



**HAL**  
open science

# Étude de la régulation de p190RhoGAPS : implication dans le cancer

Capucine Héraud

► **To cite this version:**

Capucine Héraud. Étude de la régulation de p190RhoGAPS : implication dans le cancer. Biologie cellulaire. Université de Bordeaux, 2021. Français. NNT : 2021BORD0363 . tel-04348095

**HAL Id: tel-04348095**

**<https://theses.hal.science/tel-04348095v1>**

Submitted on 16 Dec 2023

**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.

THÈSE PRÉSENTÉE  
POUR OBTENIR LE GRADE DE

**Docteur de  
l'Université de Bordeaux**

École doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé  
Spécialité Biologie Cellulaire et Physiopathologie

Par Capucine HÉRAUD

**Étude de la régulation de p190RhoGAPs  
Implication dans le cancer**

Sous la direction de Dr. Violaine MOREAU  
Soutenue le 15 décembre 2021 à Bordeaux

Membres du jury :

**Mme MOREAU Violaine**

Directrice de recherche INSERM, Bordeaux

**Directrice de thèse**

**Mme SAGOT Isabelle**

Directrice de recherche CNRS, Bordeaux

**Présidente**

**M. FAVRE Gilles**

Professeur des universités-Praticien hospitalier, Toulouse

**Rapporteur**

**Mme BLANGY Anne**

Directrice de recherche CNRS, Montpellier

**Rapporteur**

**Mme LAGRÉE Valérie**

Maître de conférences, Bordeaux

**Invitée**



## Étude de la régulation de p190RhoGAPs : Implication dans le cancer

Au cours du développement tumoral, les cellules acquièrent des capacités migratoires et invasives leur permettant de se disséminer dans l'organisme et de créer des métastases à distance. Les GTPases de la famille Rho sont les principaux régulateurs du remodelage du cytosquelette d'actine. Une fine régulation spatio-temporelle des GTPases Rho est nécessaire dans la formation et le maintien des structures riches en actine impliquées notamment lors de la migration et l'invasion cellulaires. Les protéines p190RhoGAP (p190A et p190B) sont les principaux régulateurs négatifs de la GTPase RhoA. Les gènes *ARHGAP35* et *ARHGAP5*, codant p190A et p190B respectivement, sont retrouvés mutés dans le cancer. L'objectif de ce travail de thèse vise à mieux comprendre le rôle et la régulation des protéines p190RhoGAP dans le cancer.

Tout d'abord, nous avons identifié le domaine nécessaire et suffisant pour la localisation de p190A aux invadosomes, structures d'actine impliquées dans l'invasion cellulaire. Nous montrons que ce même domaine, nommé PLS, est impliqué dans la régulation de la conformation de p190A. Par l'analyse de l'impact de mutations retrouvées dans les tumeurs, nous proposons un modèle de régulation de p190RhoGAPs. Ce modèle combine une interaction auto-inhibitrice intramoléculaire et une interaction intermoléculaire. Parallèlement, nous avons initié une étude conjointe de p190A et p190B, dans des modèles cellulaires et des échantillons de patientes de cancer de l'endomètre, cancer présentant un fort taux de mutations des gènes *ARHGAP35* et *ARHGAP5*.

Ainsi, ce travail de thèse propose un nouveau mécanisme de régulation de p190RhoGAPs. Moduler ce mécanisme pourrait être une piste thérapeutique pour contrer l'impact des mutations dans les cellules tumorales.

**Mots clés :** GTPases Rho, Cytosquelette, Mutations, Structure, Endomètre

---

## Study of p190RhoGAPs regulation: involvement in cancer

During tumor development, cells acquire migratory and invasive capacities in order to invade surrounding tissues and promote metastasis. RhoGTPases are the main regulators of actin cytoskeleton remodeling. A tight spatio-temporal regulation of RhoGTPases is required for the formation and the maintenance of actin-based structures, especially those regulating cell migration and invasion. P190RhoGAP proteins (p190A and p190B) are the major negative regulators of RhoA GTPase. *ARHGAP35* and *ARHGAP5* genes, encoding p190A and p190B respectively, are mutated in cancer. My thesis project aims to better understand the role and the regulation of p190RhoGAP in cancer.

First, using a structure/function analysis, we identified the domain necessary and sufficient to localize p190A at invadosomes. We revealed that the same domain, named PLS, is required for regulating the folding and, thereby, the activity of the protein. Thanks to the study of cancer-associated mutations, we propose a new regulatory model for p190RhoGAPs. This model combines both intramolecular auto-inhibitory interaction and intermolecular interaction. Then, as *ARHGAP35* and *ARHGAP5* genes are mutated in a high percentage of endometrial cancers, we initiated a combined study of p190A and p190B, in cellular models and patient samples of endometrial cancer.

Altogether, this work reveals a new regulatory mechanism of p190RhoGAP. Modulating this mechanism could be a therapeutic target to counteract the impact of cancer-associated mutations in tumor cells.

**Keywords:** RhoGTPases, Cytoskeleton, Mutations, Structure, Endometrium

---



## Remerciements

Je remercie le Dr. Anne Blangy et le Pr. Gilles Favre d'avoir accepté d'être les rapporteurs de mon travail de thèse. Je remercie également le Dr. Isabelle Sagot d'avoir accepté d'être la présidente de mon jury de thèse.

Je remercie le Dr. Valérie Lagrée d'avoir accepté de prendre part à la discussion de ma thèse. Valérie, merci beaucoup de m'avoir soutenue tout au long de mon stage de master 2 puis de ma thèse. Je te remercie pour tous tes conseils, pour ton écoute et ta bienveillance.

Je tiens à remercier le Dr. Violaine Moreau. Merci pour ton soutien, ton aide, ta disponibilité et ta gentillesse. Je te remercie pour les moments partagés au labo et en congrès, de la visite guidée de Strasbourg aux souvenirs mémorables de Londres, so typisch ! Merci de m'avoir fait confiance, de m'avoir accompagnée et aidée à évoluer pendant ces (presque) 5 années.

Je souhaite remercier le Dr. Samira Benhamouche ainsi que le Dr. Joaquim Javary. Merci de m'avoir permis d'effectuer mon stage de master 1 avec vous et de m'avoir fait découvrir le monde de la recherche. Merci pour votre gentillesse et votre soutien.

Je remercie le Dr. Frédéric Saltel pour ton aide tout au long de ces (trop nombreuses ?) années de thèse. Merci pour tes conseils, tes questions et ta sympathie. Merci également de m'avoir fait confiance en me confiant la suite du projet d'Aya.

Je souhaite remercier tous les membres de l'équipe 1 de BaRITOn qui m'ont permis de passer de belles années de thèse.

Je remercie le Pr. Charles Balabaud et le Pr. Paulette Bioulac-Sage. Merci pour votre sympathie, pour toutes les discussions ainsi que les chocolats.

Je tiens à remercier le Dr. Marion Bouchecareilh. Merci pour tes conseils aussi bien scientifiques que vestimentaires, sans oublier tes talents artistiques ! Je remercie le Dr. Anne-Aurélié Raymond. Merci pour ton soutien et ton aide durant les nombreuses heures passées

à l'analyse des données de spectrométrie de masse (désolée !). Merci au Dr. Clotilde Billottet et au Dr. Arnaud Jabouille pour vos conseils et votre sympathie. Un grand merci au Dr. Véronique Neaud pour ta gentillesse, ta bienveillance et toute ton aide au cours de ma thèse, notamment pour les plaques de qPCR.

Je souhaite remercier le Dr. Sara Basbous. Merci pour ton soutien depuis le début, pour toutes nos discussions (petite pensée pour Harvey !), sans oublier ton sommeil de plomb un soir de Cancéropôle... Merci également au Dr. Aya Abou Hammoud et au récent Dr. Esra Karatas. Merci les filles pour les découvertes culinaires, pour votre gentillesse et votre aide tout au long de ma thèse.

Merci à Nathalie Dugot-Senant et à Céline Léon pour votre gentillesse et votre soutien. Je remercie ensuite les personnes qui nous facilitent la vie au labo. Merci à Franck, Gina, Hélène et Jérémie. Merci également à Virginie Rocher pour ton aide durant l'organisation de cette thèse et pour ta gentillesse.

Je remercie les nouvelles thésardes Mélanie Moreau, Léa Normand, Lydia Dif, Alexandra Lehmann et Lucile Rouyer. Merci pour nos discussions et votre sympathie, je vous souhaite bon courage dans cette belle aventure qui s'offre à vous. Je souhaite remercier tout particulièrement la future Dr. Mathilde Pinault. C'était un plaisir de te voir évoluer depuis ton stage de master 1 et de partager ce projet avec toi. J'en profite pour remercier mes autres stagiaires, Alexandra Escos et Audrey Boutillier. Merci pour votre gentillesse et vos gâteaux !

Je remercie également la team du midi, merci (ordre non contractuel) au Dr. Benjamin Bonnard, à la future Dr. Camille Dantzer (ou plutôt Gangster !) et à Cyril Dourthe. Merci pour votre soutien, votre gentillesse, votre bonne humeur et toutes nos discussions et rigolades autour d'un café.

Je voudrais remercier les anciens du labo, merci au Dr. Léo Piquet, au Dr. Elodie Henriet, à Gaëlle Lachiver et Adjanie Tuarihionoa. Mention spéciale pour Élodie et Adjanie, merci pour votre gentillesse et les superbes moments partagés en Polynésie !

Je remercie également l'ensemble des membres des équipes 2 et 3 de BaRITOn, ainsi que les membres de l'équipe mIRCade pour votre sympathie, un merci tout particulier au Dr. Patrick Auguste, au Dr. Caroline Capdevielle, à Justine Charpentier et Gaëlle Labrunie.

Je voudrais remercier les personnes extérieures au labo qui m'ont aidée au cours de ma thèse. Merci à Véronique Guyonnet-Dupérat de la plateforme Vect'UB pour votre aide. Merci à Christel Poujol, Sébastien Marais et Fabrice Cordelières pour votre aide dans le traitement et l'analyse des images. Je remercie le Dr. Yann Percherancier ainsi que les membres de son équipe. Merci pour ton accueil, ton aide et tes conseils afin de mettre en place le BRET. Je remercie également le Dr. Sabrina Croce et Valérie Velasco, merci pour votre aide et votre savoir dans la mise en place de notre étude sur les cancers de l'endomètre.

Au cours de ces années de thèse, j'ai croisé le chemin de quatre personnes formidables sans qui cette thèse aurait été nettement moins agréable et sympathique. Ce sont devenues, bien plus que des collègues, des amies fantastiques. Je remercie tout d'abord le Dr. Margaux Sala, ma première coloc de bureau ! On se souviendra que le classement des choix de master 2 est important... Merci d'avoir toujours été là pour moi dans les bons comme dans les mauvais moments. Merci pour ton extrême gentillesse, ton soutien, tes conseils et aussi tes, désormais cultes, blagues (lapiiiiin). Merci de m'avoir fait voyager en Polynésie, que de beaux souvenirs ! Je remercie ensuite le Dr. Manon Ros, ma maman d'adoption ! Merci pour tous nos fous rires, nos discussions, les nombreux cafés et les moments autant mémorables que cocasses partagés en congrès (j'en profite pour remercier Dave et Francis !). Merci pour ton soutien notamment dans les derniers instants de cette thèse. Je remercie également Nathalie Allain, ma dernière coloc de bureau ! Merci pour ta bienveillance, ta sagesse et pour toutes nos discussions. Merci pour ton soutien et tes mots toujours justes, notamment quand ça n'allait pas. Je pensais finir en te disant que tu allais pouvoir être au calme dans le bureau (plus de pintades), mais il semble que la relève est assurée ! Je remercie enfin Sylvaine Di Tommaso, la sœur que j'aurais aimé avoir ! Merci pour toutes nos discussions et les nombreuses pauses thé ou café. Merci également de nous avoir fait découvrir la croziflette de la poisse (heureusement la malédiction est terminée). Merci pour ta franchise, ta gentillesse et son soutien qui a été si précieux au cours de ces dernières semaines.

Les filles, je vous remercie pour votre gentillesse, votre bienveillance et votre soutien, même à des milliers de kilomètres. Quelle joie d'être votre amie et partager de superbes moments avec vous autour d'un thé, un gâteau au chocolat, une pizza ou un cocktail !



Je remercie mes amis de longue date pour leur soutien durant ces années de thèse. Merci infiniment à mes copines Vendéennes Anaïs, Camille, Justine, Marie-Caroline, Marine, Marion, Ophélie et Sylvie. Merci aux rescapés de la PACES, Gabrielle, Guillaume et Romain. Que de chemin parcouru depuis ces années. Merci à Charlotte et Lucie, deux superbes rencontres Nantaises. Merci beaucoup pour tous les bons moments partagés avec vous, les brunchs, les apéros, les week-ends et les vacances aux quatre coins de la France (ou du monde !). Merci pour votre amitié !

Je remercie également deux belles rencontres de master 2. Merci au Dr. Pauline Bougaran pour ta gentillesse et ton soutien pendant cette thèse. Merci pour tous les bons moments passés ensemble, les (quelques) goûters et restos et nos mésaventures en Corse ! Merci à Laurie Belin, ma partenaire de Pilates et de danse, merci pour ton aide et ta bienveillance.

Je souhaite remercier ma famille que j'aime fort pour tout leur soutien durant tout au long de mes études et plus particulièrement au cours de cette thèse. Merci à mes grands-parents, Victor et Yolande, Guy et Marcelle. Merci à mes oncles et tantes, Jean-François et Sophie, Yannick et Stéphanie. Merci pour votre confiance, votre bienveillance et votre soutien indéfectible. Merci à mes cousines chéries, Sidonie, Eulalie et Jacinthe, Ilona et Coline. Je suis fière d'être votre cousine et de vous voir grandir et évoluer année après année !

Je remercie mon frère Justin. Merci pour ton soutien et tous les bons moments partagés durant nos sessions de colocation. Je suis tellement fière d'être ta (grande) sœur. Enfin, je remercie mes parents Claudie et Jean-Guy. Merci pour votre amour et votre bienveillance, merci de toujours croire en moi. Merci pour votre soutien indéfectible sans quoi cette thèse n'aurait pas été possible.





# Table des matières

<b>Introduction générale.....</b>	<b>1</b>
<b>Avant-propos .....</b>	<b>3</b>
<i>Qu'est-ce que le cancer ? .....</i>	<i>6</i>
<i>Activation des processus d'invasion et de métastases.....</i>	<i>8</i>
<b>Chapitre 1 - Le cytosquelette d'actine.....</b>	<b>11</b>
1. <i>Le squelette de la cellule .....</i>	<i>13</i>
1.1. Les microtubules.....	14
1.2. Les filaments intermédiaires .....	15
1.3. Les microfilaments d'actine.....	15
2. <i>Protéines associées au cytosquelette d'actine .....</i>	<i>17</i>
2.1. La polymérisation de l'actine.....	17
2.2. Protéines de nucléation.....	18
2.2.1. Le complexe Arp2/3 .....	20
2.2.1.1. NPFs de classe I.....	20
2.2.1.2. NPFs de classe II.....	21
2.2.2. Les formines .....	21
2.2.3. Les autres nucléateurs .....	22
2.3. Autres protéines régulant la polymérisation.....	22
2.3.1. Les protéines de coiffe .....	23
2.3.2. Les protéines de séquestration .....	24
2.3.3. Les protéines de fragmentation .....	24
2.4. Autres protéines de liaison à l'actine .....	24
2.4.1. Les protéines de stabilisation.....	24
2.4.2. Les protéines d'ancrage .....	25
2.4.3. Les protéines motrices .....	26
3. <i>Structures et fonctions physiopathologiques de l'actine.....</i>	<i>27</i>
3.1. Cortex/Jonctions cellulaires : Armature et communication cellulaires .....	27
3.2. Structures impliquées dans la migration cellulaire.....	29
3.3. Structures impliquées dans l'invasion cellulaire.....	31
3.4. Anneau de cytokinèse et actine nucléaire : Division et prolifération cellulaires.....	34
<b>Chapitre 2 - Les GTPases Rho.....</b>	<b>39</b>
1. <i>Introduction sur les GTPases .....</i>	<i>41</i>
1.1. La régulation cyclique des petites GTPases .....	43
1.2. Les différentes familles des petites GTPases.....	46
1.2.1. Ras .....	46
1.2.2. Rho .....	47
1.2.3. Rab .....	48
1.2.4. Ran .....	48
1.2.5. Arf.....	49
2. <i>Les GTPases de la famille Rho .....</i>	<i>50</i>
2.1. La sous-famille Rho.....	51
2.2. La sous-famille Rac .....	52
2.3. La sous-famille Cdc42 .....	52

2.4.	Les GTPases Rho atypiques.....	53
3.	<i>Régulateurs des GTPases Rho</i> .....	54
3.1.	Les RhoGEFs.....	54
3.1.1.	La famille DOCK.....	55
3.1.2.	La famille DBL.....	56
3.1.3.	Régulation des protéines RhoGEFs.....	58
3.2.	Les RhoGAPs .....	60
3.2.1.	Mécanisme d'hydrolyse du GTP.....	62
3.2.2.	Régulation des RhoGAPs .....	63
3.2.3.	Modifications post-traductionnelles des RhoGAPs.....	64
3.3.	Les RhoGDIs .....	65
3.3.1.	Mécanisme d'action des RhoGDIs.....	66
3.3.2.	Régulation des RhoGDIs .....	68
3.4.	Modifications post-traductionnelles des GTPases Rho .....	69
4.	<i>Fonctions des GTPases Rho</i> .....	71
4.1.	Effecteurs des GTPases Rho.....	71
4.2.	Coordination des GTPases Rho dans la migration cellulaire.....	74
4.3.	Coordination des GTPases Rho dans l'invasion cellulaire.....	81
5.	<i>Physiopathologie des GTPases Rho</i> .....	83
5.1.	Rôles physiologiques des GTPases Rho .....	83
5.2.	Dérégulation des GTPases Rho dans le cancer .....	85
5.2.1.	Altérations génétiques des GTPases Rho dans le cancer .....	86
5.2.2.	Altérations de l'expression des GTPases Rho dans le cancer .....	87
5.2.3.	Variants d'épissage.....	88
5.2.4.	Altération des effecteurs.....	88
5.2.5.	Altération des régulateurs.....	89
<b>Chapitre 3 - Les p190RhoGAPs.....</b>		<b>93</b>
1.	<i>p190RhoGAPs, principaux régulateurs négatifs de RhoA</i> .....	95
2.	<i>Modifications post-traductionnelles</i> .....	118
3.	<i>p190RhoGAP et cancer de l'endomètre</i> .....	119
3.1.	Cancer de l'endomètre .....	120
3.2.	p190RhoGAP dans le cancer de l'endomètre .....	123
3.2.1.	Impact des mutations chez les patientes .....	124
3.2.2.	Impact des mutations dans la transformation maligne .....	124
3.2.3.	Impact des mutations dans la migration cellulaire .....	126
<b>Objectifs de la thèse .....</b>		<b>129</b>
<b>Résultats .....</b>		<b>133</b>
<b>Partie 1 - Mécanismes de régulation de p190RhoGAP.....</b>		<b>135</b>
1.	<i>Recherche des protéines interagissant avec le domaine PLS</i> .....	137
2.	<i>Régulation intramoléculaire</i> .....	140
2.1.	Article « Identification of the PLS as an inhibitory domain responsible for masking of p190RhoGAP functional domain » .....	140
2.2.	Mécanisme d'adressage de p190A aux invadosomes .....	165
2.3.	Le domaine PLS inhibe l'activité GAP <i>in cellulo</i> .....	167

2.4.	Recherche de modulateurs de la conformation de p190A.....	168
2.4.1.	Approche ciblée.....	168
2.4.2.	Approche globale .....	170
3.	<i>Régulation intermoléculaire</i> .....	172
3.1.	Interaction entre les protéines p190A et p190B .....	172
3.1.1.	Interaction du PLS de p190A et du Cter de p190B .....	172
3.1.2.	Interaction du PLS de p190B et du Cter de p190A .....	173
3.1.3.	Interaction de p190A et p190B endogènes.....	174
3.1.4.	Localisation de p190A et p190B aux rosettes .....	175
3.2.	Interaction entre deux protéines p190A .....	176
3.2.1.	Interaction p190A/p190A.....	176
3.2.2.	Implication du domaine PLS dans l'interaction p190A/p190A.....	179
3.2.3.	Implication du domaine Nter dans l'interaction p190A/p190A .....	181
3.2.4.	Implication du domaine Cter dans l'interaction p190A/p190A.....	182
3.3.	Conclusion sur les changements de conformation des protéines p190RhoGAPs .....	183
4.	<i>Étude de nouveaux partenaires de p190A</i> .....	185
4.1.	Le protéasome .....	185
4.2.	La machinerie de traduction.....	187
4.3.	La mitose .....	188
<b>Partie 2 - Étude de p190RhoGAP dans le cancer de l'endomètre</b> .....		<b>191</b>
1.	<i>Analyse de p190RhoGAP in vitro</i> .....	193
1.1.	Analyse de l'expression de p190RhoGAP dans les lignées de cancer de l'endomètre ..	193
1.2.	Analyse des fonctions biologiques de p190RhoGAP <i>in vitro</i> .....	195
1.2.1.	Évaluation de la capacité invasive des lignées de cancer de l'endomètre .....	195
1.2.2.	Étude de l'impact de p190RhoGAP dans la prolifération cellulaire .....	196
2.	<i>Étude de l'expression de p190A et p190B dans des tissus humains de cancer de l'endomètre</i> 198	
2.1.	Analyse de l'expression des gènes codant p190RhoGAP .....	199
2.2.	Analyse de l'expression protéique de p190RhoGAP .....	200
<b>Discussion et conclusion</b> .....		<b>205</b>
<i>Partie 1 – Mécanismes de régulation de p190RhoGAPs dans la cellule</i> .....		207
1.1.	Le PLS régule la localisation de la protéine.....	207
1.2.	Le PLS régule l'activité GAP de la protéine .....	209
1.3.	Structure tridimensionnelle de la protéine .....	212
<i>Partie 2 – Étude de p190RhoGAP dans le cancer de l'endomètre</i> .....		214
2.1.	Analyse de p190RhoGAP <i>in vitro</i> .....	214
2.2.	Étude de p190RhoGAP dans des échantillons de tumeurs.....	216
<b>Références bibliographiques</b> .....		<b>221</b>
<b>Annexes</b> .....		<b>251</b>
<i>Annexe 1 : Résultats de l'interactome de p190A (sauvage et mutée S866F)</i> .....		253
<i>Annexe 2 : Alignement des séquences protéiques de p190A (humain) et p190B (humain)</i> .....		254
<i>Annexe 3 : Alignement des séquences protéiques de p190A (rat) et p190B (humain)</i> .....		255
<i>Annexe 4 : Alignement des séquences protéiques de p190A (humain) et p190A (rat)</i> .....		256
<i>Annexe 5 : Matériels &amp; Méthodes</i> .....		257
<i>Annexe 6</i> .....		268



## Table des illustrations

Figure 1 : Caractéristiques des cellules cancéreuses.....	7
Figure 2 : Représentation schématique des étapes du développement tumoral.....	8
Figure 3 : Les principaux composants du cytosquelette. ....	14
Figure 4 : Structures d'actine dans une cellule eucaryote. ....	16
Figure 5 : Polymérisation ATP dépendante des filaments d'actine.....	18
Figure 6 : Comparaison des mécanismes de nucléation de l'actine.....	19
Figure 7 : Les protéines de liaison à l'actine (ABPs). ....	23
Figure 8 : La migration cellulaire nécessite la combinaison de diverses structures d'actine. .	29
Figure 9 : Différentes organisations des invadosomes. ....	31
Figure 10 : Composition moléculaire des invadosomes. ....	33
Figure 11 : Formation d'un anneau d'actine lors de la mitose.....	35
Figure 12 : Séquence et sites consensus des petites protéines G monomériques.....	42
Figure 13 : Changement de conformation des GTPases.....	43
Figure 14 : Cycle des membres de la superfamille Ras.....	44
Figure 15 : Arbre phylogénétique des membres de la superfamille Ras. ....	46
Figure 16 : Arbre phylogénétique des membres de la famille des RhoGTPases.....	51
Figure 17 : Les protéines RhoGEFs de la famille DOCK. ....	55
Figure 18 : Organisation multi-domaine des protéines RhoGEFs de la famille DBL. ....	57
Figure 19 : Spécificité des substrats des protéines RhoGEFs de la famille DBL. ....	58
Figure 20 : Organisation multi-domaine des protéines RhoGAPs. ....	61
Figure 21 : Spécificité des substrats des protéines RhoGAPs. ....	62
Figure 22 : Mécanisme d'hydrolyse du GTP par les protéines RhoGAPs. ....	62
Figure 23 : Interactome des RhoGDIs.....	66
Figure 24 : Interactions impliquées dans le complexe GTPase/RhoGDI. ....	67
Figure 25 : Régulation post-traductionnelle des GTPases Rho. ....	69
Figure 26 : Coordination entre les voies de signalisation de RhoA, Rac1 & Cdc42 dans le remodelage de l'actine. ....	72
Figure 27 : Répartition spatiale des RhoGTPases impliquées lors de la migration cellulaire. .	74
Figure 28 : Mécanismes croisés d'activation/inactivation de RhoA et Rac1 au cours de la migration cellulaire.....	77
Figure 29 : Répartition des RhoGTPases dans la cellule lors des évènements de migration et d'invasion cellulaires. ....	78
Figure 30 : Modèle de boucle de régulation dans la formation et la maturation des invadosomes. ....	82
Figure 31 : La signalisation des RhoGTPases dérégulée dans la tumorigenèse et la progression tumorale.....	86
Figure 32 : Les mutations du gène ARHGAP35 suggèrent un rôle suppresseur de tumeurs de p190A. ....	119
Figure 33 : Anatomie de l'appareil reproducteur féminin. ....	120
Figure 34 : Courbes de Kaplan-Meier de survie des patientes atteintes de carcinomes de l'endomètre. ....	123
Figure 35 : Les mutations du gène ARHGAP35 sont associées à un meilleur pronostic dans le cancer de l'endomètre. ....	124
Figure 36 : Modèle d'auto-inhibition de p190A. ....	127
Figure 37 : Hypothèses de départ concernant la régulation de la conformation de p190RhoGAPs.....	139



Figure 38 : L’extinction de la cortactine n’altère pas la localisation de p190A aux invadosomes. ....	165
Figure 39 : Les mutants S866F et $\Delta$ 865-870 se localisent toujours aux invadosomes. ....	166
Figure 40 : Le domaine PLS inhibe l’activité GAP de p190A in cellulo. ....	167
Figure 41 : Approche ciblée de recherche de partenaires protéiques pouvant moduler l’interaction PLS/Cter. ....	169
Figure 42 : Approche globale de recherche de partenaires protéiques pouvant moduler l’interaction entre les domaines PLS et Cter de p190A. ....	171
Figure 43 : Le domaine PLS de p190A interagit avec le domaine Cter2h de p190B. ....	173
Figure 44 : Les protéines endogènes p190A et p190B interagissent. ....	174
Figure 45 : Les protéines endogènes p190A et p190B se localisent aux rosettes. ....	175
Figure 46 : L’interaction intermoléculaire de p190A est renforcée par l’introduction de la mutation S866F. ....	176
Figure 47 : Interaction intermoléculaire renforcée par l’introduction de la mutation S866F. ....	178
Figure 48 : L’interaction intermoléculaire de p190A est possible via l’interaction des domaines PLS. ....	180
Figure 49 : Analyse de l’implication du domaine Nter dans l’interaction intermoléculaire. ....	182
Figure 50 : Analyse de l’implication du domaine Cter dans l’interaction intermoléculaire. ....	183
Figure 51 : L’interactome de p190A (WT et S866F) montre l’enrichissement de deux complexes pouvant réguler l’expression de p190A dans les cellules. ....	186
Figure 52 : p190A et Kif2A colocalisent au niveau de l’anneau de cytokinèse, en fin de mitose. ....	189
Figure 53 : Les lignées cellulaires de cancer de l’endomètre ont des expressions variables des p190RhoGAPs. ....	194
Figure 54 : Les lignées cellulaires provenant de carcinomes de l’endomètre n’ont pas de capacités invasives. ....	195
Figure 55 : L’extinction de p190A dans les lignées HEC-1-A et AN3Ca entraîne une diminution de la prolifération cellulaire. ....	197
Figure 56 : La quantité d’ARNm de p190A et p190B diminue significativement dans les échantillons tumoraux. ....	199
Figure 57 : L’expression protéique de p190RhoGAPs est corrélée positivement dans les échantillons d’endomètre. ....	201
Figure 58 : Proposition d’un modèle de régulation des protéines p190RhoGAPs. ....	210
Figure 59 : Prédiction de structure en 3 dimensions de p190A sauvage. ....	213
Figure 60 : La classification histologique des carcinomes de l’endomètre est liée avec la régulation du gène d’ARHGAP35. ....	218
Tableau 1 : Les jonctions cellulaires impliquant le cytosquelette d’actine. ....	28
Tableau 2 : Modifications post-traductionnelles régulant l’activité de p190RhoGAP. ....	118
Tableau 3 : Classification des carcinomes de l’endomètre. ....	122
Tableau 4 : Partenaires du domaine PLS identifiés lors d’un criblage double hybride. ....	138
Tableau 5 : Bilan des données concernant la régulation de p190RhoGAPs. ....	184
Tableau 6 : Liste des échantillons de tissus sains ou tumoraux d’endomètre. ....	198

# Liste des abréviations

## A

ABP	Actin-binding proteins
Actine F	Actine filamenteuse
Actine G	Actine globulaire
ADF-H	Actin depolymerization factor homology domain
ADN	Acide désoxyribonucléique
APC/C	Anaphase-promoting complex/cyclosome
ARAP	Arf-GAP with Rho-GAP domain, ANK repeat, and PH domain-containing protein
Arf	ADP ribosylation factors
Arg	Abl-related gene
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ARP2/3	Actin-related proteins 2/3
ATP	Adénosine triphosphosphate

## B

BAR	Bin/amphiphysin/Rvs
BioID	Proximity-dependent biotin identification
BRET	Bioluminescence resonance energy transfer

## C

Cbl	E3 ubiquitin ligase casitas B lymphoma
CD36	Cluster de différenciation 36
Cdc42	Cell Division Control protein 42 homolog
CNF1	Cytotoxic necrotizing factor 1
CNV	Copy number variation
CoIP	Co-immunoprécipitation
CRIB	Cdc42/Rac-interactive binding

## D

DBL	Diffuse B-cell lymphoma
DDR	Récepteur à domaine discoïdine
DH	DBL homology
DHR	DOCK homology region
DOCK	Dedicator of cytokinesis
DUB	Deubiquitinilating enzymes

## **E**

eiF	Facteurs d'initiation de la traduction
EIN	Néoplasie intra-épithéliale endométriale
ELMO	Engulfment and cell motility
EMT	Epithelial to mesenchymal transition
ERM	Ezrine, radixine et moésine
ERMAD	ERM association domains

## **F**

FGF	Fibroblast growth factor
FI	Filaments intermédiaires
FRET	Fluorescence resonance energy transfer

## **G**

GAP	GTPase-activating proteins
GBF1	Golgi brefeldin A resistant guanine nucleotide exchange factor 1
GDI	Guanine nucleotide dissociation inhibitor
GDP	Guanosine diphosphate
GEF	Guanine nucleotide exchange factors
GIT2	GRK-interacting protein 2
GLI	Glioma-associated homolog
GPCR	Récepteurs couplés aux protéines G
GRAF	GTPase regulator associated with focal adhesion kinase
GRLF1	Glucocorticoid receptor binding factor 1
GTP	Guanosine triphosphate
GTPase	Small guanosine triphosphatase

## **H**

HAUS	Homologous to augmin subunits
HBV	Virus de l'hépatite B
HCV	Virus de l'hépatite C
HGF	Hepatocyte growth factor
HPV	Papillomavirus humain
HS1	Hematopoietic-specific protein-1

## **I**

IHC	Immunohistochimie
ILK	Integrin linked kinase
INCa	Institut national du cancer
IP	Immunoprécipitation
IQGAP1	Ras GTPase-activating-like protein 1

## **J**

JMY Junction-mediating regulatory protein  
JNK C-Jun N-terminal kinase

## **K**

kDa KiloDalton  
KO Knock out  
KRAS Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog

## **L**

LARG Leukemia-Associated RhoGEF  
LIMK LIM domain Kinase

## **M**

MAPK Mitogen activated protein kinase  
mDia Mammalian diaphanous  
MEC Matrice extra-cellulaire  
MLCK Myosin light chain kinase  
MLCP Myosin light chain phosphatase  
MMP Métalloprotéases matricielles  
MSI Instabilité des microsatellites  
MTOC Centre d'organisation des microtubules  
mTOR Mammalian target of rapamycin

## **N**

NGF Nerve growth factor  
NO Monoxyde d'azote  
NOX NAPDH oxidases  
NPF Nucleation promoting factors

## **O**

OPHN1 Oligophrenin-1

## **P**

PAK p21-activated kinase  
PH Pleckstrin homology  
PI3K Phosphoinositide 3-kinase  
PIP Phosphatidylinositol phosphates  
PKA Protéine kinase A  
PKC Protéine kinase C  
PKG Protéine kinase G  
PLS Protrusion localization sequence  
POLE ADN polymérase  $\epsilon$   
PYK2 Pyruvate kinase

## **R**

Rab	Ras-like proteins in the brain
Rac1	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
Ran	Ras-like nuclear
Ras	Rat sarcoma
RCC1	Regulator of chromosome condensation 1
RE	Réticulum endoplasmique
Rerg	Ras-related and estrogen-regulated growth inhibitor
Rho	Ras homologous
Rnd	Round
ROCK	Rho-associated protein kinase
ROS	Espèces réactives de l'oxygène

## **S**

SARA	Smad anchor for receptor activation
ScAR	Suppressor of cAR
siRNA	ARN interférent
SMA ( $\alpha$ )	Smooth muscle actin ( $\alpha$ )
SOS	Son of sevenless
SRF	Serum response factor
SUMO	Small ubiquitin-like modifier

## **T**

TCGA	The cancer genome atlas
TP53	Tumor protein 53

## **U**

UPS	Ubiquitin-proteasome system
UV	Ultraviolet

## **V**

VEGF	Vascular endothelial growth factor
------	------------------------------------

## **W**

WASH	WASP/Scar homolog
WASP	Wiskott–Aldrich syndrome protein
WAVE	WASP-family verprolin homologous protein
WH1	WASP homology 1
WH2	WASP homology 2
WHAMM	WASP homolog associated with actin, membranes and microtubules
WIP	WASP interacting proteins
WT	Wild type

**Y**

YFP      Yellow fluorescent protein

**Z**

ZO      Zonula Occludens



# Introduction générale





# Avant-propos



En France, selon les informations données par l'INCa (Institut National du Cancer), depuis plus de 30 ans, le nombre annuel de nouveaux cas de cancer augmente allant jusqu'à 380 000 nouveaux cas diagnostiqués en 2018. L'incidence est variable selon le type de cancer mais les plus fréquents sont le cancer de la prostate chez l'homme et le cancer du sein chez la femme. Depuis le début des années 2000, le cancer est devenu la première cause de mort prématurée, devançant les morts violentes et les pathologies cardio-vasculaires.

Cependant, avec l'amélioration de la prise en charge et du diagnostic et l'apparition de nouveaux traitements, la mortalité par cancer diminue année après année. En effet, un cancer diagnostiqué à un stade précoce et traité rapidement aura de meilleures chances de disparaître. Les campagnes de dépistage, notamment pour les cancers du sein, colorectaux et du col de l'utérus, permettent de détecter plus précocement ces cancers. Si 60% des cancers sont jugés inévitables, 40% des cas sont évitables, c'est pour cette raison que des campagnes de prévention de facteurs de risques sont réalisées. Les principaux facteurs de risques de développer un cancer sont la consommation d'alcool (plus d'une unité par jour) et de tabac, les mauvaises habitudes alimentaires (manger « trop gras, trop salé, trop sucré ») et la sédentarité. Une bactérie comme *Helicobacter pylori* (cancer de l'estomac), des virus comme le papillomavirus humain (HPV - cancer du corps de l'utérus), les virus des hépatites B et C (HBV et HCV - cancer du foie) sont des exemples d'agents infectieux capables de provoquer ou de permettre le développement d'un cancer. Des expositions environnementales sont à l'origine de cancers à l'instar des rayonnements UV (ultraviolet), des particules fines de diesel ou encore de l'utilisation de certains produits chimiques ou insecticides. Enfin, l'âge et l'hérédité peuvent également engendrer des prédispositions au développement de cancers.

Ces deux dernières années marquées par la pandémie causée par le coronavirus ont permis de mettre en évidence l'importance de la recherche, notamment la recherche fondamentale, avec l'exemple des vaccins à ARNm (acide ribonucléique messager) utilisés pour la première fois pour lutter contre la propagation du COVID-19 mais découverts (et testés chez la souris) dès le début des années 1990.

De ce fait, la recherche, notamment la recherche contre le cancer, est primordiale de façon à proposer de nouveaux moyens pour accélérer et améliorer le diagnostic et le traitement de ces patients. La compréhension des mutations affectant l'ADN (acide désoxyribonucléique) dans nos cellules, des modifications des protéines ainsi que des mécanismes cellulaires engendrés permettent de trouver de nouvelles cibles thérapeutiques. Ces cibles, parfois déjà connues pour une autre pathologie, peuvent alors être modulées de façon à influencer le devenir des cellules.

## Qu'est-ce que le cancer ?

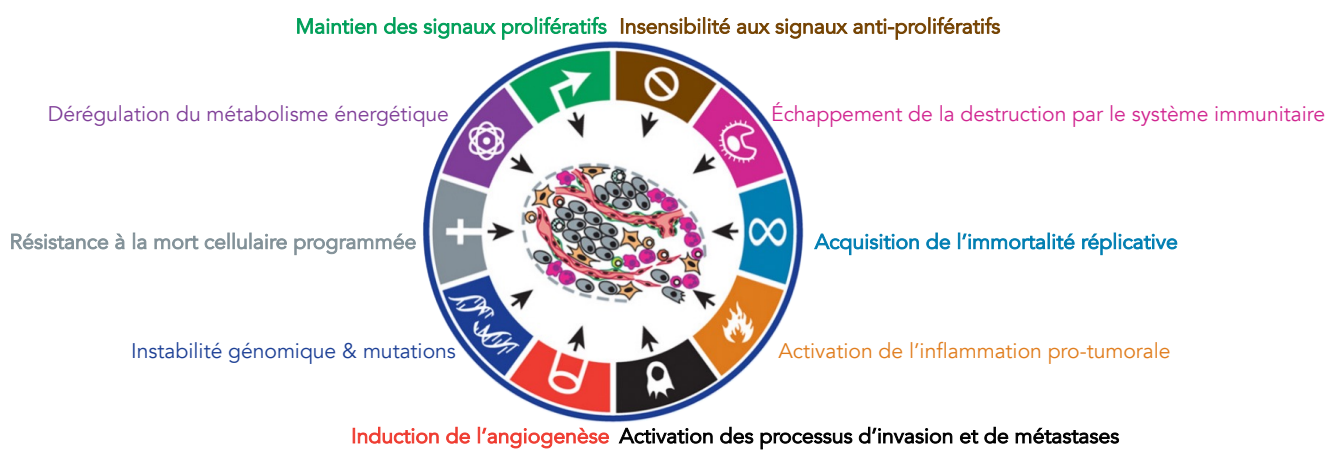
Le cancer est une pathologie résultant de la transformation progressive de cellules saines en cellules anormales qui est causée par une succession de modifications génétiques.

Ces mutations peuvent être dites « gain de fonction » en favorisant l'expression ou l'hyper-activation de protéines oncogéniques comme la petite GTPase K-Ras (Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog), mutée dans 95% des cancers du pancréas (Waddell et al. 2015). K-Ras est l'une des 4 isoformes de la protéine Ras qui va activer les voies de signalisation en aval comme la voie MAPK (mitogen activated protein kinase) par exemple, voie impliquée dans la prolifération cellulaire via l'activation de la transcription de nombreux gènes nécessaires à l'initiation du cycle cellulaire (P. J. Roberts and Der 2007).

À l'inverse, des mutations peuvent être dites « perte de fonction » *via* l'inactivation de suppresseurs de tumeurs comme le facteur de transcription p53 qui est inactivé dans près de 50% des tumeurs (Kasthuber and Lowe 2017). *TP53* (tumor protein 53) est le gène codant pour p53 dont le rôle est de se lier à l'ADN et de réguler l'expression de gènes contrôlant le cycle cellulaire. Lorsqu'une cellule est endommagée, p53 induit un blocage du cycle cellulaire de façon à réparer le dommage ou bien initier l'apoptose de la cellule, si le dommage est trop important.

La transformation maligne des cellules tumorales est accompagnée d'une prolifération anarchique de ces cellules qui échappent ainsi aux mécanismes de régulation contrôlés par l'organisme : le maintien des signaux en faveur de la prolifération, la perte de sensibilité vis-à-vis des signaux anti-prolifératifs, la capacité de prolifération cellulaire illimitée ainsi que

l'échappement de la cellule à la mort cellulaire programmée (apoptose). L'induction de l'angiogenèse et des processus d'invasion sont également représentatifs de la cellule cancéreuse et sont décrits ci-dessous. Ces différentes caractéristiques, appelées « Hallmarks of Cancer », ont été définies par Hanahan et Weinberg comme nécessaires au développement tumoral (**Figure 1**) (Hanahan and Weinberg 2000). Plus récemment, se sont ajoutés à ces critères protumorigéniques : l'instabilité génomique, la reprogrammation métabolique, l'activation de signaux pro-inflammatoires ainsi que l'échappement immunitaire (**Figure 1**) (Hanahan and Weinberg 2011).

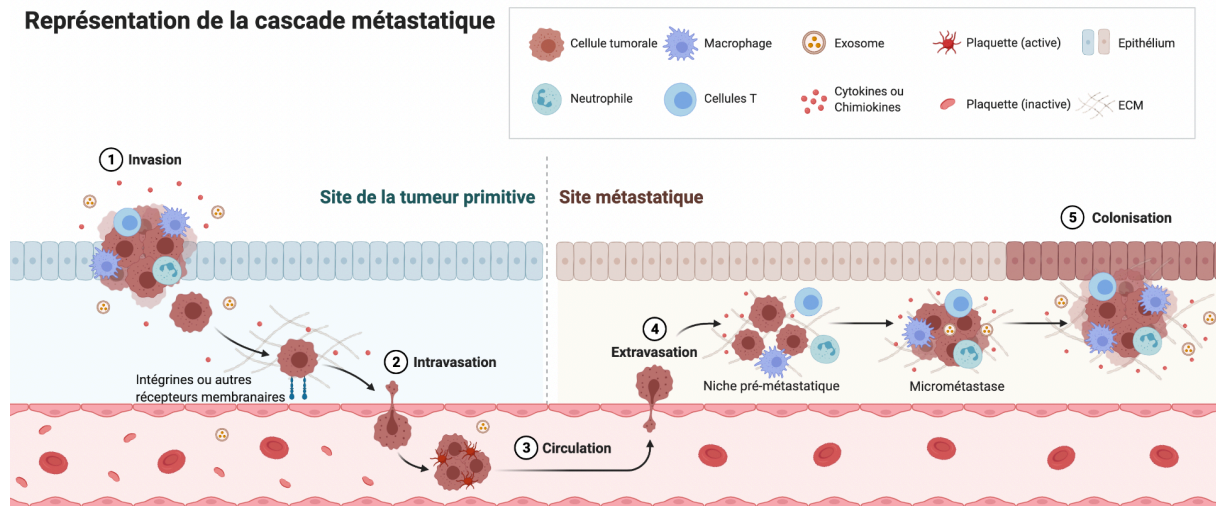


**Figure 1 : Caractéristiques des cellules cancéreuses.**

Représentation sous forme de diagramme des 10 caractéristiques du cancer : « Hallmarks of cancer ». Adapté de Hanahan et Weinberg 2000 & Hanahan et Weinberg 2011.

Associées à d'autres stimuli extracellulaires, certaines mutations acquises au cours de la tumorigenèse confèrent à la cellule des propriétés invasives. Les cellules devenues tumorales envahissent alors la matrice extracellulaire (MEC), les tissus et se disséminent dans l'organisme afin de former des métastases à distance (**Figure 2**). Le développement de métastases est la cause d'environ 90% de la mortalité par cancer.

## Représentation de la cascade métastatique



**Figure 2 : Représentation schématique des étapes du développement tumoral.**

- (1) La tumeur primitive, via le phénomène d'EMT, va acquérir des propriétés d'invasion de la MEC des tissus avoisinants.
  - (2) L'étape d'intravasation consiste au franchissement d'une première barrière endothéliale de façon à rejoindre la circulation sanguine.
  - (3) Au cours de cette étape, les cellules tumorales vont migrer à travers les vaisseaux sanguins et ainsi se disséminer dans l'organisme.
  - (4) L'étape d'extravasation consiste au passage d'une 2<sup>ème</sup> barrière endothéliale afin de sortir de la circulation sanguine.
  - (5) Les cellules dans la MEC vont former par étape la niche pré-métastatique puis une micrométastase avant de coloniser un tissu distinct de celui de la tumeur primitive, on parle alors de métastase.
- Figure réalisée avec BioRender.

## Activation des processus d'invasion et de métastases

La MEC est un réseau complexe, organisé qui remplit l'espace entre les cellules et les relie. Bien que principalement constituée par une fraction soluble (eau et molécules solubles), la MEC comprend également des polysaccharides (protéoglycanes, glycosaminoglycanes), des protéines fibreuses (comme les collagènes ou l'élastine) et des protéines d'adhérence (fibronectine, laminine) capables d'activer, *via* des récepteurs transmembranaires, des cascades de signalisation intracellulaire (Sala, Ros, and Saltel 2020). Enfin, la MEC est composée de protéines membranaires ou sécrétées, ayant une activité enzymatique de dégradation des protéines de la matrice. Ces protéases sont particulièrement impliquées lors des phénomènes de migration et d'invasion des cellules cancéreuses (Pickup, Mouw, and Weaver 2014).

La première phase de la cascade métastatique correspond au phénomène de transformation épithélio-mésenchymateuse ou EMT (Epithelial to Mesenchymal Transition) qui se caractérise par la perte d'adhésion cellulaire, l'augmentation de la motilité cellulaire et l'expression/activation de protéases spécifiques entraînant l'invasion par dégradation de la matrice environnante. Les cellules subissent un changement de phénotype pour passer de cellules épithéliales à cellules mésenchymateuses et acquérir une résistance à l'apoptose, des capacités migratoires et invasives et entraîner un remodelage de la MEC. Ce changement phénotypique est progressif et consiste en la perte de marqueurs épithéliaux (les protéines E-cadhérine, occludine, claudine ou encore ZO-1) combinée avec l'expression de marqueurs mésenchymateux (les facteurs de transcription Snail, Slug, Twist et les protéines N-cadhérine, vimentine,  $\alpha$ -SMA) (Gonzalez and Medici 2014 ; Krebs et al. 2017 ; Yang et al. 2004). Ceci entraîne une inversion de la polarité apico-basale et la perte de la cohésion cellulaire via le désassemblage des jonctions intercellulaires.

Les cellules ayant acquis un caractère mésenchymateux vont se détacher de la tumeur primitive puis migrer et franchir une première barrière endothéliale au cours de l'intravasation. Lors de cette étape, les cellules tumorales rejoignent les circulations sanguine ou lymphatique grâce auxquelles les cellules cancéreuses pourront ainsi se disséminer dans l'ensemble de l'organisme.

Lors de l'étape d'extravasation, les cellules se retrouvent dans la MEC, colonisent un nouveau tissu ou organe distinct de celui de la tumeur primaire et forment ainsi une métastase en cas de prolifération (**Figure 2**). Après extravasation, les cellules peuvent subir un blocage dans le cycle cellulaire en phase G0 et entrer en dormance. Les cellules sont alors indétectables et peuvent réactiver leur cycle cellulaire des années plus tard (Páez et al. 2012).

L'ensemble de ce processus implique des capacités de prolifération, de migration et d'invasion des cellules tumorales notamment. Au sein de la cellule, ces différentes fonctions sont régies par le cytosquelette.





# Chapitre 1

-

## Le cytosquelette d'actine

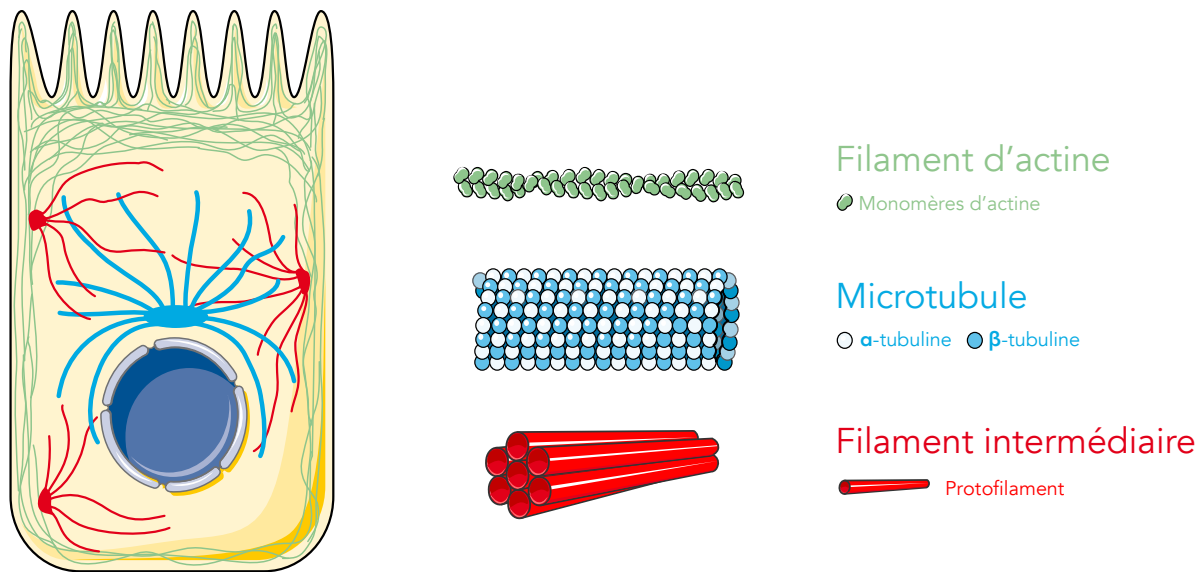


# 1. Le squelette de la cellule

Notre corps est composé d'une multitude d'organes et de tissus les entourant. Les organes sont eux-mêmes constitués de différents tissus qui correspondent à un ensemble de cellules ayant une même fonction. Les cellules sont les plus petites entités vivantes de notre organisme capables de se reproduire en autonomie.

Chaque cellule est constituée d'une membrane plasmique renfermant un milieu intracellulaire appelé cytoplasme où se retrouvent des acides nucléiques et des protéines compartimentés en organites. L'organite le plus volumineux de la cellule est le noyau, protégé par une membrane nucléaire. Le noyau contient notre information génétique située dans les chromosomes (en nombre de 46 soit 23 paires chez l'Homme) qui sont des structures composées de l'ADN et de protéines, les histones, organisées en fibre de chromatine repliées. Un réseau de filaments est présent dans toute la cellule, le cytosquelette, lui conférant principalement son ossature mais également de nombreuses fonctions, dès le développement embryonnaire avec la division cellulaire et la mise en place progressive des organes (Booth et al. 2014).

Le cytosquelette est composé des trois types de polymères : les filaments d'actine, les microtubules et les filaments intermédiaires (FIs), qui se répartissent différemment dans la cellule et qui confèrent des propriétés distinctes (**Figure 3**). En plus de donner sa forme à la cellule, le cytosquelette assure la motilité cellulaire et des fonctions de transport des composés intracellulaires mais aussi de transport de la cellule dans son microenvironnement. De par ses fonctionnalités, une dérégulation du cytosquelette ou des protéines associées résulte en l'apparition de nombreuses pathologies, comme par exemple des myopathies, des neurodégénérescences ou encore le cancer (Pollard 2003).



**Figure 3 : Les principaux composants du cytosquelette.**

Les filaments d'actine (vert), les microtubules (bleu) et les filaments intermédiaires (rouge) constituent le cytosquelette conférant sa morphologie et une partie de ses propriétés mécaniques et fonctionnelles à la cellule.

Figure réalisée avec Servier Medical Art.

## 1.1. Les microtubules

Les microtubules sont des filaments de 24 nm de diamètre, résultant de l'assemblage de monomères d' $\alpha$ -tubuline et de  $\beta$ -tubuline en hétéro-dimères et de leur polymérisation de façon à former des filaments. Ces filaments sont polarisés avec une extrémité négative (-), plutôt instable mais stabilisée par MTOC (centre d'organisation des microtubules), au centre de la cellule. L'extrémité positive (+) en périphérie, très dynamique où la polymérisation et la dépolymérisation sont rapides (Bodakuntla et al. 2019).

Dans la cellule, ces filaments sont présents soit isolés, soit en réseau. Les microtubules isolés, de plus petite taille, sont notamment retrouvés dans les cils et les flagelles permettant à la cellule de se déplacer ou de déplacer le milieu environnant.

Les microtubules s'étendent à partir du centrosome dans la quasi-totalité du cytoplasme pour participer à différentes fonctions (transport intracellulaire, migration cellulaire ou guidance axonale par exemple). La localisation du centrosome, à proximité du noyau, lui confère un rôle primordial au cours de la mitose et plus particulièrement lors de la division cellulaire en intervenant au niveau des microtubules du fuseau mitotique. Une

altération de la localisation du centrosome modifie la dynamique des microtubules et donc l'alignement des chromosomes et la séparation du matériel génétique entre les deux cellules filles (Gemble et al. 2019).

## 1.2. Les filaments intermédiaires

Les FIs, dont le diamètre est estimé à 10 nm, présentent une structure hélicoïdale qui leur confère de l'élasticité pour participer à la dynamique du cytosquelette en intégrant les forces mécaniques produites par les microtubules et les filaments d'actine. Ces filaments se localisent notamment au niveau périnucléaire où ils régulent la taille, la forme ou encore la position du noyau.

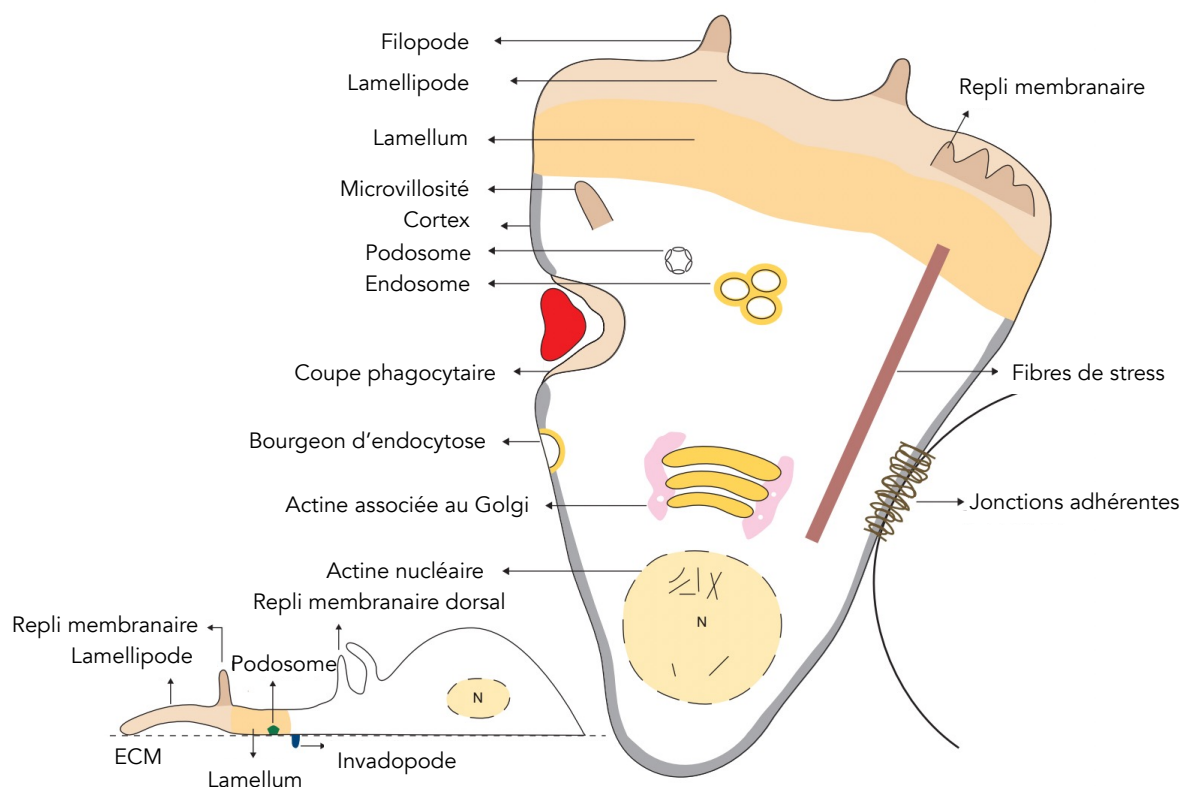
Par leur localisation sous-membranaire, les FIs participent au maintien de l'intégrité tissulaire en interagissant avec des structures d'adhésion comme les desmosomes et les hémidesmosomes (permettant les jonctions cellule-cellule et jonctions cellule-matrice respectivement). Les FIs cytoplasmiques sont classés en trois catégories selon le type de cellules : la vimentine et protéines apparentées dans les fibroblastes, les cellules gliales ou les cellules musculaires ; les cytokératines dans les cellules épithéliales et les neuro-filaments dans les neurones (Etienne-Manneville 2018). Les FIs sont également retrouvés au sein du noyau où ils forment un réseau grillagé de lamines intervenant lors de la transcription mais aussi nécessaire au contrôle de la rigidité du noyau lors de la migration cellulaire (Harada et al. 2014).

## 1.3. Les microfilaments d'actine

L'actine est l'une des protéines les plus conservées et abondantes chez les eucaryotes, après le collagène et l'hémoglobine. Il s'agit donc de la plus abondante protéine du cytosquelette (Pollard 2017). L'actine est présente sous deux formes dans la cellule : l'actine monomérique globulaire (ou actine G) et l'actine filamenteuse (ou actine F). Un cycle continu se réalise entre ces deux états de l'actine ce qui en fait des structures très dynamiques. L'actine F est formée par la polymérisation dépendante de l'ATP et réversible de monomères

d'actine G dont la structure est hélicoïdale et polarisée. À l'extrémité (-), la polymérisation est lente et la dépolymérisation est possible alors qu'à l'extrémité (+) se produit une polymérisation rapide (Dominguez and Holmes 2011).

Les filaments d'actine, dont le diamètre est d'environ 8 nm, s'organisent en de multiples structures, comme l'anneau contractile de cytokinèse, les filopodes ou encore les microvillosités, les lamellipodes et les fibres de stress par exemple. Ces structures ont des fonctionnalités variées au sein de la cellule (**Figure 4**) (Chhabra and Higgs 2007). Bien que la plupart de ces fonctions nécessitent une localisation cytoplasmique, depuis plusieurs années, la présence d'actine nucléaire a été étudiée lui conférant un rôle dans l'activation de la transcription, la progression du cycle cellulaire mais aussi dans la réparation des dommages à l'ADN (Kelsch and Tootle 2018 ; Venit et al. 2020 ; Schrank et al. 2018).



**Figure 4 : Structures d'actine dans une cellule eucaryote.**

Représentation schématique de la variété de structures d'actine pouvant se trouver dans une cellule en vue dorsale et en vue latérale.

Adapté de Chhabra et Higgs 2007.

## 2. Protéines associées au cytosquelette d'actine

Chez les eucaryotes pluricellulaires, il existe 6 isoformes d'actine codés par 6 gènes différents. Ces 6 isoformes sont classés en 3 groupes :  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ . Deux isoformes sont exprimées de façon ubiquitaire dans les cellules non musculaires (actine  $\beta$  et actine  $\gamma_1$ ) et 4 sont spécifiques des cellules musculaires (actine  $\alpha_1$  dans le muscle squelettique ; actine  $\alpha_2$  et actine  $\gamma_2$  dans le muscle lisse ; actine  $\alpha_C$  dans le muscle cardiaque) (Pollard 2016). En revanche, de nombreuses protéines sont nécessaires à l'assemblage et au fonctionnement des filaments d'actine, ce sont les protéines associées à l'actine ou ABPs (Actin-Binding Proteins).

### 2.1. La polymérisation de l'actine

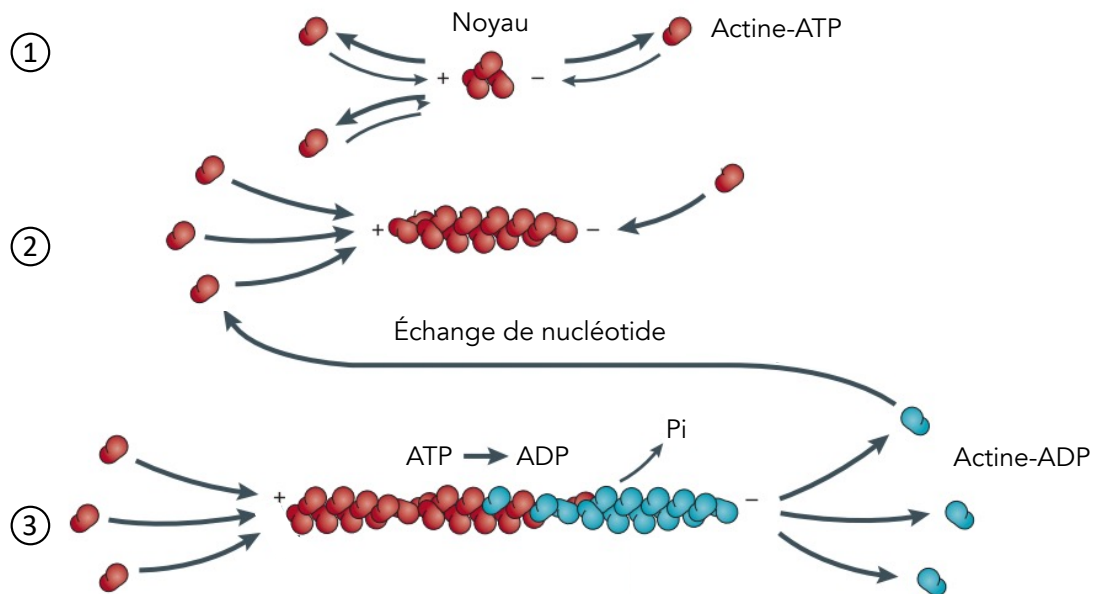
L'actine est une molécule dynamique, dynamisme acquis par un cycle de polymérisation/dépolymérisation. En effet, l'actine G et l'actine F cyclent au sein de la cellule. La polymérisation est dépendante de la fixation de l'ATP aux monomères d'actine G libres et entraîne ainsi une polymérisation spontanée afin de former les filaments d'actine F (Nürnberg, Kitzing, and Grosse 2011). Ce phénomène comprend trois étapes : une phase de nucléation, une phase d'élongation puis une phase d'équilibre (**Figure 5**).

Au cours de la phase de nucléation, les monomères d'actine G, liés à une molécule d'ATP, forment un « noyau » de 2 ou 3 monomères d'actine G. Cette étape est, d'un point de vue thermodynamique, très défavorable et lente. La phase d'élongation correspond à l'assemblage de ces noyaux en filaments, cette étape est plus rapide. Au cours de cette étape, les monomères d'actine vont s'ajouter au niveau de l'extrémité (+). Lorsque le monomère, lié à l'ATP, est ajouté, l'ATP est hydrolysée en ADP et l'actine subit un changement conformationnel.

Enfin, lorsque les filaments d'actine sont polarisés, la phase d'équilibre est atteinte, on parle de phénomène de « tread-milling » en référence au tapis roulant (Wegner 1982). En effet, le filament se trouve dans un état où l'extrémité (+) ou barbée (« barbed-end ») est constituée de monomères d'actine liés à de l'ATP et à l'extrémité (-) pointue (« pointed-



end »), les monomères d'actine liés à l'ADP sont déstabilisés et le filament se dépolymérise. L'équilibre association-dissociation est alors atteint et la longueur du filament d'actine sera constante.



**Figure 5 : Polymérisation ATP dépendante des filaments d'actine.**

La polymérisation de l'actine se déroule en trois étapes.

(1) Les monomères d'actine liés à l'ATP (rouge) constituent un noyau d'actine lors de la nucléation.

