms of Arpin in 293T cells and immunoprecipitated them to analyze their binding partners (Figure 2G). As expected, the TNKS interaction was undetectable when R213 or G218 of Arpin was mutated. The Arp2/3 interaction was below the detection limit with the W224A substitution. It was

also surprisingly affected by the G218D substitution, even though this mutation increased the overall acidity of the tail. G218D thus impaired both TNKS and Arp2/3 binding.

2.4. Arpin Controls the Ability of TNKS to Form Biomolecular Condensates

TNKS can homo- and hetero-oligomerize via their SAM motif [27]. The polymeric state reinforces the PARP activity of TNKS and is required for Wnt signaling [27,28]. Furthermore, when overexpressed, TNKS forms cytosolic aggregates [21,27–29]. We found that the aggregates formed by GFP-TNKS2 in transiently transfected MCF10A cells (Figure 3A) were dynamic, since they could fuse (Figure 3B) and quickly recover their fluorescence after photobleaching (Figure 3C). TNKS2 aggregates recovered up to 70% of their fluorescence intensity within 100 s. These properties suggested that GFP-TNKS2 aggregates underwent liquid–liquid phase separation and formed so-called biomolecular condensates [30]. Such condensates are often controlled by multivalent interactions. TNKS display five ARCs for each protomer of a multimer. The TNKS partners that display several binding sites, such as Axin [31], can bring together several multimeric TNKS units and may subsequently promote a liquid–liquid phase transition.

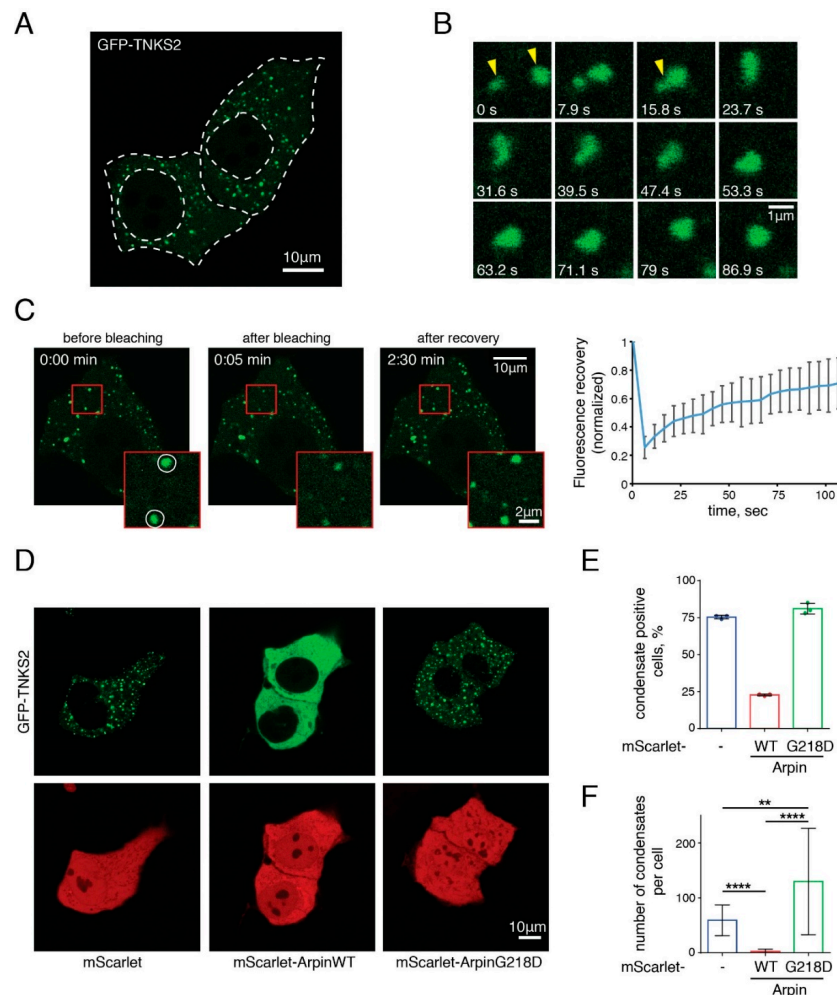


Figure 3. Arpin regulates the ability of TNKS to form biomolecular condensates. (A) GFP-TNKS2 was transiently expressed in MCF10A cells. White, dashed lines delimit the cell membranes and nuclei. (B) The fusion of two GFP-TNKS2 aggregates (yellow arrows) was imaged in a time-lapse series. (C) GFP-TNKS2 aggregates were analyzed by FRAP (bleached areas are indicated by white circles in the magnified image boxed in red). (D) The wild type or the G218D Arpin fused to mScarlet were co-expressed with GFP-TNKS2 in the MCF10A cells. (E) The quantification of the proportion of transfected cells that display TNKS2 condensates (3 biological replicates). (F) The quantification of the number TNKS2 condensates per cell (Kruskal–Wallis test, ** $p < 0.01$ and **** $p < 0.0001$).

We thus examined whether Arpin, which possesses a single binding site, might regulate the formation of biomolecular condensates by TNKS. As a negative control, we used the G218D mutant form, which displays reduced Arp2/3 binding, in addition to impaired TNKS interactions. When we co-expressed Arpin with GFP-TNKS2, wild-type Arpin, but not G218D Arpin, prevented the formation of TNKS condensates (Figure 3D). This behavior was different from the ones of endogenous or overexpressed Axin, which were reported to colocalize with TNKS condensates [27,28]. The co-expression of wild-type Arpin decreased the fraction of aggregate-positive cells (Figure 3E) and the number of condensates per cell (Figure 3F). Since these results were obtained in the context of TNKS overexpression, we also examined whether Arpin would exert this function on endogenous TNKS. In MCF10A cells, TNKS were diffusely localized in the cytoplasm of WT and *ARPIN* KO cells (Figure S2). Upon XAV939 treatment, TNKS exhibited condensation. No difference in TNKS condensation was observed between WT and *ARPIN* KO cells. Since the ability to form biomolecular condensates is thought to correspond to increased PARylation activity, we also examined the levels of TNKS and of their substrates Axin1 and PTEN. However, these levels were unchanged in *ARPIN* KO cells compared to parental cells (Figure S3). In conclusion, Arpin has a striking role in preventing TNKS from forming biomolecular condensates when both components are overexpressed, but the implications of this result at the endogenous level of expression are not clear.

2.5. The Arpin–TNKS Interaction Participates in the Regulation of Cell Migration

To examine the role of the Arpin–TNKS interaction, we used the MCF10A *ARPIN* KO cell line, previously generated using CRISPR/Cas9 [32], to isolate clones stably re-expressing exogenous WT Arpin or its derivatives. We first focused on two Arpin mutations, G218A and W224A, that impair TNKS and Arp2/3 binding, respectively (Figure 2G). Exogenous Flag-tagged Arpins were moderately overexpressed compared to the endogenous Arpin in the parental MCF10A cell line (Figure 4A). A major role of the Arp2/3 pathway in cell migration is to mediate migration persistence through positive feedback, and the Arp2/3 inhibitory protein Arpin antagonizes this role [4,6]. We recorded the random migration of single cells using these cell lines, extracted the cell trajectories, and analyzed them using DiPer software [33]. As previously reported [32], *ARPIN* KO cells exhibited higher migration persistence compared to parental MCF10A cells. The expression of wild-type Arpin fully rescued the *ARPIN* KO phenotype (Figure 4B). The W224A mutant form, whose interaction with Arp2/3 was impaired, partially rescued the phenotype almost as efficiently as wild-type Arpin. The G218A mutant form, which still binds to Arp2/3 but not to TNKS, also partially rescued the phenotype but less efficiently than W224A. All the migration parameters extracted from the cell trajectories are displayed in Figure S4 for reference, but the only parameter that was regulated by Arpin in all the cell systems was migration persistence, not speed or the mean square displacement [4,6,32]. These results suggested that the Arpin–TNKS interaction could regulate the migration persistence, but we sought to confirm them in cell clones where Arpin was not overexpressed.

For this purpose, we designed a GFP-Arpin Knock-In (KI) strategy. Briefly, we introduced two double-stranded breaks (DSBs) using CRISPR/Cas9 to excise the exons encoding the *ARPIN* open reading frame from *ARPIN* KO MCF10A cells and provided a donor plasmid encoding either GFP-Arpin WT, G218A, G218D, or W224A for Homology-Directed Repair (HDR; Figure 5A and the Methods section). GFP-Arpin expression was confirmed by Western blotting in stable clones isolated upon puromycin selection (Figure 5B). Indeed, transgene expression was, overall, at the endogenous level, even though differences could still be observed between the constructs and clones. Due to low GFP-Arpin expression levels, we performed immunofluorescence staining of fixed cells to enhance the signal. All forms of GFP-Arpin were distributed throughout the cytoplasm and the nucleus, similar to endogenous Arpin (Figure S5).

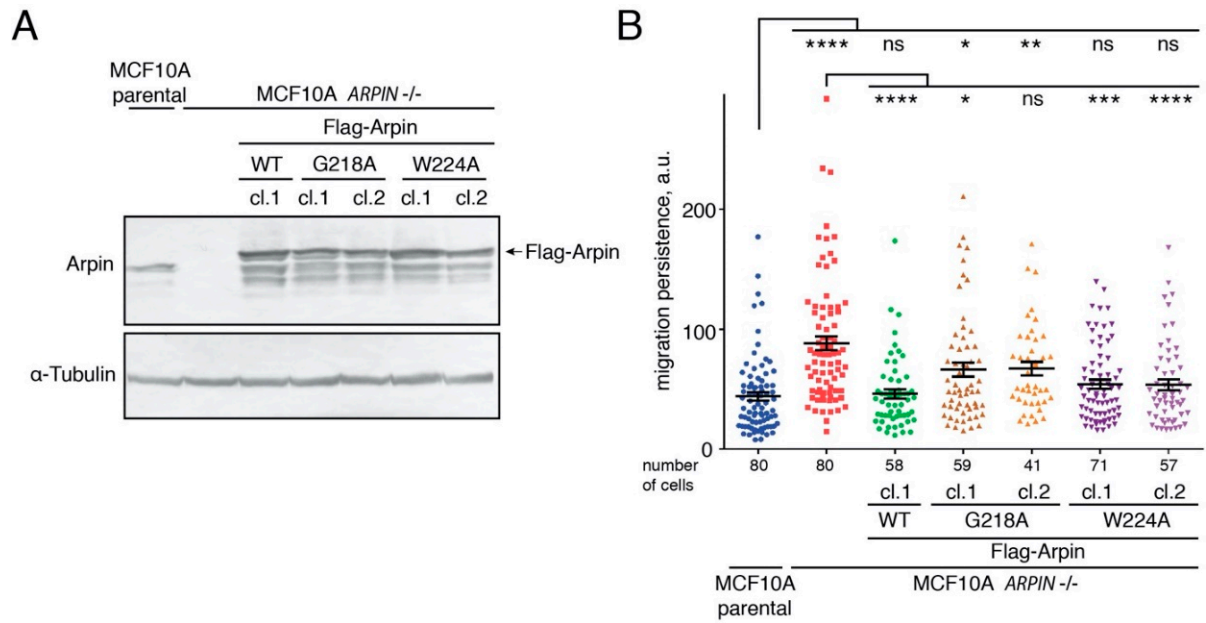


Figure 4. The Arpin–TNKS interaction is important for the control of cell migration persistence. **(A)** Stable clones expressing Flag-Arpin WT, Flag-Arpin G218A, and Flag-Arpin W224A after plasmid random integrations were generated from the *ARPIN* KO MCF10A cell line. Endogenous and exogenous Arpins were revealed by Western blotting using Arpin antibodies. **(B)** The random migration of single cells was tracked for 7 h, and the migration persistence was extracted from the trajectories (Kruskal–Wallis test, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, and **** $p < 0.0001$; the number of cells ranged from 41 to 80).

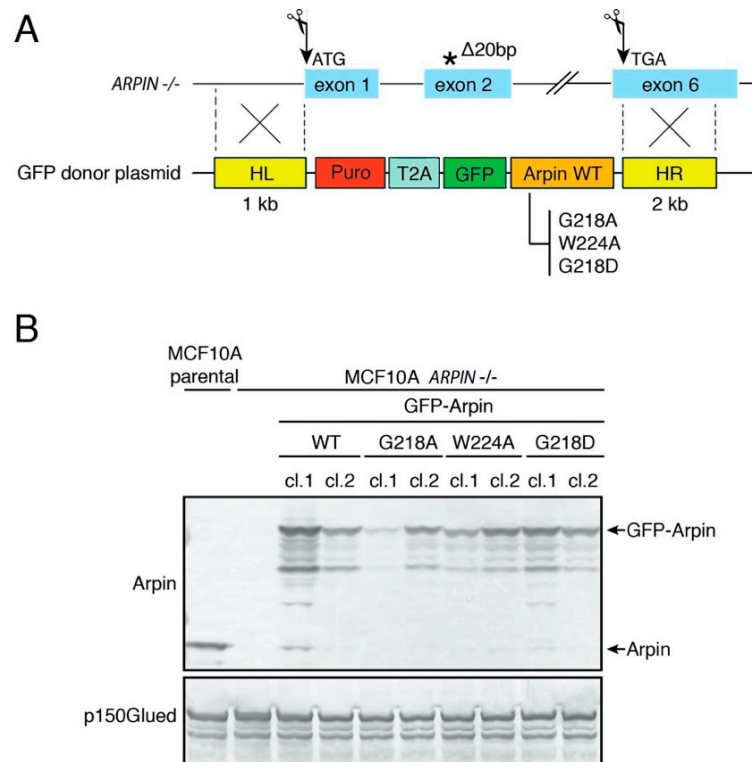


Figure 5. Cont.

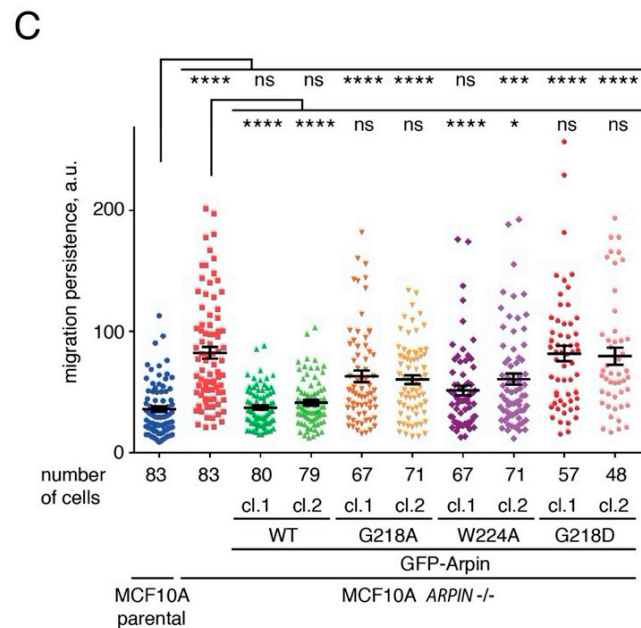


Figure 5. The Arpin–TNKS interaction controls cell migration persistence. (A) A scheme of the knock-in strategy used to rescue *ARPIN* KO cells. Two gRNAs allowing the excision of the whole Arpin locus were designed. The premature stop codon that appears due to a 20-bp deletion is indicated by an asterisk. Homology-directed repair was used to integrate selectable donor cassettes. The cassettes contained a single Open Reading Frame encoding the puromycin resistance gene, the viral self-cleaving T2A peptide, GFP and Arpin WT, G218A, W224A, or G218D. (B) The expression of GFP-Arpin WT and mutant forms in selected cell lines was assessed by Western blotting using anti-Arpin antibodies. (C) The migration persistence was extracted from the trajectories of randomly migrating single cells (Kruskal–Wallis test, * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, and **** $p < 0.0001$; the number of cells ranged from 47 to 83).

We then performed the single-cell migration assay on the obtained KI clones. WT Arpin fully rescued the *ARPIN* KO phenotype (Figure 5C). Near-total rescue was also observed in the case of W224A Arpin. The phenotypical variation between the clones was not an effect of the expression levels. The G218A Arpin provided a partial rescue that failed to reach significance, indicating that this mutation that abolished TNKS binding had a greater effect than W224A in the KI, as well as in the overexpression system. Only G218D Arpin with an impaired interaction with both Arp2/3 and TNKS was completely unable to rescue the *ARPIN* KO phenotype. All the migration parameters extracted from the cell trajectories are displayed in Figure S6 for reference. These results suggest that the interactions of Arpin with Arp2/3 and TNKS represent two independent pathways that both regulate cell migration.

3. Discussion

Here, we report that TNKS are major Arpin-interacting partners in the cell. TNKS bind to Arpin's exposed C-terminal tail that protrudes from a folded core domain [5]. The C-terminal tail carries the previously reported Arp2/3 inhibitory binding site [4]. The TNKS-binding site overlaps with the Arp2/3-binding site within the Arpin tail, and we found that one ARC of TNKS can displace the Arp2/3 bound to the tail of Arpin in vitro. However, this competition does not appear to occur in vivo, since the amount of Arp2/3 bound to Arpin does not increase in TNKS double-KO cells. Arpin is thought to bind Arp2/3 at the lamellipodial edge in response to Rac1 signaling. The results obtained here rather suggest that Arpin binds to TNKS in a diffuse manner in the cytosol or the nucleus. In the cell, the lack of competition of Arp2/3 and TNKS for Arpin binding might be due to the fact that these two partners bind Arpin in different locations.

Our analysis of the point mutations of the Arpin tail suggests that Arp2/3 and TNKS are both important for the regulation of migration persistence. Indeed, point mutations that specifically impair binding to either of the Arpin partners display only a partial loss of activity, even in a clean KI context with endogenous levels of expression. In contrast, the G218D mutation that significantly impairs binding to both Arp2/3 and TNKS displayed a clear loss of function. Previously, we reported that the deletion of the whole C-terminal tail fully inactivated Arpin [4]. This is consistent with our current results, but it can no longer be attributed solely to the abolishment of Arp2/3 binding. TNKS binding to Arpin participates in the regulation of migration persistence independently of Arp2/3 binding (Figure 6).

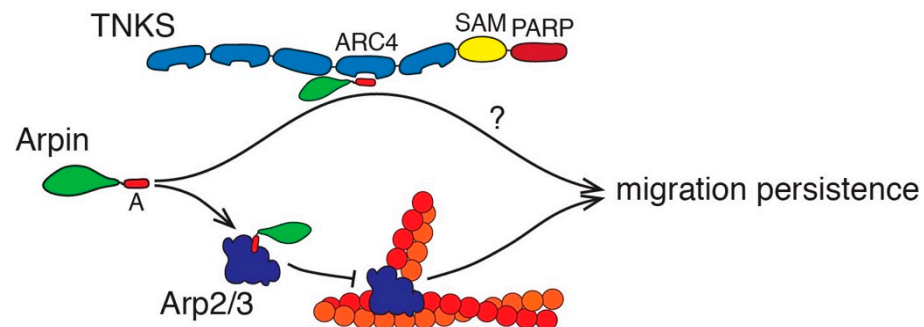


Figure 6. Working model. Arpin controls migration persistence through two pathways. The acidic tail (A) of Arpin binds to Arp2/3 and to Tankyrases (TNKS). TNKS are modular proteins composed of 5 Ankyrin Repeat Clusters (ARC), an oligomerization domain (Sterile Alpha Motif; SAM), and a catalytic domain (Poly ADP Ribosyl Polymerase; PARP). Arpin binds to ARC. Arpin, as a monomeric ligand of ARC, prevents the biomolecular condensation of TNKS. The mechanism, whereby the Arpin–TNKS interaction regulates the migration persistence, remains to be established.

TNKS were previously implicated in the regulation of cell migration. Since TNKS are overall overexpressed in several cancer types and are promising targets to block the Wnt pathway in particular, the pharmacological inhibition of TNKS or their siRNA-mediated depletion was tested and shown in numerous studies to decrease the migration and invasion of cancer cell lines [34–41]. Given the plethora of TNKS partners, the mechanisms at play may not be the same in all cell systems. One TNKS partner, TNKS1BP1, which is PARylated, negatively regulates cancer cell invasion by interacting with the capping protein and decreasing the actin filament dynamics [42]. TNKS1BP1 is downregulated in pancreatic cancer.

Here, we report that TNKS aggregates possess the properties of biomolecular condensates and that Arpin dissolves these condensates upon overexpression. Biomolecular condensates correspond to liquid–liquid phase separation due to multimeric proteins and multimeric ligands [43]. TNKS possess multiple ARCs and oligomerize through their SAM motif [27,28]. The presence of multivalent ligands induces TNKS condensation [44]. On the contrary, Arpin is a monomeric protein with a single TNKS-binding site that fits very well in the consensus motif defined by the peptide display library [10]. Overexpressed Arpin is thus likely to saturate functional ARCs of TNKS, resulting in the displacement of endogenous multivalent ligands and the subsequent dissolution of TNKS condensates. However, at the endogenous levels of expression, we did not detect a role for Arpin either in TNKS condensation or in the efficiency with which TNKS regulate their substrates. Therefore, it is still unclear at this point how Arpin controls TNKS and how TNKS control the migration persistence.

Biomolecular condensation might play a role in tumor cells where TNKS are overexpressed. However, it should be stressed that Arpin is, on the contrary, downregulated in tumors compared to normal adjacent tissues [45–48]. Since the Arpin and TNKS levels vary in opposite directions in cancers, the interaction between Arpin and TNKS reported here

might be more important in the regulation of cell migration in untransformed cells than in tumor cells. In untransformed cells, such as MCF10A cells, Arpin appears to control the migration persistence through a two-pronged mechanism, involving the independent binding of Arp2/3 or TNKS to the same binding site of Arpin.

4. Materials and Methods

4.1. Plasmids, gRNAs, and Transfection

For expression in 293 Flp-In cells, human Arpin ORF was cloned in pcDNA5 FRT His PC TEV Blue between the FseI and AscI sites. The 293 Flp-In stable cell line expressing PC Arpin was obtained as previously described [49]. For the yeast two-hybrid screening, full-length human Arpin was cloned into pB27 in fusion with the LexA DNA-binding domain. A random primed cDNA library from human placenta was screened by Hybrigenics using a mating protocol and 2 mM 3-aminotriazole to reduce the background. Arpin G8A, G189A, G218A, triple G8A-G189A-G218A, R213A, R213D, G218D, and W224A mutants were obtained in pcDNA5 His PC TEV Arpin plasmid using the QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). ORFs encoding Arpin WT and mutant forms were subcloned between the FseI and AscI sites into custom-made pcDNAm FRT PC GFP, MXS PGK ZeoM bGHpA EF1Flag mScarlet Blue2 SV40pA, and MXS EF1Flag Blue2 SV40pA PGK Blasti bGHpA plasmids.

The 293T cells were transfected using Calcium Phosphate or Lipofectamine 3000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). The 293T *ARPIN* KO cell line (clone #44) was generated with the CRISPR/Cas9 system, as previously described for MCF10A cells [32]. Stable MCF10A cells expressing Flag-Arpin WT, Flag-Arpin G218A, and Flag-Arpin W224A were obtained in MCF10A *ARPIN* KO cells [32] by transfecting with the custom-made MXS plasmids described above using Lipofectamine 3000 (Thermo Fisher Scientific). Cells were selected with 10 µg/mL of Blasticidin (InvivoGen, San Diego, CA, USA). Individual clones were picked with cloning rings, and Flag-Arpin expression was verified by Western blotting. MCF10A Arpin KI cell lines were generated with the CRISPR/Cas9 system. The following targeting sequences were used: 5'-TCCCGACCGCCCGGGCACCC-3' targets before the ATG codon in exon1 and 5'-GATTTCTCTAGGATGACTGA-3' targets after the Stop codon in exon6 of Arpin. These sequences were flanked by the BbsI restriction site. Corresponding oligonucleotides were annealed and cloned in the pX330 plasmid expressing human SpCas9 protein (Addgene #42230). The donor plasmids were constructed as follows. The sequences were amplified by PCR with Phusion polymerase (Thermo Fisher Scientific): the Arpin homology arm right (HR) flanking Cas9-targeted site was amplified from genomic DNA extracted from wild-type MCF10A cells (NucleoSpin tissue extraction kit, Macherey-Nagel, Düren, Germany), and Puro-T2A were amplified from the custom-made plasmid MXS Puro bGHpA using primers containing the T2A sequence. Amplified sequences were checked by Sanger sequencing. Arpin homology arm left (HL) was synthesized by Eurofins. The donor cassette was constructed by assembling HL, Puro-T2A, GFP-Blue2, and HR by MXS-Chaining [50]. Full-length ORFs encoding Arpin WT, G218A, G218D, and W224A were then subcloned in the constructed donor plasmid between the FseI and AscI sites. MCF10A *ARPIN* KO cells were transfected with the Cas9- and gRNA-containing pX330 plasmid and the donor plasmids described above using Lipofectamine 3000 (Thermo Fisher Scientific). Cells were selected with 0.5 µg/mL of puromycin (InvivoGen). Single clones were picked with cloning rings, expanded, and analyzed by Western blotting.

4.2. Cell Culture and Drugs

MCF10A cells were maintained in DMEM/F12 medium (Thermo Fisher Scientific) supplemented with 5% horse serum (Sigma, Hongkong, China), 100 ng/mL cholera toxin (Sigma), 20 ng/mL epidermal growth factor (Sigma), 0.01-mg/mL insulin (Sigma), 500 ng/mL hydrocortisone (Sigma), and 100 U/mL penicillin/streptomycin (Thermo Fisher Scientific). The 293, 293T, MEF, and HeLa cells were maintained in DMEM medium (Thermo

Fisher Scientific) supplemented with 10% fetal bovine serum (Thermo Fisher Scientific) and 100-U/mL penicillin/streptomycin (Thermo Fisher Scientific). Cells were incubated at 37 °C in 5% CO₂. All cells and stable clones were routinely tested for mycoplasma and found to be negative. The TNKS inhibitor XAV939 was from Sigma. The 293T parental and TNKS double-KO cell lines were kindly provided by Dr. S. Smith, Skirball Institute, New York School of Medicine.

4.3. Immunoprecipitation and GST Pulldown

The 293 cells stably expressing His-PC-Arpin or the empty plasmid as a control (Figure 1) were lysed in 50 mM Hepes, pH 7.7, 150 mM NaCl, 1 mM CaCl₂, 1% NP40, 0.5% Na Deoxycholate, and 0.1% SDS 1% supplemented with a protease inhibitor cocktail (Roche, Basel, Switzerland). Clarified lysates were incubated with 10 µL of HPC4-coupled beads (Sigma) for 3 h at 4 °C. After 5 washes in the same buffer, beads were analyzed by SDS-PAGE. For TNKS identification, tryptic peptides were analyzed by Nano-LC-MS/MS analyses using a LTQ Orbitrap Velos mass spectrometer (Thermo Scientific) coupled to the EASY nLC II high-performance liquid chromatography system (Proxeon, Thermo Scientific). Peptide separation was performed on a reverse-phase C18 column (Nikkyo Technos, Tokyo, Japan). Nano-LC-MS/MS experiments were conducted in a data-dependent acquisition method by selecting the 20 most intense precursors for CID fragmentation and analysis in the LTQ. Data were processed with Proteome Discoverer 1.3 software, and protein identification was performed using the Swiss-Prot database and MASCOT search engine (Matrix Science, Merrillville, IN, USA).

For PC immunoprecipitation of PC-Arpin WT or mutants (Figure 2), 293T cell lysates were lysed in 50 mM KCl, 10 mM Hepes, pH 7.7, 1 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, and 1% Triton TX100 supplemented with a protease inhibitor cocktail (Roche). Twenty microliters of HPC4 beads were supplied with 1 mM Ca²⁺, protease inhibitor cocktail (Roche), and 2 µM ADP HDP PARG inhibitor (Merck Millipore, Burlington, MA, USA). Beads were incubated with extracts for 1 h at 4 °C, washed 5 times in the same buffer, and analyzed by Western blotting. For GFP immunoprecipitation (Figure 2), 293T cells transiently transfected with GFP-Arpin were lysed in 50 mM KCl, 10 mM Hepes, pH 7.7, 1 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, and 1% Triton TX100 supplemented with a protease inhibitor cocktail (Roche). Extracts were incubated with anti-GFP agarose beads (GFP-trap, Chromotek, Planegg, Germany) for 2 h at 4 °C, washed 5 times in the same buffer, and analyzed by Western blotting.

For the immunoprecipitation of endogenous Arpin, 293T cells were lysed in 50 mM KCl, 10 mM Hepes, pH 7.7, 1 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, and 1% Triton TX100 supplemented with a protease inhibitor cocktail (Roche). Clarified extracts were incubated for 2 h with agarose beads previously coupled to 10 µg of nonimmune rabbit IgG or 10 µg of affinity-purified Arpin antibodies (according to the manufacturer's protocols; AminoLink Coupling Resin, Thermo Fisher Scientific). Beads were incubated with extracts for 2 h at 4 °C, washed 5 times in the same buffer, and analyzed by Western blotting. HeLa cell pellets were lysed in 50 mM Hepes, pH 7.7, 150 mM NaCl, 1 mM CaCl₂, 1% NP40, 0.5% Na Deoxycholate, and 0.1% SDS 1% supplemented with a protease inhibitor cocktail (Roche). Twenty micrograms of GST fusion protein, and 20 µL of Glutathione Sepharose 4B Beads (GE Healthcare, Chicago, IL, USA) were incubated with 1 mL of HeLa cell extract for 2 h at 4 °C. When indicated, purified ARC4 protein is added into the mixture to complete the interaction. Beads were washed 5 times in the same buffer and analyzed by Western blotting.

4.4. SEC-MALS

For SEC-MALS, purified proteins were separated in a 15-mL KW-803 column (Shodex, Shanghai, China) run on a Shimadzu HPLC system. MALS, QELS, and RI measurements were achieved with a MiniDawn Treos, a WyattQELS, and an Optilab T-rEX (all from Wyatt Technology, Santa Barbara, CA, USA), respectively. Mass calculations were performed with ASTRA VI software (Wyatt Technology) using a dn/dc value of 0.183 mL·g⁻¹.

4.5. Protein Purification and Analysis of Arpin Expression

Arpin was cloned into the pET28 vector and produced as a N-terminal 6xHis-tagged protein. Expression was done in *E. coli* Rosetta(DE3)pLysS by the addition of 0.5 mM IPTG followed by overnight incubation at 25 °C. The bacterial pellet was resuspended in 50 mM Tris, pH 8.0, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole, 0.25-mg/mL lysozyme, and EDTA-free protease inhibitor cocktail (Roche). Lysis was carried out by sonication. Arpin was purified from the soluble fraction by Ni²⁺-affinity chromatography (HisTrap HP, GE Healthcare) using 125 mM imidazole for elution, followed by size exclusion chromatography on a Superdex 75 16/60 HL column (GE Healthcare) equilibrated in 20 mM Hepes, pH 8.0, and 100 mM KCl. ARC4 from TNKS2 was expressed and purified as already described [5]. For pulldown assays, the WWE domain of RNF146 (amino acids 100–175) and Arpin were cloned in a modified pGEX vector containing a TEV protease cleavage site after the GST moiety that was not used here. GST fusion proteins were purified on glutathione-sepharose beads using a standard protocol. Purity was followed by SDS-PAGE, and the concentration of purified proteins was estimated by UV spectrophotometry using theoretical extinction coefficients at 280 nm.

4.6. SDS-PAGE, Western Blots, and Antibodies

For analysis of the Arpin expression, MCF10A cells were lysed in RIPA buffer (50 mM Hepes, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% DOC, 0.1% SDS, and 1 mM CaCl₂) supplemented with the EDTA-free protease inhibitor cocktail (Roche), and the lysates were clarified and analyzed by Western blotting.

SDS-PAGE was performed using NuPAGE 4–12% Bis-Tris gels (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). For Western blots, the proteins were transferred using the iBlot system (Life Technologies, Invitrogen) and developed using HRP-coupled antibodies, a Supersignal kit (Pierce, Thermo Fisher Scientific), and a LAS-3000 imager (Fujifilm, Tokyo, Japan) or AP-coupled antibodies and NBT/BCIP as substrates (Promega, Madison, WI, USA).

Rabbit polyclonal antibodies obtained and purified using full-length Arpin were previously described [4]. The following commercial antibodies were used: TNKS1/2 pAb (H-350, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA), ArpC2 pAb (Millipore, Burlington, MA, USA), ArpC3 pAb (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), α -Tubulin mAb (Sigma), Axin1 mAb (C76H11, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), and PTEN pAb (Cell Signaling Technology, #9552).

4.7. Immunofluorescence

For immunofluorescence, MCF10A cells were seeded on glass coverslips coated with 20 μ g/mL bovine fibronectin (Sigma) for 1 h at 37 °C in PBS. Then, cells were fixed with 4% paraformaldehyde, permeabilized in 0.5% Triton X-100, and blocked in 0.1% Triton X-100 and 2% bovine serum albumin (BSA; Sigma) in PBS for 1 h at RT. Coverslips were incubated with the indicated primary antibodies for 1 h at RT, then with anti-rabbit IgG antibodies conjugated with Alexa Fluor 488 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Imaging was performed on an Axio Observer microscope (Zeiss, Jena, Germany) with the 63 \times /1.4 oil objective.

4.8. Live Confocal Imaging

GFP-TNKS2 condensates were imaged using a confocal laser scanning microscope (TCS SP8, Leica, Wetzlar, Germany) equipped with an inverted frame (Leica), a high NA oil immersion objective (HC PL APO 63 \times /1.40, Leica), and a white light laser (WLL; Leica). The acquisition was performed using LASX software. To capture condensate fusion events, GFP-TNKS2 expressing cells were imaged every 0.79 s for 158 s. For the FRAP experiment, single GFP-TNKS2 condensates were bleached during 1.5 s and imaged every 5 s for 105 s. The aggregate intensity was manually normalized to the background, and the recovery curve presents the mean intensity and standard deviation (SD) ($n = 30$ condensates from

16 cells). To measure the fraction of cells with detectable condensates ($n > 1$), MCF10A cells co-expressing GFP-TNKS2 and mScarlet, mScarlet-Arpin WT, or the G218D mutant were imaged (data from 3 independent experiments with at least 115 cells analyzed for each condition are represented). The total quantity of GFP-TNKS2 aggregates per cell was measured in 3 independent experiments. Images were analyzed in ImageJ as follows: first, the MaxEntropy threshold was applied, and then, the number of condensates was counted with the Analyse Particles function (size > 0.15 μm ; measures from 60 cells were pooled).

4.9. Live Imaging and Analysis of Cell Migration and Statistics

MCF10A cells were seeded onto glass-bottomed μ -Slide (Ibidi, Gräfelfing, Germany) coated with 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of fibronectin (Sigma). Imaging was performed on an Axio Observer microscope (Zeiss) equipped with a Plan-Apochromat $10\times/0.25$ air objective; the Hamamatsu camera C10600 OrcaR2; and the Pecon Zeiss incubator XL multi S1 RED LS (Heating Unit XL S, Temp module, CO_2 module, Heating Insert PS, and CO_2 cover). Images were acquired every 10 min for 24 h. Single-cell trajectories were obtained by tracking cells with ImageJ and analyzed using DiPer software [33] to obtain the migration parameters: directional autocorrelation, mean square displacement, average cell speed, and single-cell trajectories plotted at the origin. Data from two (Flag-Arpin cell lines) or three (GFP-Arpin knock-in cell lines) independent experiments were pooled for the analysis and plotted. The results are expressed as the means and standard errors of the mean (s.e.m). The average cell speed was analyzed using GraphPad software with the Kruskal–Wallis test. For migration persistence, a statistical analysis was performed using R. Persistence, measured as the movement autocorrelation over time was fit for each cell by an exponential decay with a plateau (as described in reference [51]):

$$A = (1 - A_{min}) * e^{-\frac{t}{\tau}} + A_{min}$$

where A is the autocorrelation, t the time interval, A_{min} the plateau, and τ the time constant of decay. The plateau value A_{min} is set to zero for the cell lines in vitro, as they do not display overall directional movement. The time constant τ of the exponential fits were then plotted and compared using the Kruskal–Wallis test. Four levels of statistical significance were defined: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, and **** $p < 0.0001$.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms22084115/s1>: Figure S1: The purity of the recombinant proteins used in the study. Figure S2: Immunofluorescence staining of TNKS in MCF10A WT and *ARIPN* KO cells treated with XAV939. Figure S3: Arpin overexpression increases the TNKS protein levels. Figure S4: A single-cell migration assay of stable MCF10A clones expressing WT, G218A, and W224A Flag-Arpin. Figure S5: The immunofluorescence of Arpin in MCF10A parental cells and *ARIPN* knockout and knock-in clones. Figure S6: A single-cell migration assay of *ARIPN* knock-in MCF10A clones.

Author Contributions: Conceptualization and methodology: G.S., A.I.F. and A.M.G. investigation, validation, formal analysis, and visualization: G.S., I.D., K.O., V.C. and J.C. writing of the original draft: G.S. Writing: review and editing: G.S. and A.M.G. Project administration, supervision, resources, and funding acquisition: A.M.G. All authors have read and agreed to submitting the manuscript.

Funding: This research was funded by grants from the Agence Nationale de la Recherche (ANR ANR-15-CE13-0016-01) and from the Institut National du Cancer (INCA_6521).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: We thank Susan Smith for the kind gift of the TNKS double-KO cell line; Véronique Henriot, Anaïs Pitarch, Angelina Chemeris, and Sai P. Visweshwaran for technical support; Marc Lavielle and Chuang Yu for their help with the statistical tools; and Svetlana Rubtsova for

the English corrections. This work was supported by the French Infrastructure for Integrated Structural Biology (FRISBI) ANR-10-INBS-05-01. We thank Manuela Argentini and Christophe Velours from the I2BC facilities in Gif-sur-Yvette for the mass spectrometry analyses (SICaPS) and for the SEC-MALS, respectively. We thank the Polytechnique Bioimaging Facility for assistance with live imaging by using their equipment, which was partly supported by Région Ile-de-France (interDIM) and Agence Nationale de la Recherche (ANR-11-EQPX-0029 Morphoscope2, ANR-10-INBS-04 France BioImaging).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Abbreviations

ARC	Ankyrin Repeat Cluster
DSB	Double-Stranded Break
FRAP	Fluorescence Recovery After Photobleaching
KI	Knock-in
KO	Knockout
HDR	Homology-Directed Repair
MEF	Murine Embryonic Fibroblast
NPF	Nucleation-Promoting Factor
PARP	Poly ADP Ribose Polymerase
PC	Protein C
SAM	Sterile Alpha Motif
SEC-MALS	Size Exclusion Chromatography–Multi-Angle Light Scattering
TNKS	Tankyrases
WT	Wild type

References

- Ridley, A.J. Life at the Leading Edge. *Cell* **2011**, *145*, 1012–1022. [[CrossRef](#)]
- Steffen, A.; Koestler, S.A.; Rottner, K. Requirements for and consequences of rac-dependent protrusion. *Eur. J. Cell Biol.* **2014**, *93*, 184–193. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Molinie, N.; Gautreau, A. The Arp2/3 regulatory system and its deregulation in cancer. *Physiol. Rev.* **2017**, *98*, 215–238. [[CrossRef](#)]
- Dang, I.; Gorelik, R.; Sousa-Blin, C.; Derivery, E.; Guérin, C.; Linkner, J.; Nemethova, M.; Dumortier, J.G.; Giger, F.A.; Chipysheva, T.A.; et al. Inhibitory signalling to the Arp2/3 complex steers cell migration. *Nature* **2013**, *503*, 281–284. [[CrossRef](#)]
- Fetics, S.; Thureau, A.; Campanacci, V.; Aumont-Nicaise, M.; Dang, I.; Gautreau, A.; Pérez, J.; Cherfils, J. Hybrid structural analysis of the Arp2/3 regulator arpin identifies its acidic tail as a primary binding epitope. *Structure* **2016**, *24*, 252–260. [[CrossRef](#)]
- Krause, M.; Gautreau, A. Steering cell migration: Lamellipodium dynamics and the regulation of directional persistence. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2014**, *15*, 577–590. [[CrossRef](#)]
- Dimchev, V.; Lahmann, I.; Koestler, S.A.; Kage, F.; Dimchev, G.; Steffen, A.; Stradal, T.E.B.; Vauti, F.; Arnold, H.-H.; Rottner, K. Induced Arp2/3 complex depletion increases FMNL2/3 formin expression and filopodia formation. *Front. Cell Dev. Biol.* **2021**, *9*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Gorelik, R.; Gautreau, A. The Arp2/3 inhibitory protein arpin induces cell turning by pausing cell migration. *Cytoskeleton* **2015**, *72*, 362–371. [[CrossRef](#)]
- Hsiao, S.J.; Smith, S. Tankyrase function at telomeres, spindle poles, and beyond. *Biochimie* **2008**, *90*, 83–92. [[CrossRef](#)]
- Guettler, S.; LaRose, J.; Petsalaki, E.; Gish, G.; Scotter, A.; Pawson, T.; Rottapel, R.; Sicheri, F. Structural Basis and sequence rules for substrate recognition by tankyrase explain the basis for cherubism disease. *Cell* **2011**, *147*, 1340–1354. [[CrossRef](#)]
- Smith, S.; Giriat, I.; Schmitt, A.; de Lange, T. Tankyrase, a Poly(ADP-Ribose) polymerase at human telomeres. *Science* **1998**, *282*, 1484–1487. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Chang, P.; Coughlin, M.; Mitchison, T.J. Tankyrase-1 polymerization of poly(ADP-Ribose) is required for spindle structure and function. *Nat. Cell Biol.* **2005**, *7*, 1133–1139. [[CrossRef](#)]
- Chang, W.; Dynek, J.N.; Smith, S. NuMA is a major acceptor of poly(ADP-Ribosyl)ation by tankyrase 1 in mitosis. *Biochem. J.* **2005**, *391*, 177–184. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Riffell, J.L.; Lord, C.J.; Ashworth, A. Tankyrase-targeted therapeutics: Expanding opportunities in the PARP family. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2012**, *11*, 923–936. [[CrossRef](#)]
- Kim, M.K.; Dudognon, C.; Smith, S. Tankyrase 1 regulates centrosome function by controlling CPAP stability. *EMBO Rep.* **2012**, *13*, 724–732. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Huang, S.-M.A.; Mishina, Y.M.; Liu, S.; Cheung, A.; Stegmeier, F.; Michaud, G.A.; Charlat, O.; Wielle, E.; Zhang, Y.; Wiessner, S.; et al. Tankyrase inhibition stabilizes axin and antagonizes wnt signalling. *Nature* **2009**, *461*, 614–620. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

17. Wang, W.; Li, N.; Li, X.; Tran, M.K.; Han, X.; Chen, J. Tankyrase inhibitors target YAP by stabilizing angiomin family proteins. *Cell Rep.* **2015**, *13*, 524–532. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Eisemann, T.; McCauley, M.; Langelier, M.-F.; Gupta, K.; Roy, S.; Van Duyne, G.D.; Pascal, J.M. Tankyrase-1 ankyrin repeats form an adaptable binding platform for targets of ADP-ribose modification. *Structure* **2016**, *24*, 1679–1692. [[CrossRef](#)]
19. Zhang, Y.; Liu, S.; Mickanin, C.; Feng, Y.; Charlat, O.; Michaud, G.A.; Schirle, M.; Shi, X.; Hild, M.; Bauer, A.; et al. RNF146 is a poly(ADP-Ribose)-directed E3 ligase that regulates axin degradation and wnt signalling. *Nat. Cell Biol.* **2011**, *13*, 623–629. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Bhardwaj, A.; Yang, Y.; Ueberheide, B.; Smith, S. Whole Proteome analysis of human tankyrase knockout cells reveals targets of tankyrase-mediated degradation. *Nat. Commun.* **2017**, *8*. [[CrossRef](#)]
21. Li, X.; Han, H.; Zhou, M.-T.; Yang, B.; Ta, A.P.; Li, N.; Chen, J.; Wang, W. Proteomic Analysis of the human tankyrase protein interaction network reveals its role in pexophagy. *Cell Rep.* **2017**, *20*, 737–749. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Bae, J.; Donigian, J.R.; Hsueh, A.J.W. Tankyrase 1 interacts with MCL-1 proteins and inhibits their regulation of apoptosis. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 5195–5204. [[CrossRef](#)]
23. Bisht, K.K.; Dudognon, C.; Chang, W.G.; Sokol, E.S.; Ramirez, A.; Smith, S. GDP-mannose-4,6-Dehydratase is a cytosolic partner of tankyrase 1 that inhibits its poly(ADP-Ribose) polymerase activity. *Mol. Cell. Biol.* **2012**, *32*, 3044–3053. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Kuusela, S.; Wang, H.; Wasik, A.A.; Suleiman, H.; Lehtonen, S. Tankyrase inhibition aggravates kidney injury in the absence of CD2AP. *Cell Death Dis.* **2016**, *7*, e2302. [[CrossRef](#)]
25. Perdreau-Dahl, H.; Progida, C.; Barfeld, S.J.; Guldsten, H.; Thiede, B.; Arntzen, M.; Bakke, O.; Mills, I.G.; Krauss, S.; Morth, J.P. Sjögren syndrome/scleroderma autoantigen 1 is a direct tankyrase binding partner in cancer cells. *Commun. Biol.* **2020**, *3*, 1–11. [[CrossRef](#)]
26. Pollard, T.D. Regulation of actin filament assembly by Arp2/3 complex and formins. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2007**, *36*, 451–477. [[CrossRef](#)]
27. Mariotti, L.; Templeton, C.M.; Raney, M.; Paracuellos, P.; Cronin, N.; Beuron, F.; Morris, E.; Guettler, S. Tankyrase requires SAM domain-dependent polymerization to support Wnt- β -Catenin signaling. *Mol. Cell* **2016**, *63*, 498–513. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Riccio, A.A.; McCauley, M.; Langelier, M.-F.; Pascal, J.M. Tankyrase sterile α motif domain polymerization is required for its role in wnt signaling. *Structure* **2016**, *24*, 1573–1581. [[CrossRef](#)]
29. De Rycker, M.; Price, C.M. Tankyrase Polymerization is controlled by its sterile alpha motif and poly(ADP-Ribose) polymerase domains. *Mol. Cell. Biol.* **2004**, *24*, 9802–9812. [[CrossRef](#)]
30. Alberti, S.; Gladfelter, A.; Mittag, T. Considerations and challenges in studying liquid-liquid phase separation and biomolecular condensates. *Cell* **2019**, *176*, 419–434. [[CrossRef](#)]
31. Morrone, S.; Cheng, Z.; Moon, R.T.; Cong, F.; Xu, W. Crystal structure of a tankyrase-axin complex and its implications for axin turnover and tankyrase substrate recruitment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 1500–1505. [[CrossRef](#)]
32. Molinie, N.; Rubtsova, S.N.; Fokin, A.; Visweshwaran, S.P.; Rocques, N.; Polesskaya, A.; Schnitzler, A.; Vacher, S.; Denisov, E.V.; Tashireva, L.A.; et al. Cortical branched actin determines cell cycle progression. *Cell Res.* **2019**, *29*, 432–445. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Gorelik, R.; Gautreau, A. Quantitative and unbiased analysis of directional persistence in cell migration. *Nat. Protoc.* **2014**, *9*, 1931–1943. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Bao, R.; Christova, T.; Song, S.; Angers, S.; Yan, X.; Attisano, L. Inhibition of tankyrases induces axin stabilization and blocks wnt signalling in breast cancer cells. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e48670. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Kang, H.-W.; Wang, F.; Wei, Q.; Zhao, Y.-F.; Liu, M.; Li, X.; Tang, H. MiR-20a promotes migration and invasion by regulating TNKS2 in human cervical cancer cells. *FEBS Lett.* **2012**, *586*, 897–904. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Tian, X.; Hou, W.; Bai, S.; Fan, J.; Tong, H.; Xu, H. XAV939 Inhibits the stemness and migration of neuroblastoma cancer stem cells via repression of tankyrase 1. *Int. J. Oncol.* **2014**, *45*, 121–128. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Lupo, B.; Vialard, J.; Sassi, F.; Angibaud, P.; Puliafito, A.; Pupo, E.; Lanzetti, L.; Comoglio, P.M.; Bertotti, A.; Trusolino, L. Tankyrase inhibition impairs directional migration and invasion of lung cancer cells by affecting microtubule dynamics and polarity signals. *BMC Biol.* **2016**, *14*, 5. [[CrossRef](#)]
38. Li, C.; Zheng, X.; Han, Y.; Lv, Y.; Lan, F.; Zhao, J. XAV939 inhibits the proliferation and migration of lung adenocarcinoma A549 cells through the WNT pathway. *Oncol. Lett.* **2018**, *15*, 8973–8982. [[CrossRef](#)]
39. Ha, G.-H.; Kim, D.-Y.; Breuer, E.-K.; Kim, C.K. Combination treatment of polo-like kinase 1 and tankyrase-1 inhibitors enhances anticancer effect in triple-negative breast cancer cells. *Anticancer Res.* **2018**, *38*, 1303–1310.
40. Yang, H.-Y.; Shen, J.-X.; Wang, Y.; Liu, Y.; Shen, D.-Y.; Quan, S. Tankyrase promotes aerobic glycolysis and proliferation of ovarian cancer through activation of Wnt/ β -Catenin signaling. *BioMed. Res. Int.* **2019**, *2019*, 2686340. [[CrossRef](#)]
41. Huang, J.; Qu, Q.; Guo, Y.; Xiang, Y.; Feng, D. Tankyrases/ β -Catenin signaling pathway as an anti-proliferation and anti-metastatic target in hepatocarcinoma cell lines. *J. Cancer* **2020**, *11*, 432–440. [[CrossRef](#)]
42. Ohishi, T.; Yoshida, H.; Katori, M.; Migita, T.; Muramatsu, Y.; Miyake, M.; Ishikawa, Y.; Saiura, A.; Iemura, S.; Natsume, T.; et al. Tankyrase-binding protein TNKS1BP1 Regulates actin cytoskeleton rearrangement and cancer cell invasion. *Cancer Res.* **2017**, *77*, 2328–2338. [[CrossRef](#)]
43. Li, P.; Banjade, S.; Cheng, H.-C.; Kim, S.; Chen, B.; Guo, L.; Llaguno, M.; Hollingsworth, J.V.; King, D.S.; Banani, S.F.; et al. Phase transitions in the assembly of multivalent signalling proteins. *Nature* **2012**, *483*, 336–340. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

44. Diamante, A.; Chaturbedy, P.K.; Rowling, P.J.E.; Kumita, J.R.; Eapen, R.S.; McLaughlin, S.H.; de la Roche, M.; Perez-Riba, A.; Itzhaki, L.S. Engineering Mono- and multi-valent inhibitors on a modular scaffold. *Chem. Sci.* **2021**, *12*, 880–895. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Lomakina, M.E.; Lallemand, F.; Vacher, S.; Molinie, N.; Dang, I.; Cacheux, W.; Chipysheva, T.A.; Ermilova, V.D.; de Koning, L.; Dubois, T.; et al. Arpin downregulation in breast cancer is associated with poor prognosis. *Br. J. Cancer* **2016**, *114*, 545–553. [[CrossRef](#)]
46. Liu, X.; Zhao, B.; Wang, H.; Wang, Y.; Niu, M.; Sun, M.; Zhao, Y.; Yao, R.; Qu, Z. Aberrant expression of arpin in human breast cancer and its clinical significance. *J. Cell. Mol. Med.* **2016**, *20*, 450–458. [[CrossRef](#)]
47. Li, T.; Zheng, H.-M.; Deng, N.-M.; Jiang, Y.-J.; Wang, J.; Zhang, D.-L. Clinicopathological and Prognostic significance of aberrant arpin expression in gastric cancer. *World J. Gastroenterol.* **2017**, *23*, 1450–1457. [[CrossRef](#)]
48. Zhang, S.-R.; Li, H.; Wang, W.-Q.; Jin, W.; Xu, J.-Z.; Xu, H.-X.; Wu, C.-T.; Gao, H.-L.; Li, S.; Li, T.-J.; et al. Arpin downregulation is associated with poor prognosis in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Eur. J. Surg. Oncol.* **2019**, *45*, 769–775. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Derivery, E.; Gautreau, A. Assaying WAVE and WASH Complex Constitutive Activities toward the Arp2/3 Complex. In *Methods in Enzymology*; Conn, P.M., Ed.; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2010; Volume 484, Chapter 33; pp. 677–695.
50. Sladitschek, H.L.; Neveu, P.A. MXS-chaining: A highly efficient cloning platform for imaging and flow cytometry approaches in mammalian systems. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0124958. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Poleskaya, A.; Boutillon, A.; Wang, Y.; Lavielle, M.; Vacher, S.; Schnitzler, A.; Molinie, N.; Rocques, N.; Fokin, A.; Bièche, I.; et al. CYFIP2 containing WAVE complexes inhibit cell migration. *Biorxiv* **2020**. [[CrossRef](#)]

Supplementary materials.

Simanov et al. Int J Mol Sci. 2021 Apr 16 ; 22(8):4115. doi : 10.3390/ijms22084115.

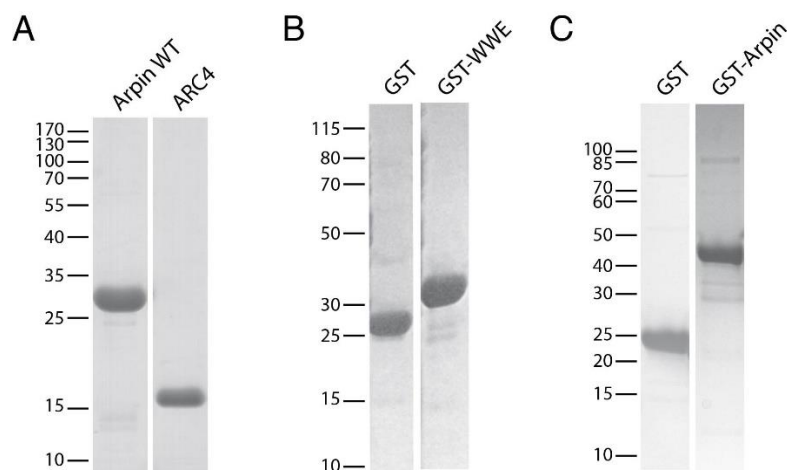


Figure S1. Purity of recombinant proteins used in the study. (A) Purified Arpin and ARC4 domain were used for Size Exclusion Chromatography – Multi Angle Light Scattering experiment of figure 1C. (B) Purified GST and GST-WWE were used for the pull-down assay of figure 2B. (C) Purified GST and GST-Arpin were used for the pull-down assay of figure 2E. Coomassie stained gels.

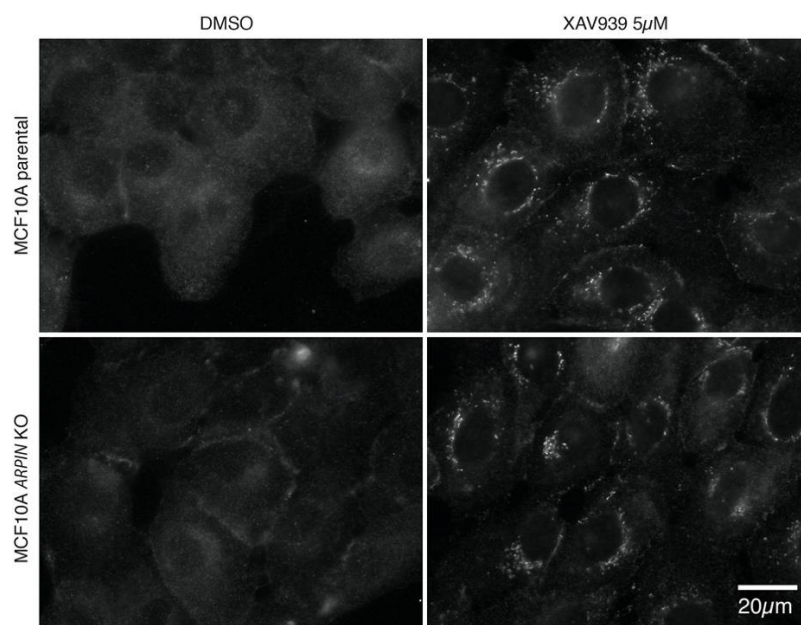


Figure S2. Immunofluorescence staining of TNKS in MCF10A WT and *ARPIN* KO cells treated with XAV939 at 5 μ M for 9 h or with DMSO. TNKS are mostly cytosolic in both cases, but appear to condensate upon XAV939 treatment.

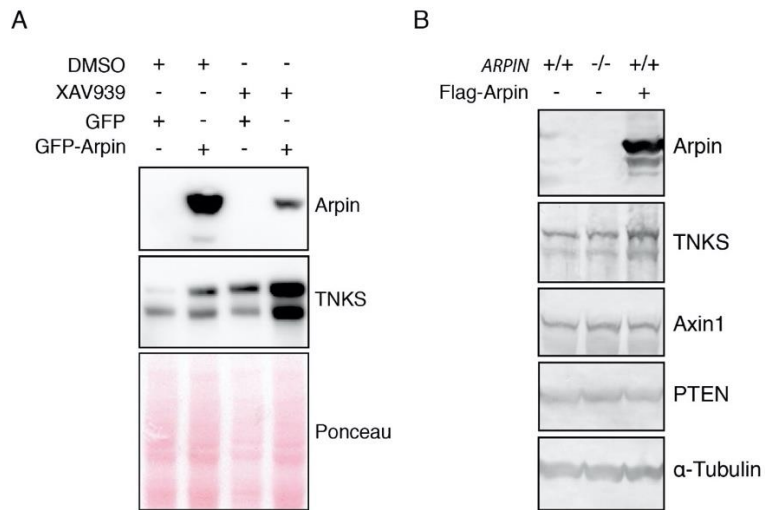


Figure S3. Arpin overexpression increases TNKS protein levels. **(A)** 293T cells were transiently transfected with GFP or GFP-Arpin and lysed. Where indicated, XAV939 1 μ M was added for 24 h **(B)** 293T WT or *ARPIN* KO cells were transiently transfected with indicated constructs and lysed. Protein levels were revealed by Western blot with corresponding antibodies.

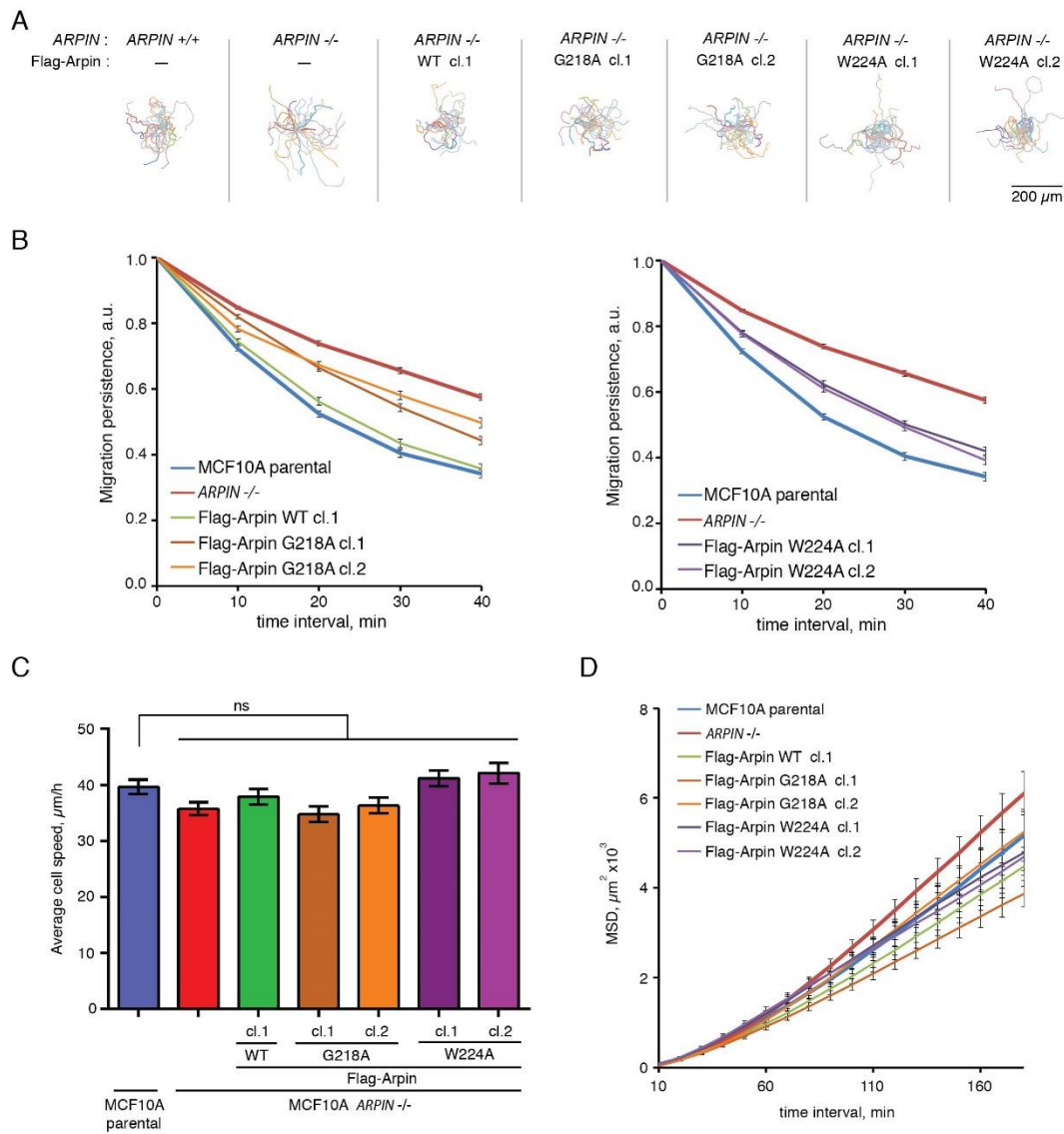


Figure S4. Single cell migration assay of stable MCF10A clones expressing WT, G218A and W224A Flag-Arpin. **(A)** Single cell trajectories (25 cells tracked for 7 h displayed). **(B)** Migration persistence displayed here for the whole cell population as an autocorrelation curve (Gorelik and Gautreau 2014). **(C)** Average cell speed **(D)** Mean square displacement (MSD) is represented as its mean value and standard error of the mean (number of cells ranges from 41 to 80).

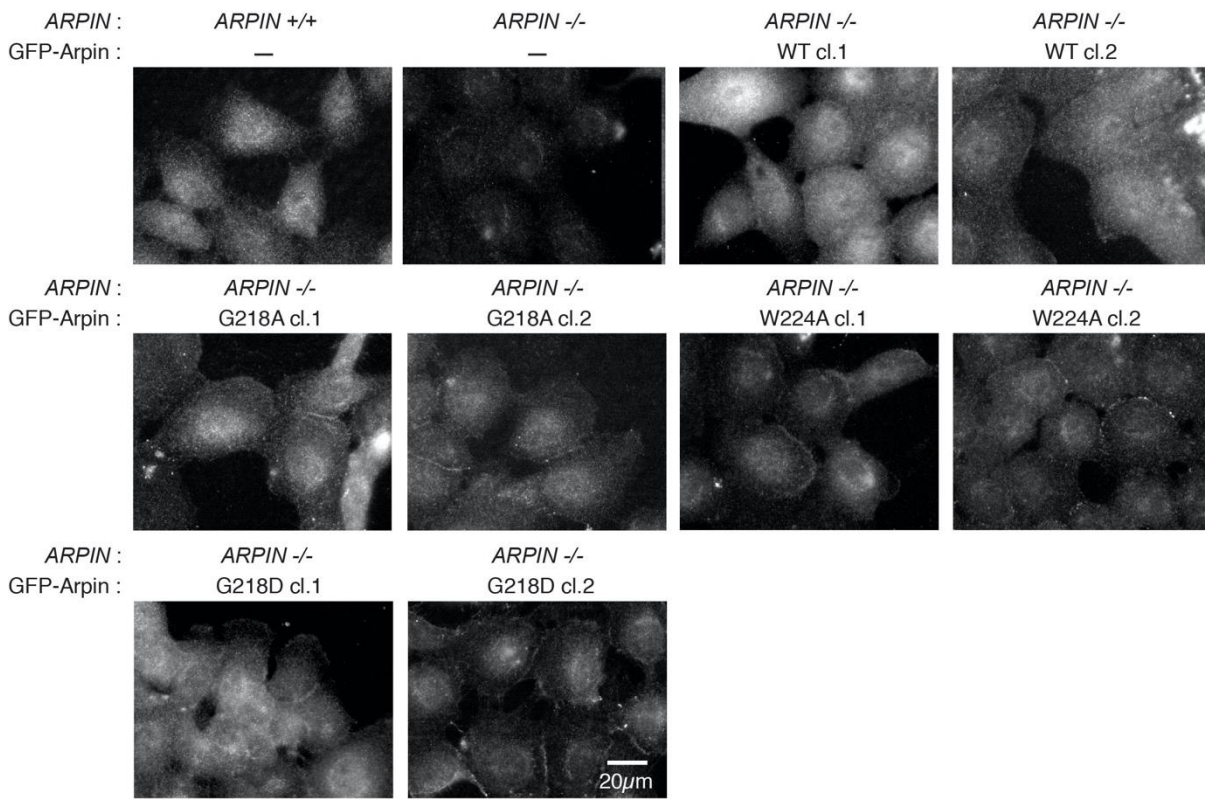


Figure S5. Immunofluorescence of Arpin in MCF10A parental cells, ARPIN knock-out and knock-in clones. All Arpin forms were localized in the cytosol and nucleus with an occasional peripheral staining, which does not systematically correspond either to cell junctions or to free edges.

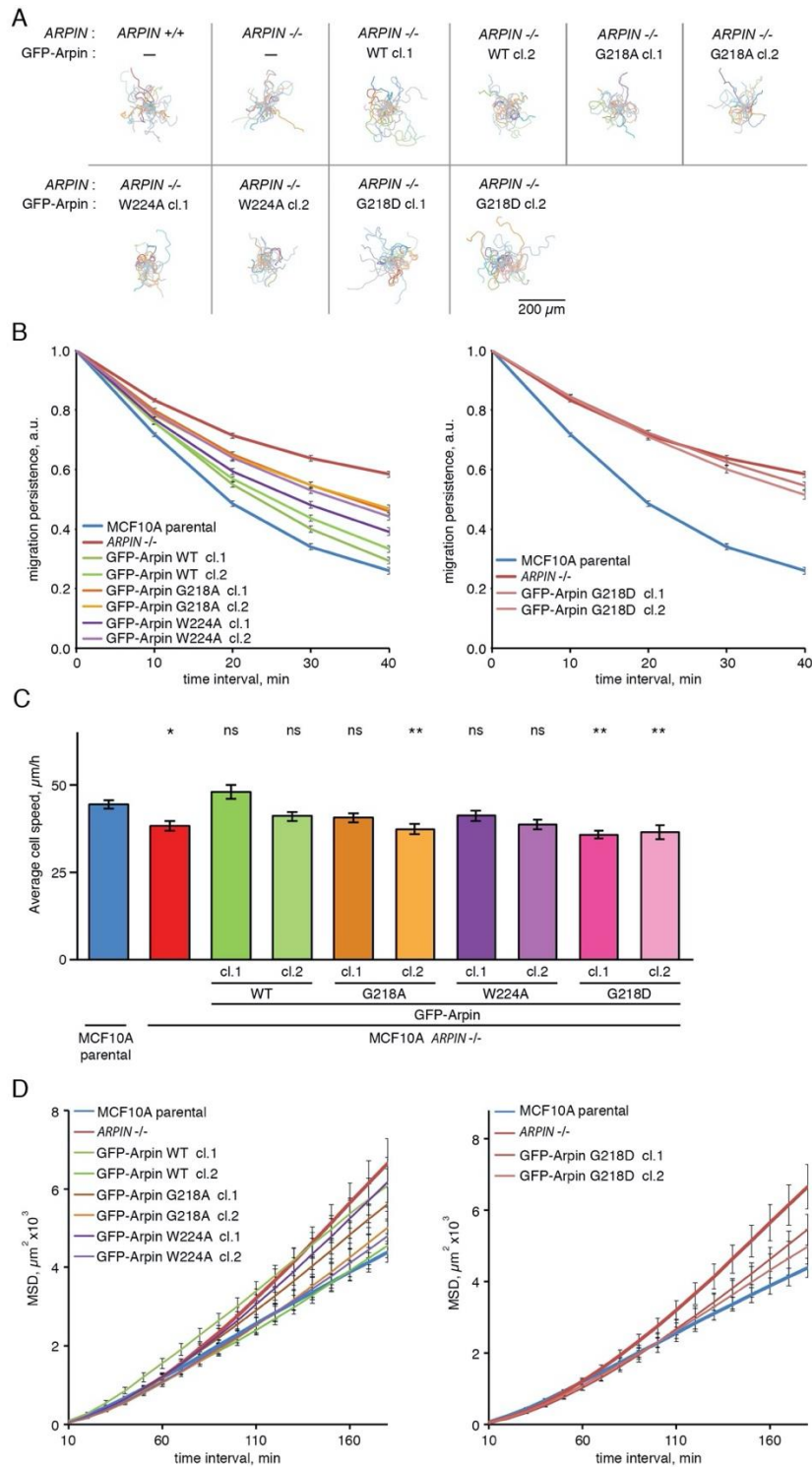


Figure S6. Single cell migration assay of *ARPIN* knock-in MCF10A clones. **(A)** Single cell trajectories (25 cells tracked for 7 h displayed). **(B)** Migration persistence displayed here for the whole cell population as an autocorrelation curve (Gorelik and Gautreau 2014). **(C)** Average cell speed (Kruskal-Wallis comparison with control MCF10A cells, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). **(D)** Mean square displacement (MSD) is represented as its mean value and standard error of the mean (number of cells ranges from 47 to 83).