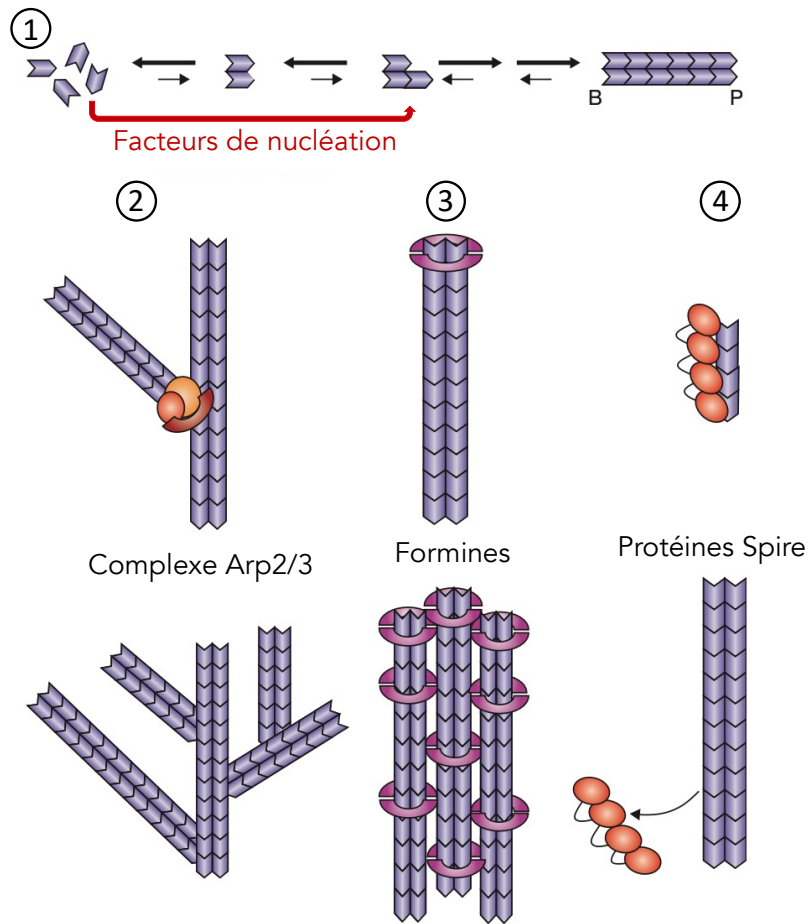
(2) Au cours de l'élongation, le filament d'actine s'allonge et se polarise.

(3) Après l'hydrolyse de l'ATP en ADP, la phase d'équilibre est atteinte. La polymérisation se fait à l'extrémité (+), l'actine est liée à l'ATP alors qu'à l'extrémité (-), les monomères d'actine liés à l'ADP (bleu) se dissocient.

Adapté de Nürnberg, Kitzing, et Grosse 2011.

## 2.2. Protéines de nucléation

La nucléation de l'actine est stimulée par des signaux extracellulaires ou par des cascades de signalisation intracellulaires (Papalazarou and Machesky 2021). Les principaux nucléateurs sont le complexe Arp2/3, les formines et les protéines Spire (**Figure 6**) (Pollard 2016) (Hohmann and Dehghani 2019). La nucléation de l'actine est une étape lente et thermodynamiquement peu favorable qui nécessite des facteurs supplémentaires, les NPFs (Nucleation Promoting Factors) afin d'accélérer cette étape.



**Figure 6 : Comparaison des mécanismes de nucléation de l'actine.**

Trois familles de protéines régulent la nucléation des monomères d'actine (violet).

(1) Nucléation spontanée des monomères d'actine en dimère ou trimère, phénomène instable nécessitant des facteurs de nucléation. Les filaments sont polarisés avec une extrémité barbée (B) et une extrémité pointue (P).

(2) Le complexe Arp2/3 mime les « noyaux » d'actine et forme un réseau d'actine branchée.

(3) Les dimères de formines stabilisent les monomères d'actine en les dimérisant et forment un réseau de filaments parallèles.

(4) Les protéines Spire recrutent 4 monomères d'actine et allongent le filament d'actine.

Adapté de Chhabra et Higgs 2007.

Comme nous le verrons dans le chapitre 2, les RhoGTPases Rho, Rac et Cdc42 agissent en amont de ces principaux régulateurs de la nucléation de l'actine et, par ce biais, régissent ainsi toute l'organisation du cytosquelette d'actine.

### 2.2.1. Le complexe Arp2/3

La première famille de protéines impliquées dans l'accélération du processus de nucléation de l'actine est le complexe Arp2/3 qui comprend 5 protéines ARPC (ARPC1-5) ainsi que les protéines Arp2 et Arp3. Le complexe Arp2/3 se lie à un filament d'actine « mère » afin d'initier la polymérisation d'un nouveau filament « fille » en formant un angle de 70° entre ces deux filaments (**Figure 6**). La répétition de ces branchements forme un réseau de filaments d'actine dit branché. A l'extrémité (+) du filament d'actine, le complexe allonge le filament en mimant un noyau d'actine tandis qu'il reste associé à l'extrémité (-) du filament (Fujiwara et al. 2002).

De ce fait, le complexe Arp2/3 permet de structurer, d'organiser les filaments d'actine en une structure précise. Cependant son activité de nucléation n'est pas efficace s'il agit seul, le complexe doit être activé par l'un des facteurs favorisant la nucléation, les NPFs qui sont classés en deux familles (Blanchoin et al. 2014).

#### 2.2.1.1. NPFs de classe I

La superfamille des protéines WASP est composée de 8 membres : WASP et N-WASP ; WAVE1, WAVE2 et WAVE3 (WASP-family verprolin homolog) ; WASH (WASP/Scar homolog) ; WHAMM (WASP Homolog associated with Actin, Membranes and Microtubules) et JMY (Junction-Mediating regulatorY protein).

En N-terminal, les protéines WASP et N-WASP possèdent un domaine WH1 (Wasp Homology 1) de liaison aux protéines WIP (WASP Interacting Proteins) de façon à stabiliser les protéines. Ces deux protéines ont également un domaine de liaison aux RhoGTPases (présentées dans le chapitre 2), le domaine CRIB (Cdc42/Rac-Interactive Binding).

En C-terminal, l'ensemble de ces protéines contient un domaine WA (W pour motif WH2 et A pour région Acide) entraînant l'activation de la nucléation et la formation d'un réseau d'actine branchée. Ce domaine comprend un ou plusieurs motifs WH2 (Wasp Homology 2) lui permettant de lier les monomères d'actine : un domaine A capable de lier l'extrémité (+) du filament et un motif de liaison au complexe Arp2/3.

Les fonctions cellulaires associées aux NPFs de classe I sont multiples et dépendent de la localisation des protéines. En effet, les protéines WAVEs et JMY participent à la polymérisation de l'actine lors de la formation du lamellipode en activant le complexe Arp2/3. Au cours de l'endocytose, la protéine N-WASP est impliquée alors que les protéines WASP et WAVE2 le sont lors de la phagocytose. Les NPFs participent au trafic intracellulaire comme WASH (endosome) N-WASP (vésicules) ou WHAMM (transport RE-Golgi). De plus, des agents pathogènes comme les bactéries *Salmonella*, *Listeria* ou *Escherichia Coli* peuvent induire un remodelage du cytosquelette d'actine *via* N-WASP, WAVE1, WAVE2 et WASH (Rottner, Hänisch, and Campellone 2010 ; Campellone and Welch 2010).

#### 2.2.1.2. NPFs de classe II

La cortactine est le principal membre des NPFs de classe II accompagnée de HS1 (Hematopoietic-Specific protein-1) qui est son homologue présent dans les cellules leucocytaires. Ces protéines ne possèdent pas de motifs WH2 donc n'interagissent pas avec les monomères d'actine.

Cependant, elles peuvent recruter le complexe Arp2/3 et réguler la polymérisation de l'actine au niveau de l'actine corticale. De la même manière, les NPFs de classe II agissent au niveau des structures d'actine que sont les lamellipodes et les invadosomes, et au niveau de la synapse immune, pour, respectivement, la cortactine et HS1 (Campellone and Welch 2010 ; Markwell et al. 2019 ; Bryce et al. 2005).

#### 2.2.2. Les formines

Une deuxième famille de nucléateurs de l'actine a été découverte, la famille des formines, qui est composée de 15 isoformes chez les mammifères. Contrairement au complexe Arp2/3, ces protéines possèdent plusieurs domaines et forment un réseau, non branché, de filaments d'actine disposés parallèlement. Ces protéines dimérisent *via* deux domaines FH2 (Formin Homology 2) qui interagissent avec l'extrémité barbée du filament d'actine (**Figure 6**) (Campellone and Welch 2010).

Un autre domaine d'interaction à l'actine est présent pour toutes les formines, le domaine FH1 (Formin Homology 1). Le domaine FH1 est riche en prolines et permet la liaison de la profiline ce qui va accélérer l'élongation en fixant les monomères d'actine liés à l'ATP.

En se fixant au filament d'actine, les formines conduisent à l'élongation du filament en protégeant l'accès de l'extrémité barbée aux protéines de coiffage (Romero et al. 2004).

### 2.2.3. Les autres nucléateurs

La troisième famille de nucléateurs de l'actine regroupe les protéines Spire, Cordon Bleu et les Léiomodines. Le point commun de ces protéines est la présence de motifs WH2 qui leur confèrent leur activité nucléatrice, chaque domaine étant capable de fixer un monomère d'actine (Chhabra and Higgs 2007). Pour cette famille, comme pour les formines, les filaments d'actine formés ne sont pas branchés (**Figure 6**) (A. O. Bradley et al. 2020 ; Campellone and Welch 2010).

Les protéines Spire 1 et 2 possèdent 4 domaines WH2 et peuvent donc fixer et stabiliser un tétramère d'actine G. Les protéines Spire se dissocient du filament rapidement après la nucléation. Ces protéines ont un rôle dans le transport entre l'appareil de Golgi et la membrane plasmique et peuvent médier une interaction entre les filaments d'actine et les microtubules.

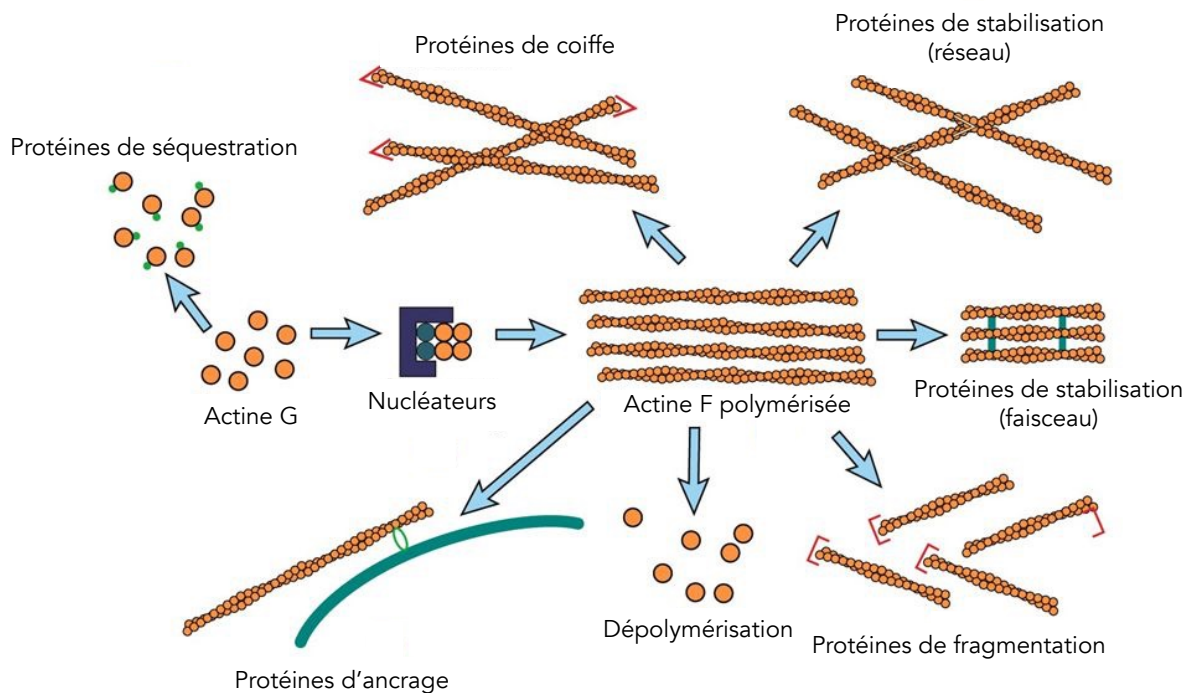
La protéine Cordon Bleu présente 3 domaines WH2, pouvant chacun fixer un monomère d'actine, et agit sur la polymérisation de l'actine au niveau des axones et dendrites dans les neurones hippocampiques (Husson et al. 2011).

Enfin, les Léiomodines 1, 2 et 3 jouent leur rôle de nucléateur de l'actine dans les cellules musculaires squelettiques par la présence d'un domaine WH2 qui interagit avec la tropomoduline (Chereau et al. 2008).

## 2.3. Autres protéines régulant la polymérisation

Après l'initiation de la polymérisation grâce aux différents nucléateurs de l'actine, les ABPs régulent la polymérisation des filaments d'actine et leur organisation en les assemblant, les coiffant, en les fragmentant ou les stabilisant (**Figure 7**). Certaines ABPs ont également un rôle dans l'ancrage de l'actine, notamment à la membrane plasmique de la cellule. Au niveau des cellules musculaires, la myosine confère des capacités motrices par glissement sur les

filaments d'actine. Les principales ABPs sont présentées ci-dessous et les fonctions associées à ces protéines seront décrites (dos Remedios et al. 2003).



**Figure 7 : Les protéines de liaison à l'actine (ABPs).**

L'actine (sous forme monomérique ou filamenteuse) interagit avec de nombreuses protéines, les ABPs. Ces protéines ont différents rôles comme la séquestration de l'actine G, sa polymérisation. Elles peuvent favoriser la dépolymérisation spontanée ou la fragmentation des filaments et à l'inverse, la prévenir de ces phénomènes par stabilisation ou par coiffage de ces extrémités. Enfin, certaines ABPs permettent un ancrage entre cellules ou à la MEC.

Adapté de SlideToDoc.com.

### 2.3.1. Les protéines de coiffe

En se fixant aux deux extrémités des filaments d'actine, les protéines de coiffe ralentissent le processus de polymérisation/dépolymérisation. Sans ces protéines, une dizaine de secondes suffisent à l'épuisement du stock d'actine G (De La Cruz et al. 2000). Afin de maintenir un pool constant de monomères d'actine, ces protéines bloquent l'ajout ou la perte des monomères par un encombrement stérique autour du filament d'actine.

La tropomoduline bloque la dépolymérisation en se fixant à l'extrémité pointue autour de trois monomères d'actine contrairement à la protéine CapZ qui se lie à l'extrémité barbée (Lewis et al. 2014 ; Y. Bao et al. 2012).

### 2.3.2. Les protéines de séquestration

Dans le but de contrôler l'équilibre entre polymérisation et dépolymérisation, les protéines de séquestration limitent la polymérisation en se fixant aux monomères d'actine les empêchant ainsi de s'intégrer au filament d'actine. Ces protéines permettent de constituer un pool d'actine G utilisable pour la polymérisation de nouveaux filaments.

La profiline va activer l'échange de nucléotides ADP-ATP au niveau des monomères d'actine. Au niveau de son interaction à l'actine, la profiline est en compétition avec une autre protéine de séquestration, la thymosine  $\beta 4$  qui, à l'inverse, se fixe préférentiellement aux monomères d'actine liés à l'ATP (Xue et al. 2014).

### 2.3.3. Les protéines de fragmentation

Afin d'assurer une concentration constante d'actine G disponible pour la polymérisation des filaments, une fragmentation des filaments déjà formés s'opère. Au niveau de l'extrémité barbée du filament, des protéines comme la famille des ADF-H (Actin Depolymerization Factor Homology domain) ou la gelsoline bloquent la polymérisation et favorisent la dépolymérisation.

Le membre fondateur des ADF-H est ADF/cofiline qui engendre un détachement des branchements d'actine au niveau du complexe Arp2/3 (Wioland et al. 2017). La twinfiline est un autre membre de la famille des ADF-H. En fixant l'actine G et l'empêchant de se fixer au filament, la twinfiline bloque la polymérisation (Johnston et al. 2018). De façon calcium-dépendante, la gelsoline va fragmenter les filaments en coiffant l'extrémité (+). En effet, la gelsoline peut agir en coopération avec la myosine capable de courber un filament d'actine par ses deux extrémités jusqu'à la rupture (Vemula et al. 2021).

## 2.4. Autres protéines de liaison à l'actine

### 2.4.1. Les protéines de stabilisation

L'organisation des filaments d'actine est finement régulée et conditionne les propriétés notamment mécaniques des structures mises en place comme les lamellipodes ou les invadosomes. Les protéines de stabilisation ou de pontage sont impliquées dans la stabilisation des filaments d'actine sous forme de réseaux de maillage.

L'actine s'organise également sous forme de faisceaux, plus ou moins serrés, pouvant être parallèles (faisceaux serrés) ou antiparallèles (faisceaux larges). La fascine, la villine et la fimbrine permettent la formation de faisceaux parallèles qui n'ont pas de propriétés contractiles. Ces protéines sont présentes en majorité au niveau des structures d'actine telles que les filopodes (fascine et fimbrine), les invadosomes (fascine) ou encore au niveau des microvillosités (villine) (Blanchoin et al. 2014). La filamine permet la formation d'un réseau de mailles en croisant deux filaments d'actine (Winder and Ayscough 2005).

A l'inverse, les faisceaux antiparallèles sont doués d'une propriété contractile. Dans les cellules musculaires, la dystrophine organise les filaments d'actine en sous-membranaire afin de lier le cytosquelette d'actine à la lame basale ce qui participe à la solidité et la résistance du tissu musculaire. Un déficit de cette protéine, causé par une altération génétique, est à l'origine la dystrophie musculaire de Duchenne (Norwood et al. 2000). L' $\alpha$ -actinine permet la liaison *via* la titine entre l'actine et la myosine II au sein du complexe acto-myosique responsable de la contraction musculaire dépendante du calcium. La présence de l' $\alpha$ -actinine n'est pas limitée aux cellules musculaires. En effet, l' $\alpha$ -actinine se retrouve également au niveau des adhésions focales en se liant aux récepteurs membranaires, les intégrines (Pinotsis et al. 2020).

La caldesmone, la calponine ou encore la tropomyosine sont également des protéines de stabilisation des filaments d'actine qui se lient le long du filament et le protège de la dépolymérisation spontanée (Winder and Ayscough 2005).

#### 2.4.2. Les protéines d'ancrage

L'ancrage des filaments d'actine à la membrane plasmique de la cellule est primordial pour que son ossature soit maintenue et que ses propriétés contractiles soient mises en place. Les zones d'ancrage sont présentes au niveau de points focaux d'adhésion entre la cellule et la MEC et au niveau des jonctions cellule-cellule.

La spectrine, la vinculine, la paxilline ou encore la taline sont présentes au niveau des adhésions focales et permettent le lien entre la lame basale et le pôle basal de la cellule épithéliale. Des protéines de stabilisation déjà citées précédemment comme l' $\alpha$ -actinine, la dystrophine ou la filamine interviennent également dans l'ancrage des filaments d'actine. Enfin, la famille ERM (Ezrine, Radixine et Moésine) permet la réunion des filaments d'actine



avec la membrane plasmique en se fixant aux lipides par l'intermédiaire des domaines ERMAD (ERM Association Domains) (Fiévet, Louvard, and Arpin 2007).

Les jonctions intercellulaires font intervenir l' $\alpha$ -caténine qui permet l'ancrage de l'actine au niveau de la jonction adhérente grâce au complexe composé notamment de l'E-cadhérine et de la  $\beta$ -caténine. Dans les jonctions serrées, l'ancrage se fait *via* la protéine ZO-1 (Zonula Occludens 1) à l'aide du complexe composé des protéines claudine et occludine (Cerutti and Ridley 2017).

### 2.4.3. Les protéines motrices

La dernière catégorie de protéines de liaison à l'actine est composée des protéines motrices, les myosines, nécessaires à la génération de la contraction musculaire mais également à la division et la motilité cellulaire. Parmi les différentes familles de myosine, la myosine II comprend 3 isoformes et est formée d'un ensemble de 6 chaînes : 2 chaînes lourdes et 4 chaînes légères dont 2 sont dites essentielles et 2 régulatrices. Ces protéines permettent la contraction que ce soit dans les cellules musculaires ou non musculaires.

L'hydrolyse de l'ATP en ADP apporte l'énergie nécessaire à la contraction par glissement des filaments d'actine organisés en faisceaux antiparallèles. La libération d'énergie engendrée par l'hydrolyse de l'ATP est régulée par l'état de phosphorylation de la chaîne légère de la myosine régulatrice. La phosphorylation est activée par la MLCK (Myosin Light Chain Kinase) et inactivée par la MLCP (Myosin Light Chain Phosphatase). MLCK est régulée directement par les RhoGTPases lors de la formation des fibres de stress (Unbekandt and Olson 2014).

La myosine I quant à elle, est capable de se lier à la membrane plasmique et de générer des vésicules comme les vésicules d'endocytose, phénomène faisant intervenir également la myosine VI. La myosine V permet le transport de cargos au sein de vésicules dans la cellule.

Une multitude de protéines interagissent avec l'actine qu'elle soit monomérique ou filamenteuse, interviennent dans les différentes étapes de polymérisation ou de dépolymérisation ainsi que dans la formation et la régulation des différentes organisations des filaments d'actine. Ces organisations en faisceaux ou en réseaux ont pour conséquence la formation de structures d'actine responsables de fonctions cellulaires variées.

### 3. Structures et fonctions physiopathologiques de l'actine

Les tissus sont composés de cellules et de MEC qui interagissent en permanence. Le remodelage de la MEC est permanent, adaptatif et nécessite une régulation de la synthèse et de la dégradation de ses composants. Un déséquilibre de cette régulation entraîne une augmentation ou une diminution de la synthèse de ces composants voire une absence de dégradation ce qui conduit à différentes pathologies. Les fonctions de la MEC sont liées au microenvironnement des cellules. La MEC participe à de multiples processus biologiques tels que l'adhérence, la motilité et la migration ou encore la prolifération des cellules. La MEC intervient dans l'étirement et la compression de tissus via ses propriétés mécaniques mais aussi dans la signalisation cellulaire par le biais de récepteurs et la régulation de diffusion de molécules comme les facteurs de croissance ou les métabolites (Sala, Ros, and Saltel 2020).

Le cytosquelette d'actine a un rôle dans ces différentes fonctions cellulaires ce qui implique que les filaments d'actine adoptent des organisations structurales différentes. Les principales structures impliquant l'actine sont détaillées et leurs fonctions physiologiques et pathologiques décrites dans cette partie.

#### 3.1. Cortex/Jonctions cellulaires : Armature et communication cellulaires

Un rôle majeur de l'actine est de maintenir l'ossature de la cellule et à une plus grande échelle la cohésion tissulaire. Afin de parvenir à ces deux objectifs, l'actine forme une couronne sous la membrane plasmique cellulaire et forme, à l'aide de protéines annexes, des jonctions pour lier les cellules entre elles ou avec la matrice environnante.

L'actine corticale est observable dans la région sous-membranaire où elle forme une couronne (**Figure 3**). En premier lieu, cette localisation donne la morphologie de la cellule. Cela permet également de polariser la cellule, notamment avec la présence des microvillosités

au pôle apical des cellules épithéliales, la formation de jonctions en position latérale et l'interaction du pôle basal de la cellule avec la lame basale (Chhabra and Higgs 2007).

L'actine sous-membranaire permet à la cellule d'acquérir une cohésion avec ce qui l'entoure à savoir une autre cellule ou la MEC. L'actine est impliquée dans les jonctions intercellulaires comme les jonctions serrées et adhérentes et aussi dans les jonctions cellules matrice comme les contacts focaux. Les protéines impliquées dans la formation de ces jonctions ont été décrites dans le paragraphe « Protéines d'ancrage » et sont rassemblées dans le **tableau 1**.

Type de jonctions	Fonctions	Molécules transmembranaires	Molécules cytoplasmiques
Serrée <i>Zonula Occludens</i>	Etanchéité intercellulaire	Claudine Occludine JAM	ZO-1 & ZO-2 Spectrine
Adhérente <i>Zonula Adherens</i>	- Ancrage intercellulaire - Cohésion tissulaire	Cadhérines	$\alpha$ -caténine $\beta$ -caténine
Contact focal	- Ancrage de la cellule à la MEC - Cohésion tissulaire	Intégrines	Taline Vinculine $\alpha$ -actinine

**Tableau 1 : Les jonctions cellulaires impliquant le cytosquelette d'actine.**

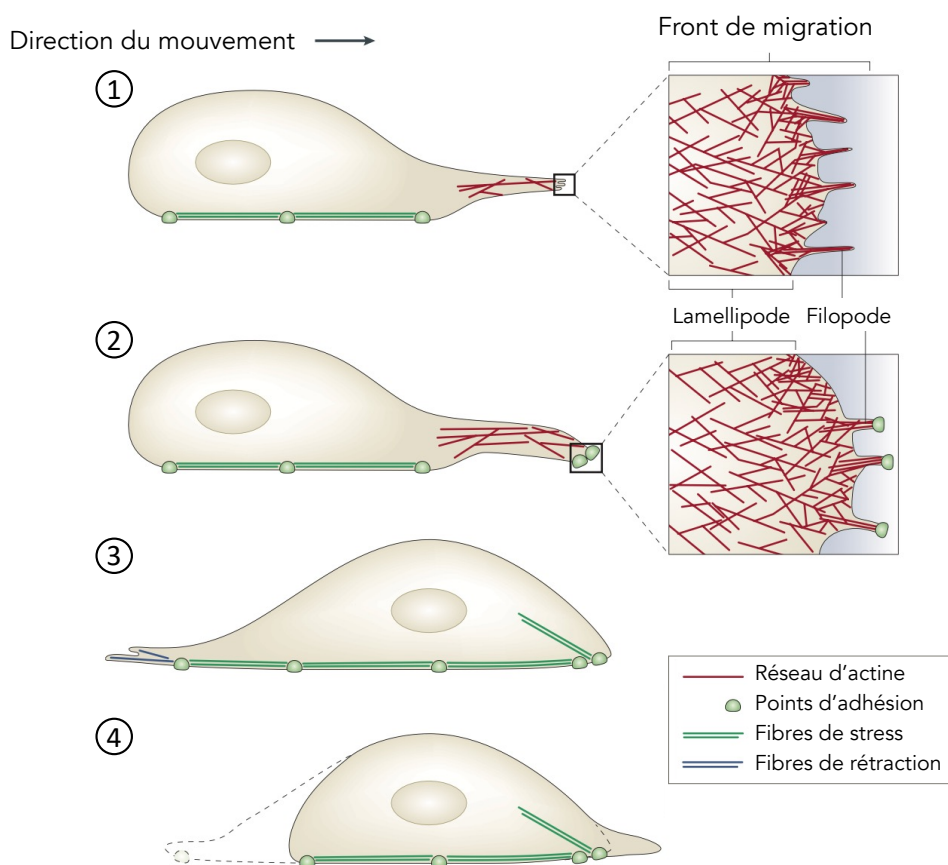
Dans ce tableau, sont listées les types de jonctions cellulaires impliquant l'actine ainsi que leurs fonctions et les protéines intervenant dans ces jonctions.

Au pôle apical, les jonctions serrées « Zonula Occludens » des cellules endothéliales et des cellules épithéliales forment une jonction étanche pour empêcher le passage de molécules entre les cellules. Les jonctions adhérentes « Zonula Adherens » interviennent dans la cohésion intercellulaire de la cellule. Enfin, au pôle basal, les contacts focaux interviennent dans l'ancrage de la cellule à la MEC où la taline permet l'activation des récepteurs membranaires, les intégrines (Cerutti and Ridley 2017).

Cette cohésion tissulaire est altérée dans le cadre du cancer, lors de l'EMT. Un switch entre la perte d'expression de marqueurs épithéliaux et l'acquisition de l'expression de marqueurs mésenchymateux déstabilise les jonctions intercellulaires, l'ancrage à la matrice et la polarité apico-basale fragilisant ainsi l'intégrité du tissu et favorisant l'échappement de cellules cancéreuses.

## 3.2. Structures impliquées dans la migration cellulaire

La migration cellulaire intervient dès le stade embryonnaire au cours de la morphogénèse. Puis de façon physiologique, elle assure la cicatrisation après une blessure et le maintien de l'intégrité des tissus en cas de mort cellulaire. Au cours de l'EMT, les cellules acquièrent des propriétés migratoires et invasives favorisant la progression tumorale. Dans les années 1970, Abercrombie et *al.* définissent les différentes étapes de la migration cellulaire ainsi que les structures d'actine impliquées (**Figure 8**) (Abercrombie, Heaysman, and Pegrum 1970a ; Abercrombie, Heaysman, and Pegrum 1970b ; Abercrombie, Heaysman, and Pegrum 1970c).



**Figure 8 : La migration cellulaire nécessite la combinaison de diverses structures d'actine.**

(1) Le lamellipode se forme au niveau du front de migration par extension de la membrane plasmique, structure à partir de laquelle les filopodes s'allongent.

(2) Des récepteurs et molécules permettent l'adhésion de la cellule à son milieu environnant à l'extrémité des filopodes.

(3) Le complexe actine-myosine entraîne la contraction de la cellule et le mouvement du corps cellulaire vers le front de migration.

(4) Des fibres de rétraction détachent l'arrière de la cellule par perte d'adhésion au substrat et dépolymérisation de l'actine.

Adapté de Mattila et Lappalainen 2008.

Dans un premier temps, la cellule s'étale sur quelques micromètres avec une structure très dynamique d'actine branchée, le lamellipode. Située au niveau du front de migration, cette structure est dépourvue d'organelles et la polymérisation de l'actine dépendante du complexe Arp2/3 permet l'extension de la membrane plasmique. En effet, lorsque le complexe Arp2/3 est délété, cela entraîne une absence de lamellipode chez la souris et une diminution significative de l'étalement des cellules chez la drosophile (Rogers et al. 2003 ; Steffen et al. 2006).

A partir du lamellipode, à l'aide du complexe Ena/VASP (de formines et de la myosine X), les filaments d'actine se réorganisent et s'allongent pour former des filopodes capables de créer des points focaux d'adhésion entre la cellule et la MEC. Au sein des filopodes, l'actine est organisée sous forme de faisceaux parallèles au niveau desquels des récepteurs transmembranaires comme les intégrines recrutent des molécules d'adhésion, des kinases ou des GTPases afin de réguler ces structures (Jacquemet, Hamidi, and Ivaska 2015).

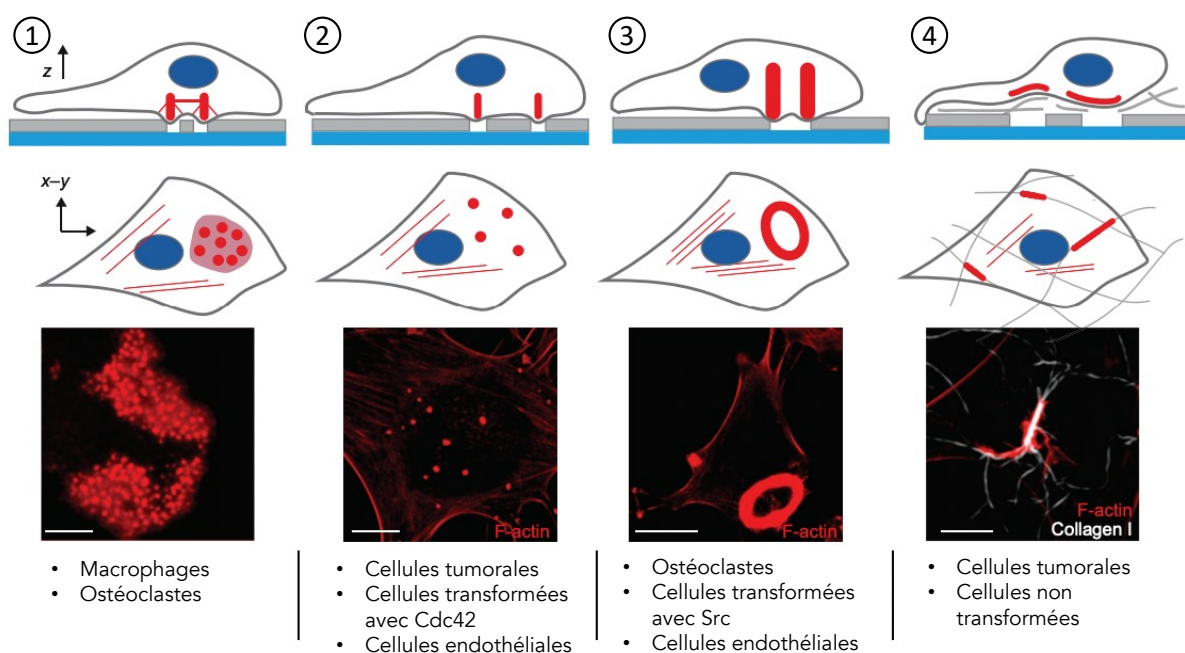
Le complexe acto-myosique, par glissement des fibres de tension d'actine (ou fibres de stress) sur les molécules de myosine, entraîne la contraction de la cellule vers le front de migration. La GTPase RhoA intervient en régulant d'une part la myosine, *via* l'activation de ROCK, et d'autre part, la polymérisation de l'actine, *via* l'activation de la formine mDia (Burridge and Guilluy 2016).

Enfin, lors de la dernière étape de la migration cellulaire, l'arrière de la cellule se rétracte et se détache du substrat par perte des contacts focaux, dépolymérisation ou fragmentation des filaments d'actine, recyclage des intégrines et des protéines associées à l'actine (Cramer 2013).

Une double organisation du réseau d'actine est donc nécessaire à la migration cellulaire impliquant de nombreux partenaires protéiques. A chaque étape, une ou plusieurs protéines de la famille des GTPases interviennent dont RhoA, Rac1 et Cdc42. Ces protéines font l'objet du chapitre 2 où leurs fonctions et leurs régulations seront détaillées.

### 3.3. Structures impliquées dans l'invasion cellulaire

Les invadosomes sont des structures d'actine impliquées dans l'invasion cellulaire. Ce terme « invadosome » regroupe les podosomes et les invadopodes, différant selon le type de cellules où ils se forment. Les podosomes sont présents dans les cellules normales telles que les cellules endothéliales, les ostéoclastes ou les macrophages tandis que les invadopodes sont retrouvés dans les cellules tumorales. Comme les lamellipodes, les invadosomes sont présents dès le stade embryonnaire où ils vont réguler la migration des cellules lors de la gastrulation (D. A. Murphy and Courtneidge 2011). Dans la cellule, ces structures de dégradation s'organisent de différentes façons et peuvent être présentes dans la cellule de façon constitutive mais ils peuvent aussi apparaître suite à un stimulus interne ou externe (**Figure 9**) (Di Martino et al. 2016).



**Figure 9 : Différentes organisations des invadosomes.**

Les invadosomes sont des structures d'actine F (rouge) pouvant s'organiser différemment selon le type de cellules et les stimuli auxquelles ces structures répondent.

(1) Invadosomes sous forme d'agrégats.

(2) Invadosomes organisés en points.

(3) Invadosomes de type rosette.

(4) Invadosomes linéaires, formés le long des fibres de collagène de type I (gris).

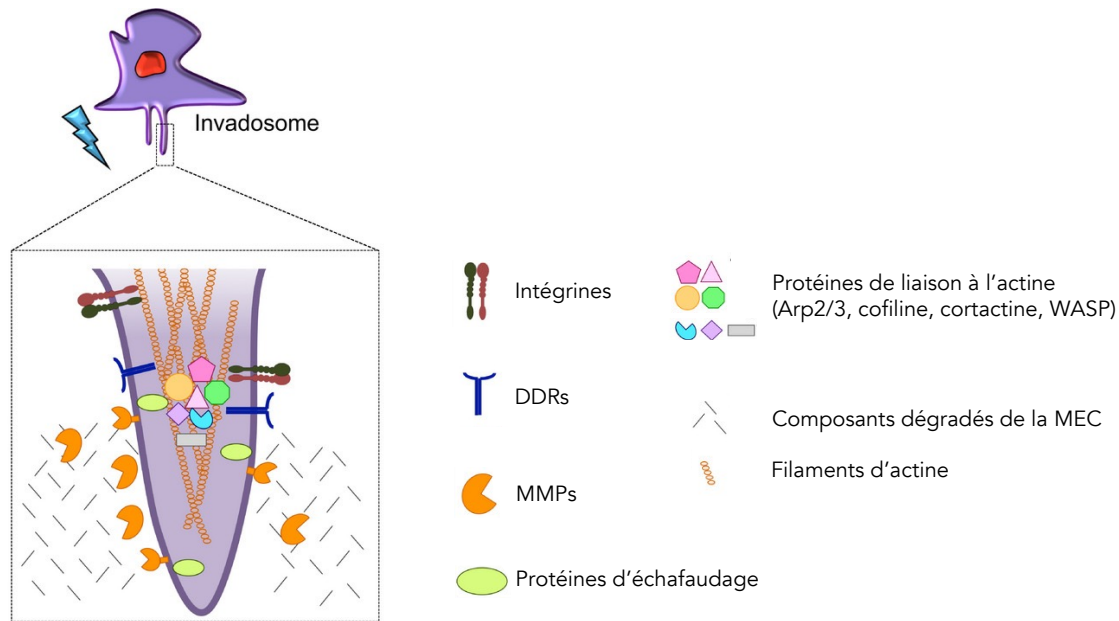
En haut, sont représentés schématiquement les différentes organisations d'invadosomes accompagnées, en dessous, par des images de microscopie confocale ainsi que les types cellulaires associés aux structures. Échelle : 10µm.

Adapté de Di Martino et al. 2016.

Plusieurs types cellulaires forment des invadosomes de façon constitutive, sans besoin de stimulation, les cellules cancéreuses présentent des invadosomes constitutifs tout comme les cellules de la lignée hématopoïétique. De nombreux stimuli permettent de former des invadosomes comme l'activation de la GTPase Cdc42 induisant la formation d'invadosomes de type point dans les cellules endothéliales (Moreau et al. 2003). L'activation de la GTPase RhoA et de la kinase Src permettent la formation des invadosomes de type rosette dans des fibroblastes (Berdeaux et al. 2004). Des cytokines et des facteurs de croissance tels que VEGF, EGF, TGF $\beta$ , TNF $\alpha$  stimulent la formation d'invadosomes aussi bien dans des cellules endothéliales que dans des cellules tumorales (Osiak, Zenner, and Linder 2005 ; Mandal, Johnson, and Wheelock 2008 ; Varon et al. 2006). Des éléments de la MEC participent à la formation d'invadosomes. En effet, des travaux de l'équipe ont montré que le collagène de type I favorise la formation d'invadosomes linéaires, le long de la fibre de collagène *via* l'activation de la voie Cdc42-Tuba (Juin et al. 2012 ; Juin et al. 2014). D'autres éléments de la MEC comme la fibronectine et la vitronectine induisent la formation de podosomes, respectivement, dans les ostéoclastes et dans les fibroblastes (Destaing et al. 2010).

Les invadosomes sont des structures d'actine F combinant la polymérisation de l'actine et une activité protéolytique conférée par le recrutement des métalloprotéases matricielles (MMPs) (Di Martino et al. 2016 ; Markwell et al. 2019). Ces activités se reflètent dans la composition moléculaire des invadosomes, un cœur d'actine F entouré de protéines de liaison à l'actine et de protéines d'échafaudage ainsi que les MMPs sécrétées ou membranaires (**Figure 10**).

Parmi les protéines de liaison à l'actine sont retrouvées le complexe Arp2/3 et les NPFs, N-WASP et la cortactine, permettant la polymérisation de l'actine au sein de ces structures. Des protéines d'échafaudage, comme Tks4 et Tks5, composent les invadosomes et sont nécessaires à leur formation (Buschman et al. 2009 ; Diaz et al. 2009). Une signature moléculaire minimale a été démontrée avec la présence de Tks5 et l'activation de Cdc42 nécessaires à la formation de structures fonctionnelles (Di Martino et al. 2014).



**Figure 10 : Composition moléculaire des invadosomes.**

Représentation schématique d'un invadosome avec un cœur d'actine filamenteuse entouré de protéines de liaison à l'actine, d'échafaudage ainsi que des récepteurs transmembranaires et des protéases dégradant la MEC.

Adapté de Paterson et Courtneidge 2018.

La formation des invadosomes se déroule en plusieurs étapes : initiation, assemblage et maturation. Les facteurs de croissance (PDGF, EGF ou TGF $\beta$ ) initient la formation des invadosomes en activant *via* leurs récepteurs, PI3K (Phosphoinositide 3-kinase). Src phosphorylé par PI3K lie Tks5 et se localise au niveau de la membrane plasmique. La phase d'initiation nécessite l'adhésion de la cellule à la MEC *via* des contacts focaux et des récepteurs transmembranaires. Plusieurs familles de récepteurs sont impliquées dans la liaison entre la cellule et la MEC selon la composition de la matrice entourant la cellule : les intégrines, CD44 et les récepteurs à domaine discoïdine (DDR) et sont responsables de la formation de différents types d'invadosomes (D. A. Murphy and Courtneidge 2011). Le récepteur au collagène DDR1 est nécessaire à la formation des invadosomes linéaires (Juin et al. 2014) tandis que les intégrines (majoritairement  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  et  $\beta 3$ ) et CD44 régulent la formation des autres formes d'invadosomes (Beatty et al. 2013 ; Chabadel et al. 2007).

Au cours de l'étape d'assemblage, le recrutement et l'activation des protéines régulatrices de l'actine comme le complexe Arp2/3, la phosphorylation de facteurs clés des invadosomes tels que Tks5, la cortactine ou la fascine ainsi que la production de ROS (espèces



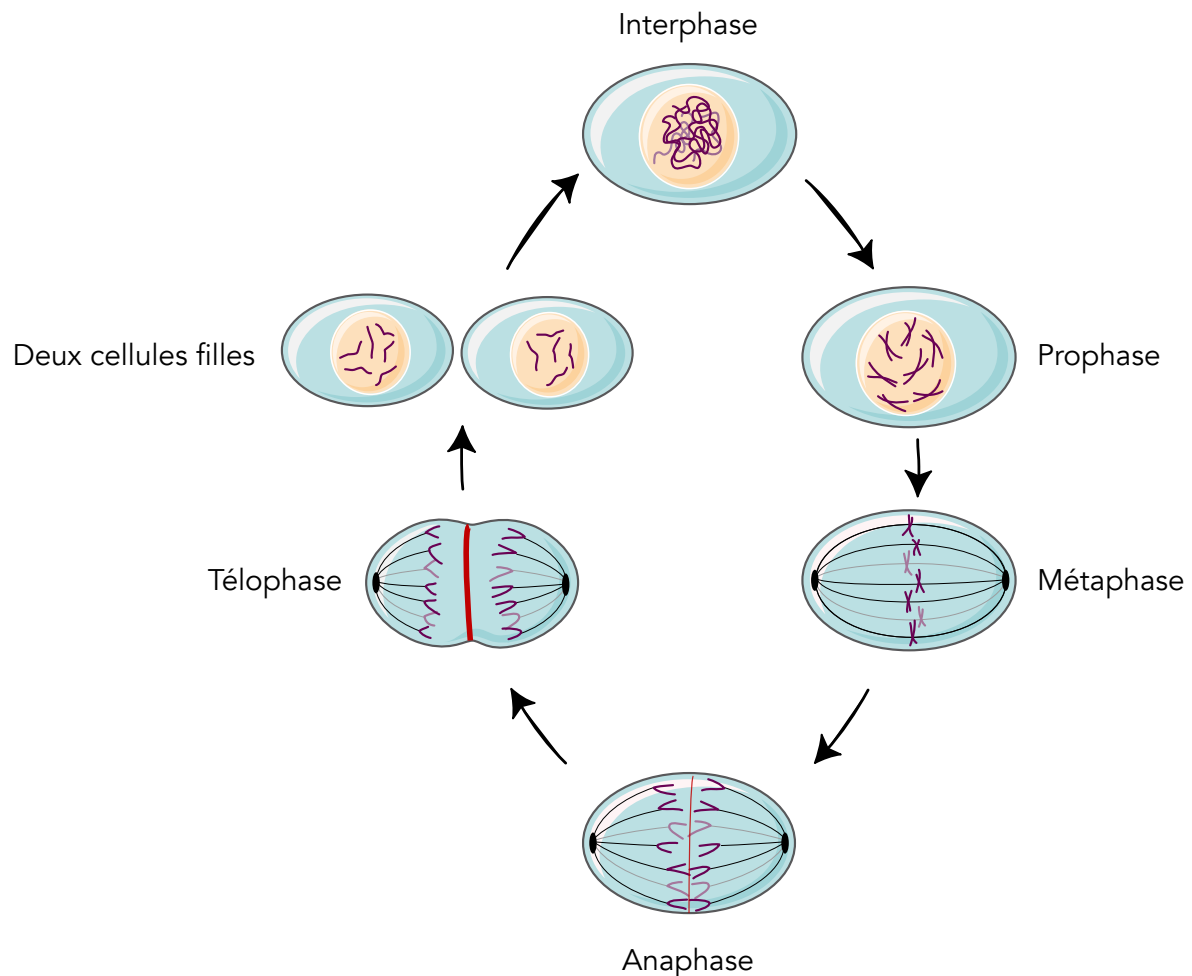
réactives de l'oxygène) se déroulent en parallèle et conduisent à la polymérisation de l'actine et à l'agrandissement de la structure.

Lorsque l'invadosome est formé, son activité protéolytique est mise en place par la sécrétion ou la présentation à la membrane de protéases impliquées dans la dégradation de la matrice, principalement les MMPs. Chez l'Homme, il existe 23 MMPs qui sont exprimées sous une forme inactive dans la cellule et qui nécessitent un clivage afin de les rendre matures. Les principales MMPs retrouvées au sein des invadosomes sont MMP-2 et MMP-9, protéases sécrétées ainsi que MT1-MMP (ou MMP-14) qui est une protéase transmembranaire pouvant cliver et activer MMP-2. Ces MMPs, capables de dégrader les différents composants de la MEC (collagènes, gélatine, fibronectine, laminine, ...), sont surexprimées dans de nombreux types de cancers et sont associées à la formation de métastases et à un mauvais pronostic (Jacob and Prekeris 2015).

### 3.4. Anneau de cytokinèse et actine nucléaire : Division et prolifération cellulaires

Le cycle cellulaire comprend plusieurs phases : une phase G1, une phase S de croissance et de préparation à la réplication de l'ADN, puis une phase G2, phase de croissance et de préparation à la phase M ou mitose et enfin la mitose (Lemmens and Lindqvist 2019). À la fin du cycle cellulaire, une cellule mère se divise en deux cellules filles au cours de la mitose. Ce processus comprend plusieurs étapes (**Figure 11**).

Lors de l'interphase, le matériel génétique est sous forme de chromatine formant des chromosomes non individualisés. Les chromosomes sont constitués de 2 chromatides reliés par un centromère (ou kinétochore) et ils s'individualisent au cours de la prophase. Le centrosome se duplique et les centrosomes se séparent et débutent leur migration vers les 2 pôles de la cellule. L'enveloppe nucléaire disparaît et les microtubules forment le fuseau mitotique. Les chromosomes se retrouvent alignés au niveau de la plaque équatoriale et sont attachés aux microtubules, c'est la métaphase.



**Figure 11 : Formation d'un anneau d'actine lors de la mitose.**

Représentation schématique des différentes étapes de la mitose : interphase, prophase, métaphase, anaphase et télophase montrant la division d'une cellule mère en deux cellules filles (et de son matériel génétique, en violet). Au cours de l'anaphase, un anneau d'actine se forme (en rouge) et se contracte lors de la télophase pour séparer les deux futures cellules. Figure réalisée avec Servier Medical Art.

Lors de l'anaphase, les 2 chromatides se séparent et migrent vers les pôles de la cellule, qui se dépolymérisent. De par sa localisation corticale, l'actine a un rôle au cours de l'anaphase lorsque la cellule s'allonge avec un contrôle de la rigidité de la cellule (Field and Lénárt 2011).

Cette étape marque le début de formation de l'anneau d'actine et de myosine autour de la cellule, au niveau de la plaque équatoriale. Cet anneau d'actine se contracte créant un sphincter jusqu'à la reconstitution des enveloppes nucléaires et la décondensation des chromosomes au cours de la télophase (cytokinèse ou cytodierèse).

Les deux cellules filles sont alors séparées, chacune avec une chromatide, et poursuivent leur cycle cellulaire en phase G1. Une cellule peut sortir du cycle cellulaire, dans

une phase G<sub>0</sub>, de quiescence ou dormance, et ainsi ne pas proliférer. Après le stimuli d'un agent mitogène, la cellule quiescente rejoint un état prolifératif en rentrant dans le cycle cellulaire.

L'actine se localise également dans le noyau où elle est présente sous forme de monomères d'actine G ou sous forme de polymères sans structure filamenteuse stricte ou sous forme de larges polymères dont la structure est similaire au filament d'actine cytoplasmique (Kelsch and Tootle 2018).

Une des fonctions de l'actine nucléaire concerne le remodelage de la chromatine et la ségrégation des chromosomes mimant les rôles de l'actine nucléaire chez les procaryotes. En effet, MreB (actine bactérienne) est nécessaire à la migration des chromosomes lors de la division bactérienne (Soufo and Graumann 2003). De plus, de l'actine est retrouvée au niveau du fuseau mitotique chez le Xénope et la drosophile (Woolner et al. 2008 ; Wineland, Kelsch, and Tootle 2018). Par ailleurs, l'actine régule également la réplication de l'ADN par inhibition de l'activité de la formine empêchant le transport nucléo-cytoplasmique et favorisant l'initiation de la réplication (Parisis et al. 2017).

De ce fait, l'actine présente dans le noyau et dans le cytoplasme a un rôle primordial au cours de plusieurs étapes de la progression du cycle cellulaire. Ce processus est dérégulé dans le cancer et favorise l'échappement à la quiescence et la prolifération anarchique des cellules cancéreuses.

Le cytosquelette d'actine est donc un constituant majoritaire de nos cellules et, par le biais d'une multitude de structures, régule de nombreuses fonctions cellulaires. Ces structures d'actine sont finement régulées afin de maintenir l'homéostasie tissulaire mais une dérégulation des composants de ces structures entraîne un remodelage du cytosquelette d'actine aboutissant à l'apparition de phénomènes pathologiques comme le développement d'un cancer. Cette régulation est principalement établie par les GTPases de la famille Rho.





# Chapitre 2

-

## Les GTPases Rho



Comme démontré dans le premier chapitre, le cytosquelette d'actine régit la morphologie et la polarité de la cellule et, par ses propriétés dynamiques, permet à la cellule de se mouvoir, d'envahir et de se diviser. La compréhension des mécanismes de régulation du cytosquelette est essentielle au vu de son implication dans de nombreuses fonctions cellulaires. Cette compréhension est d'autant plus importante que des dérégulations de ces mécanismes sont à l'origine de multiples pathologies. Les petites GTPases de la famille Rho sont les régulateurs majeurs du remodelage du cytosquelette d'actine. À travers leur régulation, leur activation, les interactions avec des protéines cibles, les GTPases Rho contrôlent des processus biologiques tels que la migration cellulaire, le cycle cellulaire ou encore la transcription des gènes (Hall 1998).

## 1. Introduction sur les GTPases

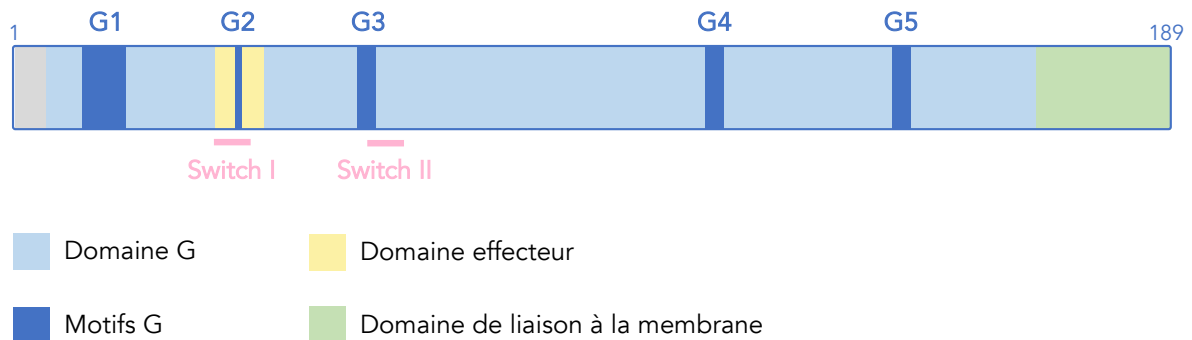
Lors de la transduction d'un signal au sein de la cellule, les GPCRs (Récepteurs Couplés aux Protéines G) activent les protéines G trimériques (composées des sous-unités  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ ) mais la transduction du signal peut également se faire via les petites protéines G, monomériques. Leur structure est proche de celle de la sous-unité  $\alpha$  des protéines G trimériques et sont appelées les petites GTPases (Small Guanosine Triphosphatase) de la superfamille Ras. Plus de 150 membres composent cette superfamille dont la majorité possède une séquence très conservée au cours de l'évolution de *S. cerevisiae* à l'Homme, en passant par *C. elegans* ou la drosophile (Colicelli 2004). Les membres fondateurs des petites GTPases, découverts dans les années 1960, sont les protéines oncogéniques Ras codées par les gènes *RAS* identifiés chez des rats développant une leucémie et des sarcomes après une infection par un virus leucémogène chez la souris (Harvey 1964).

Les fonctions associées aux petites GTPases dépendent de l'activation d'effecteurs en aval et sont régulées en amont par plusieurs familles de protéines (activatrices ou inactivatrices). Cette régulation très fine a lieu en jouant notamment sur la localisation subcellulaire des GTPases. En effet, les GTPases se localisent au niveau de structures riches en actine pour réguler et contrôler des fonctions associées au cytosquelette d'actine.

Les GTPases possèdent des caractéristiques structurales communes. Elles présentent ainsi un domaine G d'environ 20 kDa (kiloDaltons) contenant un feuillet  $\beta$  entouré de 6 hélices



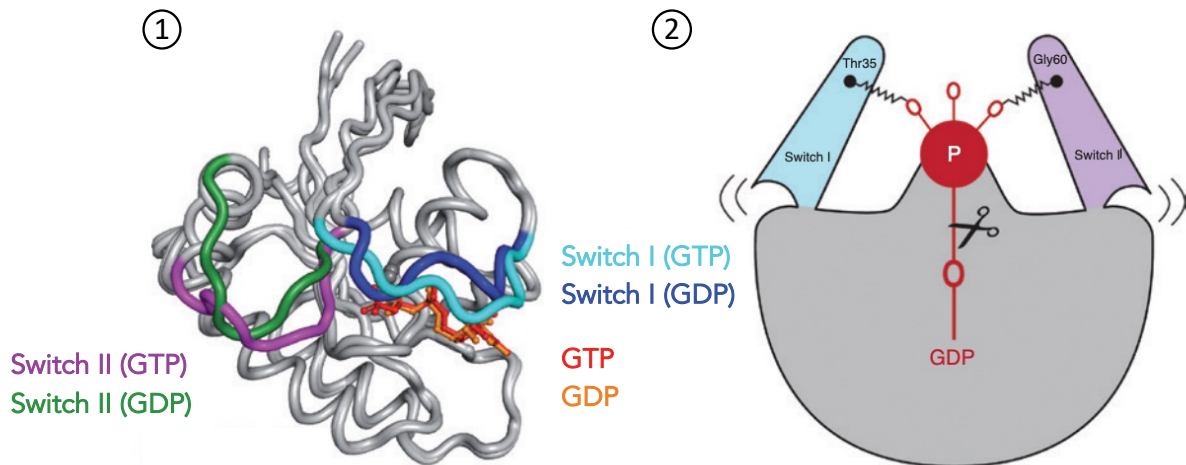
α. Ce domaine G comporte 5 motifs G ou « G box » partagés par les membres de la superfamille Ras (**Figure 12**). Ce sont des motifs conservés permettant la liaison des nucléotides guanine et l'hydrolyse du GTP en GDP (Bourne, Sanders, and McCormick 1991 ; Wennerberg, Rossman, and Der 2005).



**Figure 12 : Séquence et sites consensus des petites protéines G monomériques.**

La présence de 5 motifs G conservés constitue le domaine G des petites GTPases et lui permet de lier le GTP et de l'hydrolyser en GDP. Les domaines Switch I et II modifient la structure de la protéine selon la liaison avec du GTP ou du GDP. En C-terminal, le domaine de liaison à la membrane via les lipides permet un ancrage de la protéine après des modifications post-traductionnelles.

Au niveau N-terminal, le motif G1 (GXXXXGKS/T) forme une boucle P permettant la liaison au phosphate-α et au phosphate-β du GTP ou du GDP. Le motif G2 contient une thréonine conservée. La thréonine T35 localisée dans le domaine Switch I va, selon la liaison du GTP ou du GDP, changer la conformation de la boucle (**Figure 13**). Le motif G3 (DXXGQ/H/T) contient un résidu capable de fixer un ion  $Mg^{2+}$  et de former une liaison avec le phosphate-γ du GTP afin d'hydrolyser le GTP. La conformation de ce motif G3 est modifiée lorsque la GTPase est liée au GTP ou au GDP par une ouverture du domaine Switch II (**Figure 13**). Enfin, en C-terminal, le motif G4 (T/NKXD) forme une boucle hydrophile afin de stabiliser la liaison du nucléotide guanine. Le motif G5 (C/SAK/L/T) interagit de façon indirecte avec le nucléotide en stabilisant le motif G4 (Bourne, Sanders, and McCormick 1991).



**Figure 13 : Changement de conformation des GTPases.**

Sous leur forme active, les GTPases lient le GTP (en rouge sur la figure de gauche) par une interaction forte via des liaisons hydrogène entre le phosphate  $\gamma$  du GTP et les acides aminés Thr35 et Gly60 des domaines Switch I et Switch II respectivement (en bleu et violet). Après inactivation de la GTPase par hydrolyse du GTP en GDP (en orange) et libération du phosphate  $\gamma$ , les domaines Switch se relâchent (en bleu foncé et vert) et adoptent une conformation différente.

(1) Représentation du changement de conformation par une vue en 3D de la structure d'une GTPase.

(2) Représentation du changement de conformation par une vue en 2D de la GTPase.

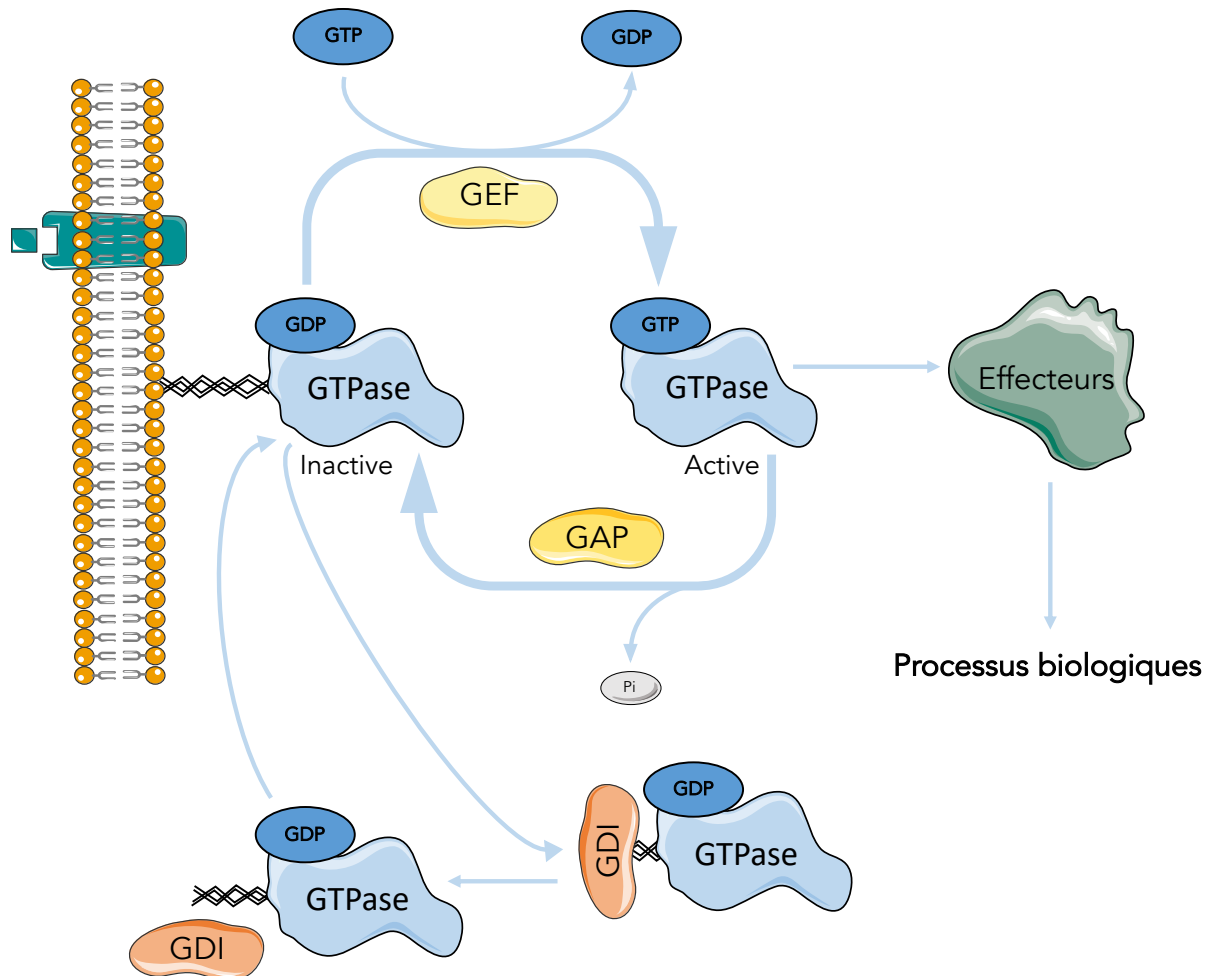
Adapté de Gasper et Wittinghofer 2020.

## 1.1. La régulation cyclique des petites GTPases

Les petites protéines G agissent, pour la plupart, comme des interrupteurs moléculaires dans la cellule en étant présent sous deux formes : un état actif lié au GTP et un état inactif lié au GDP (Bourne, Sanders, and McCormick 1990). En amont, ces interrupteurs moléculaires peuvent être activés par plusieurs signaux extracellulaires ou intracellulaires tels que les facteurs de croissance, les molécules de la MEC ou encore les hormones. Leur régulation fait intervenir 3 familles de protéines : les GEFs, les GAPs et les GDIs (**Figure 14**).

En absence de signal, les GTPases sont reliées au GDP et inactives. Les GTPases sont séquestrées dans le cytosol par les GDIs (Guanine nucleotide Dissociation Inhibitors) par le masquage des sites de modifications par les lipides. Un signal va libérer la GTPase du GDI et permettre le recrutement à la membrane de la protéine par une modification lipidique. Des modifications post-traductionnelles de farnésylation ou de géranylgeranylation ont été mises en évidence. Ces modifications leur permettent d'interagir avec les lipides membranaires (**Figures 12 & 14**) (Patrick J. Roberts et al. 2008). En effet, au niveau du domaine CAAX, des

farnésyl-transférases ou des géranylgéranyl-transférases entraînent l'ajout de groupement farnésyl (15 carbones) ou géranyl (20 carbones). Le domaine CAAX est situé en C-terminal de la protéine, et contient une cystéine, deux acides aminés aliphatiques et un acide aminé terminal.



**Figure 14 : Cycle des membres de la superfamille Ras.**

Les petites GTPases oscillent entre deux états : actif lié au GTP et inactif lié au GDP via l'intervention de protéines régulatrices. Les GEFs permettent l'échange du GDP en GTP tandis que les GAPs catalysent l'hydrolyse du GTP en GDP. Les GDIs permettent de maintenir le GDP lié à la GTPase. Sous sa forme activée, la protéine permet l'activation d'effecteurs allant réguler de nombreuses fonctions biologiques.

Les GEFs (Guanine nucleotide Exchange Factors) interviennent dans l'activation de la GTPase. La liaison entre le GDP et la GTPase est forte. L'échange du GDP en GTP nécessite l'aide d'une protéine GEF. La GTPase active déclenche alors la signalisation en aval. L'inactivation des GTPases se produit par hydrolyse du GTP en GDP par la GTPase elle-même. Cependant, l'activité d'hydrolyse intrinsèque de la GTPase est faible. Les GAPs (GTPase-Activating Proteins) sont responsables de l'inactivation de la GTPase en catalysant la réaction

d'hydrolyse du GTP en GDP (**Figure 14**). La GTPase inactive pourra alors être séquestrée de nouveau par un GDI ou de nouveau recrutée à la membrane de façon à continuer le cycle (Wennerberg, Rossman, and Der 2005 ; Cherfils and Zeghouf 2013).

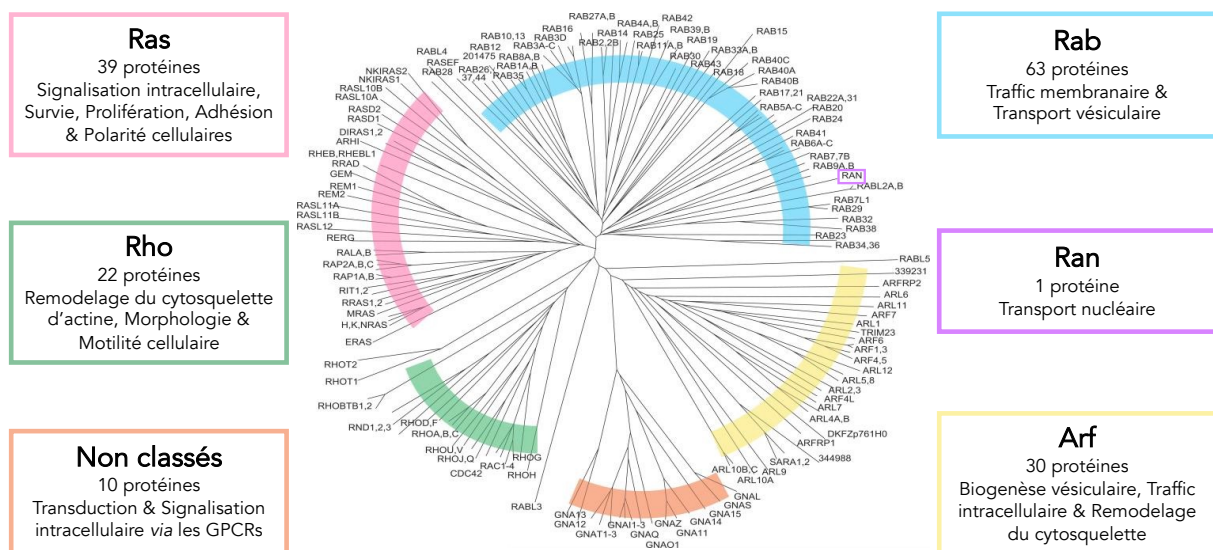
Le changement de liaison au GTP et au GDP s'effectue au niveau d'une boucle P de liaison au phosphate avec de part et d'autre de la boucle, les domaines Switch I et Switch II correspondant aux acides aminés 30-38 et 59-67 respectivement, en se basant sur la nomenclature de la GTPase Ras. Ces deux domaines sont responsables de la notion d'interrupteurs moléculaires en permettant le changement de conformation entre la GTPase liée au GTP ou au GDP. Ces domaines Switch correspondent aux régions entourant la boîte G2 et la boîte G3 (**Figure 12**). Dans la forme liée au GTP, deux résidus sont notamment essentiels pour la liaison du phosphate  $\gamma$  du GTP : la thréonine en position 35 du domaine Switch I et la glycine en position 60 du domaine Switch II (d'après la séquence de Ras) (Herrmann et al. 1998 ; Ford et al. 2005). Par la formation de deux liaisons hydrogène, ces deux acides aminés permettent une forte affinité de la GTPase active avec ses effecteurs. Sous cette conformation active, la GTPase sera reconnue par les protéines régulatrices GAPs (**Figure 14**) (Gasper and Wittinghofer 2020).

Deux résidus sont importants pour l'hydrolyse du GTP en GDP, médiée par les protéines GAPs. La glycine en position 60 du domaine Switch II (motif G3) active une molécule d'eau qui libère le phosphate  $\gamma$  par attaque nucléophile (**Figure 14**) (Ford et al. 2005). La glutamine en position 63 du motif G3 est également essentielle dans l'hydrolyse du GTP catalysée par les protéines GAPs. En effet, la toxine CNF1 (cytotoxic necrotizing factor 1) agit par déamidation de cette glutamine et maintient la GTPase constitutivement active en rendant impossible l'hydrolyse du GTP (Schmidt et al. 1997 ; Cherfils and Zeghouf 2013).

Après hydrolyse du GTP, les deux domaines Switch présentent une conformation relâchée. Ce changement de conformation rend l'interaction de la GTPase inactive avec ses effecteurs impossible. Ce changement permet la reconnaissance de protéines régulatrices comme les GDIs avant un nouveau signal entraînant le recrutement et l'activation de la GTPase (Biou and Cherfils 2004).

## 1.2. Les différentes familles des petites GTPases

Les différents membres de la superfamille Ras ont été répartis en 5 familles : Ras, Rho, Rab, Ran et Arf, selon l'analyse des séquences des gènes, les structures et les fonctions associées aux petites GTPases (**Figure 15**). Pour certains membres, il n'existe pas de données concernant leur structure ou leur fonction permettant de les affilier à une famille, ils sont donc « non classés ». De plus, de nombreux pseudogènes sont présents dans le génome humain ainsi que des gènes codant pour des protéines présentant des séquences similaires à certaines GTPases (Wennerberg, Rossman, and Der 2005).



**Figure 15 : Arbre phylogénétique des membres de la superfamille Ras.**

Les petites GTPases de la superfamille Ras sont réparties en 5 familles selon leurs séquences et leurs fonctions : Ras, Rho, Rab, Ran, Arf et une famille regroupant des membres non classés. Adapté de Colicelli 2004.

### 1.2.1. Ras

La famille Ras (Rat Sarcoma) correspond au premier groupe découvert, raison pour laquelle le nom Ras est donné à l'ensemble des petites protéines G monomériques. Il existe 39 protéines Ras (**Figure 15**). Ces protéines sont responsables d'activation de voies de signalisation cytoplasmiques dont les majoritaires sont (1) la voie des MAPK impliquée dans la prolifération et la survie cellulaires ou encore l'EMT et (2) la voie PI3K/Akt/mTOR régulant la synthèse des protéines, la prolifération et la migration cellulaire (Simanshu, Nissley, and McCormick 2017).

Des mutations des gènes *RAS* ou des régulateurs de Ras rendent constitutivement actives ces protéines et favorisent le développement de pathologies comme le cancer, des troubles neurologiques ou des RASopathies (ensemble d'affections dès le développement embryonnaire causé par des mutations au sein de gènes *RAS* dans les cellules germinales).

Des mutations ponctuelles des gènes *RAS* sont retrouvées dans environ 20% des tumeurs humaines, avec 85% sur le gène *KRAS*, 15% sur *NRAS* et moins de 1% sur *HRAS*. Le gène *KRAS* est notamment muté dans 90% des cancers du pancréas et plus de 40% des cancers colorectaux. *NRAS* est muté dans près d'un mélanome sur quatre et *HRAS*, bien que plus rare, est muté dans 5% des cancers de la vessie. Des mutations sur les gènes codant la protéine RasGAP p120RasGAP et la RasGEF SOS1 (Son of Sevenless 1) sont retrouvées dans 6 à 8% des cancers de l'endomètre. Parmi les effecteurs des protéines Ras, le gène codant pour la sous-unité catalytique de PI3K présente au moins une mutation dans plus de 50% des cancers de l'endomètre tandis que la sous-unité régulatrice l'est dans un tiers de ces cancers. Les gènes *BRAF* (60% des mélanomes) ou *MAP3K1* (6% des cancers du sein) sont également fortement mutés, activant ainsi les voies de signalisation en aval et permettant le développement et la progression tumorale (M. S. Lawrence et al. 2014).

En parallèle, quelques membres de la famille Ras agissent comme suppresseurs de tumeurs comme D-Ras, Noey2 ou Rerg (Ras-related and Estrogen-Regulated Growth inhibitor) dont l'expression est corrélée avec une augmentation de la survie de patientes atteintes de cancer du sein (Finlin et al. 2001).

### 1.2.2. Rho

La famille Rho (Ras homologous) comprend 22 membres. Certaines de ces GTPases Rho sont les régulateurs clés du remodelage du cytosquelette d'actine (**Figure 15**). Les membres les plus étudiés de cette famille sont RhoA qui favorise la formation des fibres de stress et des adhésions focales, Rac1, la formation des lamellipodes et Cdc42, la formation des filopodes et d'invadosomes.

Ainsi, les GTPases de la famille Rho contrôlent la polarité cellulaire, la motilité cellulaire tout comme les phénomènes d'invasion de la MEC ou le trafic intracellulaire (Wennerberg, Rossman, and Der 2005). Les GTPases Rho régulent de multiples fonctions cellulaires dans

lesquelles interviennent de nombreux effecteurs. De plus, les protéines Rho sont finement régulées en réponse à des stimuli extérieurs par des GEFs et des GAPs.

La régulation et l'activation d'effecteurs des GTPases de la famille Rho seront expliquées de façon plus détaillée dans la partie 2 de ce chapitre.

### 1.2.3. Rab

La famille Rab (Ras-like proteins in the brain) est la famille de petites GTPases comprenant le plus de membres : 63 protéines (**Figure 15**). Les GTPases Rab se localisent dans différents compartiments intracellulaires en lien avec leurs rôles dans le transport vésiculaire et le trafic intracellulaire des protéines : RE, appareil de Golgi ou encore endosomes mais aussi au niveau de la membrane plasmique et du noyau. Selon leur localisation, les protéines Rab interviennent lors de différentes étapes de la formation de la vésicule d'un compartiment donneur, à son relargage dans le compartiment accepteur en passant par le transport des vésicules et la fusion des membranes (Zerial and McBride 2001).

La présence des GTPases Rab au niveau de compartiments endomembranaires est dépendante de la prénylation de la protéine en C-terminal qui, une fois recrutée à la membrane, va s'activer *via* l'intervention de RabGEFs. Lorsque la protéine Rab a effectué son rôle au cours d'une étape du transport vésiculaire, des RabGAPs l'inactivent et des RabGDIs séquestrent la protéine Rab-GDP dans le cytoplasme jusqu'à son recrutement à la membrane et un nouveau cycle de transport (Schwartz et al. 2007).

Certaines protéines Rab sont impliquées dans le cancer comme par exemple Rab25 qui participe au recyclage des membranes internalisées à la membrane plasmique. Sa surexpression dans des cas de cancers du sein ou de l'ovaire est corrélée à un mauvais pronostic en favorisant la prolifération cellulaire et en diminuant l'apoptose (Cheng et al. 2005).

### 1.2.4. Ran

La famille Ran ne comprend qu'un seul gène codant pour la protéine Ran (Ras-like nuclear) dont le rôle principal est de réguler le transport nucléocytoplasmique des ARNs et de protéines (**Figure 15**) (Hahn and Schlenstedt 2011).

La protéine Ran est la petite GTPase la plus abondante de nos cellules et malgré des homologies de séquences avec la famille Rab, elle se différencie par son fonctionnement dépendant d'un gradient spatial de Ran-GTP nucléaire et de Ran-GDP cytoplasmique. Le cycle d'activation/inactivation de Ran est régulé par des RanGAPs cytoplasmiques et une RanGEF nucléaire, RCC1 (Regulator of Chromosome Condensation 1). RCC1 interagit avec Ran et la chromatine, catalyse l'échange du GTP en GDP, créant un gradient de concentration de Ran-GTP/Ran-GDP (Bischoff and Ponstingl 1991). La liaison du cargo à transporter dans le noyau se lie à une importine  $\alpha$  *via* une séquence NLS (signal de localisation nucléaire) et une importine  $\beta$ . Ce complexe protéique interagit avec un complexe de pore nucléaire afin de diffuser du cytoplasme vers le noyau. Une fois dans le noyau, le complexe s'associe à Ran-GTP induisant sa dissociation et donc la libération du cargo. Les importines forment un complexe avec Ran-GTP et une exportine pour retourner dans le cytoplasme. Ran-GTP sera alors hydrolysé dans le cytoplasme et les importines seront recyclées (Ding and Sepehrimanesh 2021).

Dans le noyau, Ran actif induit l'assemblage du fuseau mitotique et de l'enveloppe nucléaire ainsi que la réplication de l'ADN (Carazo-Salas et al. 2001 ; H.-Y. Li, Cao, and Zheng 2003).

Ran a été reportée comme dérégulée dans plusieurs types de tumeurs. Une augmentation de l'expression de Ran est retrouvée dans des cancers du foie, du sein ou encore de l'ovaire et cette augmentation est corrélée avec un mauvais pronostic en favorisant la prolifération des cellules ainsi que l'invasion des tissus et donc le développement de métastases (Boudhraa et al. 2020).

#### 1.2.5. Arf

La famille Arf (ADP Ribosylation Factors) comprend 30 membres, impliqués dans le transport intracellulaire mais aussi le remodelage du cytosquelette (**Figure 15**). Les GTPases Arf ne possèdent pas de modification de leur séquence au niveau C-terminal comme pour les familles Ras, Rho et Rab mais la modification post-traductionnelle intervient en N-terminal avec une myristoylation qui permet à Arf-GTP de se lier à la membrane (Colicelli 2004).



Certaines GTPases Arf sont dérégulées dans le cancer, comme par exemple les protéines Arf1 ou Sar1 surexprimées dans des cas de cancer du foie ou de la peau (He et al. 2002 ; H.-M. Chang et al. 2014). L'activation/inactivation de la protéine Arf1 est essentielle à la formation de vésicules dépendante du complexe COPI au niveau de l'appareil de Golgi. L'activation par la protéine ArfGEF GBF1 (Golgi Brefeldin A resistant guanine nucleotide exchange Factor 1) permet la formation de la vésicule par courbure de la membrane (Sager et al. 2021).

Sar1 est un membre du sous-groupe SARA (Smad Anchor for Receptor Activation) impliqué dans l'export des protéines nouvellement synthétisées dans le RE vers l'appareil de Golgi. Sar1 prend part au complexe COPII en contrôlant la formation de la vésicule après son activation par la GEF Sec12 et son recrutement à la membrane du RE (Kurokawa, Suda, and Nakano 2016).

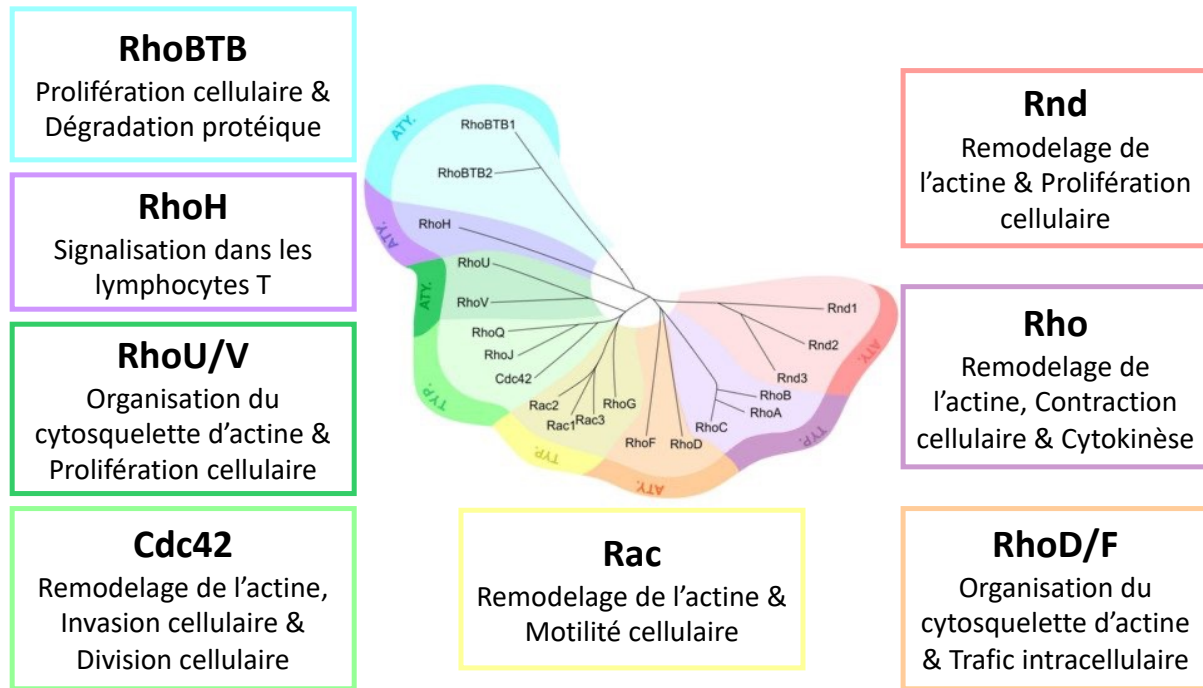
## 2. Les GTPases de la famille Rho

Environ 1% du génome humain code pour des protéines régulant ou régulées par les GTPases Rho. Ces protéines régissent la plupart des fonctions cellulaires fondamentales chez les eucaryotes *via* le remodelage du cytosquelette d'actine (Jaffe and Hall 2005 ; Mosaddeghzadeh and Ahmadian 2021).

Tout d'abord, je vous présenterai brièvement les différentes sous-familles de GTPases Rho puis les protéines régulant le cycle d'activation/inactivation des GTPases Rho. Ensuite, je détaillerai les effecteurs et les fonctions associées aux principaux régulateurs du cytosquelette d'actine que sont RhoA, Rac1 et Cdc42. Enfin, je terminerai avec les rôles physiologiques ainsi que les dérégulations pathologiques des GTPases Rho.

Les membres de la famille des GTPases Rho sont répartis en sous-familles selon leur structure ou le mécanisme de régulation de leur activité enzymatique (**Figure 16**) (Zubor et al. 2020). Les sous-familles Rho, Rac et Cdc42 sont les 3 sous-familles qui agissent en tant qu'interrupteurs moléculaires, ce sont les RhoGTPases dites classiques ou typiques. Cinq autres sous-familles complètent les GTPases Rho et diffèrent notamment par leur présence

préférentielle sous forme GTP. Ce sont les RhoGTPases « atypiques » : Rnd, RhoD/F, RhoH, RhoU/V et RhoBTB. Chez l'Homme, la plupart des GTPases Rho ont une expression ubiquitaire mais il y a des exceptions comme Rac2 ou RhoH exprimées préférentiellement dans les cellules de la lignée hématopoïétique (Wennerberg and Der 2004).



**Figure 16 : Arbre phylogénétique des membres de la famille des RhoGTPases.**

Selon leur mécanisme de régulation et leur structure, les GTPases de la famille Rho sont divisées en 8 familles. Les sous-familles Rho, Rac ainsi que Cdc42 sont les RhoGTPases « typiques » et fonctionnent comme des interrupteurs moléculaires. A l'inverse, les RhoGTPases « atypiques » Rnd, RhoD/RhoF, RhoU/RhoV, RhoH et RhoBTB sont présentes principalement sous leur forme active, liée au GTP. Adapté de Zubor et al. 2020.

## 2.1. La sous-famille Rho

La sous-famille Rho est composée de 3 protéines : RhoA, RhoB et RhoC. Ces protéines possèdent un fort degré d'homologie avec près de 90% d'homologie de séquence. Bien que ces 3 protéines contrôlent la contraction acto-myosique et le remodelage du cytosquelette d'actine, des différences de localisation (et donc de fonctions) surviennent par la divergence de séquence au niveau C-terminal de ces GTPases (**Figure 16**). Bien que RhoA, B et C s'associent, toutes les trois, à la membrane plasmique, RhoA et RhoC sont en plus retrouvées dans le cytosol. RhoB est présente au sein du système endomembranaire, notamment aux

membranes des vésicules et RhoC au niveau de structures périnucléaires (L. Wang et al. 2003 ; Michaelson et al. 2001).

Les principaux effecteurs de RhoA, RhoB et RhoC sont les kinases ROCKs (Rho-associated protein Kinase) et les formines mDia (Mammalian Diaphanous) impliquées dans la formation des adhésions focales et des fibres de stress (Narumiya and Thumkeo 2018).

## 2.2. La sous-famille Rac

La formation des lamellipodes et des replis membranaires est régulée par Rac1, Rac2, Rac3 et RhoG qui forment la sous-famille Rac (**Figure 16**). Rac2 et Rac3 partagent une très forte homologie de séquence avec Rac1, d'environ 88%, tandis que RhoG n'est homologue à Rac1 qu'à 72%. Rac1 et Rac3 se localisent au niveau de la membrane plasmique tandis que Rac2 est présent au niveau des membranes des compartiments intracellulaires dans les cellules de la lignée hématopoïétique (Mira et al. 2000 ; Tao et al. 2002).

De manière intéressante, RhoG et Rac1 collaborent : RhoG régule Rac1 en l'activant *via* la régulation de Cdc42 et ainsi, agit sur la formation du lamellipode. Par l'intervention de la RhoGEF DOCK180, RhoG active Rac1 et assure l'étalement de la cellule. C'est le cas par exemple dans les neurones où le signal donné par le NGF (Nerve Growth Factor) favorise la croissance des axones neuronaux (Katoh and Negishi 2003 ; El Atat, Fakih, and El-Sibai 2019).

Rac1 active principalement les kinases PAKs (p21-Activated Kinases) et le complexe WAVE intervenant dans la régulation du cytosquelette d'actine ou JNK (c-Jun N-terminal Kinase) en amont de la voie des MAPK.

## 2.3. La sous-famille Cdc42

Cdc42, RhoJ (ou TCL) et RhoQ (ou TC10) composent la sous-famille Cdc42 (Cell Division Cycle 42). Ils régulent le remodelage du cytosquelette d'actine et agissent sur la motilité ou la division des cellules (**Figure 16**). Cdc42 présente deux isoformes, résultat d'un épissage alternatif, qui diffèrent dans leur séquence C-terminale ainsi que dans leur expression. En

effet, Cdc42a est exprimée chez l'Homme de façon ubiquitaire tandis que le variant Cdc42b est retrouvé dans le cerveau.

RhoQ et RhoJ induisent la formation des filopodes tout comme Cdc42 en interagissant avec les protéines WASP, N-WASP et le complexe WAVE et en régulant le complexe Arp2/3. De plus, RhoJ, RhoQ et Cdc42 participent à la formation des podosomes dans un contexte de cellules endothéliales en réponse au VEGF notamment. *Via* l'activation de PKC (Protéine Kinase C), de LIMK (LIM domain Kinase) ou de PAK, les membres de la sous-famille Cdc42 interviennent dans l'angiogenèse en régulant la formation de nouveaux vaisseaux (Billottet et al. 2008 ; Shi, Li, and Xiao 2016).

Dans le cadre de la neurogenèse, les deux isoformes de Cdc42 ont un rôle. En effet, Cdc42a induit la formation des progéniteurs neuronaux par stimulation de l'activité du complexe mTORC1 et Cdc42b favorise la différenciation des neurones en diminuant l'expression de mTOR (mammalian Target Of Rapamycin) (Endo, Druso, and Cerione 2020).

Les membres de la sous-famille Cdc42 partagent de nombreux effecteurs mais leurs mécanismes de régulation divergent. En effet, Cdc42 subit une géranylgeranylation alors que RhoJ et RhoQ peuvent également être farnésylés au niveau du motif CAAX en C-terminal de leur séquence (Wennerberg and Der 2004).

## 2.4. Les GTPases Rho atypiques

Parmi les RhoGTPases atypiques, une distinction est à faire entre les RhoGTPases ayant une activité GTPasique défectueuse : Rnd, RhoH et RhoBTB et les RhoGTPases cyclant rapidement : RhoD/RhoF et RhoU/RhoV (**Figure 16**). Ces dernières sont majoritairement présentes sous une forme inactive tandis que les précédentes sont considérées comme constitutivement actives (Aspenström, Ruusala, and Pacholsky 2007). Ces RhoGTPases ne sont pas régulées par les 3 familles de protéines (GDI, GEF et GAP) comme les RhoGTPases classiques. Les GTPases atypiques seront l'objet de régulation d'expression principalement au niveau de la transcription.

Les membres de la sous-famille Rnd (pour « round ») ont une homologie de séquence proche de 60%. En activant la RhoGAP p190RhoGAP, Rnd1 et Rnd3 s'opposent aux fonctions associées à RhoA dans la contractilité cellulaire et sur la formation des fibres de stress et des adhésions focales (Wennerberg et al. 2003). Les Rnd sont présentes majoritairement à la membrane plasmique car elles sont constitutivement liées au GTP, leurs séquences présentent des mutations au niveau des sites de liaison du nucléotide guanidine ce qui empêche l'hydrolyse du GTP en GDP.

Au niveau du domaines CAAX, alors que les GTPases Rho sont majoritairement géranylgeranylées, les protéines Rnd sont farnésylées. Les GTPases Rnd sont également phosphorylées à proximité du motif C-terminal CAAX, engendrant des altérations de localisation et de fonction de ces GTPases atypiques (Mouly et al. 2019 ; Basbous et al. 2020). Les formes phosphorylées de Rnd1 et de Rnd3 interagissent avec la protéine 14-14-3 et la translocation de la membrane plasmique vers le cytoplasme.

### 3. Régulateurs des GTPases Rho

Le cycle GTP/GDP des GTPases de la famille Rho dites classiques est contrôlé par 3 familles de protéines régulatrices (GEFs, GAPs et GDIs). De plus, les RhoGTPases font l'objet de modifications post-traductionnelles pouvant réguler leur activité. Ainsi, plus de 150 protéines régulatrices agissent sur les RhoGTPases. Chacune des RhoGTPases peut donc être régulée par plusieurs de ces protéines. Des analyses structure/fonction ou de BioID (proximity-dependent biotin identification) couplée à de la spectrométrie de masse ont permis de mieux comprendre la régulation des GTPases Rho (Jaiswal, Dvorsky, and Ahmadian 2013 ; Amin et al. 2016 ; Bagci et al. 2020).

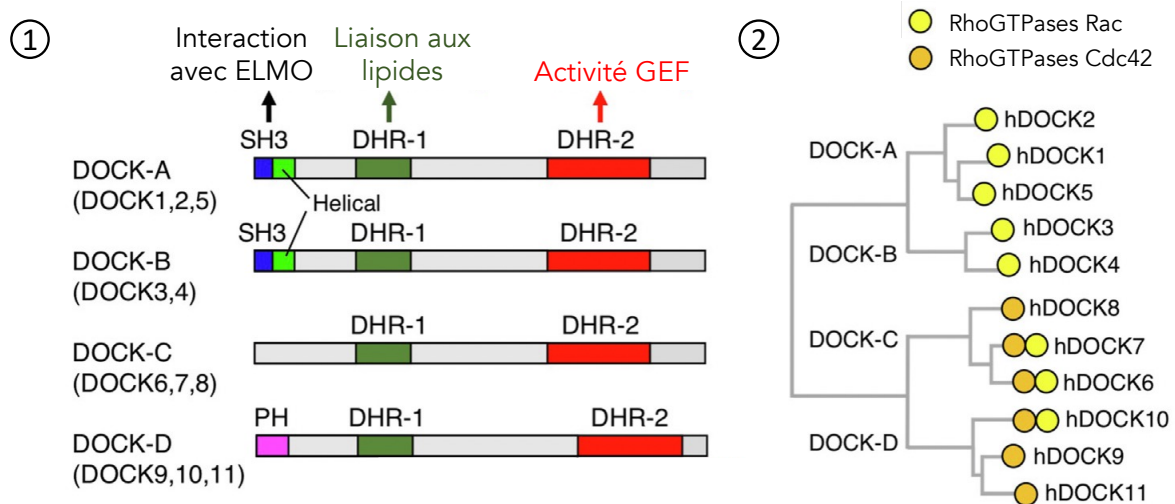
#### 3.1. Les RhoGEFs

La libération du GDP est un processus très lent qui est accéléré afin d'atteindre un niveau d'activation des RhoGTPases. L'échange du GDP en GTP est accéléré par les protéines régulatrices GEFs qui sont au nombre de 85 chez les eucaryotes. Ces protéines forment un complexe avec la RhoGTPase couplée au GDP en interagissant avec son domaine Switch II (Arrington et al. 2020). Le mécanisme d'action utilisé par les GEFs fragilise la liaison entre le

GDP et la GTPase Rho. Ensuite, la GEF entraîne le remplacement du GDP en GTP (Guo, Ahmadian, and Goody 2005). Il existe donc un état intermédiaire où la RhoGTPase est libre de tout nucléotide mais cette étape est très rapide du fait de la concentration intracellulaire importante en GTP et de l'affinité plus importante de la GTPase libre avec le GTP qu'avec la GEF. Il existe deux familles de GEFs : DOCK (Dedicator Of CytoKinesis) et DBL (Diffuse B-cell Lymphoma).

### 3.1.1. La famille DOCK

La famille DOCK comprend 11 membres (DOCK1-11) qui comportent deux domaines conservés (**Figure 17**). Un domaine de liaison aux phospholipides permet la localisation au niveau des membranes : DHR-1 (DOCK homology region 1) et un domaine catalytique induisant l'échange GDP-GTP : DHR-2 (DOCK homology region 2) (Côté et al. 2005). En N-terminal, les DOCK1-5 contiennent un domaine SH3 auto-inhibiteur capable d'interagir avec le domaine DHR-2. L'activation est engendrée par l'interaction avec la protéine ELMO (Engulfment and cell MOtility) qui change la conformation de la protéine DOCK et lui permet de jouer son rôle de GEF (Liu et al. 2013 ; L. Chang et al. 2020).



**Figure 17 : Les protéines RhoGEFs de la famille DOCK.**

(1) Représentation de la séquence multi-domaine des protéines DOCK et sa répartition en 4 sous-familles. Les domaines DHR-1 et DHR-2 sont conservés pour les différentes sous-familles des DOCK, HDR-1 se lie aux phospholipides et HDR-2 confère l'activité GEF. En N-terminal, le domaine SH3 permet l'auto-inhibition des DOCK-A et DOCK-B par la liaison avec la protéine ELMO.

(2) Arbre phylogénétique des RhoGEFs de la famille DOCK. Les DOCK-A et DOCK-B régulent spécifiquement les protéines Rac alors que les DOCK-C et DOCK-D activent également les protéines Cdc42.

Adapté de Kukimoto-Niino et al. 2021.

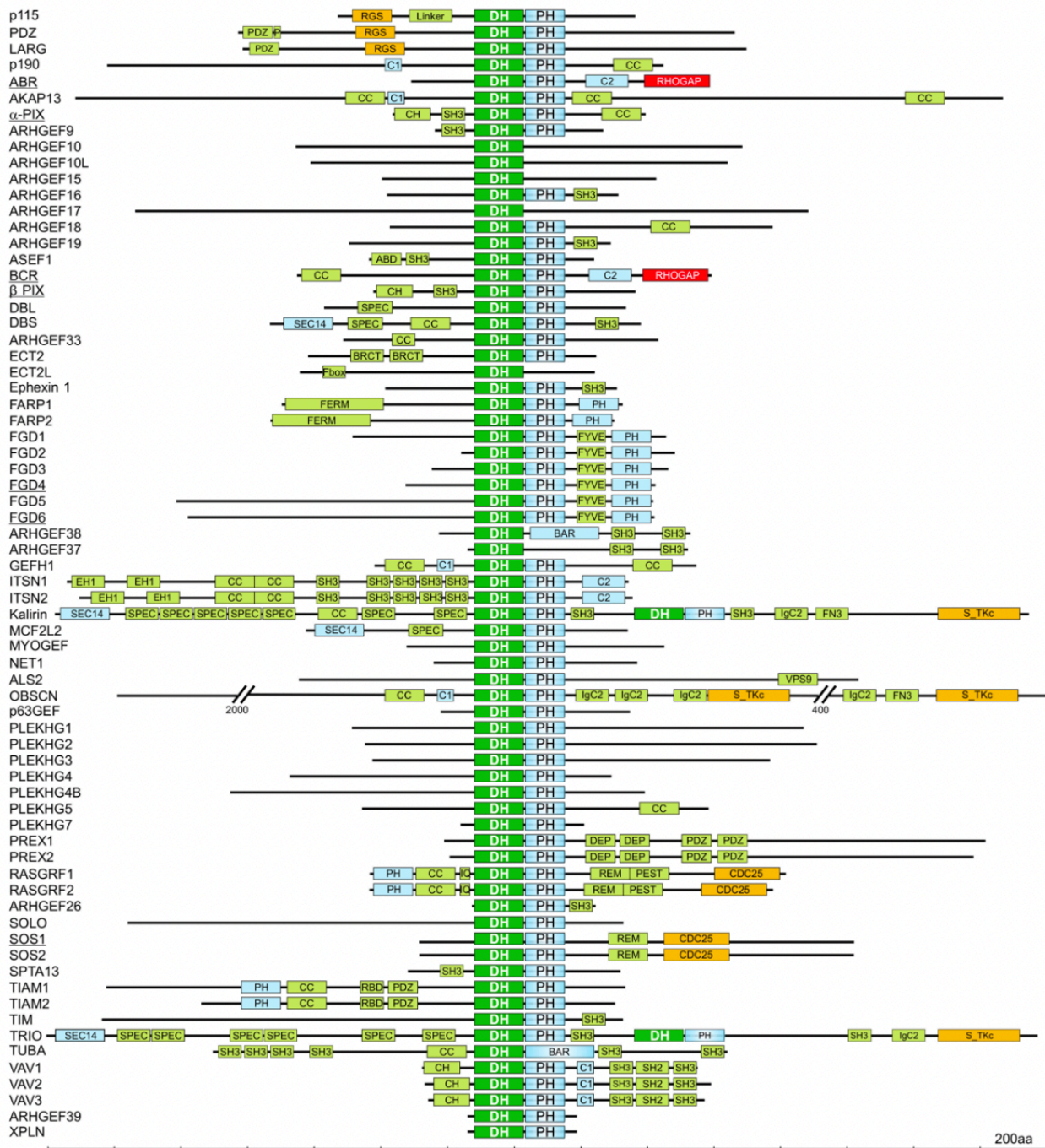
Quatre sous-familles composent les DOCK : DOCK-A, DOCK-B, DOCK-C et DOCK-D. Les GEFs DOCK-A et DOCK-B activent préférentiellement les protéines Rac alors que les DOCK-C et DOCK-D activent les RhoGTPases Cdc42 mais pas les autres RhoGTPases (**Figure 17**) (Côté and Vuori 2002 ; Kukimoto-Niino et al. 2021).

Les protéines DOCK interviennent dans différents processus biologiques (de façon dépendante ou indépendante de leur activité GEF) comme au cours du développement cérébral ou dans la polymérisation de l'actine. DOCK1 se coordonne avec Rac1, Rac2 et ELMO pour former un complexe capable d'induire la polymérisation de l'actine, la migration et l'invasion dans un contexte cellulaire de cancer du sein (H. Li et al. 2013). DOCK2 et DOCK8, par l'activation des RhoGTPases Rac et Cdc42 respectivement, induisent notamment la polymérisation de l'actine et la migration des cellules dendritiques, la production de ROS dans les neutrophiles. L'activation de Rac dans des lymphocytes T permet également la polarisation de la cellule. La polarisation favorise la formation de la synapse immunologique pour transmettre et contrôler l'activation du lymphocyte T (Kunimura, Uruno, and Fukui 2019).

### 3.1.2. La famille DBL

La seconde famille de RhoGEFs comprend 74 membres : elle constitue la famille DBL. La première protéine de cette famille a été isolée au cours d'un criblage d'oncogènes dans des cellules issues de lymphome diffus à grandes cellules B (Srivastava et al. 1986 ; Cook, Rossman, and Der 2014). Cette famille de RhoGEFs est caractérisée par la présence d'un domaine DH (DBL Homology) qui catalyse l'échange du GDP en GTP (**Figure 18**) (Rossman, Der, and Sondek 2005 ; Jaiswal, Dvorsky, and Ahmadian 2013). Le domaine DH est suivi d'un domaine PH (Pleckstrin Homology), pour la majorité des protéines DBL. Le domaine PH est responsable de son auto-inhibition par masquage du site d'interaction avec la GTPase. Par un ancrage à la membrane des RhoGEFs, le domaine PH favorise l'interaction avec la RhoGTPase et donc son activation (Rossman, Der, and Sondek 2005).

En plus de ce tandem DH-PH, les protéines DBL possèdent différents domaines responsables de différentes fonctions et de la régulation spatio-temporelle de ces protéines (**Figure 18**). Par exemple, les domaines SH2, SH3, CH, RGS, PDZ et IQ sont des domaines d'interaction protéique. D'autres domaines comme les domaines BAR, PH FYVE, CC et C2



**Figure 18 : Organisation multi-domaine des protéines RhoGEFs de la famille DBL.**

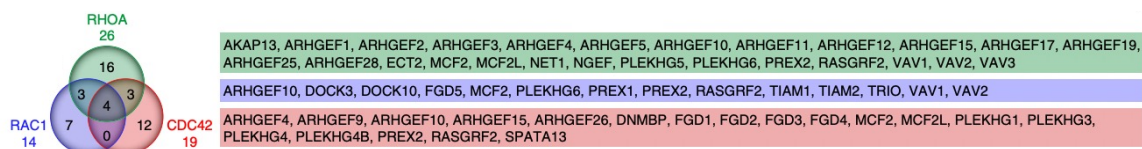
Les protéines DBL sont des RhoGEFs composées de plusieurs domaines fonctionnels pouvant conférer des réactions croisées entre les protéines Rho et d'autres voies de signalisation. Un tandem DH-PH, deux domaines conservés permettant la liaison au substrat et son activité GEF pour le domaine DH (vert) et un domaine PH d'ancrage à la membrane (bleu) est présent dans la plupart des protéines DBL. D'autres domaines fonctionnels interviennent dans l'interaction avec la membrane ou les lipides (bleu), avec des protéines (vert clair). Certains domaines confèrent des activités enzymatiques (rouge et orange). En bas, une barre d'échelle incrémentée tous les 200 acides aminés est présente.

Adapté de Mosaddeghzadeh et Ahmadian 2021.



favorisent l'interaction avec les phospholipides membranaires. Enfin, des domaines possèdent des activités enzymatiques de phosphorylation des Thréonines/Sérines, une activité GAP vis-à-vis des RhoGTPases ou même des activités GEF envers d'autres GTPases (Ras ou Ran) (Rossman, Der, et Sondek 2005 ; Cook, Rossman, and Der 2014 ; Mosaddeghzadeh and Ahmadian 2021). Ainsi, ces différents domaines participent à l'autorégulation des RhoGEFs et leur confèrent des modifications de localisation, d'activation ou de fonction.

Les protéines DBL sont divisées en plusieurs sous-familles selon leur spécificité vis-à-vis des RhoGTPases avec notamment 35 DBL mono-spécifiques d'une RhoGTPase classique, 6 bispécifiques pour les GTPases et 4 multi-spécifiques de plusieurs RhoGTPases classiques (**Figure 19**) (Jaiswal, Dvorsky, and Ahmadian 2013 ; Müller et al. 2020).



**Figure 19 : Spécificité des substrats des protéines RhoGEFs de la famille DBL.**

Diagramme de Venn représentant la spécificité des protéines DBL vis-à-vis des RhoGTPases. 16 DBL sont spécifiques de RhoA (vert), 7 de Rac1 (bleu) et 12 de Cdc42 (rouge), 6 sont spécifiques de 2 RhoGTPases et 4 sont multi-spécifiques.

Adapté de Müller et al. 2020.

### 3.1.3. Régulation des protéines RhoGEFs

Il existe plus de RhoGEFs que de RhoGTPases à activer, ce qui suggère que l'activation des RhoGTPases par les RhoGEFs constitue un niveau de régulation. La régulation des RhoGEFs intervient à plusieurs niveaux : par leur expression, par translocation dans un compartiment spécifique où est présente la GTPase à activer. La régulation des RhoGEFs peut également se faire par libération de leur auto-inhibition découvrant leur site de liaison à la GTPase ou en induisant des modifications structurales dans le domaine catalytique (Bos, Rehmann, and Wittinghofer 2007). L'expression de ces protéines ainsi que leur localisation subcellulaire régulent les voies de signalisation pouvant se différencier ou se coordonner vis-à-vis de l'activation spatio-temporelle des RhoGTPases.

Des seconds messagers comme l'AMP cyclique ou bien le calcium, intervenant dans la transduction du signal, sont des régulateurs des RhoGEFs. En effet, le calcium a un rôle dans

la signalisation de RhoA en induisant la phosphorylation de PDZ-RhoGEF par Pyk2 (Pyruvate Kinase 2) et donc son activation conduisant à l'activation de RhoA (Derewenda et al. 2004). La liaison de PIP (Phosphatidylinositol phosphates) au domaine PH contribue en partie à l'ancrage à la membrane de SOS et influe sur son activité catalytique alors que cela ne modifie pas l'activité GEF de Dbs ou Tiam1 (Innocenti et al. 2003 ; Bos, Rehmann, and Wittinghofer 2007).

De manière intéressante, l'analyse des structures des RhoGEFs DBL pointe le fait que les domaines PH-DH puissent se replier différemment tout en ayant une forte homologie de séquence et la capacité d'interagir avec le domaine G des protéines Rho. Ainsi, le domaine PH de SOS a une fonction auto-inhibitrice en masquant le domaine DH d'interagir avec la GTPase et l'empêchant d'effectuer son rôle de GEF, tandis que le domaine PH de Dbs, PDZ-RhoGEF, Trio ou LARG (Leukemia-Associated RhoGEF) catalyse le déplacement du GDP (Rossman, Der, and Sondek 2005). Les protéines GEFs SOS régulent différemment l'activation de Ras et de Rac. L'activité GEF de SOS est auto-inhibée par le masquage du site d'interaction à la GTPase par le domaine PH de SOS et nécessite l'intervention de protéines pour lever cette inhibition. La région d'interaction de SOS étant la même pour Ras et Rac, les activations de Rac et de Ras sont donc mutuellement distinctes (Innocenti et al. 2002). L'activation de Ras demande l'interaction de SOS avec Grb2 tandis que l'activité Rac-GEF requiert l'interaction de SOS avec le complexe Abi1/E3B1, Eps8 et PI3K (Innocenti et al. 2003).

Enfin, les modifications post-traductionnelles de phosphorylation et d'ubiquitination des protéines RhoGEFs font varier leur activité enzymatique, c'est le cas des protéines Vav. Dans leur partie N-terminale, les protéines Vav présentent un domaine acide (Ac) contenant des tyrosines conservées qui s'auto-inhibent par interaction avec le domaine DH.

La phosphorylation de la tyrosine en position 174 (nomenclature de Vav1) par Lck ou Src déstabilise l'interaction Ac-DH, dévoile et active le domaine catalytique (Rodríguez-Fdez and Bustelo 2019). Ce domaine Ac n'est pas présent dans toutes les RhoGEFs mais des régions phosphorylables similaires sont retrouvées dans les RhoGEFs.

Les protéines Vav sont également la cible d'ubiquitination, notamment par la protéine Cbl (E3 ubiquitin ligase Casitas B Lymphoma). Cbl intervient dans la dégradation de Vav2 en favorisant son ubiquitination soit en formant un complexe avec Vav2 et EGFR phosphorylés ou directement en ciblant la tyrosine 700. Dans un contexte de cellules épithéliales de sein, la

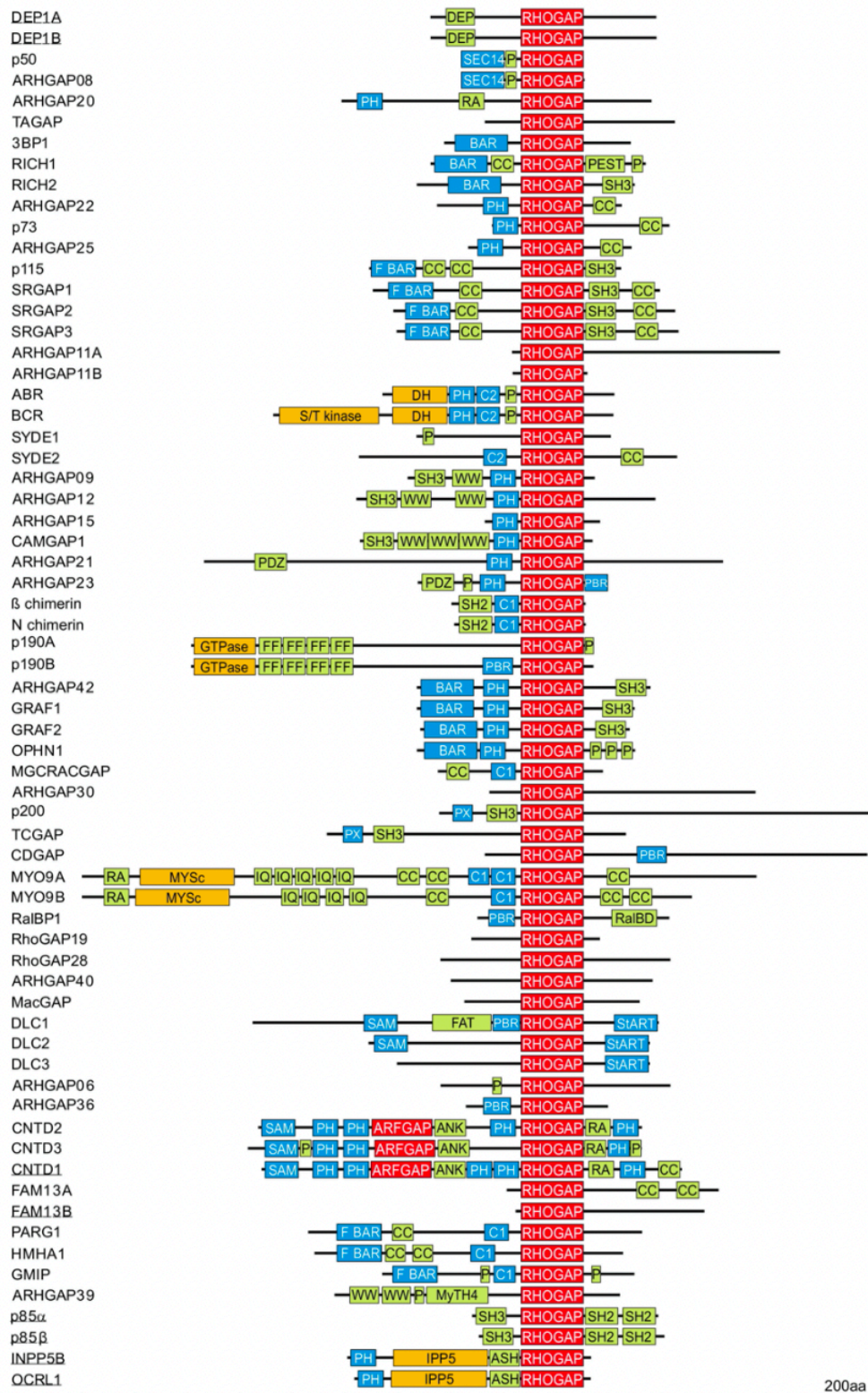
dégradation de Vav2 a pour effet de diminuer l'activation de Rac1 et Cdc42 et ainsi de déstabiliser le cytosquelette d'actine au niveau des jonctions adhérentes et de diminuer la migration cellulaire (Duan et al. 2011 ; Hodge and Ridley 2016). La régulation des modifications post-traductionnelles de ces protéines est donc une cible dans le traitement de cancer.

### 3.2. Les RhoGAPs

Les petites GTPases ayant une activité GTPasique intrinsèque lente, les protéines GAP agissent pour catalyser cette réaction d'hydrolyse du GTP en GDP. Les GAPs sont des régulateurs négatifs des GTPases et 66 protéines sont dénombrées au sein de cette famille. La première RhoGAP identifiée p50 (ou p50RasGAP) a été mise en évidence dans des extraits de cellules humaines de rate par analyse biochimique utilisant une protéine recombinante RhoA (Garrett et al. 1989). Les RhoGAPs, comme les RhoGEFs, sont des protéines à multi-domaines. Le domaine conservé RhoGAP leur confère leur activité catalytique. Ce domaine RhoGAP (ou GAP) permet la régulation des RhoGTPases, en interagissant avec la RhoGTPase liée au GTP (**Figure 20**).

Le domaine RhoGAP des différentes protéines RhoGAPs présente un fort degré d'homologie de séquences et comprend deux résidus basiques essentiels à sa fonction : l'arginine en position 282 (appelée arginine catalytique) et la lysine en position 319 (d'après la nomenclature de p50RhoGAP).

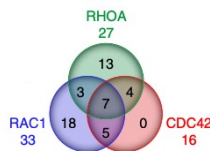
Une analyse de la séquence, de la structure et de la fonction des RhoGAPs et des protéines Rho a montré que le domaine GAP n'était pas sélectif de son substrat et que d'autres domaines interviennent dans cette spécificité et dans la régulation de l'activité GTPasique. Tout comme les RhoGEFs, il existe plus de RhoGAP que de RhoGTPases, 31 RhoGAPs sont spécifiques de RhoA ou Rac1, 12 sont bispécifiques et 7 d'entre elles peuvent réguler les différentes RhoGTPases (**Figure 21**) (Müller et al. 2020).



**Figure 20 : Organisation multi-domaine des protéines RhoGAPs.**

Les RhoGAPs sont composées de plusieurs domaines fonctionnels pouvant conférer des réactions croisées entre les protéines Rho et d'autres voies de signalisation. Hormis le domaine catalytique GAP (rouge), d'autres domaines fonctionnels interviennent dans l'interaction avec la membrane ou avec les lipides (bleu), avec des protéines (vert clair). D'autres domaines confèrent des activités enzymatiques (rouge et orange). En bas, une barre d'échelle incrémentée tous les 200 acides aminés est présente. Les protéines soulignées sont des « GAP-like » et ne présentent pas d'activité RhoGAP.

Adapté de Mosaddeghzadeh et Ahmadian 2021.



ARAP2, ARHGAP1, ARHGAP5, ARHGAP6, ARHGAP8, ARHGAP10, ARHGAP11A, ARHGAP11B, ARHGAP19, ARHGAP20, ARHGAP21, ARHGAP22, ARHGAP23, ARHGAP26, ARHGAP28, ARHGAP29, ARHGAP30, ARHGAP31, ARHGAP35, ARHGAP40, DLC1, GMIP, MYO9A, MYO9B, STARD8, STARD13, TAGAP
ARAP1, ARAP2, ARAP3, ARHGAP4, ARHGAP9, ARHGAP12, ARHGAP15, ARHGAP20, ARHGAP22, ARHGAP23, ARHGAP27, ARHGAP30, ARHGAP31, ARHGAP33, ARHGAP35, ARHGAP39, ARHGAP44, CHN1, CHN2, FAM13A, FAM13B, GMIP, MYO9B, RACGAP1, RALBP1, SH3BP1, SRGAP1, SRGAP2, SRGAP3, SYDE2, TAGAP, ABR, BCR
ARAP1, ARAP2, ARAP3, ARHGAP1, ARHGAP11B, ARHGAP20, ARHGAP22, ARHGAP30, ARHGAP31, ARHGAP39, ARHGAP40, FAM13B, GMIP, MYO9B, SRGAP2, STARD8

**Figure 21 : Spécificité des substrats des protéines RhoGAPs.**

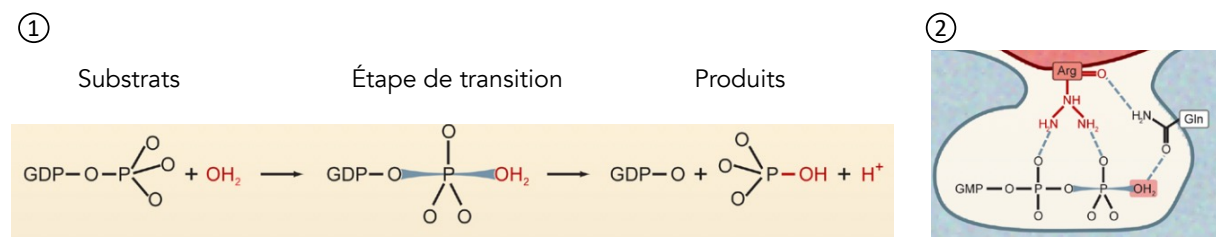
Diagramme de Venn représentant la spécificité des protéines RhoGAPs vis-à-vis des RhoGTPases. 13 RhoGAPs sont spécifiques de RhoA (vert), 18 de Rac1 (bleu) et aucune de Cdc42 (rouge), 12 sont spécifiques de 2 RhoGTPases et 7 sont multi-spécifiques.

Adapté de Müller et al. 2020.

### 3.2.1. Mécanisme d'hydrolyse du GTP

Un mécanisme d'hydrolyse du GTP similaire à celui présenté pour les petites GTPases au début de ce chapitre a été mis en évidence pour les RhoGAPs qui interagissent avec la boucle P et les domaines Switch des protéines Rho (**Figures 13&22**). En effet, l'activité RhoGAP engendre un changement de conformation des domaines Switch I et Switch II des RhoGTPases qui accélère l'hydrolyse du GTP.

D'une part, le résidu arginine en position 282 (nomenclature de p50RasGAP) dans le domaine GAP s'insère directement au niveau du site actif de la RhoGTPase. Cela permet d'établir le lien avec la glycine 12 (nomenclature de Rac1) et de stabiliser l'étape de transition au cours de l'hydrolyse du GTP (**Figure 22**).



**Figure 22 : Mécanisme d'hydrolyse du GTP par les protéines RhoGAPs.**

(1) Représentation schématique de l'hydrolyse du GTP avec une étape de transition associative suivie d'une attaque nucléophile du  $\text{OH}^-$  amenant à la libération du phosphate  $\gamma$  du GTP.

(2) L'hydrolyse de GTP en GDP catalysée par les protéines RhoGAPs (rouge) fait intervenir une arginine dans le domaine G, site actif de la GTPase (bleu). Des résidus tyrosine et glutamine présents dans les domaines Switch I et Switch II de la GTPase sont essentiels.

Adapté de Bos, Rehmann, et Wittinghofer 2007.

D'autre part, cette interaction neutralise les charges négatives du phosphate  $\gamma$  du GTP au cours de cet état transitoire d'hydrolyse. L'interaction met en jeu une glutamine conservée, Gln63 (nomenclature de RhoA), qui peut coordonner l'attaque nucléophile libérant le phosphate  $\gamma$  (**Figure 22**).

L'arginine catalytique, indispensable à l'activité GAP, n'est pas présente pour l'ensemble des RhoGAPs. Par exemple CNTD1, ArhGAP36, DEP1 ou encore OCRL1 ne possèdent pas cette arginine dans leur domaine GAP les rendant inactives d'un point de vue enzymatique (Müller et al. 2020). Cependant, ces RhoGAPs ont des fonctions indépendamment de leur domaine GAP. Par exemple, ArhGAP36 régule l'activation du facteur de transcription GLI (Glioma-associated homolog) impliqué dans la voie de signalisation Sonic Hedgehog.

### 3.2.2. Régulation des RhoGAPs

Étant donné qu'une protéine RhoGAP régule plusieurs RhoGTPases, une fine régulation dans l'espace et dans le temps est nécessaire. La présence de nombreux domaines au sein des RhoGAPs confère des fonctions spécifiques aux protéines RhoGAPs. Ces domaines fonctionnels peuvent être classés en 3 groupes : domaines d'interaction à la membrane ou aux lipides (par exemple, les domaines PH, BAR, C1, C2 ou BAR, ...), domaines de liaison aux protéines (comme les domaines SH2, SH3, PDZ, WW, FF, ...) et domaines ayant une activité enzymatique GTPase ou kinase par exemple (**Figure 20**). Des modifications post-traductionnelles comme la phosphorylation, l'ubiquitination ou la sumoylation entrent en jeu pour moduler l'activité GTPasique de ces protéines.

Les protéines CNTD ou ARAP (Arf-GAP with Rho-GAP domain, ANK repeat, and PH domain-containing protein) sont des GAPs d'Arf6 mais également de RhoA. L'activation d'Arf6 dépend de l'interaction avec des phospholipides au niveau du 1<sup>er</sup> domaine PH. L'activation de RhoA est dépendante de l'interaction du domaine PH de CNTD avec la petite GTPase Rap1-GTP. Cette interaction CNTD/Rap1-GTP permet la levée de l'auto-inhibition de l'activité RhoGAP par le domaine PH. Les résidus arginine 942, l'arginine catalytique du domaine RhoGAP, et arginine 982 sont indispensables pour l'interaction de CNTD1 et CNTD3 avec les résidus Asp90 et Glu97 de RhoA. Pour CNTD2, RhoA-GTP peut se fixer mais l'activité RhoGAP

est perdue par l'absence de l'arginine 942 (catalytique) substituée par une glutamine (H. Bao et al. 2016).

A l'instar des protéines CNTD, d'autres RhoGAPs sont capables de s'auto-inhiber par repliement intramoléculaire. C'est le cas pour les protéines GRAF (GTPase regulator associated with focal adhesion kinase) et OPHN1 (Oligophrenin-1), dont le masquage du domaine PH par le domaine BAR (Bin/amphiphysin/Rvs) entraîne une diminution de l'activité GAP et donc un remodelage du cytosquelette d'actine (Eberth et al. 2009 ; Elvers et al. 2012).

L'interaction de plusieurs RhoGAPs avec p120RasGAP, une GAP de Ras, modulent l'activité RhoGAP. En effet, le domaine SH3 de p120RasGAP diminue l'activité RhoGAP de DLC1 en interagissant avec son domaine GAP et en masquant l'arginine catalytique (Jaiswal et al. 2014). De la même manière, en réponse à l'adhésion cellulaire médiée par les intégrines, la kinase Arg (Abl-related gene) est activée et phosphoryle la tyrosine 1105 de p190RhoGAP-A. La phosphorylation de la tyrosine Y1105 permet l'interaction de p190RhoGAP-A avec p120RasGAP. Cette interaction est nécessaire au recrutement à la membrane plasmique de p190RhoGAP-A où elle régule négativement RhoA (W. D. Bradley et al. 2006).

### 3.2.3. Modifications post-traductionnelles des RhoGAPs

Des modifications post-traductionnelles affectent les protéines RhoGAPs comme l'ubiquitination ou la phosphorylation. La protéine APC/C (anaphase-promoting complex/cyclosome) induit la dégradation par le protéasome des protéines MgcRACGAP et p190RhoGAP au cours du cycle cellulaire, en fin de mitose, par ubiquitination. L'expression de ces deux RhoGAPs est modulée au cours du cycle cellulaire de façon à réguler l'activation des RhoGTPases et permettre la progression du cycle cellulaire et une division correcte des cellules. L'absence de dégradation lors de la cytokinèse de ces RhoGAPs entraîne un mauvais positionnement de l'anneau contractile et ainsi une division inégale des cellules filles (Nishimura et al. 2013 ; Su, Agati, and Parsons 2003). L'activateur d'APC/C, Cdh1, régule également la motilité cellulaire en favorisant l'ubiquitination de p190RhoGAP. La délétion de Cdh1 entraîne un remodelage du cytosquelette d'actine dépendant de la voie p190RhoGAP/Rho/ROCK (Naoe et al. 2010).

La phosphorylation des RhoGAPs joue un rôle dans l'activité GTPasique de la protéine mais aussi dans des fonctions indépendantes des RhoGTPases. Ainsi, la phosphorylation de p190RhoGAP sur la tyrosine 308 par PDGFR induit la libération de son interaction avec le facteur de transcription TFII, ce qui provoque sa translocation dans le noyau et l'activation de la transcription de ses gènes cibles (Jiang et al. 2005). La kinase Erk cible plusieurs RhoGAPs avec des effets différents sur l'activité GAP. En effet, Erk augmente l'activité GAP de DLC1 par exemple tandis qu'Erk inhibe l'activité GAP de p190RhoGAP ou CdGAP (Ravi et al. 2015 ; Pullikuth and Catling 2010 ; Tcherkezian et al. 2005).

Les protéines RhoGAPs ont un rôle essentiel dans la régulation des RhoGTPases et sur la signalisation sous-jacente, notamment le remodelage du cytosquelette d'actine. Parmi elles, les deux isoformes p190RhoGAP, p190RhoGAP-A & p190RhoGAP-B, les principaux régulateurs négatifs de RhoA, feront l'objet d'une description plus détaillée dans le troisième chapitre de cette introduction.

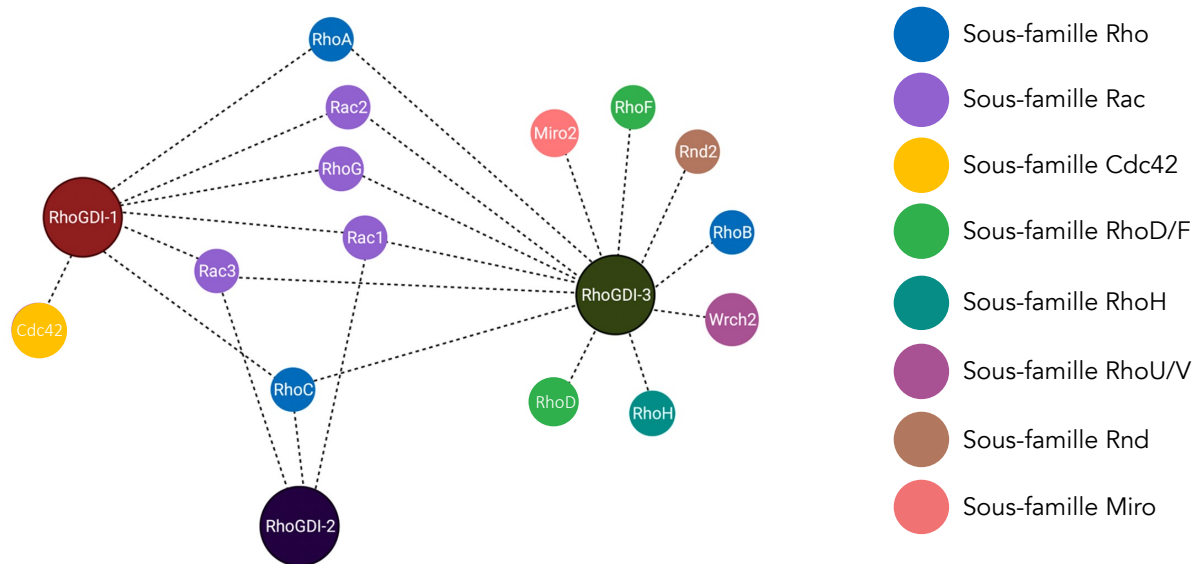
### 3.3. Les RhoGDIs

A la différence des RhoGEFs et des RhoGAPs, les RhoGDIs sont peu nombreuses : seulement 3 sont codées par le génome humain. Les RhoGDIs ne sont pas exprimées de façon ubiquitaire hormis GDI1 (ou GDI $\alpha$ ) (Mosaddeghzadeh and Ahmadian 2021). GDI2 (ou GDI $\beta$ ) est présente dans les cellules de la lignée hématopoïétique tandis que GDI3 (ou GDI $\gamma$ ) est exprimée préférentiellement dans le cerveau, les poumons et le pancréas (Guillemot et al. 1996 ; Morin et al. 2010).

Le rôle des GDIs est de séquestrer dans le cytoplasme les RhoGTPases en formant un complexe inhibiteur. La libération de cette interaction entraîne le recrutement de la GTPase Rho au niveau des membranes (plasmique ou des compartiments intracellulaires). Les RhoGTPases, alors actives, activent les voies de signalisation en aval. Mais les RhoGDIs permettent de maintenir un pool de RhoGTPases, dans le cytosol, prêtes à être activées, par prévention de leur dégradation protéique (Boulter et al. 2010 ; Mosaddeghzadeh and Ahmadian 2021). Étant donné qu'il existe un nombre plus important de RhoGTPases que de



RhoGDIs, chaque GDI cible et interagit avec plusieurs RhoGTPases (**Figure 23**). Ainsi, GDI1 interagit avec les GTPases de la sous-famille Rac, RhoA, RhoC ainsi que Cdc42 alors que GDI2 régule directement RhoC, Rac1 et Rac3 (Ahmad Mokhtar et al. 2021).



**Figure 23 : Interactome des RhoGDIs.**

Les 3 RhoGDIs codées par le génome humain régulent les différentes RhoGTPases. GDI1 et GDI2 régulent les RhoGTPases classiques tandis que GDI3 interagit également avec les RhoGTPases atypiques.