II. Arpin se lie à la sous-unité Arp3 du complexe Arp2/3 via le motif A et l'hélice C

Résumé

Bien qu'Arpin ait une activité inhibitrice envers le complexe Arp2/3 in vitro et au lamellipode, son interaction précise avec Arp2/3 n'est pas bien caractérisée. Les études ont prédit deux sites d'interaction à la surface du complexe Arp2/3, similaires à ceux des NPFs (Sokolova et al. 2017). Cependant, les résultats récents obtenus par notre collaborateur Roberto Dominguez (University of Pennsylvania, Philadelphia) indiquent qu'Arpin ne se lie qu'à un seul site sur le complexe Arp2/3, localisé sur la sous-unité Arp3. Un motif C non repéré auparavant, comparable au motif C des activateurs, a été détecté sur l'extrémité C-terminale d'Arpin. Ce motif C est nécessaire pour l'activité inhibitrice d'Arpin dans la polymérisation d'actine et la migration cellulaire. Ainsi, cette étude en cours rapporte les mécanismes d'action d'Arpin et identifie un nouveau domaine à l'extrémité C-terminale d'Arpin crucial pour son activité.

Les résultats ci-dessous résument une partie des données obtenues dans le cadre de cette collaboration. Les contributions respectives sont les suivantes.

Groupe de R. Dominguez : conceptualisation de l'étude, design des mutations et mutagenèse, expériences de cryo-EM et de pyrène-actine, titrage calorimétrique isotherme, analyse des données structurales et reconstruction 3D.

G. Simanov et A. Gautreau : toutes les expériences de biologie cellulaire, en particulier mutagenèse, établissement des clones de sauvetage, vidéo-microscopie et analyse de leurs trajectoires.

1. Arpin possède un motif connecteur C important pour l'interaction avec Arp2/3, similaire à celui des NPFs

Le motif A C-terminal d'Arpin, constitué de 20 acides aminés, est nécessaire à son activité inhibitrice (Dang et al. 2013). Cependant, le motif A à lui seul est moins actif que la protéine complète suggérant que la séquence d'Arpin peut contenir d'autres motifs ou sites d'interaction importants pour son activité inhibitrice vis-à-vis d'Arp2/3.

En effet, l'alignement de la séquence d'acides aminés d'Arpin avec celles des NPFs montre que la similarité entre ces séquences va au-delà du motif A (Figure 1). Contrairement aux NPFs, Arpin est dépourvue de motif WH2. En revanche, en plus de l'extrémité acide qui entoure le tryptophane à la position 224, Arpin possède un motif C (hélice C) ressemblant à ceux des NPFs. Cette ressemblance due à la distribution similaire de résidus hydrophobes et de résidus positifs au sein du motif C d'Arpin suggère que ce motif pourrait jouer un rôle dans l'interaction d'Arpin avec Arp2/3. La similarité de l'hélice C d'Arpin avec celles des NPFs contribuerait aussi à la compétition entre Arpin et les domaines WCA des NPFs pour les mêmes sites d'interaction sur Arp2/3.

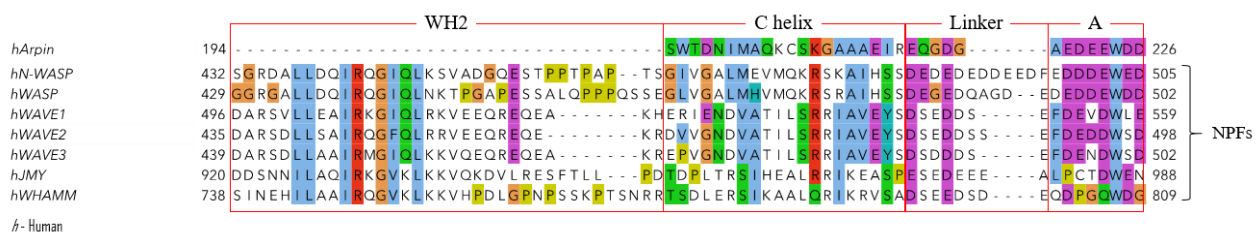


Figure 1. Alignement de séquences WCA des NPFs avec l'extrémité C-terminale d'Arpin. Arpin manque le domaine WH2 mais présente un motif connecteur C (hélice C), similaire aux domaines C des NPFs. Code couleur : bleu – les acides aminés hydrophobes, vert – polaires non chargés, rouge – chargés positivement, violet – chargés négativement.

2. Arpin possède un seul site d'interaction avec Arp2/3 à la sous-unité Arp3.

Les études ont suggéré deux sites probables d'interaction d'Arpin avec le complexe Arp2/3 (Sokolova et al. 2017). Ces sites se recoupaient avec les sites d'interaction des domaines WCA des NPFs.

Afin de définir les paramètres d'interaction d'Arpin avec Arp2/3 le laboratoire de R. Dominguez a effectué des expériences de titration calorimétrique isotherme. Le titrage a permis d'estimer la constante de dissociation ($K_d=1,24 \mu\text{M}$) de l'interaction d'Arpin avec Arp2/3 qui formaient un complexe 1 :1 (Figure 2A). Arpin se lie donc au complexe Arp2/3 avec une affinité moindre que les domaines WCA des NPFs (Boczowska et al. 2014), ce qui peut paraître surprenant pour un inhibiteur. Arpin ne se lie probablement qu'à un seul site à la surface d'Arp2/3, contrairement aux NPFs.

Ensuite, une expérience de titration calorimétrique similaire a été effectuée avec Arp2/3 en présence d' « actine-GCA », c'est-à-dire un domaine WCA modifié, dans lequel le motif WH2 a été remplacé par le

segment-1 de gelsoline (Zimmet et al. 2020) lié à de l'actine G. Ce segment-1 de la gelsoline se lie à l'actine de manière plus forte que le domaine WH2 et empêche l'ajout de monomères d'actine sur le complexe Arp2/3. Ainsi, cette chimère GCA permet de figer le complexe actine-NPF-Arp2/3 et de saturer le site de forte affinité sur Arp2-ArpC1. La titration a montré que dans ces conditions, Arpin liait toujours Arp2/3 et que les paramètres d'interaction étaient semblables à ceux de la titration précédente sans l'actine-GCA. Cette expérience suggère qu'Arpin lie préférentiellement l'autre site sur Arp2/3, celui sur la sous-unité Arp3 (avec $K_D=1,6\mu\text{M}$) (Figure 2B).

Enfin et de manière importante, ces résultats sont parfaitement en accord avec la reconstruction 3D du co-complexe Arpin-Arp2/3 en cryo-microscopie électronique (Figure 2C). Les domaines C et A d'Arpin sont associés à la sous-unité Arp3.

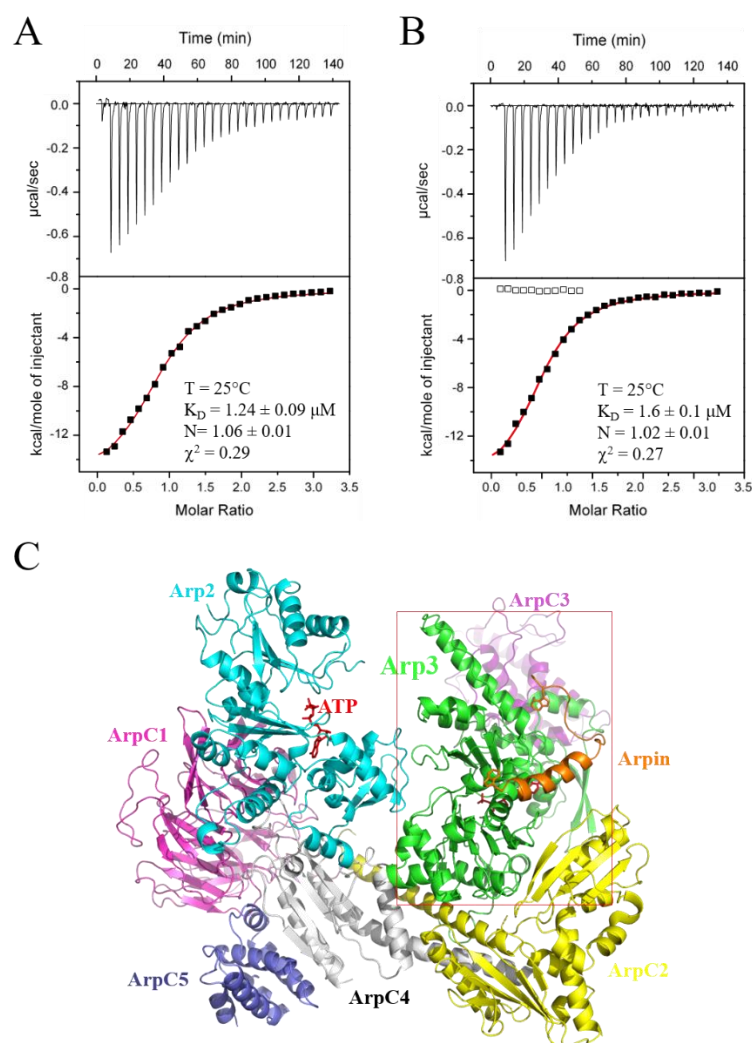


Figure 2. Arpin interagit avec le complexe Arp2/3 via un site unique situé sur la sous-unité Arp3. (A-B) Titration calorimétrique isotherme définissant les paramètres de l'interaction d'Arpin avec Arp2/3. (A) L'Arpin à 150 μM a été injectée dans la solution contenant Arp2/3 à 8,6 μM ; (B) L'Arpin à 173 μM a été injectée dans la solution contenant Arp2/3 à 7,9 μM , dont le site d'interaction avec les NPF sur la sous-unité Arp2 était saturé avec de l'actine-GCA (comme décrit dans (Zimmet et al. 2020)). (C) Structure cryo-EM à la résolution de 3,1Å d'Arp2/3 lié à Arpin (seule l'extrémité C-terminale d'Arpin est visible).

3. L'hélice C d'Arpin est nécessaire pour son activité inhibitrice

La reconstruction 3D d'Arpin liée à Arp2/3 permet de visualiser l'interaction de l'hélice C prédite d'Arpin. Le laboratoire de R. Dominguez a étudié la structure de l'hélice C et les propriétés d'acides aminés entrant en contact avec la surface d'Arp3 (Figure 3A). Les acides aminés hydrophobes, présents également dans les domaines C des NPFs ont été suggérés en tant que sites importants pour l'interaction de l'hélice C d'Arpin avec Arp3.

Pour vérifier cette hypothèse, le laboratoire de R. Dominguez a introduit la mutations W195D dans la séquence d'Arpin et a effectué les expériences de polymérisation avec la pyrène-actine (Figure 3B). Ces expériences ont montré que la partie C-terminale d'Arpin contenant les acides aminés 194-226, correspondant aux motifs C et A, avait la même activité inhibitrice que la protéine complète. La capacité inhibitrice de mutant W195D d'Arpin est sévèrement affectée. Ce sont donc bien les deux motifs A et C qui sont nécessaires pour l'activité d'Arpin *in vitro*.

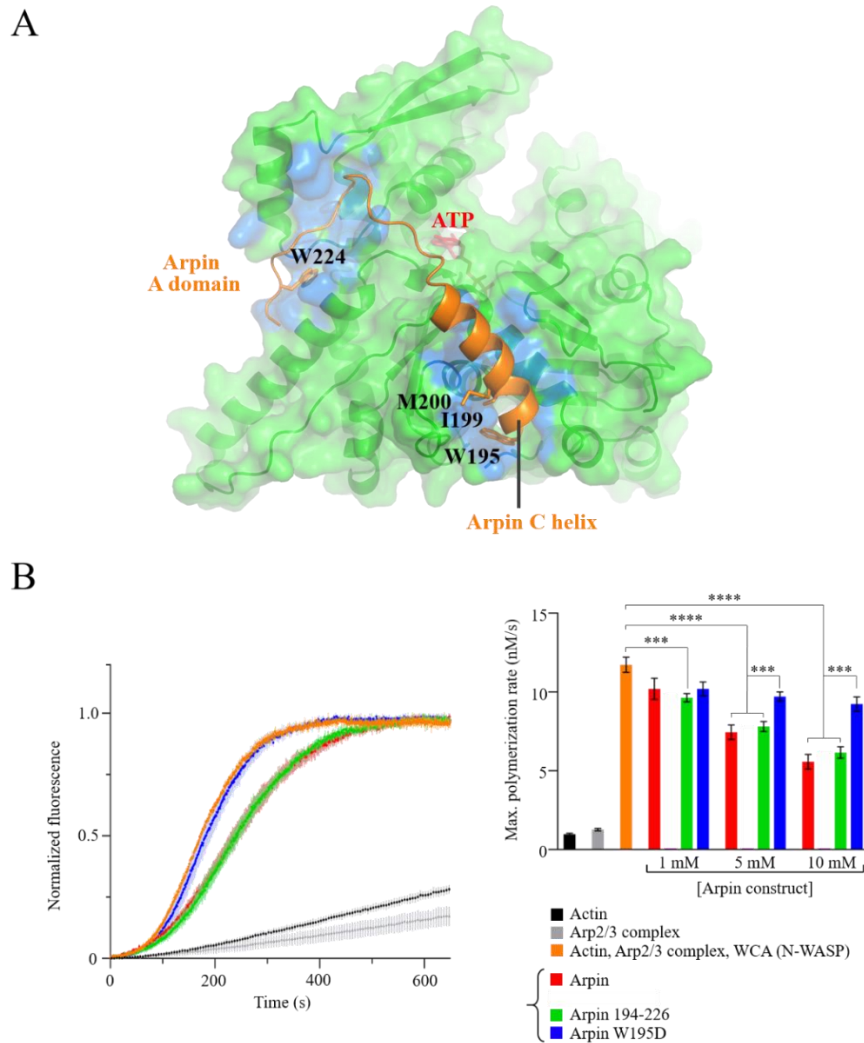


Figure 3. Hélice C d'Arpin est nécessaire pour la fonction inhibitrice d'Arpin. (A) Cartographie de l'interaction de la sous-unité Arp3 avec les domaines C et A d'Arpin (les zones d'interaction sont colorées en bleu). Les acides aminés importants pour l'interaction sont indiqués. (B) Expérience de polymérisation avec la pyrène-actine : actine à 2 mM, Arp2/3 à 5 nM, WCA de N-WASP à 200 nM. Le taux de polymérisation d'actine est comparé en absence et en présence d'Arpin complète ou de son domaine CA (Arpin 194-226), aussi que du mutant W195D d'Arpin.

Pour valider le modèle structural de l'interaction Arpin-Arp2/3, nous avons testé dans les cellules certains mutants caractérisés *in vitro* (W195D et I199D/M200D, Figure 3A). Nous avons introduit les mutations W195D et I199D/M200D dans la séquence d'Arpin et exprimé les mutants d'Arpin fusionnés à la séquence Flag dans les cellules 293T (Figure 4). La précipitation avec les billes anti-Flag a permis de confirmer que les mutations d'hélice C d'Arpin empêchent l'interaction d'Arpin avec Arp2/3. Ces résultats suggèrent que l'hélice C d'Arpin est effectivement importante pour l'activité inhibitrice d'Arpin dans les cellules et pourrait réguler la persistance de migration.

Pour étudier l'effet des mutations d'hélice C sur la persistance de migration, nous avons transfecté les cellules MCF10A *ARPIN*^{-/-} (Molinie et al. 2019a) avec les constructions Flag-Arpin. Des clones stables exprimant l'Arpin sauvage ou les mutants W195D et I199D/M200D ont été isolés (Figure 5A). Les mutations de l'hélice C rendent Arpin incapable de diminuer la persistance des cellules *ARPIN*^{-/-}, contrairement à l'Arpin sauvage (Figure 5B). Les mutants W195D et I199D/M200D d'Arpin sont donc inactifs, en accord avec les résultats des expériences *in vitro* et de précipitation dans les cellules 293T.

Ces résultats réunis permettent de suggérer que l'interaction d'Arpin avec le complexe Arp2/3 dans les cellules nécessite deux motifs, le motif A bien connu et le motif C nouvellement identifié (Figure 6).

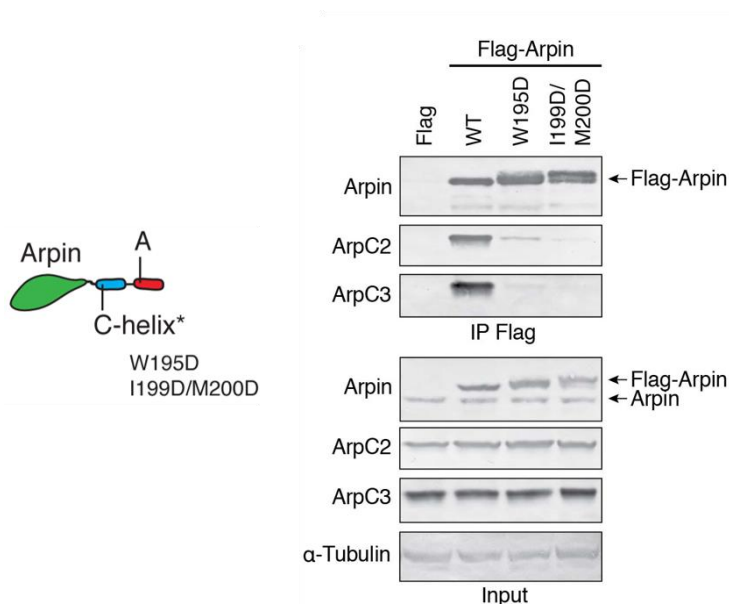


Figure 4. Mutations de l'hélice C d'Arpin empêche l'interaction d'Arpin avec Arp2/3 dans les cellules. Flag-Arpin WT et les mutants W195D et I199D/M200D ont été exprimées dans les cellules 293T de manière transitoire. Les protéines exprimées ont été ensuite précipitées avec les billes anti-Flag.

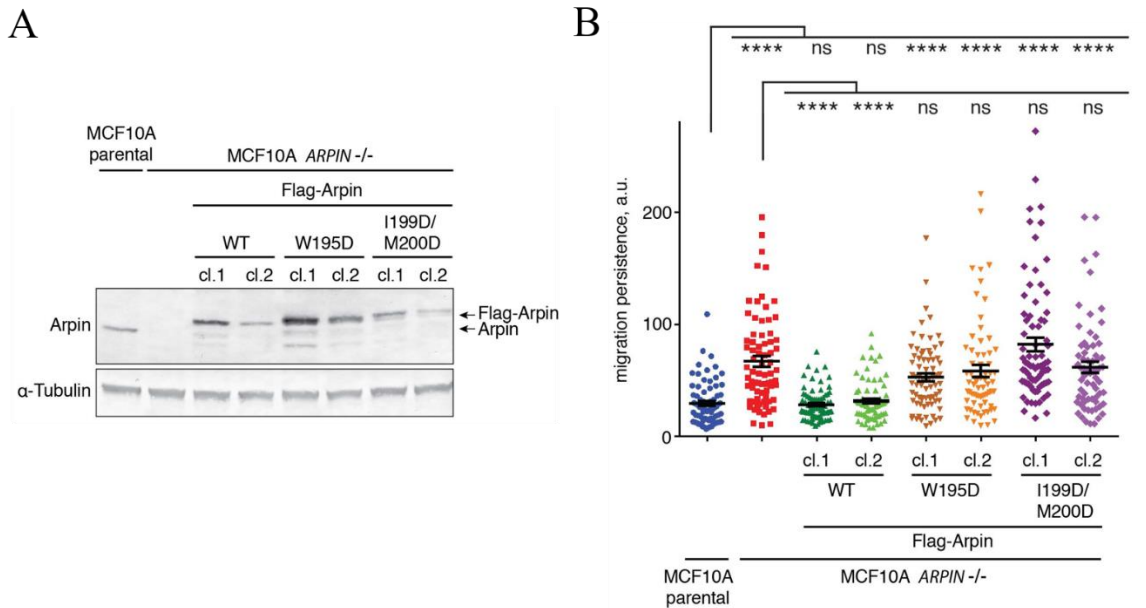


Figure 5. L'hélice C d'Arpin est importante pour l'activité inhibitrice d'Arpin et pour le contrôle de la persistance de migration des cellules. (A) Les lignées stables MCF10A *ARPIN*^{-/-} (Molinie et al. 2019a) exprimant Flag-Arpin WT ou les mutants W195D et I199D/M200D ont été obtenues par intégration aléatoire dans les chromosomes. (B) La persistance de migration des clones exprimant les mutants d'Arpin a été mesurée et comparée entre les clones (one-way ANOVA, **** $p < 0.0001$).

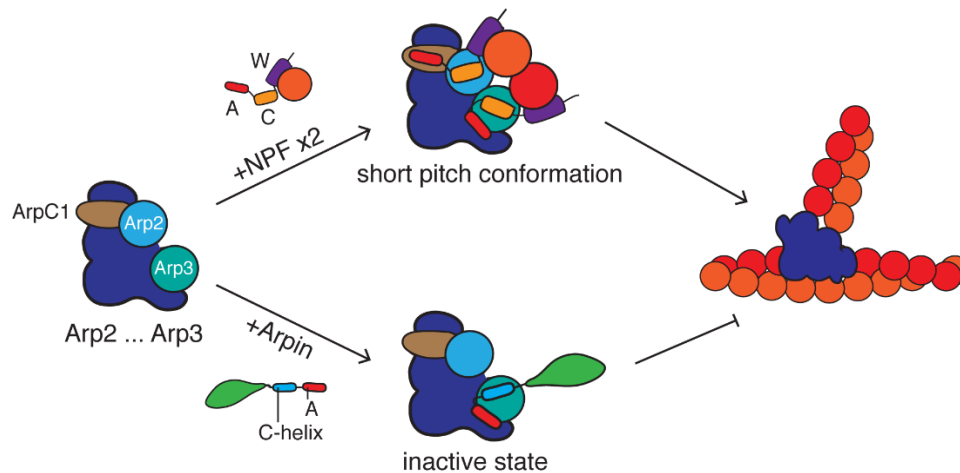


Figure 6. Comparaison de modes d'action des NPFs et d'Arpin vis-à-vis le complexe Arp2/3. Contrairement aux NPFs, Arpin possède probablement un seul site d'interaction sur Arp2/3, sur la sous-unité Arp3. Les motifs A et C (hélice C) sont tous les deux nécessaires pour l'interaction d'Arpin avec Arp2/3, l'activité inhibitrice d'Arpin et sa fonction dans la régulation de migration.

III. The Arp2/3 inhibitory protein Arpin inhibits homology-directed recombination

Résumé

La polymérisation de l'actine branchée par le complexe Arp2/3 permet de remodeler les membranes cellulaires. Dans les lamellipodes des cellules en migration, l'activité d'Arp2/3 est régulée négativement par la protéine inhibitrice d'Arp2/3, Arpin. Arpin est sous exprimée dans plusieurs cancers et la perte d'expression d'Arpin est associée à un mauvais pronostic dans le cancer du sein. Cependant, le rôle que pouvait jouer la sous expression d'Arpin dans la progression du cancer n'est pas compris. En utilisant des échantillons de tumeurs du sein, nous avons mesuré les niveaux protéiques de 61 récepteurs et effecteurs de la croissance cellulaire, de la prolifération, de la réorganisation du cytosquelette et de la réparation de l'ADN. Nous avons constaté que le niveau d'Arpin corrèle avec les niveaux de plusieurs marqueurs de réponse au dommage de l'ADN. De plus, les cellules *ARPIN* knock-out ont plus de cassures double brin (DSB) que les cellules contrôles et cette différence est renforcée lorsque les DSBs sont induites chimiquement. Arp2/3 est montré de favoriser la résection des extrémités de l'ADN et le regroupement des DSBs nécessaire pour la réparation efficace via les mécanismes de recombinaison homologue. Nous avons donc évalué l'effet de la déplétion d'Arpin sur ce processus. Nous avons montré que la déplétion d'Arpin augmente le niveau de réparation dirigée par homologie. Étant donné l'activité inhibitrice d'Arpin envers Arp2/3, ces résultats suggèrent une nouvelle voie de régulation de la réparation de l'ADN dirigée par homologie qui s'opère via l'inhibition d'Arp2/3 dans le noyau.

Le manuscrit correspond à une version préparée pour une soumission en tant que short communication à European Journal of Cell Biology.

Title: The Arp2/3 inhibitory protein Arpin inhibits homology-directed recombination

Gleb Simanov¹, Leanne de Koning², Sophie Vacher³, Thierry Dubois², Ivan Bièche³ and Alexis M. Gautreau^{1*}

Authors affiliations :

¹ CNRS UMR7654, Institut Polytechnique de Paris, 91120 Palaiseau, France

² Department of Translational Research, Institut Curie, PSL Research University, 75005 Paris, France

³ Department of Genetics, Pharmacogenomics Unit, Institut Curie, 75005 Paris, France

* Corresponding author: alexis.gautreau@polytechnique.edu

Abstract

Arp2/3-mediated branched actin polymerization drives the remodelling of cell membranes. In lamellipodia of migrating cells, Arp2/3 activity is negatively regulated by an Arp2/3 inhibitory protein, Arpin. Arpin is downregulated in several cancers and the loss of Arpin expression is associated with poor prognosis in breast cancer. However, the role of Arpin downregulation in cancer progression is poorly understood. Here, using breast tumour samples, we measured protein levels of 61 major receptors and effectors of cell growth, proliferation, cytoskeleton reorganisation and DNA repair. We found that Arpin levels correlated with the levels of several DNA damage response markers. Further, *ARPIN* knock-out cells exhibit more double strand breaks (DSB) than control cells and this difference was enhanced when DSBs were chemically induced. Arp2/3 has recently been shown to promote DNA end resection and clustering of DNA damage repair sites for efficient homology directed repair (HDR). We question the putative role of Arpin in DNA repair by studying the effect of Arpin depletion on the HDR efficiency. We found that Arpin depleted cells exhibit two-fold increase in HDR level. Given Arpin inhibitory activity towards Arp2/3, these results suggest a new way of regulation of HDR, potentially acting through Arp2/3 inhibition in the nucleus.

Keywords : Arpin, Arp2/3, DNA repair, homology directed repair

1. Introduction

Membrane remodelling driven by branched actin polymerisation is crucial for numerous cell processes, including cell migration, intracellular traffic and cell shape control (Papalazarou and Machesky 2021). The Arp2/3 complex is the only machinery capable of polymerising branched actin and its activity is tightly regulated by specifically localised activators, called Nucleation Promoting Factors (NPF) (L M Machesky et al. 1994; Molinie and Gautreau 2017). At the leading edge of the cell, Arp2/3 is activated by the WAVE complex and creates membrane protrusions called lamellipodia. The stability of lamellipodia is under the control of Arp2/3 inhibitory protein Arpin (Dang et al. 2013). Instead of preventing the lamellipodia formation, Arpin regulates its lifetime and allows the cell to change the direction of movement and, thus, regulates cell migration persistence (Dang et al. 2013; Gorelik and Gautreau 2015). Recently, Arpin interaction with its new binding partners, Tankyrases 1 and 2, has been reported and shown to participate in the regulation of cell migration persistence (Simanov et al. 2021). There are, thus, two independent pathways, whereby Arpin regulates the persistence of cell migration.

Several new Arpin functions, relying on its inhibitory activity towards the Arp2/3 complex, have recently been uncovered. Thus, Arpin participates in the regulation of cell proliferation (Molinie et al. 2019b). In untransformed cells, the network of cortical branched actin, generated by the Arp2/3 complex, controls the progression of the cell cycle by integrating various extracellular stimuli. Arpin depletion renders cells less dependent on this regulation. Furthermore, according to its inhibitory role, Arpin is important for the regulation of actin polymerisation during phagocytosis in macrophages (Jubrail et al. 2020) and for maintenance of the integrity of the intestinal barrier in intestinal epithelial cells (Chávez-Paredes et al. 2021).

The inhibition of the Arp2/3 complex is a key cellular function attributed to Arpin. Strikingly, Arp2/3 is frequently upregulated in tumours and associated with poor prognosis in many cancers (Molinie and Gautreau 2017). On the other hand, Arpin is downregulated in breast, gastric and pancreatic cancers (M. E. Lomakina et al. 2016; Liu et al. 2016; Y. Li et al. 2017; S.-R. Zhang et al. 2019) and Arpin downregulation is associated with poor prognosis in breast cancer (M. E. Lomakina et al. 2016). However, it is not known would the loss of Arpin affect cellular pathways related to cell homeostasis and cancer progression. Here we studied the correlation of Arpin protein level with the levels of several markers of cell growth, proliferation, cytoskeleton reorganisation and DNA repair. We found a significant correlation between Arpin levels and those of DNA damage response markers and studied the putative role of Arpin in the process of DNA repair.

2. Materials and methods

2.1. Cell culture and drugs

The 293T cells were maintained in DMEM medium (Thermo Fisher Scientific) supplemented with 10% fetal bovine serum (Thermo Fisher Scientific) and 100 U/mL penicillin/streptomycin (Thermo Fisher Scientific). MCF10A cells were maintained in DMEM/F12 medium (Thermo Fisher Scientific) supplemented with 5% horse serum (Sigma, Hongkong, China), 100 ng/mL cholera toxin (Sigma), 20 ng/mL epidermal growth factor (Sigma), 0.01-mg/mL insulin (Sigma), 500 ng/mL hydrocortisone (Sigma), and 100 U/mL penicillin/streptomycin (Thermo Fisher Scientific). Cells were incubated at 37°C in 5% CO₂. All cells and stable clones were routinely tested for mycoplasma and found to be negative. The 293T BFP+ cell line was kindly provided by Dr. Alberto Ciccia, Columbia University Medical Centre, New York, USA. For experiments with DSB induction cells were treated with Neocarzinostatin (Sigma-Aldrich) at 200 ng/ml for 1h.

2.2. siRNA transfection

Arpin was targeted by individual siRNAs at final concentration of 25nM (ON-TARGETplus, Dharmacon): Arpin #1 GUGGAUGUAUCUCGGCACA and Arpin #2 AUGGCAGGAAGGAGCGCUA. The control siRNA was the non-targeting siRNA designed by Dharmacon. 293T BFP+ cells were transfected using Lipofectamine RNAiMAX according to the recommended reverse transfection protocol (Thermo Fisher Scientific).

2.3. Plasmids and cell lines

53BP1 (amisno acids 1224-1716 for isoform 1) was amplified from pTRIPSFFV-EGFP-53BP1 plasmid (the kind gift from Nicolas Manel, Institut Curie, Paris, France) and subcloned in homemade plasmid MXS AAVS1L SA2A Puro bGHpA EF1Flag GFP Blue2 SV40pA AAVS1R between FseI and AscI sites. Obtained plasmid was transfected in MCF10A WT and MCF10A *ARPIN*^{-/-} cell lines (described in (Molinie et al. 2019b)) using Lipofectamine3000 (Thermo Fisher Scientific) according to forward transfection protocol. Stable clones were selected with 1 µg/mL of puromycin (Invivogen), single clones were isolated by cloning rings, expanded, and characterized by Western blot. sgRNA-Cas9 and GFP-donor plasmids were the kind gifts from Dr. Alberto Ciccia, Columbia University Medical Centre, New York, USA.

2.4. Reverse Phase Protein Array and tumour samples

Reverse phase protein array (RPPA), a miniaturised ‘dot-blot’ immunoassay was performed as previously described (Rondeau et al. 2015). 233 biopsy samples from the same patients as in (M. E. Lomakina et al. 2016) of unilateral invasive primary breast tumours excised from women managed at Institut Curie—Hôpital René Huguenin (Saint-Cloud, France) from 1978 to 2008 have been analysed. Since 2007, patients entering this institution have given their approval by signed informed consent. This study was approved by the local ethics committee (Breast Group of René Huguenin Hospital).

2.5. HDR assays with the BFP reporter

To examine the levels of Cas9-induced HDR upon Arpin depletion, 293T BFP+ cells were reverse transfected with non-targeting siRNA or siRNA against Arpin, next day cells were transfected with sgRNA-Cas9 plasmid targeting BFP with or without GFP-donor plasmid using jetPEI and according to the manufacturer protocol. The cells were collected 3 days after transfection and analysed by flow cytometry using a Guava easyCyte system (Millipore).

2.6. Western blot and Antibodies

Anti-Arpin home-made rabbit polyclonal antibodies were previously described (Dang et al. 2013). Following commercial antibodies were used: mAb Tubulin (clone DM1A, Sigma-Aldrich), mAb GFP (13.1 and 7.1 clones, Roche). 293T BFP+ and MCF10A cells were lysed in RIPA buffer and analysed by western blot. SDS-PAGE was performed using NuPAGE 4–12% Bis-Tris gels (Life Technologies). Nitrocellulose membranes were developed with alkaline phosphatase-coupled antibodies (Promega) and NBT-BCIP as substrates (Promega).

2.7. Immunofluorescence

For immunofluorescence, MCF10A cells expressing GFP-53BP1 were seeded on glass coverslips coated with 20 µg/mL bovine fibronectin (Sigma) for 1 h at 37 °C in PBS. Then, cells were fixed with 4% paraformaldehyde and incubated with DAPI (Thermo Fischer Scientific). Imaging was performed on an Axio Observer microscope (Zeiss, Jena, Germany) with the 63×/1.4 oil objective.