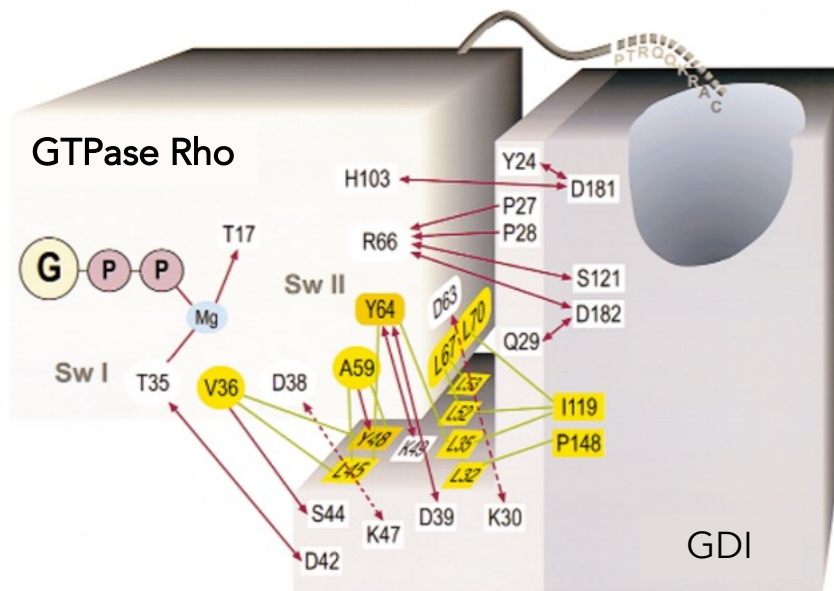
Adapté de Ahmad Mokhtar et al. 2021.

Les RhoGDIs ont une localisation cytosolique mais GDI3 est également retrouvée au niveau de la membrane des vésicules circulant de l'appareil de Golgi à la membrane plasmique (Mosaddeghzadeh and Ahmadian 2021). La présence d'une hélice  $\alpha$  dans la partie N-terminale de GDI3 explique cette localisation où GDI3 séquestre et délivre spécifiquement RhoG à la membrane Golgienne afin de contrôler le trafic vésiculaire (Brunet, Morin, and Olofsson 2002 ; Morin et al. 2010). En plus de réguler les GTPases de la sous-famille Rho et Rac, GDI3 interagit avec des RhoGTPases atypiques comme RhoH, Rnd2 ou encore RhoV ce qui le différencie des deux autres GDIs mais la fonction de ces interactions est peu connue (**Figure 23**) (Ahmad Mokhtar et al. 2021).

### 3.3.1. Mécanisme d'action des RhoGDIs

Deux sites d'interaction permettent la formation du complexe RhoGTPase/GDI. Une séquence dans la partie N-terminale de la GDI se lie aux domaines Switch des RhoGTPases et

empêche ainsi l'hydrolyse du GTP et la dissociation du GDP (Grizot et al. 2001 ; Dransart et al. 2005). Les résidus Thr35 et Val36 dans le domaine Switch I et les résidus Ala59, Tyr64, Arg66, Leu67 et Leu70 dans le domaine Switch II sont conservés chez les RhoGTPases et impliqués dans l'interaction GTPase/GDI (nomenclature de Rac1) (**Figure 24**). Lorsque ces résidus sont mutés, l'interaction est inhibée (Ahmad Mokhtar et al. 2021). Une poche hydrophobe cible les RhoGTPases géranylgeranyllées et libère l'interaction entre la membrane et la GTPase active (**Figure 24**) (Scheffzek et al. 2000). Les processus d'isoprénylation peuvent donc être régulés par les GDIs qui vont engendrer la dissociation de la GTPase avec la membrane et maintenir dans le cytosol une protéine inactive en les protégeant d'une activation par les RhoGEFs ou de la dégradation. La régulation de l'interaction RhoGTPase/GDI est donc nécessaire et implique différents mécanismes.



**Figure 24 : Interactions impliquées dans le complexe GTPase/RhoGDI.**

Vue d'ensemble des principales interactions identifiées entre les RhoGTPases (ici Rac1) et une RhoGDI. Une poche hydrophobe au sein de la GDI (gris) permet son interaction avec un motif géranylgeranyl associé à la GTPase. Les résidus polaires sont indiqués sur un fond blanc et les résidus hydrophobes sur un fond jaune.

Adapté de Scheffzek et al. 2000.

L'action des RhoGDIs est exclusive des RhoGEFs. En effet, les analyses de structure 3D de l'interaction des RhoGTPases avec les RhoGEFs et les RhoGDIs montrent que ces deux familles régulatrices interagissent avec les RhoGTPases au niveau des domaines Switch I et II. Ceci suggère que les deux types d'interaction ne peuvent pas être simultanées, elles sont

exclusives (Garcia-Mata, Boulter, and Burridge 2011). Par un phénomène de compétition, avec des interactions protéine-protéine, la dissociation du complexe RhoGDI/RhoGTPase peut être possible. Par compétition avec les RhoGTPases, notamment avec RhoA, les protéines d'ancrage de la famille ERM s'associent aux RhoGDIs et libèrent les RhoGTPases induisant leur activation (Takahashi et al. 1997).

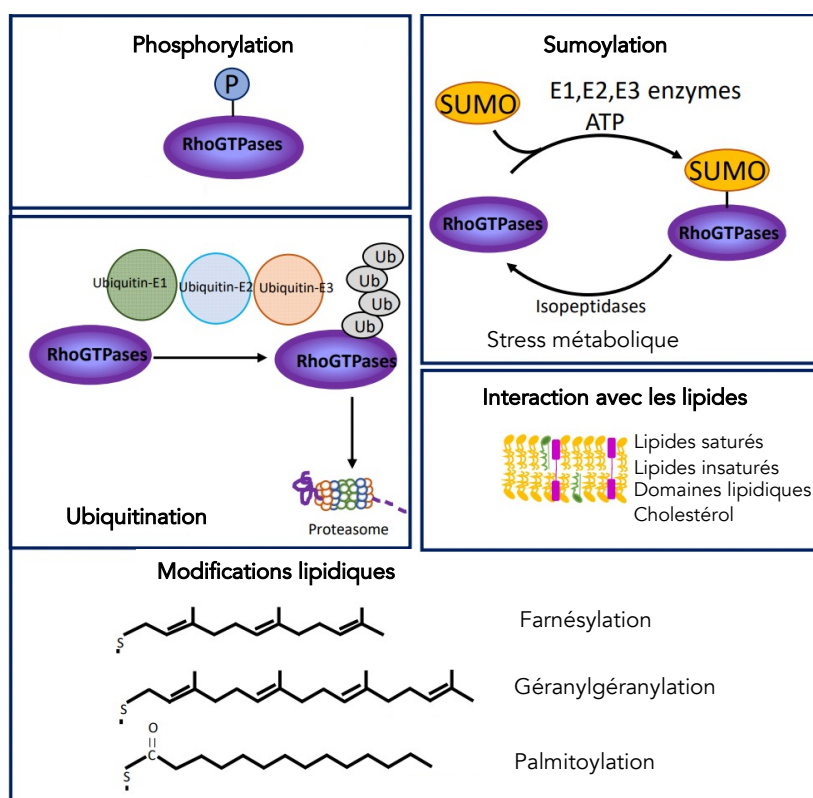
### 3.3.2. Régulation des RhoGDIs

Plusieurs kinases ont été démontrées comme ayant une activité inhibitrice sur les RhoGDIs car la phosphorylation (majoritairement au niveau des deux domaines d'interaction avec les RhoGTPases) entraîne une baisse de l'affinité de la RhoGDI pour la RhoGTPase. Ceci favorise ainsi la libération de la GTPase, ce qui permet son activation. Dans certains cas, la phosphorylation permet la séquestration et l'inactivation de la RhoGTPase dans le cytosol. La kinase PKC $\alpha$  phosphoryle GDI1 au niveau de la sérine 34, libérant et favorisant l'activation de RhoA tandis que l'affinité pour Rac1 ou Cdc42 n'est pas altérée (Dovas et al. 2010). Cette sérine est située dans la région régulatrice N-terminale des RhoGDIs qui interagit avec le domaine Switch II des RhoGTPases. La phosphorylation par PAK1 des sérines 101 et 174 de GDI1 diminue son affinité pour Rac1 promouvant sa libération et son activation alors que cela ne modifie pas l'affinité de GDI1 pour RhoA (DerMardirossian, Schnelzer, and Bokoch 2004). Ces deux sérines sont présentes dans la poche hydrophobique suggérant que leurs phosphorylations perturbent l'interaction au niveau de la région isoprénylée de la RhoGTPase (Hoffman, Nassar, and Cerione 2000).

Un mécanisme lipidique régule l'interaction RhoGTPase/RhoGDI en favorisant l'ouverture des GDIs libérant ainsi la RhoGTPase. Ce mécanisme a notamment été montré pour Rac1. En effet, lors de l'adhésion cellulaire, les intégrines envoient un signal de dissociation du GDI. La GTPase Rac1 est alors recrutée au niveau d'un raft lipidique, au niveau du site de contact entre les intégrines et la MEC, afin que Rac1 s'associe à ses effecteurs et les active. (Del Pozo et al. 2002 ; Del Pozo et al. 2004). Ainsi, les RhoGDIs régulent également les fonctions des RhoGTPases en contrôlant leur activité spatio-temporelle.

### 3.4. Modifications post-traductionnelles des GTPases Rho

Des régulations post-traductionnelles régulent la localisation mais aussi l'activation (ou l'inactivation) et donc la fonction des RhoGTPases. Au niveau du motif CAAX des RhoGTPases, l'isoprénylation (ajout de groupement farnésyl ou géranyl) tout comme la carboxyméthylation, la palmitoylation ou l'endoprotéolyse (perte des 3 acides aminés terminaux) permettent leur recrutement à la membrane plasmique, crucial pour leur fonctionnement biologique (**Figure 25**) (Patrick J. Roberts et al. 2008 ; Mosaddeghzadeh and Ahmadian 2021). Mais d'autres modifications post-traductionnelles jouent un rôle dans l'activité et la fonction des GTPases Rho. Ces modifications post-traductionnelles peuvent avoir lieu au niveau de sites conservés et sont donc retrouvées pour différentes GTPases Rho.



**Figure 25 : Régulation post-traductionnelle des GTPases Rho.**

Les modifications post-traductionnelles modulant la localisation subcellulaire et/ou la fonction des GTPases Rho sont représentées.

Adapté de Navarro-Lérida, Sánchez-Álvarez, et del Pozo 2021.

RhoA est la première RhoGTPase décrite phosphorylée (Tong et al. 2016). La tyrosine en position 34 (nomenclature de RhoA) située dans le domaine Switch I et conservée dans les différentes RhoGTPases est phosphorylée pour RhoA et Cdc42 (Olson 2016 ; Uezu et al. 2012). Cette phosphorylation est importante pour l'activation de ces deux protéines (Rafikov et al. 2014). À l'inverse, la phosphorylation de la tyrosine Y66 (nomenclature de RhoA) dans le domaine Switch II augmente l'affinité de RhoA, Rac1 et Cdc42 avec les RhoGDIs, les séquestrant ainsi dans le cytoplasme (Navarro-Lérida, Sánchez-Álvarez, and del Pozo 2021). De ce fait, l'interaction de ces RhoGTPases avec leurs RhoGEFs ou leurs effecteurs est diminuée. La phosphorylation de la tyrosine 64 de Rac1 par Src ou FAK inhibe la formation du lamellipode et l'étalement de la cellule (F. Chang et al. 2011).

L'activité de RhoA est inhibée par phosphorylation de la sérine 188 entraînant son interaction avec une RhoGDI, son détachement de la membrane et sa rétention cytoplasmique (Loirand, Guilluy, and Pacaud 2006). La sérine 188 est également la cible de la kinase PKA (Protéine Kinase A) qui, par interaction avec une RhoGDI, inhibe la voie de signalisation de RhoA en empêchant son interaction avec des RhoGEFs ou avec des effecteurs, notamment ROCK (Ellerbroek, Wennerberg, and Burridge 2003).

Les RhoGTPases ont été démontrées comme pouvant être ubiquitinylées et/ou sumoylées. D'un point de vue biochimique, les mécanismes d'ubiquitination et de sumoylation sont proches car les structures de l'ubiquitine et des protéines SUMO (small ubiquitin-like modifier) sont similaires. En effet, l'ajout de l'ubiquitine et l'interaction avec des protéines SUMO se fait au niveau de résidus lysine. Alors que l'ubiquitine va favoriser la dégradation de la protéine cible par le protéasome, la sumoylation régule le transport intracellulaire de la protéine donc ces deux processus permettent la régulation de l'expression des RhoGTPases dans la cellule.

La dégradation des RhoGTPases ubiquitinylées a des répercussions sur les fonctions associées à ces protéines comme son rôle au niveau des structures d'actine et dans la motilité cellulaire avec l'inhibition de l'EMT, la régulation de la migration de cellules épithéliales ou la régulation de l'expression de l'E-cadhérine dans des cellules issues de cancer œsophagien, respectivement (Navarro-Lérida, Sánchez-Álvarez, et del Pozo 2021 ; Ma et al. 2019).

Après stimulation par l'HGF (hepatocyte growth factor), la sumoylation de Rac1 est présentée comme nécessaire à son activation afin de favoriser la formation de lamellipode et

d'induire la migration de la cellule (Castillo-Lluva et al. 2010). A l'inverse, dans un contexte cellulaire de cancer du sein, l'inhibition de la sumoylation de Rac1 diminue la capacité des cellules à migrer et envahir ainsi que la mort cellulaire médiée par l'autophagie (Lorente et al. 2019).

La régulation de l'activité des multiples RhoGTPases présentes dans les cellules est donc contrôlée par 3 familles de protéines (GEF, GAP et GDI) ainsi que par des modifications post-traductionnelles des RhoGTPases directement ou de leurs protéines régulatrices. Cette régulation très fine est spatiale mais aussi temporelle et permet la coordination de plusieurs GTPases de la famille Rho (ou d'autres GTPases) afin de contrôler de nombreux processus physiologiques.

## 4. Fonctions des GTPases Rho

### 4.1. Effecteurs des GTPases Rho

La principale fonction des RhoGTPases est la régulation du cytosquelette notamment des multiples structures d'actine par la régulation de la polymérisation et de l'organisation des filaments d'actine. RhoA, Rac1 et Cdc42 sont les régulateurs majeurs impliqués dans de cette fonction et je vais me focaliser sur ces éléments au cours de cette partie.

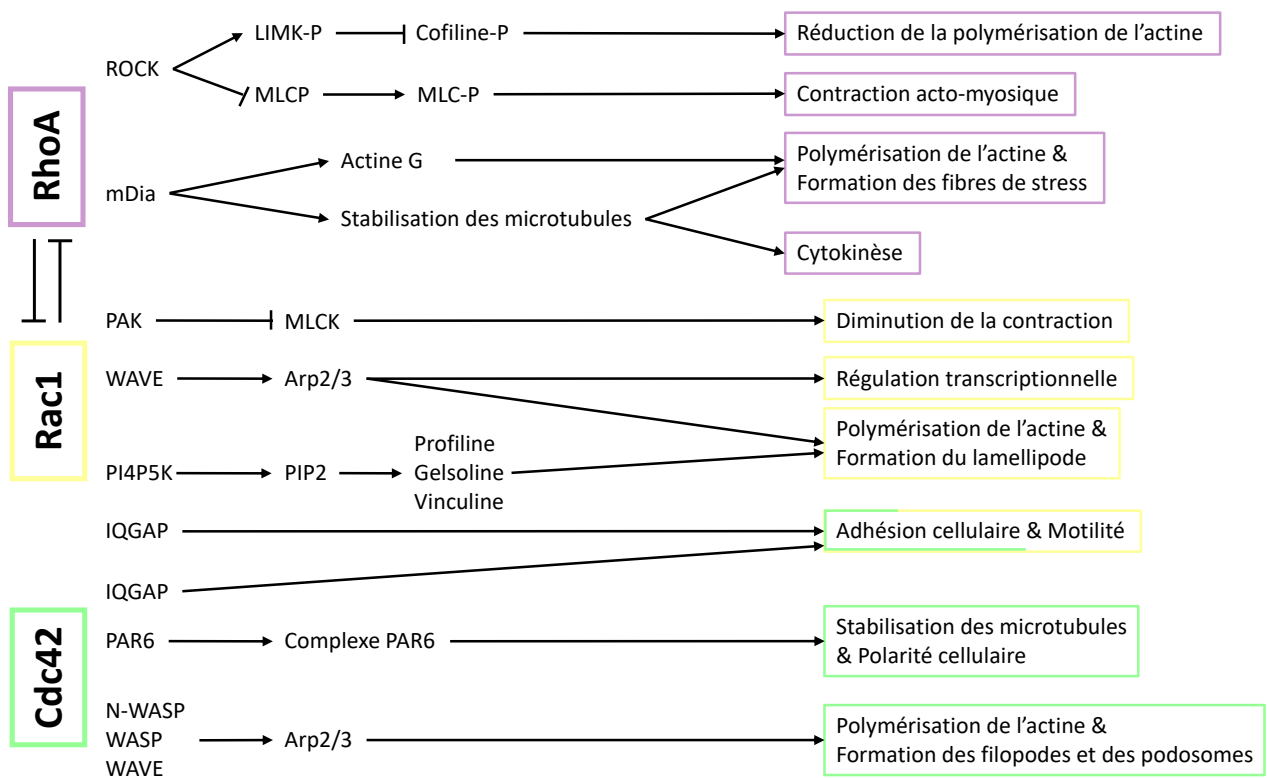
Comme indiqué dans le premier chapitre, la polymérisation de l'actine met en jeu principalement deux facteurs : le complexe Arp2/3 et les formines agissant en coordination avec des protéines de coiffe et des protéines de fragmentation (Campellone and Welch 2010). Rac1 et Cdc42 activent le complexe Arp2/3 de façon indirecte en interagissant avec des NPFs (**Figure 26**).

Il a été montré que Cdc42 lié au GTP se lie au domaine C-terminal des protéines WASP et N-WASP et augmente leur activité de nucléation de l'actine dans un contexte de fibroblastes murins (Antón et al. 2020). Cette interaction entraîne la levée de l'auto-inhibition par une ouverture de l'interaction intramoléculaire et libère le site de liaison au complexe Arp2/3. La protéine WIP stabilise la protéine N-WASP et maintient en conformation inactive fermée mais participe à son recrutement au niveau de régions où l'actine a besoin d'être

polymérisée (Donnelly et al. 2013). Le complexe Arp2/3/WASP/WIP est donc important pour la régulation spatio-temporelle de la polymérisation de l'actine. Cela permet la formation de comète d'actine induisant la mobilité de certains virus comme celui de la vaccine (V. Moreau et al. 2000 ; Donnelly et al. 2013).

La liaison de Rac1 avec les protéines du complexe WAVE, *in vivo*, participe à l'activation du complexe Arp2/3 aboutissant à la polymérisation de l'actine et son organisation au lamellipode nécessaire à la motilité cellulaire (Schaks et al. 2018 ; Schaks et al. 2021).

Les formines participent à la nucléation de l'actine et sont régulées par les RhoGTPases, notamment RhoA dont mDia est une des cibles (**Figure 26**). La formine mDia contient un domaine FH1 d'interaction avec un complexe formé de la profiline et d'un monomère d'actine. L'interaction de RhoA-GTP au niveau du domaine FH2 entraîne une levée de l'auto-inhibition de mDia. mDia interagit avec l'extrémité barbée du filament d'actine et favorise la formation de fibres de stress (Sun et al. 2011).



**Figure 26 : Coordination entre les voies de signalisation de RhoA, Rac1 & Cdc42 dans le remodelage de l'actine.**

Des effecteurs des RhoGTPases RhoA, Rac1 et Cdc42 impliqués dans la formation et la régulation de structures d'actine sont représentés dans cette figure avec les fonctions correspondantes.

Les GTPases Rho régulent donc directement ou indirectement l'activation des nucléateurs de l'actine et participent à l'organisation des filaments. Par l'intermédiaire de ROCK et de la phosphorylation de MLC, RhoA favorise l'association des filaments contractiles d'actine et de myosine. Une interaction entre la fascine et l'actine, identifiée dans des cellules musculaires et dans des cellules de carcinome du côlon, est permise par l'interaction de la fascine avec LIMK. Cette interaction régule la polymérisation de l'actine et stabilise le réseau d'actine au niveau des filopodes (Jaffe and Hall 2005 ; Jayo, Parsons, and Adams 2012) (**Figure 26**).

En plus des fonctions en lien avec le remodelage du cytosquelette, les RhoGTPases régulent des voies de signalisation intervenant dans la modulation de l'expression de gènes. Les protéines Rho sont notamment impliquées dans l'activation de la voie MAL/SRF (serum response factor). Dans un modèle de fibroblastes murins privés en nutriments, en réponse à l'activation de Rho, l'engagement de l'actine G dans les filaments d'actine, libère MAL de son interaction avec l'actine G et MAL est transloqué du cytoplasme vers le noyau. MAL étant le co-activateur du facteur de transcription SRF, il peut l'activer une fois dans le noyau et ainsi SRF activera la transcription de gènes cibles (Miralles et al. 2003 ; Tabuchi et al. 2005).

Des activités enzymatiques sont également régulées par les RhoGTPases. Rac1 interagit dans le cytoplasme avec les NOX (NAPDH oxidases) conduisant la production de ROS (Acevedo and González-Billault 2018). De ce fait, la régulation de la localisation et la coordination des effecteurs en aval favorisera le remodelage de l'actine et des événements d'oxydoréduction. Les RhoGTPases classiques interviennent également dans le métabolisme lipidique en régulant des kinases (PI4P5K, PI3K, DGK) ou des phospholipases (PLC, PLD) pouvant agir directement sur les activités de RhoA ou Rac1, notamment dans un contexte de cancer *in vitro* dans des cellules de cancer du pancréas, du côlon ou du sein (Fazio et al. 2020).

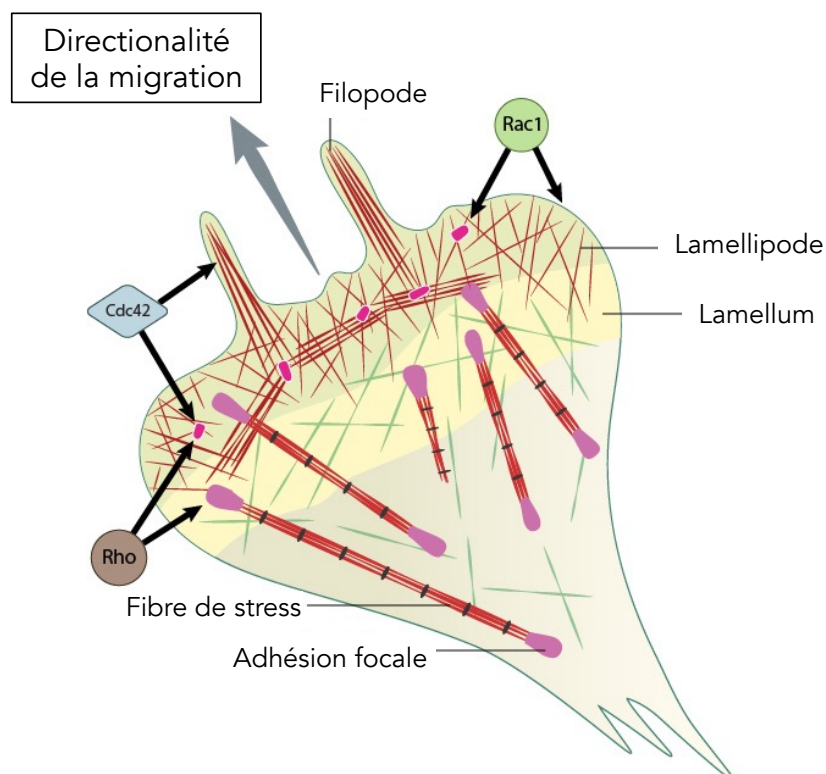
De façon générale, les RhoGTPases interviennent dans des voies de signalisation intervenant dans le remodelage du cytosquelette d'actine régissant la morphologie, la polarité, l'invasion et la migration des cellules. Mais ces protéines contrôlent d'autres processus biologiques impliquant ou non le cytosquelette d'actine : transports intracellulaire et vésiculaire, contraction cellulaire, formation et dynamique des microtubules, prolifération



cellulaire mais aussi la régulation d'activités enzymatiques et de l'expression génique. Dans les paragraphes suivants, une attention particulière sera apportée à la régulation coordonnée des activités de RhoA, Rac1 et Cdc42 dans les processus de migration et d'invasion cellulaires.

## 4.2. Coordination des GTPases Rho dans la migration cellulaire

La migration cellulaire comprend plusieurs étapes mettant en jeu différentes structures d'actine : lamellipode, filopode, complexe actine-myosine et fibres de stress (**Figure 8**) (Mattila and Lappalainen 2008). Pour chacune de ces étapes, des GTPases de la famille Rho interviennent dans la mise en place des structures d'actine et dans leur régulation spatio-temporelle afin de contrôler la migration cellulaire (**Figure 27**).



**Figure 27 : Répartition spatiale des RhoGTPases impliquées lors de la migration cellulaire.**

RhoA, Rac1 et Cdc42 sont nécessaires à la mise en place des structures d'actine au cours de la migration cellulaire. Rac1 participe à la formation du lamellipode tandis que Cdc42 intervient dans la formation des filopodes et RhoA est essentielle à la formation des fibres de stress. Adapté du site [www.mechanobio.info/](http://www.mechanobio.info/).

Tout d'abord, la formation de protrusions membranaires d'actine est importante pour la directionnalité de la migration. Au niveau du front de migration, lorsque la cellule se polarise et s'étale, elle forme un lamellipode faiblement adhérent au substrat sous-jacent, dans sa partie la plus distale (**Figure 27**). Les premiers points d'adhésion sont instables et peuvent se désassembler rapidement ou devenir des complexes focaux plus stables. Les complexes focaux se mettent en place à la frontière entre le lamellipode et le corps cellulaire, au niveau de la lamelle (ou *lamellum*) capable d'adhérer plus fortement au substrat. La lamelle intervient donc dans l'adhésion des cellules au substrat mais aussi dans la contraction dépendante de la myosine II par la présence des fibres de stress (**Figure 27**) (Jacquemet, Hamidi, and Ivaska 2015 ; Burridge and Guilluy 2016).

Au cours de la migration cellulaire, les activités de RhoA et de Rac1 se coordonnent en agissant de façon antagoniste (**Figures 26&28**) (Burridge and Wennerberg 2004 ; Ridley 2015). L'importance des protéines GEFs et GAPs dans le contrôle de l'activation et l'inactivation des GTPases est essentielle (Lawson and Burridge 2014). En effet, des signaux pro-migratoires comme les intégrines mais aussi les facteurs de croissance ou les cytokines permettent leur recrutement à la membrane plasmique afin de remodeler le cytosquelette d'actine (Lawson and Ridley 2018).

Les étapes précoces de la migration cellulaire correspondent à l'étalement cellulaire et la formation du lamellipode dépendante de Rac1. Au niveau du front de migration, Rac1 active le complexe Arp2/3 par le complexe WAVE stimulant ainsi la polymérisation de filaments d'actine et la formation d'un réseau d'actine branchée, caractéristique du lamellipode (**Figure 27**) (Steffen et al. 2006 ; Chen et al. 2010). Plusieurs études ont montré que l'activation de Rac1 dépend de l'implication de GEFs en réponse à l'engagement des intégrines dans des cellules épithéliales (Lawson and Burridge 2014).

Les kinases FAK et Src sont recrutées à proximité de la partie intracellulaire des intégrines  $\beta$  et s'activent par l'intermédiaire d'une boucle de rétrocontrôle positive. Dans un modèle cellulaire exprimant une forme active de Src, l'interaction des intégrines et de FAK favorise l'interaction de FAK avec Src par autophosphorylation de FAK au niveau du résidu

Y397 (Mitra and Schlaepfer 2006). L'interaction FAK/Src augmente l'activité de Src capable de phosphoryler à son tour FAK (Schlaepfer, Mitra, and Ilic 2004 ; Ruest et al. 2000).

En dehors de cette boucle de rétrocontrôle, FAK et Src phosphorylent des protéines adaptatrices des adhésions focales comme la paxilline et p130Cas. Des études montrent que la phosphorylation de ces protéines, dans un contexte de cellules épithéliales surexprimant Crk, favorise l'interaction avec Crk et GIT2, responsables du recrutement et de l'activité de GEFs (Turner et al. 1999 ; Lamorte et al. 2003).

Les protéines GEFs de la sous-famille Vav se localisent aux lamellipodes dans des cellules épithéliales étalées sur fibronectine (Marignani and Carpenter 2001). Elles sont directement activées par Src conduisant au recrutement de GIT2 (GRK-interacting protein 2) et  $\beta$ -Pix (ou ArhGEF7). GIT2 en se fixant à  $\beta$ -Pix favorise la liaison entre le domaine C-terminal de Rac1 et le domaine SH3 de  $\beta$ -Pix (**Figure 28**). Ceci induit le recrutement et l'activation de Rac1 au niveau des sites d'adhésion et des replis membranaires. Rac1 activée directement par  $\beta$ -Pix contrôle l'étalement de la cellule en migration (ten Klooster et al. 2006). L'activation de la GEF DOCK180 par p130Cas et Crk est également impliquée dans la régulation de l'étalement de la cellule médiée par Rac1 (**Figure 28**) (Kiyokawa, Hashimoto, Kobayashi, et al. 1998 ; Kiyokawa, Hashimoto, Kurata, et al. 1998).

Une autre GEF se localise dans les protrusions membranaires, Tiam1, dont l'activation dépend de la phosphorylation par Src (O'Toole et al. 2011 ; Garcia-Guzman et al. 1999). Il a été montré dans des cellules de cancer du col de l'utérus que l'activation de Tiam1 favorise le recrutement de la taline et 14-3-3 $\zeta$  aux sites d'adhésion précoces (Arthur, Quilliam, and Cooper 2004). La kinase ILK (integrin linked kinase) intervient dans le contrôle de l'étalement cellulaire en formant un complexe avec les protéines PINCH,  $\alpha$ -parvine et  $\beta$ -parvine (Rosenberger et al. 2003 ; Filipenko et al. 2005). Ce complexe, identifié au cours d'un criblage double-hybride chez la levure, est établi au contact avec les domaines intracellulaires des intégrines  $\beta$ 1 et  $\beta$ 3. Dans les cellules épithéliales, ArhGEF6 est recrutée par la  $\beta$ -parvine afin d'activer Rac1 et d'induire la migration des cellules sur fibronectine (Boulter et al. 2006). L'activation de Rac1 par des GEFs est caractéristique de l'adhésion précoce et elle est couplée à l'inhibition de RhoA par les GAPs (**Figures 26&28**).

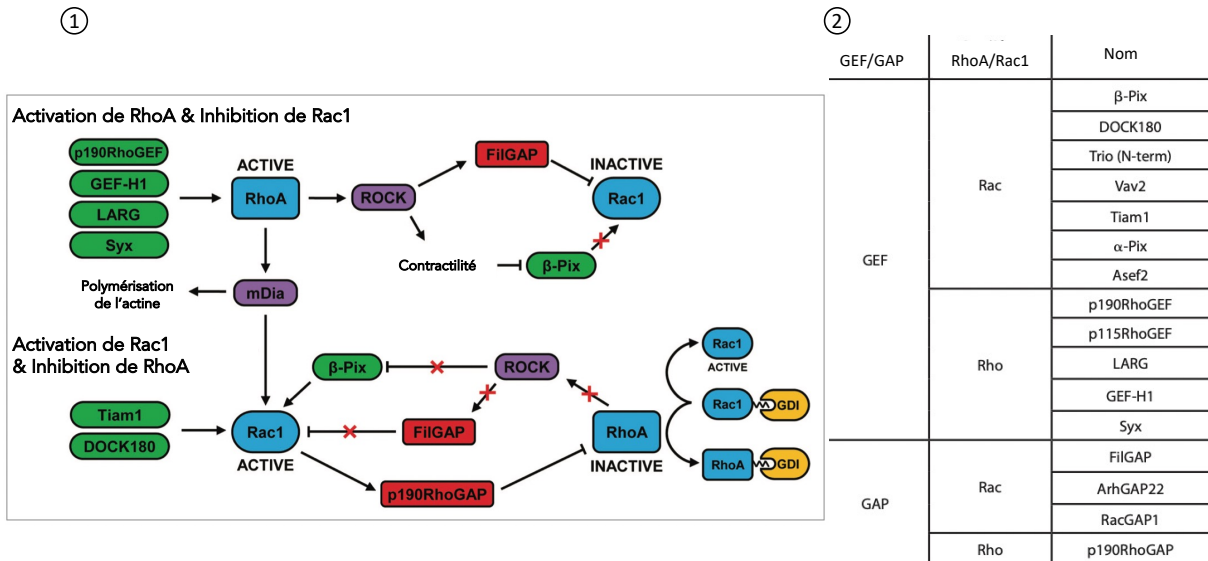


Figure 28 : Mécanismes croisés d'activation/inactivation de RhoA et Rac1 au cours de la migration cellulaire.

(1) Représentation schématisée de la réaction croisée entre RhoA et Rac1.

Au niveau du front de migration, RhoA peut être activée par des GEFs comme p190RhoGEF, GEF-H1 ou LARG. A l'arrière de la cellule, RhoA inhibe l'activité de Rac1 via la protéine FilGAP ou par la localisation de β-pix. RhoA active la formine mDia capable d'activer Rac1 au niveau du front de migration. Cette activation passe par l'activation de GEFs Tiam1 ou DOCK180.

Rac1 inhibe l'activité de RhoA par l'activation des p190RhoGAPs. Cette diminution de l'activation de RhoA entraîne l'activation de Rac1 par la levée de l'inhibition médiée par β-pix ou l'inhibition de FilGAP. La compétition de liaison des protéines GDIs avec RhoA ou Rac1 permet la régulation de l'activité de ces deux protéines.

(2) Tableau composé des principales protéines GEFs et GAPs régulant l'activité de RhoA et Rac1 au cours de la migration cellulaire.

Adapté de Lawson et Burridge 2014.

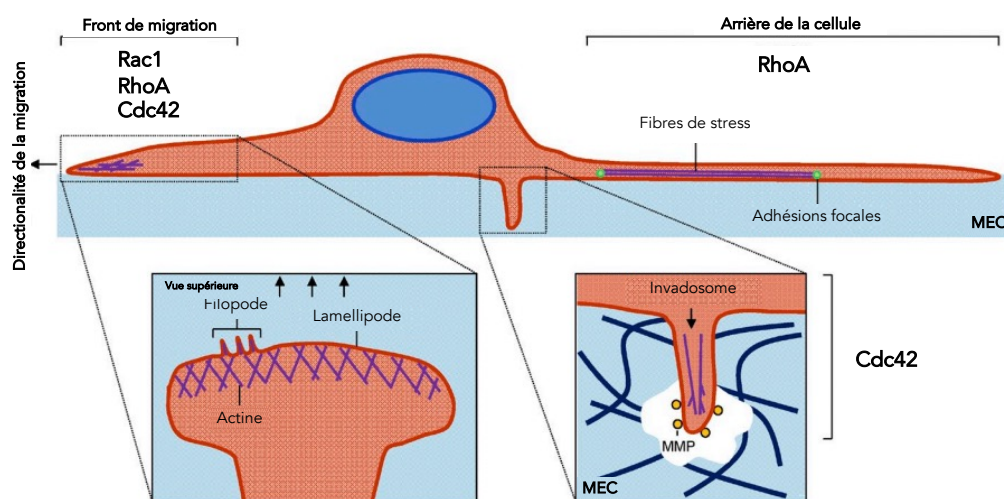
L'inactivation de RhoA dépend des protéines p190RhoGAPs (p190A et p190B) *via* leur domaine GAP capable d'interagir avec RhoA et de catalyser l'hydrolyse du GTP en GDP. Des protéines partenaires et des modifications post-traductionnelles régissent l'activité des p190RhoGAPs, ces régulations sont détaillées dans le chapitre 3.

La phosphorylation de p190A par Src ou PKC, en réponse à l'engagement de l'intégrine α5β1 ou à l'activation du récepteur Syndécan-4 est nécessaire à sa localisation où RhoA doit être régulée (Bass et al. 2008). La formation d'un complexe entre p190RhoGAP, FAK et p120RasGAP a été identifiée dans des modèles cellulaires de fibroblastes ou de carcinomes. Ce complexe permet l'activité GAP vis-à-vis de RhoA (Tomar et al. 2009).

Par ailleurs, l'interaction de p190RhoGAP avec la cortactine est nécessaire à sa localisation au lamellipode afin d'inhiber RhoA (Binamé et al. 2016 ; Bidaud-Meynard et al. 2017). De plus, une étude a montré la régulation p190RhoGAP par Rac1 crée une boucle de

régulation impliquant l'activation de Rac1 et l'inhibition de RhoA au cours des événements précoces de la migration cellulaire (**Figure 28**) (Nimnual, Taylor, and Bar-Sagi 2003 ; Bustos et al. 2008).

Au niveau du front de migration et de l'arrière de la cellule, RhoA doit être activée, afin de permettre la poursuite des étapes de la migration. Les protéines GEFs p190RhoGEF, GEF-H1 ou LARG interviennent dans l'activation de RhoA au front de migration (**Figure 28**). La délétion de p190RhoGEF inhibe la formation d'adhésions focales et la migration de fibroblastes et de cellules de cancer du côlon, par inhibition de l'activité de RhoA (Miller et al. 2012). L'activité de RhoA est régulée par les kinases Pyk2 et FAK, de façon complémentaire. La formation d'un complexe avec p190RhoGEF, démontrée dans des fibroblastes, au niveau des adhésions focales, permet la phosphorylation de RhoA (Lim et al. 2008). De la même façon, l'activation de LARG par la kinase Fyn ou de GEF-H1 par FAK sont impliquées dans l'activation de RhoA associée à la formation de fibres de stress et à la maturation des adhésions focales *via* l'activation des effecteurs ROCK et mDia (**Figure 29**) (Dubash et al. 2007 ; Guilluy et al. 2011).



**Figure 29 : Répartition des RhoGTPases dans la cellule lors des événements de migration et d'invasion cellulaires.**

Localisation des RhoGTPases au niveau des structures d'actine que sont les lamellipodes et les invadosomes. Rac1 se localise essentiellement au front de migration. RhoA est retrouvée à la fois au front de migration et à l'arrière de la cellule afin de promouvoir la rétractation par contraction. Quant à Cdc42, la GTPase est indispensable à la formation des invadosomes et se localise avec Rac1 et RhoA au front de migration.

Adapté de Lawson et Ridley 2018.

L'état de phosphorylation de la myosine est régulé par ROCK, directement en phosphorylant les MLC et indirectement en inhibant leur déphosphorylation par MLCP. Ceci permet la contraction des filaments d'actine sur la myosine ainsi que la formation des fibres de stress et des adhésions focales comme il l'a été démontré dans des cellules endothéliales et des cellules de cancer du sein (**Figures 26&28**) (Unbekandt and Olson 2014). La contraction acto-myosique induite par ROCK est responsable de la rétraction de la cellule en fin de migration.

La formation des fibres de stress découle de l'activité de la formine mDia notamment en aval de RhoA. Il a été montré dans des cellules de cancer du côlon, qu'en phosphorylant LIMK, ROCK induit l'activation de la protéine ADF/cofiline dont le rôle est de stabiliser les filaments d'actine en bloquant la polymérisation (**Figure 26**) (Jayo, Parsons, and Adams 2012).

Dans les événements tardifs de la migration, un antagonisme entre les activités de RhoA et Rac1 est également présent. L'activation de ROCK par RhoA entraîne la phosphorylation de FilGAP inhibant la formation du lamellipode, dépendante de Rac1, dans des cellules déposées sur fibronectine (**Figure 28**) (Ohta, Hartwig, and Stossel 2006). FilGAP agit par compétition, en empêchant l'interaction de Rac1 avec l'une de ses protéines GEFs ce qui favorise son inhibition (Shifrin et al. 2009). Le complexe RacGAP1/Filamine A/IQGAP1 est recruté au lamellipode de cellules en cours de migration, au niveau de sites d'activation de l'intégrine  $\beta 1$  (Jacquemet et al. 2013).

L'ensemble de ces mécanismes de régulation démontre le rôle de RhoA et Rac1 et leurs activités et leurs voies de signalisation croisées au cours de la migration cellulaire. Cependant, il a été démontré que d'autres GTPases, de la famille Rho mais également des autres familles, étaient capables de se coordonner ou de s'opposer.

Cdc42 a un rôle prépondérant dans la migration cellulaire en intervenant dans la polarisation de la cellule et la formation des filopodes au front de migration ainsi qu'en jouant un rôle de senseur en intégrant des signaux du microenvironnement la cellule (Lawson and Ridley 2018). La présence de Cdc42 favorise la polymérisation de l'actine par le complexe Arp2/3 en activant ses effecteurs WAVE et WASP ce qui permet de former des filopodes à

partir du lamellipode (**Figures 27&29**) (Jacquemet, Hamidi, and Ivaska 2015 ; Amato et al. 2019).

En activant le complexe PAR6, Cdc42 permet la polarisation de la cellule en orientant le noyau et MTOC, tel qu'il a été montré dans des fibroblastes et des cellules endothéliales (**Figure 26**) (Palazzo et al. 2001). La polarisation des organites induit la polymérisation et l'orientation des microtubules avec l'extrémité « + » en périphérie, vers le front de migration (Cau and Hall 2005).

L'utilisation de biosenseurs et de l'imagerie à haute résolution permet l'analyse et la compréhension des mécanismes participant à la coordination spatio-temporelle des GTPases.

Les approches optogénétiques ont permis de mettre en évidence les gradients d'activation des GTPases Rho dans des cellules en cours de migration comme il a été décrit précédemment (Machacek et al. 2009 ; Pertz 2010 ; de Beco et al. 2018). Il a été montré que les gradients de RhoA, Rac1 et Cdc42 ne sont pas causés par des mécanismes de transport mais sont dus à une distribution contrôlée des régulateurs (activateurs ou inactivateurs) de RhoGTPases (de Beco et al. 2018). De plus, l'activation localisée de RhoA et l'antagonisme RhoA/Rac1 a également été mis en évidence avec l'utilisation de biosenseurs, au niveau de différentes protrusions membranaires, dans un modèle de fibroblastes stimulé par des facteurs de croissance tels que le PDGF (Pertz et al. 2006).

Ainsi, la coordination des activités des GTPases RhoA, Rac1 et Cdc42 et leur régulation spatio-temporelle très précise, bien que complexe, permet la régulation de différentes structures d'actine lors de la migration cellulaire. Cette régulation est localisée, rapide et passe par les cycles d'activation/inactivation des GTPases. Leurs régulateurs que sont les GEFs, les GAPs, les GDIs et les différentes modifications post-traductionnelles vont favoriser leur activation ou leur inactivation dans des régions précises de la cellule où le cytosquelette d'actine doit être régulé.

### 4.3. Coordination des GTPases Rho dans l'invasion cellulaire

Les GTPases sont des éléments essentiels dans le contrôle du remodelage de l'actine au sein des invadosomes, structures impliquées dans l'invasion cellulaire. En effet, les étapes de formation et de maturation des invadosomes tout comme l'activité enzymatique de dégradation de la matrice sous-jacente sont directement liées à l'activité coordonnée de RhoA, Rac1 et Cdc42 (Lawson and Ridley 2018 ; Rivier, Mubalama, and Destaing 2021).

L'interaction des intégrines avec les protéines de la MEC confère une fonction d'adhérence aux invadosomes, tout comme l'interaction avec le récepteur CD44. Dans les ostéoclastes, cellules ne formant pas d'adhésions focales, les podosomes sont essentiels à l'adhésion de ces cellules à la MEC (Georgess et al. 2014). L'adhésion cellulaire est un élément limitant à la fonction des invadopodes comme il l'a été démontré dans des cellules issues de cancer du sein. En effet, la délétion de la kinase ILK ou l'inhibition de l'interaction des intégrines avec des éléments de la MEC entraînent une diminution de la capacité de dégradation des invadosomes par une altération du recrutement d'IQGAP1 (Ras GTPase-activating-like protein 1) et de l'exposition de MT1-MMP au niveau extracellulaire (Jayo, Parsons, et Adams 2012).

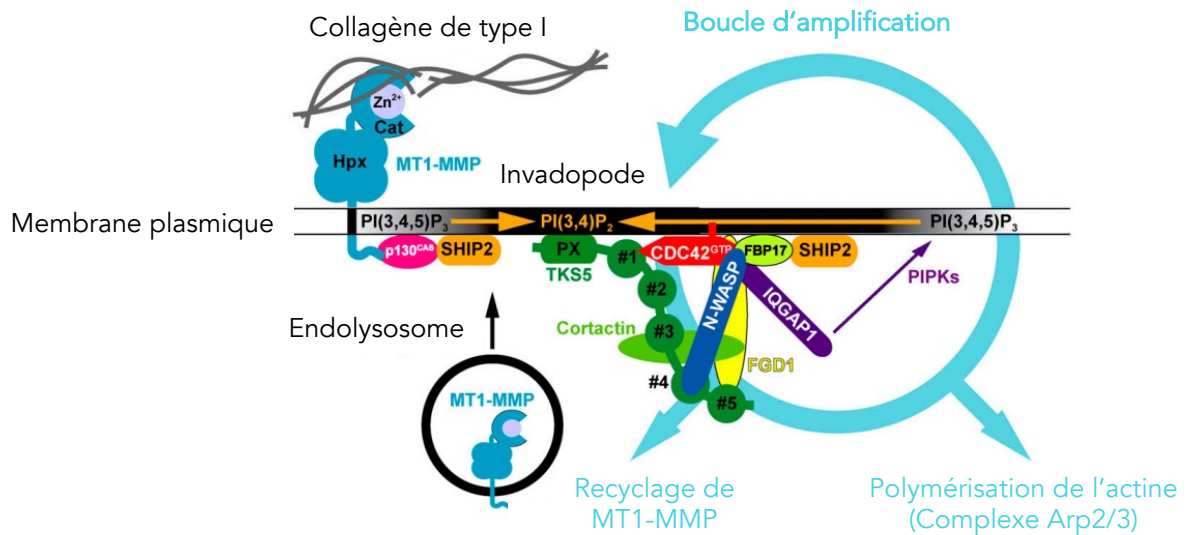
Cdc42 est nécessaire à la mise en place des invadosomes en régulant WASP et le complexe Arp2/3. Cdc42 permet la polymérisation de l'actine au niveau des structures d'invasion (**Figure 10**) (Pichot et al. 2010). L'expression d'une forme constitutivement active de Cdc42 (V12Cdc42) induit d'ailleurs la formation de podosomes dans les cellules endothéliales ou les fibroblastes murins (Moreau et al. 2003 ; Di Martino et al. 2014).

Dans des cellules de cancer du sein, il a été montré l'importance de l'interaction de Tks5 avec une protéine GEF de Cdc42, FGD1, nécessaire à la formation des invadosomes linéaires (**Figure 30**) (Zagryazhskaya-Masson et al. 2020). Par ailleurs, la protéine GEF Tuba active Cdc42 et ainsi régule la formation et la fonction des invadosomes linéaires dans un mécanisme dépendant de la localisation de DDR1, un récepteur au collagène (Juin et al. 2014).

Cdc42 est essentiel à la formation mais aussi à la fonction des invadosomes en intervenant dans le phénomène de sécrétion des MMPs nécessaire à l'activité de dégradation



de la matrice des invadosomes. L'interaction d'IQGAP1 avec le complexe exocyste entraîne le recrutement à la surface membranaire de MMPs notamment MT1-MMP (**Figure 30**) (Sakurai-Yageta et al. 2008). Cette interaction est permise par l'activation de Cdc42 et l'activation d'une autre GTPase, RhoA.



**Figure 30 : Modèle de boucle de régulation dans la formation et la maturation des invadosomes.**

La RhoGTPase Cdc42 induit la polymérisation de l'actine via l'activation du complexe Arp2/3. En interagissant avec IQGAP1, Cdc42 permet le recyclage de MT1-MMP et son exposition à la surface membranaire afin de dégrader le collagène I présent dans la MEC.

Adapté de Zagryazhskaya-Masson et al. 2020.

Les protéines d'échafaudage Tks4 et Tks5 participent à la formation et la maturation des invadosomes en interagissant avec les voies de signalisation des RhoGTPases. Tks5 permet le recrutement des protéines AFAP-110, p190RhoGAP et cortactine au niveau des podosomes (Crimaldi, Courtneidge, and Gimona 2009). Ces protéines ont des rôles spécifiques dans la formation de ces structures, respectivement, en activant la kinase Src, en régulant négativement RhoA et en accélérant la polymérisation d'actine. La coordination des activités de ce complexe est nécessaire à la formation de podosomes fonctionnels. La délétion de Tks5 dans des cellules musculaires de rat inhibe la formation des podosomes en altérant la localisation d'AFAP-110, p190RhoGAP et la cortactine.

Il a également été montré l'importance de p190RhoGAP dans la régulation de RhoA aux invadosomes. L'inhibition de RhoA induite par l'expression de p190RhoGAP dans des cellules musculaires entraîne une perte des invadosomes expliquée par la régulation de la

contractilité cellulaire (Burgstaller and Gimona 2004 ; Crimaldi, Courtneidge, and Gimona 2009).

Des études ont démontré l'implication de Rac dans l'invasion cellulaire. En effet, dans des cellules cancéreuses, la phosphorylation de la cortactine permet le recrutement aux invadosomes de Vav2 qui l'une des GEF de Rac3. Lorsque la cortactine est déphosphorylée ou l'expression de Vav2 inhibée, la surexpression d'une forme constitutivement active de Rac3 restaure la dégradation de la matrice induite par les invadosomes (Rosenberg et al. 2017). A l'inverse, il a été montré par FRET (fluorescence resonance energy transfer) qu'une réduction de l'activité de Rac1 est nécessaire à la stabilité de l'invadosome (Moshfegh et al. 2014). Dans cette étude, Rac1 est décrit comme un facteur de désassemblage des invadosomes, mécanisme important pour le renouvellement de ces structures au cours de l'invasion cellulaire.

Les RhoGTPases ont un rôle essentiel dans l'intégration des signaux conduisant à la formation et le maintien des structures d'actine lors des processus d'adhésion, de migration et d'invasion cellulaires. L'expression et l'activation de ces protéines doivent être finement régulées et coordonnées dans l'espace et dans le temps afin d'assurer ces fonctions biologiques.

## 5. Physiopathologie des GTPases Rho

De par les processus cellulaires contrôlés par les GTPases Rho, des altérations dans leurs voies de signalisation sont à l'origine de nombreuses pathologies (Narumiya and Thumkeo 2018).

### 5.1. Rôles physiologiques des GTPases Rho

Dès les premiers instants du développement embryonnaire, l'activité des RhoGTPases, notamment de RhoA et de ses effecteurs ROCK et mDia est nécessaire. La formation de faisceaux d'actine et de myosine permet de connecter les cellules épithéliales au travers de

jonctions intercellulaires et de les contracter afin de former les tissus et maintenir la morphogenèse tissulaire.

La contraction au niveau apical des cellules épithéliales entraîne une déformation de la cellule passant d'une forme cuboïde à une forme trapézoïde permettant ainsi de former des tubes et invaginations notamment lors de la gastrulation et la neurulation (Martin and Goldstein 2014). La présence d'actine autour de l'œil et de l'anneau ombilical a été démontrée et l'absence de ROCK (I et II) *in vivo* engendre des malformations chez les souris qui souffrent d'omphalocèle (absence de fermeture de la paroi abdominale) et naissent les « yeux ouverts » (Shimizu et al. 2005 ; Thumkeo et al. 2005). L'absence de mDia engendre une hyperplasie périventriculaire et une perte de la polarité apico-basale des cellules neuroépithéliales (Thumkeo et al. 2011).

La voie de signalisation RhoA/ROCK intervient au cours de la morphogenèse cérébrale, dans la formation des axones, la migration des neurones et la plasticité synaptique. Au cours de la croissance axonale, un signal calcique est envoyé aux neurones à proximité. Il active RhoA et permet la croissance de l'axone vers sa cellule cible (Takano et al. 2017). Au niveau des épines dendritiques, Rac1 favorise leur croissance tandis que RhoA, par l'activation de ROCK, antagonise l'action de Rac. Les expressions de Rac1 et du complément C3 sont similaires, l'absence de C3 impacte l'activation de Rac1 et induit une différenciation prématurée des neurones (Gorelik et al. 2018).

Les découvertes de plusieurs inhibiteurs de ROCK comme Y27632 puis du fasudil, réduisant la contraction des artères en réponse au calcium ou la pression artérielle chez des souris hypertendues, ont permis de mieux comprendre le rôle des RhoGTPases au niveau cardio-vasculaire (Narumiya and Thumkeo 2018). Ainsi, la voie de signalisation en aval de RhoA joue un rôle dans le remodelage cardiaque et le développement de cardio-myopathies (Kilian et al. 2021).

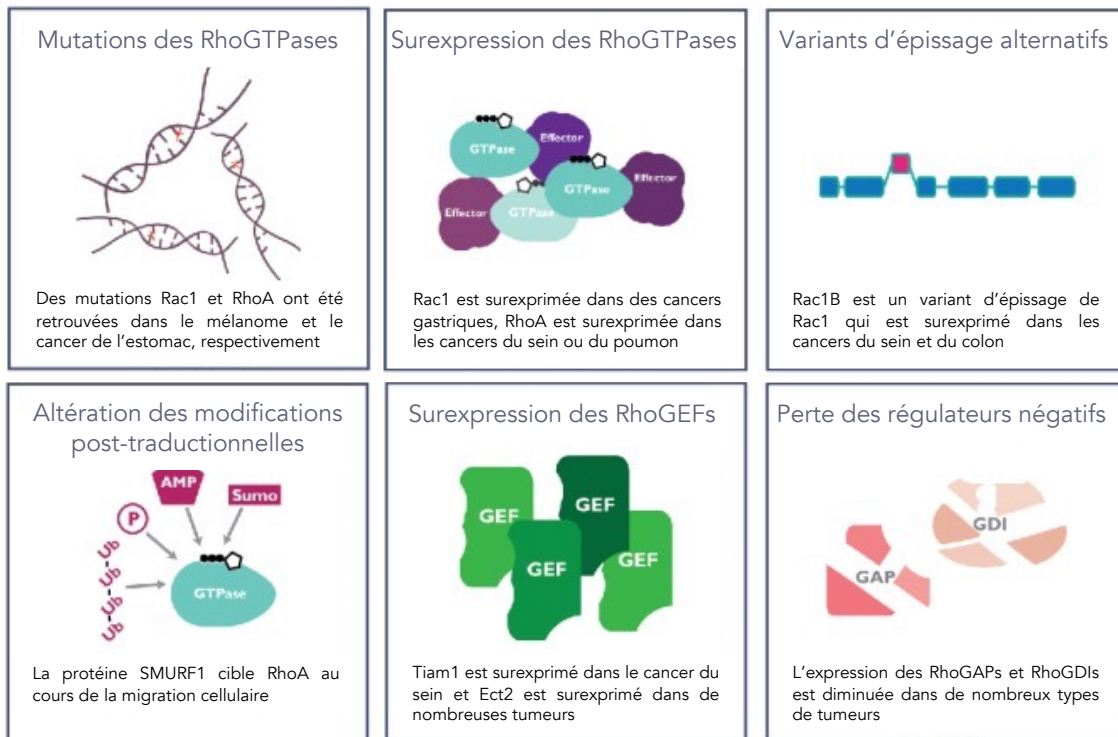
Des études ont également démontré le rôle de RhoGTPases dans l'immunité innée ou acquise. IQGAP1 interagit avec Rac1 sous une forme non prénylée et régule son activation et sa dégradation par le protéasome. Chez des souris présentant une délétion de géranyl-géranyl-transférases, une augmentation du pool de Rac1-GTP induit une augmentation de

l'inflammation. L'absence d'IQGAP1 réduit l'inflammation induite chez ces souris (Akula et al. 2019). RhoA participe à la phagocytose de pathogènes par remodelage des filaments d'actine (Tzircotis, Braga, and Caron 2011). En réponse à la stimulation par des chimiokines, RhoA induit la migration de cellules du système immunitaire comme les macrophages, les lymphocytes T ou les cellules dendritiques (Bros et al. 2019 ; Katakai et al. 2014 ; Jones et al. 2016).

## 5.2. Dérégulation des GTPases Rho dans le cancer

Les RhoGTPases étant impliquées dans de multiples fonctions physiologiques, une dérégulation de ces dernières entraîne des phénomènes pathologiques comme le cancer, les maladies cardio-vasculaires, neurodégénératives ou infectieuses (Haga and Ridley 2016 ; Strassheim et al. 2019 ; Huang et al. 2017). Les voies de signalisation dans lesquelles interviennent les GTPases de la famille Rho sont impliquées dans l'acquisition des « hallmarks of cancer » définies par Hanahan et Weinberg en régulant des fonctions biologiques associées à des structures d'actine (Clayton and Ridley 2020). La dérégulation de ces voies peut entraîner une altération de polarité, de prolifération et de survie, d'adhésion, de migration et d'invasion mais aussi de transformation maligne des cellules (Orgaz, Herraiz, and Sanz-Moreno 2014).

Le dérèglement peut intervenir directement au niveau de la GTPase elle-même, au travers d'une variation de leur expression ou d'une mutation, et entraîner une modification de leur localisation ou de leur état d'activation. La régulation des modifications post-traductionnelles des RhoGTPases est impliquée dans le cancer. Cette partie a déjà été abordée dans la partie 3.4 de ce chapitre. Un changement d'expression des protéines régulatrices peut également être à l'origine de l'altération des fonctions associées aux GTPases (**Figure 31**) (Porter, Papaioannou, and Malliri 2016).



**Figure 31 : La signalisation des RhoGTPases dérégulée dans la tumorigenèse et la progression tumorale.**

Différents mécanismes sont à l'origine des dérèglements des RhoGTPases dans le cadre du cancer. Des altérations directement sur la GTPase comme des mutations, des modifications post-traductionnelles ou des variants d'épissage peuvent induire le développement et la progression de cancers. Des impacts sur les régulateurs des RhoGTPases mettent en jeu le rôle des RhoGTPases dans la capacité des cellules cancéreuses à migrer et à envahir les tissus.

Adapté de Porter, Papaioannou, et Malliri 2016.

### 5.2.1. Altérations génétiques des GTPases Rho dans le cancer

A l'inverse des GTPases Ras qui présentent de nombreuses mutations retrouvées dans les tumeurs, la dérégulation des membres de la sous-famille Rho passe majoritairement par une surexpression ou une suractivation de ces protéines et intervient dans le développement tumoral et la dissémination métastatique. Cependant, des données montrent des mutations de RhoGTPases retrouvées dans les cancers pouvant avoir un effet gain de fonction ou un effet perte de fonction (Jung et al. 2020).

Les données issues du séquençage des tumeurs TCGA (The Cancer Genome Atlas) ont mis en évidence des mutations activatrices de RhoA dans 12 types de tumeurs. Cette activation de RhoA est souvent associée à la réduction de l'expression de gènes codant pour

les protéines RhoGAPs, induisant la baisse de leur fonction régulatrice de RhoA (Lawrence et al. 2014 ; D. Wang et al. 2020). Des études mettent en évidence la présence de mutations de RhoA dans des cas de cancers gastriques ou des lymphomes (Kakiuchi et al. 2014 ; Palomero et al. 2014). Le séquençage de 87 cas de carcinome gastrique de type diffus indique qu'une mutation de *RHOA* a été observée dans 25% de ces tumeurs, avec la présence de hotspots mutationnels tels que les résidus Arg5 ou Gly17, hautement conservés parmi les GTPases Rho, (Kakiuchi et al. 2014). La glycine 17 est de façon récurrente mutée dans des lymphomes à cellules T. De manière intéressante, l'analyse *in vitro* de la mutation G17V de RhoA indique un effet de dominant négatif. En effet, l'expression de RhoA G17V empêche l'activation des effecteurs de RhoA, par une absence de liaison du mutant au GTP, et de la protéine endogène RhoA sauvage. L'expression de RhoA G17V favorise la prolifération et la polarisation des cellules T (Chiba et al. 2015 ; Cortes et al. 2018).

Des mutations de Rac1 et Cdc42 ont également été observées dans divers types de tumeurs (Jung et al. 2020 ; Hodis et al. 2012). Par exemple, la mutation P29S de Rac1 est identifiée dans près de 10% des mélanomes et confère à Rac1 un gain de fonction (Krauthammer et al. 2012). Le résidu se situe dans le domaine Switch I entraîne une forte activité GTPasique et l'activation des effecteurs en aval expliquant l'augmentation de la prolifération et de la migration des cellules de mélanome (Davis et al. 2013). La mutation G12D de Cdc42 est également identifiée dans le mélanome et une étude a montré que les mutations de *CDC42* et l'ubiquitine ligase *TRAF7* sont mutuellement exclusives dans des cas de mésothéliome papillaire (Hodis et al. 2012 ; Stevers et al. 2019). Cependant, les fonctions de ces mutations n'ont pas été étudiées.

### 5.2.2. Altérations de l'expression des GTPases Rho dans le cancer

L'analyse de l'expression tissulaire des RhoGTPases montre l'importance de ces protéines dans les différentes étapes de la tumorigenèse, pouvant ainsi être considérées comme des biomarqueurs de la progression tumorale. Ainsi, la surexpression de RhoGTPases est associée à une progression tumorale et/ou un mauvais pronostic dans de nombreuses études. RhoA est surexprimée dans les cancers du sein, du foie ou encore des poumons (Gerhard Fritz, Just, and Kaina 1999 ; G. Fritz et al. 2002). La surexpression de RhoA est

associée à la prolifération, l'invasion et l'angiogenèse. Dans des modèles *in vitro* et *in vivo* de xénogreffe chez la souris, l'inhibition de RhoA prévient la croissance et l'angiogenèse (Gerhard Fritz, Just, and Kaina 1999 ; Pillé et al. 2005). La surexpression de Rac1 est retrouvée dans des cancers gastriques, en corrélation avec l'invasion et le développement de métastases (F. Yu et al. 2019). Dans des cancers du sein, la surexpression de Cdc42 a été identifiée et reliée au processus de transformation maligne (Bray et al. 2013 ; N. P. Murphy, Mott, and Owen 2021).

À l'inverse, des diminutions d'expression de GTPases Rho ont été identifiées comme étant associées à l'induction de l'EMT et la progression tumorale. C'est le cas de RhoB dont l'inhibition favorise l'invasion de cellules de cancer du poumon et le développement de métastases pulmonaires dans un modèle *in vivo* d'ostéosarcome (Calvayrac, Pradines, and Favre 2018 ; Zou et al. 2018).

### 5.2.3. Variants d'épissage

La protéine Rac1b provient d'un épissage alternatif au cours de la transcription de *RAC1*. Ce variant comprend une séquence supplémentaire dans le domaine Switch II ce qui génère une protéine avec une diminution de son activité GTPasique et une augmentation de sa capacité d'échange du GDP en GTP (Fiegen et al. 2004). De ce fait, Rac1b diffère des autres composants de la sous-famille Rac en étant constitutivement active et donc en interagissant avec des effecteurs différents. Ainsi, ce variant d'épissage Rac1b perd la capacité à réguler les effecteurs classiques de Rac1, mais peut activer le facteur de transcription NFκB notamment responsable de l'activation de facteurs impliqués dans des processus en lien avec le développement et la progression tumorale (Lehman et al. 2018 ; Wennerberg and Der 2004).

### 5.2.4. Altération des effecteurs

Comme démontré dans la partie 4 de ce chapitre, les voies de signalisation en aval des RhoGTPases sont altérées dans le cadre de la tumorigenèse et sont donc des cibles thérapeutiques afin de réguler les fonctions des GTPases.

Par exemple, plusieurs études ont montré que la surexpression de WIP qui, en complexe avec la protéine WASP, active la polymérisation de l'actine au niveau des invadosomes. La surexpression de WIP est corrélée avec l'augmentation des capacités

invasives *in vitro* et un mauvais pronostic dans le cancer du sein (García et al. 2012 ; García et al. 2016 ; Gryaznova et al. 2015). L'induction de l'EMT est accélérée par la surexpression de WIP dans des cellules issues d'adénocarcinome pulmonaire. Les cellules acquièrent des propriétés prolifératives et invasives par l'interaction de WIP avec RhoA induisant sa suractivation (Salvi and Thanabalu 2017).

Des inhibiteurs pharmacologiques des RhoGTPases et des effecteurs existent. Par exemple, les inhibiteurs Rhosine, NSC23766 et ZCL278 ciblent la liaison de RhoA, Rac1 et Cdc42, respectivement, avec plusieurs RhoGEFs telles que LARG, p115RhoGEF ou PDZ-RhoGEF. L'inhibition de la liaison avec la GEF diminue les capacités invasives de cellules de cancer du sein (Shang et al. 2012 ; Gao et al. 2004 ; Friesland et al. 2013 ; Aguilar et al. 2019). Le Fasudil et Y-27632 sont des inhibiteurs sélectifs de ROCK, l'effecteur de RhoA. L'inhibition de l'invasion cellulaire par le Fasudil a été montré dans des modèles hautement invasifs de cancer du sein et de fibrosarcome (Ying et al. 2006). L'injection de Y-27632 dans une tumeur chez la souris entraîne une régression de la croissance du mélanome (Routhier et al. 2010).

#### 5.2.5. Altération des régulateurs

La compréhension des mécanismes d'expression et de régulation de ces protéines liées aux RhoGTPases est donc un élément important dans la recherche de nouvelles cibles thérapeutiques. Depuis quelques années, des études à grande échelle de séquençage de tumeurs ont mis en évidence des mutations de protéines régulatrices des RhoGTPases (Lawrence et al. 2014 ; D. Wang et al. 2020).

Parmi les RhoGEFs dérégulées, les protéines PDZ-RhoGEF, LARG, et p115GEF sont suractivées tandis que les protéines Ect2, Tiam1 et Vav sont retrouvées surexprimées dans plusieurs types de cancer (Rossman, Der, and Sondek 2005 ; Jung et al. 2020). Par exemple, une surexpression de Tiam1 est démontrée dans le cancer du sein ou le carcinome de l'œsophage et corrélée avec une dissémination métastatique et un mauvais pronostic (Minard et al. 2004 ; Boissier and Huynh-Do 2014).

Les protéines DLC1 et p190RhoGAP sont les principales RhoGAPs présentant, dans la plupart des cas, une diminution d'expression dans plusieurs types de cancer (Jung et al. 2020). La plupart des RhoGAPs agissent en tant que suppresseur de tumeurs, en régulant l'activité



RhoGTPase. Cependant, une surexpression des protéines p190RhoGAP-B, ArhGAP8 et ArhGAP42 est également retrouvée dans des cancers gastriques, du sein, du côlon ou du pharynx et favorisent *in vitro* la migration et l'invasion des cellules cancéreuses (G. Dong et al. 2018 ; Johnstone et al. 2004 ; Hu et al. 2018).

Par la présence de mutations ou la régulation de leur expression, les protéines régulatrices offrent de nouvelles possibilités thérapeutiques car leur régulation pharmacologique permettrait de restaurer leurs fonctions d'activation ou d'inhibition des RhoGTPases dans les cellules cancéreuses (Humphries, Wang, and Yang 2020). Par exemple, le gène *ARHGAP35*, codant pour la protéine p190RhoGAP-A, est désormais considéré comme l'un des gènes les plus mutés dans le cancer. L'implication de p190RhoGAP-A dans le cancer est développé plus précisément dans le chapitre 3.





# Chapitre 3

-

## Les p190RhoGAPs



# 1. p190RhoGAPs, principaux régulateurs négatifs de RhoA

Les phénomènes de migration et d'invasion des cellules cancéreuses sont une des caractéristiques du cancer. Ils favorisent le développement et la progression des tumeurs par l'intermédiaire de structures composées de filaments d'actine, les lamellipodes et les invadosomes. Le cytosquelette d'actine est finement régulé par les GTPases de la famille Rho, elles-mêmes régulées par différentes familles de protéines dont les RhoGAPs. Parmi les protéines RhoGAPs, capable d'inactiver les GTPases en catalysant l'hydrolyse du GTP en GDP, les deux isoformes p190RhoGAPs régulent majoritairement RhoA. Tout au long de ce manuscrit, p190RhoGAP servira de dénomination aux deux protéines tandis que p190RhoGAP-A et p190RhoGAP-B seront appelées respectivement p190A et p190B.

La protéine p190A (ou GRF-1) est une protéine d'environ 171 kDa codée par le gène *GRLF1* (glucocorticoid receptor binding factor 1) ou *ARHGAP35*, localisé sur le chromosome 19 (au locus 19q13.3) et composé de 4543 paires de bases. Son nom « p190 » provient du fait que cette protéine ait été clonée lors de l'identification d'une protéine phosphorylée de 190 kDa en interaction avec p120RasGAP dans des fibroblastes transformés par Src (Settleman et al. 1992).

La protéine p190B est une protéine d'environ 172 kDa codée par le gène *ARHGAP5* localisé sur le chromosome 14 (au locus 14.q12). Ces deux isoformes proviennent d'une duplication génique et sont conservés au cours de l'évolution.


Les protéines p190RhoGAPs présentent approximativement 50% d'homologie de séquences (**Annexe 2**). Les protéines codées par ces gènes sont constituées de plusieurs domaines avec des fonctions similaires dont le domaine GAP, en C-terminal, qui est le siège de l'activité GAP. Au niveau de ce domaine GAP, le degré d'homologie est important avec 70% d'homologie entre les séquences des gènes codant pour p190A et p190B.

Les protéines p190RhoGAPs ont fait l'objet d'une revue publiée dans *Cells* en 2019 et intitulée « **p190RhoGAPs, the *ARHGAP35*- and *ARHGAP5*-Encoded Proteins, in Health and**

**Disease** ». Cette revue présente successivement (1) la structure multi-domaine des protéines ainsi que le rôle des différents domaines, (2) les différentes localisations et les fonctions associées aux p190RhoGAPs, dépendantes ou indépendantes de l'activité de RhoA, (3) le rôle de ces protéines au cours du développement et (4) leurs implications dans des pathologies humaines dont le cancer.

Review

# p190RhoGAPs, the *ARHGAP35*- and *ARHGAP5*-Encoded Proteins, in Health and Disease

Capucine Héraud <sup>1,2,3</sup>, Mathilde Pinault <sup>1,2,3</sup>, Valérie Lagrée <sup>1,2,3,\*</sup> and Violaine Moreau <sup>1,2,3,\*</sup> 

<sup>1</sup> INSERM, UMR1053 Bordeaux Research In Translational Oncology, BaRITOn, F-33000 Bordeaux, France; capucine.heraud@inserm.fr (C.H.); mathilde.pinault1@gmail.com (M.P.); valerie.lagree-bringtowntown@u-bordeaux.fr (V.L.)

<sup>2</sup> UMR1053 Bordeaux Research in Translational Oncology, University of Bordeaux, BaRITOn, F-33000 Bordeaux, France

<sup>3</sup> Equipe Labellisée Fondation pour la Recherche Médicale (FRM) 2018, F-33000 Bordeaux, France

\* Correspondence: violaine.moreau@inserm.fr; Tel.: +33-5-57571272

Received: 19 March 2019; Accepted: 9 April 2019; Published: 12 April 2019



**Abstract:** Small guanosine triphosphatases (GTPases) gathered in the Rat sarcoma (Ras) superfamily represent a large family of proteins involved in several key cellular mechanisms. Within the Ras superfamily, the Ras homolog (Rho) family is specialized in the regulation of actin cytoskeleton-based mechanisms. These proteins switch between an active and an inactive state, resulting in subsequent inhibiting or activating downstream signals, leading finally to regulation of actin-based processes. The On/Off status of Rho GTPases implicates two subsets of regulators: GEFs (guanine nucleotide exchange factors), which favor the active GTP (guanosine triphosphate) status of the GTPase and GAPs (GTPase activating proteins), which inhibit the GTPase by enhancing the GTP hydrolysis. In humans, the 20 identified Rho GTPases are regulated by over 70 GAP proteins suggesting a complex, but well-defined, spatio-temporal implication of these GAPs. Among the quite large number of RhoGAPs, we focus on p190RhoGAP, which is known as the main negative regulator of RhoA, but not exclusively. Two isoforms, p190A and p190B, are encoded by *ARHGAP35* and *ARHGAP5* genes, respectively. We describe here the function of each of these isoforms in physiological processes and sum up findings on their role in pathological conditions such as neurological disorders and cancers.

**Keywords:** GTPases; GTPase-activating proteins; actin; RhoA; acto-myosin; cancers; neurological diseases

## 1. Introduction

Small guanosine triphosphatases (GTPases) of the Rat sarcoma (Ras) superfamily are molecular switchers of key signaling pathways. Within the Ras superfamily, members of the Ras homolog (Rho) family are crucial to regulate actin-based processes such as adhesion, migration, or cell division. The alteration of Rho pathways is implicated in various pathological conditions including cancer, cardiovascular diseases, or developmental disorders [1–3]. In physiological conditions, these key cellular processes need to be tightly controlled in space and time at the molecular level. Regulation of small GTPases occurs through nucleotide binding and hydrolysis allowing the well-known guanosine diphosphate (GDP)/guanosine triphosphate (GTP) cycle. Thus, the spatiotemporal regulation of this cycle is determinant for the accomplishment of signaling cascades and downstream cellular processes. The main regulators of the GDP/GTP cycle of Rho GTPases are the guanine nucleotide exchange factors (GEFs) and the GTPase-activating proteins (GAPs), allowing, respectively, GTPase activation or inhibition.

The p190RhoGAP paralogs, p190RhoGAP-A (p190A, glucocorticoid receptor DNA-binding factor 1 (GRF-1), or GRLF1, encoded by the *ARHGAP35* gene) and p190RhoGAP-B (p190B, encoded by the

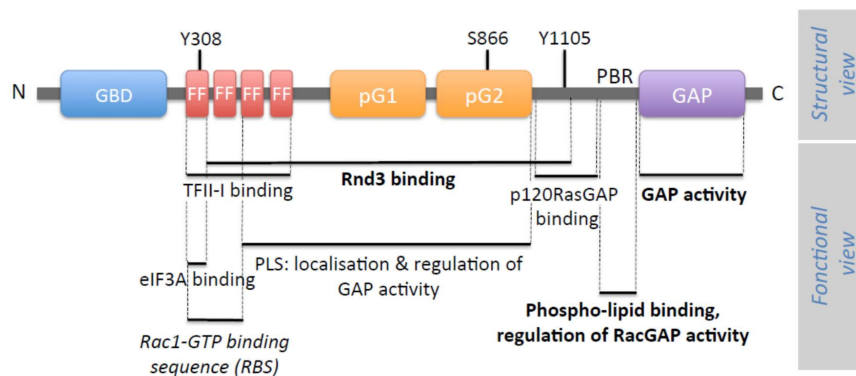


*ARHGAP5* gene), correspond to the two main GAPs regulating the Rho family of small GTPases. Both isoforms are large ( $\approx 1500$  amino acid long) multidomain proteins with their catalytic RhoGAP domain at the C-terminus. In humans, p190A (Uniprot Q9NRY4) and p190B (Uniprot Q13017) share over 50% sequence identity, and especially 70% for their GAP domain, but only 45% for the middle domain, which is the most divergent domain between both isoforms. The *ARHGAP35* gene is conserved in several species like chimpanzee, Rhesus monkey, dog, cow, mouse, rat, chicken, zebrafish, fruit fly, mosquito, and frog, whereas the *ARHGAP5* gene is present in mouse, chicken, lizard, and zebrafish. *Drosophila* shows a single p190RhoGAP (Uniprot Q9VX32), which shares 54% identity with human p190A [4]. Amino acid residues of the human and mouse p190B proteins are approximately 97% identical [5]. Of note, in cellular studies, rat p190A (Uniprot P81128), which is over 98% identical to human p190A, is often used to address p190A function.















Herein, we sum up their best-known cellular roles as regulators of Rho-dependent signaling processes such as cell adhesion, migration, invasion, and cytokinesis, even if Rho-independent implication of p190RhoGAPs emerges in the literature. We also address their important roles in development and in diseases.

## 2. p190RhoGAP Architecture

The two isoforms of p190RhoGAP share a common domain organization. Each domain has been studied either in a structural and/or functional approach (Figure 1). In addition to Figure 1 showing p190RhoGAP architecture, Figure 2 summarizes p190A and p190B partners.



**Figure 1.** Structure of p190RhoGAP. The structural organization of p190RhoGAP is represented (structural view) and the corresponding function of each domain is indicated when determined (functional view). From its N-terminus, p190RhoGAP is composed of a guanosine triphosphate (GTP)-binding domain (GBD) (13–249) and four FF domains (FF) (251–533) that can bind TFII-I, eIF3A, or Rac1 proteins. In the middle domain, two pseudoGTPase domains, pG1 (592–767) and pG2 (766–958) have been identified. The protrusion localization sequence (PLS) (380–971) is implicated in the localization and the regulation of the function of p190A. A polybasic region (PBR) (1213–1236), mainly composed of basic amino acids, binds to acidic phospholipids. The GTPase activating proteins (GAP) domain (1259–1513) is located at the C-terminus end of the protein and is responsible for the GAP catalytic function of p190A and p190B. Identified residues involved in the function of p190RhoGAP are indicated on the figure (number of amino acids corresponds to the rat p190A protein sequence). For the functional view, bold indicates data obtained for both p190A and p190B. Italic indicates data obtained only for p190B, whereas basic font indicates data obtained for p190A.

Protein/gene	P190A/B region involved	Partner region involved	Method used/cell line, tissue	Associated function	Refs
<b>P190A partners</b>					
RhoA		Switch I and II	In vitro assay, microinjection / Swiss 3T3 fibroblasts	Cell migration and invasion	Ridley et al., EMBO J. 1993 Gambin et al., Curr Opin Struct Biol. 1998
RhoC		ND	Immunofluorescence, p190RhoGAP siRNA / MTLn3 cells	Cell migration and invasion	Bravo-Cordero et al., Curr Biol. 2011 Bravo-Cordero et al., J Cell Sci. 2013
Rac1		ND	Filter binding assay, Rac GTPase activation assay, Immunofluorescence / COS7 cells	Cell adhesion and migration	Ligeti et al., JBC. 2004 Levy et al. Cell Signal. 2013
P120RasGAP		ND	GST pull-down, Co-IP / C3H10T1/2 murine fibroblasts & Cos7 cells	Actin dynamics	Roof et al., MCB. 1998
PYK2 (=RAFTK)	ND	ND	Co-IP (HA-p190/Flag-PYK2) / 293T cells	Cell invasion	Zrihan-Licht S et al., Oncogene 2000
Rnd3		Motif within residues 16–93	2-hybrid, GST pull-down, Co-IP / Yeast, Cos7 cells	p190 GAP activity	Wennerberg et al., Curr Biol. 2003
P120Catenin	Not GBD, not GAP	CRAD domain (in the C-terminal region)	CoIP (p120cat Ab) / NIH-3T3, MEFs cells GST/His pull-down / HEK293T cells, HPAEC	Adherent junction formation	Wildenberg et al., Cell. 2006 Zebda et al., JBC. 2013
TFII-I		N-terminal region	GST-pull-down, Co-IP / Cos7 cells, HMVE and HUVE cells	Gene expression, control of angiogenesis	Jiang et al., Mol Cell. 2005 Mammoto et al., Nature. 2009
GATA2	ND	ND	Co-IP / HMVE, HUVE cells	Gene expression, control of angiogenesis	Mammoto et al., Nature. 2009
PKC zeta	ND	ND	Endogenous Co-IP anti-PKC / hippocampal neurons	Spine morphogenesis	Zhang H & Macara I., Dev Cell 2008
Cortactin		ND	Co-IP, proximity ligation assay / Huh7 cells	Persistent cell migration	Binamé et al., JCB 2016
<b>eIF3A</b>		PCI domain	Co-IP, GST pull-down / HeLa cells, purified protein	Potential role in translational regulation	Parasuraman et al., JBC. 2017
<b>eIF3 B, C, D, H</b>	ND	ND	Co-IP, GST pull-down / HeLa cells, purified protein	Potential role in translational regulation	Parasuraman et al., JBC. 2017
<b>Claudin-11</b>		ND	Co-IP / squamous cell carcinoma	Regulation of cell-cell contacts	Li C-F et al., Nat Cell Biol. 2019
<b>Anillin</b>		C-terminal region	Co-IP, pull-down / HeLa cells	Cytokinesis	Manukyan et al., J Cell Sci. 2015
<b>Plexins</b>	ND	Cytoplasmic domain	Co-IP / 293T cells	Cell migration and angiogenesis	Barberis et al. J Cell Sci. 2005
<b>ECT2 RhoGEF</b>	ND	C-terminal half, preferentially	Co-IP, immunofluorescence / HeLa cells	Cytokinesis	Mikawa et al. Cell Cycle. 2008
<b>Brk</b>	ND	ND	Co-IP / HeLa cells (Flag-Brk), T47D cells (endogenous Brk)	Cell proliferation, migration and invasion	Shen et al. Cancer Res. 2008
<b>HPV16 E7</b>		C-terminal sequence	Mass spectrometry, Co-IP / HEK293, CaSk1, C33A, and HT1080 cells	Cell spreading	Todorovic et al. J Virol. 2014
<b>ABL2</b>	ND	ND	Co-IP / U87MG cells	Cell migration	Shimizu et al. JBC. 2014
<b>PrPC</b>	ND	ND	Co-IP / ZW cells	Neurite outgrowth	Kim HJ et al. Cell Death Dis. 2017
<b>P190B partners</b>					
RhoA		ND	Filter binding assay, immunofluorescence / human foreskin fibroblasts	Cell migration and invasion	Burbeo et al., JBC. 1995
P120RasGAP	ND	ND	Co-IP / normal foreskin fibroblast, HT-1080, RD cells	Cell adhesion	Burbeo et al., JBC. 1995
P120Catenin	ND	ND	Co-IP, immunofluorescence, GST pull-down / T47D cells	Adherent junction formation	Ponik et al., MBoC 2013
Rnd1/2/3		aa16-93 (Rnd3)	2-hybrid, GST pull-down, coIP, direct (GST) / Cos7 cells	p190 GAP activity	Wennerberg et al., Curr Biol 2003
Rac1		GTP-bound Rac1	GST-pull-down (GST-Rac1) with endogenous p190B / NIH-3T3 cells	GAP activity & localization, regulation of cell shape	Bustos et al., Curr Biol 2008
Src (Y1105)	ND	ND	CoIP/MDA-MB-468 cancer cells	Neoplastic multinucleation	Wu et al. Oncogene. 2014
MCT1	ND	ND	CoIP/MDA-MB-468 cancer cells	Neoplastic multinucleation	Wu et al. Oncogene. 2014

**Figure 2.** P190A and p190B partners. Co-IP: Co-immunoprecipitation; ND: Not Determined.

The RhoGAP domain is located at the C-terminal end of p190RhoGAP proteins. Both p190A and B have mainly a catalytic activity towards RhoA [6,7] and p190A represents 60% of the RhoGAP activity in cultured fibroblasts [8]. Arg1283 was identified as the active site allowing efficient catalysis of

RhoA-GTP [9]. By regulating RhoA activity, expression of p190RhoGAP in cells alters actin-based stress fibers formation, readout of RhoA function. Work from Dr. Ligeti's laboratory demonstrates that both p190RhoGAP isoforms can modulate their substrate specificity by switching their GAP activity from RhoA to Rac1 upon interaction between a polybasic region (PBR) located near the GAP domain and phospholipids [10,11] (Figure 1). Like most of the RhoGAP proteins, besides their RhoGAP module, p190A and B contain several domains conferring plasma membrane-binding protein interactions, which modulate their GAP activity as well as provide them additional functions.

The N-terminal part of p190RhoGAPs displays a GTP-binding domain (GBD), which was recently reclassified as a class (ii) pseudo-GTPase domain, meaning a nucleotide-binding catalytically inactive GTPase [4]. Based on crystal structure and on biochemical data, Stiegler and Boggon showed that the N-terminal domain of p190A binds constitutively to GTP/Mg<sup>2+</sup> but lacks intrinsic catalytic activity [4]. They further suggested that the role of GTP binding is not to act as a conformational regulator, but rather contributes to stabilizing the structure of the domain. This newly identified domain would so consist of a protein–protein interaction domain. In previous papers, GTP binding was reported to be regulated by a Src-mediated phosphorylation in this domain [12], but the impact of the lack of GTP binding on protein activity is not clear [13,14].

Closed to the GBD, four FF domains have been identified, each consisting of 50 amino acids motifs with two strictly conserved phenylalanines. These FF domains are usually found in nuclear RNA-regulating proteins, making p190RhoGAPs the only cytoplasmic proteins containing FF domains. This region has been implicated in interactions with proteins like the transcription factor TFII-I [15] or the translation preinitiation factor eIF3A [16] (Figure 2). These interactions have been reported to be regulated by phosphorylation. Phosphorylation of Tyr308 by PDGF Receptor within the first FF domain inhibits the interaction with TFII-I [15], but does not affect eIF3A interaction, which, itself, requires phosphorylation of Ser296 [16] (Figures 1 and 2).

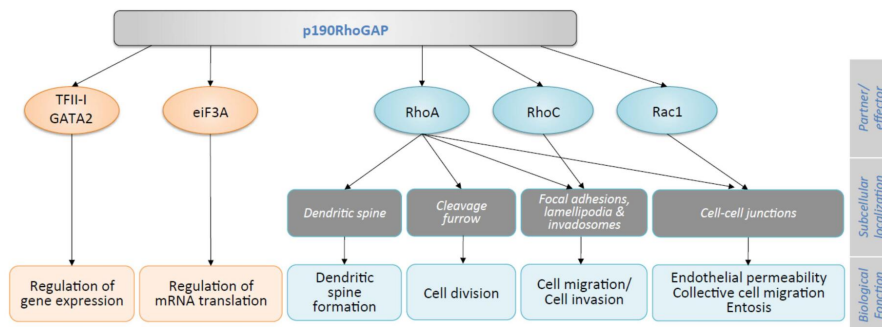
The former large “middle domain” defined by the region between the FF and GAP domains contains two newly identified cryptic GTPase-like domains which were termed pG1 and pG2 and classified as class (i) pseudo-GTPase domains described with no nucleotide-binding activity (and therefore no catalytic activity) [17]. pG1 and pG2, encompassing, respectively, residues 592–767 and 766–958 in p190A, constitute two evolutionarily conserved domains, indicating that they may contribute to necessary functions [18]. Intriguingly, based on molecular and cellular studies, we demonstrated that an overlapping region (residues 380–971), including two FF motifs, pG1 and pG2, is necessary to target p190A to actin-based protrusions such as lamellipodia but also to regulate the GAP activity. We further hypothesized that this region, named PLS for protrusion localization sequence, could be involved in an autoinhibitory interaction allowing a closed/inhibited form of the protein [19]. In light of these new structural results, one attractive hypothesis is that one of the pseudo-GTPase domains could bind in cis to the GAP domain to regulate its activity. However, this hypothesis remains to be tested. Within pG2, Ser866 appears as a key residue regulating p190A localization and function. In fact, mutation of this serine into phenylalanine results in a higher GAP activity that alters tumor cell migration [20].

Moreover, in this former middle domain, the regions encompassing residues 382–1007 in p190A/B and residues 382–607 in p190B were shown to interact, respectively, with the atypical Rho family member Rnd3 [21], and the active Rac1 [22], modifying p190RhoGAP activities. Thus, p190RhoGAP function appears tightly regulated by this large middle domain.

Finally, among the other residues important in the regulation and function of p190A, Tyr1105 was identified early as a Src phosphorylation site involved in the association of p190A with the Ras GAP protein, p120RasGAP and, consequently, in its recruitment to the plasma membrane [23–26] (Figure 2). Although phosphorylation of Y1105 is essential for complex formation, additional phosphorylation of Y1087 in p190A helps to stabilize the interaction [25]. Tyr1105 was also demonstrated to be substrate of other non-receptor tyrosine kinases such as Brk (breast tumor kinase) and ABL2 (v-Abl Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 2)/Arg (Abelson-related gene) kinase resulting in the activation of p190RhoGAP [27,28].

### 3. p190RhoGAP Cellular Functions

Due to their enzymatic activity consisting of an increased GTP hydrolytic rate and thereby an attenuation of the biological function of small GTPases, GAPs are often labeled as signal terminators. However, thanks to interaction with key partners, GAPs may also function as signal initiators and/or transmitters [29,30]. Function of both p190RhoGAP isoforms is intrinsically linked to RhoA regulation, even if more recently, few roles independently of RhoA were suggested (Figure 3). Of note, most of the data available, summarized in Figure 3, focused on p190A, while only few on p190B.



**Figure 3.** Cellular functions of p190A. P190A functions occurring independently of small GTPases are indicated in orange and those implicating the small GTPases are indicated in blue.

#### 3.1. RhoA-Dependent Cell Mechanisms

P190RhoGAPs play their major role by inhibiting the GTPase RhoA and thus its downstream effectors, the Rho-associated coiled-coil-containing protein kinase (ROCK) and the formin mDia. Via ROCK, RhoA controls the phosphorylation of myosin light chain, thus cell contractility, and the cleavage of F-actin by inhibiting cofilin activity. Via mDia, RhoA promotes actin polymerization. Inhibition of RhoA by toxins or dominant negative inhibitors in vitro demonstrated essential functions of this GTPase in stress fiber formation, maintenance of cell–cell contacts, cytokinesis, and cell migration [2,31]. Consequently, p190RhoGAP activity leads to a major decrease in acto-myosin/contractility and thus impacts various RhoA dependent-cell mechanisms. This regulatory function depends on p190RhoGAP subcellular localizations and partner interactions (Figures 2 and 3). Indeed, p190A accumulates in actin-rich structures where a regulation of RhoA is necessary. Localization of the protein in new adhesion sites [32], lamellipodia/ruffles [23], and podosomes/invadopodia [33,34] involved p190RhoGAP in cell migration and invasion. These well-described functions were reviewed elsewhere [19]. Other functions of p190A such as endothelial permeability, collective cell migration, entosis, cell division, and synaptic transmission are described herein. These roles are linked to p190A redistribution at either intercellular junctions [35], cleavage furrow [36], or dendritic spines [37].

##### 3.1.1. Cell–Cell Junctions and Endothelial Permeability

Cadherin engagement to form adherens junctions was previously shown to inhibit RhoA activity via p190A [38]. This occurs through an interaction between p190A and p120-catenin at cell–cell junctions allowing p190A translocation to the membrane where it plays its role of GTPase regulator [35]. A domain in the C-terminus part of p120-catenin, named CRAD (catenin-RhoGAP-association domain) was recently identified as the minimal domain of interaction with p190A (Figure 2). In endothelial cells, depletion of the CRAD of p120-catenin affects p190A translocation to the membrane and is therefore responsible for an increase of RhoA and a decrease of Rac1 signaling, altering endothelial permeability [39].

### 3.1.2. Cell–Cell Junctions and Collective Cell Migration

The sub-cellular localization of p190A at cell–cell junctions was further described to play a role in collective cell migration of squamous cell carcinoma [40]. Indeed, inhibiting RhoA activity is required to decrease actomyosin activity at cell–cell contacts and favor coordinated cell movement. More recently, this role was demonstrated to be important in the formation of circulating tumor cell clusters. An interaction between claudin-11 and p190A is required to downregulate RhoA at intercellular junctions in order to maintain stable cell–cell contacts during dissemination of these circulating tumor cells [41]. The RhoGAP activity at cell–cell junctions may also implicate p190B. Indeed, in breast cancer cells, RhoA activity at cell–cell contact is regulated by p190B through a complex with p120-catenin (Figure 2). Interestingly, this complex formation is modulated in response to matrix rigidity. This suggests that a cross-talk between cell–cell contact and cell–matrix adhesion is generated by the p190B/p120-catenin complex to spatially regulate RhoA activity in response to changes in tensional homeostasis [42].

### 3.1.3. Cell–Cell Junctions and Entosis

Throughout its role on attenuation of cell contractility via RhoA down-regulation, p190A was recently implicated in the entotic mechanism. Entosis is described as a non-apoptotic cell death program for cancer cells, where one cell is able to ingest its living neighboring cell. This competition between tumor cells results from a difference in cell contractility between the invading (i.e., loser) and the engulfing (i.e., winner) cell [43]. On one hand, the winner cell exhibits high mechanical deformability, allowing changes in its shape and morphology. On the other hand, the invading cell accumulates actin and myosin at the cell cortex and the resulting mechanical tension drives the cell-in-cell invasion process. In this cellular mechanism, increased cell tension is regulated by Rho/ROCK following establishment of cell–cell adhesion [44,45]. Localization of p190A at cell–cell junctions in the invading cell allows the polarization of RhoA activity and the distribution of tension at the back, which promotes entosis. Accordingly, p190A is required for entosis, and downregulation of its expression reduced entosis [45].

### 3.1.4. Cell Division

In eukaryotic cells, by its interaction with anillin, p190A localizes at the cleavage furrow of cells allowing a role of this protein during late mitosis [46,47]. Level of endogenous p190A is regulated during cell cycle leading to a decrease of the protein allowing cytokinesis completion. This transient decrease of p190A level during late mitosis is due to degradation of the protein via ubiquitination of the GBD domain [46]. P190A acts antagonistically with the RhoGEF ECT2 at the cleavage furrow where both proteins co-localize and probably interact [48]. A decrease in p190A level consequently regulates RhoA activity at the contractile ring, allowing completion of cytokinesis [36]. However, cells depleted of p190A failed to divide as well, as RhoA GTP induces increased contractility. Thus, p190A, by interacting with anillin, allows a fine regulation of the level of active RhoA necessary for cell division (Figure 2) [47]. However, p190A involvement in mitosis appeared more complex. In addition to its role in cytokinesis, p190A was recently implicated in regulating the mitotic spindle [49]. Interestingly, independently of its GAP activity, p190A is required for bipolar spindle formation in HeLa and RPE cells. This new role of p190A was demonstrated to occur through the regulation of the kinesin Eg5 and the kinase Aurora A activities [49].

### 3.1.5. Dendritic Spines and Neuronal Morphogenesis

In addition to the roles described above, p190RhoGAP was implicated in the regulation of actin cytoskeletal rearrangements in cells from the central nervous system, with implications in brain functioning [50–53]. In *Drosophila*, p190RhoGAP was identified as essential for axon branch stability in body neurons, olfactory learning, and the memory center [53]. In fact, activation of RhoA or

inactivation of p190A leads, in both cases, to axon branch retraction. The axon retraction pathway implicates Drok (*Drosophila* ROCK) and the myosin regulatory light chain [53]. Moreover, outgrowth of cellular extensions and formation of dendritic spines, which constitute actin-rich protrusions on dendrites essential for cognitive functions, are driven by actin cytoskeleton rearrangement and therefore under the control of RhoGTPases which are negatively regulated by p190A. In 2008, Zhang and Macara's work on dendritic spines implicated the polarity protein PAR-6 and p190A in spine morphogenesis. They showed that, in hippocampal neurons, where p190A and RhoA are downstream effectors of the PKC/PAR6 complex, the catalytic GAP activity of p190A is necessary for spine formation, and depletion of p190A leads to a decrease of spine density [37]. p190A is also implicated in neuronal morphogenesis in the developing brain. Indeed, phosphorylation of p190A by Arg kinase leads to its interaction with p120RasGAP and regulates neuronal morphogenesis in mice postnatal brain. The p190/p120RasGAP complex was demonstrated to induce neurogenesis in neuroblastoma cells [27]. Finally, in a recent study, p190A has been linked to the cellular prion protein (PrP<sup>C</sup>), a highly conserved glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored membrane protein involved in neurite outgrowth (Figure 2). A p190A/PrP<sup>C</sup> complex, which is impaired in the case of disease-associated mutants of PrP<sup>C</sup>, may be important to prevent prion-related neurodegeneration [54]. The impact of p190A in neuronal functions was further highlighted by p190A KO mice phenotypes (see paragraph 4) and by its involvement in neuronal diseases (Section 5.1).

### 3.2. RhoA-Independent Functions

Besides its RhoA-mediated functions, p190A also acts via other small GTPases such as RhoC and Rac1 or, as recently reported, via non-small GTPase pathways (Figure 3).

#### 3.2.1. RhoC/Rac1 Dependent Cell Migration and Invasion

In addition to RhoA, p190A demonstrated GAP activity towards RhoC and Rac1 (Figure 2). RhoC is a Rho family GTPase, which shares a high homology with RhoA [55] and promotes migration and invasion in many cancer cell types [56,57]. The activity of RhoC is regulated by both p190RhoGAP and p190RhoGEF at invadopodia [58] but also at protrusions at the leading edge of cells [59]. The spatial regulation of RhoC modulates protrusion formation by acting on actin dynamics and interfering with either of these proteins affect protrusion formation [60].

P190RhoGAPs display a GAP activity on Rac1 as well [11,61]. Based on in vitro experiments, the ability of p190RhoGAP to switch its GAP activity from RhoA to Rac1 was reported. In fact, due to the presence of some acidic phospholipids in the membrane, the activity of both p190A and p190B is modulated, leading to inhibition of RhoGAP activity and stimulation of RacGAP activity [11]. The switch between RhoGAP and RacGAP activity also depends on post-translational modification like prenylation of the GTPase [61]. The domain of interaction with acidic phospholipids was mapped and named PBR, consisting of a polybasic region composed of 24 amino acids close to the GAP domain in p190A (aa1213–1236) (Figure 1). Phosphorylation of Ser1121 and Thr1226 by PKC in PBR inhibits this interaction regulating thus the switch of GAP activity [62]. Similar to these in vitro experiments, under cellular conditions, p190RhoGAP exhibits RacGAP activity as well. Moreover, the PBR of p190A is necessary for the cellular RacGAP but not for the RhoGAP activity [10].

#### 3.2.2. Gene Expression and Protein Translation

In addition to its classical role of GAP protein acting as a GTPase inhibitor, p190A has been reported to interact with proteins involved in other cell mechanisms such as gene expression or mRNA translation, identifying p190A as a moonlighting protein.

P190A was implicated in gene expression regulation by its interaction with the multifunctional transcription factor TFII-I [63]. Intrigued by the FF domains present in p190A, the group of Pr. Settleman performed a pulldown approach to identify new partners of this domain. They thus identified the serum-responsive transcriptional regulator TFII-I as a specific interactor with the p190A FF domains

(Figures 1 and 2), and further demonstrated that these domains sequester TFII-I into the cytoplasm in a phosphorylation-dependent manner in fibroblasts [15]. P190A regulates the nuclear translocation and antagonizes the transcriptional activity of TFII-I. The cytoplasmic retention of TFII-I by p190A was further confirmed in human capillary cells where TFII-I governs vascular endothelial growth factor receptor 2 (*VEGFR2*) expression [64]. In these cells, p190A also inhibits the nuclear localization of the endothelial transcription factor GATA2. Through the regulation of both transcription factors, TFII-I and GATA2 that act antagonistically on *VEGFR2* expression, p190A was showed to control capillary network formation in vitro and retinal angiogenesis in mice [64].

In a similar pulldown approach, p190A was also reported to interact with eIF3A and other translation preinitiation factors (Figure 2). Indeed, five endogenous eIF3 subunits (eIF3A, B, C, D, and H) were identified to co-immunoprecipitate with endogenous p190A, but not p190B, in HeLa cells. This interaction leads to an incomplete and non-functional preinitiation complex. As eIF1A and other important translational preinitiation complex subunits were absent from the p190A complex, the authors hypothesize that p190A might affect the overall rate of mRNA translation by preventing the assembly of complete preinitiation complexes [16]. Given that no previous evidence had suggested a role for p190A GTPase substrates in the rate-limiting initiation step of mRNA translation, this new role of p190A may be independent of its GAP activity, even if this remains to be determined.

These two latter examples suggest that p190A may function as a sequestering molecule through interaction with various proteins in order to regulate key molecular processes such as gene expression and protein synthesis.

#### 4. p190RhoGAP Function during Development

The respective roles of p190A and p190B isoforms in development were studied using *Arhgap35* and *Arhgap5* knockout in mice. Mice lacking a functional p190A protein die just after birth with several defects in neuronal development. The defects lead to aberrant neuronal morphogenesis and abnormalities in forebrain hemisphere fusion, ventricle shape, optic cup formation, neural tubes closure, and layering of the cerebral cortex [51]. Additional defects were identified in axon guidance and fasciculation [52]. Of note, these animals and mouse embryonic fibroblasts derived from them are not totally knocked out for p190A but instead display a non-functional form of the protein, lacking the GBD domain [51].

Mice lacking p190B also die after birth and exhibit alterations in cell and organism size [65]. As for p190A, p190B-lacking mice exhibit defects in nervous system development suggesting failure in axonogenesis, neuronal differentiation, and neurogenesis [66]. In p190B-deficient mice, a significant reduction in adipogenesis was observed [67] as well as an altered mammary ductal morphogenesis [68]. This latter defect due to p190B deficiency was extensively studied using an inducible system allowing the expression of p190B at different stages of mammary development. p190B overexpression during ductal morphogenesis or during pregnancy alters the terminal end buds (TEB) architecture, leading to disrupted ductal tree, and induces hyperplastic lesions, respectively [69]. As p190B, p190A was involved in mammary gland development but exhibits a distinct role in this process. P190A is implicated in cell adhesion within the TEB and its deletion alters the mammary epithelium differentiation [70].

Altogether, these findings obtained in murine models demonstrated that p190A and p190B play similar but still distinct roles in neuronal and mammary development.

## 5. p190RhoGAPs in Human Diseases

### 5.1. p190RhoGAPs in Neuronal Diseases

Due to the implication of p190A in neural development [51,66], few genome-wide and non-bias studies suggested a role of this protein in mental health disorders.

Frontotemporal dementia (FTD) is one of the leading causes of dementia in young patients (<65 years old). Looking for genes potentially implicated in the development of FTD, Mishra and collaborators identified *ARHGAP35* as a candidate gene. Indeed, performing gene-based association studies on 3348 clinically identified FTD cases, they reported the novel genetic association of *ARHGAP35* with progressive non-fluent aphasia [71]. These data are further consolidated by the fact that *ARHGAP35* is strongly expressed in brain tissues, and more specifically, in the anterior cingulate cortex, which is one of the early affected regions in FTD patients [71].

Other studies involved p190A in stress-induced diseases. Stress exposure may lead to neuronal remodeling and structural plasticity. As p190A is localized at dendritic spines, the group of Koleske analyzed the role of p190A in the brain circuit using mice with reduced gene dosage of the protein [72,73]. They determined that p190A is involved in the behavior of mice and cellular response to the prolonged exposure to the major stress hormone, corticosterone [72]. They found that in neural systems, by inhibiting RhoA and subsequently, modulating cellular actomyosin contractility, p190A coordinates behaviorally adaptive outcomes such as mitigating vulnerability to stress hormone exposure, but also to drugs of abuse, as described hereafter. Indeed, underexpression of p190A was correlated with cocaine addiction in mice [73]. p190+/- mice in contrast to WT mice exaggerate locomotor activity and psychomotor sensitivity created by cocaine in link with a structural reorganization in neurons.

In humans, depression and, more precisely, suicide attempts are stress-induced diseases. With the aim to validate several genetic biomarkers associated with suicide attempts in patients with schizophrenia, Li and collaborators confirmed acid phosphatase 1 (ACP1) as a top predictor of suicide attempts [74]. This study also identified *ARHGAP35* as a gene whose expression is negatively correlated with ACP1, that the authors linked with the transcription repressor of glucocorticoid receptor (NR3C1) to stress response. Altogether, these data suggest that p190A may be involved in phenomena of behavioral vulnerability and resilience throughout life in humans.

Alcohol consumption during pregnancy may lead to severe psychological and organic alterations known as fetal alcohol spectrum (FAS) disorders. Actin cytoskeleton and p190RhoGAP were identified as potential targets of ethanol in astrocytes [75]. Indeed, in in vitro models (HEK293T cells and primary cultures of newborn rat astrocytes), an increase of p190A and p190B activities was detected in response to ethanol chronic exposure. These data provide insights into the molecular mechanism responsible for the neurobehavioral deficiencies induced by alcohol.

In conclusion, p190RhoGAP may act as key factor in cellular response after chronic stress exposure induced by hormones or drugs. Through its role on cytoskeleton remodeling, p190RhoGAP may be linked to the pathogenesis of other stress-related and neurodegenerative diseases.

### 5.2. p190RhoGAPs in Cancer

Linked to the role of p190RhoGAP in cell cycle progression, cell migration and invasion, many papers described p190A and p190B implication in cancer progression. P190A was first described as a substrate of the oncoprotein c-Src, interacting with p120RasGAP, a key regulator of the Ras oncogene, and subsequently described to contribute to fibroblast transformation [76–81]. P190RhoGAP was reported to be involved in several cancer types based on data coming from either patient samples or cell lines (Tables 1 and 2). Different types of alterations were reported concerning the mRNA or protein expression, the mutational or the phosphorylation status, and/or the GAP activity of p190A and p190B proteins. Most of the studies investigate p190A involvement, whereas only few focus on p190B. Hereinafter, we attempt to summarize data available on p190RhoGAP in the cancer field.



**Table 1.** P190RhoGAP's deregulation in cancers. This table lists data on p190A and 190B obtained from patients. Abbreviations: T, tumoral; NT, non tumoral; nd, not determined; IHC, immunohistochemistry; FISH, fluorescence in situ hybridization.

Cancer Type	Nb of Tumor/Control	Expression	Detection	Source of Deregulation	Output	References
<b>p190A</b>						
<b>Cancer</b>	3281 T (12 tumor types)	nd	Exome sequencing	Mutations	ARHGAP35 significantly mutated in cancer	Kandathil et al. Nature 2013
	4742 T (21 tumor types)	nd	Exome sequencing	Mutations: 83 missense, 38 nonsense, 16 frameshift and 2 splice site	ARHGAP35 significantly mutated in cancer	Lawrence et al. Nature. 2014
	191 gliomas + 115 gliomas + 37 ovarian cancers	nd	FISH assay	Locus rearranged/Chromosomal region frequently deleted in solid tumors	Alteration may be responsible of cancerogenesis	Tikoo et al. Gene. 2000
<b>Osteosarcoma</b>	247 T	Up	IHC	nd	Poor outcome (larger tumor size, tumor dedifferentiation, high metastatic risk, recurrence-free and overall survival)	Zhao et al. Tumor Biol. 2014
	247 T/428 NT	nd	TaqMan PCR	rs1052667 polymorphism (3' UTR)	Association with osteosarcoma risk, grade and poor prognosis	Zhao et al. Bio Med Res Int. 2014
<b>Colorectal cancer</b>	114 T/NT	Up	qRT-PCR, IHC, WB	nd	Correlation between expression and grade Poor survival outcome	Li et al. Am Transl Res. 2016
	124 T	nd	PCR-SSCP	c.2834dupA > p.Asn946GlnfsX11	Premature stop/Loss-of-function mutation	Ji Choi et al. Pathol. Oncol. Res. 2017
<b>Lung adenocarcinoma</b>	133 T/NT	Up	qRT-PCR, IHC	↗ <sup>ns</sup> phospho-p190A	Poor disease-free survival	Notsuda et al. Int J Oncol. 2013
	660 T/NT	nd	Exome sequencing, RNA seq	Missense & frameshift indel or nonsense mutations	ARHGAP35 alteration in oncogene-negative tumors	Campbell et al. Nature Genetics. 2016
<b>Hepatocellular carcinoma</b>	37 T/17 NT	Down	PCR array	nd	Potentially responsible of non-viral hepatocarcinogenesis	Kurokawa et al. J Hepatol. 2003
	44 T	nd	IHC	↗ <sup>ns</sup> Grp78 > FAK > phospho-p190A	Link between Grp78 and tumoral invasion	Su et al. BMC Cancer, 2010
<b>Hürtle Cell Carcinoma</b>	41 T/NT	nd	Exome sequencing	p.E1273A	Recurrently mutated in HCC (≈5% samples)	Gopal et al. Cancer cell. 2018
<b>Renal angiomyolipoma</b>	30 T	nd	Sanger sequencing	p.E1273A	Missense variant with uncertain functional effects	Giannikou et al. PLOS Genetics. 2016

**Table 1.** Cont.

Cancer Type	Nb of Tumor/Control	Expression	Detection	Source of Deregulation	Output	References
<b>p190B</b>						
<b>Hepatocellular carcinoma</b>	47 T	Up	IHC	Positive correlation between the expression levels of CD147 and p190B	Role in HCC progression by regulation of cell movement through p190B and CD147	Chen et al. Cancer Cell Int. 2016
<b>Nasopharyngeal carcinoma</b>	52 T	Up	RT-qPCR, WB	↗ <sup>ns</sup> miR-744 > ↗ <sup>ns</sup> p190B	Tumor progression	Fang et al. Oncotarget. 2015
<b>Invasive epithelial ovarian cancer</b>	18,736 T (10,316 of serous histology) / 26,138 NT	Down	eQTL	nd	G allele of AKAP6 rs927062 correlated with reduced expression of ARHGAP5	Earp et al. PLoS ONE 2018
<b>Lung cancer</b>	54 T	Up	IHC, qRT-PCR	Inverse correlation between miR-486-5p and ARHGAP5 expression	Positive correlation of p190B expression and cancer stage and lymph node metastasis	Wang et al. Oncogene. 2014
<b>Colorectal adenomatous polyposis</b>	221 T / 531 NT		Genome-wide analysis of germline CNV, NGS	Somatic point mutations/Partial duplication	One of 11 promising causative candidate genes	Horpaopan et al. Int. J. Cancer. 2015
<b>Breast cancer</b>	120 T / 7 NT	Up	qPCR array	Positive correlation between MCT-1 expression and ARHGAP5 expression in tumors	MCT-1 controls cancer cell dissemination and progression through Src/p190B signaling pathway	Wu et al. Oncogene. 2014

**Table 2.** Cellular or molecular effects of p190RhoGAP deregulation in cancers. This table lists functional deregulations of p190A or p190B in cancer studied in vitro and in vivo experiments. Abbreviations: o/e, overexpression; nd, not determined.

Cancer Type	Cell Lines	Loss or Gain of Function Experiment	Output on p190A Activity	Output on Cell Proliferation	Output on Cell Migration/Invasion	Other Output	References
<b>p190A</b>							
Osteosarcoma	MG63	Loss (si p190A)	nd	Decrease	nd	Increase of apoptosis	Zhao et al. Tumor Biol. 2014
Breast cancer	MDA-MB-231	Gain (plasmids p190A)	Increase Brk/p190A interaction, phosphorylation of p190A and p190/p120 complex formation	Increase	Increase	Increase tumorigenicity (mice model)	Shen et al. Cancer Res. 2008
	MDA-MB-468, MCF10A	Gain (plasmids)	nd	nd	nd	Induction of caspase- and Rho-dependent apoptosis	Ludwig and Parsons. Genes & Cancer. 2011
Lung adenocarcinoma	A549, LK87, PC-14, H1975	Loss (si p190A)	Decrease p190/p120 complex formation, Ras inactivation, Rho activation	Cell cycle arrest	Decrease	Inhibition of Ras pathway	Notsuda et al. Int J Oncol. 2013
Glioma	PDGF/Gtv-a cells	Gain (WT GAP domain)	nd	Inhibition of PDGF-induced proliferation	nd	nd	Wolf et al. Genes Dev. 2003
Renal cancer	RCC, 786-O	Loss (si p190A)	nd	nd	nd	Restore fibronectin matrix assembly	Feijoo-Cuaresma. J Biol Chem. 2008
Melanoma	BLM human melanoma cells	Loss (si p190A)	p120ctn allows p190-RhoA interaction and RhoA activation	nd	E-cadherin melanoma transfectant invasion	nd	Molina-Ortiz et al. J Biol Chem. 2009
	LOX melanoma cells	Loss (injection of p190 antibody)	nd	nd	Decrease of matrix degradation	No alteration of cell adhesion	Nakahara et al. J Biol Chem. 1998
Squamous cell carcinoma	10 SCC cell lines and a primary HNSCC	Loss (sh p190A)	nd	nd	Dissociation of cancer cells	nd	Li et al. Nat Cell Biol. 2019
Pancreatic cancer	AsPC-1, PANC-1	Gain (p190-RhoA chimera)	Inhibition of RhoA activity (RhoB and RhoC)	No significant effect	Decrease of cell invasion, metastatic formation	nd	Kusama et al. Cancer Sci. 2006

**Table 2.** Cont.

Cancer Type	Cell Lines	Loss or Gain of Function Experiment	Output on p190A Activity	Output on Cell Proliferation	Output on Cell Migration/Invasion	Other Output	References
Human Papillomavirus	HaCat, CaSki, C3A, U2OS, HT1080	Gain (plasmids p190A-HA)	Interaction MD p190A & Ck3 of HPV E7	nd	nd	Decrease actin stress fiber formation, cell spreading	Todorovic et al. J Virology. 2014
Cancer	Huh7, MDA-MB-231, MEF	Gain (plasmids p190A-HA)	ΔPLS, S886F and Δ865-870 increase RhoGAP activity	nd	Alteration of cell migration directionality	Defect in cell protrusion localisation and lamellipodia persistence	Binamé et al. J Cell Biol. 2016
	MDCK cell lines	Loss (sh p190A)	nd	Loss of CIP	nd	Nuclear translocation of YAP, rescue repression of gene transcription of Hippo pathway	Frank et al. J Cell Biol. 2018
<b>p190B</b>							
Breast cancer	MDA-MB-468	Loss (si p190B)	Interaction between p190B and MCT1 and also Src	Decrease acytokinetic division and neoplastic multinucleation induced by MCT1	nd	Inhibition of tumor growth	Wu et al. Oncogene. 2014
	MCF7-10A, rats	Gain (o/e p190B)	Overexpression of p190B in some murine mammary tumors	nd	nd	Actin cytoskeleton reorganization, loss of adhesion	Chakravarty et al. Cell Growth Differ. 2000
	Neu mice	p190B haploinsufficiency	Affect Rho signaling pathways	nd	nd	Inhibition of tumor initiation and progression, increase tumor free survival	Heckman-Stoddard et al. Breast Cancer Res. 2009
Hepatocellular carcinoma	Huh7	Loss (si p190B)	Increase RhoA activity	nd	Increase cell spreading and cell migration	nd	Gen et al. Cancer Lett. 2009
	SMMC-7721, Huh7, HepG2	Loss (si p190B)	Increase of RhoA activity	nd	Decrease migration induced by CD147	nd	Chen et al. Cancer Cell Int. 2016
Nasopharyngeal carcinoma	NPC cell lines	Loss (si p190B)	nd	nd	Abrogates migration and invasion induced by miR-744	nd	Fang et al. Oncotarget. 2015
Cancer	MDCK cell lines	Loss (sh p190B)	nd	Loss of CIP	nd	Nuclear translocation of YAP, rescue repression of gene transcription of Hippo pathway	Frank et al. J Cell Biol. 2018

### 5.2.1. ARHGAP35 as a Significant Mutated Gene in Cancer

Several large-scale studies mapping somatic variants across thousands of tumors recently identified *ARHGAP35*, the gene-encoding p190A, as a new major cancer gene [82,83]. In 2013, *ARHGAP35* appears among 127 significantly mutated genes from the analysis of 3281 tumors across 12 cancer types, with the highest percentage in uterine corpus endometrial carcinoma [83]. These data were confirmed by Lawrence et al. in 2014. Exome sequencing analysis of almost 5000 samples from 21 tumor types identifies *ARHGAP35* as a candidate gene in cancer among 33 new genes. In this study, 2% of whole samples exhibit a mutation on *ARHGAP35* gene and this mutational status appears significant for five tumor types: Endometrial tumors (14%), lung squamous cell carcinoma (5%), lung adenocarcinoma (3%), head and neck cancer (3%), and kidney clear cell carcinoma (1%) [82]. The alteration of *ARHGAP35* gene in lung cancer was further confirmed by a more recent study dedicated to the identification of new driver genes in lung carcinogenesis. Indeed, *ARHGAP35* was highlighted as a new gene significantly altered in lung adenocarcinoma-lacking receptor tyrosine kinase–Ras–Raf pathway or other oncogene alterations [84]. Interestingly, in this study, *RASA1*-encoding p120RasGAP, a partner of p190A (Figure 2), was also found mutated in squamous cell carcinomas, suggesting that p190A/p120RasGAP pathway may be involved in lung carcinogenesis. Finally, searching for genetic drivers of Hürthle cell carcinoma of the thyroid, whole-exome sequencing also identified recurrent mutations in *ARHGAP35*, in addition to *NRAS*, *TP53*, *CDKN1A*, and *TERT* promoter [85]. Altogether, these data demonstrated that *ARHGAP35* is a new identified cancer gene. However, investigations should now be performed to correlate *ARHGAP35* mutations with clinicopathological features and prognosis of cancer patients.

To better understand p190A function during cancer development and progression, we may attempt to analyze mutation spectrum. Even if few hotspots may be distinguished (i.e., R997\* in endometrial tumors [82] or E1273A in thyroid tumors or renal angiomyolipoma [85,86]), *ARHGAP35* mutations are observed all along the gene with nonsense mutations and frameshift deletions/insertions supporting a tumor-suppressor role for p190A (tumorportal website (<http://www.tumorportal.org/>)). At the protein level, as the GAP domain of the protein is localized at its C-terminus, these latter mutations are expected to behave as loss of function mutations, leading to a non-functional protein without GAP activity. This was confirmed by our study of the R997\* nonsense mutation in vitro. Ectopically expressed p190A-R977\* was unable to bind active RhoA, so to affect stress fiber formation [20]. Besides these mutations, many missense mutations were also reported all along *ARHGAP35* sequence. Even if some may have no impact on the protein activity as Y742H or R832Q found in endometrial tumors, we showed that some mutations localized in the pG2 domain (Figure 1) had a strong impact on the protein activity and on cell behavior [20]. Indeed, the point mutation S866F and the in-frame deletion del865-870 when ectopically expressed in tumor cells induce an increase of p190A activity and an alteration of directed tumor cell motility [20]. It is clear that the impact of such mutations remains to be explored in a closer way, but interestingly, these data allow us to hypothesize on a new mode of regulation of p190A, suggesting a potential auto-inhibitory folding of the protein [19]. Thus, even if, at first glance, cancer genome sequencing data support a tumor-suppressor function for p190A, more mechanistic studies about the impact of the cancer-associated mutations are required.

So far, no study has identified mutations in the p190B-encoding gene *ARHGAP5* in cancers. However, a genome-wide investigation into copy number variations of 221 colorectal adenomatous polyposis samples revealed recurrent alterations in three genes from the ARHGAP family, among which was *ARHGAP5*. A partial duplication and several somatic point mutations in this latter gene suggest a role for p190B in colorectal adenoma formation, and classify *ARHGAP5* as a candidate gene that may increase the risk of hereditary colorectal tumors [87]. This finding remains to be confirmed with other genetic studies.

### 5.2.2. ARHGAP35 and ARHGAP5 as Tumor-Suppressor Genes

Without analyzing *ARHGAP35* and *ARHGAP5* mutational status, several studies reported a decrease of expression of those genes in human tumors.

Hepatitis viruses (HCV and HCB) are major risk factors for hepatocellular carcinoma (HCC), the main primary liver tumor. With the aim to focus on HCC lacking hepatitis virus background, Kurokawa and collaborators performed a PCR array gene profiling and observed a lower expression of p190A mRNA in HCC samples in comparison with non-tumor liver tissues [88]. Similarly, the expression of *ARHGAP5*, encoding p190B isoform, was found downregulated in invasive epithelial ovarian cancers [89].

Consistent with a tumor-suppressor function, *ARHGAP35* gene maps to the chromosomal region 19q13.3, which is also frequently deleted in gliomas, in pancreatic, ovarian, and thyroid tumors [90–92]. For gliomas, the tumor-suppressive role of p190A was studied in mice. In a model of oligodendrogliomas using PDGF (platelet-derived growth factor)-expressing retrovirus, co-expression of p190A GAP domain caused a decreased incidence of oligodendrogliomas compared with that observed with PDGF alone [92]. This finding is consistent with the fact that p190A is involved in the differentiation of glial cells [93].

In this context, the function of p190A often occurs through RhoA inactivation. Interestingly, RhoA inhibition by p190A or its C-terminus domain was suggested as a new approach in pancreatic cancer treatment. Indeed, overexpression of p190-RhoA chimera in human pancreatic cancer cells decreases the risk of developing liver metastasis in immune-incompetent mice [94]. As described above, by inactivating RhoA, p190RhoGAP activity leads to a major decrease in acto-myosin/contractility, inhibiting migration and/or invasion of cells. The activation of p190RhoGAP is mainly performed through phosphorylation by non-receptor tyrosine kinases such as Src, Brk, Blk (B lymphocyte kinase), ABL2/Arg kinase, and FAK (focal adhesion kinase), most of the time on Tyr1087 and Tyr1105 (Figure 1). These types of regulation of p190RhoGAP leading to alteration of tumor cell migration and invasion were demonstrated in various cancer cell types. In U87-MG glioma cells, the mediator of axon guidance semaphorin SEMA3F was shown to inhibit in vitro cell migration via the ABL2/Arg kinase-dependent activation of p190A and further inhibition of RhoA [95]. In prostate cancer cells, the microRNA miR-20a, which targets ABL2/Arg, was reported to be overexpressed [96]. In in vitro experiments, inhibition of miR-20a function led to an inhibition of migration and invasion of prostate cancer cells, via an activation of p190A [96]. In patients, this overexpression of miR-20a, which reduces p190A phosphorylation and its activation, correlates with a poor outcome.

Several papers from Teixido's laboratory focused on the involvement of p190RhoGAP in melanoma progression. They described p190A as a central molecule controlling melanoma cell invasion. Activation of p190A via phosphorylation by the tyrosine kinase Blk inhibits RhoA in melanoma cells [97]. Consequently, this signal decreased cell motility, invasion, and metastasis development in melanoma cellular and murine models [98,99]. They further demonstrated a key role of E-cadherin-based cell–cell junctions in this process via the interaction between p120-catenin and p190A [99].

Another interesting work from Parsons' laboratory also suggests that p190A may function as a tumor suppressor by regulating apoptosis. Indeed, in breast cancer cell lines, ectopic expression of p190A induced cell death in a RhoA and caspase-dependent manner. Moreover, p190A is able to modulate the apoptotic response to docetaxel (used as chemotherapeutic drug) and increase the sensitivity of breast cancer cell to the drug [100]. More recently, work by Hansen's laboratory suggests that p190A may alternatively play its tumor-suppressor function by promoting contact inhibition of cell proliferation through its cell–cell junction subcellular localization [101]. Indeed, they demonstrated that absence of p190A (but also p190B) is sufficient to alter contact inhibition of proliferation in epithelial cells cultured in matrigel. This function is dependent on the Hippo pathway, involving the translocation of YAP (yes-associated protein) to the nucleus and the downstream regulation of gene transcription [101].

Thus, altogether these data demonstrate that alterations of p190A arise in tumors from transformed cells of mainly epithelial origin. Thus, p190A through its numerous cellular functions is required to maintain a differentiated state of epithelial cells.

### 5.2.3. ARHGAP35 and ARHGAP5 as Potential Oncogenes

In contrast with the data summarized above, overexpression and/or overactivity of p190RhoGAP proteins were also reported in a number of studies questioning the status of tumor suppressor of p190A and p190B.

Overexpression of p190A was demonstrated in several cancer types at the protein or mRNA level and was proposed to influence the prognosis of patients. In osteosarcoma, high expression of p190A was correlated with poor outcome and associated with tumor dedifferentiation and increase of tumor size or metastasis risk [102]. Moreover, as a polymorphism in the 3'-UTR of *ARHGAP35* gene is associated with tumor size, tumor grade, tumor metastasis, and survival (overall and recurrence-free) of patients, p190A was proposed as an independent prognostic factor influencing survival of patients with osteosarcoma [103]. During colorectal cancer progression, from normal mucosa to liver metastasis through colorectal adenoma and primary carcinoma, p190A expression increased. Overexpression of p190A is thus correlated with poor prognosis in colorectal cancer [104]. In colorectal cancer cellular models, p190A activation together with p120RasGAP were shown to be important effectors of mutant *KRAS* [105]. In lung adenocarcinoma, p190A mRNA overexpression was associated with a hyperphosphorylation of the protein on Tyr1105 [106]. This hyperactivation of p190A leads to enhanced proliferation, migration, and invasion in EGFR-TKI cell line. This is in line with the poor disease-free survival of patients that harbor tumors with high levels of p190A mRNA [106]. At a glance, these data appear in clear contrast with the non-sense mutations recently found in lung adenocarcinoma [84], but p190A involvement may differ according to the tumor stage and/or mutational status.

As described earlier, p190A was involved in the collective mode of cell migration of squamous cell carcinoma through its role in maintaining cell–cell junctions. P190A is required to decrease actomyosin activity at cell–cell contacts and favor coordinated cell movement [40]. More recently, this role was demonstrated to be important in the formation of circulating tumor cell clusters. Downregulation of RhoA by p190A at intercellular junctions is required to maintain stable cell–cell contact during dissemination of circulating tumor cells [41].

Moreover, in breast cancer, a depletion of p190A leads to a decrease of incidence of bone metastasis in mice model [107]. In vitro and in human breast cancer tissue samples, the non-receptor tyrosine kinase Brk is expressed, but not in benign lesions or in normal breast tissue, and is associated with breast carcinoma cell proliferation [108]. Interaction of Brk with p190A is required to increase Tyr1105 phosphorylation leading to RhoA inactivation and Ras activation in vitro. In breast cancer cells, this will result in an increase in cell migration and invasion but also an increase in tumor growth [28]. Thus, this study revealed that p190A acts downstream of Brk to promote breast tumor proliferation and migration.

Similarly, p190B, which was reported essential for mammary gland development [68], was also suggested to play a role in mammary malignancy. Induction of p190B expression in mammary gland during pregnancy results in hyperplastic lesions in mice [69] and an increased level of p190B was detected in a subset of mutagen-induced mammary tumors [109]. More recently, overexpression of p190B was correlated with MCT1 (multiple copies in T-cell malignancy-1) expression in breast cancer. In vitro, MCT1-*Src*-p190B interaction gave rise to neoplastic multinucleation of breast cancer cells [110] that was suggested to favor tumorigenicity. This involvement of p190B was also studied in nasopharyngeal carcinoma and lung cancer where, respectively, miR-744 and miR-486-5 expressions correlated with p190B expression resulting in tumor progression and dissemination [111,112]. Several p190B loss-of-function studies in vitro and in vivo confirmed oncogenic role of p190B (Table 2). Depletion of p190B inhibits cell migration, cell invasion, tumor progression, and metastatic dissemination in different cell lines of lung cancer [112], breast cancer [110,113], hepatocellular carcinoma [114], and nasopharyngeal carcinoma [111].

Thus, in the oncogenic context described above, p190A and p190B may be predictive factors for the prognosis of different types of tumors.

### 5.3. p190A and Other Diseases

Few studies investigate p190A involvement in other diseases. Among them, low p190A activity was observed in idiopathic pulmonary fibrosis (IPF), which is a chronic lung disease characterized by a progressive and irreversible decline in lung function. RhoA activity is increased in IPF fibroblasts and associated with IPF phenotype such as expression of different markers like smooth muscle actin, collagen I, and fibronectin [115]. In glomerulocystic kidney defects, using a small-scale Nethyl-n-nitrosourea mutagenesis screen, Stewart et al. highlighted a point mutation L1396G in p190A leading to an alteration on cilia elongation and its involvement in renal developmental diseases [116].

## 6. Conclusions and Future Directions

Through Rho-dependent functions, p190RhoGAPs play a critical role in regulating actin cytoskeleton dynamics. Both isoforms p190A and p190B are ubiquitously expressed and co-exist in most cells. They share a common structural organization, often common partners, and similar subcellular localizations, but the interplay between both isoforms at the cellular level remains to be explored in detail. So far, data are in favor of distinct but overlapping functions that may or may not involve regulation of Rho family GTPases. Recent data highlighted new structural domains, i.e., pseudo-GTPases in p190RhoGAPs, and hypothesized a new mode of regulation, i.e., autoinhibitory folding for p190A, opening new paths to explore. Structural, combined with functional, studies would permit us to better understand the molecular mechanisms underlying the function of p190RhoGAPs.

Their involvement in pathologic disorders is important to address to determine whether their signaling may be useful in a therapeutic approach. As described herein, p190RhoGAPs are suggested to play a role mainly in mental health disorders and in tumorigenesis.

Aberrant regulation of Rho GTPase activity and corresponding effector pathways is described to be a hallmark of human tumors. However, the Rho GTPase signaling network is complex. For negative regulators as GAPs, the general trend is toward a reduced expression of GAPs [117]. Nevertheless, the emerging picture for p190RhoGAP is much more complex, probably dependent on the environment and on both tumor type and progression status. Study of cancer-associated mutations by using genome editing would contribute to getting clues about the role of p190RhoGAP in tumorigenesis. This may lead to unexpected functions and regulations of p190RhoGAP.