3. Results

3.1. Arpin protein levels correlate with the levels of DNA damage response markers

We had previously analysed downregulation of Arpin at the mRNA and protein levels in mammary carcinomas in a retrospective cohort of 454 patients (M. E. Lomakina et al. 2016). Out of 454 tumours, 233 biopsy samples were available to produce extracts that were automatically spotted on microscopy slides. These slides were incubated with various high quality antibodies to produce quantitative signals in a miniaturised 'dot-blot' assay, referred to as Reverse Phase Protein Array (RPPA). Because these samples were used for various projects, we examined the correlation of Arpin levels with signals obtained with 61 antibodies targeting major receptors and effectors signalling growth, proliferation, cell cycle, apoptosis, cytoskeleton reorganisation, migration/invasion and DNA repair (Figure 1A). Out of the 61 markers, Arpin levels significantly correlated with 8 markers, 6 of which were related to DNA repair (Table S1).

Arpin levels negatively correlated with levels of histone H2AX, when phosphorylated ($r=-0.315$, $p=0.000034$; Figure 1B); Phospho-H2AX is a marker of DNA double strand breaks (DSB) (Mah, El-Osta, and Karagiannis 2010). A significant negative correlation was observed with levels of tumour suppressor protein p53, a master inducer of the DNA damage response, and its phosphoforms on Ser15 and on Ser392.

Markers of the DNA damage response involved at early steps of reparation process were examined among the 61 markers. Neither the levels of Ku80, belonging to canonical Non-Homologous End Joining (c-NHEJ) pathway, nor those of c-NHEJ promoting factor, 53BP1 protein, correlated with Arpin levels. On the other hand, 2 subunits of the Mre11-Rad50-Nbs1 (MRN) complex, recruited to double strand breaks (DSB) shortly after DNA damage to initiate DNA end resection (Syed and Tainer 2018), showed a significant positive correlation with Arpin levels (Figure 1B). Surprisingly, there was no correlation with the levels of the third subunit of MRN complex, Nbs1 protein. Similarly, there was no correlation with the levels of the regulator of DNA DSB signalling recruited by Nbs1, ataxia telangiectasia mutated (ATM) kinase (Lee and Paull 2007). Together, these correlation data suggested that Arpin can be involved in the DNA damage response signalling.

Concerning other signalling proteins tested, there was a significant positive correlation detected with the amounts of p42/p44 MAP kinases (ERK1/2; $r=+0.306$, $p=0.000006$) and with the product of the *NF2* tumour suppressor gene, Merlin. Nevertheless, there was correlation neither with p42/p44 MAP kinases activated state (phosphorylation on Thr202 and Tyr204), nor with the immediately upstream MAPKK, MEK1 and MEK2, or their active phosphoforms, which activate p42/p44 MAP kinases by dual phosphorylation.

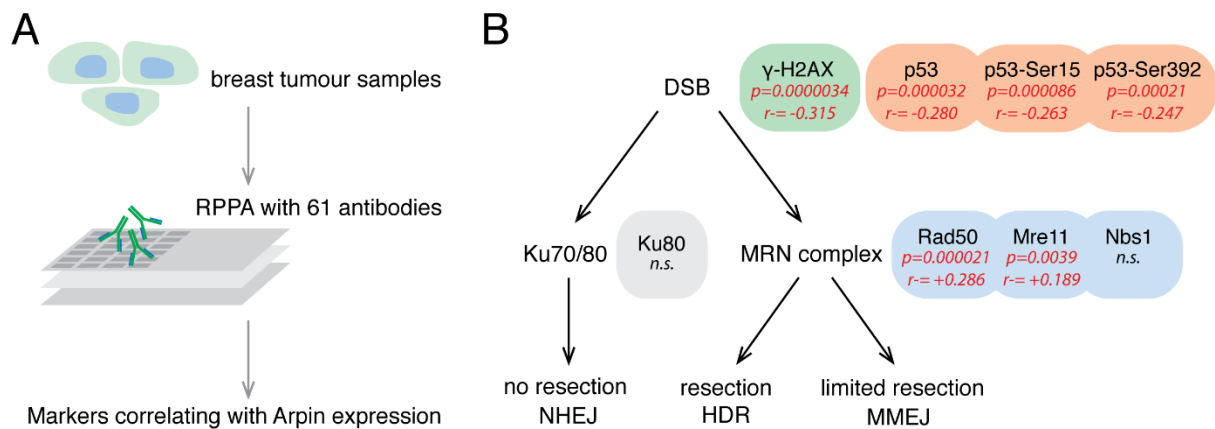


Figure 1. Correlation of Arpin levels with the levels of different markers in breast tumour samples assessed by Reverse Phase Protein Array (RPPA). (A) Lysates from tumour samples were probed with 61 antibodies. (B) Levels of several actors of DNA damage response pathway were positively or negatively correlated with Arpin levels (Spearman coefficient $r > 0$ or < 0 , respectively). Corresponding p values are indicated. DSB – double strand break, NHEJ – non-homologous end joining, HDR – homology directed repair, MMEJ – microhomology-mediated end joining.

3.2. Arpin depleted cells exhibit more DSB repair foci

To obtain an independent evidence of Arpin involvement in DNA repair signalling, we used a reporter system allowing DNA DSB foci visualisation. We isolated WT and *ARPIN*^{-/-} MCF10A cells stably expressing C-terminal fragment of 53BP1 protein, which was sufficient for its recruitment to the DSB's sites but unable to promote c-NHEJ (called hereafter 53BP1-Cter, described in (Gentili et al. 2019)) (Figure 2A). The GFP-53BP1-Cter fusion was successfully integrated and expressed in MCF10A cells and showed nuclear diffused localisation with a few bright spots corresponding to the sites of naturally occurring DSBs and DNA repair. We quantified the number of DSB foci per nucleus and found that *ARPIN*^{-/-} cells exhibited more DSB foci than the control cells under normal culture conditions (Figure 2B).

We then treated MCF10A cells with a DSB-inducing drug Neocarzinostatin (NCS) and quantified the number of 53BP1-Cter foci per nucleus. *ARPIN*^{-/-} cells showed more DSB foci under NCS treatment than the WT cells and the difference was more pronounced under NCS treatment than in untreated condition (Figure 2B). However, this reporter system could not provide the information concerning the DNA repair pathway affected by Arpin depletion.

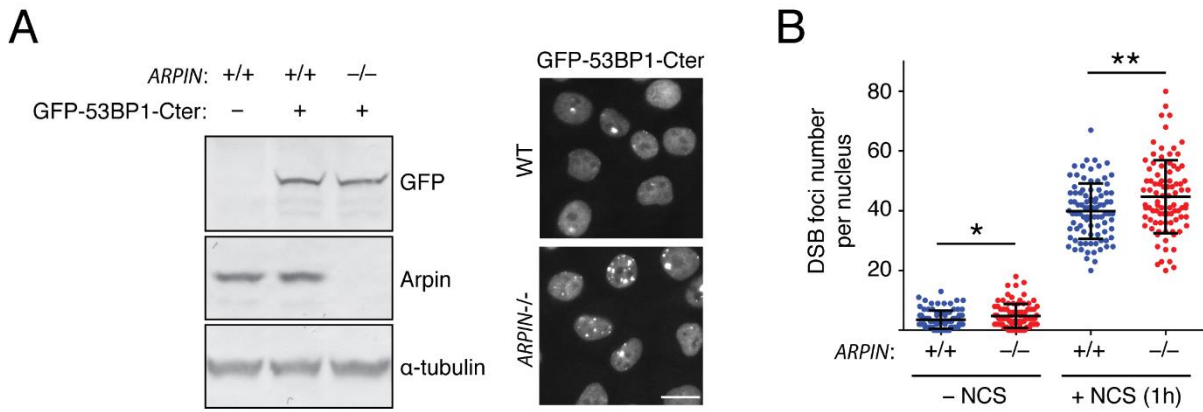


Figure 2. Arpin depleted cells exhibit more DSB foci per nucleus. (A) MCF10A WT and ARPIN^{-/-} cells expressing GFP-53BP1-Cter were isolated and GFP and Arpin expression was validated by Western blot. Representative images of GFP-53BP1-Cter expressing cells; scale bar: 20 μ m. (B) GFP-53BP1 foci number was assessed in ARPIN^{-/-} versus control cells with or without Neocarzinostatin (NCS) treatment (1h). Values from independent experiments (n=3, 30 cells each) were pooled, represented as means \pm SD and statistical significance was calculated with unpaired *t* test (* p < 0.05, ** p < 0.01).

3.3. Arpin depletion increases the efficiency of CRISPR-mediated homology directed repair (HDR)

Since Arp2/3 has recently been shown to play an important role in HDR (B. R. Schrank et al. 2018), we questioned the involvement of Arpin in this process. To assess the efficiency of CRISPR/Cas9-mediated HDR we used fluorescence-based reporter system that was previously described (Nambiar et al. 2019). In brief, we used 293T cells stably expressing blue fluorescent protein (BFP) that could be converted into a green fluorescent protein (GFP) by a substitution of one amino acid. This substitution is mediated by CRISPR/Cas9-induced cleavage of BFP sequence and following reparation via homologous recombination using donor plasmid containing GFP template sequence. Then, the percentage of GFP-positive cells is monitored by flow cytometry and allows to determine the efficiency of HDR-mediated reparation of DSBs (Figure 2A).

Using this reporter system, we assessed the HDR efficiency under Arpin depletion. First, using the control condition without GFP donor plasmid we established the thresholds to eliminate a nonspecific signal. We then depleted Arpin with two different siRNAs in 293T BFP⁺ cells and transfected them with the gRNA/Cas9 and the GFP-containing plasmids. We then measured the proportion of GFP-positive cells (Figure 2B). Arpin depletion led to the two-fold increase of HDR efficiency. This effect was reproducible and significant for both siRNAs (Figure 2C). Thus, under Arpin depletion cells exhibited more reparations via HDR. These data indicated that Arpin could play a role in negative regulation of this repair pathway.

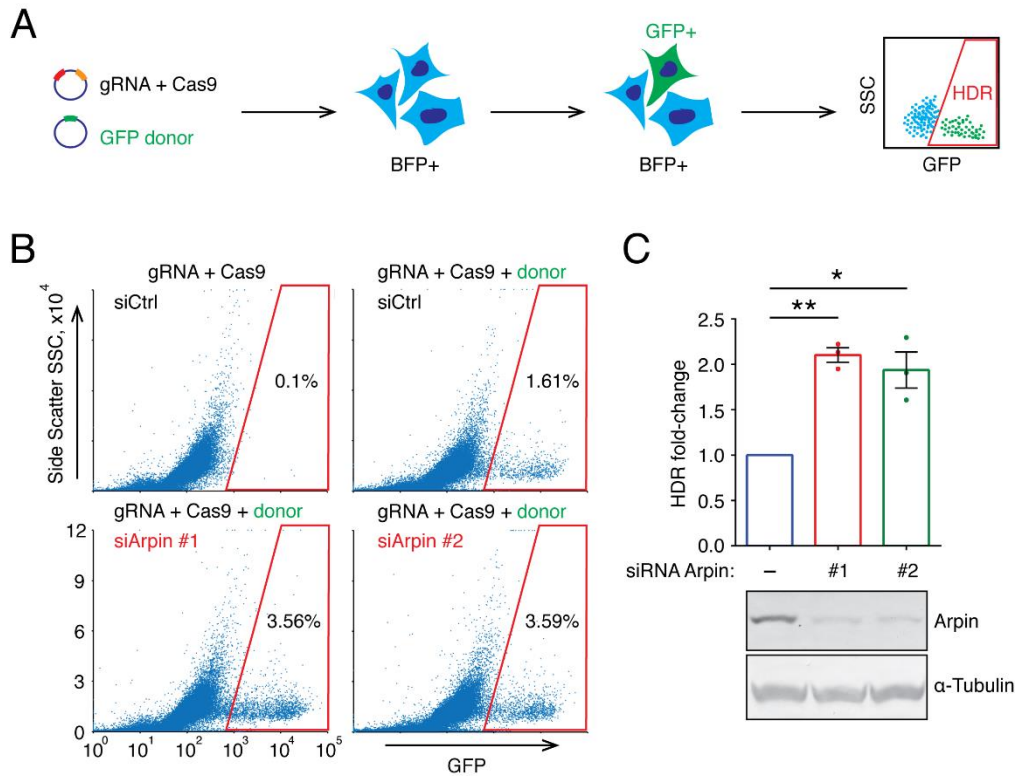


Figure 3. Arpin depletion increases the efficiency of HDR. (A) Scheme of experimental workflow for the analysis of HDR. 293T BFP reporter cells were transfected with a plasmid expressing Cas9 and gRNA targeting BFP gene and a plasmid containing GFP donor sequence and homology arms, as described in (Nambiar et al. 2019). The percentage of GFP+ cells was assessed by flow cytometry. (B) Representative flow cytometry plots of BFP reporter cells transfected with non-targeting siRNA or siRNAs targeting Arpin 24 h prior to transfection of the plasmids. (C) Quantification of the HDR assay and validation of Arpin depletion. Percentage of GFP+ cells were normalized to the percentage from control condition (non-targeting siRNA) in each independent experiment (n=3) and represented as mean \pm SEM (paired *t* test, * *p* < 0.05, ** *p* < 0.01).

4. Discussion

Arp2/3 inhibitory protein, Arpin was previously shown to regulate cell migration persistence (Dang et al. 2013; Simanov et al. 2021) and to be downregulated in several cancers (M. E. Lomakina et al. 2016; Liu et al. 2016; Y. Li et al. 2017; S.-R. Zhang et al. 2019). Here, we performed RPPA on breast tumour samples to examine the correlation of Arpin protein level with the levels of several markers of cell growth, proliferation, cytoskeleton reorganisation and DNA repair. Our results indicated that 8 markers correlated with Arpin levels. Consistent with the fact that Merlin, like Arpin, was reported to be downregulated in breast cancer (Morrow et al. 2011), Merlin levels were positively correlated with Arpin (Spearman coefficient $r=+0.315$, $p=0.0000033$). We further found a significant correlation with 6 markers of DNA damage response. Importantly, Arpin levels negatively correlated with levels of universal DNA damage response markers Phospho-H2AX, p53 and its phosphoforms. Consistent with this result, *ARPIN*^{-/-} cells exhibited more DSB foci than control cells and this effect was enhanced by the treatment with DSB-inducing drug.

DNA DSBs are particularly toxic DNA lesions that are needed to be efficiently and accurately repaired. The accumulation of DSB foci in *ARPIN*^{-/-} cells could be the result of delayed repair. Repression of c-NHEJ, a faster repair pathway operating through all the phases of cell cycle (Mao et al. 2008), or favouring of more time-consuming HDR, limited to S-G2 phases, over c-NHEJ could explain the delayed repair and DSB accumulation. Alternatively, the increased DNA damage could be due to a general failure of DNA repair mechanisms. Our RPPA data revealed no significant correlation between Arpin levels and the factors involved in c-NHEJ pathway. In contrast, HDR efficiency assessment using reporter system has demonstrated that Arpin depletion increased the percentage of DSB's repair via the HDR pathway. Together, this suggests that, by increasing the efficiency of HDR, Arpin depletion might lead to delayed reparation and overall accumulation of DSB foci.

In human cells, Arp2/3 fuels DSB's clustering necessary for efficient HDR (B. R. Schrank et al. 2018). This is in line with our experimental observation of HDR increase under the depletion of Arpin. Thus, Arpin could negatively regulate HDR by acting through the inhibition of the Arp2/3 complex in the nucleus. On the other hand, recently identified Arpin interaction partners Tankyrases are involved in many nuclear processes and thought to play a role in HDR (Nagy et al. 2016). Further studies are necessary to unravel the exact mechanism through which Arpin influences HDR.

The migrating cell can be subjected to the deformation or even disruption of nuclear envelope which results in DNA damage (Raab et al. 2016; Denais et al. 2016; Irianto et al. 2017; Sahu et al. 2021). This DNA damage requires efficient repair in order for the cell to maintain migration. Arpin depletion renders cell migration more persistent (Dang et al. 2013) but also, according to our results, is accompanied by the accumulation of DNA repair foci and increased HDR. Given the role that actin polymerisation plays in cell migration and its emerging functions in DNA repair processes, the involvement of NPF or Arpin might be a way through which the cell coordinates the both phenomena.

Funding

This research was funded by grants from the Agence Nationale de la Recherche (ANR ANR-15-CE13-0016-01) and from Institut National du Cancer (INCA_6521).

Acknowledgments

We thank Alberto Ciccia for the kind gift of the 293T BFP+ reporter cell line, Nicolas Manel for the kind gift of pTRIPSFFV-EGFP-53BP1 plasmid, Artem I. Fokin for stimulating discussions.

Author contribution

GS and AMG conceived and designed the study. GS performed all cell biology experiments, analysed data and wrote the draft of the paper. LK and IB performed the RPPA experiments. AMG coordinated the work, acquired the funding and wrote the final version of the manuscript. All authors have read and approved the final manuscript.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest

Appendix A. Supplementary data

The following is Supplementary data to this article:

Table S1. RPPA correlation results.

References

- Chávez-Paredes, Sandra, Armando Montoya-García, Karla F. Castro-Ochoa, Julio García-Cordero, Leticia Cedillo-Barrón, Mineko Shibayama, Porfirio Nava, et al. 2021. “The Arp2/3 Inhibitory Protein Arpin Is Required for Intestinal Epithelial Barrier Integrity.” *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 9. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.625719>.
- Dang, Irene, Roman Gorelik, Carla Sousa-Blin, Emmanuel Derivery, Christophe Guérin, Joern Linkner, Maria Nemethova, et al. 2013. “Inhibitory Signalling to the Arp2/3 Complex Steers Cell Migration.” *Nature* 503 (7475): 281–84. <https://doi.org/10.1038/nature12611>.
- Denais, Celine M., Rachel M. Gilbert, Philipp Isermann, Alexandra L. McGregor, Mariska te Lindert, Bettina Weigelin, Patricia M. Davidson, Peter Friedl, Katarina Wolf, and Jan Lammerding. 2016. “Nuclear Envelope Rupture and Repair during Cancer Cell Migration.” *Science* 352 (6283): 353–58. <https://doi.org/10.1126/science.aad7297>.
- Gentili, Matteo, Xavier Lahaye, Francesca Nadalin, Guilherme P. F. Nader, Emilia Puig Lombardi, Solène Herve, Nilushi S. De Silva, et al. 2019. “The N-Terminal Domain of CGAS Determines Preferential Association with Centromeric DNA and Innate Immune Activation in the Nucleus.” *Cell Reports* 26 (9): 2377–2393.e13. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.01.105>.
- Gorelik, Roman, and Alexis Gautreau. 2015. “The Arp2/3 Inhibitory Protein Arpin Induces Cell Turning by Pausing Cell Migration.” *Cytoskeleton (Hoboken, N.J.)* 72 (7): 362–71. <https://doi.org/10.1002/cm.21233>.
- Irianto, Jerome, Yuntao Xia, Charlotte R. Pfeifer, Avathamsa Athirasala, Jiazheng Ji, Cory Alvey, Manu Tewari, et al. 2017. “DNA Damage Follows Repair Factor Depletion and Portends Genome Variation in Cancer Cells after Pore Migration.” *Current Biology* 27 (2): 210–23. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.11.049>.
- Jubrail, Jamil, Kshanti Africano-Gomez, Floriane Herit, Anna Mularski, Pierre Bourdoncle, Lisa Oberg, Elisabeth Israelsson, et al. 2020. “Arpin Is Critical for Phagocytosis in Macrophages and Is Targeted by Human Rhinovirus.” *EMBO Reports* 21 (1): e47963. <https://doi.org/10.15252/embr.201947963>.
- Lee, J.-H., and T. T. Paull. 2007. “Activation and Regulation of ATM Kinase Activity in Response to DNA Double-Strand Breaks.” *Oncogene* 26 (56): 7741–48. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210872>.
- Li, Yi, Jiliang Qiu, Ting Pang, Zhixing Guo, Yonghui Su, Qingan Zeng, and Xuexia Zhang. 2017. “Restoration of Arpin Suppresses Aggressive Phenotype of Breast Cancer Cells.” *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie* 92 (August): 116–21. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.05.053>.
- Liu, Xiangping, Bin Zhao, Haibo Wang, Yu Wang, Mengdi Niu, Ming Sun, Yang Zhao, Ruyong Yao, and Zhiqiang Qu. 2016. “Aberrant Expression of Arpin in Human Breast Cancer and Its Clinical Significance.” *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 20 (3): 450–58. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12740>.
- Lomakina, Maria E, François Lallemand, Sophie Vacher, Nicolas Molinie, Irene Dang, Wulfran Cacheux, Tamara A Chipysheva, et al. 2016. “Arpin Downregulation in Breast Cancer Is Associated with Poor Prognosis.” *British Journal of Cancer* 114 (5): 545–53. <https://doi.org/10.1038/bjc.2016.18>.
- Machesky, L M, S J Atkinson, C Ampe, J Vandekerckhove, and T D Pollard. 1994. “Purification of a Cortical Complex Containing Two Unconventional Actins from *Acanthamoeba* by Affinity Chromatography on Profilin-Agarose.” *Journal of Cell Biology* 127 (1): 107–15. <https://doi.org/10.1083/jcb.127.1.107>.
- Mah, L.-J., A. El-Osta, and T. C. Karagiannis. 2010. “TH2AX: A Sensitive Molecular Marker of DNA Damage and Repair.” *Leukemia* 24 (4): 679–86. <https://doi.org/10.1038/leu.2010.6>.

- Molinie, Nicolas, and Alexis Gautreau. 2017. “The Arp2/3 Regulatory System and Its Dereglulation in Cancer.” *Physiological Reviews* 98 (1): 215–38. <https://doi.org/10.1152/physrev.00006.2017>.
- Molinie, Nicolas, Svetlana N. Rubtsova, Artem Fokin, Sai P. Visweshwaran, Nathalie Rocques, Anna Polesskaya, Anne Schnitzler, et al. 2019. “Cortical Branched Actin Determines Cell Cycle Progression.” *Cell Research* 29 (6): 432–45. <https://doi.org/10.1038/s41422-019-0160-9>.
- Morrow, K. Adam, Shamik Das, Brandon J. Metge, Keqiang Ye, Madhuri S. Mulekar, J. Allan Tucker, Rajeev S. Samant, and Lalita A. Shevde. 2011. “Loss of Tumor Suppressor Merlin in Advanced Breast Cancer Is Due to Post-Translational Regulation *.” *Journal of Biological Chemistry* 286 (46): 40376–85. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.250035>.
- Nagy, Zita, Alkmini Kalousi, Audrey Furst, Marc Koch, Benoit Fischer, and Evi Soutoglou. 2016. “Tankyrases Promote Homologous Recombination and Check Point Activation in Response to DSBs.” *PLOS Genetics* 12 (2): e1005791. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005791>.
- Nambiar, Tarun S., Pierre Billon, Giacomo Diedenhofen, Samuel B. Hayward, Angelo Tagliatalata, Kunheng Cai, Jen-Wei Huang, et al. 2019. “Stimulation of CRISPR-Mediated Homology-Directed Repair by an Engineered RAD18 Variant.” *Nature Communications* 10 (1): 3395. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11105-z>.
- Papalazarou, Vassilis, and Laura M. Machesky. 2021. “The Cell Pushes Back: The Arp2/3 Complex Is a Key Orchestrator of Cellular Responses to Environmental Forces.” *Current Opinion in Cell Biology, Cell Architecture*, 68 (February): 37–44. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2020.08.012>.
- Raab, Matthew, Matteo Gentili, Henry de Belly, Hawa-Racine Thiam, Pablo Vargas, Ana Joaquina Jimenez, Franziska Lautenschlaeger, et al. 2016. “ESCRT III Repairs Nuclear Envelope Ruptures during Cell Migration to Limit DNA Damage and Cell Death.” *Science* 352 (6283): 359–62. <https://doi.org/10.1126/science.aad7611>.
- Rondeau, S., S. Vacher, L. De Koning, A. Briaux, A. Schnitzler, W. Chemlali, C. Callens, R. Lidereau, and I. Bièche. 2015. “ATM Has a Major Role in the Double-Strand Break Repair Pathway Dysregulation in Sporadic Breast Carcinomas and Is an Independent Prognostic Marker at Both mRNA and Protein Levels.” *British Journal of Cancer* 112 (6): 1059–66. <https://doi.org/10.1038/bjc.2015.60>.
- Sahu, Sounak, Divya Sridhar, Prasad Abnave, Noboyoshi Kosaka, Anish Dattani, James M Thompson, Mark A Hill, and Aziz Aboobaker. 2021. “Ongoing Repair of Migration-Coupled DNA Damage Allows Planarian Adult Stem Cells to Reach Wound Sites.” Edited by Dario Riccardo Valenzano, Marianne E Bronner, and Dario Riccardo Valenzano. *ELife* 10 (April): e63779. <https://doi.org/10.7554/eLife.63779>.
- Schrank, Benjamin R., Tomas Aparicio, Yinyin Li, Wakam Chang, Brian T. Chait, Gregg G. Gundersen, Max E. Gottesman, and Jean Gautier. 2018. “Nuclear ARP2/3 Drives DNA Break Clustering for Homology-Directed Repair.” *Nature* 559 (7712): 61–66. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0237-5>.
- Simanov, Gleb, Irene Dang, Artem I. Fokin, Ksenia Oguievetskaia, Valérie Campanacci, Jacqueline Cherfils, and Alexis M. Gautreau. 2021. “Arpin Regulates Migration Persistence by Interacting with Both Tankyrases and the Arp2/3 Complex.” *International Journal of Molecular Sciences* 22 (8): 4115. <https://doi.org/10.3390/ijms22084115>.
- Syed, Aleem, and John A. Tainer. 2018. “The MRE11–RAD50–NBS1 Complex Conducts the Orchestration of Damage Signaling and Outcomes to Stress in DNA Replication and Repair.” *Annual Review of Biochemistry* 87 (1): 263–94. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-062917-012415>.
- Zhang, Shi-Rong, Hao Li, Wen-Quan Wang, Wei Jin, Jin-Zhi Xu, Hua-Xiang Xu, Chun-Tao Wu, et al. 2019. “Arpin Downregulation Is Associated with Poor Prognosis in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma.” *European Journal of Surgical Oncology: The Journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology* 45 (5): 769–75. <https://doi.org/10.1016/j.ejso.2018.10.539>.

Table S1. RPPA correlation results

Function	Name	Supplier	Reference	Correlation with Arpin (p, r)
Growth	p44/42 MAPK	CST	'9102'	0,000006 0,306
Growth	Phospho-p44/42 MAPK (Thr202/Tyr204)	CST	'4370 (D13.14.4E)'	0,043 0,131
Growth	MEK1/2	CST	'9126'	n.s. 0,045
Growth	Phospho-MEK1/2 (Ser217/221)	CST	'9154'	n.s. 0,065
Growth	p38 MAPK	CST	'9212'	n.s. -0,070
Growth	Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182)	BD	'612288'	0,047 -0,129
Growth	mTOR	Abcam	'ab51089'	n.s. -0,013
Growth	phospho-mTOR (Ser2448)	Abcam	'ab109268'	n.s. 0,065
Growth	S6 Ribosomal Protein	CST	'2212'	n.s. -0,077
Growth	Phospho-S6 Ribosomal Protein (Ser240/244)	CST	'2215'	n.s. 0,042
Growth	Phospho-S6 Ribosomal Protein (Ser235/236)	CST	'2211'	n.s. -0,061
Growth	p70 S6 Kinase	CST	'2708'	n.s. -0,024
Growth	Phospho-p70 S6 kinase (Thr389)	Upstate (Millipore)	'04-392'	0,00058 -0,228
Growth	Phospho-p70 S6 kinase (Thr421/Ser424)	Upstate (Millipore)	'04-393'	n.s. 0,025
Growth	PDK1 (D37A7)	CST	'5662'	n.s. -0,096
Growth	Phospho-PDK1 (Ser241)	CST	'3061'	n.s. 0,091
Growth	Src (36D10)	CST	'2109'	n.s. 0,057
Growth	Phospho-Src (Tyr527)	CST	'2105'	0,038 -0,134
Growth	LKB1	CST	'3050'	0,0029 -0,196
Growth	IRS1	Upstate (Millipore)	'06-248'	n.s. 0,089
Receptors	EGFR	Santa-Cruz	'sc-03 (1005)'	n.s. -0,088
Receptors	Phospho-EGFR (Thr669)	CST	'3056'	0,074 0,116
Receptors	Phospho-EGFR (Tyr 1173) (53A5)	CST	'4407'	0,035 -0,137
Receptors	HER2/ErbB2	Lab Vision	'MS-432-P1 (Ab11)'	n.s. -0,091
Receptors	Phospho-Her3/ErbB3 (tyr1289)	CST	'4791'	0,066 -0,119
Receptors	HER3/ErbB3 (c-17)	Santa-Cruz	'sc-285'	n.s. -0,021
Receptors	Phospho-HER4 (Tyr1162)	Epitomics	'2295-1'	n.s. -0,058

Receptors	Met	Santa-Cruz	'sc-10 (C-12)'	n.s. 0,012
Receptors	Phospho-Met (Tyr1234/1235)	CST	'3129'	n.s. -0,001
Receptors	Progesterone receptor	Epitomics	'1483-1'	n.s. -0,027
Receptors	Phospho-Estrogen Receptor alpha (Ser118)	Epitomics	'1091-1'	n.s. -0,106
Receptors	Estrogen Receptor	Epitomics	'4200-1'	n.s. 0,050
Receptors	Androgen Receptor	Epitomics	'1852-1'	0,026 0,145
Proliferation	YAP65	Epitomics	'2060-1'	0,0093 0,169
Proliferation	Phospho-YAP65 (Ser127)	Epitomics	'2209-1'	n.s. 0,083
Proliferation	Ki67 (MIB-1)	Dako	'M7240'	n.s. 0,033
Cell Cycle	p15 INK4B	CST	'4822'	n.s. 0,066
Cell cycle	Phospho-Wee1 (Ser642) (D47G5)	CST	'4910'	0,00033 -0,238
Invasion	MMP14/MT1	Upstate (Millipore)	'MAB3328'	n.s. -0,069
Invasion	E-cadherin	BD	'610181'	0,0093 0,169
Cytoskeleton	Ezrin	Epitomics	'2255-1'	n.s. -0,015
Cytoskeleton	Merlin	Epitomics	'3357-1'	0,0000033 0,315
Cytoskeleton	Cortactin	CST	'3503 (H222)'	n.s. 0,081
Cytoskeleton	Vimentin	BD	'550513'	n.s. -0,050
Apoptosis	FoxO3a/FKHRL1	CST	'9467'	n.s. -0,051
DNA repair	p53	CST	'9282'	0,000032 -0,280
DNA repair	Phospho-p53 (Ser392)	Epitomics	'2326-1'	0,00021 -0,247
DNA repair	Phospho-p53 (Ser15) (16G8)	CST	'9286'	0,000086 -0,263
DNA repair	53BP1	CST	'4937'	n.s. 0,090
DNA repair	Phospho-53BP1 (Ser1778)	CST	'2675'	0,076 -0,115
DNA repair	histone H2AX	Abcam	'ab11175'	n.s. 0,004
DNA repair	Phospho-Histone H2AX (Ser139)	Upstate (Millipore)	'05-636'	0,0000034 -0,315
DNA repair	Rad50	CST	'3427'	0,000021 0,286
DNA repair	Mre11(31H4)	CST	'4847'	0,0039 0,189
DNA repair	Ku80 (C48E7)	CST	'2180'	n.s. 0,071
DNA repair	PARP uncleaved p116	Epitomics	'1077-1'	n.s. -0,010

DNA repair	XRCC1	Abcam	'ab1838'	0,011 -0,165
DNA repair	NBS1 p95	CST	'3002'	n.s. 0,044
DNA repair	Phospho-NBS1 p95 (Ser343)	Abcam	'ab47272'	0,089 -0,110
DNA repair	ATM	Epitomics	'1549-1'	n.s. -0,051
DNA repair	Phospho-ATM (ser1981)	Novus	'NB110-55475'	n.s. -0,036

n.s. : not
significant

Discussion

I. Interaction d'Arpin avec Arp2/3 et la régulation de migration

1. Arpin régule la persistance de la migration via deux voies indépendantes

En cherchant à comprendre comment Arpin est régulée dans la cellule le laboratoire d'accueil a identifié les Tankyrases en tant que nouveaux partenaires d'Arpin. Les Tankyrases sont impliquées dans une multitude de processus cellulaires et régulent le niveau de la majorité de leurs partenaires via PARylation et leur dégradation ultérieure par les protéasomes. Cependant, nos résultats ont montré que les Tankyrases ne sont pas capables de réguler le niveau ou l'activité d'Arpin. Arpin interagit avec les Tankyrases via son domaine C-terminal qui lui permet également de se lier à Arp2/3. Dans l'expérience *in vitro* un domaine ARC des Tankyrases capable de lier Arpin rentrait en compétition avec Arp2/3 pour l'interaction avec Arpin. De manière surprenante, nos expériences ont montré que dans les cellules, les Tankyrases ne sont probablement pas en compétition avec Arp2/3 pour l'interaction avec Arpin et cette interaction n'est pas requise pour l'activité inhibitrice d'Arpin. Cette activité inhibitrice envers le complexe Arp2/3 a été caractérisée au lamellipode auparavant et était sous contrôle de la GTPase Rac1 (Dang et al. 2013). Il est possible que l'absence de la compétition soit due au fait que les deux partenaires d'Arpin, Arp2/3 et les Tankyrases, interagissent avec Arpin dans les compartiments différents de la cellule. En effet, les Tankyrases sont majoritairement diffusées dans le noyau et le cytoplasme.

Après avoir identifié les mutations du motif A d'Arpin permettant de découpler de manière spécifique ses interactions avec Arp2/3 et les Tankyrases, nous avons étudié l'influence de ces mutations sur la migration cellulaire. Nos résultats suggèrent que les interactions d'Arpin avec ses deux partenaires sont importantes pour la régulation de la persistance de migration. Ainsi, les mutations qui interrompent une des deux interactions provoquent la perte partielle d'activité d'Arpin, alors même que le mutant G218D, qui interrompt les deux interactions à la fois, est inactif. L'étude précédente a montré que le mutant d'Arpin auquel il manque les 20 acides aminés C-terminals était inactif (Dang et al. 2013). Nos nouveaux résultats montrent que cet effet ne peut plus être attribué uniquement à la perte d'interaction avec Arp2/3. Ainsi, les Tankyrases peuvent jouer le rôle d'un nouvel effecteur d'Arpin dans la régulation de la persistance de migration.

De nombreuses études rapportent l'implication des Tankyrases dans la régulation de la migration cellulaire. En particulier, les Tankyrases sont souvent surexprimées dans les cancers et l'inhibition des Tankyrases permet de diminuer les capacités de migration et d'invasions de différentes lignées de cellules cancéreuses (Zamudio-Martinez et al. 2021). Cependant, Arpin est au contraire souvent sous exprimée dans les tumeurs (L. Lomakina et al. 2016; Liu et al. 2016). Ainsi, l'interaction d'Arpin avec les Tankyrases est alors probablement surtout importante pour les cellules non transformées. Il est compliqué d'identifier comment l'interaction d'Arpin avec les Tankyrases affecte la persistance de migration et quels sont d'autres acteurs de cette régulation. Une piste possible est d'analyser les voies de signalisation qui impliquent les Tankyrases et qui sont perturbées suite à la déplétion d'Arpin. Cela permettrait de se focaliser sur certains partenaires particuliers des Tankyrases et d'étudier leur rôle éventuel dans la régulation de migration.

2. Arpin est capable d'empêcher la condensation des Tankyrases

L'oligomérisation des Tankyrases est requises pour la régulation de certaines voies de signalisation telles que Wnt, par exemple (Riccio et al. 2016; Mariotti et al. 2016). Nous avons donc étudié la nature des agrégats que les Tankyrases forment quand elles sont surexprimées ou leur activité catalytique est inhibée. Nous émettons l'hypothèse qu'il s'agit d'un processus de séparation de phases de type liquide-liquide qui pourrait avoir une signification physiologique. En effet, les Tankyrases possèdent quatre domaines ARC capables de lier les partenaires d'interaction et peuvent former des oligomères via leur domaine SAM (Mariotti et al. 2016). Egalement, certains partenaires des Tankyrases possèdent plusieurs sites d'interaction avec les Tankyrases et peuvent ainsi favoriser leur condensation.

Contrairement à certains partenaires des Tankyrases, Arpin est une protéine monomérique qui se lie aux Tankyrases via le site unique à son extrémité C-terminale. Selon le crible des peptides qui a établi la séquence consensus d'interaction avec les Tankyrases (Guettler et al. 2011), Arpin possède une combinaison d'acides aminés qui fournit une affinité pour les Tankyrases parmi les plus fortes. Quand les deux protéines sont surexprimées, Arpin est capable d'empêcher la condensation des Tankyrases, probablement, en saturant les sites d'interaction disponibles des Tankyrases et en empêchant ainsi la liaison des autres partenaires et l'oligomérisation des Tankyrases. Cependant, nous n'avons pas été capable de confirmer ce phénomène aux niveaux d'expression physiologiques de ces protéines. Nous n'avons pas non plus observé de changement de niveau de deux substrats des Tankyrases (Axin1 et PTEN) quand Arpin était déplétée.

3. Arpin se lie à Arp2/3 via la sous-unité Arp3 grâce à ses 2 motifs, C et A

Le travail du laboratoire d'accueil a mis en évidence l'activité inhibitrice d'Arpin envers Arp2/3 et son rôle dans la régulation de migration (Dang et al. 2013). Nous nous sommes associés à la recherche du laboratoire de R. Dominguez qui visait à définir les mécanismes précis d'interaction d'Arpin avec Arp2/3. Selon nos résultats pas encore publiés, Arpin se lie préférentiellement à la sous-unité Arp3 d'Arp2/3, contrairement aux NPFs dont l'affinité est plus forte pour la sous-unité Arp2. Les études précédentes ont montré que le complexe Arp2/3 possède deux sites d'interaction avec des NPFs et son activation nécessite la liaison de deux molécule NPFs.

Nos résultats indiquent qu'Arpin possède un seul site d'interaction sur le complexe Arp2/3 et donc qu'une seule molécule d'Arpin peut être liée à Arp2/3. Cette interaction nécessite son motif acide C-terminal (Dang et al. 2013) mais également son hélice C non identifiée auparavant qui précède le motif A. Cette hélice, ressemblant aux motifs C des NPFs, est importante pour la fonction inhibitrice d'Arpin. En effet, les mutations d'hélice C rendaient Arpin incapable de lier et d'inhiber Arp2/3 dans les cellules. En revanche, le fragment d'Arpin 194-226, correspondant aux motifs C et A d'Arpin, avait la même activité inhibitrice que la protéine complète. Cela explique la perte partielle d'activité de motif A seul par rapport à la protéine complète rapportée auparavant (Dang et al. 2013).

Nos résultats indiquent qu'Arpin possède probablement un seul site d'interaction avec Arp2/3, contrairement à deux sites suggérés par l'étude précédente (Sokolova et al. 2017). Par contre, le mécanisme d'action précis d'Arpin qui expliquerait comment Arpin exerce sa fonction inhibitrice est encore mal compris. La compétition d'Arpin avec les WCA d'un NPF *in vitro* suggère qu'Arpin pourrait déplacer le WCA d'Arp2/3, probablement de la sous-unité Arp3, et empêcher ainsi l'activation complète d'Arp2/3. Dans la cellule, Arpin, tout comme l'activateur WAVE, est localisée au lamellipode (Dang et al. 2013). Cela suggère qu'Arpin y pourrait effectivement rentrer en compétition avec WAVE. Cependant, il n'est pas établi qu'Arpin empêche l'interaction d'un premier domaine WCA avec la sous-unité Arp2. Il se pourrait qu'Arpin rentre en compétition uniquement avec le deuxième WCA qui se lie à Arp3 et empêche ainsi l'activation complète d'Arp2/3. Une vue plus précise de l'activation d'Arp2/3 et du mode d'action d'Arpin est requise pour comprendre la signification potentielle de cette inhibition qui ne touche que la deuxième étape de l'activation d'Arp2/3.

II. Nouveau rôle d'Arpin dans la régulation de réparation d'ADN

1. La déplétion d'Arpin augmente l'efficacité de la réparation d'ADN par HDR

La sous expression d'Arpin est documentée dans plusieurs cancers (L. Lomakina et al. 2016; Liu et al. 2016; T. Li et al. 2017; S.-R. Zhang et al. 2019). Néanmoins, le rôle que joue cette sous expression dans la progression de cancer n'est pas établi. Dans les tissus tumoraux de sein, le niveau protéique d'Arpin corrèle négativement avec les niveaux de certains facteurs précoces de la réponse à DSB, notamment, avec la forme phosphorylée de l'histone H2AX et du suppresseur de tumeurs p53. Conformément à cette corrélation, la déplétion d'Arpin dans les cellules non transformées se traduit par l'augmentation du nombre de foci de réparation d'ADN et cette augmentation est renforcée sous l'induction des cassures d'ADN double brin avec une drogue chimique.

Plusieurs hypothèses peuvent être proposées pour expliquer l'accumulation de foci de DSB sous la déplétion d'Arpin. Cette accumulation pourrait être le résultat du retardement de réparation. L'inhibition de la NHEJ, voie plus rapide de réparation (Mao et al. 2008), ou la favorisation de l'HDR sur la NHEJ pourrait expliquer le retard de réparation et l'accumulation de DSB. Nos données n'ont pas révélé la corrélation entre le niveau d'Arpin et celui de la protéine Ku80, facteur précoce de la voie NHEJ, ni avec le niveau de la protéine 53BP1 qui empêche la résection en G1 (Zimmermann and de Lange 2014) et favorise ainsi la NHEJ. En revanche, le niveau d'Arpin corrèle de manière positive avec celui de Rad50, la sous-unité du complexe MRN recruté sur les DSB et nécessaire pour l'initiation de la résection. Alternativement, l'augmentation de dommage de l'ADN pourrait être due à un défaut général de mécanismes de réparation.

Les avancées récentes ont permis d'associer la polymérisation d'actine dans le noyau à la réponse au dommage de l'ADN. Ainsi, Schrank et collègues ont rapporté que l'activation d'Arp2/3 lors de la réparation d'ADN dépendait du NPF WASP et permettaient de favoriser la résection et de générer le mouvement des sites de coupures d'ADN double brin nécessaires pour la réparation fidèle (B. R. Schrank et al. 2018). Cette étude laisse suggérer qu'un nouveau mécanisme de régulation de la réparation d'ADN via l'HDR pourrait opérer au niveau de la régulation d'activité d'Arp2/3. Nous avons donc supposé qu'Arpin pourrait jouer un rôle dans la régulation de ce processus. La déplétion d'Arpin renforcerait l'activité d'Arp2/3 et, ainsi, favoriserait la résection et la réparation via l'HDR. En effet, nos données montrent que la déplétion d'Arpin augmente l'efficacité de la recombinaison homologe. Ce résultat suggère que l'accumulation de foci de DSB dans les cellules déplétées d'Arpin est probablement due à l'augmentation de la part de DSB réparés via l'HDR.

Le mode d'action exact d'Arpin lors de la réparation d'ADN reste à élucider. Arpin, a-t-elle une activité inhibitrice envers le complexe Arp2/3 nucléaire similaire à celle qu'elle a au lamellipode ? Ou bien cette régulation passe-t-elle par l'interaction d'Arpin avec d'autres partenaires encore inconnus ? De manière intéressante, les Tankyrases sont localisées dans le noyau et, selon une étude, impliquées dans la réparation de l'ADN via l'HDR (Nagy et al. 2016). En plus, les Tankyrases interagissent avec Arpin et participent dans

la régulation de la persistance de migration cellulaire, bien que la localisation de cette interaction ne soit pas connue (Simanov et al. 2021). Dans le futur, il sera intéressant de vérifier si l'action d'Arpin dans la régulation de réparation de l'ADN implique son interaction avec les Tankyrases.

2. Les cassures d'ADN dans le contexte de migration

Dans un tissu, la cellule en migration subit de manière permanente les contraintes mécaniques de son environnement. La cellule rencontre un milieu poreux, très peuplé de fibres d'ECM, entre lesquels elle se propulse en adaptant constamment sa morphologie. Étant une organelle assez rigide, le noyau est un facteur limitant de la migration et définit la taille minimale de pores (approximativement 2-3 μ m pour différents types cellulaires) que la cellule peut passer. La rigidité du noyau est définie par l'expression des lamines A/C et son enveloppe est capable de supporter des déformations jusqu'à un certain seuil après lequel son intégrité peut être affectée. Cela n'empêche pourtant pas le passage des cellules à travers la zone confinée. Des études montrent que de nombreux types cellulaires sont capables de rompre l'intégrité de leur noyau, de passer au travers des pores et de réparer leur enveloppe nucléaire après le passage (Raab et al. 2016; Denais et al. 2016; Irianto et al. 2017). Les chercheurs ont remarqué que la rupture de l'enveloppe nucléaire, ou même une simple déformation du noyau que les cellules subissent lors de la migration est associée à un niveau élevé de dommages de l'ADN. Ce phénomène a été confirmé *in vivo* (Denais et al. 2016; Sahu et al. 2021). Ainsi, les cellules souches migrant vers le site de blessure accumulaient les cassures d'ADN au cours de leur migration et l'inhibition de la machinerie de réparation empêchait leur migration. Ces études suggèrent que la migration *in vivo* peut être associée aux dommages de l'ADN qui nécessite d'être efficacement réparé afin que la cellule puisse maintenir sa migration.

Le renforcement de l'activité d'Arp2/3 dans les cellules déplétées d'Arpin rend la migration cellulaire plus persistante et permet aux cellules d'explorer un espace plus important (Dang et al. 2013). Nos résultats montrent que le niveau d'Arpin corrèle de manière négative avec ceux des marqueurs précoces du dommage d'ADN et que la déplétion d'Arpin est accompagnée de l'accumulation de foci de réparation de l'ADN. Il est alors possible que les deux processus de migration et de réparation soient connectés et soumis à une régulation commune. Étant donné le rôle que la polymérisation d'actine joue dans la migration et ses fonctions émergentes dans les processus de réparation d'ADN, il est tout-à-fait possible que l'implication de NPF ou d'Arpin dans les deux phénomènes soit un des moyens de la cellule de coordonner les deux fonctions cellulaires de migration et de réparation de l'ADN.

Conclusions

Mon travail avait pour but de caractériser et d'élucider le rôle de l'interaction d'Arpin avec de nouveaux partenaires, les Tankyrases, identifiés auparavant par le laboratoire d'accueil. J'ai bénéficié d'un travail préalable qui a permis, notamment, d'identifier le site d'interaction avec les Tankyrases et de montrer qu'Arpin n'était pas régulée par les Tankyrases. J'ai alors étudié le rôle de cette interaction dans la régulation de la persistance de migration. Mes résultats indiquent qu'Arpin contrôle la persistance via l'interaction avec ses deux partenaires, le complexe Arp2/3 et les Tankyrases. Les deux interactions étaient importantes pour l'activité d'Arpin et ce n'est que l'interruption des deux interactions à la fois qui rendait Arpin complètement inactive. Il existe alors dans la cellule deux voies parallèles et indépendantes de la régulation de la persistance de migration sous contrôle d'Arpin, une bien connue qui dépend d'Arp2/3 et une nouvelle qui dépend des Tankyrases.

Vu que les mécanismes de l'inhibition d'Arp2/3 par Arpin ne sont pas encore bien compris, nous participons actuellement à une étude structurale menée par nos collaborateurs de l'Université de Pennsylvanie. Nos résultats réunis montrent que, contrairement aux NPFs, Arpin se lie à un site unique sur Arp2/3, localisé au niveau de la sous-unité Arp3. Cette interaction nécessite le motif A d'Arpin mais aussi son hélice C, similaire aux motifs C des NPFs. En effet, nous avons montré que l'hélice C d'Arpin régule la persistance de migration.

En parallèle, les résultats revisités d'une analyse de corrélation d'expression d'Arpin dans des carcinomes mammaires nous ont suggéré nouvelle fonction d'Arpin dans le processus de réparation d'ADN. J'ai pu montrer qu'Arpin est impliquée dans la régulation de la recombinaison homologue. En effet, la déplétion d'Arpin est associée à une augmentation de nombre de réparations effectuées par recombinaison homologue. Vu que la polymérisation d'actine branchée est indispensable à la migration persistante mais joue aussi un rôle important dans la réparation de l'ADN, il est probable que les machineries qui régulent Arp2/3 orchestre ces deux processus fondamentaux de manière coordonnée.

Références

- Abella, Jasmine V. G., Chiara Galloni, Julien Pernier, David J. Barry, Svend Kjær, Marie-France Carlier, and Michael Way. 2016. "Isoform Diversity in the Arp2/3 Complex Determines Actin Filament Dynamics." *Nature Cell Biology* 18 (1): 76–86. <https://doi.org/10.1038/ncb3286>.
- Andrin, Christi, Darin McDonald, Kathleen M. Attwood, Amélie Rodrigue, Sunita Ghosh, Razmik Mirzayans, Jean-Yves Masson, Graham Dellaire, and Michael J. Hendzel. 2012. "A Requirement for Polymerized Actin in DNA Double-Strand Break Repair." *Nucleus* 3 (4): 384–95. <https://doi.org/10.4161/nucl.21055>.
- Baarlink, Christian, Haicui Wang, and Robert Grosse. 2013. "Nuclear Actin Network Assembly by Formins Regulates the SRF Coactivator MAL." *Science* 340 (6134): 864–67. <https://doi.org/10.1126/science.1235038>.
- Barzik, Melanie, Tatyana I. Kotova, Henry N. Higgs, Larnele Hazelwood, Dorit Hanein, Frank B. Gertler, and Dorothy A. Schafer. 2005. "Ena/VASP Proteins Enhance Actin Polymerization in the Presence of Barbed End Capping Proteins *." *Journal of Biological Chemistry* 280 (31): 28653–62. <https://doi.org/10.1074/jbc.M503957200>.
- Belin, Brittany J., Beth A. Cimini, Elizabeth H. Blackburn, and R. Dyche Mullins. 2013. "Visualization of Actin Filaments and Monomers in Somatic Cell Nuclei." *Molecular Biology of the Cell* 24 (7): 982–94. <https://doi.org/10.1091/mbc.e12-09-0685>.
- Belin, Brittany J, Terri Lee, and R Dyche Mullins. 2015. "DNA Damage Induces Nuclear Actin Filament Assembly by Formin-2 and Spire-1/2 That Promotes Efficient DNA Repair." Edited by Pekka Lappalainen. *ELife* 4 (August): e07735. <https://doi.org/10.7554/eLife.07735>.
- Bersini, Simone, Nikki K. Lytle, Roberta Schulte, Ling Huang, Geoffrey M. Wahl, and Martin W. Hetzer. 2020. "Nup93 Regulates Breast Tumor Growth by Modulating Cell Proliferation and Actin Cytoskeleton Remodeling." *Life Science Alliance* 3 (1). <https://doi.org/10.26508/lsa.201900623>.
- Blanchoin, Laurent, Kurt J. Amann, Henry N. Higgs, Jean-Baptiste Marchand, Donald A. Kaiser, and Thomas D. Pollard. 2000. "Direct Observation of Dendritic Actin Filament Networks Nucleated by Arp2/3 Complex and WASP/Scar Proteins." *Nature* 404 (6781): 1007–11. <https://doi.org/10.1038/35010008>.
- Blanchoin, Laurent, Rajaa Boujemaa-Paterski, Cécile Sykes, and Julie Plastino. 2014. "Actin Dynamics, Architecture, and Mechanics in Cell Motility." *Physiological Reviews* 94 (1): 235–63. <https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2013>.
- Block, Jennifer, Dennis Breitsprecher, Sonja Kühn, Moritz Winterhoff, Frieda Kage, Robert Geffers, Patrick Duwe, et al. 2012. "FMNL2 Drives Actin-Based Protrusion and Migration Downstream of Cdc42." *Current Biology* 22 (11): 1005–12. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.03.064>.
- Boczkowska, Malgorzata, Grzegorz Rebowski, David J. Kast, and Roberto Dominguez. 2014. "Structural Analysis of the Transitional State of Arp2/3 Complex Activation by Two Actin-Bound WCAs." *Nature Communications* 5 (1): 3308. <https://doi.org/10.1038/ncomms4308>.
- Breitsprecher, Dennis, and Bruce L. Goode. 2013. "Formins at a Glance." *Journal of Cell Science* 126 (1): 1–7. <https://doi.org/10.1242/jcs.107250>.
- Campanale, Joseph P., Thomas Y. Sun, and Denise J. Montell. 2017. "Development and Dynamics of Cell Polarity at a Glance." *Journal of Cell Science* 130 (7): 1201–7. <https://doi.org/10.1242/jcs.188599>.

- Campellone, Kenneth G., Neil J. Webb, Elizabeth A. Znameroski, and Matthew D. Welch. 2008. "WHAMM Is an Arp2/3 Complex Activator That Binds Microtubules and Functions in ER to Golgi Transport." *Cell* 134 (1): 148–61. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.05.032>.
- Campellone, Kenneth G., and Matthew D. Welch. 2010. "A Nucleator Arms Race: Cellular Control of Actin Assembly." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 11 (4): 237–51. <https://doi.org/10.1038/nrm2867>.
- Caridi, Christopher P., Carla D'Agostino, Taehyun Ryu, Grzegorz Zapotoczny, Laetitia Delabaere, Xiao Li, Varandt Y. Khodaverdian, et al. 2018. "Nuclear F-Actin and Myosins Drive Relocalization of Heterochromatic Breaks." *Nature* 559 (7712): 54–60. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0242-8>.
- Caridi, Christopher Patrick, Matthias Plessner, Robert Grosse, and Irene Chiolo. 2019. "Nuclear Actin Filaments in DNA Repair Dynamics." *Nature Cell Biology* 21 (9): 1068–77. <https://doi.org/10.1038/s41556-019-0379-1>.
- Carlier, M. F., and D. Pantaloni. 1986. "Direct Evidence for ADP-Inorganic Phosphate-F-Actin as the Major Intermediate in ATP-Actin Polymerization. Rate of Dissociation of Inorganic Phosphate from Actin Filaments." *Biochemistry* 25 (24): 7789–92. <https://doi.org/10.1021/bi00372a001>.
- Carlier, Marie-France, Valérie Laurent, Jérôme Santolini, Ronald Melki, Dominique Didry, Gui-Xian Xia, Yan Hong, Nam-Hai Chua, and Dominique Pantaloni. 1997. "Actin Depolymerizing Factor (ADF/Cofilin) Enhances the Rate of Filament Turnover: Implication in Actin-Based Motility." *The Journal of Cell Biology* 136 (6): 1307–22.
- Chan, Keefe T., Sarah J. Creed, and James E. Bear. 2011. "Unraveling the Enigma: Progress towards Understanding the Coronin Family of Actin Regulators." *Trends in Cell Biology* 21 (8): 481–88. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2011.04.004>.
- Chávez-Paredes, Sandra, Armando Montoya-García, Karla F. Castro-Ochoa, Julio García-Cordero, Leticia Cedillo-Barrón, Mineko Shibayama, Porfirio Nava, et al. 2021. "The Arp2/3 Inhibitory Protein Arpin Is Required for Intestinal Epithelial Barrier Integrity." *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 9. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.625719>.
- Charest, Pascale G., and Richard A. Firtel. 2006. "Big Roles for Small GTPases in the Control of Directed Cell Movement." *Biochemical Journal* 401 (2): 377–90. <https://doi.org/10.1042/BJ20061432>.
- Charras, Guillaume, and Ewa Paluch. 2008. "Blebs Lead the Way: How to Migrate without Lamellipodia." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9 (9): 730–36. <https://doi.org/10.1038/nrm2453>.
- Chen, Baoyu, Klaus Brinkmann, Zhucheng Chen, Chi W. Pak, Yuxing Liao, Shuoyong Shi, Lisa Henry, Nick V. Grishin, Sven Bogdan, and Michael K. Rosen. 2014. "The WAVE Regulatory Complex Links Diverse Receptors to the Actin Cytoskeleton." *Cell* 156 (1): 195–207. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.11.048>.
- Chen, Baoyu, Hui-Ting Chou, Chad A Brautigam, Wenmin Xing, Sheng Yang, Lisa Henry, Lynda K Doolittle, Thomas Walz, and Michael K Rosen. 2017. "Rac1 GTPase Activates the WAVE Regulatory Complex through Two Distinct Binding Sites." Edited by Axel T Brunger. *ELife* 6 (September): e29795. <https://doi.org/10.7554/eLife.29795>.
- Chen, Zhucheng, Dominika Borek, Shae B. Padrick, Timothy S. Gomez, Zoltan Metlagel, Ayman M. Ismail, Junko Umetani, Daniel D. Billadeau, Zbyszek Otwinowski, and Michael K. Rosen. 2010. "Structure and Control of the Actin Regulatory WAVE Complex." *Nature* 468 (7323): 533–38. <https://doi.org/10.1038/nature09623>.
- Chereau, David, Frederic Kerff, Philip Graceffa, Zenon Grabarek, Knut Langsetmo, and Roberto Dominguez. 2005. "Actin-Bound Structures of Wiskott–Aldrich Syndrome Protein (WASP)-Homology Domain 2 and the

Implications for Filament Assembly.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102 (46): 16644–49. <https://doi.org/10.1073/pnas.0507021102>.

Chesarone, Melissa A, and Bruce L Goode. 2009. “Actin Nucleation and Elongation Factors: Mechanisms and Interplay.” *Current Opinion in Cell Biology*, Cell structure and dynamics, 21 (1): 28–37. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2008.12.001>.

Chorev, Dror S., Oren Moscovitz, Benjamin Geiger, and Michal Sharon. 2014. “Regulation of Focal Adhesion Formation by a Vinculin-Arp2/3 Hybrid Complex.” *Nature Communications* 5 (1): 3758. <https://doi.org/10.1038/ncomms4758>.

Ciccia, Alberto, and Stephen J. Elledge. 2010. “The DNA Damage Response: Making It Safe to Play with Knives.” *Molecular Cell* 40 (2): 179–204. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.09.019>.

Coutts, Amanda S., and Nicholas La Thangue. 2006. “The P53 Response during DNA Damage: Impact of Transcriptional Cofactors.” Edited by Stefan G.E. Roberts, Robert O.J. Weinzierl, and Robert J. White. *Biochemical Society Symposia* 73 (January): 181–89. <https://doi.org/10.1042/bss0730181>.

Damiano-Guercio, Julia, Laëticia Kurzawa, Jan Mueller, Georgi Dimchev, Matthias Schaks, Maria Nemethova, Thomas Pokrant, et al. 2020. “Loss of Ena/VASP Interferes with Lamellipodium Architecture, Motility and Integrin-Dependent Adhesion.” Edited by Pekka Lappalainen, Anna Akhmanova, Pekka Lappalainen, and Giorgio Scita. *ELife* 9 (May): e55351. <https://doi.org/10.7554/eLife.55351>.

Dang, Irene, Roman Gorelik, Carla Sousa-Blin, Emmanuel Derivery, Christophe Guérin, Joern Linkner, Maria Nemethova, et al. 2013. “Inhibitory Signalling to the Arp2/3 Complex Steers Cell Migration.” *Nature* 503 (7475): 281–84. <https://doi.org/10.1038/nature12611>.

Dang, Irene, Joern Linkner, Jun Yan, Daniel Irimia, Jan Faix, and Alexis Gautreau. 2017. “The Arp2/3 Inhibitory Protein Arpin Is Dispensable for Chemotaxis.” *Biology of the Cell* 109 (4): 162–66. <https://doi.org/10.1111/boc.201600064>.

Denais, Celine M., Rachel M. Gilbert, Philipp Isermann, Alexandra L. McGregor, Mariska te Lindert, Bettina Weigelin, Patricia M. Davidson, Peter Friedl, Katarina Wolf, and Jan Lammerding. 2016. “Nuclear Envelope Rupture and Repair during Cancer Cell Migration.” *Science* 352 (6283): 353–58. <https://doi.org/10.1126/science.aad7297>.

Derivery, Emmanuel, and Alexis Gautreau. 2010. “Generation of Branched Actin Networks: Assembly and Regulation of the N-WASP and WAVE Molecular Machines.” *BioEssays* 32 (2): 119–31. <https://doi.org/10.1002/bies.200900123>.

Derivery, Emmanuel, Bérangère Lombard, Damarys Loew, and Alexis Gautreau. 2009. “The Wave Complex Is Intrinsically Inactive.” *Cell Motility* 66 (10): 777–90. <https://doi.org/10.1002/cm.20342>.

Derivery, Emmanuel, Carla Sousa, Jérémie J. Gautier, Bérangère Lombard, Damarys Loew, and Alexis Gautreau. 2009. “The Arp2/3 Activator WASH Controls the Fission of Endosomes through a Large Multiprotein Complex.” *Developmental Cell* 17 (5): 712–23. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.09.010>.

Dimchev, Vanessa, Ines Lahmann, Stefan A. Koestler, Frieda Kage, Georgi Dimchev, Anika Steffen, Theresia E. B. Stradal, Franz Vauti, Hans-Henning Arnold, and Klemens Rottner. 2021. “Induced Arp2/3 Complex Depletion Increases FMNL2/3 Formin Expression and Filopodia Formation.” *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 9. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.634708>.

Dong, Rui, Yasunori Saheki, Sharan Swarup, Louise Lucast, J. Wade Harper, and Pietro De Camilli. 2016. “Endosome-ER Contacts Control Actin Nucleation and Retromer Function through VAP-Dependent Regulation of PI4P.” *Cell* 166 (2): 408–23. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.06.037>.

- Dovas, Athanassios, and John R. Couchman. 2005. "RhoGDI: Multiple Functions in the Regulation of Rho Family GTPase Activities." *Biochemical Journal* 390 (1): 1–9. <https://doi.org/10.1042/BJ20050104>.
- Du, Ting-Ting, James B. Dewey, Elizabeth L. Wagner, Runjia Cui, Jinho Heo, Jeong-Jin Park, Shimon P. Francis, et al. 2019. "LMO7 Deficiency Reveals the Significance of the Cuticular Plate for Hearing Function." *Nature Communications* 10 (1): 1117. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09074-4>.
- DuChez, Brian J., Andrew D. Doyle, Emiliós K. Dimitriadis, and Kenneth M. Yamada. 2019. "Durotaxis by Human Cancer Cells." *Biophysical Journal* 116 (4): 670–83. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2019.01.009>.
- Edwards, Marc, Adam Zwolak, Dorothy A. Schafer, David Sept, Roberto Dominguez, and John A. Cooper. 2014. "Capping Protein Regulators Fine-Tune Actin Assembly Dynamics." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 15 (10): 677–89. <https://doi.org/10.1038/nrm3869>.
- Egile, Coumaran, Isabelle Rouiller, Xiao-Ping Xu, Niels Volkmann, Rong Li, and Dorit Hanein. 2005. "Mechanism of Filament Nucleation and Branch Stability Revealed by the Structure of the Arp2/3 Complex at Actin Branch Junctions." *PLOS Biology* 3 (11): e383. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0030383>.
- El-Brolosy, Mohamed A., Zacharias Kontarakis, Andrea Rossi, Carsten Kuenne, Stefan Günther, Nana Fukuda, Khrievono Kikhi, et al. 2019. "Genetic Compensation Triggered by Mutant mRNA Degradation." *Nature* 568 (7751): 193–97. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1064-z>.
- Etienne-Manneville, Sandrine. 2013. "Microtubules in Cell Migration." *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 29 (1): 471–99. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-101011-155711>.
- Fetics, Susan, Aurélien Thureau, Valérie Campanacci, Magali Aumont-Nicaise, Irène Dang, Alexis Gautreau, Javier Pérez, and Jacqueline Cherfils. 2016. "Hybrid Structural Analysis of the Arp2/3 Regulator Arpin Identifies Its Acidic Tail as a Primary Binding Epitope." *Structure* 24 (2): 252–60. <https://doi.org/10.1016/j.str.2015.12.001>.
- Fokin, Artem I., Violaine David, Ksenia Oguievetskaia, Emmanuel Derivery, Caroline E. Stone, Luyan Cao, Nathalie Rocques, et al. 2021. "The Arp1/11 Minifilament of Dynactin Primes the Endosomal Arp2/3 Complex." *Science Advances* 7 (3): eabd5956. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abd5956>.
- Fokin, Artem I., and Alexis M. Gautreau. 2021. "Assembly and Activity of the WASH Molecular Machine: Distinctive Features at the Crossroads of the Actin and Microtubule Cytoskeletons." *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 9. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.658865>.
- Fort, Loic, Jose Batista, Peter A. Thomason, Heather J. Spence, Jamie A. Whitelaw, Luke Tweedy, Jennifer Greaves, et al. 2018. "CYRI (FAM49) Proteins Are Local Inhibitors of Scar/WAVE Induced Lamellipodia That Bind Directly to Active Rac1." *Nature Cell Biology* 20 (10): 1159–71. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0198-9>.
- Friedberg, Felix. 2009. "Alternative Splicing for Members of Human Mosaic Domain Superfamilies. I. The CH and LIM Domains Containing Group of Proteins." *Molecular Biology Reports* 36 (5): 1059–81. <https://doi.org/10.1007/s11033-008-9281-9>.
- Friedl, Peter, and Darren Gilmour. 2009. "Collective Cell Migration in Morphogenesis, Regeneration and Cancer." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 10 (7): 445–57. <https://doi.org/10.1038/nrm2720>.
- Funamoto, Satoru, Ruedi Meili, Susan Lee, Lisa Parry, and Richard A. Firtel. 2002. "Spatial and Temporal Regulation of 3-Phosphoinositides by PI 3-Kinase and PTEN Mediates Chemotaxis." *Cell* 109 (5): 611–23. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00755-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00755-9).

- Funk, Johanna, Felipe Merino, Matthias Schaks, Klemens Rottner, Stefan Raunser, and Peter Bieling. 2021. "A Barbed End Interference Mechanism Reveals How Capping Protein Promotes Nucleation in Branched Actin Networks." *Nature Communications* 12 (1): 5329. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-25682-5>.
- Galloni, Chiara, Davide Carra, Jasmine V.G. Abella, Svend Kjær, Pavithra Singaravelu, David J. Barry, Naoko Kogata, Christophe Guérin, Laurent Blanchoin, and Michael Way. 2021. "MICAL2 Enhances Branched Actin Network Disassembly by Oxidizing Arp3B-Containing Arp2/3 Complexes." *Journal of Cell Biology* 220 (8). <https://doi.org/10.1083/jcb.202102043>.
- Gardel, Margaret L., Ian C. Schneider, Aratyn-Schaus Yvonne, and Clare M. Waterman. 2010. "Mechanical Integration of Actin and Adhesion Dynamics in Cell Migration." *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 26 (1): 315–33. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.011209.122036>.
- Gautier, Jérémie J., Maria E. Lomakina, Lamia Bouslama-Oueghlani, Emmanuel Derivery, Helen Beilinson, Wolfgang Faigle, Damaris Loew, et al. 2011. "Clathrin Is Required for Scar/Wave-Mediated Lamellipodium Formation." *Journal of Cell Science* 124 (20): 3414–27. <https://doi.org/10.1242/jcs.081083>.
- Gautreau, Alexis, Hsin-yi H. Ho, Jiaxu Li, Hanno Steen, Steven P. Gygi, and Marc W. Kirschner. 2004. "Purification and Architecture of the Ubiquitous Wave Complex." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101 (13): 4379–83. <https://doi.org/10.1073/pnas.0400628101>.
- Gentili, Matteo, Xavier Lahaye, Francesca Nadalin, Guilherme P. F. Nader, Emilia Puig Lombardi, Solène Herve, Nilushi S. De Silva, et al. 2019. "The N-Terminal Domain of CGAS Determines Preferential Association with Centromeric DNA and Innate Immune Activation in the Nucleus." *Cell Reports* 26 (9): 2377-2393.e13. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.01.105>.
- Goley, Erin D., Stacia E. Rodenbusch, Adam C. Martin, and Matthew D. Welch. 2004. "Critical Conformational Changes in the Arp2/3 Complex Are Induced by Nucleotide and Nucleation Promoting Factor." *Molecular Cell* 16 (2): 269–79. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.09.018>.
- Gorelik, Roman, and Alexis Gautreau. 2014. "Quantitative and Unbiased Analysis of Directional Persistence in Cell Migration." *Nature Protocols* 9 (8): 1931–43. <https://doi.org/10.1038/nprot.2014.131>.
- Gorelik Roman, and Alexis Gautreau. 2015. "The Arp2/3 Inhibitory Protein Arpin Induces Cell Turning by Pausing Cell Migration." *Cytoskeleton (Hoboken, N.J.)* 72 (7): 362–71. <https://doi.org/10.1002/cm.21233>.
- Grosse, Robert, and Maria K. Vartiainen. 2013. "To Be or Not to Be Assembled: Progressing into Nuclear Actin Filaments." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 14 (11): 693–97. <https://doi.org/10.1038/nrm3681>.
- Guettler, Sebastian, Jose LaRose, Evangelia Petsalaki, Gerald Gish, Andy Scotter, Tony Pawson, Robert Rottapel, and Frank Sicheri. 2011. "Structural Basis and Sequence Rules for Substrate Recognition by Tankyrase Explain the Basis for Cherubism Disease." *Cell* 147 (6): 1340–54. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.10.046>.
- Haga, Raquel B., and Anne J. Ridley. 2016. "Rho GTPases: Regulation and Roles in Cancer Cell Biology." *Small GTPases* 7 (4): 207–21. <https://doi.org/10.1080/21541248.2016.1232583>.
- Hahne, Penelope, Antonio Sechi, Stefanie Benesch, and J. Victor Small. 2001. "Scar/WAVE Is Localised at the Tips of Protruding Lamellipodia in Living Cells." *FEBS Letters* 492 (3): 215–20. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(01\)02239-6](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)02239-6).
- Hakala, Markku, Hugo Wioland, Mari Tolonen, Tommi Kotila, Antoine Jegou, Guillaume Romet-Lemonne, and Pekka Lappalainen. 2021. "Twinfilin Uncaps Filament Barbed Ends to Promote Turnover of

Lamellipodial Actin Networks." *Nature Cell Biology* 23 (2): 147–59. <https://doi.org/10.1038/s41556-020-00629-y>.