**Funding:** This research was funded by La Fondation pour la Recherche Médicale (grant number DEQ20180839586), by INCa (grant PLBIO2014-182) and by La Ligue contre le Cancer (comité de Gironde). C.H. is supported by a PhD fellowship from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

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

### Abbreviations

Abl2	v-Abl Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 2
ACP1	acid phosphatase 1
Arg	Abelson related gene
Blk	B lymphocyte kinase
Brk	breast tumor kinase
CRAD	Catenin-RhoGAP-Association Domain
EGFR-TKI	epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor
FAK	focal adhesion kinase
FAS	fetal alcohol spectrum
FTD	Frontotemporal dementia
GAP	GTPase activating protein
GBD	GTP-binding domain
GDP	guanosine diphosphate
GEF	guanine nucleotide exchange factor

GPI	glycosylphosphatidylinositol
GRF-1	glucocorticoid receptor DNA-binding factor 1
GTP	guanosine triphosphate
GTPase	guanosine triphosphate hydrolase
HCC	hepatocellular carcinoma
IPF	idiopathic pulmonary fibrosis
MCT1	multiple copies in T-cell malignancy-1
PBR	polybasic region
PDGF	platelet derived growth factor
PLS	protrusion localization sequence
PrPc	cellular prion protein
Ras	Rat sarcoma
ROCK	Rho associated coiled-coil-containing protein kinase
Rho	Ras homolog
TEB	terminal end buds
YAP	yes-associated protein

## References

1. Toksoz, D.; Merdek, K.D. The Rho small GTPase: Functions in health and disease. *Histol. Histopathol.* **2002**, *17*, 915–927. [[CrossRef](#)]
2. Haga, R.B.; Ridley, A.J. Rho GTPases: Regulation and roles in cancer cell biology. *Small GTPases* **2016**, *7*, 207–221. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Hall, A. Rho family GTPases. *Biochem. Soc. Trans.* **2012**, *40*, 1378–1382. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Stiegler, A.L.; Boggon, T.J. The N-Terminal GTPase Domain of p190RhoGAP Proteins Is a PseudoGTPase. *Structure* **2018**, *26*, 1451–1461.e1454. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Burbelo, P.D.; Finegold, A.A.; Kozak, C.A.; Yamada, Y.; Takami, H. Cloning, genomic organization and chromosomal assignment of the mouse p190-B gene. *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, *1443*, 203–210. [[CrossRef](#)]
6. Burbelo, P.D.; Miyamoto, S.; Utani, A.; Brill, S.; Yamada, K.M.; Hall, A.; Yamada, Y. p190-B, a new member of the Rho GAP family, and Rho are induced to cluster after integrin cross-linking. *J. Boil. Chem.* **1995**, *270*, 30919–30926.
7. Ridley, A.J.; Self, A.J.; Kasmir, F.; Paterson, H.F.; Hall, A.; Marshall, C.J.; Ellis, C. rho family GTPase activating proteins p190, bcr and rhoGAP show distinct specificities in vitro and in vivo. *EMBO J.* **1993**, *12*, 5151–5160.
8. Vincent, S.; Settleman, J. Inhibition of RhoGAP activity is sufficient for the induction of Rho-mediated actin reorganization. *Eur. J. Cell Biol.* **1999**, *78*, 539–548. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Li, R.; Zhang, B.; Zheng, Y. Structural determinants required for the interaction between Rho GTPase and the GTPase-activating domain of p190. *J. Boil. Chem.* **1997**, *272*, 32830–32835.
10. Levay, M.; Bartos, B.; Ligeti, E. p190RhoGAP has cellular RacGAP activity regulated by a polybasic region. *Cell. Signal.* **2013**, *25*, 1388–1394. [[CrossRef](#)]
11. Ligeti, E.; Dagher, M.C.; Hernandez, S.E.; Koleske, A.J.; Settleman, J. Phospholipids can switch the GTPase substrate preference of a GTPase-activating protein. *J. Boil. Chem.* **2004**, *279*, 5055–5058. [[CrossRef](#)]
12. Roof, R.W.; Dukes, B.D.; Chang, J.H.; Parsons, S.J. Phosphorylation of the p190 RhoGAP N-terminal domain by c-Src results in a loss of GTP binding activity. *FEBS Lett.* **2000**, *472*, 117–121. [[CrossRef](#)]
13. Tatsis, N.; Lannigan, D.A.; Macara, I.G. The function of the p190 Rho GTPase-activating protein is controlled by its N-terminal GTP binding domain. *J. Boil. Chem.* **1998**, *273*, 34631–34638. [[CrossRef](#)]
14. Foster, R.; Hu, K.Q.; Shaywitz, D.A.; Settleman, J. p190 RhoGAP, the major RasGAP-associated protein, binds GTP directly. *Mol. Cell. Biol.* **1994**, *14*, 7173–7181. [[CrossRef](#)]
15. Jiang, W.; Sordella, R.; Chen, G.C.; Hakre, S.; Roy, A.L.; Settleman, J. An FF domain-dependent protein interaction mediates a signaling pathway for growth factor-induced gene expression. *Mol. Cell* **2005**, *17*, 23–35. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Parasuraman, P.; Mulligan, P.; Walker, J.A.; Li, B.; Boukhali, M.; Haas, W.; Bernards, A. Interaction of p190A RhoGAP with eIF3A and Other Translation Preinitiation Factors Suggests a Role in Protein Biosynthesis. *J. Boil. Chem.* **2017**, *292*, 2679–2689. [[CrossRef](#)]
17. Stiegler, A.L.; Boggon, T.J. p190RhoGAP proteins contain pseudoGTPase domains. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 506. [[CrossRef](#)]

18. Stiegler, A.L.; Boggon, T.J. PseudoGTPase domains in p190RhoGAP proteins: A mini-review. *Biochem. Soc. Trans.* **2018**, *46*, 1713–1720. [[CrossRef](#)]
19. Bidaud-Meynard, A.; Biname, F.; Lagree, V.; Moreau, V. Regulation of Rho GTPase activity at the leading edge of migrating cells by p190RhoGAP. *Small GTPases* **2017**, *10*, 99–110. [[CrossRef](#)]
20. Biname, F.; Bidaud-Meynard, A.; Magnan, L.; Piquet, L.; Montibus, B.; Chabadel, A.; Saltel, F.; Lagree, V.; Moreau, V. Cancer-associated mutations in the protrusion-targeting region of p190RhoGAP impact tumor cell migration. *J. Cell Boil.* **2016**, *214*, 859–873. [[CrossRef](#)]
21. Wennerberg, K.; Forget, M.A.; Ellerbroek, S.M.; Arthur, W.T.; Burridge, K.; Settleman, J.; Der, C.J.; Hansen, S.H. Rnd proteins function as RhoA antagonists by activating p190 RhoGAP. *Curr. Biol.* **2003**, *13*, 1106–1115. [[CrossRef](#)]
22. Bustos, R.I.; Forget, M.A.; Settleman, J.E.; Hansen, S.H. Coordination of Rho and Rac GTPase function via p190B RhoGAP. *Curr. Biol.* **2008**, *18*, 1606–1611. [[CrossRef](#)]
23. McGlade, J.; Brunkhorst, B.; Anderson, D.; Mbamalu, G.; Settleman, J.; Dedhar, S.; Rozakis-Adcock, M.; Chen, L.B.; Pawson, T. The N-terminal region of GAP regulates cytoskeletal structure and cell adhesion. *EMBO J.* **1993**, *12*, 3073–3081. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Bryant, S.S.; Briggs, S.; Smithgall, T.E.; Martin, G.A.; McCormick, F.; Chang, J.H.; Parsons, S.J.; Jove, R. Two SH2 domains of p120 Ras GTPase-activating protein bind synergistically to tyrosine phosphorylated p190 Rho GTPase-activating protein. *J. Boil. Chem.* **1995**, *270*, 17947–17952. [[CrossRef](#)]
25. Hu, K.Q.; Settleman, J. Tandem SH2 binding sites mediate the RasGAP-RhoGAP interaction: A conformational mechanism for SH3 domain regulation. *EMBO J.* **1997**, *16*, 473–483. [[CrossRef](#)]
26. Roof, R.W.; Haskell, M.D.; Dukes, B.D.; Sherman, N.; Kinter, M.; Parsons, S.J. Phosphotyrosine (p-Tyr)-dependent and -independent mechanisms of p190 RhoGAP-p120 RasGAP interaction: Tyr 1105 of p190, a substrate for c-Src, is the sole p-Tyr mediator of complex formation. *Mol. Cell. Boil.* **1998**, *18*, 7052–7063. [[CrossRef](#)]
27. Hernandez, S.E.; Settleman, J.; Koleske, A.J. Adhesion-dependent regulation of p190RhoGAP in the developing brain by the Abl-related gene tyrosine kinase. *Curr. Biol.* **2004**, *14*, 691–696. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Shen, C.H.; Chen, H.Y.; Lin, M.S.; Li, F.Y.; Chang, C.C.; Kuo, M.L.; Settleman, J.; Chen, R.H. Breast tumor kinase phosphorylates p190RhoGAP to regulate rho and ras and promote breast carcinoma growth, migration, and invasion. *Cancer Res.* **2008**, *68*, 7779–7787. [[CrossRef](#)]
29. Csepanyi-Komi, R.; Pasztor, M.; Bartos, B.; Ligeti, E. The neglected terminators: Rho family GAPs in neutrophils. *Eur. J. Clin. Investig.* **2018**, *48* (Suppl. 2). [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. McCormick, F. ras GTPase activating protein: Signal transmitter and signal terminator. *Cell* **1989**, *56*, 5–8. [[CrossRef](#)]
31. O'Connor, K.; Chen, M. Dynamic functions of RhoA in tumor cell migration and invasion. *Small GTPases* **2013**, *4*, 141–147. [[CrossRef](#)]
32. Tomar, A.; Lim, S.T.; Lim, Y.; Schlaepfer, D.D. A FAK-p120RasGAP-p190RhoGAP complex regulates polarity in migrating cells. *J. Cell Sci.* **2009**, *122*, 1852–1862. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Nakahara, H.; Mueller, S.C.; Nomizu, M.; Yamada, Y.; Yeh, Y.; Chen, W.T. Activation of beta1 integrin signaling stimulates tyrosine phosphorylation of p190RhoGAP and membrane-protrusive activities at invadopodia. *J. Boil. Chem.* **1998**, *273*, 9–12. [[CrossRef](#)]
34. Guegan, F.; Tatin, F.; Leste-Lasserre, T.; Drutel, G.; Genot, E.; Moreau, V. p190B RhoGAP regulates endothelial-cell-associated proteolysis through MT1-MMP and MMP2. *J. Cell Sci.* **2008**, *121*, 2054–2061. [[CrossRef](#)]
35. Wildenberg, G.A.; Dohn, M.R.; Carnahan, R.H.; Davis, M.A.; Lobdell, N.A.; Settleman, J.; Reynolds, A.B. p120-catenin and p190RhoGAP regulate cell-cell adhesion by coordinating antagonism between Rac and Rho. *Cell* **2006**, *127*, 1027–1039. [[CrossRef](#)]
36. Su, L.; Pertz, O.; Mikawa, M.; Hahn, K.; Parsons, S.J. p190RhoGAP negatively regulates Rho activity at the cleavage furrow of mitotic cells. *Exp. Cell Res.* **2009**, *315*, 1347–1359. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Zhang, H.; Macara, I.G. The PAR-6 polarity protein regulates dendritic spine morphogenesis through p190 RhoGAP and the Rho GTPase. *Dev. Cell* **2008**, *14*, 216–226. [[CrossRef](#)]
38. Noren, N.K.; Arthur, W.T.; Burridge, K. Cadherin engagement inhibits RhoA via p190RhoGAP. *J. Boil. Chem.* **2003**, *278*, 13615–13618. [[CrossRef](#)]



39. Zebda, N.; Tian, Y.; Tian, X.; Gawlak, G.; Higginbotham, K.; Reynolds, A.B.; Birukova, A.A.; Birukov, K.G. Interaction of p190RhoGAP with C-terminal domain of p120-catenin modulates endothelial cytoskeleton and permeability. *J. Boil. Chem.* **2013**, *288*, 18290–18299. [[CrossRef](#)]
40. Hidalgo-Carcedo, C.; Hooper, S.; Chaudhry, S.I.; Williamson, P.; Harrington, K.; Leitinger, B.; Sahai, E. Collective cell migration requires suppression of actomyosin at cell-cell contacts mediated by DDR1 and the cell polarity regulators Par3 and Par6. *Nat. Cell Boil.* **2011**, *13*, 49–58. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Li, C.F.; Chen, J.Y.; Ho, Y.H.; Hsu, W.H.; Wu, L.C.; Lan, H.Y.; Hsu, D.S.; Tai, S.K.; Chang, Y.C.; Yang, M.H. Snail-induced claudin-11 prompts collective migration for tumour progression. *Nat. Cell Boil.* **2019**, *21*, 251–262. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Ponik, S.M.; Trier, S.M.; Wozniak, M.A.; Eliceiri, K.W.; Keely, P.J. RhoA is down-regulated at cell-cell contacts via p190RhoGAP-B in response to tensional homeostasis. *Mol. Boil. Cell* **2013**, *24*, 1688–1699. [[CrossRef](#)]
43. Fais, S.; Overholtzer, M. Cell-in-cell phenomena in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2018**, *18*, 758–766. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Overholtzer, M.; Mailleux, A.A.; Mouneimne, G.; Normand, G.; Schnitt, S.J.; King, R.W.; Cibas, E.S.; Brugge, J.S. A nonapoptotic cell death process, entosis, that occurs by cell-in-cell invasion. *Cell* **2007**, *131*, 966–979. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Sun, Q.; Cibas, E.S.; Huang, H.; Hodgson, L.; Overholtzer, M. Induction of entosis by epithelial cadherin expression. *Cell Res.* **2014**, *24*, 1288–1298. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Su, L.; Agati, J.M.; Parsons, S.J. p190RhoGAP is cell cycle regulated and affects cytokinesis. *J. Cell Boil.* **2003**, *163*, 571–582. [[CrossRef](#)]
47. Manukyan, A.; Ludwig, K.; Sanchez-Manchinelly, S.; Parsons, S.J.; Stukenberg, P.T. A complex of p190RhoGAP-A and anillin modulates RhoA-GTP and the cytokinetic furrow in human cells. *J. Cell Sci.* **2015**, *128*, 50–60. [[CrossRef](#)]
48. Mikawa, M.; Su, L.; Parsons, S.J. Opposing roles of p190RhoGAP and Ect2 RhoGEF in regulating cytokinesis. *Cell Cycle* **2008**, *7*, 2003–2012. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Manukyan, A.; Sargsyan, L.; Parsons, S.J.; Stukenberg, P.T. P190RhoGAP prevents mitotic spindle fragmentation and is required to activate Aurora A kinase at acentriolar poles. *Chromosoma* **2018**, *127*, 375–386. [[CrossRef](#)]
50. Dupont, H.; Blancq, M. Formation of complexes involving RasGAP and p190 RhoGAP during morphogenetic events of the gastrulation in xenopus. *Eur. J. Biochem.* **1999**, *265*, 530–538. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Brouns, M.R.; Matheson, S.F.; Hu, K.Q.; Delalle, I.; Caviness, V.S.; Silver, J.; Bronson, R.T.; Settleman, J. The adhesion signaling molecule p190 RhoGAP is required for morphogenetic processes in neural development. *Development* **2000**, *127*, 4891–4903. [[PubMed](#)]
52. Brouns, M.R.; Matheson, S.F.; Settleman, J. p190 RhoGAP is the principal Src substrate in brain and regulates axon outgrowth, guidance and fasciculation. *Nat. Cell Boil.* **2001**, *3*, 361–367. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Billuart, P.; Winter, C.G.; Maresh, A.; Zhao, X.; Luo, L. Regulating axon branch stability: The role of p190 RhoGAP in repressing a retraction signaling pathway. *Cell* **2001**, *107*, 195–207. [[CrossRef](#)]
54. Kim, H.J.; Choi, H.S.; Park, J.H.; Kim, M.J.; Lee, H.G.; Petersen, R.B.; Kim, Y.S.; Park, J.B.; Choi, E.K. Regulation of RhoA activity by the cellular prion protein. *Cell Death Dis.* **2017**, *8*, e2668. [[CrossRef](#)]
55. Wheeler, A.P.; Ridley, A.J. Why three Rho proteins? RhoA, RhoB, RhoC, and cell motility. *Exp. Cell Res.* **2004**, *301*, 43–49. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Fingleton, B. Molecular targets in metastasis: Lessons from genomic approaches. *Cancer Genom. Proteom.* **2007**, *4*, 211–221.
57. Vega, F.M.; Fruhwirth, G.; Ng, T.; Ridley, A.J. RhoA and RhoC have distinct roles in migration and invasion by acting through different targets. *J. Cell Boil.* **2011**, *193*, 655–665. [[CrossRef](#)]
58. Bravo-Cordero, J.J.; Oser, M.; Chen, X.; Eddy, R.; Hodgson, L.; Condeelis, J. A novel spatiotemporal RhoC activation pathway locally regulates cofilin activity at invadopodia. *Curr. Biol.* **2011**, *21*, 635–644. [[CrossRef](#)]
59. Bravo-Cordero, J.J.; Sharma, V.P.; Roh-Johnson, M.; Chen, X.; Eddy, R.; Condeelis, J.; Hodgson, L. Spatial regulation of RhoC activity defines protrusion formation in migrating cells. *J. Cell Sci.* **2013**, *126*, 3356–3369. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Bravo-Cordero, J.J.; Hodgson, L.; Condeelis, J.S. Spatial regulation of tumor cell protrusions by RhoC. *Cell Adhes. Migr.* **2014**, *8*, 263–267. [[CrossRef](#)]
61. Ligeti, E.; Settleman, J. Regulation of RhoGAP specificity by phospholipids and prenylation. *Methods Enzymol.* **2006**, *406*, 104–117. [[CrossRef](#)]

62. Levay, M.; Settleman, J.; Ligeti, E. Regulation of the substrate preference of p190RhoGAP by protein kinase C-mediated phosphorylation of a phospholipid binding site. *Biochemistry* **2009**, *48*, 8615–8623. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Roy, A.L. Biochemistry and biology of the inducible multifunctional transcription factor TFII-I. *Gene* **2001**, *274*, 1–13. [[CrossRef](#)]
64. Mammoto, A.; Connor, K.M.; Mammoto, T.; Yung, C.W.; Huh, D.; Aderman, C.M.; Mostoslavsky, G.; Smith, L.E.; Ingber, D.E. A mechanosensitive transcriptional mechanism that controls angiogenesis. *Nature* **2009**, *457*, 1103–1108. [[CrossRef](#)]
65. Sordella, R.; Classon, M.; Hu, K.Q.; Matheson, S.F.; Brouns, M.R.; Fine, B.; Zhang, L.; Takami, H.; Yamada, Y.; Settleman, J. Modulation of CREB activity by the Rho GTPase regulates cell and organism size during mouse embryonic development. *Dev. Cell* **2002**, *2*, 553–565. [[CrossRef](#)]
66. Matheson, S.F.; Hu, K.Q.; Brouns, M.R.; Sordella, R.; VanderHeide, J.D.; Settleman, J. Distinct but overlapping functions for the closely related p190 RhoGAPs in neural development. *Dev. Neurosci.* **2006**, *28*, 538–550. [[CrossRef](#)]
67. Sordella, R.; Jiang, W.; Chen, G.C.; Curto, M.; Settleman, J. Modulation of Rho GTPase signaling regulates a switch between adipogenesis and myogenesis. *Cell* **2003**, *113*, 147–158. [[CrossRef](#)]
68. Chakravarty, G.; Hadsell, D.; Buitrago, W.; Settleman, J.; Rosen, J.M. p190-B RhoGAP regulates mammary ductal morphogenesis. *Mol. Endocrinol.* **2003**, *17*, 1054–1065. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
69. Vargo-Gogola, T.; Heckman, B.M.; Gunther, E.J.; Chodosh, L.A.; Rosen, J.M. P190-B Rho GTPase-activating protein overexpression disrupts ductal morphogenesis and induces hyperplastic lesions in the developing mammary gland. *Mol. Endocrinol.* **2006**, *20*, 1391–1405. [[CrossRef](#)]
70. Heckman-Stoddard, B.M.; Vargo-Gogola, T.; Herrick, M.P.; Visbal, A.P.; Lewis, M.T.; Settleman, J.; Rosen, J.M. P190A RhoGAP is required for mammary gland development. *Dev. Biol.* **2011**, *360*, 1–10. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
71. Mishra, A.; Ferrari, R.; Heutink, P.; Hardy, J.; Pijnenburg, Y.; Posthuma, D.; International, F.T.D.G.C. Gene-based association studies report genetic links for clinical subtypes of frontotemporal dementia. *Brain* **2017**, *140*, 1437–1446. [[CrossRef](#)]
72. Gourley, S.L.; Swanson, A.M.; Koleske, A.J. Corticosteroid-induced neural remodeling predicts behavioral vulnerability and resilience. *J. Neurosci.* **2013**, *33*, 3107–3112. [[CrossRef](#)]
73. Gourley, S.L.; Olevska, A.; Warren, M.S.; Taylor, J.R.; Koleske, A.J. Arg kinase regulates prefrontal dendritic spine refinement and cocaine-induced plasticity. *J. Neurosci.* **2012**, *32*, 2314–2323. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Li, J.; Yoshikawa, A.; Meltzer, H.Y. Replication of rs300774, a genetic biomarker near ACP1, associated with suicide attempts in patients with schizophrenia: Relation to brain cholesterol biosynthesis. *J. Psychiatr. Res.* **2017**, *94*, 54–61. [[CrossRef](#)]
75. Selva, J.; Egea, G. Ethanol increases p190RhoGAP activity, leading to actin cytoskeleton rearrangements. *J. Neurochem.* **2011**, *119*, 1306–1316. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Fincham, V.J.; Chudleigh, A.; Frame, M.C. Regulation of p190 Rho-GAP by v-Src is linked to cytoskeletal disruption during transformation. *J. Cell Sci.* **1999**, *112 Pt 6*, 947–956.
77. Settleman, J.; Albright, C.F.; Foster, L.C.; Weinberg, R.A. Association between GTPase activators for Rho and Ras families. *Nature* **1992**, *359*, 153–154. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
78. Settleman, J.; Narasimhan, V.; Foster, L.C.; Weinberg, R.A. Molecular cloning of cDNAs encoding the GAP-associated protein p190: Implications for a signaling pathway from ras to the nucleus. *Cell* **1992**, *69*, 539–549. [[CrossRef](#)]
79. Bouton, A.H.; Kanner, S.B.; Vines, R.R.; Wang, H.C.; Gibbs, J.B.; Parsons, J.T. Transformation by pp60src or stimulation of cells with epidermal growth factor induces the stable association of tyrosine-phosphorylated cellular proteins with GTPase-activating protein. *Mol. Cell. Biol.* **1991**, *11*, 945–953. [[CrossRef](#)]
80. Ellis, C.; Moran, M.; McCormick, F.; Pawson, T. Phosphorylation of GAP and GAP-associated proteins by transforming and mitogenic tyrosine kinases. *Nature* **1990**, *343*, 377–381. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
81. Wang, D.Z.; Nur, E.K.M.S.; Tikoo, A.; Montague, W.; Maruta, H. The GTPase and Rho GAP domains of p190, a tumor suppressor protein that binds the M(r) 120,000 Ras GAP, independently function as anti-Ras tumor suppressors. *Cancer Res.* **1997**, *57*, 2478–2484. [[PubMed](#)]
82. Lawrence, M.S.; Stojanov, P.; Mermel, C.H.; Robinson, J.T.; Garraway, L.A.; Golub, T.R.; Meyerson, M.; Gabriel, S.B.; Lander, E.S.; Getz, G. Discovery and saturation analysis of cancer genes across 21 tumour types. *Nature* **2014**, *505*, 495–501. [[CrossRef](#)]

83. Kandoth, C.; McLellan, M.D.; Vandin, F.; Ye, K.; Niu, B.; Lu, C.; Xie, M.; Zhang, Q.; McMichael, J.F.; Wyczalkowski, M.A.; et al. Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. *Nature* **2013**, *502*, 333–339. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Campbell, J.D.; Alexandrov, A.; Kim, J.; Wala, J.; Berger, A.H.; Pedamallu, C.S.; Shukla, S.A.; Guo, G.; Brooks, A.N.; Murray, B.A.; et al. Distinct patterns of somatic genome alterations in lung adenocarcinomas and squamous cell carcinomas. *Nat. Genet.* **2016**, *48*, 607–616. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Gopal, R.K.; Kubler, K.; Calvo, S.E.; Polak, P.; Livitz, D.; Rosebrock, D.; Sadow, P.M.; Campbell, B.; Donovan, S.E.; Amin, S.; et al. Widespread Chromosomal Losses and Mitochondrial DNA Alterations as Genetic Drivers in Hurthle Cell Carcinoma. *Cancer Cell* **2018**, *34*, 242–255. [[CrossRef](#)]
86. Giannikou, K.; Malinowska, I.A.; Pugh, T.J.; Yan, R.; Tseng, Y.Y.; Oh, C.; Kim, J.; Tyburczy, M.E.; Chekaluk, Y.; Liu, Y.; et al. Whole Exome Sequencing Identifies TSC1/TSC2 Biallelic Loss as the Primary and Sufficient Driver Event for Renal Angiomyolipoma Development. *PLoS Genet.* **2016**, *12*, e1006242. [[CrossRef](#)]
87. Horpaopan, S.; Spier, I.; Zink, A.M.; Altmüller, J.; Holzapfel, S.; Laner, A.; Vogt, S.; Uhlhaas, S.; Heilmann, S.; Stienen, D.; et al. Genome-wide CNV analysis in 221 unrelated patients and targeted high-throughput sequencing reveal novel causative candidate genes for colorectal adenomatous polyposis. *Int. J. Cancer* **2015**, *136*, E578–E589. [[CrossRef](#)]
88. Kurokawa, Y.; Matoba, R.; Takemasa, I.; Nakamori, S.; Tsujie, M.; Nagano, H.; Dono, K.; Umeshita, K.; Sakon, M.; Ueno, N.; et al. Molecular features of non-B, non-C hepatocellular carcinoma: A PCR-array gene expression profiling study. *J. Hepatol.* **2003**, *39*, 1004–1012. [[CrossRef](#)]
89. Earp, M.; Tyrer, J.P.; Winham, S.J.; Lin, H.Y.; Chornokur, G.; Dennis, J.; Aben, K.K.H.; Anton-Culver, H.; Antonenkova, N.; Bandera, E.V.; et al. Variants in genes encoding small GTPases and association with epithelial ovarian cancer susceptibility. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0197561. [[CrossRef](#)]
90. Tikoo, A.; Czekay, S.; Viars, C.; White, S.; Heath, J.K.; Arden, K.; Maruta, H. p190-A, a human tumor suppressor gene, maps to the chromosomal region 19q13.3 that is reportedly deleted in some gliomas. *Gene* **2000**, *257*, 23–31. [[CrossRef](#)]
91. Zack, T.I.; Schumacher, S.E.; Carter, S.L.; Cherniack, A.D.; Saksena, G.; Tabak, B.; Lawrence, M.S.; Zhsng, C.Z.; Wala, J.; Mermel, C.H.; et al. Pan-cancer patterns of somatic copy number alteration. *Nat. Genet.* **2013**, *45*, 1134–1140. [[CrossRef](#)]
92. Wolf, R.M.; Draghi, N.; Liang, X.; Dai, C.; Uhrbom, L.; Eklof, C.; Westermark, B.; Holland, E.C.; Resh, M.D. p190RhoGAP can act to inhibit PDGF-induced gliomas in mice: A putative tumor suppressor encoded on human chromosome 19q13.3. *Genes Dev.* **2003**, *17*, 476–487. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
93. Wolf, R.M.; Wilkes, J.J.; Chao, M.V.; Resh, M.D. Tyrosine phosphorylation of p190 RhoGAP by Fyn regulates oligodendrocyte differentiation. *J. Neurobiol.* **2001**, *49*, 62–78. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
94. Kusama, T.; Mukai, M.; Endo, H.; Ishikawa, O.; Tatsuta, M.; Nakamura, H.; Inoue, M. Inactivation of Rho GTPases by p190 RhoGAP reduces human pancreatic cancer cell invasion and metastasis. *Cancer Sci.* **2006**, *97*, 848–853. [[CrossRef](#)]
95. Shimizu, A.; Mammoto, A.; Italiano, J.E., Jr.; Pravda, E.; Dudley, A.C.; Ingber, D.E.; Klagsbrun, M. ABL2/ARG tyrosine kinase mediates SEMA3F-induced RhoA inactivation and cytoskeleton collapse in human glioma cells. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 27230–27238. [[CrossRef](#)]
96. Qiang, X.F.; Zhang, Z.W.; Liu, Q.; Sun, N.; Pan, L.L.; Shen, J.; Li, T.; Yun, C.; Li, H.; Shi, L.H. miR-20a promotes prostate cancer invasion and migration through targeting ABL2. *J. Cell. Biochem.* **2014**, *115*, 1269–1276. [[CrossRef](#)]
97. Bartolome, R.A.; Diaz-Martinez, M.; Colo, G.P.; Arellano-Sanchez, N.; Torres-Ayuso, P.; Kleinovink, J.W.; Merida, I.; Teixido, J. A Blk-p190RhoGAP signaling module downstream of activated Gα13 functionally opposes CXCL12-stimulated RhoA activation and cell invasion. *Cell. Signal.* **2014**, *26*, 2551–2561. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
98. Bartolome, R.A.; Wright, N.; Molina-Ortiz, I.; Sanchez-Luque, F.J.; Teixido, J. Activated Gα13 impairs cell invasiveness through p190RhoGAP-mediated inhibition of RhoA activity. *Cancer Res.* **2008**, *68*, 8221–8230. [[CrossRef](#)]
99. Molina-Ortiz, I.; Bartolome, R.A.; Hernandez-Varas, P.; Colo, G.P.; Teixido, J. Overexpression of E-cadherin on melanoma cells inhibits chemokine-promoted invasion involving p190RhoGAP/p120ctn-dependent inactivation of RhoA. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 15147–15157. [[CrossRef](#)]

100. Ludwig, K.; Parsons, S.J. The Tumor Suppressor, p190RhoGAP, Differentially Initiates Apoptosis and Confers Docetaxel Sensitivity to Breast Cancer Cells. *Genes Cancer* **2011**, *2*, 20–30. [[CrossRef](#)]
101. Frank, S.R.; Kollmann, C.P.; Luong, P.; Galli, G.G.; Zou, L.; Bernards, A.; Getz, G.; Calogero, R.A.; Frodin, M.; Hansen, S.H. p190 RhoGAP promotes contact inhibition in epithelial cells by repressing YAP activity. *J. Cell Boil.* **2018**, *217*, 3183–3201. [[CrossRef](#)]
102. Zhao, J.; Xu, H.; He, M.; Wu, Y. Glucocorticoid receptor DNA binding factor 1 expression and osteosarcoma prognosis. *Tumour Biol.* **2014**, *35*, 12449–12458. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
103. Zhao, J.; Xu, H.; He, M.; Wang, Z.; Wu, Y. Rho GTPase-activating protein 35 rs1052667 polymorphism and osteosarcoma risk and prognosis. *Biomed Res. Int.* **2014**, *2014*, 396947. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
104. Li, L.; Li, Y.M.; Zhou, P.; Wang, X.S.; Wang, G.Y.; Zhao, X.H.; Cui, B.B.; Ren, Y.L.; Dong, X.S.; Chen, Z.Q. Abnormal expression of p190RhoGAP in colorectal cancer patients with poor survival. *Am. J. Transl. Res.* **2016**, *8*, 4405–4414.
105. Organ, S.L.; Hai, J.; Radulovich, N.; Marshall, C.B.; Leung, L.; Sasazuki, T.; Shirasawa, S.; Zhu, C.Q.; Navab, R.; Ikura, M.; et al. p120RasGAP is a mediator of rho pathway activation and tumorigenicity in the DLD1 colorectal cancer cell line. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e86103. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
106. Notsuda, H.; Sakurada, A.; Endo, C.; Okada, Y.; Horii, A.; Shima, H.; Kondo, T. p190A RhoGAP is involved in EGFR pathways and promotes proliferation, invasion and migration in lung adenocarcinoma cells. *Int. J. Oncol.* **2013**, *43*, 1569–1577. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
107. Chiu, J.H.; Wen, C.S.; Wang, J.Y.; Hsu, C.Y.; Tsai, Y.F.; Hung, S.C.; Tseng, L.M.; Shyr, Y.M. Role of estrogen receptors and Src signaling in mechanisms of bone metastasis by estrogen receptor positive breast cancers. *J. Transl. Med.* **2017**, *15*, 97. [[CrossRef](#)]
108. Harvey, A.J.; Crompton, M.R. Use of RNA interference to validate Brk as a novel therapeutic target in breast cancer: Brk promotes breast carcinoma cell proliferation. *Oncogene* **2003**, *22*, 5006–5010. [[CrossRef](#)]
109. Chakravarty, G.; Roy, D.; Gonzales, M.; Gay, J.; Contreras, A.; Rosen, J.M. P190-B, a Rho-GTPase-activating protein, is differentially expressed in terminal end buds and breast cancer. *Cell Growth Differ.* **2000**, *11*, 343–354. [[PubMed](#)]
110. Wu, M.H.; Chen, Y.A.; Chen, H.H.; Chang, K.W.; Chang, I.S.; Wang, L.H.; Hsu, H.L. MCT-1 expression and PTEN deficiency synergistically promote neoplastic multinucleation through the Src/p190B signaling activation. *Oncogene* **2014**, *33*, 5109–5120. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
111. Fang, Y.; Zhu, X.; Wang, J.; Li, N.; Li, D.; Sakib, N.; Sha, Z.; Song, W. MiR-744 functions as a proto-oncogene in nasopharyngeal carcinoma progression and metastasis via transcriptional control of ARHGAP5. *Oncotarget* **2015**, *6*, 13164–13175. [[CrossRef](#)]
112. Wang, J.; Tian, X.; Han, R.; Zhang, X.; Wang, X.; Shen, H.; Xue, L.; Liu, Y.; Yan, X.; Shen, J.; et al. Downregulation of miR-486-5p contributes to tumor progression and metastasis by targeting protumorigenic ARHGAP5 in lung cancer. *Oncogene* **2014**, *33*, 1181–1189. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
113. Heckman-Stoddard, B.M.; Vargo-Gogola, T.; McHenry, P.R.; Jiang, V.; Herrick, M.P.; Hilsenbeck, S.G.; Settleman, J.; Rosen, J.M. Haploinsufficiency for p190B RhoGAP inhibits MMTV-Neu tumor progression. *Breast Cancer Res.* **2009**, *11*, R61. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
114. Chen, R.; Wang, S.J.; Zhang, Y.; Hou, R.; Jiang, J.L.; Cui, H.Y. CD147 promotes cell motility via upregulation of p190-B RhoGAP in hepatocellular carcinoma. *Cancer Cell Int.* **2016**, *16*, 69. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
115. Monaghan-Benson, E.; Wittchen, E.S.; Doerschuk, C.M.; Burridge, K. A Rnd3/p190RhoGAP pathway regulates RhoA activity in idiopathic pulmonary fibrosis fibroblasts. *Mol. Boil. Cell* **2018**, *29*, 2165–2175. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
116. Stewart, K.; Gaitan, Y.; Shafer, M.E.; Aoudjit, L.; Hu, D.; Sharma, R.; Tremblay, M.; Ishii, H.; Marcotte, M.; Stanga, D.; et al. A Point Mutation in p190A RhoGAP Affects Ciliogenesis and Leads to Glomerulocystic Kidney Defects. *PLoS Genet.* **2016**, *12*, e1005785. [[CrossRef](#)]
117. Porter, A.P.; Papaioannou, A.; Malliri, A. Deregulation of Rho GTPases in cancer. *Small GTPases* **2016**, *7*, 123–138. [[CrossRef](#)]



© 2019 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 (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 2. Modifications post-traductionnelles

La régulation des protéines p190RhoGAPs a été abordée dans la revue en détaillant les interactants et leurs impacts sur l'activité de p190RhoGAPs. De plus, de nombreuses modifications post-traductionnelles ont été mises en évidence, principalement des phosphorylations dans le domaine C-terminal. Ces modifications sont listées dans le **Tableau 2**, de même que les résidus impliqués, les protéines impliquées dans les modifications et l'impact fonctionnel notamment sur l'activité GAP.

La plupart de ces modifications entraînent une inhibition de l'activité GAP de la protéine mais certaines phosphorylations, notamment celles des résidus Y1087 et Y1105, sont activatrices de l'activité GAP. Ces phosphorylations sont par ailleurs liées à l'interaction p190A/p120RasGAP identifiée comme requise pour la localisation de p190A au lamellipode (Tomar et al. 2009).

Modification	Domaine ou résidu	Protéines impliquées	Impact fonctionnel
Phosphorylation	T116, T133, T259 & T305	Src	Inhibition de la liaison au GTP
	Y308	PDGF-R	Levée de la séquestration cytoplasmique de TFII-I
	Y1087 & Y1105	Src, Arg	Activation de l'activité GAP
	S1150	ROCK	Inhibition de l'activité GAP
	S1221 & T1226	PKC $\alpha$	Activation de l'activité GAP
	S1472, S1476, T1480 & S1483	GSK3 $\beta$	Inhibition de l'activité GAP
	Domaine C-terminal	ERK	Inhibition de l'activité GAP
	Inconnu	FAK	Inhibition de l'activité GAP
Déphosphorylation	Y1105	LMW-PTP	Inhibition de l'activité GAP
	Y1105	PTPRZ	Inhibition de l'activité GAP
Nitration	Y1105	eNOS	Inhibition de l'activité GAP
Ubiquitination	Inconnu	Cdh1 & APC/C	Inhibition de l'activité GAP

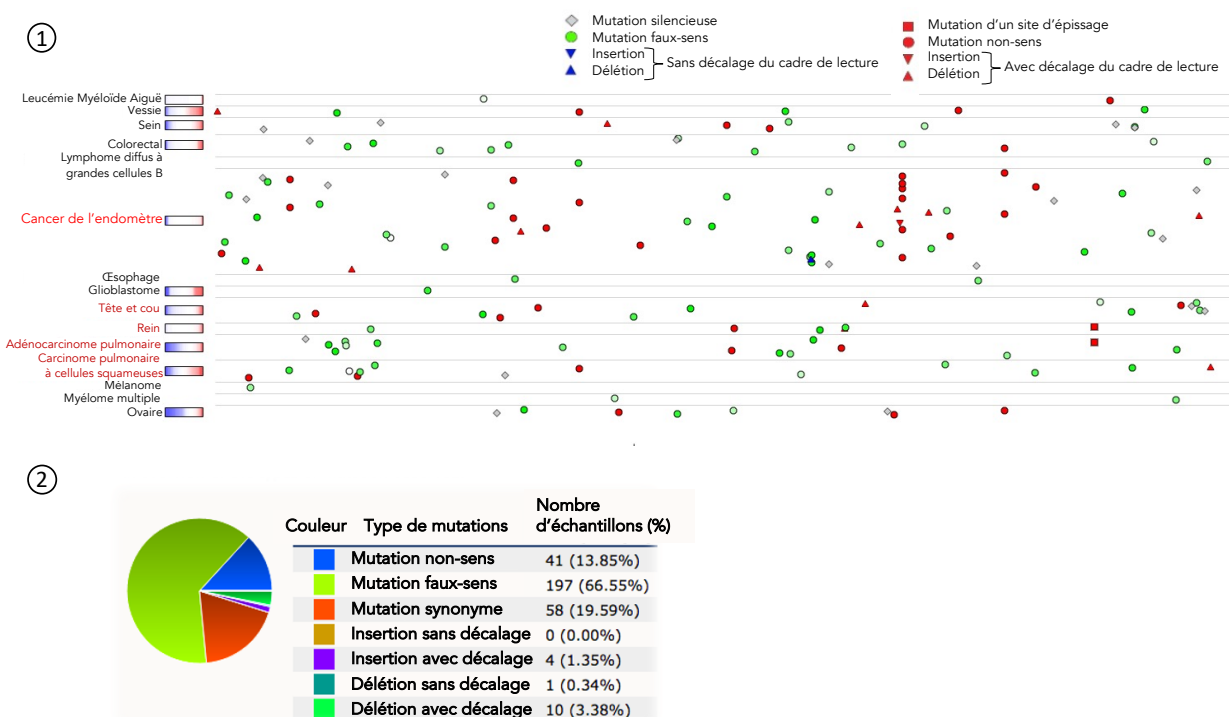
**Tableau 2 : Modifications post-traductionnelles régulant l'activité de p190RhoGAP.**

Les acides aminés indiqués dans le tableau correspondent à S : Sérine, T : Thréonine, Y : Tyrosine.

### 3. p190RhoGAP et cancer de l'endomètre

Comme décrit dans le paragraphe « p190RhoGAPs in Cancer » de la revue ci-dessus, des altérations des protéines p190RhoGAP sont fréquemment observées dans les tumeurs, mais l'intérêt de l'étude des protéines p190RhoGAP dans le cadre du cancer a considérablement augmenté au cours des dernières années grâce au séquençage à grande échelle de tumeurs. En effet, le gène *ARHGAP35* est significativement muté dans près de 2% des tumeurs analysées et plus précisément, dans 14% des cancers de l'endomètre (M. S. Lawrence et al. 2014).

Ces mutations sont distribuées tout au long de la séquence du gène *ARHGAP35* sans réel « hotspot » de mutations mis à part la récurrence de la mutation R997\* (**Figure 32**). Certaines mutations sont des mutations non-sens ou entraînant des décalages du cadre de lecture et donc une protéine non fonctionnelle. Ceci suggère un rôle suppresseur de tumeurs de p190A. Cependant la majorité est représentée par des mutations faux-sens, dont l'impact reste à explorer.

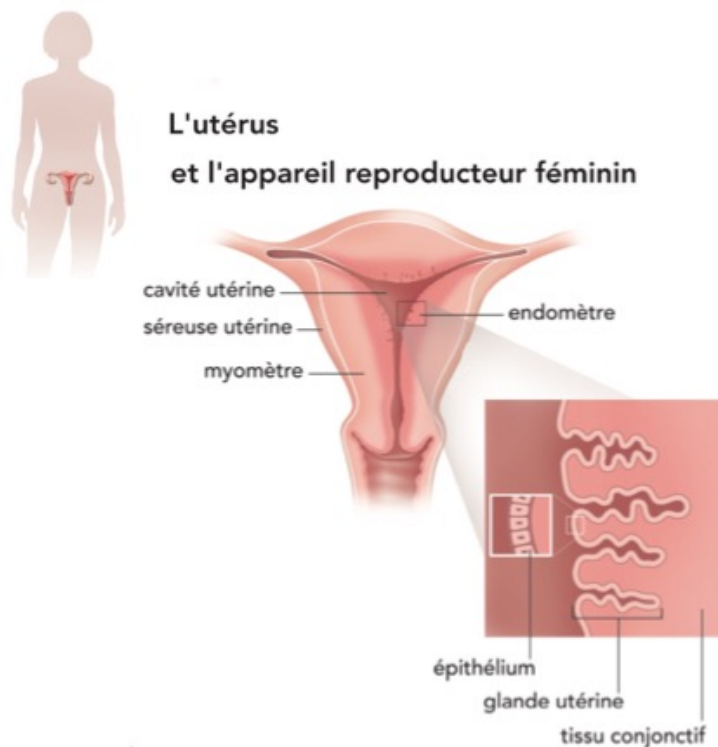


**Figure 32 : Les mutations du gène *ARHGAP35* suggèrent un rôle suppresseur de tumeurs de p190A.**  
 (1) Représentation des mutations tout au long de la séquence du gène *ARHGAP35* retrouvées dans les différents sous-types de tumeurs dont le cancer de l'endomètre (rouge vif).  
 (2) Graphique classant les mutations du gène *ARHGAP35* selon le type de modification engendré.  
 Adapté de TumorPortal et cBioPortal.

Avec plus d'une tumeur sur 7 présentant des mutations sur le gène *ARHGAP35*, il est important et intéressant d'étudier l'impact de ces mutations dans le développement et la progression des cancers de l'endomètre.

### 3.1. Cancer de l'endomètre

L'utérus est la partie centrale de l'appareil reproducteur de la femme. Il s'agit d'un organe creux avec une forme d'entonnoir. La partie haute et large constitue le corps de l'utérus et communique avec les trompes de Fallope et les ovaires. La partie basse et étroite est le col de l'utérus en communication avec le vagin (**Figure 33**). Il mesure environ 8 centimètres de hauteur, 3 centimètres d'épaisseur pour 5 centimètres dans sa plus grande largeur. Le corps de l'utérus renferme la cavité utérine, où se déroule la grossesse. Sa paroi est composée de 3 couches : (1) la couche séreuse externe est la séreuse utérine, (2) la couche musculaire est le myomètre et (3) la couche muqueuse interne est l'endomètre (**Figure 33**).



**Figure 33 : Anatomie de l'appareil reproducteur féminin.**

L'utérus est un organe creux dont le corps de l'utérus renferme la cavité utérine. La paroi épaisse de l'utérus est constituée de la séreuse utérine, du myomètre et de l'endomètre, de la couche la plus externe à la couche la plus interne. L'endomètre est composé d'un épithélium et de glandes utérines au sein du tissu conjonctif.

Adapté de e-cancer.fr.

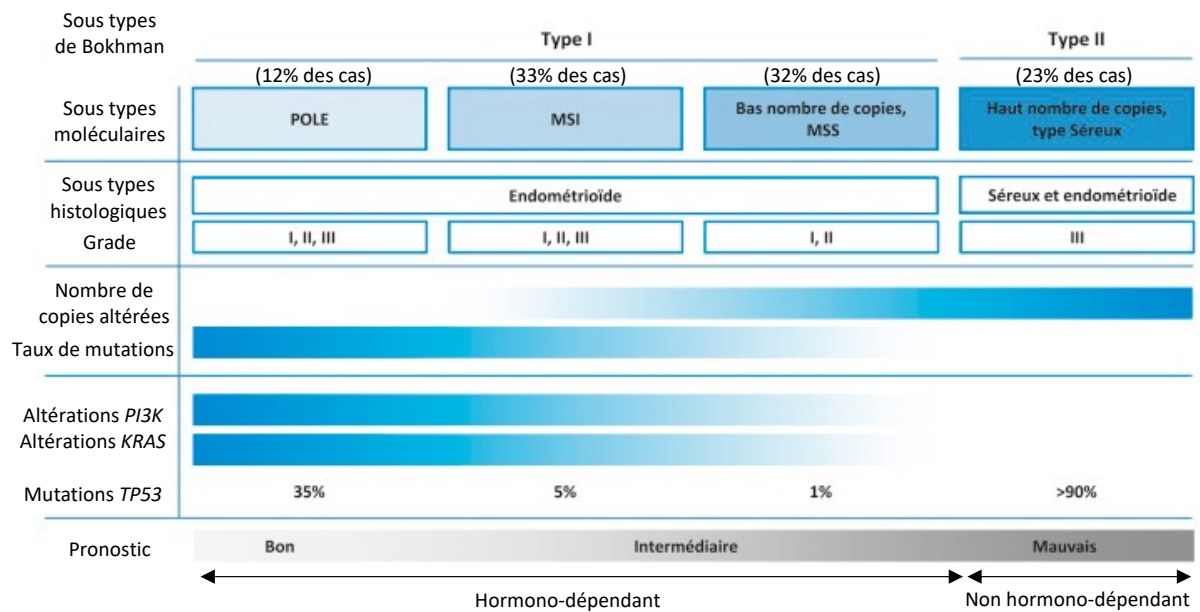
L'endomètre est constitué d'une couche de cellules formant l'épithélium et de tissu conjonctif contenant les glandes utérines. La forme et la fonction de l'endomètre sont modifiées régulièrement par l'influence des hormones sexuelles, œstrogène et progestérone, sécrétées par les ovaires. En effet, de la puberté à la ménopause, tous les mois, l'endomètre se prépare à une éventuelle grossesse en proliférant. En cas de fécondation, l'endomètre permet à l'embryon de s'implanter et de se développer dans l'utérus. Si l'ovule n'est pas fécondé, la partie superficielle de l'endomètre se décompose en provoquant un saignement, les menstruations.

Les cancers du corps de l'utérus se développent majoritairement à partir de l'endomètre, et plus particulièrement à partir de l'épithélium endométrial, c'est pourquoi le plus souvent les cancers du corps de l'utérus sont définis par le terme de carcinome de l'endomètre. Le carcinome de l'endomètre est le 2<sup>ème</sup> cancer gynécologique le plus fréquent, après le cancer du sein, et correspond donc au cancer du corps de l'utérus (Passarello, Kurian, and Villanueva 2019). Il est à différencier du cancer du col de l'utérus qui dans plus de 99% des cas résulte d'une infection persistante causée par le papillomavirus humain (HPV). La plupart du temps, le cancer de l'endomètre touche les femmes après la ménopause avec un âge moyen du diagnostic autour de 68 ans (Colombo et al. 2020 ; Zubor et al. 2020).

A la différence de nombreux cancers, l'incidence du cancer de l'endomètre a augmenté au cours des dernières années, notamment à cause du vieillissement de la population et de l'augmentation d'incidence du syndrome métabolique (surpoids/obésité) qui est l'un des facteurs de risque de ce cancer. Par ailleurs, l'exposition aux œstrogènes, le diabète, le traitement par le tamoxifène ou le syndrome de Lynch sont les facteurs de risque de développement d'un cancer de l'endomètre (Passarello, Kurian, and Villanueva 2019).

La classification des carcinomes de l'endomètre est multiple, selon des critères anatomiques, histologiques, épidémiologiques, endocrines ou encore moléculaires (**Tableau 3**).





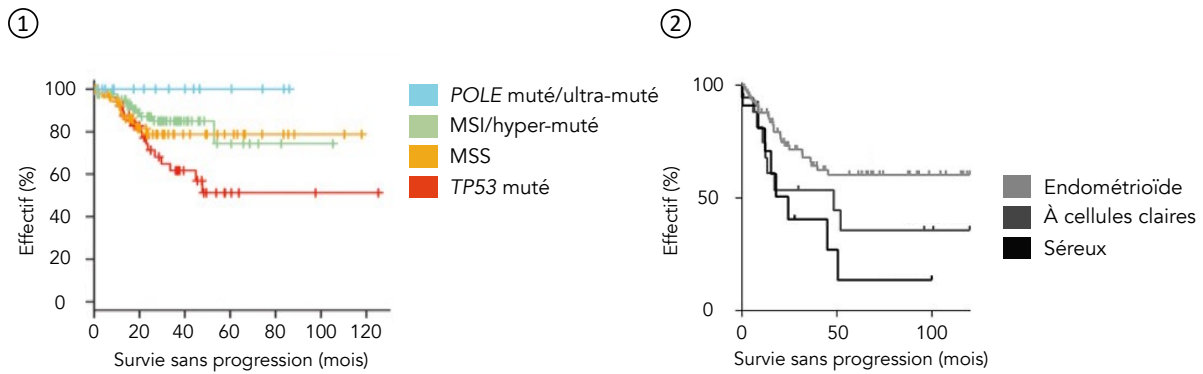
**Tableau 3 : Classification des carcinomes de l'endomètre.**

La classification de Bokhman divise les cancers de l'endomètre en tumeurs de type I, de meilleur pronostic alors que les tumeurs de classe II sont de mauvais pronostic. Sur ce tableau, sont regroupées les différentes classifications des carcinomes de l'endomètre (moléculaire, histologique) ainsi que les altérations génétiques et le pronostic des patientes.

Adapté de Genestie et al. Bulletin du Cancer. 2017 et León-Castillo et al. JMO. 2020.

La classification de Bokhman définit deux types I et II selon la dépendance aux œstrogènes (Genestie et al. 2017). Les carcinomes de l'endomètre de type I représentent près de 80% des cas, ce sont des cancers dits hormono-dépendants. Le pronostic des patientes est bon contrairement aux carcinomes de l'endomètre de type II, non hormono-dépendants, dont le pronostic est mauvais.

Le séquençage de tumeurs a permis de classer ces cancers en différents sous-types moléculaires décrits sur le **tableau 3** : (1) POLE : un fort taux de mutations associées aux mutations de *POLE*, gène codant pour l'ADN polymérase  $\epsilon$ , (2) MSI : instabilité des microsatellites, (3) MSS : absence de MSI sans anomalie particulière et avec un bas CNV (copy number variation) et (4) TP53 : des mutations du gène *TP53* associées à un haut CNV (León-Castillo, Gilvazquez, et al. 2020 ; León-Castillo, de Boer, et al. 2020). La classification moléculaire comprend ainsi 4 sous-types présentant un pronostic variable, les tumeurs mutées pour *POLE* ont un pronostic favorable tandis que les tumeurs mutées pour *TP53* sont associées à un mauvais pronostic (**Figure 34**).



**Figure 34 : Courbes de Kaplan-Meier de survie des patientes atteintes de carcinomes de l'endomètre.** La survie des patientes atteintes de carcinomes de l'endomètre est variable selon le sous-type de tumeur. La mutation du gène *POLE* est de meilleur pronostic que la mutation de *TP53* au niveau des sous-types moléculaires. Dans la classification histologique, les carcinomes endométrioides ont un pronostic favorable tandis que les sous-types à cellules claires ou séreux sont de mauvais pronostic. Adapté de Genestie et al. Bulletin du Cancer. 2017 et Stelloo et al. Modern Pathology. 2015.

Une classification histologique divise les carcinomes de l'endomètre en deux sous-types majoritaires, endométrioides et séreux et un sous-type minoritaire, à cellules claires (Genestie et al. 2017). Indépendamment des classifications, les cancers de stade I sont limités au corps de l'utérus tandis que pour les stades II, III et IV, les tumeurs s'étendent à l'ensemble de l'utérus et peuvent conduire à l'apparition de métastases à distance. La survie des patientes atteintes de carcinome de l'endomètre est très variable selon les sous-types allant de 10% de survie sans progression à 5 ans pour les carcinomes séreux à plus de 70% pour les carcinomes endométrioides (**Figure 34**).

La chirurgie est le principal traitement des carcinomes et consiste en une hystérectomie totale associée à une résection des trompes et des ovaires. Selon le sous-type de tumeur, d'autres traitements comme la radiothérapie, la chimiothérapie mais aussi l'hormonothérapie peuvent être utilisés en complément de la chirurgie, notamment pour des stades avancés de la maladie.

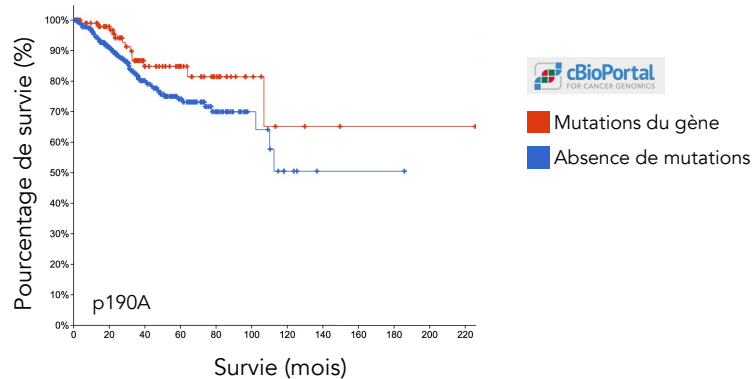
### 3.2. p190RhoGAP dans le cancer de l'endomètre

Comme indiqué ci-dessus, le gène *ARHGAP35* est significativement muté dans près de 14% des carcinomes de l'endomètre. Peu d'études se sont, pour l'instant, intéressées à

l'impact des mutations de p190A dans les tumeurs de l'endomètre (Binamé et al. 2016 ; Wen et al. 2020). Ici sont résumées les données actuellement disponibles.

### 3.2.1. Impact des mutations chez les patientes

Des données bio-informatiques permettent d'estimer la survie selon le statut mutationnel des gènes. L'analyse effectuée pour *ARHGAP35* montre que la présence de mutations semble avoir un effet protecteur car le pronostic des patientes avec mutations est meilleur que celui de celles ne présentant pas d'altération (**Figure 35**). Cependant, le fait d'obtenir près de 15% des tumeurs présentant des mutations suggère un avantage sélectif des cellules mutées.



**Figure 35 : Les mutations du gène *ARHGAP35* sont associées à un meilleur pronostic dans le cancer de l'endomètre.**

Courbes de survie Kaplan-Meier de patientes atteintes de cancer de l'endomètre avec ou sans mutations du gène *ARHGAP35*.

Adapté de cBioPortal.

### 3.2.2. Impact des mutations dans la transformation maligne

Deux études ont mis en avant l'impact du statut mutationnel de p190A dans le cancer de l'endomètre. Les néoplasies intra-épithéliales endométriales (EIN) sont considérées comme les lésions précancéreuses de cancers de l'endomètre endométrioïde (EEC). Dans la première étude, 79 échantillons d'EEC et 36 échantillons d'EIN ont été analysés par séquençage. Il a été montré que le gène *ARHGAP35* fait partie d'un ensemble de gènes muté dans l'EEC et non muté dans l'EIN suggérant un rôle des mutations de p190A dans la transformation maligne des cellules de cancer de l'endomètre (Y. Wang et al. 2019).

Cela a été confirmé par une seconde étude où il est indiqué que des mutations inactivatrices de p190A dans les cellules de cancer de l'endomètre engendrerait la transformation maligne *via* la voie de signalisation Hippo-YAP (Wen et al. 2020). Un lien entre p190RhoGAP et la voie Hippo-YAP a déjà été mis en évidence dans des cellules épithéliales où l'extinction de p190A et de p190B entraîne une accumulation nucléaire de YAP et perturbe l'inhibition de contact des cellules épithéliales (Frank et al. 2018).

Dans la voie de signalisation Hippo-YAP, les kinases MST et LATS phosphorylent YAP et TAZ ce qui les retient dans le cytoplasme. L'inactivation de ces kinases entraîne la déphosphorylation de YAP et TAZ qui se transigent alors dans le noyau où elles vont activer la transcription de gènes cibles régulant ainsi divers processus biologiques tels que la prolifération cellulaire ou l'apoptose. Il a été montré que la voie Hippo-YAP a notamment un rôle dans le phénomène d'EMT associée au développement de capacités pro-migratoires et pro-invasives des cellules (F.-X. Yu, Zhao, and Guan 2015 ; Stanger 2012).

L'extinction de p190A, par Knock-Out (KO p190A) dans des cellules de cancer de l'endomètre entraîne une augmentation de la présence des marqueurs de l'EMT associée à une suractivation de la voie Hippo-YAP, notamment par l'accumulation nucléaire de YAP. L'expression de p190A sauvage dans les cellules KO p190A réverse l'induction de l'EMT ainsi que la suractivation de la voie Hippo-YAP. En effet, les protéines YAP et ATZ sont fortement phosphorylées et l'accumulation nucléaire de YAP est diminuée (Wen et al. 2020).

L'introduction de mutations R44C ou F1247C, retrouvées dans le cancer de l'endomètre, inactivatrices de p190A ne restaure pas le phénotype sauvage, YAP est toujours accumulé dans le noyau et l'expression des marqueurs de l'EMT est augmentée. Il est donc proposé que les mutations de p190A retrouvées dans des tumeurs de l'endomètre pourraient altérer son activité RhoGAP et ainsi, favoriser la transformation maligne de cellules de cancer de l'endomètre (Wen et al. 2020).

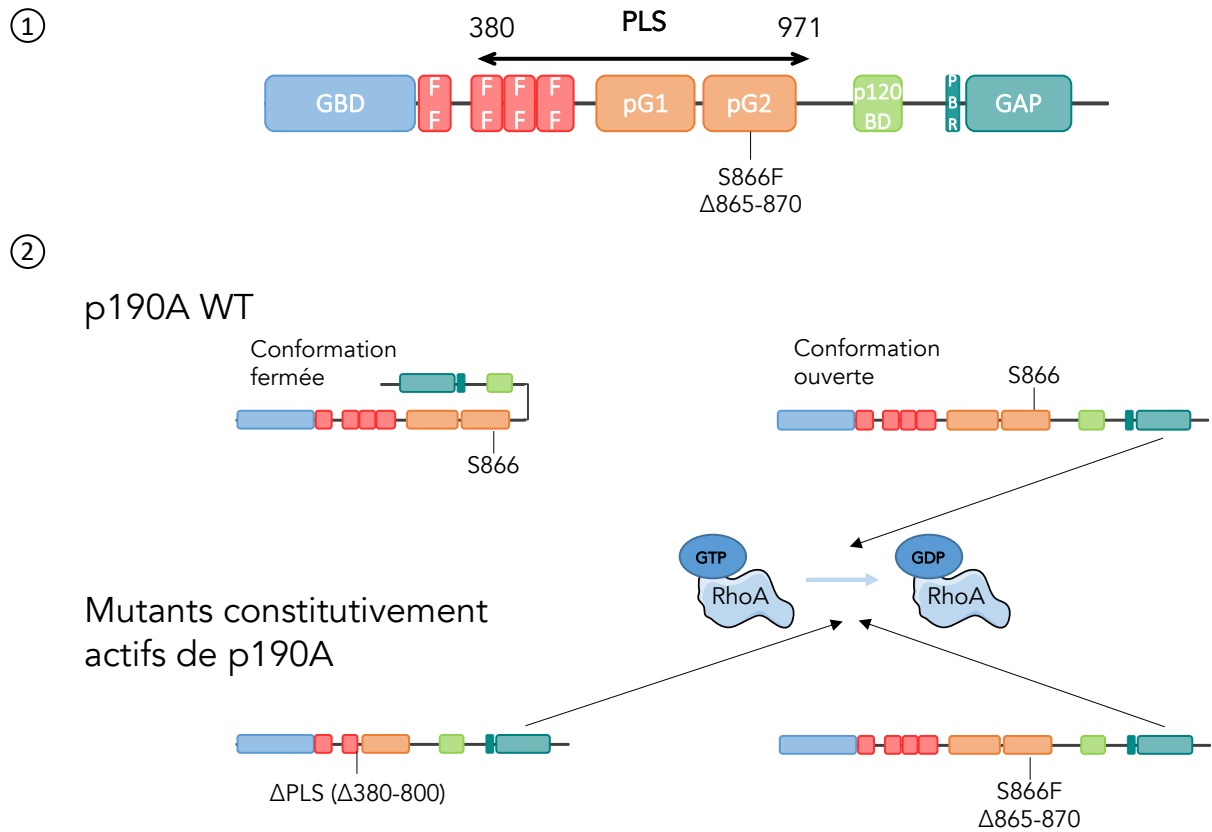
### 3.2.3. Impact des mutations dans la migration cellulaire

Une étude du laboratoire a mis en évidence que des mutations de p190A retrouvées dans les tumeurs altèrent la migration cellulaire (Binamé et al. 2016).

Grâce à une étude structure-fonction de p190A, un domaine, appelé PLS pour « protrusion localization sequence », comprenant les deux derniers motifs FF et le début du domaine central (**Figure 36**), a été identifié comme la séquence minimale de la protéine nécessaire et suffisante pour une localisation correcte de la protéine au niveau des lamellipodes. De plus, l'analyse fonctionnelle de la protéine dépourvue de ce domaine (p190A $\Delta$ PLS) a montré que p190A ainsi modifiée avait une activité GAP envers RhoA plus importante que la protéine sauvage suggérant un rôle inhibiteur de la séquence PLS sur la fonction de la protéine.

Ces travaux ont mis en évidence que certaines mutations retrouvées dans les tumeurs, les mutations S866F et  $\Delta$ 865-870, miment la perte du domaine PLS. L'expression de ces deux mutants engendre une augmentation de l'affinité de la protéine mutée pour RhoA actif traduisant une augmentation de l'activité GAP de la protéine mutée. L'expression de ces deux mutations présentent une altération de leur localisation subcellulaire associée à une altération de la directionnalité de la migration de cellules cancéreuses (Binamé et al. 2016).

Sur la base de ces résultats, l'hypothèse d'un modèle associant une conformation ouverte et une conformation fermée de la protéine *via* une interaction intramoléculaire impliquant le PLS et la sérine 866 a été proposée (**Figure 36**) (Bidaud-Meynard et al. 2017).



**Figure 36 : Modèle d'auto-inhibition de p190A.**

(1) Représentation schématique de p190A, du domaine PLS et des mutations constitutivement actives de p190A.

(2) Dans ce modèle d'auto-inhibition de p190A, la protéine p190A sauvage oscille entre une conformation inactive/fermée et une conformation active/ouverte afin d'assurer l'activité transitoire de RhoA au front de migration. La délétion du PLS ou l'introduction des mutations S866F et  $\Delta$ 865-870 sont dans une conformation constitutivement active permettant l'inactivation durable de RhoA.

Adapté de Bidaud-Meynard et al. 2017.



# Objectifs de la thèse





L'activation spatio-temporelle des GTPases Rho doit être finement contrôlée et coordonnée afin de réguler le remodelage du cytosquelette d'actine impliqué dans de nombreuses fonctions cellulaires. Mon travail de thèse porte sur l'un de ces régulateurs, p190RhoGAP. Les études précédentes du laboratoire et les nouvelles données de la littérature concernant p190RhoGAP démontrent l'importance de la compréhension des mécanismes de régulation de p190RhoGAP.

Il a été démontré que le domaine PLS (Protrusion Localization Sequence) de p190A est nécessaire et suffisant à sa localisation au niveau des lamellipodes et qu'il régule l'activité GAP de p190A vis-à-vis de RhoA. L'hypothèse d'un changement de conformation impliquant une interaction intramoléculaire de p190A a été émise. En effet, la délétion du domaine PLS entraîne une augmentation de la capacité de p190A à fixer RhoA et à le réguler négativement. De plus, des mutations retrouvées dans des tumeurs miment la perte du PLS non seulement au niveau de la localisation de la protéine mais aussi dans la régulation de l'activité GAP. Ces résultats ont permis de suggérer un repliement auto-inhibiteur impliquant le domaine PLS ce qui masquerait le domaine GAP, l'empêchant ainsi d'inhiber RhoA. La première partie de mon travail de thèse vise à mieux comprendre les mécanismes de régulation conformationnels et fonctionnels de p190A et également de son isoforme p190B.