Halle, Mari K., Marte Sødal, David Forsse, Hilde Engerud, Kathrine Woie, Njål G. Lura, Kari S. Wagner-Larsen, et al. 2021. "A 10-Gene Prognostic Signature Points to LIMCH1 and HLA-DQB1 as Important Players in Aggressive Cervical Cancer Disease." *British Journal of Cancer* 124 (10): 1690–98. <https://doi.org/10.1038/s41416-021-01305-0>.

Hao, Yi-Heng, Jennifer M. Doyle, Saumya Ramanathan, Timothy S. Gomez, Da Jia, Ming Xu, Zhijian J. Chen, Daniel D. Billadeau, Michael K. Rosen, and Patrick Ryan Potts. 2013. "Regulation of WASH-Dependent Actin Polymerization and Protein Trafficking by Ubiquitination." *Cell* 152 (5): 1051–64. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.01.051>.

Helfer, Emmanuèle, Michael E. Harbour, Véronique Henriot, Goran Lakisic, Carla Sousa-Blin, Larisa Volceanov, Matthew N. J. Seaman, and Alexis Gautreau. 2013. "Endosomal Recruitment of the WASH Complex: Active Sequences and Mutations Impairing Interaction with the Retromer." *Biology of the Cell* 105 (5): 191–207. <https://doi.org/10.1111/boc.201200038>.

Hetrick, Byron, Min Suk Han, Luke A. Helgeson, and Brad J. Nolen. 2013. "Small Molecules CK-666 and CK-869 Inhibit Actin-Related Protein 2/3 Complex by Blocking an Activating Conformational Change." *Chemistry & Biology* 20 (5): 701–12. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2013.03.019>.

Holaska, James M., Soroush Rais-Bahrami, and Katherine L. Wilson. 2006. "Lmo7 Is an Emerin-Binding Protein That Regulates the Transcription of Emerin and Many Other Muscle-Relevant Genes." *Human Molecular Genetics* 15 (23): 3459–72. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddl423>.

Hotulainen, Pirta, and Pekka Lappalainen. 2006. "Stress Fibers Are Generated by Two Distinct Actin Assembly Mechanisms in Motile Cells." *The Journal of Cell Biology* 173 (3): 383–94. <https://doi.org/10.1083/jcb.200511093>.

Hurst, Verena, Kenji Shimada, and Susan M. Gasser. 2019. "Nuclear Actin and Actin-Binding Proteins in DNA Repair." *Trends in Cell Biology* 29 (6): 462–76. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2019.02.010>.

Irianto, Jerome, Yuntao Xia, Charlotte R. Pfeifer, Avathamsa Athirasala, Jiazheng Ji, Cory Alvey, Manu Tewari, et al. 2017. "DNA Damage Follows Repair Factor Depletion and Portends Genome Variation in Cancer Cells after Pore Migration." *Current Biology* 27 (2): 210–23. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.11.049>.

Jia, Da, Timothy S. Gomez, Zoltan Metlagel, Junko Umetani, Zbyszek Otwinowski, Michael K. Rosen, and Daniel D. Billadeau. 2010. "WASH and WAVE Actin Regulators of the Wiskott–Aldrich Syndrome Protein (WASP) Family Are Controlled by Analogous Structurally Related Complexes." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107 (23): 10442–47. <https://doi.org/10.1073/pnas.0913293107>.

Johnson, Michael A., Manisha Sharma, Myth T. S. Mok, and Beric R. Henderson. 2013. "Stimulation of in Vivo Nuclear Transport Dynamics of Actin and Its Co-Factors IQGAP1 and Rac1 in Response to DNA Replication Stress." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1833 (10): 2334–47. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.06.002>.

Jubrail, Jamil, Kshanti Africano-Gomez, Floriane Herit, Anna Mularski, Pierre Bourdoncle, Lisa Oberg, Elisabeth Israelsson, et al. 2020. "Arpin Is Critical for Phagocytosis in Macrophages and Is Targeted by Human Rhinovirus." *EMBO Reports* 21 (1): e47963. <https://doi.org/10.15252/embr.201947963>.

- Kabsch, Wolfgang, Hans Georg Mannherz, Dietrich Suck, Emil F. Pai, and Kenneth C. Holmes. 1990. "Atomic Structure of the Actin: DNase I Complex." *Nature* 347 (6288): 37–44. <https://doi.org/10.1038/347037a0>.
- Kanaar, Roland, and Claire Wyman. 2008. "DNA Repair by the MRN Complex: Break It to Make It." *Cell* 135 (1): 14–16. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.09.027>.
- Karlsson, Terese, Samuel Kvarnbrink, Camilla Holmlund, Johan Botling, Patrick Micke, Roger Henriksson, Mikael Johansson, and Håkan Hedman. 2018. "LMO7 and LIMCH1 Interact with LRIG Proteins in Lung Cancer, with Prognostic Implications for Early-Stage Disease." *Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands)* 125 (November): 174–84. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2018.09.017>.
- Kim, Hye-Ran, Min-Sung Kwon, Sangmin Lee, YeVin Mun, Kyung-Sik Lee, Chang-Hyun Kim, Bo-Ra Na, et al. 2018. "TAGLN2 Polymerizes G-Actin in a Low Ionic State but Blocks Arp2/3-Nucleated Actin Branching in Physiological Conditions." *Scientific Reports* 8 (1): 5503. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23816-2>.
- King, Samantha J., Sreeja B. Asokan, Elizabeth M. Haynes, Seth P. Zimmerman, Jeremy D. Rotty, James G. Alb Jr, Alicia Tagliatela, et al. 2016. "Lamellipodia Are Crucial for Haptotactic Sensing and Response." *Journal of Cell Science* 129 (12): 2329–42. <https://doi.org/10.1242/jcs.184507>.
- King, Virginia L., Nathan K. Leclair, Alyssa M. Coulter, and Kenneth G. Campellone. 2021. "The Actin Nucleation Factors JMY and WHAMM Enable a Rapid Arp2/3 Complex-Mediated Intrinsic Pathway of Apoptosis." *PLOS Genetics* 17 (4): e1009512. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1009512>.
- Kiuchi, Tai, Kazumasa Ohashi, Souichi Kurita, and Kensaku Mizuno. 2007. "Cofilin Promotes Stimulus-Induced Lamellipodium Formation by Generating an Abundant Supply of Actin Monomers." *Journal of Cell Biology* 177 (3): 465–76. <https://doi.org/10.1083/jcb.200610005>.
- Krause, Matthias, and Alexis Gautreau. 2014. "Steering Cell Migration: Lamellipodium Dynamics and the Regulation of Directional Persistence." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 15 (9): 577–90. <https://doi.org/10.1038/nrm3861>.
- Kuhn, Jeffrey R., and Thomas D. Pollard. 2005. "Real-Time Measurements of Actin Filament Polymerization by Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy." *Biophysical Journal* 88 (2): 1387–1402. <https://doi.org/10.1529/biophysj.104.047399>.
- Lamm, Noa, Mark N. Read, Max Nobis, David Van Ly, Scott G. Page, V. Pragathi Masamsetti, Paul Timpson, Maté Biro, and Anthony J. Cesare. 2020. "Nuclear F-Actin Counteracts Nuclear Deformation and Promotes Fork Repair during Replication Stress." *Nature Cell Biology* 22 (12): 1460–70. <https://doi.org/10.1038/s41556-020-00605-6>.
- Lappalainen, Pekka, and David G. Drubin. 1997. "Cofilin Promotes Rapid Actin Filament Turnover in Vivo." *Nature* 388 (6637): 78–82. <https://doi.org/10.1038/40418>.
- Le, Anh Hoang, Tamas Yelland, Nikki R. Paul, Loic Fort, Savvas Nikolaou, Shehab Ismail, and Laura M. Machesky. 2021. "CYRI-A Limits Invasive Migration through Macropinosome Formation and Integrin Uptake Regulation." *Journal of Cell Biology* 220 (9). <https://doi.org/10.1083/jcb.202012114>.
- Leduc, Cécile, and Sandrine Etienne-Manneville. 2015. "Intermediate Filaments in Cell Migration and Invasion: The Unusual Suspects." *Current Opinion in Cell Biology, Cell architecture*, 32 (February): 102–12. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2015.01.005>.
- Lee, J.-H., and T. T. Paull. 2007. "Activation and Regulation of ATM Kinase Activity in Response to DNA Double-Strand Breaks." *Oncogene* 26 (56): 7741–48. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210872>.

- Leithner, Alexander, Alexander Eichner, Jan Müller, Anne Reversat, Markus Brown, Jan Schwarz, Jack Merrin, et al. 2016. "Diversified Actin Protrusions Promote Environmental Exploration but Are Dispensable for Locomotion of Leukocytes." *Nature Cell Biology* 18 (11): 1253–59. <https://doi.org/10.1038/ncb3426>.
- Li, Tao, Hong-Mei Zheng, Nai-Mei Deng, Ying-Jian Jiang, Jiang Wang, and Dian-Liang Zhang. 2017. "Clinicopathological and Prognostic Significance of Aberrant Arpin Expression in Gastric Cancer." *World Journal of Gastroenterology* 23 (8): 1450–57. <https://doi.org/10.3748/wjg.v23.i8.1450>.
- Li, Yi, Jiliang Qiu, Ting Pang, Zhixing Guo, Yonghui Su, Qingan Zeng, and Xuexia Zhang. 2017. "Restoration of Arpin Suppresses Aggressive Phenotype of Breast Cancer Cells." *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie* 92 (August): 116–21. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.05.053>.
- Liao, Chia-Jung, Hsiang-Cheng Chi, Chung-Ying Tsai, Chi-De Chen, Sheng-Ming Wu, Yi-Hsin Tseng, Yang-Hsiang Lin, et al. 2015. "A Novel Small-Form NEDD4 Regulates Cell Invasiveness and Apoptosis to Promote Tumor Metastasis." *Oncotarget* 6 (11): 9341–54.
- Lin, Yu-Hung, Yen-Yi Zhen, Kun-Yi Chien, I-Ching Lee, Wei-Chi Lin, Mei-Yu Chen, and Li-Mei Pai. 2017. "LIMCH1 Regulates Nonmuscle Myosin-II Activity and Suppresses Cell Migration." Edited by Laurent Blanchoin. *Molecular Biology of the Cell* 28 (8): 1054–65. <https://doi.org/10.1091/mbc.e15-04-0218>.
- Liu, Xiangping, Bin Zhao, Haibo Wang, Yu Wang, Mengdi Niu, Ming Sun, Yang Zhao, Ruyong Yao, and Zhiqiang Qu. 2016. "Aberrant Expression of Arpin in Human Breast Cancer and Its Clinical Significance." *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 20 (3): 450–58. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12740>.
- Lomakina, Lallemand, Molinie N, Dang I, Cacheux W, Chipysheva Ta, Ermilova Vd, de Koning L, et al. 2016. "Arpin Downregulation in Breast Cancer Is Associated With Poor Prognosis." *British Journal of Cancer. Br J Cancer*. January 3, 2016. <https://doi.org/10.1038/bjc.2016.18>.
- Lomakina, Maria E, François Lallemand, Sophie Vacher, Nicolas Molinie, Irene Dang, Wulfran Cacheux, Tamara A Chipysheva, et al. 2016. "Arpin Downregulation in Breast Cancer Is Associated with Poor Prognosis." *British Journal of Cancer* 114 (5): 545–53. <https://doi.org/10.1038/bjc.2016.18>.
- Lu, Rebecca, David G. Drubin, and Yidi Sun. 2016. "Clathrin-Mediated Endocytosis in Budding Yeast at a Glance." *Journal of Cell Science* 129 (8): 1531–36. <https://doi.org/10.1242/jcs.182303>.
- Luan, Qing, and Brad J. Nolen. 2013. "Structural Basis for Regulation of Arp2/3 Complex by GMF." *Nature Structural & Molecular Biology* 20 (9): 1062–68. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2628>.
- Ma, Zhipeng, Peipei Zhu, Hui Shi, Liwei Guo, Qinghe Zhang, Yanan Chen, Shuming Chen, Zhe Zhang, Jinrong Peng, and Jun Chen. 2019. "PTC-Bearing mRNA Elicits a Genetic Compensation Response via Upf3a and COMPASS Components." *Nature* 568 (7751): 259–63. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1057-y>.
- Machacek, Matthias, Louis Hodgson, Christopher Welch, Hunter Elliott, Olivier Pertz, Perihan Nalbant, Amy Abell, Gary L. Johnson, Klaus M. Hahn, and Gaudenz Danuser. 2009. "Coordination of Rho GTPase Activities during Cell Protrusion." *Nature* 461 (7260): 99–103. <https://doi.org/10.1038/nature08242>.
- Machesky, L M, S J Atkinson, C Ampe, J Vandekerckhove, and T D Pollard. 1994. "Purification of a Cortical Complex Containing Two Unconventional Actins from Acanthamoeba by Affinity Chromatography on Profilin-Agarose." *Journal of Cell Biology* 127 (1): 107–15. <https://doi.org/10.1083/jcb.127.1.107>.
- Machesky, Laura M., R. Dyche Mullins, Henry N. Higgs, Donald A. Kaiser, Laurent Blanchoin, Robin C. May, Margaret E. Hall, and Thomas D. Pollard. 1999. "Scar, a WASp-Related Protein, Activates Nucleation of Actin Filaments by the Arp2/3 Complex." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96 (7): 3739–44. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.7.3739>.

- Madasu, Yadaiah, Changsong Yang, Malgorzata Boczkowska, Kelley A. Bethoney, Adam Zwolak, Grzegorz Rebowski, Tatyana Svitkina, and Roberto Dominguez. 2015. "PICK1 Is Implicated in Organelle Motility in an Arp2/3 Complex-Independent Manner." *Molecular Biology of the Cell* 26 (7): 1308–22. <https://doi.org/10.1091/mbc.E14-10-1448>.
- Mah, L.-J., A. El-Osta, and T. C. Karagiannis. 2010. "γH2AX: A Sensitive Molecular Marker of DNA Damage and Repair." *Leukemia* 24 (4): 679–86. <https://doi.org/10.1038/leu.2010.6>.
- Maiuri, Paolo, Jean-François Rupprecht, Stefan Wieser, Verena Ruprecht, Olivier Bénichou, Nicolas Carpi, Mathieu Coppey, et al. 2015. "Actin Flows Mediate a Universal Coupling between Cell Speed and Cell Persistence." *Cell* 161 (2): 374–86. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.01.056>.
- Mao, Zhiyong, Michael Bozzella, Andrei Seluanov, and Vera Gorbunova. 2008. "Comparison of Nonhomologous End Joining and Homologous Recombination in Human Cells." *DNA Repair* 7 (10): 1765–71. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2008.06.018>.
- Mariotti, Laura, Catherine M. Templeton, Michael Ranes, Patricia Paracuellos, Nora Cronin, Fabienne Beuron, Edward Morris, and Sebastian Guettler. 2016. "Tankyrase Requires SAM Domain-Dependent Polymerization to Support Wnt-β-Catenin Signaling." *Molecular Cell* 63 (3): 498–513. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.06.019>.
- Maritzen, Tanja, Tobias Zech, Michael R. Schmidt, Eberhard Krause, Laura M. Machesky, and Volker Haucke. 2012. "Gadkin Negatively Regulates Cell Spreading and Motility via Sequestration of the Actin-Nucleating ARP2/3 Complex." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109 (26): 10382–87. <https://doi.org/10.1073/pnas.1206468109>.
- Marnef, Aline, and Gaëlle Legube. 2017. "Organizing DNA Repair in the Nucleus: DSBs Hit the Road." *Current Opinion in Cell Biology, Cell Nucleus*, 46 (June): 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2016.12.003>.
- Mattila, Pieta K., and Pekka Lappalainen. 2008. "Filopodia: Molecular Architecture and Cellular Functions." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9 (6): 446–54. <https://doi.org/10.1038/nrm2406>.
- Melak, Michael, Matthias Plessner, and Robert Grosse. 2017. "Actin Visualization at a Glance." *Journal of Cell Science* 130 (3): 525–30. <https://doi.org/10.1242/jcs.189068>.
- Molinie, Nicolas, and Alexis Gautreau. 2017. "The Arp2/3 Regulatory System and Its Deregulation in Cancer." *Physiological Reviews* 98 (1): 215–38. <https://doi.org/10.1152/physrev.00006.2017>.
- Molinie, Nicolas, Svetlana N. Rubtsova, Artem Fokin, Sai P. Visweshwaran, Nathalie Rocques, Anna Poleskaya, Anne Schnitzler, et al. 2019a. "Cortical Branched Actin Determines Cell Cycle Progression." *Cell Research* 29 (6): 432–45. <https://doi.org/10.1038/s41422-019-0160-9>.
- Morrow, K. Adam, Shamik Das, Brandon J. Metge, Keqiang Ye, Madhuri S. Mulekar, J. Allan Tucker, Rajeev S. Samant, and Lalita A. Shevde. 2011. "Loss of Tumor Suppressor Merlin in Advanced Breast Cancer Is Due to Post-Translational Regulation *." *Journal of Biological Chemistry* 286 (46): 40376–85. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.250035>.
- Mullins, R. Dyche, John A. Heuser, and Thomas D. Pollard. 1998. "The Interaction of Arp2/3 Complex with Actin: Nucleation, High Affinity Pointed End Capping, and Formation of Branching Networks of Filaments." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95 (11): 6181–86. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.11.6181>.
- Nagy, Zita, Alkmini Kalousi, Audrey Furst, Marc Koch, Benoit Fischer, and Evi Soutoglou. 2016. "Tankyrases Promote Homologous Recombination and Check Point Activation in Response to DSBs." *PLOS Genetics* 12 (2): e1005791. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005791>.

- Nambiar, Tarun S., Pierre Billon, Giacomo Diedenhofen, Samuel B. Hayward, Angelo Tagliatela, Kunheng Cai, Jen-Wei Huang, et al. 2019. "Stimulation of CRISPR-Mediated Homology-Directed Repair by an Engineered RAD18 Variant." *Nature Communications* 10 (1): 3395. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11105-z>.
- Nolen, B. J., N. Tomasevic, A. Russell, D. W. Pierce, Z. Jia, C. D. McCormick, J. Hartman, R. Sakowicz, and T. D. Pollard. 2009. "Characterization of Two Classes of Small Molecule Inhibitors of Arp2/3 Complex." *Nature* 460 (7258): 1031–34. <https://doi.org/10.1038/nature08231>.
- Oakes, Patrick W., Tamara C. Bidone, Yvonne Beckham, Austin V. Skeeters, Guillermina R. Ramirez-San Juan, Stephen P. Winter, Gregory A. Voth, and Margaret L. Gardel. 2018. "Lamellipodium Is a Myosin-Independent Mechanosensor." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115 (11): 2646–51. <https://doi.org/10.1073/pnas.1715869115>.
- Oikawa, Tsukasa, Hideki Yamaguchi, Toshiki Itoh, Masayoshi Kato, Takeshi Ijuin, Daisuke Yamazaki, Shiro Suetsugu, and Tadaomi Takenawa. 2004. "PtdIns(3,4,5)P₃ Binding Is Necessary for WAVE2-Induced Formation of Lamellipodia." *Nature Cell Biology* 6 (5): 420–26. <https://doi.org/10.1038/ncb1125>.
- Ooshio, Takako, Kenji Irie, Koji Morimoto, Atsunori Fukuhara, Toshio Imai, and Yoshimi Takai. 2004. "Involvement of LMO7 in the Association of Two Cell-Cell Adhesion Molecules, Nectin and E-Cadherin, through Afadin and α -Actinin in Epithelial Cells *." *Journal of Biological Chemistry* 279 (30): 31365–73. <https://doi.org/10.1074/jbc.M401957200>.
- Padrick, Shae B., Lynda K. Doolittle, Chad A. Brautigam, David S. King, and Michael K. Rosen. 2011. "Arp2/3 Complex Is Bound and Activated by Two WASP Proteins." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (33): E472–79. <https://doi.org/10.1073/pnas.1100236108>.
- Paluch, Ewa K., Irene M. Aspalter, and Michael Sixt. 2016. "Focal Adhesion–Independent Cell Migration." *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 32 (1): 469–90. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-111315-125341>.
- Pantaloni, Dominique, and Marie-France Carlier. 1993. "How Profilin Promotes Actin Filament Assembly in the Presence of Thymosin B₄." *Cell* 75 (5): 1007–14. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90544-Z](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90544-Z).
- Papalazarou, Vassilis, and Laura M. Machesky. 2021. "The Cell Pushes Back: The Arp2/3 Complex Is a Key Orchestrator of Cellular Responses to Environmental Forces." *Current Opinion in Cell Biology, Cell Architecture*, 68 (February): 37–44. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2020.08.012>.
- Parri, Matteo, and Paola Chiarugi. 2010. "Rac and Rho GTPases in Cancer Cell Motility Control." *Cell Communication and Signaling* 8 (1): 23. <https://doi.org/10.1186/1478-811X-8-23>.
- Pertz, Olivier. 2010. "Spatio-Temporal Rho GTPase Signaling – Where Are We Now?" *Journal of Cell Science* 123 (11): 1841–50. <https://doi.org/10.1242/jcs.064345>.
- Petrie, Ryan J., Andrew D. Doyle, and Kenneth M. Yamada. 2009. "Random versus Directionally Persistent Cell Migration." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 10 (8): 538–49. <https://doi.org/10.1038/nrm2729>.
- Pizarro-Cerdá, Javier, Dror Shlomo Chorev, Benjamin Geiger, and Pascale Cossart. 2017. "The Diverse Family of Arp2/3 Complexes." *Trends in Cell Biology* 27 (2): 93–100. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2016.08.001>.
- Plessner, Matthias, Michael Melak, Pilar Chinchilla, Christian Baarlink, and Robert Grosse. 2015. "Nuclear F-Actin Formation and Reorganization upon Cell Spreading * ♦." *Journal of Biological Chemistry* 290 (18): 11209–16. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.627166>.

- Pocha, Shirin M., and Giles O. Cory. 2009. "WAVE2 Is Regulated by Multiple Phosphorylation Events within Its VCA Domain." *Cell Motility* 66 (1): 36–47. <https://doi.org/10.1002/cm.20323>.
- Polesskaya, Anna, Arthur Boutillon, Yanan Wang, Marc Lavielle, Sophie Vacher, Anne Schnitzler, Nicolas Molinie, et al. 2020. "CYFIP2 Containing WAVE Complexes Inhibit Cell Migration." *BioRxiv*, July, 2020.07.02.184655. <https://doi.org/10.1101/2020.07.02.184655>.
- Pollard, Thomas D. 2007. "Regulation of Actin Filament Assembly by Arp2/3 Complex and Formins." *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* 36 (1): 451–77. <https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.35.040405.101936>.
- Thomas D. Pollard. 2016. "Actin and Actin-Binding Proteins." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 8 (8): a018226. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a018226>.
- Pollard, Thomas D., Laurent Blanchoin, and R. Dyche Mullins. 2000. "Molecular Mechanisms Controlling Actin Filament Dynamics in Nonmuscle Cells." *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* 29 (1): 545–76. <https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.29.1.545>.
- Prehoda, Kenneth E., Jessica A. Scott, R. Dyche Mullins, and Wendell A. Lim. 2000. "Integration of Multiple Signals Through Cooperative Regulation of the N-WASP-Arp2/3 Complex." *Science* 290 (5492): 801–6. <https://doi.org/10.1126/science.290.5492.801>.
- Putilina, T., C. Jaworski, S. Gentleman, B. McDonald, M. Kadiri, and P. Wong. 1998. "Analysis of a Human CDNA Containing a Tissue-Specific Alternatively Spliced LIM Domain." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 252 (2): 433–39. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1998.9656>.
- Raab, Matthew, Matteo Gentili, Henry de Belly, Hawa-Racine Thiam, Pablo Vargas, Ana Joaquina Jimenez, Franziska Lautenschlaeger, et al. 2016. "ESCRT III Repairs Nuclear Envelope Ruptures during Cell Migration to Limit DNA Damage and Cell Death." *Science* 352 (6283): 359–62. <https://doi.org/10.1126/science.aad7611>.
- Raftopoulou, Myrto, and Alan Hall. 2004. "Cell Migration: Rho GTPases Lead the Way." *Developmental Biology* 265 (1): 23–32. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2003.06.003>.
- Riccio, Amanda A., Michael McCauley, Marie-France Langelier, and John M. Pascal. 2016. "Tankyrase Sterile α Motif Domain Polymerization Is Required for Its Role in Wnt Signaling." *Structure* 24 (9): 1573–81. <https://doi.org/10.1016/j.str.2016.06.022>.
- Ridley, Anne J. 2015. "Rho GTPase Signalling in Cell Migration." *Current Opinion in Cell Biology, Cell adhesion and migration*, 36 (October): 103–12. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2015.08.005>.
- Ridley, Anne J., Martin A. Schwartz, Keith Burridge, Richard A. Firtel, Mark H. Ginsberg, Gary Borisy, J. Thomas Parsons, and Alan Rick Horwitz. 2003. "Cell Migration: Integrating Signals from Front to Back." *Science* 302 (5651): 1704–9. <https://doi.org/10.1126/science.1092053>.
- Ridley, Anne J. 2011. "Life at the Leading Edge." *Cell* 145 (7): 1012–22. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.06.010>.
- Rodal, Avital A., Olga Sokolova, Deborah B. Robins, Karen M. Daugherty, Simon Hippenmeyer, Howard Riezman, Nikolaus Grigorieff, and Bruce L. Goode. 2005. "Conformational Changes in the Arp2/3 Complex Leading to Actin Nucleation." *Nature Structural & Molecular Biology* 12 (1): 26–31. <https://doi.org/10.1038/nsmb870>.

- Rohatgi, Rajat, Hsin-yi Henry Ho, and Marc W. Kirschner. 2000. "Mechanism of N-Wasp Activation by Cdc42 and Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate." *Journal of Cell Biology* 150 (6): 1299–1310. <https://doi.org/10.1083/jcb.150.6.1299>.
- Rohatgi, Rajat, Le Ma, Hiroaki Miki, Marco Lopez, Tomas Kirchhausen, Tadaomi Takenawa, and Marc W Kirschner. 1999. "The Interaction between N-WASP and the Arp2/3 Complex Links Cdc42-Dependent Signals to Actin Assembly." *Cell* 97 (2): 221–31. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80732-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80732-1).
- Romero, Stéphane, Christophe Le Clairche, and Alexis M. Gautreau. 2020. "Actin Polymerization Downstream of Integrins: Signaling Pathways and Mechanotransduction." *Biochemical Journal* 477 (1): 1–21. <https://doi.org/10.1042/BCJ20170719>.
- Rondeau, S., S. Vacher, L. De Koning, A. Briaux, A. Schnitzler, W. Chemlali, C. Callens, R. Lidereau, and I. Bièche. 2015. "ATM Has a Major Role in the Double-Strand Break Repair Pathway Dysregulation in Sporadic Breast Carcinomas and Is an Independent Prognostic Marker at Both MRNA and Protein Levels." *British Journal of Cancer* 112 (6): 1059–66. <https://doi.org/10.1038/bjc.2015.60>.
- Rotty, Jeremy D., Congying Wu, and James E. Bear. 2013. "New Insights into the Regulation and Cellular Functions of the ARP2/3 Complex." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 14 (1): 7–12. <https://doi.org/10.1038/nrm3492>.
- Sahu, Sounak, Divya Sridhar, Prasad Abnave, Noboyoshi Kosaka, Anish Dattani, James M Thompson, Mark A Hill, and Aziz Aboobaker. 2021. "Ongoing Repair of Migration-Coupled DNA Damage Allows Planarian Adult Stem Cells to Reach Wound Sites." Edited by Dario Riccardo Valenzano, Marianne E Bronner, and Dario Riccardo Valenzano. *ELife* 10 (April): e63779. <https://doi.org/10.7554/eLife.63779>.
- Schafer, D A, P B Jennings, and J A Cooper. 1996. "Dynamics of Capping Protein and Actin Assembly in Vitro: Uncapping Barbed Ends by Polyphosphoinositides." *Journal of Cell Biology* 135 (1): 169–79. <https://doi.org/10.1083/jcb.135.1.169>.
- Schaks, Matthias, Grégory Giannone, and Klemens Rottner. 2019. "Actin Dynamics in Cell Migration." *Essays in Biochemistry* 63 (5): 483–95. <https://doi.org/10.1042/EBC20190015>.
- Schlüter, Kai, Dieter Waschbüsch, Moritz Anft, Debbie Hügging, Sabine Kind, Jan Hänisch, Goran Lakisic, Alexis Gautreau, Angelika Barnekow, and Theresia E. B. Stradal. 2014. "JMY Is Involved in Anterograde Vesicle Trafficking from the Trans-Golgi Network." *European Journal of Cell Biology, Special Issue: SPP 1464: Actin Dynamics - Part II*, 93 (5): 194–204. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2014.06.001>.
- Schrank, Benjamin, and Jean Gautier. 2019. "Assembling Nuclear Domains: Lessons from DNA Repair." *Journal of Cell Biology* 218 (8): 2444–55. <https://doi.org/10.1083/jcb.201904202>.
- Schrank, Benjamin R., Tomas Aparicio, Yinyin Li, Wakam Chang, Brian T. Chait, Gregg G. Gundersen, Max E. Gottesman, and Jean Gautier. 2018. "Nuclear ARP2/3 Drives DNA Break Clustering for Homology-Directed Repair." *Nature* 559 (7712): 61–66. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0237-5>.
- Sept, David, and J. Andrew McCammon. 2001. "Thermodynamics and Kinetics of Actin Filament Nucleation." *Biophysical Journal* 81 (2): 667–74. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(01\)75731-1](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(01)75731-1).
- Shaaban, Mohammed, Saikat Chowdhury, and Brad J. Nolen. 2020. "Cryo-EM Reveals the Transition of Arp2/3 Complex from Inactive to Nucleation-Competent State." *Nature Structural & Molecular Biology* 27 (11): 1009–16. <https://doi.org/10.1038/s41594-020-0481-x>.
- Simanov, Gleb, Irene Dang, Artem I. Fokin, Ksenia Oguievetskaia, Valérie Campanacci, Jacqueline Cherfils, and Alexis M. Gautreau. 2021. "Arpin Regulates Migration Persistence by Interacting with Both Tankyrases

and the Arp2/3 Complex.” *International Journal of Molecular Sciences* 22 (8): 4115.
<https://doi.org/10.3390/ijms22084115>.

Skruber, Kristen, Peyton V. Warp, Rachael Shklyarov, James D. Thomas, Maurice S. Swanson, Jessica L. Henty-Ridilla, Tracy-Ann Read, and Eric A. Vitriol. 2020. “Arp2/3 and Mena/VASP Require Profilin 1 for Actin Network Assembly at the Leading Edge.” *Current Biology* 30 (14): 2651-2664.e5.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.04.085>.

Sokolova, Olga S., Angelina Chemeris, Siyang Guo, Salvatore L. Alioto, Meghal Gandhi, Shae Padrick, Evgeniya Pechnikova, Violaine David, Alexis Gautreau, and Bruce L. Goode. 2017. “Structural Basis of Arp2/3 Complex Inhibition by GMF, Coronin, and Arpin.” *Journal of Molecular Biology* 429 (2): 237–48.
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.11.030>.

Stracker, Travis H., and John H. J. Petrini. 2011. “The MRE11 Complex: Starting from the Ends.” *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 12 (2): 90–103. <https://doi.org/10.1038/nrm3047>.

Stradal, Theresia E. B., Klemens Rottner, Andrea Disanza, Stefano Confalonieri, Metello Innocenti, and Giorgio Scita. 2004. “Regulation of Actin Dynamics by WASP and WAVE Family Proteins.” *Trends in Cell Biology* 14 (6): 303–11. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2004.04.007>.

Suraneni, Praveen, Boris Rubinstein, Jay R. Unruh, Michael Durnin, Dorit Hanein, and Rong Li. 2012. “The Arp2/3 Complex Is Required for Lamellipodia Extension and Directional Fibroblast Cell Migration.” *Journal of Cell Biology* 197 (2): 239–51. <https://doi.org/10.1083/jcb.201112113>.

Svitkina, Tatyana M., and Gary G. Borisy. 1999. “Arp2/3 Complex and Actin Depolymerizing Factor/Cofilin in Dendritic Organization and Treadmilling of Actin Filament Array in Lamellipodia.” *Journal of Cell Biology* 145 (5): 1009–26. <https://doi.org/10.1083/jcb.145.5.1009>.