Le gène *ARHGAP35* est significativement muté dans le cancer de l'endomètre et bien que de nombreuses études aient montré la dérégulation d'expression de p190A ou de p190B dans différents types de cancers, aucune d'entre elles n'a fait l'objet d'une analyse comparée de p190A et de p190B. La deuxième partie de mon travail de thèse concerne ainsi l'étude conjointe de p190A et de p190B dans des lignées issues de cancer de l'endomètre ainsi que dans des échantillons de patientes.



# Résultats



# Partie 1

-

## Mécanismes de régulation de p190RhoGAP



# 1. Recherche des protéines interagissant avec le domaine PLS

Comme décrit dans l'introduction, de nombreuses protéines interagissent avec p190A et régulent ainsi la fonction et la localisation de la protéine. Deux domaines au sein de p190A, les domaines PLS et GAP, sont essentiels à la fonction GAP de la protéine mais aussi à sa localisation au niveau de structures d'actine impliquées dans la progression tumorale. Deux mutations S866F et  $\Delta$ 865-870, localisées dans le domaine PLS, augmentent l'activité GAP et perturbent la localisation au lamellipode. Nous nous sommes demandés si une ou plusieurs protéine(s) partenaire(s) étai(en)t impliquée(s) dans la régulation de la protéine. Pour répondre à cette question, une approche de criblage double hybride a été réalisée afin d'identifier des partenaires du domaine PLS de p190A.

Le criblage double hybride a été réalisé chez la levure, avec le domaine PLS de p190A en appât. En utilisant une banque d'ADNc humain, le criblage, réalisé par la société Hybrigenics, a permis l'identification de seulement 55 protéines interagissant avec le domaine PLS de p190A (**Tableau 4**), démontrant la stringence de ce criblage.

Parmi les candidats identifiés, plus de la moitié sont des protéines de la famille ZNF (doigts de zinc). La structure des protéines ZNF est composée d'une variété de motifs organisés autour des résidus cystéine et histidine. Les protéines ZNF sont impliquées dans de nombreux processus biologiques, tels que la régulation de la transcription, la dégradation médiée par le protéasome ou encore la migration cellulaire. De manière intrigante, plusieurs protéines à doigts de zinc ont déjà été identifiées comme interagissant avec p190A (Jiang et al. 2005 ; Mammoto et al. 2009 ; Todorovic et al. 2014 ; Cassandri et al. 2017). Par exemple, l'interaction de p190A avec la protéine GATA2 ou le facteur de transcription TFII-I confèrent à p190A un rôle dans le contrôle de l'expression des gènes (Jiang et al. 2005 ; Mammoto et al. 2009). De plus, l'interaction de p190A avec un domaine de liaison au zinc de la protéine E7 du papillomavirus humain dérégule la fonction RhoGAP de p190A et le cytosquelette d'actine ce qui pourrait favoriser la tumorigenèse dans la cellule infectée (Todorovic et al. 2014). Ainsi,



même si nous n'avons pas encore étudié plus en profondeur les protéines ZNF identifiées, les domaines à doigts de zinc semblent être des domaines pouvant interagir avec le PLS de p190A.

Nom du gène	Score d'interaction	Nombre de clones
Homo sapiens - ACTN4	D	1
Homo sapiens - AKT3	D	3
Homo sapiens - AMOTL2	N/A	3
Homo sapiens - ANKRD10	N/A	1
Homo sapiens - ARHGAP5	A	49
Homo sapiens - ATP-dependent RNAhelicase	D	1
Homo sapiens - C3orf21	N/A	3
Homo sapiens - DDX24	A	17
Homo sapiens - EOGT	D	1
Homo sapiens - GIOT-3	D	1
Homo sapiens - GRLF1	A	35
Homo sapiens - HP1BP3	N/A	37
Homo sapiens - KIAA1979	D	3
Homo sapiens - KIF2A	B	32
Homo sapiens - MAFG	D	1
Homo sapiens - MYST2	B	3
Homo sapiens - NCOR2	D	1
Homo sapiens - PSG9 var1	D	1
Homo sapiens - RBAK	D	1
Homo sapiens - RPS10	D	5
Homo sapiens - SF3A3	A	17
Homo sapiens - SHARP	N/A	1
Homo sapiens - STX5	A	6
Homo sapiens - TBRG1	D	1
Homo sapiens - UBB	N/A	1
Homo sapiens - VASH1	D	1
Homo sapiens - ZBTB17	A	32
Homo sapiens - ZBTB44	E	5
Homo sapiens - ZBTB47	D	2
Homo sapiens - ZKSCAN1	D	1
Homo sapiens - ZNF12	B	5
Homo sapiens - ZNF155	D	2
Homo sapiens - ZNF17	D	1
Homo sapiens - ZNF197	E	8
Homo sapiens - ZNF228	B	5
Homo sapiens - ZNF410	B	6
Homo sapiens - ZNF425	D	2
Homo sapiens - ZNF439	D	1
Homo sapiens - ZNF470	D	1
Homo sapiens - ZNF471	D	3
Homo sapiens - ZNF502	A	9
Homo sapiens - ZNF548	D	1
Homo sapiens - ZNF558	D	1
Homo sapiens - ZNF578	D	3
Homo sapiens - ZNF607	D	4
Homo sapiens - ZNF620	B	3
Homo sapiens - ZNF626	D	1
Homo sapiens - ZNF628	D	2
Homo sapiens - ZNF658	D	2
Homo sapiens - ZNF700	D	1
Homo sapiens - ZNF707	D	1
Homo sapiens - ZNF74	B	5
Homo sapiens - ZNF799	C	2
Homo sapiens - uncharacterized protein HARP11	D	1
Homo sapiens - unknown ZNF related	C	2

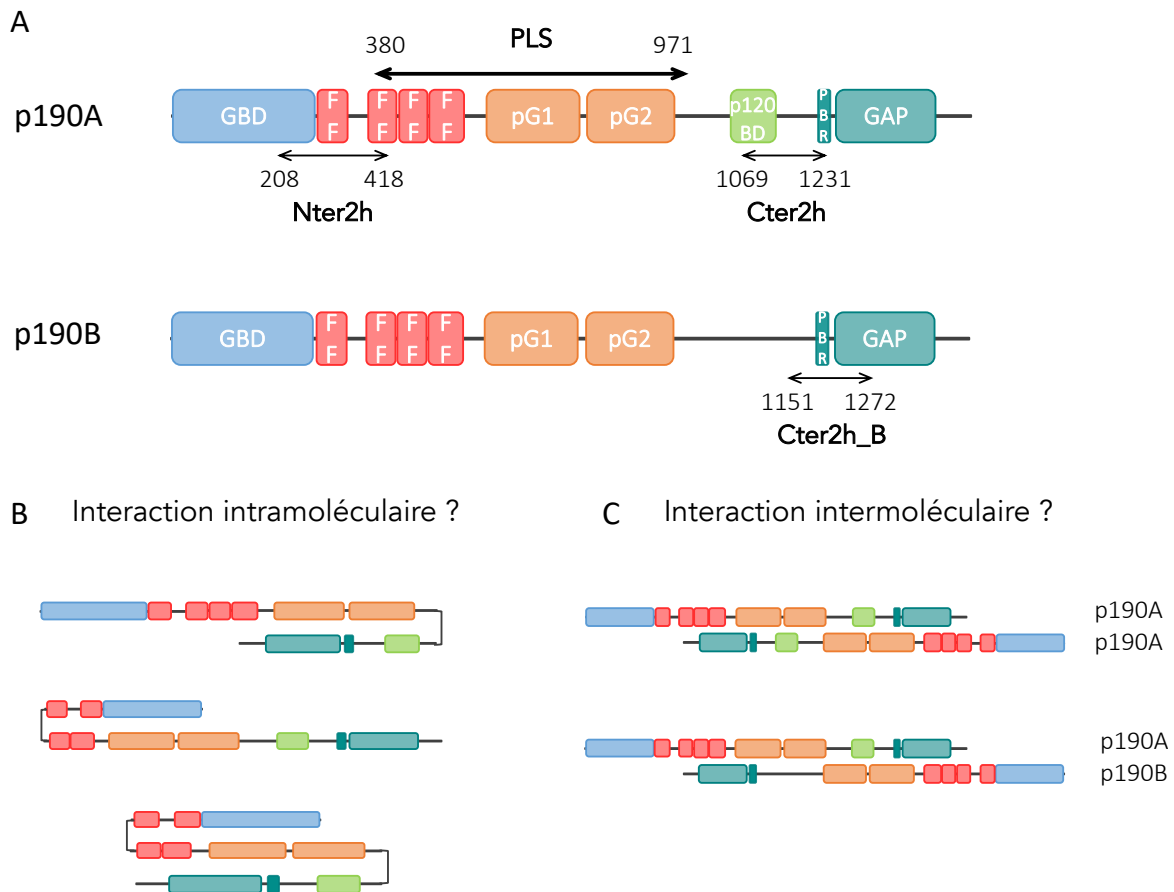
**Tableau 4 : Partenaires du domaine PLS identifiés lors d'un criblage double hybride.**

Résultats du criblage double hybride réalisé avec le PLS en appât avec le nom du gène identifié ainsi que le score d'interaction et le nombre de clones retrouvés.

Les scores de confiance d'interaction sont définis avec A (fort), B (haut), C (bon), D (modéré), E (faible) et N/A (non défini).

De façon intéressante, parmi les protéines identifiées comme interagissant avec le PLS, p190A et p190B, respectivement GRLF1 et ARHGAP5, ont été trouvées (**Figure 37A**). Pour p190A, les domaines capables d'interagir avec le PLS sont les domaines Nter2h (aa 208-418) dans la partie N-terminale de la protéine et Cter2h (aa 1069-1231) dans la partie C-terminale de la protéine. Un seul domaine a été identifié pour p190B, le domaine Cter2h\_B (aa 1151-1272).

Ces résultats suggèrent plusieurs hypothèses : une interaction intramoléculaire de p190A, une interaction intermoléculaire p190A/p190A et, une interaction intermoléculaire p190A/p190B (**Figure 37B&37C**). Chacune de ces hypothèses a été étudiée au cours de ma thèse et fait l'objet des sous-parties 2 et 3.



**Figure 37 : Hypothèses de départ concernant la régulation de la conformation de p190RhoGAPs.**

(A) Représentation de la protéine p190A et de ses domaines. Les domaines Nter2h et Cter2h sont les domaines identifiés lors d'un criblage double hybride (avec le PLS en appât).

(B) Représentation schématique de l'hypothèse d'une interaction intramoléculaire.

(C) Représentation schématique de l'hypothèse d'une interaction intermoléculaire p190A/p190A ou p190A/p190B.

## 2. Régulation intramoléculaire

### 2.1. Article « Identification of the PLS as an inhibitory domain responsible for masking of p190RhoGAP functional domain »

Dans un premier temps, je me suis intéressée à l'hypothèse d'une interaction intramoléculaire de p190A. En effet, l'hypothèse d'un repliement auto-inhibiteur impliquant le domaine PLS avait été émise dans les publications précédentes du laboratoire (Binamé et al. 2016 ; Bidaud-Meynard et al. 2017).

Le but de ce premier projet était de comprendre l'implication du PLS dans la régulation conformationnelle et fonctionnelle de p190A.

Les résultats de ce projet sont présentés sous la forme d'un article intitulé « Identification of the PLS as an inhibitory domain responsible for masking of p190RhoGAP functional domain ».

# Identification of the PLS as an inhibitory domain responsible for masking of p190RhoGAP functional domain

Capucine Héraud, Mathilde Pinault, Véronique Neaud, Frédéric Saltel, Valérie Lagrée and Violaine Moreau\*

Univ. Bordeaux, INSERM, BaRITOn, U1053, F-33000 Bordeaux, France

\*Corresponding author

Phone: +33 (0)5 57 57 12 72. Fax: +33 (0)5 56 51 40 77. E-mail: [violaine.moreau@inserm.fr](mailto:violaine.moreau@inserm.fr)

Running title: Auto-inhibition of p190RhoGAP

## ABSTRACT

p190RhoGAP (p190A) is the main negative regulator of RhoA in cells. To achieve its role, 190A has to be targeted in RhoA-dependent actin-based structures. We previously identified a functional region of p190A, called PLS (protrusion localization sequence) required for its localization to lamellipodia. Herein we demonstrated that this region is also required to target p190A to invadosome rosettes in NIH3T3-Src cells or to linear invadosomes in Huh6 cells seeded on type I collagen. Furthermore, we confirmed that the PLS is also required to regulate the GAP activity of the protein. When expressed in cells, a construct of p190A deleted of the PLS (p190A $\Delta$ PLS) favors F-actin depolymerisation in a stronger way than the WT protein, suggesting that the PLS is an auto-inhibitory domain of the GAP activity. To get insight in this mechanism, we search for PLS interacting proteins using the 2hybrid system. We found that PLS is able to interact with p190A itself. Co-immunoprecipitation experiments demonstrate that PLS interacts with the region close to the GAP domain. Moreover, we demonstrated that this interaction is abolished if PLS harbors cancer-associated mutations, S866F and  $\Delta$ 865-870 mutations. Thus, our results are in favor of defining PLS as an inhibitory domain responsible for masking the p190A functional GAP domain. This would suggest that p190A exist in two forms in the cell, an inactive closed conformation with a masked GAP domain and an open conformation allowing p190A GAP function. Altogether, our data unveil a new mechanism of regulation of p190A.

## INTRODUCTION

Small GTPases of the Rho family are molecular switchers of key signaling pathways involved in cytoskeletal remodeling. To achieve their key functions, a spatiotemporal regulation of RhoGTPases is mandatory. For instance, to achieve efficient cell migration, RhoGTPases, including RhoA, Rac1 and Cdc42 are sequentially activated/inactivated in order to generate cycles of membrane protrusion (i.e. lamellipodia and filopodia) and assembly of adhesion sites (i.e. stress fibers). Notably, super-resolution imaging and FRET-based experiments using biosensors highlighted the spatio-temporal regulation of Rho proteins at leading edges (Pertz et al., 2006; Machacek et al., 2009; Mehidi et al., 2019). To this end, a tight control of the GTPase hydrolase activity is crucial. One of the main regulators of the GDP/GTP cycle of Rho GTPases are GTPase-activating proteins (GAPs).

p190RhoGAP-A (also known as ARHGAP35 or GRLF1, and hereafter called p190A) is a GAP of the GTPases Rho. It plays important roles in actin regulatory pathways in numerous cell types and controls diverse cellular mechanisms such as cell division, cell migration and invasion, endothelial permeability or cell death (Héraud et al., 2019). To achieve these specific functions, p190A subcellular localization is highly regulated. Thus, p190A accumulates in actin-rich structures where a regulation of RhoA is necessary, such as new adhesion sites (Tomar et al., 2009), lamellipodia/ruffles (McGlade et al., 1993; Binamé et al., 2016), podosomes/invadopodia (Nakahara et al., 1998; Guegan et al., 2008), or cleavage furrows (Su et al., 2009). Due to its enzymatic activity consisting of an enhancement of the GTP hydrolysis, p190A is mainly involved in the attenuation of the biological function of the RhoA GTPase. However, thanks to interaction with other key partners, p190A may also function as signal terminator for Rac1 and RhoC (Héraud et al., 2019).

P190A is a large ( $\approx 1500$  amino acid long) multidomain protein with its catalytic domain at the C-terminus. In addition to this RhoGAP module, p190A contains three other structural domains. The N-terminal part of p190A displays a GTP-binding domain (GBD), described recently as a class (ii) pseudo-GTPase domain, i.e. a nucleotide-binding catalytically inactive GTPase (Stiegler and Boggon, 2018). Close to the GBD, four motifs, the so-called FF motifs, consist of 50 amino acids motifs with two strictly conserved phenylalanines. Finally, the large middle domain between the FF and GAP domains contains two class (i) pseudo-GTPase domains, named pG1 and pG2, described with neither nucleotide-binding activity nor catalytic activity (Stiegler and Boggon, 2017). Besides these structural domains, several functional domains were characterized in p190A. Between the pG2 and the GAP domains, a binding site for p120RasGAP, a GAP of the Ras GTPase, was identified, and two Src-phosphorylated tyrosines, Y1087 and Y1105, are involved in the regulation of this interaction (Roof et al., 1998; Hu and Settleman, 1997). Furthermore, using a structure/function analysis, we identified an other functional region (residues 380-971), including two FF motifs, pG1 and pG2, implicated in the regulation of p190A subcellular localization and function. This region, named PLS for Protrusion Localization Sequence is necessary to target p190A to lamellipodia (Binamé et al., 2016). Whether the PLS is also required to target p190A to other actin-rich subcellular structures, such as invadosomes, remains to be explored. Importantly, we also showed that PLS regulates the GAP activity of the molecule. A truncated protein devoid of PLS (p190 $\Delta$ PLS) exhibits an increased ability to bind constitutively active RhoA in comparison to the wild-type (WT) protein. How the PLS does regulate the activity of p190A is largely unknown, and is the focus of the present study.

Recently, this GAP protein regains attention as it was found to be mutated in cancers. Indeed, several large-scale studies mapping somatic variants across thousands of tumors identified *ARHGAP35*, the gene-encoding p190A, as a new major cancer gene (Lawrence et al., 2014; Kandoth et al., 2013).

*ARHGAP35* appears mutated in about 2% of tumors, and this mutational status appears significant for endometrial tumors (14%), lung squamous cell carcinoma (5%), lung adenocarcinoma (3%) and head and neck cancer (3%) (Lawrence et al., 2014). The alteration of *ARHGAP35* gene in lung cancer was further confirmed by a more recent study dedicated to the identification of new driver genes in lung carcinogenesis (Campbell et al., 2016). Most *ARHGAP35* mutations are nonsense mutations and frameshift deletions/insertions supporting a tumor-suppressor role for p190A. At the protein level, as the GAP domain of the protein is localized at its C-terminus, these latter mutations are expected to produce a non-functional protein without GAP activity, as we found for the R997\* nonsense mutation (Binamé et al., 2016). Besides these mutations, many missense mutations were also reported all along *ARHGAP35* sequence. Even if some may have no impact on protein function, we showed that some mutations localized in the PLS and pG2 domain, had a strong impact on GAP activity and on cell behavior (Binamé et al., 2016). Indeed the point mutation S866F and the in-frame deletion del865-870 when ectopically expressed in tumor cells induce an increase of GAP activity and an alteration of directed tumor cell motility (Binamé et al., 2016). It is clear that the impact of such mutations remains to be explored in a closer way. Taken together, the identification and characterization of the PLS and the impact of these latter missense mutations allow us to make the hypothesis of a potential auto-inhibitory folding of the protein (Bidaud-Meynard et al., 2019).

Following our previous study, we aim to better characterize the involvement of the PLS domain in p190A regulation. Herein, we confirmed that p190A localizes at various invadosome organizations such as dots, rosettes and linear invadosomes. We found that deletion of the PLS (p190A $\Delta$ PLS construct) in p190A alters this localization. Using a global approach and biochemical analyses, we demonstrated that the PLS interacts with the region close to the GAP domain. Thus, our data are consistent with a specific folding of the molecule, involving the PLS and masking the GAP domain. We demonstrated that this interaction is lost upon introduction of S866F and  $\Delta$ 865-870 mutations, given a molecular explanation to the gain of function observed in cells expressing these mutants. Altogether our results unveil a new mechanism involved in p190A regulation, with the identification of the PLS as an inhibitory domain responsible for masking of p190A functional domain.

## RESULTS

### PLS is required to modulate p190A GAP activity and invadosome localization

The PLS region, encompassing 2 FF motifs, pG1 and pG2 was previously described to regulate p190A function and lamellipodium targeting in migrating cells (Binamé et al., 2016). We first attempt to complete these data. In order to evaluate the involvement of PLS in the regulation of p190A GAP activity, we used the F/G-actin ratio as a read-out of Rho GTPase activities. The WT and a PLS truncated form of p190A were expressed in HEK293 cells (Fig. 1A), and the amount of F- and G-actin was evaluated in cell lysate (Fig. 1B). As expected for a GAP protein, overexpressing WT p190A allows a decrease of F-actin. Consistent with our previous observations, while less expressed in HEK293 cells (Fig. 1A), p190A $\Delta$ PLS expression led to a stronger inhibition of F-actin polymerization than the WT protein (Fig. 1B). As control the PLS alone, without the GAP domain, did not impact F/G ratio upon expression in cells (Fig. 1B).

We have previously identified the PLS domain as the region of p190A necessary and sufficient for its targeting to lamellipodia. Since p190A also localized to invadosomes, which are actin-rich structures implicated in cell invasion, we analyzed the involvement of the PLS domain in the targeting/localization of p190A to invadosomes. We first confirmed that endogenous p190A localized to invadosomes, regardless of their organization and stimuli. p190A is present not only in dot-like invadopodia and linear invadosomes in Huh6 hepatocellular carcinoma cells spread, respectively, on glass and type I collagen fibers but also in v-Src-induced rosettes in NIH-3T3 cells (Fig. 2A). To check whether the PLS domain is required for p190A localization to invadosomes, we analyzed the localization of several HA tagged constructs. We showed that like the full-length protein, the PLS by itself was able to localize to invadosomes in NIH3T3 (Fig. 2B) and Huh6 cells (Fig. S1). On the contrary, a p190A $\Delta$ PLS mutant, corresponding to the protein lacking the PLS domain, was not correctly targeted to invadosomes (Fig. 2B and S1). Altogether these new data confirmed the importance of PLS in regulating both the GAP function and the targeting of p190A.

### PLS interacts with the C-terminal part of p190A

To understand how this PLS domain could regulate p190A, we performed a yeast two-hybrid experiment to identify interacting proteins. The PLS domain of p190A was used as a bait in a two-hybrid screen of a highly complex human placenta cDNA library (92.3 millions interactions). Interestingly, p190A itself was identified as interacting with PLS. Indeed, 35 clones from human p190A were identified (Supplementary Table I) corresponding to two distinct regions of p190A: region 2H#1 (aa 208-418) overlapping the end of the GBD and the 2 first FF motifs at the N-terminus part of the molecule, and region 2H#2 (aa 1069-1231) localized in the C-terminus part of p190A (Fig. 3A).

To confirm these results, we co-expressed, in HEK293T cells, GFP-tagged PLS with HA-tagged domains of p190A. Co-immunoprecipitations (coIP) were performed on cell lysates, using anti-HA beads. We first used HA-tagged constructs we have previously generated (Binamé et al., 2016), HA-Nter (aa 1-533) and HA-Cter (aa 1055-1513) (Supplementary Table II), overlapping respectively region 2H#1 and region 2H#2 (Fig. 3A). We observed a strong interaction between the PLS and the Cter domain of p190A as shown on Figures 3B-C. However, despite the identification of the region 2H#1 in the two-hybrid screen, interaction between the Nter domain and the PLS was barely detectable (Fig. 3C). This weak interaction may be due to the low expression of the HA-Nter construct in cells.

To map more precisely the interacting domains of p190A in the N-terminus and C-terminus parts, we performed coIP experiments between PLS and smaller domains of p190A. Figure 3D revealed that,

whereas PLS strongly interacts with the C-terminal domain of p190A, the interaction was reduced with the so-called p120-binding domain and almost absent with the GAP domain. Amongst the domains tested in the N-terminus part of the protein, only a weak interaction with the 4FF domain is observed (Fig. 3D). We then generated HA-tagged constructs corresponding to the two regions identified in the two-hybrid screen, i.e. regions 2H#1 and 2H#2, and performed co-IPs with GFP-PLS. The 2H#2 region (HA-Cter2h) interacts strongly with the PLS whereas no interaction can be detected with the 2H#1 (HA-Nter2h) (Fig. 3E) indicating that the domain between amino acids 1069-1231 is the smallest region of p190A detected as interacting with the PLS domain. These results show an interaction of two distinct domains of p190A involving the region close to the GAP domain and the PLS domain, suggesting a functional role of this interaction.

### **Phosphorylation is not involved in PLS/Cter interaction**

Some amino acids localized in the C-terminus part and especially in the 2H#2 region of the protein have been already involved in the function and regulation of the protein. In fact, Y1087 and Y1105 were implicated in p120RasGAP binding (Roof et al., 1998; Hu and Settleman, 1997). Using phosphosite mutants, we attempted to check whether these amino acids could regulate or modulate the interactions we demonstrated. By site-directed mutagenesis, we introduced Y1087F, Y1105F or Y1105E mutations into the HA-Cter construct and coIP experiments were performed using these mutants and GFP-PLS (Fig. 4A). No change in the PLS/Cter interaction was observed using either the WT or the mutated Cter domains. This result suggests that phosphorylation of these two specific residues is not implicated in the binding of the Cter domain with the PLS. We next wondered whether phosphorylation, in general, was necessary to allow the interaction. As shown on Figure 4B, phosphatase treatment did not modify the interaction between Cter and PLS domains, suggesting that phosphorylation is not involved in this molecular interaction.

### **Cancer-associated mutations alter PLS/Cter interaction**

The point mutation S866F and the small deletion of five amino acids including the S866 ( $\Delta$ 865-870), two cancer-associated mutations, were previously described as mimicking the PLS deletion in p190A function (Binamé et al., 2016). As both mutations are localized within the PLS domain of p190A (Fig. 3B), we analyzed their impact on the PLS/Cter interaction. To do so, we introduced each mutation in the GFP-tagged PLS construct and monitor by coIP the interaction with HA-tagged Cter. Interestingly we showed that inserting S866F mutation or deleting five amino acids ( $\Delta$ 865-870) into the PLS abolishes the interaction of the PLS domain with the Cter region of p190A (Fig. 4C). We further assayed the impact of these mutations on the weak PLS/Nter interaction. On the opposite way, we found that both mutations increase the interaction between the Nter and the PLS domain (Fig. 4D). Same results were obtained when coIP experiments were performed with the Nter2h corresponding to the 2H#1 region (Fig. 4D). These results suggest that both mutations may alter the conformation of the protein by modifying domain interactions. This would also suggest that these mutations may lead to the release of the interaction between the Cter and the PLS domain, unmasking the GAP domain and in the same time would increase the interaction between the Nter part of the protein and the PLS.



## DISCUSSION

Herein, we confirmed that the PLS, encompassing 2 FF motifs, pG1 and pG2 is an important functional domain for p190A. This domain was previously identified through a structure/function analysis, as the protrusion localization sequence of p190A (Binamé et al., 2016). Indeed PLS is necessary and sufficient for p190A targeting to lamellipodia and leading edges in migrating cells. As invadosomes are also actin-based protrusions where p190A was shown to regulate RhoGTPases such as RhoC and TC10 activities (Bravo-Cordero et al., 2011; Hülsemann et al., 2021), we further analyzed the involvement of PLS in the targeting of p190A to invadosomes. We first completed available data about p190A localization at invadosomes (Nakahara et al., 1998; Burgstaller and Gimona, 2004; Guegan et al., 2008; Crimaldi et al., 2009), as we demonstrated that WT p190A is present in all types of invadosomes structures such as rosettes in vSrc-transformed fibroblasts, dots in Huh6 tumor cells, and linear invadosomes in type I collagen plated cells. Using truncated version of p190A, we demonstrated that PLS is also necessary and sufficient for p190A targeting to these invadosome structures.

We have previously demonstrated that the PLS is also required for the negative regulation of p190A RhoGAP activity. We indeed published that RhoA activity decrease is stronger in cells expressing p190A $\Delta$ PLS than p190AWT. This strong effect of p190A $\Delta$ PLS arises from a drastic increase of its affinity toward active RhoA (Binamé et al., 2016). We demonstrated here that this impact on RhoA is measurable at the F-actin level. Thus, these data reinforce the key role of the PLS domain in the regulation of p190A and strongly support a PLS-mediated inhibition of the GAP domain.

Due to the presence of two pseudo-GTPase domains (pG1 and pG2) in the PLS we previously hypothesized that an intramolecular interaction could occur between pG1 or pG2 and the GAP domain, defined as an GTPase-interacting domain (Bidaud-Meynard et al., 2019; Héraud et al., 2019). Using a global 2hybrid screen and co-immunoprecipitation approaches, we identified the regions that do interact in p190A. We show that PLS strongly interacts with the region corresponding to aa 1069-1231. Interestingly this region excludes the GAP domain, but overlaps the p120RasGAP binding domain of p190A (aa 1055–1143) (Hu and Settleman, 1997) and the poly-basic region identified in as crucial for p190A phospholipid binding (Levay et al., 2013; Ligeti et al., 2004). Thus, our results are consistent with the determination of the PLS as an inhibitory domain responsible for p190A GAP activity repression. As deletion of PLS increased the affinity of the molecule for active RhoA, the PLS domain may act in *cis* through an intramolecular folding supposed to mask p190A catalytic domain (Fig. 5); this locked Cter conformation would result in an inactivated form of p190A. Autoinhibition due to protein folding that controls the GAP activity has been described for several GAPs such as p50RhoGAP, oligophrenin, Abr, and chimerins (Ligeti et al., 2012). Indeed in oligophrenin, the BAR domain of the protein acts as *cis*-acting inhibitory element that masks the GAP domain to prevent down-regulation of Rho GTPases (Eberth et al., 2009). However, through the data presented here we cannot exclude a role of the PLS in a trans-inhibition via an inter-molecular interaction, even if so far p190A has never been demonstrated to act as a dimer.

Such autoinhibition mechanism raises the question of the release of the autoinhibited state. Consequently, signals that may work as molecular conformation switchers have to activate p190A at the right place. Nevertheless, such signals remain to be identified. Protein partners and post-translational modifications such as phosphorylation are at first evident candidates. In this line, previous studies have proposed the involvement of Rac1 and Rnd3 to enhance RhoGAP activity of p190B, a paralog of p190A (Bustos et al., 2008). However, neither Rac1 nor Rnd3 were able to alter p190A PLS/Cter interaction; the same result was also obtained using p120RasGAP (data not shown). As shown

in this paper, we also exclude the involvement of phosphorylation. Indeed, neither mutations of tyrosine phosphosites present in the p120RasGAP-binding domain, nor the treatment with phosphatase did modify the PLS/Cter interaction of p190A.

Interestingly, our data point out serine 866 as an important amino acid for p190A regulation. Indeed, the cancer-associated S866F missense mutation and the  $\Delta$ 865–870 deletion abolished the PLS/Cter interaction as evaluated by co-IP. Both mutations were shown previously to mimic the deletion of the PLS domain with a mislocalization and an increase of GAP activity. Thus, these new data give a molecular explanation for the observed phenotypes and define these mutant proteins as constitutively active forms of p190A, with an unlocked Cter domain (Fig. 5). Since phosphorylation is frequently involved in functional regulation, it was tempting to hypothesize that phosphorylation of serine 866 keeps p190A in its closed conformation and that its dephosphorylation activates the protein, but consistent with our data obtained with the phosphatase treatment, mass spectrometry analysis revealed that S866 is not phosphorylated in WT p190A (data not shown). The closed conformation of p190A involving the PLS/Cter interaction is probably not the only mechanism that may regulates p190A folding. Indeed, based on our 2hybrid screen results we also demonstrated that the Nterminal part of the molecule may under some circumstances interacts with the PLS. We found that missense mutations S866F or  $\Delta$ 865-870 deletion strongly alter p190A conformation favoring PLS/Nter interaction instead of PLS/Cter interaction, with an locked Nter and unlocked Cter conformation (Fig. 5).

Together, our new data support an intramolecular model (Fig. 5), in which p190A is present in a closed conformation that may be opened upon stimuli, leading to the translocation and full activation of p190A restricted to actin-based structures such as lamellipodia and invadosomes. Thus, interestingly, the PLS domain is at the basis of a dual-effect system with separate membrane-localization and GAP-inhibitory functions that may operate simultaneously. In cancers, missense cancer-associated mutations, such as S866F that affects this mechanism may finally results in loss of function equivalent to the non-sense mutations.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

### Cell lines

HEK293T and NIH-3T3-vSrc cell lines were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Media (DMEM) containing 4.5 g/l glucose and Glutamax (Gibco) supplemented with 10% FCS (Eurobio). Hepatocellular carcinoma Huh6 cells were maintained in DMEM containing 1 g/l glucose and Glutamax (Gibco) supplemented with 10% FCS (Eurobio). All cells were maintained at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> humidified atmosphere. HEK293T cell line was purchased from American Type Culture Collection (ATCC). Huh6 cells were a gift from C. Perret (Cochin Institute, Paris), and NIH-3T3-vSrc cells from S. Courtneidge (Burham Institute for Medical Research, La Jolla, CA). Cell lines were confirmed for the absence of mycoplasma by PCR and authenticated by STR Matching analysis (ATCC).

### Antibodies and reagents

Mouse monoclonal (clone 12CA5) and rat monoclonal (clone 3F10) anti-HA antibodies were purchased from Roche. Mouse anti-p190A (clone D2D6) and rabbit polyclonal anti-GFP antibodies were obtained from Sigma. Mouse anti-p190A antibodies (clone 30) were from BD. Rabbit anti-GAPDH (FL-335) antibodies were obtained from Santa Cruz Biotechnology. Anti-mouse IRDYE680 and anti-rabbit IRDYE800 secondary antibodies were obtained from Eurobio Scientific. FluoProbes 488-phalloidin and 488-labeled secondary antibodies and 547-labeled secondary antibodies were purchased from Interchim. Hoechst 405 (34580, Invitrogen) was used to stain nuclei.

### F- and G-actin in vivo assay

Relative proportions of F-actin and G-actin in cells were determined using a kit from Cytoskeleton (Cat. no. #BK037, Cytoskeleton Inc), according to manufacturer's instructions. 24h after plasmid transfection, HEK293T cells were harvested in a detergent-based lysis buffer that stabilizes F-actin, containing 100 mM ATP and proteases inhibitors. Cells were then centrifuged at 350 g at room temperature to pellet unbroken cells and fragments. The supernatant was ultracentrifuged at 100,000 g at 37°C for 1 hour, to separate F-actin from G-actin. F-Actin was then depolymerized, and actin amounts were assessed by SDS page and immunoblotting.

### Two-hybrid screen

A bait cDNA construct (pB27 bait vector) expressing the PLS (aa380-971) from *Rattus norvegicus* ARHGAP35 fused to the lexA DNA-binding domain was used to screen for prey clones in a human placenta cDNA library (pP6 prey vector). This screen was performed by Hybrigenics services (Evry, France) using the ULTimate Y2HTM screen.

### Transfection

DNA transfections in HEK293T cell line were performed using Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific), Huh6 cells were transfected using promofectin-hepatocyte transfection reagent (Promocell) and NIH-3T3-vSrc cells with JetPrime (PolyPlus Transfection) according to the manufacturer's instructions.

### Plasmid constructs

The pKH3-p190A-WT containing the rat full-length p190RhoGAP (GenBank under accession no. M94721) was a generous gift from I. Macara (Vanderbilt University, Nashville, TN). The two truncated p190A constructs (Nter 2h and Cter 2h) were engineered by PCR using the rat full-length p190RhoGAP

as matrix and subcloned into pKH3 expression vector using BamHI and EcoRI restriction sites. Point mutations were generated in the parental vector pKH3-p190A using site-directed mutagenesis with the QuikChange II XL kit according to the manufacturer's protocol (Agilent Technologies). The two mutated PLS constructs (PLS S866F and PLS  $\Delta$ 865-870) were generated by site-directed mutagenesis in the rat GFP-PLS construct. The three mutated Cter constructs (Cter Y1087F, Cter Y1105F and Cter Y1105E) were generated by site-directed mutagenesis in the rat HA-Cter construct. All constructs were verified by DNA sequencing. All other p190 constructs (truncated and/or mutated p190A constructs) were previously generated and published (Binamé et al., 2016). All constructs used in this study are summarized in Supplemental Table II. All primers used for these constructs are listed in Supplementary Table III.

### **Western blot analysis and immunoprecipitation**

24h after transfection, cells were scraped off on ice and homogenized in Tris-HCl lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, and 0.1% NP-40) with protease and phosphatase inhibitors. Cell lysates were centrifuged at 10,000g for 10 min to erase cellular debris and nuclei. Lysates were denatured with Laemmli loading buffer containing 2.5% 2- $\beta$ -mercaptoethanol for 5 min and analysed by SDS-PAGE by blotting them onto nitrocellulose membranes. Blots were incubated overnight at 4°C or for one hour at room temperature with primary antibodies, and then incubated with infrared fluorescent dye-conjugated secondary antibodies (Eurobio). Activity was visualized with the Odyssey infrared imaging system (LI-COR Biosciences) and the Chemidoc infrared imaging system (Bio-Rad) and analyzed using ImageJ image analysis software. Anti-HA affinity matrix was obtained from Roche for immunoprecipitation assays and used following the manufacturer's protocol. Briefly, cells were extracted in the Tris-HCl buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, and 0.1% NP-40) supplemented with protease and phosphatase inhibitors and centrifuged for 10 minutes at 10,000g. One mg of the supernatant was incubated for 30 min with the beads. Bead pellets were washed three times with Tris-HCl buffer, resuspended in loading buffer before analysis by SDS-PAGE.

### **$\lambda$ -phosphatase treatment**

Protein lysates were incubated with  $\lambda$ -phosphatase (New England Biolabs) with or without the recommended amount of the Halt Phosphatase Inhibitor Mixture (ThermoScientific) for 30 min at 30°C. Samples were washed six times with buffer, according to the manufacturer's protocol, prior to coimmunoprecipitation and subsequent SDS-PAGE analysis.

### **Collagen I coating**

To induce linear invadosome formation, coverslips were prepared as previously described (Juin et al., 2012). Coverslips were coated with 0.5 mg/ml type I collagen (BD Biosciences, Bedford, MA) in Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS; Gibco). Collagen-coated coverslips were incubated for 4 h at 37°C, after which they were washed gently in PBS (Invitrogen). Cells were seeded and fixed after 5h of incubation at 37°C before staining.

### **Immunofluorescence and confocal imaging**

24h after transfection on glass coverslips, cells were fixed with 4% PFA for 10 min at RT and permeabilized with 0.2% Triton X-100 for 10 min before incubation with various antibodies, as previously described (Moreau et al., 2003). After staining, coverslips were mounted on slides with Fluoromount G mounting medium. Cells were imaged using an SP5 confocal microscope (Leica

Biosystems) using a 63×/NA 1.4 Plan Neofluor objective lens and the LAS-AF-Lite 2.4.1 acquisition software (Leica Biosystems). To prevent contamination among fluorochromes, each channel was imaged sequentially using the multitrack recording module before merging. Images were processed using LAS-AF-Lite 2.4.1 (Leica Biosystems) or ImageJ software (National Institutes of Health).

**Supporting information**—This article contains supporting information.

**Acknowledgments**— We thank Dr I. G. Macara (Vanderbilt University, USA) for DNA constructs. We are grateful to Drs C. Perret (Cochin Institute, Paris) and S. Courtneidge (Burham Institute for Medical Research, La Jolla, CA) for providing us cell lines. Microscopy was done in the Bordeaux Imaging Center, a service unit of the CNRS-INSERM and Bordeaux University, member of the national infrastructure France Biolmaging.

**Author contributions**—V.L. and V.M. conceptualization; C.H., M.P., V.L. and V.M. formal analysis; C.H., M.P., V.N. and F.S. methodology; V.L. and V.M. supervision; V.L. and V.M. writing original draft; C.H., F.S, V.L. and V.M. writing, review and editing; F.S. and V.M. funding acquisition.

**Funding and additional information**— CH was supported by a PhD scholarship from the French Ministry of Research (MENESR) and an end-of-thesis fellowship from Fondation ARC pour la Recherche sur le Cancer. MP is supported by a PhD fellowship from both Fondation pour la Recherche Médicale and Région Nouvelle-Aquitaine. This research was funded by La Fondation pour la Recherche Médicale (équipe FRM 2018, grant number DEQ20180839586), by INCa (grant PLBIO2014-182) and by La Ligue contre le Cancer (comité de Gironde). The authors declare no competing financial interests.

**Conflicts of interest**—The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

**Abbreviations**—The abbreviations used are: co-IP, co-immunoprecipitation; Cter, C-terminus; GAP, GTPase-Activating Protein; GBD, GTP-binding domain; GDP, guanosine diphosphate; GTP, guanosine triphosphate; GTPase, guanosine triphosphate hydrolase; Nter, Nterminus; PLS, protrusion localization sequence; Ras, Rat sarcoma; Rho, Ras homolog; WT, wild-type.

## REFERENCES

- Bidaud-Meynard, A., F. Binamé, V. Lagrée, and V. Moreau. 2019. Regulation of Rho GTPase activity at the leading edge of migrating cells by p190RhoGAP. *Small GTPases*. 10:99–110. doi:10.1080/21541248.2017.1280584.
- Binamé, F., A. Bidaud-Meynard, L. Magnan, L. Piquet, B. Montibus, A. Chabadel, F. Saltel, V. Lagrée, and V. Moreau. 2016. Cancer-associated mutations in the protrusion-targeting region of p190RhoGAP impact tumor cell migration. *J. Cell Biol.* 214:859–873. doi:10.1083/jcb.201601063.
- Bravo-Cordero, J.J., M. Oser, X. Chen, R. Eddy, L. Hodgson, and J. Condeelis. 2011. A novel spatiotemporal RhoC activation pathway locally regulates cofilin activity at invadopodia. *Curr Biol.* 21:635–44. doi:10.1016/j.cub.2011.03.039.
- Burgstaller, G., and M. Gimona. 2004. Actin cytoskeleton remodelling via local inhibition of contractility at discrete microdomains. *Journal of Cell Science*. 117:223–231. doi:10.1242/jcs.00839.
- Campbell, J.D., A. Alexandrov, J. Kim, J. Wala, A.H. Berger, C.S. Pdamallu, S.A. Shukla, G. Guo, A.N. Brooks, B.A. Murray, M. Imielinski, X. Hu, S. Ling, R. Akbani, M. Rosenberg, C. Cibulskis, A. Ramachandran, E.A. Collisson, D.J. Kwiatkowski, M.S. Lawrence, J.N. Weinstein, R.G. Verhaak, C.J. Wu, P.S. Hammerman, A.D. Cherniack, G. Getz, N. Cancer Genome Atlas Research, M.N. Artyomov, R. Schreiber, R. Govindan, and M. Meyerson. 2016. Distinct patterns of somatic genome alterations in lung adenocarcinomas and squamous cell carcinomas. *Nat Genet.* 48:607–16. doi:10.1038/ng.3564.
- Crimaldi, L., S.A. Courtneidge, and M. Gimona. 2009. Tks5 recruits AFAP-110, p190RhoGAP, and cortactin for podosome formation. *Experimental Cell Research*. 315:2581–2592. doi:10.1016/j.yexcr.2009.06.012.
- Eberth, A., R. Lundmark, L. Gremer, R. Dvorsky, K.T. Koessmeier, H.T. McMahon, and M.R. Ahmadian. 2009. A BAR domain-mediated autoinhibitory mechanism for RhoGAPs of the GRAF family. *Biochem J.* 417:371–377. doi:10.1042/BJ20081535.
- Guegan, F., F. Tatin, T. Leste-Lasserre, G. Drutel, E. Genot, and V. Moreau. 2008. p190B RhoGAP regulates endothelial-cell-associated proteolysis through MT1-MMP and MMP2. *Journal of cell science*. 121:2054–61.
- Héraud, C., M. Pinault, V. Lagrée, and V. Moreau. 2019. p190RhoGAPs, the ARHGAP35- and ARHGAP5-Encoded Proteins, in Health and Disease. *Cells*. 8. doi:10.3390/cells8040351.
- Hu, K.Q., and J. Settleman. 1997. Tandem SH2 binding sites mediate the RasGAP-RhoGAP interaction: a conformational mechanism for SH3 domain regulation. *The EMBO journal*. 16:473–83.
- Hülsemann, M., C. Sanchez, P.V. Verkhusha, V. Des Marais, S.P.H. Mao, S.K. Donnelly, J.E. Segall, and L. Hodgson. 2021. TC10 regulates breast cancer invasion and metastasis by controlling membrane type-1 matrix metalloproteinase at invadopodia. *Commun Biol.* 4:1091. doi:10.1038/s42003-021-02583-3.

Juin, A., C. Billottet, V. Moreau, O. Destaing, C. Albiges-Rizo, J. Rosenbaum, E. Génot, and F. Saltel. 2012. Physiological type I collagen organization induces the formation of a novel class of linear invadosomes. *Mol. Biol. Cell.* 23:297–309. doi:10.1091/mbc.E11-07-0594.

Kandoth, C., M.D. McLellan, F. Vandin, K. Ye, B. Niu, C. Lu, M. Xie, Q. Zhang, J.F. McMichael, M.A. Wyczalkowski, M.D.M. Leiserson, C.A. Miller, J.S. Welch, M.J. Walter, M.C. Wendl, T.J. Ley, R.K. Wilson, B.J. Raphael, and L. Ding. 2013. Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. *Nature.* 502:333–339.

Lawrence, M.S., P. Stojanov, C.H. Mermel, J.T. Robinson, L.A. Garraway, T.R. Golub, M. Meyerson, S.B. Gabriel, E.S. Lander, and G. Getz. 2014. Discovery and saturation analysis of cancer genes across 21 tumour types. *Nature.* 505:495–501. doi:10.1038/nature12912.

Levay, M., B. Bartos, and E. Ligeti. 2013. p190RhoGAP has cellular RacGAP activity regulated by a polybasic region. *Cell Signal.* 25:1388–94. doi:10.1016/j.cellsig.2013.03.004.

Ligeti, E., M.C. Dagher, S.E. Hernandez, A.J. Koleske, and J. Settleman. 2004. Phospholipids can switch the GTPase substrate preference of a GTPase-activating protein. *The Journal of biological chemistry.* 279:5055–8.

Ligeti, E., S. Welti, and K. Scheffzek. 2012. Inhibition and termination of physiological responses by GTPase activating proteins. *Physiol Rev.* 92:237–72. doi:10.1152/physrev.00045.2010.

Machacek, M., L. Hodgson, C. Welch, H. Elliott, O. Pertz, P. Nalbant, A. Abell, G.L. Johnson, K.M. Hahn, and G. Danuser. 2009. Coordination of Rho GTPase activities during cell protrusion. *Nature.* 461:99–103.

McGlade, J., B. Brunkhorst, D. Anderson, G. Mbamalu, J. Settleman, S. Dedhar, M. Rozakis-Adcock, L.B. Chen, and T. Pawson. 1993. The N-terminal region of GAP regulates cytoskeletal structure and cell adhesion. *The EMBO journal.* 12:3073–81.

Mehidi, A., O. Rossier, M. Schaks, A. Chazeau, F. Binamé, A. Remorino, M. Coppey, Z. Karatas, J.-B. Sibarita, K. Rottner, V. Moreau, and G. Giannone. 2019. Transient Activations of Rac1 at the Lamellipodium Tip Trigger Membrane Protrusion. *Curr. Biol.* 29:2852-2866.e5. doi:10.1016/j.cub.2019.07.035.

Moreau, V., F. Tatin, C. Varon, and E. Génot. 2003. Actin Can Reorganize into Podosomes in Aortic Endothelial Cells, a Process Controlled by Cdc42 and RhoA. *Mol Cell Biol.* 23:6809–6822. doi:10.1128/MCB.23.19.6809-6822.2003.

Nakahara, H., S.C. Mueller, M. Nomizu, Y. Yamada, Y. Yeh, and W.T. Chen. 1998. Activation of beta1 integrin signaling stimulates tyrosine phosphorylation of p190RhoGAP and membrane-protrusive activities at invadopodia. *J Biol Chem.* 273:9–12.

Pertz, O., L. Hodgson, R.L. Klemke, and K.M. Hahn. 2006. Spatiotemporal dynamics of RhoA activity in migrating cells. *Nature.* 440:1069–72.

Roof, R.W., M.D. Haskell, B.D. Dukes, N. Sherman, M. Kinter, and S.J. Parsons. 1998. Phosphotyrosine (p-Tyr)-dependent and -independent mechanisms of p190 RhoGAP-p120 RasGAP interaction: Tyr 1105

of p190, a substrate for c-Src, is the sole p-Tyr mediator of complex formation. *Molecular and cellular biology*. 18:7052–63.

Stiegler, A.L., and T.J. Boggon. 2017. p190RhoGAP proteins contain pseudoGTPase domains. *Nat Commun*. 8:506. doi:10.1038/s41467-017-00483-x.

Stiegler, A.L., and T.J. Boggon. 2018. The N-Terminal GTPase Domain of p190RhoGAP Proteins Is a PseudoGTPase. *Structure*. 26:1451-1461 e4. doi:10.1016/j.str.2018.07.015.

Su, L., O. Pertz, M. Mikawa, K. Hahn, and S.J. Parsons. 2009. p190RhoGAP negatively regulates Rho activity at the cleavage furrow of mitotic cells. *Exp Cell Res*. 315:1347–59. doi:10.1016/j.yexcr.2009.02.014.

Tomar, A., S.T. Lim, Y. Lim, and D.D. Schlaepfer. 2009. A FAK-p120RasGAP-p190RhoGAP complex regulates polarity in migrating cells. *J Cell Sci*. 122:1852–62. doi:10.1242/jcs.046870.



## FIGURE LEGENDS

### Figure 1: PLS is required to modulate p190A GAP activity

HEK293T cells were transfected with indicated HA-tagged constructs. Cell lysates were used to performed immunoblots (A) or to quantify F/G-actin ratio (B). (A) Immunoblots were revealed with anti-HA and anti-GAPDH antibodies. GAPDH is used as loading control. Arrows indicated expected proteins. (B) F- and G-actin were separated by centrifugation and each fraction was run on a SDS - PAGE. Western-blot was revealed using anti-actin antibodies. The graph shows ratio of F/G-actin in each condition.

### Figure 2: PLS is necessary for p190A invadosome localization

(A) NIH3T3-Src cells were plated on glass coverslip (upper panel) and Huh6 cells were plated on coverslips treated (bottom panel) or not (middle panel) with type I collagen. All cells are stained for endogenous F-actin (red), p190A (green), and nuclei (blue). Merge images are represented. (B) NIH3T3-Src cells were transfected with indicated HA-tagged constructs, plated on glass coverslips, fixed and stained for F-actin (red), HA tag (green), and nuclei (blue). (A-B) Boxed regions are shown as enlarged views. Bar: 10  $\mu$ m.

### Figure 3: PLS interacts with the Cter domain of p190A

(A) Schematic representation of p190A. Functional domains are indicated. GBD: GTP binding domain; pG1: pseudo GTPase domain 1, pG2: pseudo GTPase domain 2; p120BD: p120RasGAP binding domain; GAP: GTPase Activating Protein domain. Constructs used in the experiments are represented. (B-E) Co-IP of different HA-tagged proteins and GFP-PLS from lysates of HEK293T cells overexpressing respective tagged proteins. Input and coIP were analyzed by Western-blot with antibodies against HA and GFP tag, as indicated. Arrows indicated expected proteins, stars indicated signal of the IgG light chains.

### Figure 4: Cancer-associated mutations in PLS abolish PLS/Cter interaction and increase PLS/Nter interaction.

(A) Phosphosites Y1105 and Y1087 are not involved in PLS/Cter interaction. HEK293T cells were cotransfected with indicated constructs and coIP were performed using HA-coupled beads. Input and coIP experiments were analyzed by Western-blot with antibodies against HA and GFP tags, as indicated. (B) Phosphorylation is not implicated in Cter/PLS interaction. Cells were cotransfected as indicated and treated with phosphatase with or without phosphatase inhibitor. Cell extracts were analyzed after (IP HA) coIP, by Western-blot using anti-HA or anti-GFP antibodies as indicated. (C-D) HEK293 cells were transfected as indicated and cell extracts were analyzed by Western-blot before (Input) or after coIP (IP HA). Western-blots were performed using a mouse anti-HA or a rabbit anti-GFP antibodies as indicated. (C) CoIP were performed between HA-Cter and WT (GFP-PLS) or mutated PLS (GFP-PLS S866F, GFP-PLS  $\Delta$ 865-870). (D) CoIP was performed between HA-Nter or HA-Nter2h and the WT or mutated forms of the PLS. (B, D) Arrows indicated expected proteins, stars indicated signal of the IgG light chains.

### Figure 5: Auto inhibition folding of the protein.

Representation of the model for an intramolecular interaction within p190A involving PLS/Cter domains. In the WT inactivated protein, PLS is interacting with the Cter domain in a locked Cter conformation masking the GAP domain. In the mutated protein, the Cter is not interacting anymore with the PLS leading to unmasking of the GAP domain and increasing of the GAP activity. The Nter

domain would instead interact with the PLS preventing the correct localization of the protein. A fully activated protein may require an open conformation to allow proper localization and GAP activity.

## Supplemental material

### **Supplementary Figure 1: PLS is necessary for p190A linear invadosome localization**

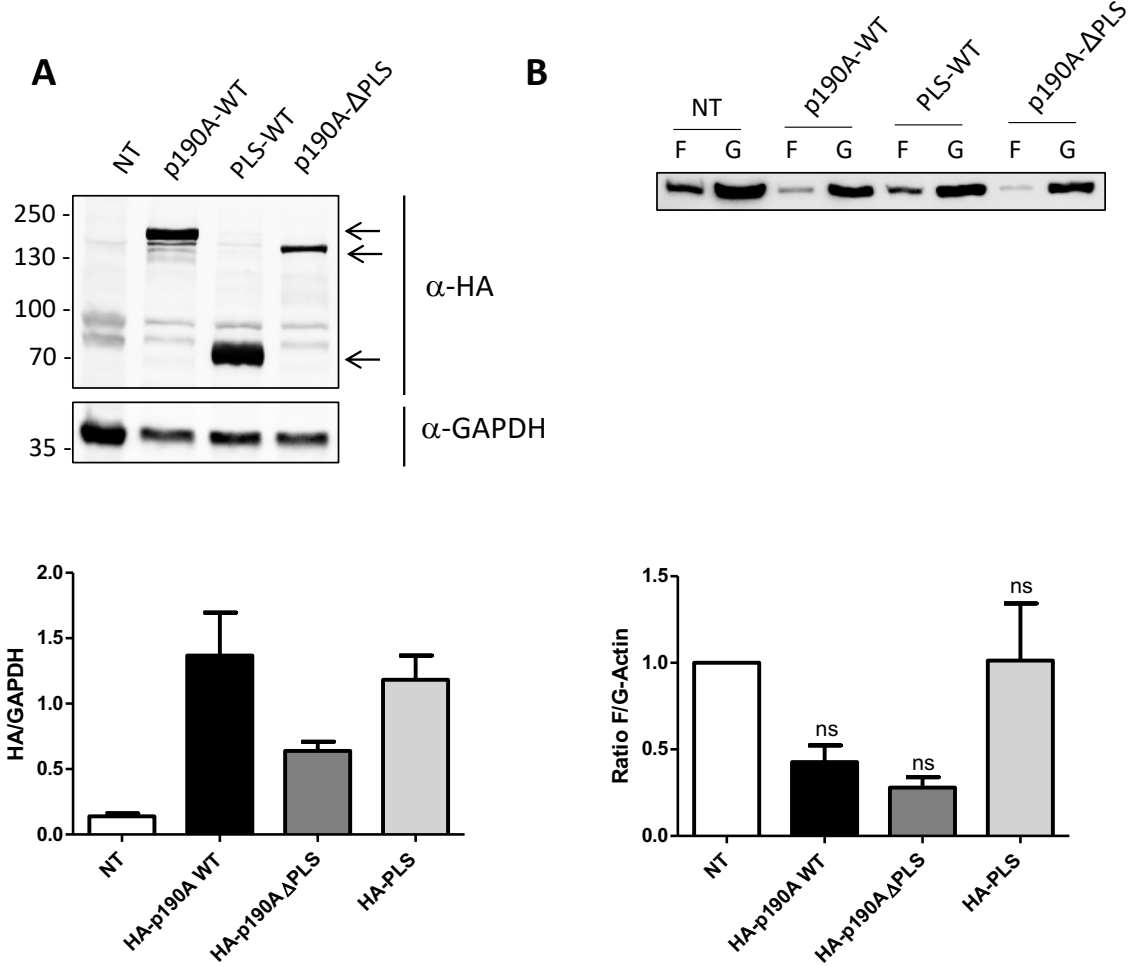
Huh6 cells transfected with indicated HA-tagged constructs were plated on type I collagen-coated coverslips to induced linear invadosomes. Cells were then fixed and stained for F-actin (red), HA tag (green), and nuclei (blue). Boxed regions are shown as enlarged views. Bar: 10  $\mu$ m.

### **Supplementary Table I: ARHGAP35/GRLF1 clones obtained in the 2Hybrid screen**

**Supplementary Table II:** *ARHGAP35* constructs used in this study. Numbering corresponds to the rat *ARHGAP35* cDNA (GenBank under accession no. M94721), that was used.

**Supplementary Table III:** *ARHGAP35* primers used in this study.

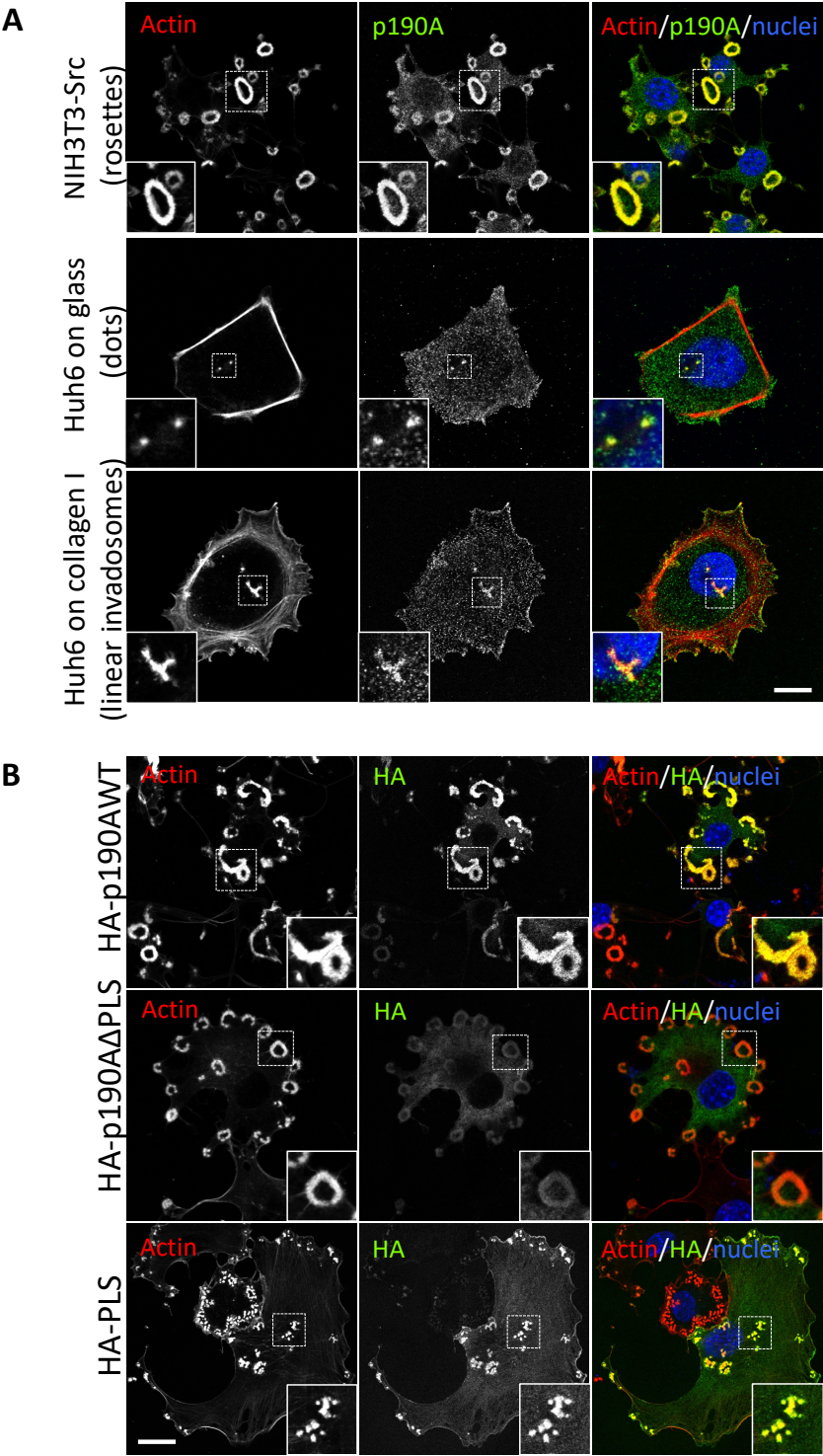
**Figure 1: PLS is required to modulate p190A GAP activity**



**Figure 1: PLS is required to modulate p190A GAP activity**

HEK293T cells were transfected with indicated HA-tagged constructs. Cell lysates were used to performed immunoblots (A) or to quantify F/G-actin ratio (B). (A) Immunoblots were revealed with anti-HA and anti-GAPDH antibodies. GAPDH is used as loading control. Arrows indicated expected proteins. (B) F- and G-actin were separated by centrifugation and each fraction was run on a SDS - PAGE. Western-blot was revealed using anti-actin antibodies. The graph shows ratio of F/G-actin in each condition.

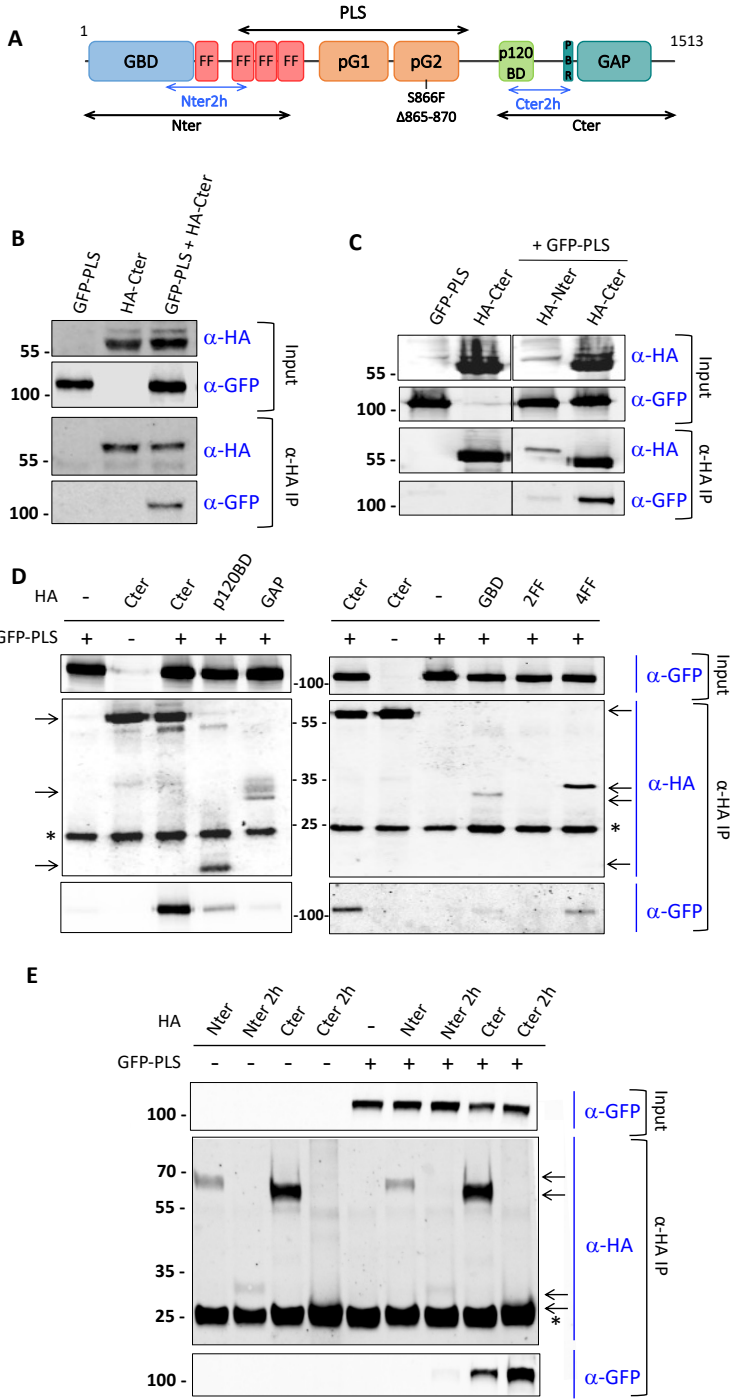
**Figure 2: PLS is necessary for p190A invadosome localization**



**Figure 2: PLS is necessary for p190A invadosome localization**

(A) NIH3T3-Src cells were plated on glass coverslip (upper panel) and Huh6 cells were plated on coverslips treated (bottom panel) or not (middle panel) with type I collagen. All cells are stained for endogenous F-actin (red), p190A (green), and nuclei (blue). Merge images are represented. (B) NIH3T3-Src cells were transfected with indicated HA-tagged constructs, plated on glass coverslips, fixed and stained for F-actin (red), HA tag (green), and nuclei (blue). (A-B) Boxed regions are shown as enlarged views. Bar: 10 μm.