Svitkina, Tatyana M., Alexander B. Verkhovskiy, Kyle M. McQuade, and Gary G. Borisy. 1997. “Analysis of the Actin–Myosin II System in Fish Epidermal Keratocytes: Mechanism of Cell Body Translocation.” *Journal of Cell Biology* 139 (2): 397–415. <https://doi.org/10.1083/jcb.139.2.397>.

Syed, Aleem, and John A. Tainer. 2018. “The MRE11–RAD50–NBS1 Complex Conducts the Orchestration of Damage Signaling and Outcomes to Stress in DNA Replication and Repair.” *Annual Review of Biochemistry* 87 (1): 263–94. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-062917-012415>.

Tanaka-Okamoto, Miki, Keiko Hori, Hiroyoshi Ishizaki, Akihiro Hosoi, Yu Itoh, Min Wei, Hideki Wanibuchi, Akira Mizoguchi, Hiroyuki Nakamura, and Jun Miyoshi. 2009. “Increased Susceptibility to Spontaneous Lung Cancer in Mice Lacking LIM-Domain Only 7.” *Cancer Science* 100 (4): 608–16.
<https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2009.01091.x>.

Theriot, Julie A., and Timothy J. Mitchison. 1993. “The Three Faces of Profilin.” *Cell* 75 (5): 835–38.
[https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90527-W](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90527-W).

Tsarouhas, Vasilios, Dan Liu, Georgia Tsikala, Alina Fedoseienko, Kai Zinn, Ryo Matsuda, Daniel D. Billadeau, and Christos Samakovlis. 2019. “WASH Phosphorylation Balances Endosomal versus Cortical Actin Network Integrities during Epithelial Morphogenesis.” *Nature Communications* 10 (1): 2193.
<https://doi.org/10.1038/s41467-019-10229-6>.

Vicente-Manzanares, Miguel, Xuefei Ma, Robert S. Adelstein, and Alan Rick Horwitz. 2009. “Non-Muscle Myosin II Takes Centre Stage in Cell Adhesion and Migration.” *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 10 (11): 778–90. <https://doi.org/10.1038/nrm2786>.

- Wagner, Andrew R., Qing Luan, Su-Ling Liu, and Brad J. Nolen. 2013. "Dip1 Defines a Class of Arp2/3 Complex Activators That Function without Preformed Actin Filaments." *Current Biology* 23 (20): 1990–98. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.08.029>.
- Wear, Martin A., and John A. Cooper. 2004. "Capping Protein: New Insights into Mechanism and Regulation." *Trends in Biochemical Sciences* 29 (8): 418–28. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2004.06.003>.
- Williams, Ashley B., and Björn Schumacher. 2016. "P53 in the DNA-Damage-Repair Process." *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 6 (5): a026070. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a026070>.
- Wozniak, Michele A., Brendon M. Baker, Christopher S. Chen, and Katherine L. Wilson. 2013. "The Emerin-Binding Transcription Factor Lmo7 Is Regulated by Association with P130Cas at Focal Adhesions." *PeerJ* 1 (August): e134. <https://doi.org/10.7717/peerj.134>.
- Wu, Congying, Sreeja B. Asokan, Matthew E. Berginski, Elizabeth M. Haynes, Norman E. Sharpless, Jack D. Griffith, Shawn M. Gomez, and James E. Bear. 2012. "Arp2/3 Is Critical for Lamellipodia and Response to Extracellular Matrix Cues but Is Dispensable for Chemotaxis." *Cell* 148 (5): 973–87. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.12.034>.
- Wu, Congying, Elizabeth M. Haynes, Sreeja B. Asokan, Jeremy M. Simon, Norman E. Sharpless, Albert S. Baldwin, Ian J. Davis, Gary L. Johnson, and James E. Bear. 2013. "Loss of Arp2/3 Induces an NF- κ B-Dependent, Nonautonomous Effect on Chemotactic Signaling." *Journal of Cell Biology* 203 (6): 907–16. <https://doi.org/10.1083/jcb.201306032>.
- Yamada, Kenneth M., and Michael Sixt. 2019. "Mechanisms of 3D Cell Migration." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 20 (12): 738–52. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0172-9>.
- Yang, Changsong, Martin Pring, Martin A. Wear, Minzhou Huang, John A. Cooper, Tatyana M. Svitkina, and Sally H. Zigmond. 2005. "Mammalian CARMIL Inhibits Actin Filament Capping by Capping Protein." *Developmental Cell* 9 (2): 209–21. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2005.06.008>.
- Ydenberg, Casey A., Shae B. Padrick, Meredith O. Sweeney, Meghal Gandhi, Olga Sokolova, and Bruce L. Goode. 2013. "GMF Severs Actin-Arp2/3 Complex Branch Junctions by a Cofilin-like Mechanism." *Current Biology* 23 (12): 1037–45. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.04.058>.
- Zamudio-Martinez, Esteban, Ana Belén Herrera-Campos, Alberto Muñoz, José Manuel Rodríguez-Vargas, and F. Javier Oliver. 2021. "Tankyrases as Modulators of Pro-Tumoral Functions: Molecular Insights and Therapeutic Opportunities." *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 40 (1): 144. <https://doi.org/10.1186/s13046-021-01950-6>.
- Zhang, Shi-Rong, Hao Li, Wen-Quan Wang, Wei Jin, Jin-Zhi Xu, Hua-Xiang Xu, Chun-Tao Wu, et al. 2019. "Arpin Downregulation Is Associated with Poor Prognosis in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma." *European Journal of Surgical Oncology: The Journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology* 45 (5): 769–75. <https://doi.org/10.1016/j.ejso.2018.10.539>.
- Zhang, Yuanyuan, Yingmei Zhang, and Haiyan Xu. 2019. "LIMCH1 Suppress the Growth of Lung Cancer by Interacting with HUWE1 to Sustain P53 Stability." *Gene* 712 (September): 143963. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2019.143963>.
- Zhao, Kailiang, Decai Wang, Xiaolong Zhao, Chenfeng Wang, Yongxiang Gao, Kaiyue Liu, Fang Wang, et al. 2020. "WDR63 Inhibits Arp2/3-Dependent Actin Polymerization and Mediates the Function of P53 in Suppressing Metastasis." *EMBO Reports* 21 (4): e49269. <https://doi.org/10.15252/embr.201949269>.
- Zimmermann, Michal, and Titia de Lange. 2014. "53BP1: Pro Choice in DNA Repair." *Trends in Cell Biology* 24 (2): 108–17. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2013.09.003>.

Zimmet, Austin, Trevor Van Eeuwen, Malgorzata Boczkowska, Grzegorz Rebowski, Kenji Murakami, and Roberto Dominguez. 2020. "Cryo-EM Structure of NPF-Bound Human Arp2/3 Complex and Activation Mechanism." *Science Advances* 6 (23): eaaz7651. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aaz7651>.

Zuchero, J. Bradley, Brittany Belin, and R. Dyché Mullins. 2012. "Actin Binding to WH2 Domains Regulates Nuclear Import of the Multifunctional Actin Regulator JMY." *Molecular Biology of the Cell* 23 (5): 853–63. <https://doi.org/10.1091/mbc.e11-12-0992>.

Annexe

**LIMCH1, un nouveau suppresseur de tumeurs et senseur de l'état
d'actine branchée au cortex**

Positionnement du projet

Les cellules cancéreuses sont connues pour leurs prolifération et migration accrues, même dans des conditions non optimales. Elles sont caractérisées par l'activation d'oncogènes et l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs qui leur permettent de contourner plusieurs checkpoints du cycle cellulaire.

Le travail d'un ancien doctorant du laboratoire d'accueil a mis en lumière le couplage entre l'état de l'actine branchée au cortex de la cellule et le passage G1-S du cycle cellulaire (Molinie et al. 2019a). Il a montré que les cellules non transformées s'arrêtent en phase G1 en réponse à l'inhibition du complexe Arp2/3 par la drogue CK666. Il a également montré que la déplétion du complexe WAVE, l'activateur d'Arp2/3 impliqué dans la formation d'actine branchée corticale bloque l'entrée en phase S. Finalement, la majorité des cellules transformées est apparue insensible à l'action de CK666 sur la progression dans le cycle cellulaire suggérant que les altérations génétiques d'oncogènes et de gènes suppresseurs de tumeurs suppriment le besoin d'actine branchée corticale pour la progression dans le cycle cellulaire. Un crible ARNi à l'échelle du génome a donc été entrepris pour détecter des gènes suppresseurs de tumeur putatifs sur la voie de signalisation qui détecte l'actine branchée corticale et qui permet la progression du cycle cellulaire. Le but de ma thèse à son début était de **valider un gène candidat suggéré par le crible, *LIMCH1*, et d'élucider son rôle dans la voie de signalisation de l'actine branchée**. Pour ce faire j'ai obtenu des lignées knock-out pour *LIMCH1* et les ai caractérisées.

1. Données préliminaires

1.1. Identification de *LIMCH1* en tant que nouveau gène suppresseur de tumeurs putatif

Une ancienne post-doc de l'équipe, Xenia Naj, en collaboration avec Guillaume Pinna, responsable de la plateforme PARI du CEA à Saclay, a recherché les gènes dont la déplétion permettait à des cellules non transformées MCF10A et bloquées par le CK666 de repartir dans le cycle cellulaire (Figure 1).

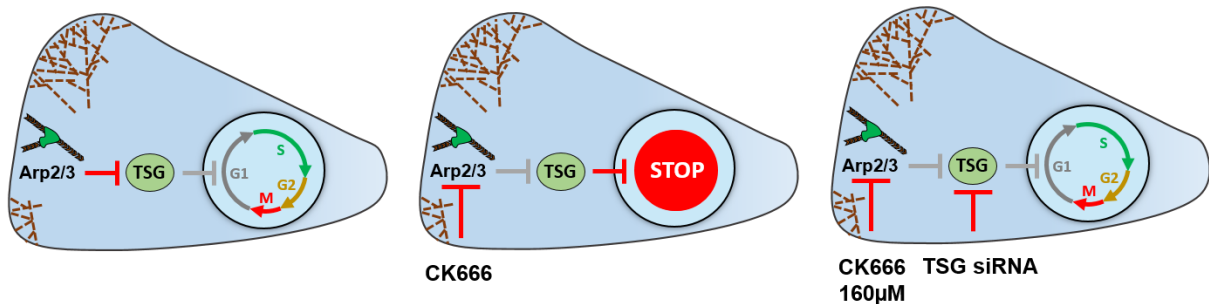


Figure 1. Design du cribre ARNi à l'échelle du génome. La déplétion des gènes suppresseurs de tumeurs putatifs (tumor suppressor gene, TSG) sur la voie de signalisation partant de la polymérisation d'actine au cortex devrait permettre la progression dans le cycle cellulaire en présence de CK666, l'inhibiteur d'Arp2/3.

18 000 gènes ont été testés dans le cribre primaire. Le cribre primaire a permis d'identifier 706 stimulateurs de l'incorporation d'EdU. Le cribre secondaire a ensuite permis de valider 106 gènes de ces 706 avec au moins deux siRNA individuels sur quatre (Figure 2). *LIMCH1* a été identifié parmi les meilleurs hits avec 4 siRNAs actifs sur 4 testés. C'est un gène relativement peu décrit, mais qui code une protéine associée au cytosquelette d'actine (Lin et al. 2017) et qui est souvent down régulée dans les cancers (Liao et al. 2015; Karlsson et al. 2018; Y. Zhang, Zhang, and Xu 2019, 1; Bersini et al. 2020; Halle et al. 2021), en accord avec son rôle de gènes suppresseur de tumeur putatif.

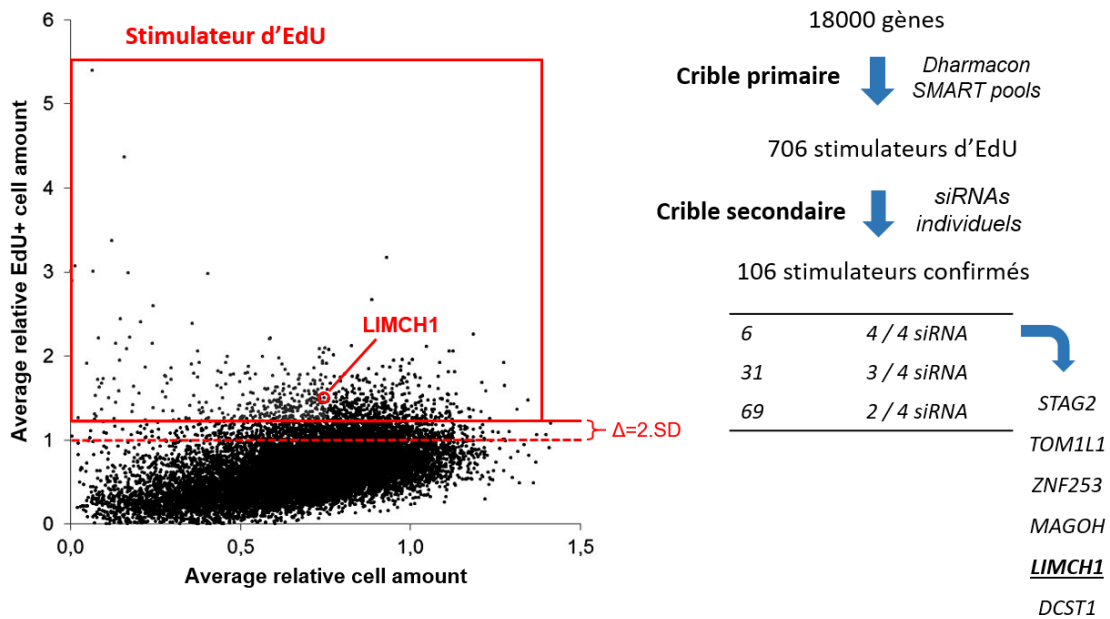


Figure 2. Les résultats du crible ARNi. Le crible primaire sur les cellules MCF10A bloquées au CK666 a permis d'identifier les gènes dont la déplétion se traduit par une augmentation de l'incorporation d'EdU (gauche, SD – standard deviation). Le schéma de validation des gènes est représenté à droite.

Les résultats du crible ont été confirmés à plus grande échelle au laboratoire avec deux siRNAs différents utilisés. L'effet de la déplétion de LIMCH1 sous l'inhibition d'Arp2/3 par CK666 et dans les conditions de starvation (en variant le pourcentage du sérum et des facteurs de croissance) a été testé (Figure 3). Ses expériences ont validé le résultat du crible.

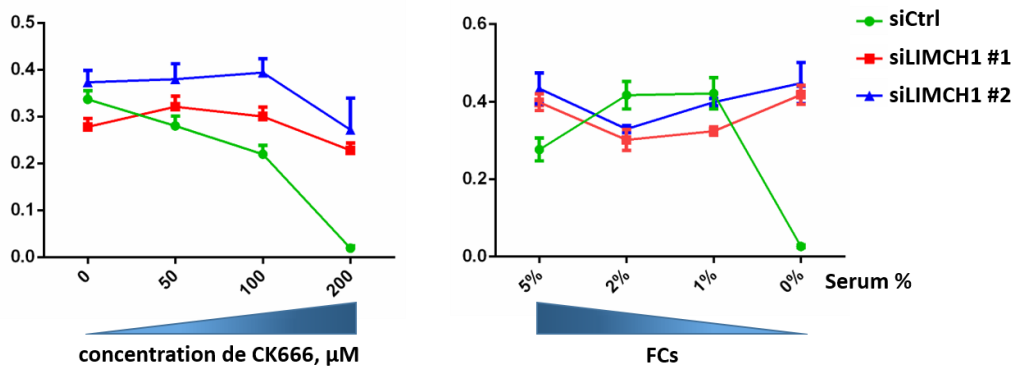


Figure 3. Vérification des résultats du crible concernant LIMCH1. Le taux d'incorporation d'EdU par les MCF10A traitées par des siRNAs déplaçant LIMCH1 ou non a été mesuré en réponse à des doses croissantes de CK666 ou de facteurs de croissance (FCs : serum + EGF).

En parallèle en collaboration avec Evgueny Denisov du Centre de Recherche sur le Cancer de Tomsk (Russie), Xenia a étudié l'expression de LIMCH1 dans les carcinomes mammaires et a montré que l'expression de LIMCH1 y est souvent perdue (Figure 4).

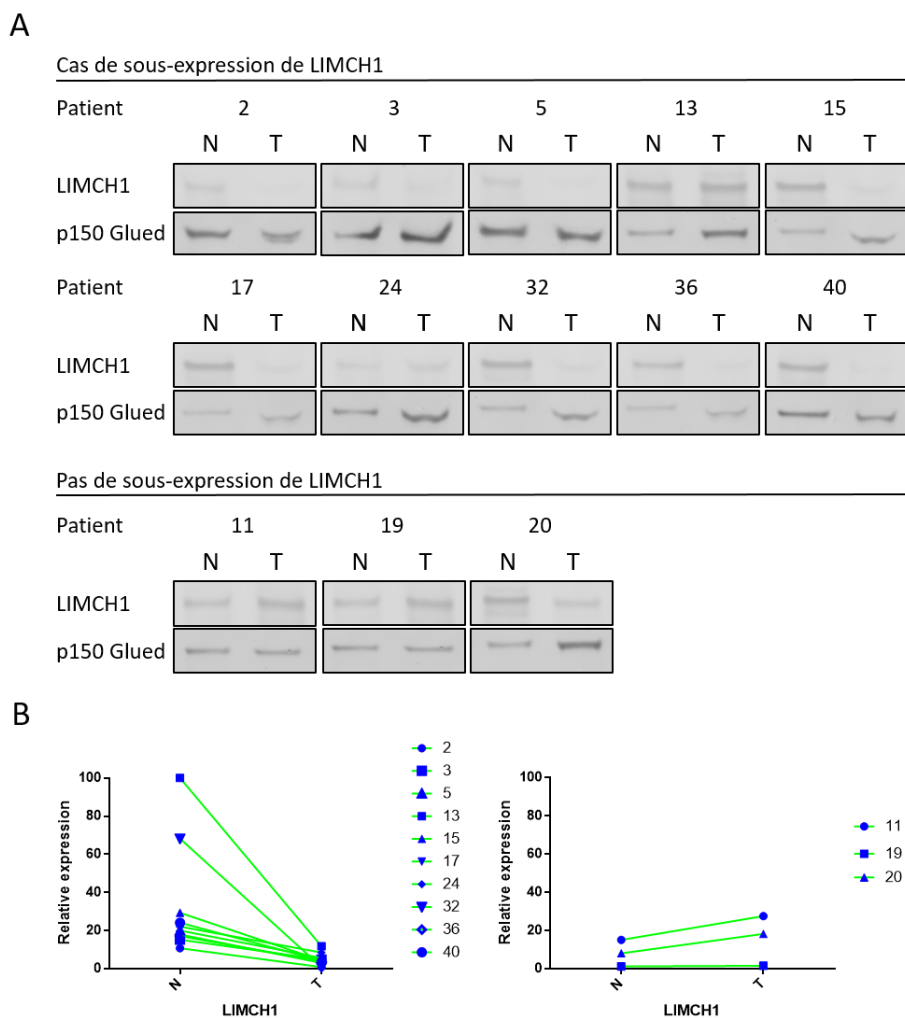


Figure 4. L'expression de LIMCH1 est souvent perdue dans le cancer du sein. (A) Expression de LIMCH1 analysée par Western blot sur des extraits de carcinomes mammaires (T) ou du tissu sain adjacent des mêmes patientes (N). (B) Quantification de l'expression du ratio LIMCH1/p150 glued dans les paires de tissus. Les cas de down régulation (à gauche) sont plus fréquents que les autres (à droite).

1.2. Structure et localisation de la protéine LIMCH1

Cartographié sur le chromosome 4p13, le gène *LIMCH1* humain s'étend sur 340 kb et avec ses 38 exons code une protéine de 1083 acides aminés. LIMCH1 possède un domaine CH (calponin homology) N-terminal et un domaine LIM (LIN-11, Isl-1 and MEC-3) C-terminal (Figure 5). Les domaines structuraux de LIMCH1 sont séparés par des segments relativement longs de faible complexité. Outre que les domaines CH et LIM, deux domaines coiled coil dont les fonctions ne sont pas connues ont été prédit dans LIMCH1 (Lin et al. 2017). La protéine est extensivement phosphorylée sur plusieurs sites cartographiés (Uniprot).

LIMCH1 est transcrit principalement dans le cœur et les muscles squelettiques, le cerveau, les tissus endocriniens et les poumons (Human Protein Atlas). *LIMCH1* possède un gène paralogue, *LMO7* dont la structure est similaire à celle de *LIMCH1*, à part qu'il contient en plus un domaine PDZ central (Figure 5).

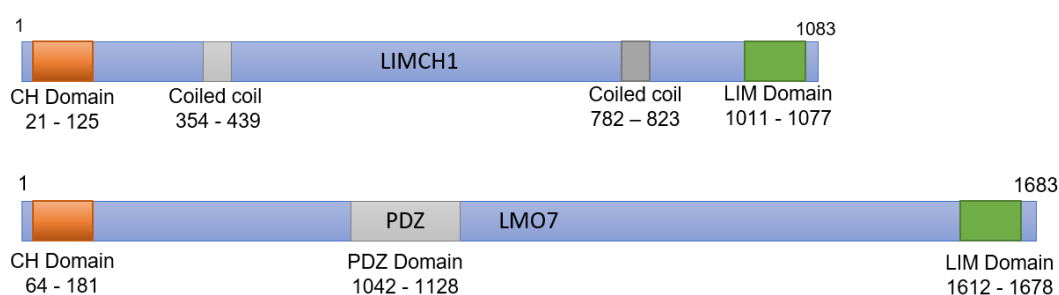


Figure 5. Structure de LIMCH1 et de son paralogue LMO7. La protéine LIMCH1 comporte deux domaines structuraux CH et LIM dans ses extrémités N- et C-terminales séparés par une partie centrale globalement non-structurée, à part deux domaines coiled coils prédits. LMO7 diffère de LIMCH1 par un domaine PDZ central.

Dans les cellules épithéliales LIMCH1 est localisée sur les fibres de stress d'actine, avec un profil en pointillé, comparable à celui de la myosine (Lin et al. 2017).

Xenia a étudié la localisation de LIMCH1 dans les deux lignées, issues de sein humain, immortalisées mais non transformées. Les cellules MCF10A, déjà utilisées pour le crible initial, est un système approprié pour les études de migration et des tests de croissance et de transformation. En revanche, elles ne développent pas de grandes protrusions au front de migration. Les cellules hTERT-HME1, au contraire, représentent un système idéal pour observer des lamellipodes. LIMCH1 est localisée à l'extrémité du lamellipode en immunofluorescence (Figure 6).

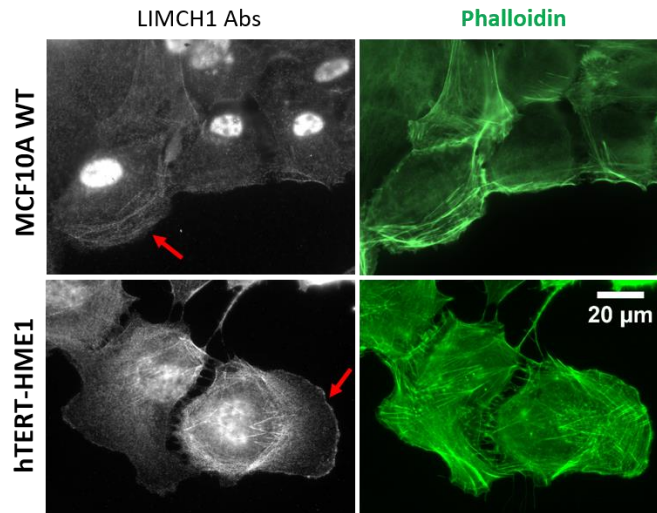


Figure 6. Localisation de LIMCH1. Dans les cellules MCF10A LIMCH1 est distribuée dans le cytoplasme et co-localise avec les fibres de stress d'actine (flèche rouge) ; dans les cellules hTERT-HME1, LIMCH1 se localise en outre à l'extrémité des lamellipodes (flèche rouge).

1.4. *LMO7*, un gène paralogue de *LIMCH1*

Le gène *LMO7* (LIM domain only 7) est un gène paralogue de *LIMCH1*. Présent sur le chromosome 13q22, *LMO7* a été initialement isolé de l'ADNc du pancréas humain (Putilina et al. 1998). Le gène *LMO7* humain s'étend sur 240 kb, contient 39 exons et code une protéine de 1683 acides aminés. Malgré son nom, *LMO7* est composée d'un domaine CH N-terminale, d'un domaine PDZ interne et d'un domaine LIM C-terminal, séparés par des segments de faible complexité (Figure 5). Le domaine CH et LIM de *LMO7* présentent 64% et 60% d'identité avec les domaines CH et LIM de *LIMCH1*, respectivement (Friedberg 2009).

LMO7 a été beaucoup plus étudiée que *LIMCH1*. *LMO7* a été localisée dans le noyau, le cytoplasme et sur la membrane plasmique (Ooshio et al. 2004). *LMO7* a été co-localisée avec la vinculine et la kinase FAK dans les adhérences focales (AFs) (Holaska, Rais-Bahrami, and Wilson 2006) où elle interagissait avec p130Cas (Wozniak et al. 2013). *LMO7* est lié à l' α -actinine et à l'afadine aux jonctions cellulaires (Ooshio et al. 2004). Elle est déplacée en réponse au traitement avec des agents perturbateurs de la dynamique de l'actine. *LMO7* et *LIMCH1* sont co-localisées avec les filaments d'actine et lient plusieurs protéines associées à l'actine, y compris la myosine II (Lin et al. 2017; Du et al. 2019). Il est intéressant de noter que ni le domaine CH de *LMO7*, ni celui de *LIMCH1* ne sont nécessaires pour la co-localisation avec les filaments d'actine. Dans les cellules hTERT-HME1 parentales et les clones dérivés *LIMCH1* KO, nous avons observé *LMO7* dans le noyau et le cytoplasme sans localisation claire au lamellipode (Figure 7).

LMO7, comme son paralogue *LIMCH1*, a été suggéré comme gène suppresseur de tumeur (Tanaka-Okamoto et al. 2009; Karlsson et al. 2018).

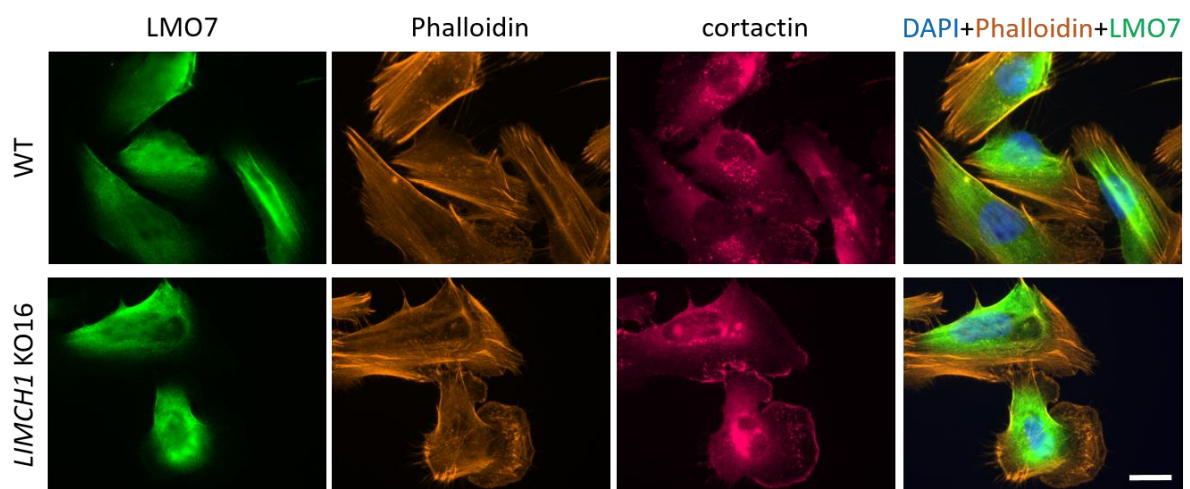


Figure 7. Localisation de LMO7 dans les cellules hTERT-HME1 contrôles et *LIMCH1* KO. LMO7 est distribuée dans le cytoplasme et le noyau et exclue de la périphérie de la cellule (échelle : 20µm).

Résultats

Ces données préliminaires du laboratoire permettaient de supposer que *LIMCH1* était un nouveau gène suppresseur de tumeurs capable de détecter l'état de l'actine branchée corticale. Le but de mon projet était alors d'explorer cette hypothèse.

1. Génération des lignées stables déplétées en *LIMCH1*.

Nous avons décidé de continuer l'étude de *LIMCH1* dans les deux lignées cellulaires, MCF10A et hTERT-HME1, déjà utilisées au laboratoire. J'ai comparé l'expression de *LIMCH1* dans ces deux lignées cellulaires par Western blot (Figure 8A). Les cellules MCF10A exprimaient une isoforme majoritaire de *LIMCH1* de 130 kDa, alors que les cellules hTERT-HME1 présentaient plusieurs isoformes de la protéine, la même isoforme de 130 kDa étant la majoritaire.

Dans un premier temps, j'ai essayé d'obtenir les lignées cellulaires MCF10A stables, sous-exprimant *LIMCH1*, par la transfection des plasmides avec shRNA contre *LIMCH1* (les petits ARN en épingle à cheveux) qui dégradent l'ARNm via l'interférence par ARN. Après avoir criblé par Western blot 41 clones isolés, j'ai choisi les deux montrant la diminution de niveau de *LIMCH1* la plus prononcée et quantifié la déplétion (Figure 8B). La perte d'expression de *LIMCH1* dans ces cellules était de l'ordre de 50%, ce qui n'est pas assez prononcé pour espérer un phénotype fort.

J'ai décidé alors de transférer les cellules MCF10A avec les plasmides CRISPR/Cas9 commerciaux (SantaCruz Biotechnology) conçus pour invalider *LIMCH1*. Il y avait trois guides ARN différents, visant chacun une séquence sur *LIMCH1*, et trois plasmides de réparation correspondants. Ces plasmides permettent l'insertion du gène de résistance à la puromycine à l'endroit de coupure double brin faite par la Cas9 (Figure 8C). Le criblage par Western blot de 49 clones stables a permis d'isoler plusieurs clones knock-out dont deux ont été retenus pour l'analyse. Ces clones MCF10A *LIMCH1* knock-out (KO) étaient morphologiquement identiques aux cellules contrôles. J'ai alors comparé le taux d'incorporation d'EdU dans les clones *LIMCH1* KO et les cellules contrôles. Après avoir été cultivées sans sérum et facteurs de croissance pendant 24h, les cellules ont été fixées. Le test d'incorporation d'EdU n'a pas révélé les différences significatives entre les cellules WT et *LIMCH1* KO (Figure 8D). De la même manière, les cellules *LIMCH1* KO s'arrêtaient dans leur cycle cellulaire en réponse au traitement avec le CK666 à 200µM, tout comme les cellules contrôles (Figure 8E). Les cellules *LIMCH1* KO présentaient une bande résiduelle sur Western blot (Figure 8C). A ce stade il était difficile de comprendre l'origine de cette bande résiduelle, pouvant être le résultat de la cross-réactivité des anticorps avec une autre protéine ou bien d'une expression résiduelle de *LIMCH1* par un mécanisme incompris.

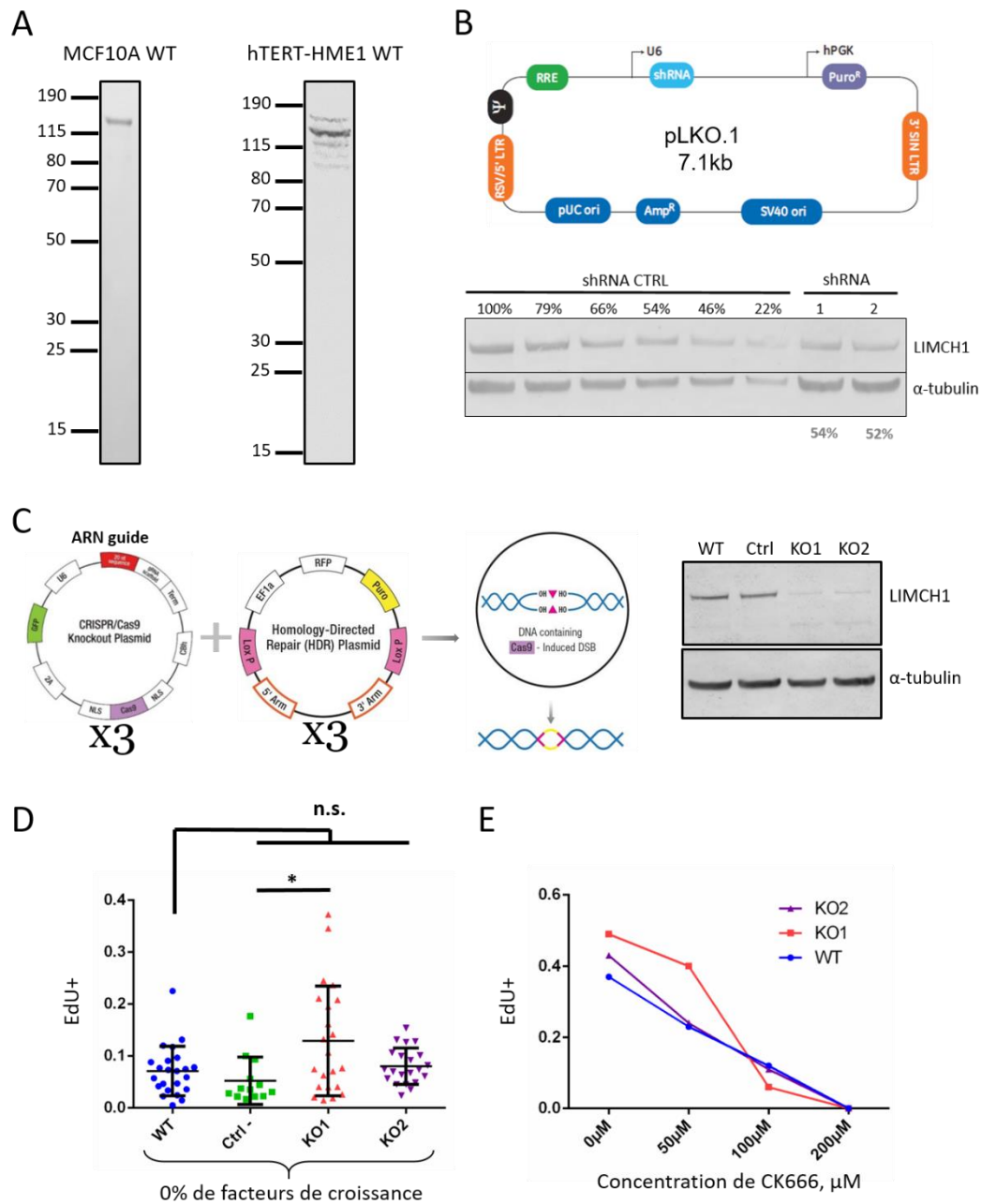


Figure 8. Caractérisation des lignées stables déplétées en LIMCH1. (A) Profil d'expression de LIMCH1 dans les cellules MCF10A et hTERT-HME1. (B) Analyse des clones stables déplétés par shRNA (Dharmacon). (C) Stratégie de génération des lignées stables MCF10A *LIMCH1* KO avec les plasmides CRISPR/Cas9 (SantaCruz Biotechnology) et analyse des clones *LIMCH1* KO obtenus par Western blot. A droite : plasmide HDR conçu pour pouvoir insérer le gène de résistance à la puromycine à l'endroit de coupure double brin d'ADN par recombinaison homologue ; à gauche : plasmide contenant le guide ARN et la Cas9 (origine des schémas : SantaCruz Biotechnology, www.scbt.com). (D-E) Taux d'incorporation d'EdU sans facteurs de croissance (D) et en présence de CK666 (E) dans les cellules *LIMCH1* KO (Kruskal-Wallis test, * $p < 0.05$).

N'ayant pas d'information sur les séquences cibles utilisées dans le design de SantaCruz Biotechnology, nous ne pouvions pas vérifier les clones obtenus par le séquençage. Nous avons décidé alors de générer les nouveaux clones *LIMCH1* KO avec notre propre design (Figure 9A). Afin d'obtenir ces lignées j'ai transfecté les cellules MCF10A et hTERT-HME1 avec de la protéine Cas9 purifiée et des gRNAs synthétiques. Quatre guides ARN disponibles chez Thermo Fisher ont été préalablement testé concernant leur efficacité (test T7EI) et le guide le plus efficace a été choisi pour la transfection. Les clones *LIMCH1* KO isolés ont été criblés par Western blot, puis un clone KO de chaque lignée a pu être confirmé par séquençage (Figure 9B-C). Notons qu'une nouvelle fois les clones KO générés présentaient une bande résiduelle par Western blot dans les deux lignées cellulaires.

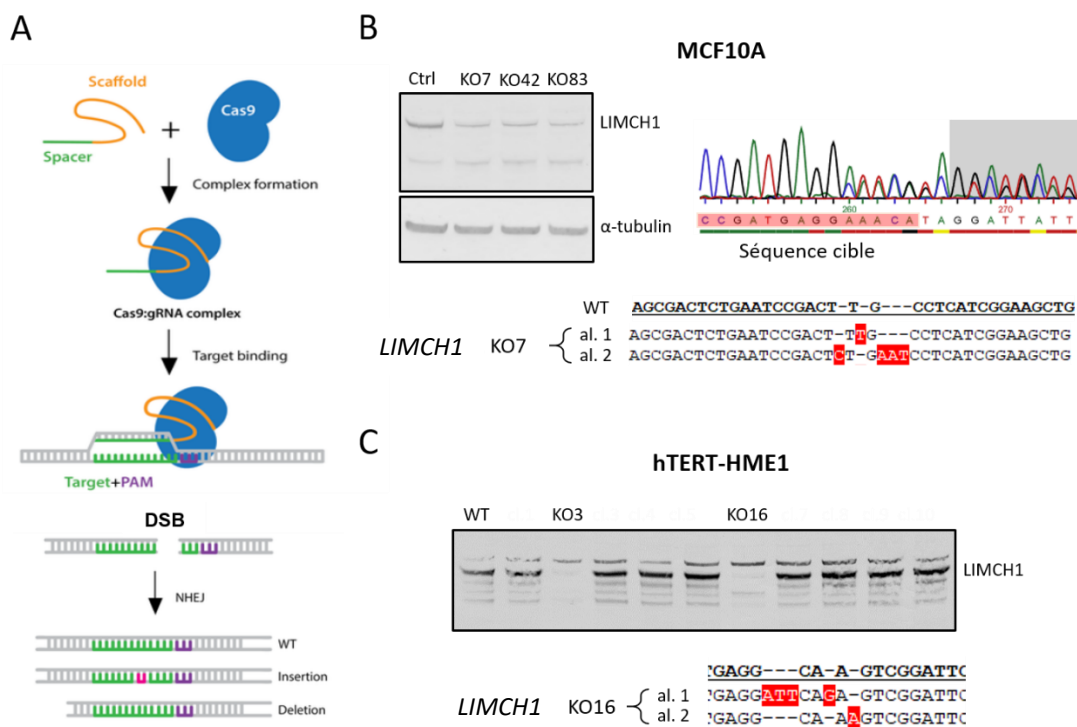


Figure 9. Génération de clones *LIMCH1* knock-out. (A) Les guides ARN designés ont été mélangés à de l'ARN tracer et transfectés avec la protéine Cas9. Les coupures d'ADN double brin induites par la Cas9 sont majoritairement réparées par non-homologous end joining (NHEJ) et il peut en résulter des insertion/délétions qui créent le décalage de phase de lecture (origine des schémas : Addgene). (B-C) Les clones obtenus ont été testés par Western blot et par PCR. Le séquençage du produit d'amplification de la région contenant la séquence cible montre une superposition de deux chromatogrammes à cause du mélange de deux allèles différents. Les deux allèles sont ensuite séparés par clonage et séquencés individuellement.

Les clones *LIMCH1* KO obtenus ont été analysés avec le test d'incorporation d'EdU en présence de CK666 et dans les conditions de starvation (Figure 10A). Les clones MCF10A *LIMCH1* KO générés sont aussi sensibles à l'absence des facteurs de croissance et à l'inhibition d'Arp2/3 avec CK666 que les cellules contrôles. Les cellules hTERT-HME1 ont montré une faible sensibilité à CK666 en comparaison aux cellules MCF10A. Répété à plusieurs reprises avec les lignées KO, ce test n'a pas permis de révéler le phénotype observé avec le crible ARNi. Comme avant, les cellules MCF10A *LIMCH1* KO étaient morphologiquement identiques aux cellules contrôles. Les clones *LIMCH1* KO ont été analysés en microscopie à fluorescence avec l'anticorps contre LIMCH1. De manière surprenante, les clones MCF10A *LIMCH1* KO présentaient un marquage identique à celui des cellules contrôles, indiquant une cross-réaction de l'anticorps (Figure 10B). La déplétion de LIMCH1 était, en revanche, très claire pour la lignée hTERT-HME1 où le marquage était fortement diminué dans les cellules KO.

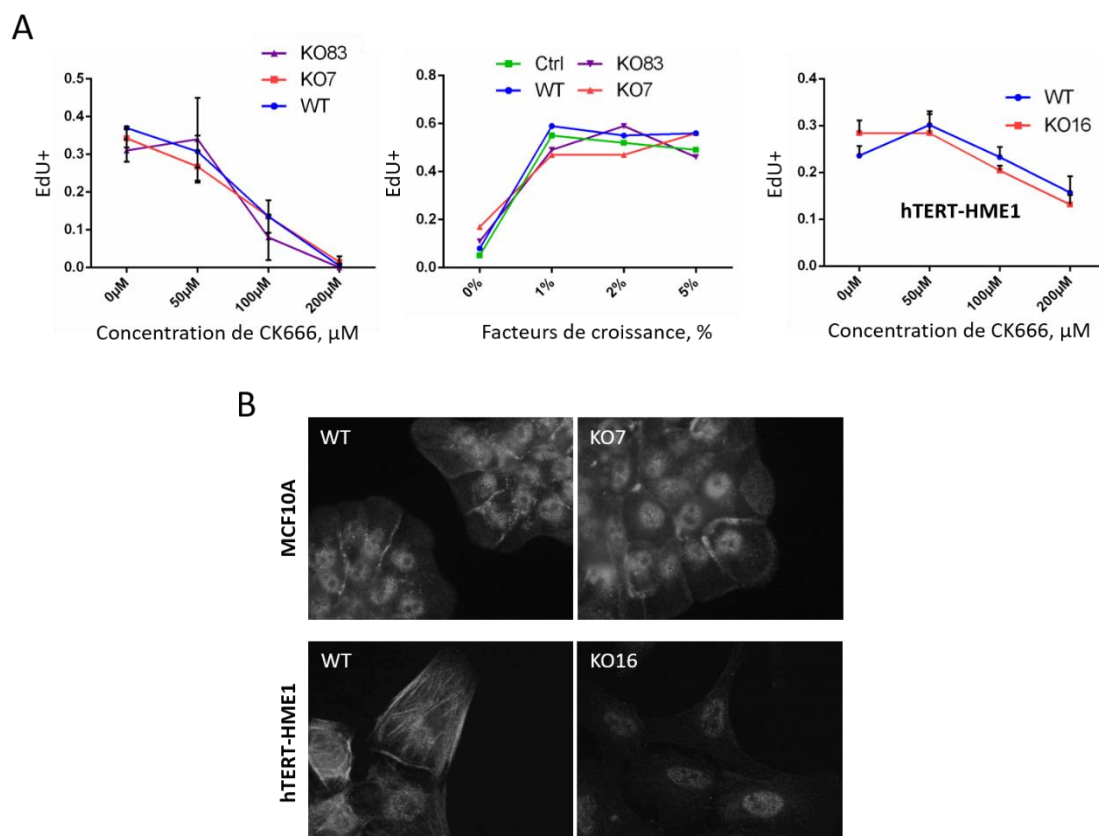


Figure 10. Les lignées *LIMCH1* KO ne permettent pas de révéler le phénotype observé dans le crible ARNi. (A) Taux d'incorporation d'EdU dans les cellules traitées avec différentes concentrations de CK666 ou en fonction de pourcentage des facteurs de croissance présents dans le milieu a été analysé. (B) Les clones *LIMCH1* KO ont été fixés et marqués avec l'anticorps contre LIMCH1.

2. L'absence de phénotype dans les clones *LIMCH1* KO s'explique-t-elle par une compensation génétique ?

Puisque *LIMCH1* possède un gène paralogue *LMO7*, nous avons examiné l'hypothèse que nous étions en présence de compensation génétique dont certains mécanismes d'adaptation transcriptionnelle ont récemment été révélés (El-Brolosy et al. 2019; Ma et al. 2019). La protéine LMO7 était exprimée dans les cellules MCF10A, présentant au moins deux isoformes. Les cellules hTERT-HME1 exprimaient plusieurs isoformes de poids moléculaire entre 80 et 190 kDa, notons que l'isoforme majoritaire est différente de celle exprimée par les cellules MCF10A (Figure 11A).

Premièrement, j'ai vérifié si la bande résiduelle de LIMCH1 dans les expériences de Western blot était due à la cross-réactivité de l'anticorps contre LIMCH1 avec son paralogue LMO7. En effet, cette bande a disparu quand les cellules *LIMCH1* KO ont été traitées avec les siRNAs dirigés contre LMO7 (Figure 11C, l'efficacité du pool de siRNAs contre LMO7 est illustrée sur la Figure 11B). Nous avons alors supposé que LMO7 pouvait être surexprimée dans les cellules *LIMCH1* KO. J'ai mesuré le niveau d'expression de la protéine LMO7 par Western blot et de son ARNm par qRT-PCR (Figure 11D-E). LMO7 était effectivement surexprimée dans les cellules *LIMCH1* KO aux niveaux protéique et ARNm. En suggérant que la protéine LMO7 est surexprimée suite à knock-out de LIMCH1 et peut compenser l'absence de la dernière, j'ai essayé de dépléter LMO7 et d'effectuer le test d'incorporation d'EdU. Malheureusement, cette déplétion n'a pas plus révélé le phénotype établi dans le crible initial (Figure 11F).

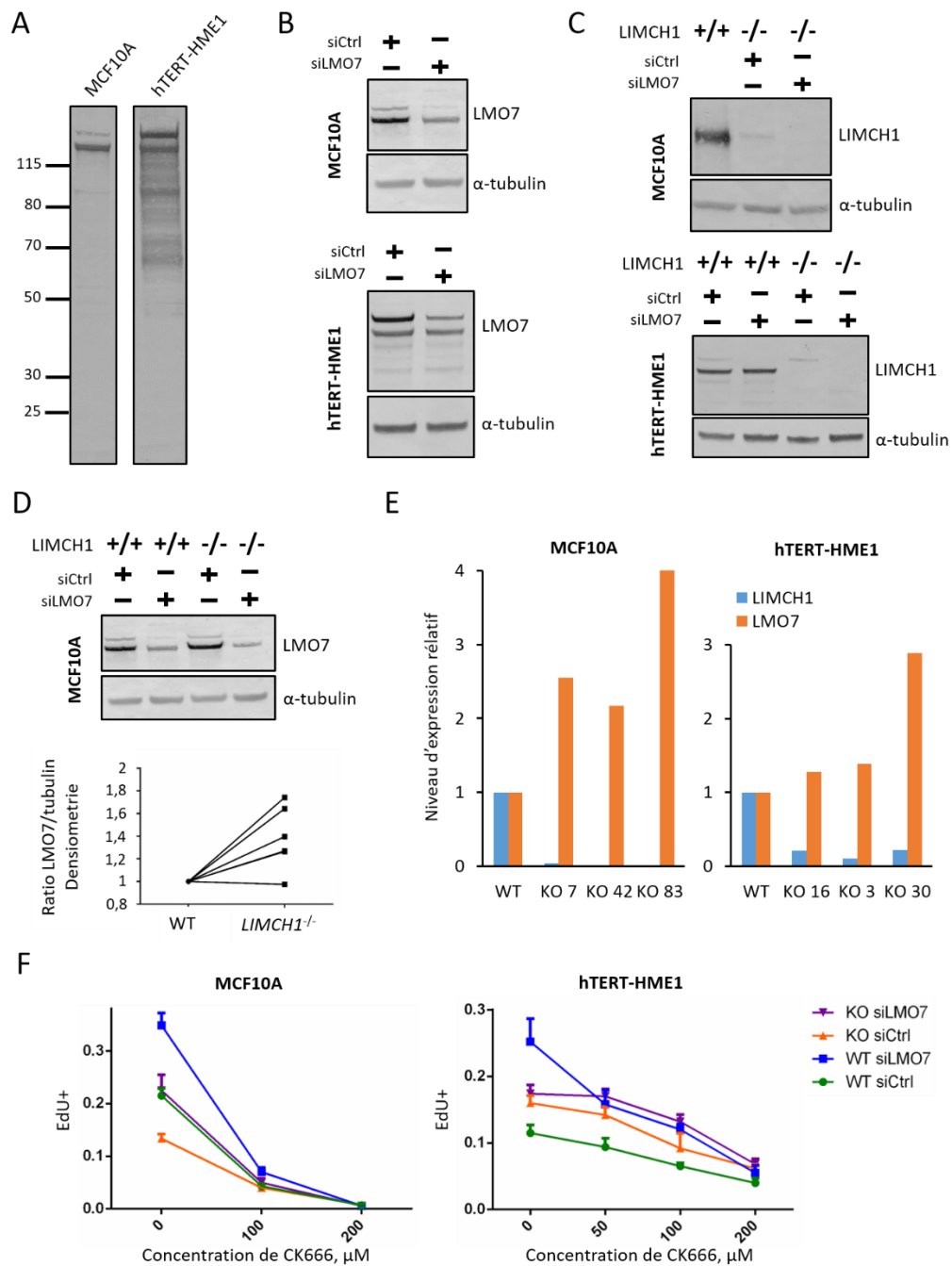


Figure 11. *LMO7*, le gène paralogue de *LIMCH1*, est sur-exprimé dans les cellules *LIMCH1* KO. (A) Western blot montrant le profil d'expression de *LMO7* dans les cellules MCF10A et hTERT-HME1. (B) Déplétion transitoire de *LMO7* à l'aide de Smartpool de siRNAs. La dose pour les cellules hTERT-HME1 reste à optimiser. (C) La déplétion de *LMO7* dans les cellules *LIMCH1* KO permet de faire disparaître la bande résiduelle détectable par Western blot avec les anticorps contre *LIMCH1*. (D-E) *LMO7* est surexprimé dans cellules *LIMCH1* KO comme indique la densitométrie des bandes révélées par Western blot (D) et qRT-PCR avec des sondes spécifiques pour *LIMCH1* et *LMO7* (E). (F) Le taux d'incorporation d'EdU dans les cellules MCF10A *LIMCH1* KO avec *LMO7* déplétée en transitoire a été mesuré en réponse à des concentrations croissantes de CK666.

En admettant que la déplétion transitoire pouvait être insuffisante, je me suis ensuite attaché à obtenir de nouvelles lignées *LIMCH1 LMO7* double KO ainsi que la lignée simple *LMO7* KO. Ces lignées pouvaient nous aider à vérifier si la compensation génétique fonctionne dans les deux sens et si la redondance fonctionnelle entre ces deux protéines paralogues est effectivement la cause de l'absence de phénotype des simples *LIMCH1* KO. La génération de ces lignées *LMO7* KO et double KO s'est avéré difficile sans aucune raison apparente. En effet, j'ai utilisé la même stratégie qui a permis d'obtenir les simples *LIMCH1* KO (transfection du complexe guide ARN:Cas9 qui introduit la coupure double brin dans l'exon 10 de *LMO7*, Figure 12A). Malgré deux tentatives, je n'ai pas réussi à générer des clones double KO dans les cellules MCF10A. Souvent dans les clones dont l'exon 10 devait contenir des insertions/délétions, j'observais un décalage de poids moléculaire visible sur Western blot. Ce shift peut être expliqué par l'épissage alternatif qui permet de sauter l'exon 10 muté. J'ai alors essayé de changer la stratégie. Ainsi, j'ai cloné une séquence de gRNA ciblant l'exon 9 de *LMO7* dans le plasmide vecteur exprimant la Cas9. J'ai ensuite transfecté les cellules MCF10A avec ce plasmide en ajoutant un autre plasmide apportant le gène de résistance au puromicine. Les clones ont été sélectionnés et analysés par Western blot. De manière surprenante, j'ai constaté le décalage en poids moléculaire semblable à celui observé auparavant (Figure 12B). En traitant les clones avec des siRNAs contre *LMO7* j'ai pu confirmer qu'il s'agissait bien de *LMO7* et pas d'une cross-réactivité des anticorps.

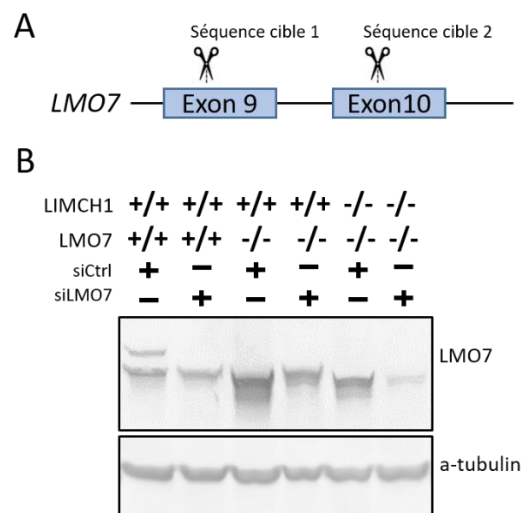


Figure 12. Génération de clones *LMO7* KO dans des lignées de MCF10A WT ou *LIMCH1* KO. (A) Schéma indiquant la localisation de séquences cibles. (B) Exemples du probable épissage alternatif qui se produit dans les cellules dont l'exon 9 est perturbé par CRISPR/Cas9.

Conclusion

Le présent projet, basé sur un crible ARNi à l'échelle du génome, tentait d'identifier les acteurs inconnus sur la voie de signalisation partant de l'actine branchée au cortex et régulant la progression dans le cycle cellulaire. *LIMCH1*, dont la déplétion permet d'ignorer l'état d'actine branchée, nous a paru le candidat le plus intéressant. *LIMCH1*, ainsi que son paralogue *LMO7*, est suggéré en tant que gène suppresseur de tumeurs putatif. *LIMCH1* et *LMO7* sont associées au cytosquelette d'actine et participent vraisemblablement dans plusieurs voies de signalisation dans lesquelles leurs rôles restent à élucider.

Je me suis attaché alors à créer des systèmes propres constitués de lignées où le gène *LIMCH1* est invalidé afin de pouvoir confirmer le rôle de suppresseur de tumeurs de *LIMCH1* dans les tests de prolifération. Malheureusement, les clones *LIMCH1* KO obtenus n'ont pas eu le phénotype attendu d'après le crible ARNi. Une explication possible de l'absence du phénotype dans les cellules *LIMCH1* KO est la compensation génétique impliquant la surexpression de son gène paralogue *LMO7*. *LMO7* était effectivement surexprimée dans les cellules *LIMCH1* KO, aux niveaux protéique et ARNm. Nous avons décidé de générer des lignées *LMO7* KO et *LIMCH1 LMO7* double KO afin de contourner les effets de la compensation. La création de ces lignées s'est avéré difficile et n'a pas abouti. Ces résultats négatifs se sont ajoutés à d'autres difficultés rencontrées tout au long de projet. Par exemple, il était difficile de travailler avec le gène *LIMCH1* dont l'ADNc est vraisemblablement toxique dans les bactéries. Cela expliquerait notamment pourquoi il était très difficile de trouver l'ADNc de *LIMCH1* dans les banques de plasmides habituelles et pourquoi il existe si peu de publication sur *LIMCH1* malgré son importance probable (seulement 17 résultats sur PubMed avec une minorité de publications utilisant l'ADNc). L'absence de résultats positifs m'ont malheureusement forcé à abandonner ce projet au cours de ma deuxième année de thèse et à consacrer le reste de temps au projet d'Arpin, moins risqué.

Si les contraintes de temps me permettaient de continuer de travailler sur *LIMCH1*, j'envisagerais à générer les clones *LIMCH1 LMO7* double KO par l'excision du locus entier ou du promoteur de *LMO7*. Cela devrait permettre de contourner l'épissage alternatif, la raison probable de mes échecs précédentes. Il serait également intéressant d'utiliser le système de lignées *LIMCH1* KO, *LMO7* KO et *LIMCH1 LMO7* double KO pour examiner les mécanismes de compensation génétique tout à fait fascinants récemment décrits.

Références

- Bersini, Simone, Nikki K. Lytle, Roberta Schulte, Ling Huang, Geoffrey M. Wahl, and Martin W. Hetzer. 2020. "Nup93 Regulates Breast Tumor Growth by Modulating Cell Proliferation and Actin Cytoskeleton Remodeling." *Life Science Alliance* 3 (1). <https://doi.org/10.26508/lsa.201900623>.
- Du, Ting-Ting, James B. Dewey, Elizabeth L. Wagner, Runjia Cui, Jinho Heo, Jeong-Jin Park, Shimon P. Francis, et al. 2019. "LMO7 Deficiency Reveals the Significance of the Cuticular Plate for Hearing Function." *Nature Communications* 10 (1): 1117. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09074-4>.
- El-Brolosy, Mohamed A., Zacharias Kontarakis, Andrea Rossi, Carsten Kuenne, Stefan Günther, Nana Fukuda, Khrievono Kikhi, et al. 2019. "Genetic Compensation Triggered by Mutant mRNA Degradation." *Nature* 568 (7751): 193–97. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1064-z>.
- Friedberg, Felix. 2009. "Alternative Splicing for Members of Human Mosaic Domain Superfamilies. I. The CH and LIM Domains Containing Group of Proteins." *Molecular Biology Reports* 36 (5): 1059–81. <https://doi.org/10.1007/s11033-008-9281-9>.
- Halle, Mari K., Marte Sødal, David Forsse, Hilde Engerud, Kathrine Woie, Njål G. Lura, Kari S. Wagner-Larsen, et al. 2021. "A 10-Gene Prognostic Signature Points to LIMCH1 and HLA-DQB1 as Important Players in Aggressive Cervical Cancer Disease." *British Journal of Cancer* 124 (10): 1690–98. <https://doi.org/10.1038/s41416-021-01305-0>.
- Holaska, James M., Soroush Rais-Bahrami, and Katherine L. Wilson. 2006. "Lmo7 Is an Emerin-Binding Protein That Regulates the Transcription of Emerin and Many Other Muscle-Relevant Genes." *Human Molecular Genetics* 15 (23): 3459–72. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddl423>.
- Karlsson, Terese, Samuel Kvarnbrink, Camilla Holmlund, Johan Botling, Patrick Micke, Roger Henriksson, Mikael Johansson, and Håkan Hedman. 2018. "LMO7 and LIMCH1 Interact with LRIG Proteins in Lung Cancer, with Prognostic Implications for Early-Stage Disease." *Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands)* 125 (November): 174–84. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2018.09.017>.
- Liao, Chia-Jung, Hsiang-Cheng Chi, Chung-Ying Tsai, Chi-De Chen, Sheng-Ming Wu, Yi-Hsin Tseng, Yang-Hsiang Lin, et al. 2015. "A Novel Small-Form NEDD4 Regulates Cell Invasiveness and Apoptosis to Promote Tumor Metastasis." *Oncotarget* 6 (11): 9341–54.
- Lin, Yu-Hung, Yen-Yi Zhen, Kun-Yi Chien, I-Ching Lee, Wei-Chi Lin, Mei-Yu Chen, and Li-Mei Pai. 2017. "LIMCH1 Regulates Nonmuscle Myosin-II Activity and Suppresses Cell Migration." Edited by Laurent Blanchoin. *Molecular Biology of the Cell* 28 (8): 1054–65. <https://doi.org/10.1091/mbc.e15-04-0218>.
- Ma, Zhipeng, Peipei Zhu, Hui Shi, Liwei Guo, Qinghe Zhang, Yanan Chen, Shuming Chen, Zhe Zhang, Jinrong Peng, and Jun Chen. 2019. "PTC-Bearing mRNA Elicits a Genetic Compensation Response via Upf3a and COMPASS Components." *Nature* 568 (7751): 259–63. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1057-y>.
- Molinie, Nicolas, Svetlana N. Rubtsova, Artem Fokin, Sai P. Visweshwaran, Nathalie Rocques, Anna Polesskaya, Anne Schnitzler, et al. 2019. "Cortical Branched Actin Determines Cell Cycle Progression." *Cell Research* 29 (6): 432–45. <https://doi.org/10.1038/s41422-019-0160-9>.
- Ooshio, Takako, Kenji Irie, Koji Morimoto, Atsunori Fukuhara, Toshio Imai, and Yoshimi Takai. 2004. "Involvement of LMO7 in the Association of Two Cell-Cell Adhesion Molecules, Nectin and E-Cadherin, through Afadin and α -Actinin in Epithelial Cells *." *Journal of Biological Chemistry* 279 (30): 31365–73. <https://doi.org/10.1074/jbc.M401957200>.
- Putilina, T., C. Jaworski, S. Gentleman, B. McDonald, M. Kadiri, and P. Wong. 1998. "Analysis of a Human CDNA Containing a Tissue-Specific Alternatively Spliced LIM Domain." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 252 (2): 433–39. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1998.9656>.
- Tanaka-Okamoto, Miki, Keiko Hori, Hiroyoshi Ishizaki, Akihiro Hosoi, Yu Itoh, Min Wei, Hideki Wanibuchi, Akira Mizoguchi, Hiroyuki Nakamura, and Jun Miyoshi. 2009. "Increased Susceptibility to Spontaneous Lung Cancer in Mice Lacking LIM-Domain Only 7." *Cancer Science* 100 (4): 608–16. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2009.01091.x>.
- Wozniak, Michele A., Brendon M. Baker, Christopher S. Chen, and Katherine L. Wilson. 2013. "The Emerin-Binding Transcription Factor Lmo7 Is Regulated by Association with P130Cas at Focal Adhesions." *PeerJ* 1 (August): e134. <https://doi.org/10.7717/peerj.134>.

Zhang, Yuanyuan, Yingmei Zhang, and Haiyan Xu. 2019. "LIMCH1 Suppress the Growth of Lung Cancer by Interacting with HUWE1 to Sustain P53 Stability." *Gene* 712 (September): 143963. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2019.143963>.

Remerciements

Je voudrais tout d'abord remercier Prof. Alexis Gautreau, mon directeur de thèse et mon professeur depuis la deuxième année à l'Ecole Polytechnique. Je remercie Alexis de m'avoir initié à la recherche en biologie, de m'avoir guidé au long des cours et des projets et de m'avoir ensuite accepté au sein de son équipe pour préparer le doctorat. Merci de m'avoir aidé à préciser mes intérêts scientifiques, d'être toujours disponible tout en me laissant la liberté d'apprendre, d'essayer et de développer mes compétences.

N'ayant pas d'expérience solide en techniques de biologie moléculaire et cellulaire, j'ai eu beaucoup à apprendre. J'ai été chanceux d'être chaleureusement accueilli et conseillé par les gens brillants de l'équipe d'Alexis qui aiment partager leur savoir-faire. Je remercie Nicolas Molinié de m'avoir initié au début de ma thèse aux techniques nécessaires pour démarrer. Un grand merci à Artem Fokin d'être toujours à l'écoute, de ses conseils et astuces techniques précieux, de m'avoir appris à organiser mes expériences et de tous les moments quotidiens partagés au cours de ces trois années. Je remercie Yanan Wang d'avoir partagé avec moi l'expérience de thèse qu'on a vécue pendant cette période incertaine de la pandémie.

Je remercie Nathalie Rocques de son soutien et de son écoute, de ses efforts pour le fonctionnement fluide du laboratoire et de son état d'esprit toujours positif. Je remercie Anna Poleskaya, Stéphane Romero, John James et Dmitry Guschin d'avoir partagé avec moi leurs expériences dans le domaine. Je voudrais remercier toutes et tous les membres du laboratoire de Biologie structurale de la cellule de l'Ecole polytechnique, les chercheuses et les chercheurs passionnés et formidables que j'ai pu côtoyer.

Je remercie mes parents, ma compagne Ellie et sa famille aussi que mes amis de leur soutien sans faille et de leur patience qu'ils m'ont accordés pendant de nombreux moments d'échecs et de réussites. Merci à ma copine pour nos week-ends et nos vacances qui m'ont permis de me reposer et d'apporter de nouvelles idées à mes projets.

Je tiens à remercier l'Ecole Polytechnique de m'avoir accordé la bourse doctorale AMX et le complément Monge qui m'ont permis de travailler sereinement et de développer mes projets de recherche.

Titre : Rôles d'Arpin dans la migration cellulaire et la réparation de l'ADN

Mots clés : Arpin, Arp2/3, Tankyrases, persistance de la migration, réparation d'ADN, recombinaison homologue

Résumé : Au front de migration, la protrusion de la membrane appelée lamellipode est générée par la polymérisation de l'actine branchée par Arp2/3. Ce processus est orchestré par la petite GTPase Rac1 capable d'activer le complexe WAVE et d'exposer son domaine WCA nécessaire pour l'activation d'Arp2/3. Différentes boucles de rétroaction positive soutiennent l'activité de Rac1 et stabilisent le lamellipode. Rac1 active aussi l'inhibiteur d'Arp2/3, Arpin, créant une boucle de rétroaction négative. Comme WAVE, Arpin possède un motif A à son extrémité C-terminale, pour lequel il existe deux sites d'interaction à la surface d'Arp2/3. Au lieu d'empêcher la formation de lamellipode, Arpin régule sa durée de vie et, ainsi, contrôle la persistance de la migration cellulaire. Récemment, une nouvelle fonction d'Arp2/3 dans la recombinaison homologue (HDR) a été rapportée.

Dans ma thèse, je me suis attaché à mieux comprendre les rôles et les régulations d'Arpin dans la cellule. Nous avons identifié de nouveaux partenaires d'interaction d'Arpin, les Tankyrases 1 et 2. En interrompant spécifiquement l'interaction des Tankyrases ou d'Arp2/3 avec Arpin, j'ai montré que ces deux interactions sont nécessaires pour l'activité d'Arpin dans la régulation de la migration cellulaire. En collaboration, nous avons étudié les mécanismes d'interaction d'Arpin avec le complexe Arp2/3 et montré qu'Arpin se lie à un seul site sur Arp2/3, au niveau de la sous-unité Arp3. Outre le motif A, l'interaction nécessite un motif C non identifié auparavant, similaire au domaine C des activateurs d'Arp2/3. Deuxièmement, j'ai montré que la déplétion d'Arpin stimulait l'efficacité de la HDR mais favorisait l'accumulation des sites de réparation d'ADN dans le noyau. Arpin, ainsi, pourrait jouer un rôle régulateur dans la réparation de l'ADN.

Title : Roles of Arpin in cell migration and DNA repair

Keywords : Arpin, Arp2/3, Tankyrases, cell migration persistence, DNA repair, homology-directed recombination

Abstract : At the leading edge, membrane protrusions called lamellipodia are driven by Arp2/3-mediated actin polymerization. This process is orchestrated by the small GTPase Rac1 that activates the WAVE complex by exposing its WCA domain. Different positive feedback loops sustain Rac1 activity and stabilize lamellipodia. Strikingly, Rac1 also activates an Arp2/3 inhibitory protein, Arpin, thus creating a negative feedback loop. Like WAVE, Arpin possesses an A motif at its C-terminus, for which two binding sites at the surface of Arp2/3 are predicted. Arpin does not prevent lamellipodia from forming but rather regulates their lifetime and, thus, control the persistence of cell migration. Recently, a new Arp2/3 function during DNA repair has been reported, specifically in homology directed recombination (HDR).

During my PhD I sought to better understand the roles and regulations of Arpin in the cell. We identified new Arpin interaction partners, Tankyrases 1 and 2. By specifically impairing Tankyrase or Arp2/3 binding to Arpin we demonstrated that both the interactions are required for full Arpin activity in the regulation of cell migration. In collaboration, we studied the mechanisms of Arpin interaction with the Arp2/3 complex and showed that Arpin binds to a single site at the surface of Arp2/3, interacting specifically with the Arp3 subunit. This interaction requires a previously unidentified C helix motif at the C-terminus of Arpin, similar to the C domain of Arp2/3 activators. In addition, I demonstrated that Arpin depletion increases HDR efficiency but also promotes accumulation of DSB foci in the cell nuclei. Arpin, thus, could play a regulatory role in DNA repair.