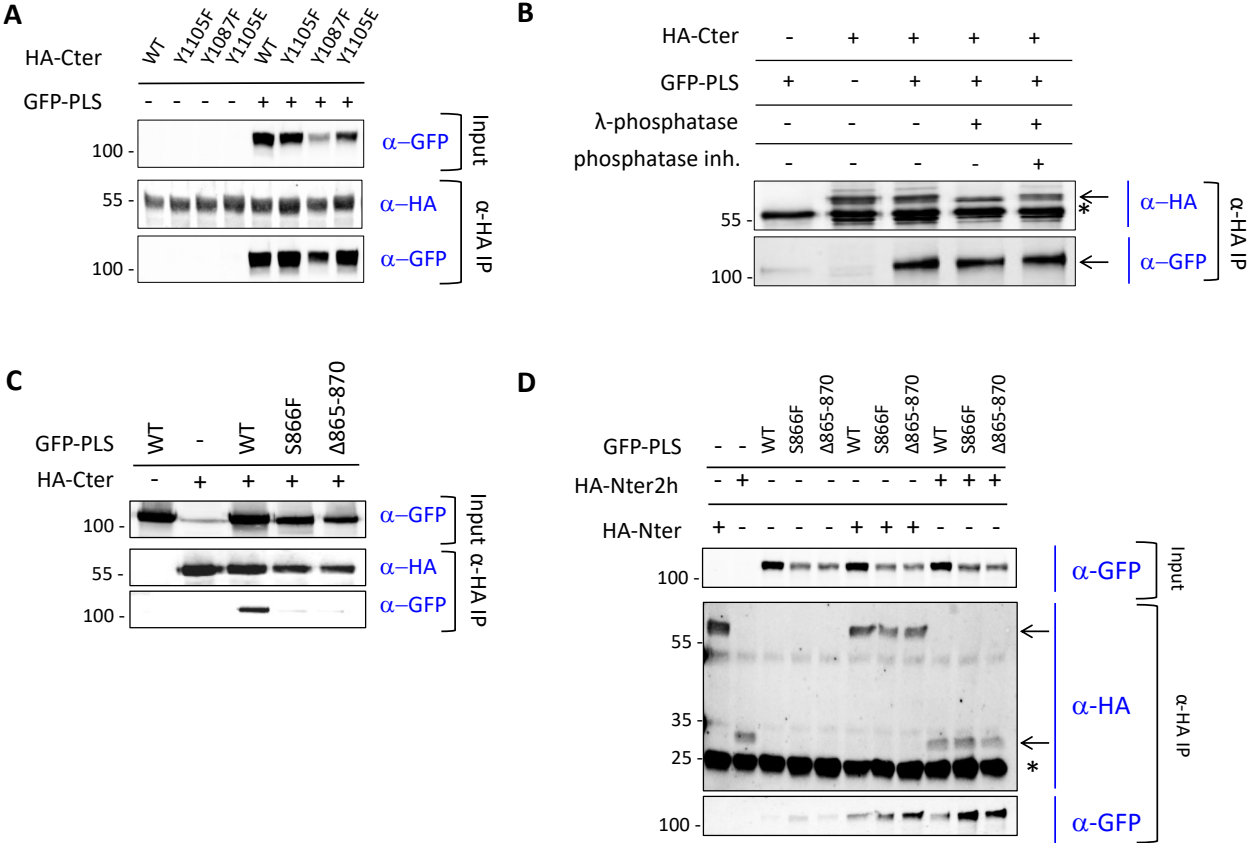
**Figure 3: PLS interacts with the Cter domain of p190A**



**Figure 3: PLS interacts with the Cter domain of p190A**

(A) Schematic representation of p190A. Functional domains are indicated. GBD: GTP binding domain; pG1: pseudo GTPase domain 1, pG2: pseudo GTPase domain 2; p120BD: p120RasGAP binding domain; GAP: GTPase Activating Protein domain. Constructs used in the experiments are represented. (B-E) Co-IP of different HA-tagged proteins and GFP-PLS from lysates of HEK293T cells overexpressing respective tagged proteins. Input and coIP were analyzed by Western-blot with antibodies against HA and GFP tag, as indicated. Arrows indicated expected proteins, stars indicated signal of the IgG light chains.


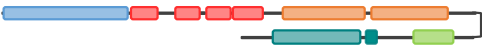


**Figure 4: Cancer-associated mutations in PLS abolish PLS/Cter interaction and increase PLS/Nter interaction.**



**Figure 4: Cancer-associated mutations in PLS abolish PLS/Cter interaction and increase PLS/Nter interaction.**

(A) Phosphosites Y1105 and Y1087 are not involved in PLS/Cter interaction. HEK293T cells were cotransfected with indicated constructs and coIP were performed using HA-coupled beads. Input and coIP experiments were analyzed by Western-blot with antibodies against HA and GFP tags, as indicated. (B) Phosphorylation is not implicated in Cter/PLS interaction. Cells were cotransfected as indicated and treated with phosphatase with or without phosphatase inhibitor. Cell extracts were analyzed after (IP HA) coIP, by Western-blot using anti-HA or anti-GFP antibodies as indicated. (C-D) HEK293 cells were transfected as indicated and cell extracts were analyzed by Western-blot before (Input) or after coIP (IP HA). Western-blot were performed using a mouse anti-HA or a rabbit anti-GFP antibodies as indicated. (C) CoIP were performed between HA-Cter and WT (GFP-PLS) or mutated PLS (GFP-PLS S866F, GFP-PLS Δ865-870). (D) CoIP was performed between HA-Nter or HA-Nter2h and the WT or mutated forms of the PLS. (B, D) Arrows indicated expected proteins, stars indicated signal of the IgG light chains.

**Figure 5: Auto inhibition folding of the protein.**

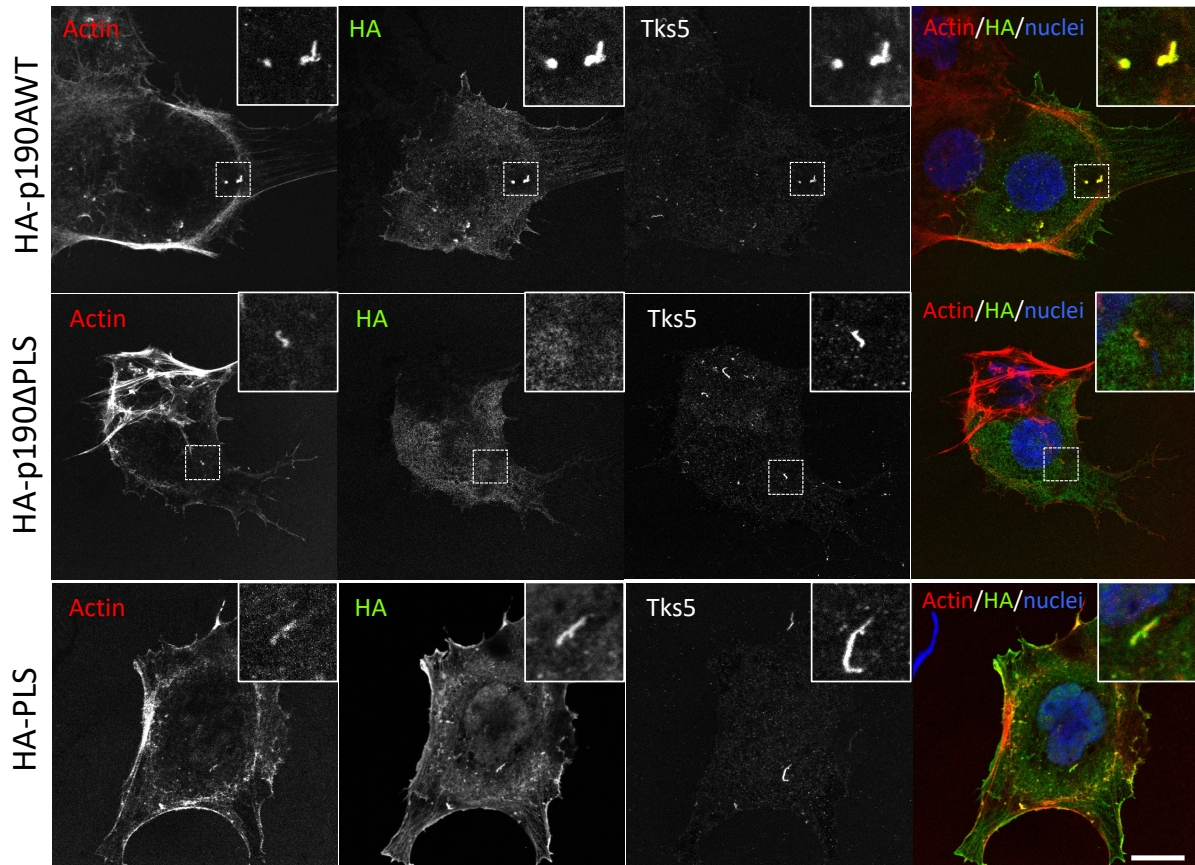
		localization	GAP activity
Double locked model ? (Fully closed conformation)		X	X
Unactivated WT p190 (Locked Cter conformation)		X	X
Mutated S866F p190A (Locked Nter/Unlocked Cter)		X	✓
Activated WT p190 (Open conformation)		✓	✓

**Figure 5: Auto inhibition folding of the protein.**

Representation of the model for an intramolecular interaction within p190A involving PLS/Cter domains. In the WT inactivated protein, PLS is interacting with the Cter domain in a locked Cter conformation masking the GAP domain. In the mutated protein, the Cter is not interacting anymore with the PLS leading to unmasking of the GAP domain and increasing of the GAP activity. The Nter domain would instead interact with the PLS preventing the correct localization of the protein. A fully activated protein may require an open conformation to allow proper localization and GAP activity.

## Supplementary Figure 1: PLS is necessary for p190A linear invadosome localization

Huh6 cells on type I collagen



### Supplementary Figure 1: PLS is necessary for p190A linear invadosome localization

Huh6 cells transfected with indicated HA-tagged constructs were plated on type I collagen-coated coverslips to induced linear invadosomes. Cells were then fixed and stained for F-actin (red), HA tag (green), and nuclei (blue). Boxed regions are shown as enlarged views. Bar: 10  $\mu$ m.



## Supplementary Table I:

ARHGAP35/GRLF1 clones obtained in the 2Hybrid screen

Clone Name	Gene Name (Best Match)	Global PBS	Start	Stop
PLA_RP6_hgx4519v1_pB27_A-174	Homo sapiens - GRLF1	A	621	1256
PLA_RP6_hgx4519v1_pB27_A-41	Homo sapiens - GRLF1	A	621	1256
PLA_RP6_hgx4519v1_pB27_A-319	Homo sapiens - GRLF1	A	2683	3695
PLA_RP6_hgx4519v1_pB27_A-209	Homo sapiens - GRLF1	A	2685	3820
PLA_RP6_hgx4519v1_pB27_A-330	Homo sapiens - GRLF1	A	2685	3820
PLA_RP6_hgx4519v1_pB27_A-346	Homo sapiens - GRLF1	A	2685	3820
PLA_RP6_hgx4519v1_pB27_A-337	Homo sapiens - GRLF1	A	2820	4250
PLA_RP6_hgx4519v1_pB27_A-264	Homo sapiens - GRLF1	A	2886	3909
PLA_RP6_hgx4519v1_pB27_A-323	Homo sapiens - GRLF1	A	2886	3909
PLA_RP6_hgx4519v1_pB27_A-279	Homo sapiens - GRLF1	A	2907	4257
PLA_RP6_hgx4519v1_pB27_A-289	Homo sapiens - GRLF1	A	2907	4257
PLA_RP6_hgx4519v1_pB27_A-117	Homo sapiens - GRLF1	A	2907	4257
PLA_RP6_hgx4519v1_pB27_A-204	Homo sapiens - GRLF1	A	2907	4257
PLA_RP6_hgx4519v1_pB27_A-205	Homo sapiens - GRLF1	A	2907	4257
PLA_RP6_hgx4519v1_pB27_A-363	Homo sapiens - GRLF1	A	2907	4257
PLA_RP6_hgx4519v1_pB27_A-360	Homo sapiens - GRLF1	A	2907	4257
PLA_RP6_hgx4519v1_pB27_A-287	Homo sapiens - GRLF1	A	2931	3767
PLA_RP6_hgx4519v1_pB27_A-300	Homo sapiens - GRLF1	A	2934	4257
PLA_RP6_hgx4519v1_pB27_A-255	Homo sapiens - GRLF1	A	2934	4257
PLA_RP6_hgx4519v1_pB27_A-268	Homo sapiens - GRLF1	A	2970	3841
PLA_RP6_hgx4519v1_pB27_A-354	Homo sapiens - GRLF1	A	2970	3841
PLA_RP6_hgx4519v1_pB27_A-353	Homo sapiens - GRLF1	A	2970	3841
PLA_RP6_hgx4519v1_pB27_A-366	Homo sapiens - GRLF1	A	2970	3841
PLA_RP6_hgx4519v1_pB27_A-296	Homo sapiens - GRLF1	A	3000	3829
PLA_RP6_hgx4519v1_pB27_A-327	Homo sapiens - GRLF1	A	3000	3829
PLA_RP6_hgx4519v1_pB27_A-45	Homo sapiens - GRLF1	A	3000	3829
PLA_RP6_hgx4519v1_pB27_A-150	Homo sapiens - GRLF1	A	3000	3829
PLA_RP6_hgx4519v1_pB27_A-184	Homo sapiens - GRLF1	A	3000	3829
PLA_RP6_hgx4519v1_pB27_A-158	Homo sapiens - GRLF1	A	3003	3702
PLA_RP6_hgx4519v1_pB27_A-178	Homo sapiens - GRLF1	A	3003	3702
PLA_RP6_hgx4519v1_pB27_A-348	Homo sapiens - GRLF1	A	3051	3733
PLA_RP6_hgx4519v1_pB27_A-347	Homo sapiens - GRLF1	A	3051	3733
PLA_RP6_hgx4519v1_pB27_A-172	Homo sapiens - GRLF1	A	3051	3733
PLA_RP6_hgx4519v1_pB27_A-1	Homo sapiens - GRLF1	A	3204	4044
PLA_RP6_hgx4519v1_pB27_A-223	Homo sapiens - GRLF1	A	3204	3823

## Supplementary Table II:

*ARHGAP35* constructs used in this study. Numbering corresponds to the rat *ARHGAP35* cDNA (GenBank under accession no. M94721), that was used.

Protein name	Vector name	Tag	Start & Stop amino-acids	Observed MW (kDa)
HA-p190A WT	pKH3-p190A WT	HA	1-1513	190
HA-p190AΔPLS	pKH3-p190AΔPLS	HA	1- 379 & 800-1513	135
HA-PLS	pKH3-p190A-PLS WT	HA	380-971	70
GFP-PLS	pEGFPC1-p190A-PLS WT	GFP	380-971	110
GFP-PLS S866F	pEGFPC1-p190A-PLS S866F	GFP	380-971	110
GFP-PLSΔ865-870	pEGFPC1-p190A-PLS Δ865-870	GFP	380-971	110
HA-Nter	pKH3-p190A-Nter	HA	1-533	60
HA-Nter2h	pKH3-p190A-Nter2h	HA	207-418	28
HA-GBD	pKH3-p190A-GBD	HA	1-257	30
HA-2FF	pKH3-p190A-2FF	HA	380-531	23
HA-4FF	pKH3-p190A-4FF	HA	251-533	33
HA-Cter	pKH3-p190A-Cter	HA	1055-1513	55
HA-Cter2h	pKH3-p190A-Cter2h	HA	1069-1231	25
HA-p120BD	pKH3-p190A-p120BD	HA	1055-1180	15
HA-GAP	pKH3-p190A-GAP	HA	1259-1513	33
HA-Cter Y1087F	pKH3-p190A-Cter Y1087F	HA	1055-1513	55
HA-Cter Y1105F	pKH3-p190A-Cter Y1105F	HA	1055-1513	55
HA-Cter Y 1105E	pKH3-p190A-Cter Y1105E	HA	1055-1513	55

## Supplementary Table III:

*ARHGAP35* primers used in this study.

Construct generated	Vector matrix	Forward primer 5' → 3'	Reverse primer 5' → 3'
pKH3-p190A-Cter2h	HA-p190A	CGGGATCCCGAGATCTTTCTTACTTAGACC	GGAATTCAGGGTTTGGGCTTTGGTTTCTTG
pKH3-p190A-Nter2h	HA-p190A	CGGGATCCCGGTACATTAGAGATGCACATACT	GGAATTCAGGTCTCATACTGCTCAGC
pKH3-p190A Cter Y1087F	HA-p190A	GGATTTGATCCTTCTGACTTCGCAGAGCCCATGGATGCTGTGG	CCACAGCATCCATGGGCTCTGCGAAGTCAGAAGGATCAAATCC
pKH3-p190A Cter Y1105E	HA-p190A	GAGGAAGAAAACATAGAGTCAAGTCCCCACGAC	GTCTGGGGCACTGACTCTATGTTTTCTTCCTC
pKH3-p190A Cter Y1105F	HA-p190A	GAGGAAGAAAACATATTCTCAAGTCCCCACGAC	GTCTGGGGCACTGAGAAATATGTTTTCTTCCTC
pEGFP-PLS S866F	GFP-PLS	GCCAAACGTAAGGCCTTCTGGCAATGTTA CGT	ACGTAACATTGCCAAGAAGGCCTTACGTTTGGC
pEGFP-PLS Δ865-870	GFP-PLS	TATTCAGCCAAACGTAAGGTACGTGCTTTCTTTGTGAA	TTCACAAAGAAAGGCACGTACCTTACGTTTGGCTGAATA

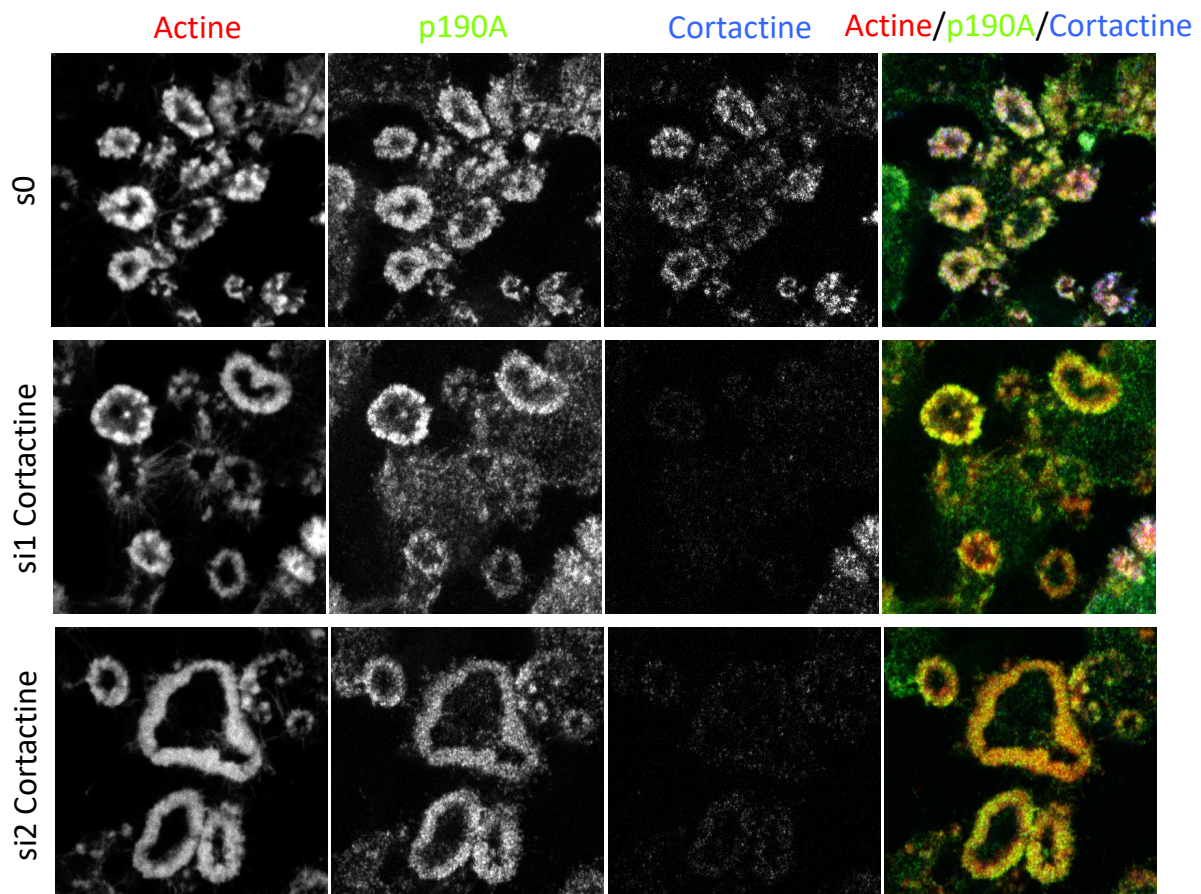
Nous avons ainsi pu démontrer que le domaine PLS régule l'activité GAP de p190A par une analyse biochimique de quantification du ratio d'actine F/actine G présent dans la cellule. Nous avons également mis en évidence que le domaine PLS est nécessaire et suffisant à la localisation de p190A aux invadosomes (de type linéaire et rosettes).

Par des expériences de co-immunoprécipitation (CoIP), nous avons démontré que le domaine PLS interagit fortement avec le domaine Cter de p190A et que la phosphorylation n'était pas impliquée dans cette interaction. L'introduction de mutations dans le PLS (S866F et  $\Delta$ 865-870, retrouvées dans les tumeurs) entraîne une perte de l'interaction entre ces deux domaines. De façon opposée, ces deux mutations induisent une interaction entre le PLS et le domaine Nter, interaction qui est très faible voire absente avec le PLS sauvage.

Ces résultats suggèrent donc un nouveau modèle de régulation de p190A impliquant un changement de conformation entre la protéine p190A WT et la protéine mutée S866F. En effet, p190A WT oscillerait entre deux conformations : une conformation repliée/inactive avec le PLS masquant le domaine Cter et une conformation ouverte/active. Les mutants constitutivement actifs de p190A permettraient la levée du repliement auto-inhibiteur en démasquant le domaine Cter et, dans le même temps, en renforçant l'interaction du PLS avec le domaine Nter de la protéine.

## 2.2. Mécanisme d'adressage de p190A aux invadosomes

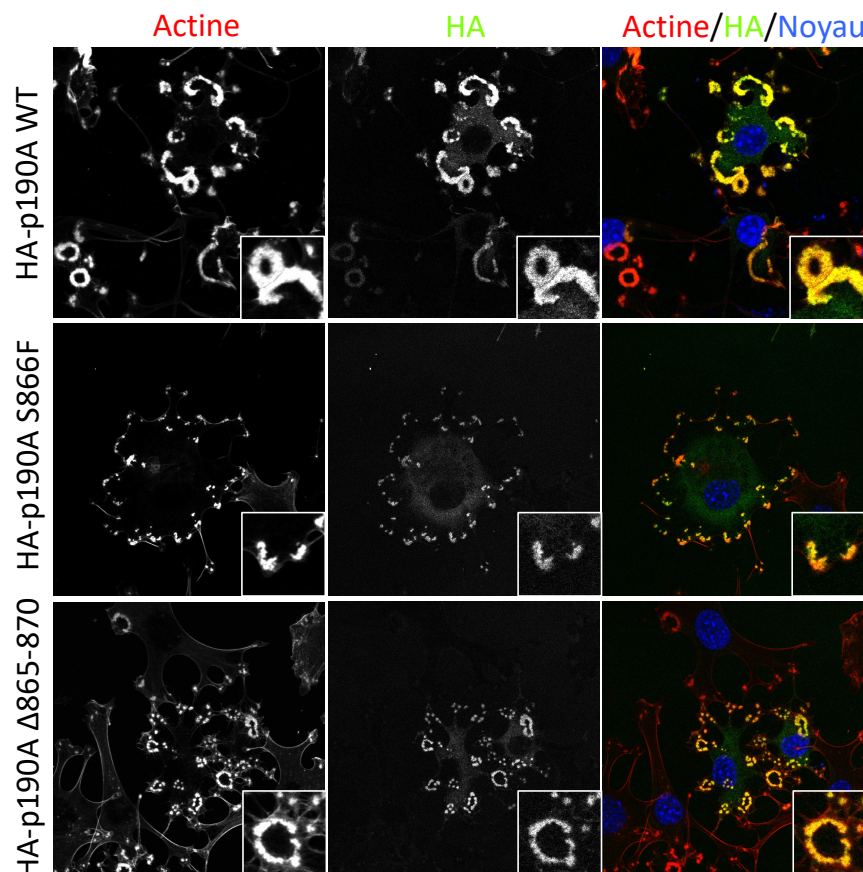
La cortactine, protéine de liaison à l'actine, se localise aux invadosomes et a été identifiée comme étant nécessaire à l'adressage de p190A aux lamellipodes (Binamé et al. 2016 ; Markwell et al. 2019). Le domaine PLS a été identifié comme un domaine essentiel à la localisation de p190A aux lamellipodes et également aux invadosomes. Afin de compléter le mécanisme de régulation de localisation de p190A, nous avons donc étudié l'impact de l'extinction de la cortactine sur la localisation de p190A aux invadosomes par immunofluorescence dans des cellules NIH3T3-vSrc formant des invadosomes de type rosettes. Nous observons que l'extinction de la cortactine par deux ARN interférents (si1Cortactine et si2 Cortactine) n'a pas d'impact sur la localisation de la protéine p190A endogène, en comparaison à la condition contrôle s0 (**Figure 38**).



**Figure 38** : L'extinction de la cortactine n'altère pas la localisation de p190A aux invadosomes.

Marquage par immunofluorescence de p190A (vert) et de la cortactine dans des cellules NIH3T3-vSrc où l'expression de la cortactine a été diminuée. L'actine F a été marquée par la phalloïdine (rouge) et les noyaux ont été marqués avec le Hoescht (bleu).

L'introduction de mutations retrouvées dans les tumeurs S866F et  $\Delta$ 865-870, situées dans le domaine PLS, altère la localisation de p190A aux lamellipodes (Binamé et al. 2016). Pour cette raison, nous nous sommes intéressées à l'impact de ces mutations sur la localisation de la protéine aux invadosomes. Par des immunomarquages réalisés dans des cellules NIH3T3-vSrc formant des invadosomes de type rosettes, nous avons montré que les formes mutées S866F et  $\Delta$ 865-870 n'altèrent pas la localisation de la protéine aux invadosomes (**Figure 39**).



**Figure 39 : Les mutants S866F et  $\Delta$ 865-870 se localisent toujours aux invadosomes.**

Marquage par immunofluorescence de HA-p190A sauvage ou mutées (vert) dans des cellules NIH3T3-vSrc. L'actine F a été marquée par la phalloïdine (rouge) et les noyaux ont été marqués avec le Hoescht (bleu).

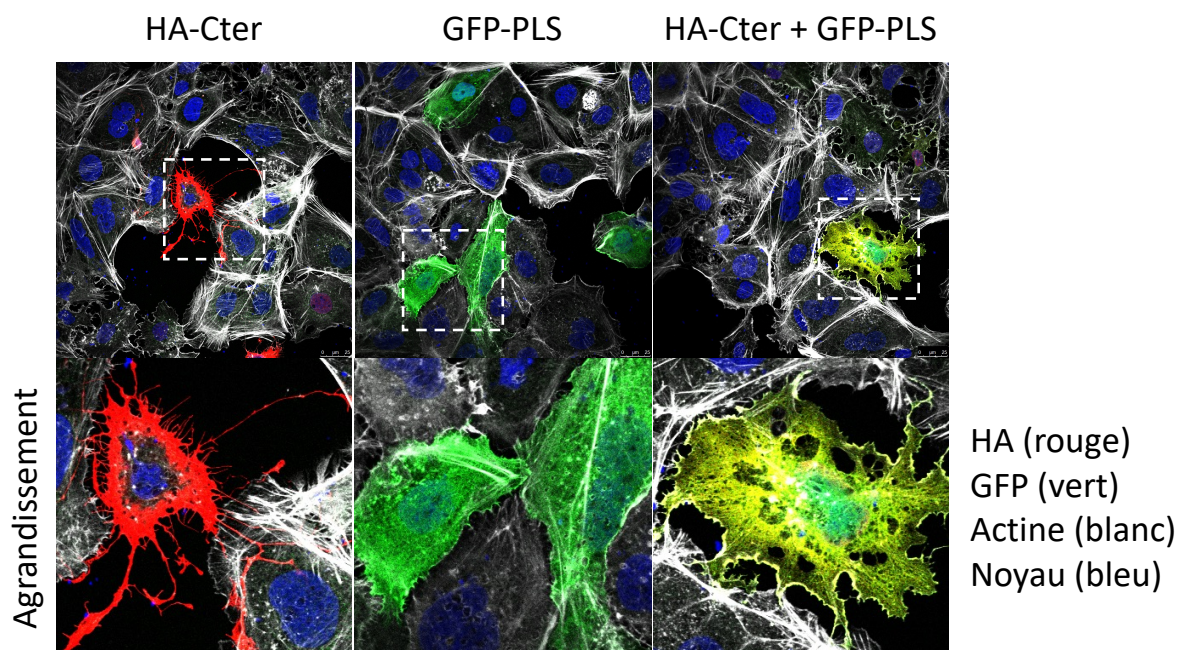
Les résultats indiquent que l'adressage de p190A aux invadosomes implique un mécanisme différent de l'adressage de p190A aux lamellipodes. Toutefois, il serait intéressant d'évaluer l'impact de l'extinction de la cortactine sur la localisation des mutants de p190A.

### 2.3. Le domaine PLS inhibe l'activité GAP *in cellulo*

Des données supplémentaires confirment le modèle proposé dans l'article de régulation de p190A. Étant donné que le domaine PLS est important dans la localisation de p190A aux lamellipodes et aux invadosomes et qu'il inhibe l'activité GAP par un repliement du domaine Cter de p190A, nous avons souhaité analyser l'impact *in vitro* de l'expression de chacun de ces domaines (HA-Cter ou GFP-PLS) et de leur co-expression (HA-Cter + GFP-PLS).

La surexpression de HA-Cter dans des cellules tumorales Huh7 (carcinome hépatocellulaire) entraîne un remodelage important du cytosquelette d'actine avec une perte des fibres de stress et des jonctions cellulaires (**Figure 40**). Ce remodelage est expliqué par une très forte activité GAP, non contrôlée.

La surexpression du GFP-PLS inhibe le phénotype induit par la surexpression de HA-Cter où nous pouvons observer un remodelage moins important du cytosquelette d'actine (**Figure 40**). Il semble donc que la présence du domaine PLS inhibe la suractivité RhoGAP engendrée par le domaine Cter *in cellulo*.



**Figure 40 : Le domaine PLS inhibe l'activité GAP de p190A *in cellulo*.**

Marquage par immunofluorescence de HA-Cter (rouge) +/- GFP-PLS (vert) dans des cellules Huh7. L'actine F a été marquée par la phalloïdine (blanc) et les noyaux ont été marqués avec le Hoescht (bleu).

Cependant, ce résultat nécessite une confirmation ainsi qu'une quantification du remodelage de l'actine. Pour cela, nous prévoyons une approche biochimique de quantification du ratio d'actine F/actine G, identique à celle utilisée dans l'article afin de quantifier le remodelage de l'actine dans des cellules exprimant soit le domaine PLS, soit le domaine Cter, soit les domaines PLS et Cter.

Cette étude pourra également être complétée avec l'expression de formes mutées du PLS, S866F et  $\Delta$ 865-870, car ces mutations altèrent la localisation de p190A aux lamellipodes, augmentent l'activité GAP de p190A et abolissent l'interaction PLS/Cter.

Ces résultats pourraient nous permettre de mieux comprendre les mécanismes de régulation de la localisation, de la fonction et de la conformation de p190A.

L'interaction des domaines PLS et Cter de p190A semble importante pour la régulation de l'activité RhoGAP de p190A. Il est donc nécessaire de préciser le mécanisme de régulation de conformation de p190A.

## 2.4. Recherche de modulateurs de la conformation de p190A

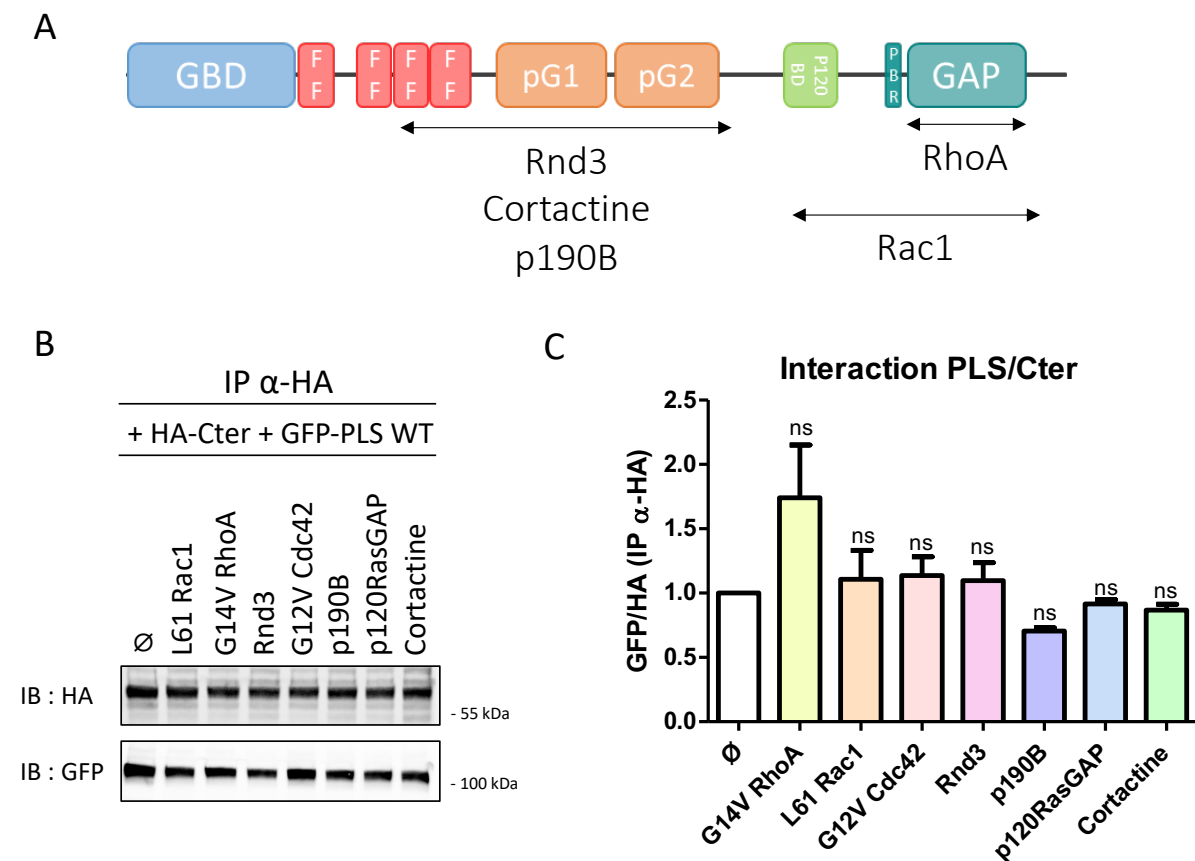
Nous avons démontré que le domaine PLS interagit avec le domaine Cter de p190A et qu'il régule l'accessibilité de RhoA actif au domaine GAP, régulant ainsi l'activité catalytique de la protéine. J'ai donc recherché un signal qui serait capable de réguler cette interaction entre les domaines PLS et Cter de p190A. J'ai tout d'abord essayé d'identifier un partenaire protéique qui serait impliqué dans ce mécanisme de fermeture/ouverture. Pour cela, deux approches ont été initiées : une approche ciblée et une approche globale.

### 2.4.1. Approche ciblée

D'après les données de la littérature, nous avons ciblé des protéines spécifiques interagissant et/ou régulant p190A : (1) les 3 principales RhoGTPases régulant le cytosquelette d'actine : RhoA, Rac1 et Cdc42, (2) la RhoGTPase atypique Rnd3, (3) l'isoforme de p190A : p190B, (4) une autre GAP : p120RasGAP et (5) une protéine de liaison de l'actine : la cortactine (Wennerberg et al. 2003 ; Bradley et al. 2006 ; Binamé et al. 2016 ; Héraud et al.

2019). Deux stratégies ont été réalisées en parallèle afin d'évaluer l'impact de ces protéines cibles sur l'interaction PLS/Cter : une stratégie de surexpression par transfection plasmidique transitoire et une stratégie de diminution d'expression par ARNs interférents (siRNA) (**Figure 41A**).

Les 7 protéines ont été surexprimées et leur impact sur l'interaction PLS/Cter a été quantifié. Pour les GTPases, nous avons décidé de surexprimer les formes constitutivement actives de RhoA, Rac1 et Cdc42 car ce sont ces formes actives, liées au GTP, qui interagissent avec les domaines GAP. Les résultats montrent qu'aucune de ces protéines n'entraîne de variation de l'interaction PLS/Cter (**Figure 41B&41C**).



**Figure 41 : Approche ciblée de recherche de partenaires protéiques pouvant moduler l'interaction PLS/Cter.**

(A) Représentation de la protéine p190A et des domaines d'interaction avec les protéines ciblées.  
 (B) Analyse par Western Blot de l'interaction GFP-PLS/HA-Cter après une IP α-HA dans les cellules surexprimant les différentes protéines cibles. Western Blot représentatif des 3 expériences réalisées.  
 (C) Quantification de l'interaction GFP-PLS/HA-Cter sur 3 expériences indépendantes.  
 Un test statistique ANOVA une voie a été réalisé avec ns : non significatif ( $p > 0,05$ ).



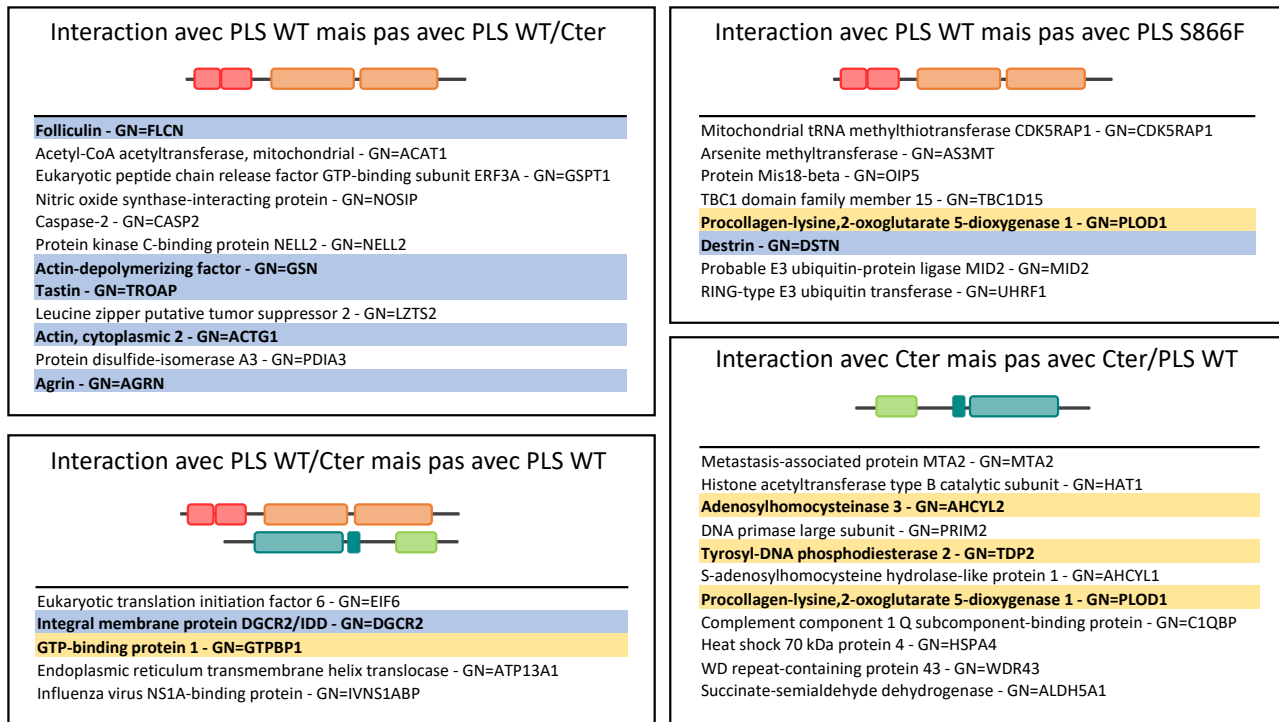
Concernant la stratégie d'extinction des protéines cibles, nous n'avons pas pu conclure car une seule expérience a été réalisée. De plus, l'extinction des protéines cibles étant très faible, il nous faut améliorer les conditions expérimentales. Toutefois les premiers résultats indiquent que l'extinction (partielle) de RhoA, Rac1 ou Cdc42 ne semble pas montrer de modification de cette interaction alors que l'extinction des protéines p190B et cortactine semble avoir un effet en diminuant l'interaction PLS/Cter (données non montrées). Ces résultats restent à être confirmés.

#### 2.4.2. Approche globale

Pour l'approche globale, nous avons effectué une analyse par spectrométrie de masse afin de trouver de potentiels interactants du domaine PLS (WT ou muté S866F) seul, du domaine Cter seul ou bien du complexe PLS/Cter. Pour cela, nous avons réalisé des expériences de CoIP à partir de lysats protéiques provenant des cellules HEK293T exprimant les constructions listées ci-dessus. Plusieurs centaines de protéines ont été identifiées au cours de l'analyse. Pour s'assurer de la robustesse des résultats, nous avons décidé de ne garder que les protéines identifiées dans les 3 réplicats réalisés. Puis, des ratios d'interaction spécifique ont été calculés à partir des abondances brutes afin de sélectionner les protéines d'intérêt (**Figure 42**). Par exemple, dans la recherche d'interactants avec le GFP-PLS WT mais pas avec le complexe GFP-PLS WT/HA-Cter, nous avons défini (1) qu'un ratio supérieur à 2 permet de définir l'interaction spécifique de la protéine X avec GFP-PLS WT (en comparaison avec le contrôle GFP seul) et (2) qu'un ratio inférieur à 0,5 permet de définir une absence d'interaction de la protéine X avec le complexe GFP-PLS WT/HA-Cter (en comparaison avec le contrôle GFP seul).

Étant donné que p190A participe au remodelage du cytosquelette d'actine *via* son activité RhoGAP et que le domaine PLS régule l'activité RhoGAP de p190A, nous avons, dans un premier temps, mis en avant des protéines en lien avec le cytosquelette d'actine et son organisation. La folliculine, qui agit comme une protéine GAP vis-à-vis de Rag et se localise à la membrane du lysosome, et la gelsoline, protéine de fragmentation de l'actine, interagissent avec le PLS WT mais cette interaction n'est pas retrouvée avec le complexe PLS WT/Cter (Lawrence et al. 2019 ; Vemula et al. 2021). La destrine (ADF, Actin Depolymerizing Factor)

interagit avec le PLS WT mais pas avec le PLS S866F. Ces protéines pourraient donc participer à la déstabilisation de l'interaction en bloquant l'interaction PLS WT/Cter. À l'inverse, le récepteur membranaire DGCR2 interagit avec le complexe PLS WT/Cter mais pas avec le PLS WT donc DGCR2 pourrait maintenir l'interaction auto-inhibitrice de p190A.



**Figure 42 : Approche globale de recherche de partenaires protéiques pouvant moduler l'interaction entre les domaines PLS et Cter de p190A.**

Protéines identifiées comme interagissant avec l'un des domaines impliqués dans l'interaction PLS/Cter après une expérience de CoIP suivie d'une analyse par spectrométrie de masse. Les protéines en gras sont les protéines pouvant avoir un intérêt dans la régulation de p190A car elles ont des activités enzymatiques (jaune) ou sont en lien avec le cytosquelette d'actine (bleu).

Nous avons également identifié des protéines qui, par leur activité enzymatique, pourraient moduler la conformation de p190A en agissant sur ses liaisons covalentes. La protéine de liaison au GTP, GTPBP1, interagit avec le complexe PLS WT/Cter et pas avec le PLS WT, elle pourrait favoriser la conformation repliée de p190A. D'autres enzymes à activité hydrolase comme AHCYL2, que nous avons identifiée dans l'interactome de p190A, (interaction avec le domaine Cter et pas avec le complexe Cter/PLS WT) ou oxydase comme PLOD1 (interaction avec le domaine Cter, interaction avec le domaine PLS WT et pas d'interaction avec le complexe Cter/PLS WT) pourraient bloquer l'interaction.

Ces différentes protéines sont des pistes intéressantes de modulateur de l'interaction PLS/Cter de p190A qui devront être testées.

## 3. Régulation intermoléculaire

### 3.1. Interaction entre les protéines p190A et p190B

Dans les résultats du criblage double hybride, un domaine dans la région C-terminale de p190B a été identifié (Cter2h\_B) suggérant une interaction entre p190A et p190B (**Tableau 4**).

Pour étudier cette interaction, nous avons cloné, dans un vecteur pKH3, permettant une expression dans les cellules de mammifères sous la forme d'une protéine étiquetée HA, la région Cter de p190B identifiée lors du criblage double hybride (aa 1151-1272). Nous avons également cloné un domaine de p190B (aa 378-969) équivalent au domaine PLS de p190A (**Figure 43A**).

#### 3.1.1. Interaction du PLS de p190A et du Cter de p190B

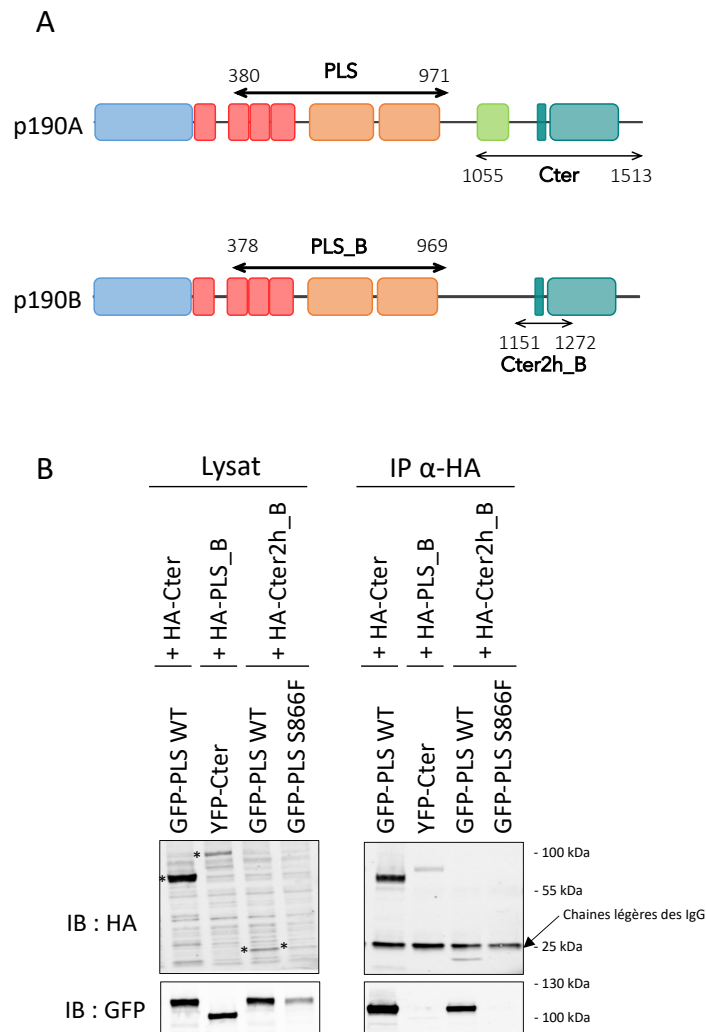
Dans un premier temps, nous avons souhaité confirmer les résultats du criblage double hybride. Pour cela, nous avons surexprimé le domaine Cter2h\_B (HA-Cter2h\_B) et observé son interaction avec le PLS de p190A (GFP-PLS WT ou S866F).

Nous notons que le domaine Cter2h\_B interagit de manière forte avec le PLS de p190A sous sa forme WT (**Figure 43B**). Ces résultats confirment les résultats du criblage double hybride et démontrent l'interaction entre p190A et p190B.

Lorsque la mutation S866F est introduite dans le domaine PLS de p190A, l'interaction avec le domaine Cter2h\_B est perdue (**Figure 43B**). Ceci suggère que le PLS de p190A pourrait avoir un rôle dans la régulation de p190B.

Le domaine PLS de p190A interagit avec le domaine Cter2h de p190B et les protéines p190RhoGAPs présentent un degré d'homologie important (**Annexe 3**). Pour compléter les résultats de l'interaction p190A/p190B, deux hypothèses ont été émises concernant l'interaction p190A/p190B : (1) soit l'interaction entre les domaines PLS et Cter des deux protéines serait bilatérale (PLS de p190A avec Cter de p190B et vice-versa : PLS de p190B avec

Cter de p190A), (2) soit l'interaction identifiée entre p190A/p190B est unilatérale et implique les domaines PLS de p190A et Cter de p190B.



**Figure 43 : Le domaine PLS de p190A interagit avec le domaine Cter2h de p190B.**

(A) Représentation schématique des protéines p190A de p190B ainsi que des domaines utilisés dans les CoIP ci-dessous.

(B) Expériences de CoIP entre le domaine PLS de p190B (HA-PLS\_B) et le domaine Cter de p190A (YFP-Cter) ou entre le domaine Cter2h de p190B (HA-Cter\_2h) et le domaine PLS de p190A (GFP-PLS WT ou S866F). La 1<sup>ère</sup> colonne montrant l'interaction les protéines GFP-PLS et HA-Cter sert de contrôle positif.

### 3.1.2. Interaction du PLS de p190B et du Cter de p190A

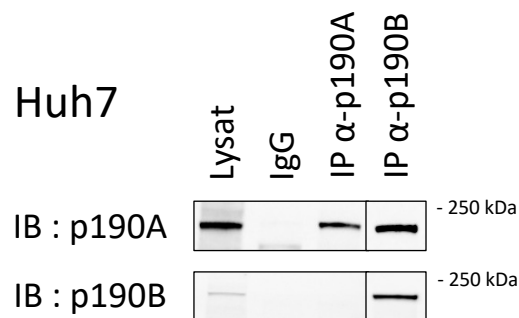
Pour évaluer la première hypothèse, nous avons analysé si le domaine PLS de p190B interagit avec le domaine Cter de p190A. Pour cela, nous avons surexprimé le domaine Cter de p190A (YFP-Cter) et observé son interaction avec le PLS de p190B (HA-PLS\_B).

Les résultats de CoIP montrent que le domaine PLS de p190B n'interagit pas avec le Cter de p190A (**Figure 43B**). Ceci valide donc la seconde hypothèse selon laquelle l'interaction entre les domaines PLS de p190A et Cter de p190B interagissent de façon unilatérale.

### 3.1.3. Interaction de p190A et p190B endogènes

Nous venons de montrer que certains domaines des protéines p190A et p190B interagissent suggérant une interaction intermoléculaire p190A/p190B que nous avons analysé. Pour cela, nous avons voulu vérifier si les protéines p190A et p190B endogènes interagissaient. Les expériences ont été réalisées dans la lignée de cellules Huh7 car les deux protéines sont fortement exprimées dans cette lignée. En parallèle, nous avons réalisé une immunoprécipitation de p190A et une immunoprécipitation de p190B.

De manière intéressante, p190A est co-immunoprécipitée avec p190B. Cependant, p190B n'est pas visible dans l'immunoprécipitat de p190A. Ceci peut s'expliquer par une plus faible abondance de p190B dans le lysat protéique ou d'une mauvaise détection par les anticorps. Ainsi, même si ce résultat reste à confirmer par de nouvelles expériences de CoIP, l'expérience suggère une interaction intermoléculaire p190A/p190B (**Figure 44**).



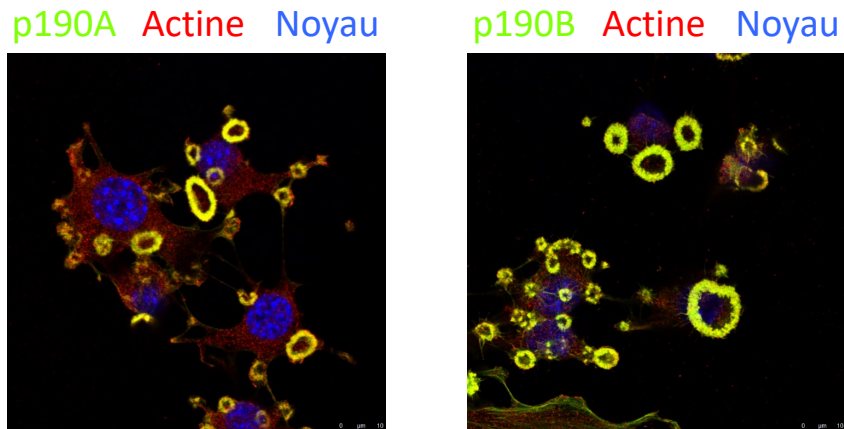
**Figure 44 : Les protéines endogènes p190A et p190B interagissent.**

Expérience de CoIP des formes endogènes de p190A et p190B dans la lignée Huh7. IgG sert de contrôle interne.

Ces résultats confirment les données issues du criblage double hybride et démontrent une interaction intermoléculaire entre les protéines p190A et p190B.

### 3.1.4. Localisation de p190A et p190B aux rosettes

Nous avons voulu observer par immunofluorescence si les protéines p190A et p190B se localisent au même endroit dans la cellule. Des données préliminaires montrent que chacune des protéines se localise au niveau des invadosomes de type rosette (**Figure 45**).



**Figure 45 : Les protéines endogènes p190A et p190B se localisent aux rosettes.**

Marquage par immunofluorescence des formes endogènes de p190A (image de gauche) et p190B (image de droite) en vert dans des cellules NIH3T3-vSrc. L'actine F a été marquée par la phalloïdine (rouge) et les noyaux ont été marqués avec le Hoescht (bleu).

Cependant, nous ne pouvons pas conclure sur une colocalisation de ces protéines. Pour cela, des marquages sont en cours avec des anticorps compatibles qui permettraient d'étudier une colocalisation de p190A et p190B. Pour compléter, une expérience de Proximity Ligation Assay (PLA) nous permettra d'analyser cette l'interaction *in cellulo*.

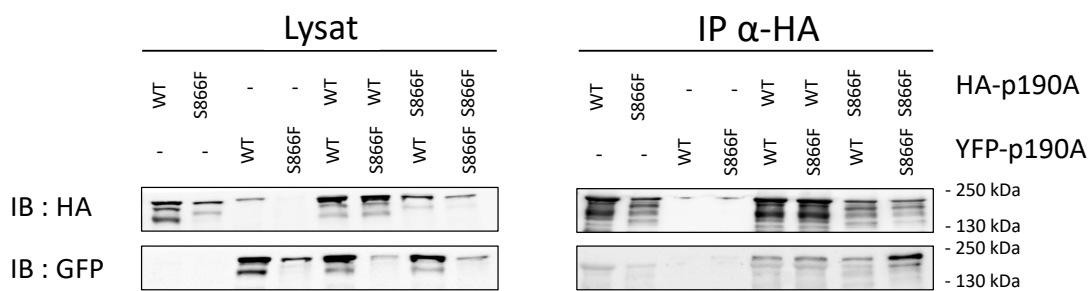
A ce stade, nous avons mis en évidence une interaction entre p190A et p190B impliquant le domaine PLS de p190A et le domaine Cter de p190B. Au-delà de potentiels hétérodimères p190A/p190B, nous avons également testé si p190A pouvait interagir avec lui-même *via* une interaction intermoléculaire.

## 3.2. Interaction entre deux protéines p190A

### 3.2.1. Interaction p190A/p190A

Pour étudier l'interaction intermoléculaire de p190A, nous avons généré des constructions afin d'exprimer une protéine p190A (sauvage ou mutée S866F) fusionnée à la YFP (yellow fluorescent protein). Nous avons ensuite réalisé des expériences de CoIP afin d'observer l'interaction d'une protéine p190A sauvage ou mutée S866F avec une autre protéine p190A.

Les résultats montrent une faible interaction entre deux protéines p190A sauvages ou entre une protéine sauvage et une protéine mutée S866F. Cependant, une très forte interaction est retrouvée entre deux protéines p190A S866F (**Figure 46**).



**Figure 46** : L'interaction intermoléculaire de p190A est renforcée par l'introduction de la mutation S866F.

Expérience de CoIP des formes entières de p190A WT ou mutée S866F (fusionnée à la YFP ou avec une étiquette HA). IP α-HA de HA-p190A (WT ou S866F) et analyse par Western Blot de son interaction avec YFP-p190A (WT ou S866F).

De plus, pour confirmer cette interaction, nous avons utilisé la technique de BRET (bioluminescence resonance energy transfer) en collaboration avec l'équipe du Dr. Yann Percherancier, directeur de recherche à l'IMS de Bordeaux.

Le principe de cette technique *in cellulo* est l'évaluation d'une interaction physique étroite (inférieure à 100 Å) entre deux protéines par transfert d'énergie entre la luciférase et la YFP. L'émission de luminescence émise lorsque ces deux protéines sont proches sert de mesure de quantification de l'interaction entre les deux protéines (**Figure 47A**). Deux constructions plasmidiques sont nécessaires afin d'exprimer une protéine fusionnée à la luciférase, donneuse d'énergie et une protéine fusionnée à la YFP, receveuse d'énergie. La

fusion se fait en N-terminal et en C-terminal de la séquence d'intérêt pour disposer de toutes les configurations à tester car le niveau d'expression et le signal de BRET peuvent varier selon les constructions.

Pour cela, nous avons dû générer de nouvelles constructions plasmidiques afin d'exprimer les protéines fusionnées à la luciférase ou à la YFP. La liste des plasmides générés ainsi que les amorces utilisées pour les clonages sont présentées en **annexe 5**. Les expériences de BRET se sont déroulées en plusieurs étapes.

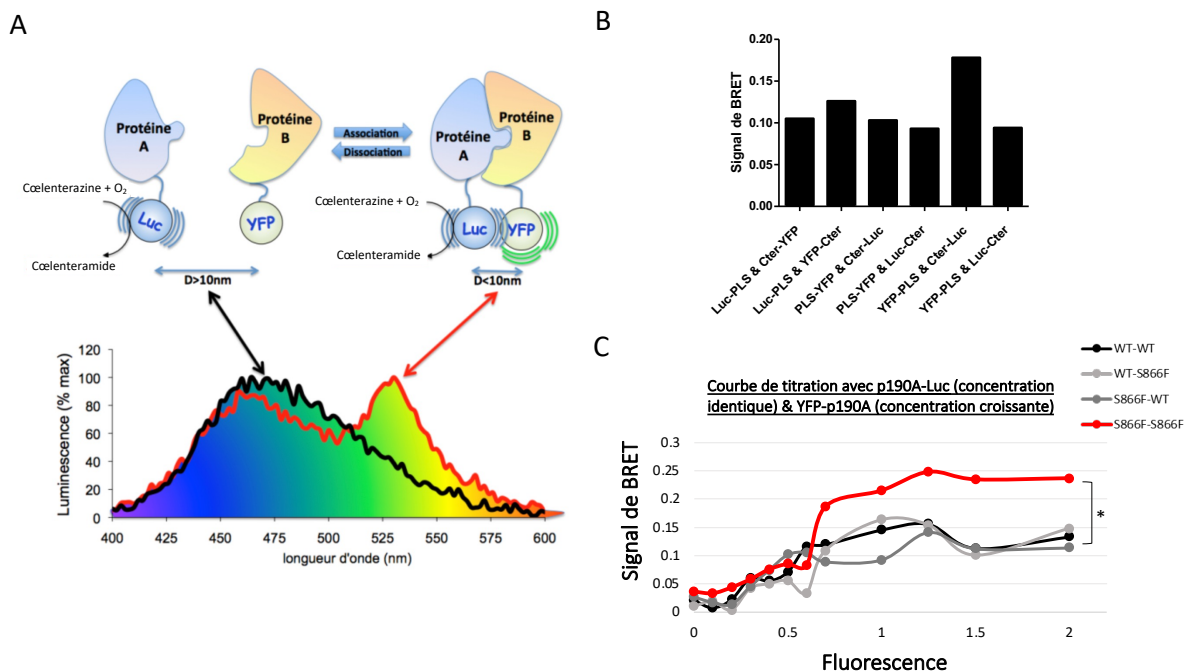
Tout d'abord, pour avoir un contrôle expérimental, nous avons utilisé les constructions correspondant aux domaines PLS et Cter de p190A, qui interagissent fortement en CoIP. Ces plasmides ont été transfectés dans des cellules HEK293T. Après 24h de transfection et un traitement à la coelenterazine h (substrat de la luciférase), les mesures de BRET, c'est-à-dire de fluorescence (530 nm) et de luminescence (480 nm) sont faites à l'aide d'un lecteur de plaque. Pour la plupart des couples Luciférase/YFP testés, la mesure relative de BRET était supérieure ou égale à 0,1 qui est la valeur seuil permettant de dire qu'il y a interaction (**Figure 47B**). Cette expérience nous a servi de preuve de concept en confirmant les résultats observés d'interaction intramoléculaire de p190A (partie 1, sous-partie 2.1).

Nous avons, dans un deuxième temps, étudié l'interaction intermoléculaire de p190A en combinant deux plasmides permettant l'expression de deux protéines p190A (sauvage ou mutée S866F).

Les premiers résultats ont montré, comme pour l'interaction PLS/Cter que la majorité des couples luciférase/YFP avaient un signal de BRET supérieur ou égal à 0,1 suggérant une interaction entre deux protéines entières p190A/p190A (données non montrées). Cela a été confirmé par la réalisation d'une courbe de titration.

Le principe est de transfecter une quantité égale du plasmide luciférase (ici, p190A-Luc) et une quantité croissante du plasmide YFP (ici, YFP-p190A) afin d'arriver à saturation. Les résultats sont présentés sous la forme d'un graphique et montrent qu'il existe une interaction entre deux protéines WT et aussi entre une protéine WT et une protéine mutée S866F. En revanche, le signal de BRET est significativement plus important lorsque deux protéines S866F sont exprimées (**Figure 47C**). Ceci suggère donc une interaction intermoléculaire de p190A renforcée lorsque la protéine présente la mutation S866F.





**Figure 47 : Interaction intermoléculaire renforcée par l'introduction de la mutation S866F.**

(A) Schéma d'explication de la technique de BRET nécessitant une protéine A fusionnée à la luciférase et une protéine B fusionnée à la YFP. Une proximité de moins de  $100\text{\AA}$  entraîne un signal de luminescence quantifiable. D'après le site [www.ims-bordeaux.fr/](http://www.ims-bordeaux.fr/).

(B) Preuve de concept du BRET avec les constructions PLS et Cter. Graphique représentant le signal calculé de BRET démontrant une interaction entre PLS et Cter.

(C) Courbe de titration suivant l'interaction de deux protéines p190A WT (noir), d'une protéine WT et une protéine mutée (gris clair et gris foncé) et de deux protéines mutées (rouge). Un test statistique ANOVA une voie a été réalisé avec \* :  $p < 0,05$ .

La technique de BRET permet facilement de suivre l'interaction de deux protéines et de moduler cette interaction. Nous avons utilisé différents réactifs, notamment des inhibiteurs de ROCK (Y-27632) ou de la myosine II (blebbistatine), un inhibiteur de la dépolymérisation de l'actine (jasplakinolide) et des inhibiteurs de la kinase Src (PP2, dasatinib) afin de moduler l'interaction. Les résultats obtenus ne nous ont malheureusement pas permis de conclure sur cette expérience.

En conclusion, nous avons mis en évidence l'interaction intermoléculaire de deux protéines p190A sauvages. La présence de la mutation S866F, dans le domaine PLS, augmente très fortement cette interaction intermoléculaire.

Nous avons ensuite voulu déterminer les domaines de p190A impliqués dans cette interaction intermoléculaire de p190A. Pour répondre à cette question, nous avons testé l'implication des domaines PLS, Nter et Cter par de nouvelles expériences de CoIP.

### 3.2.2. Implication du domaine PLS dans l'interaction p190A/p190A

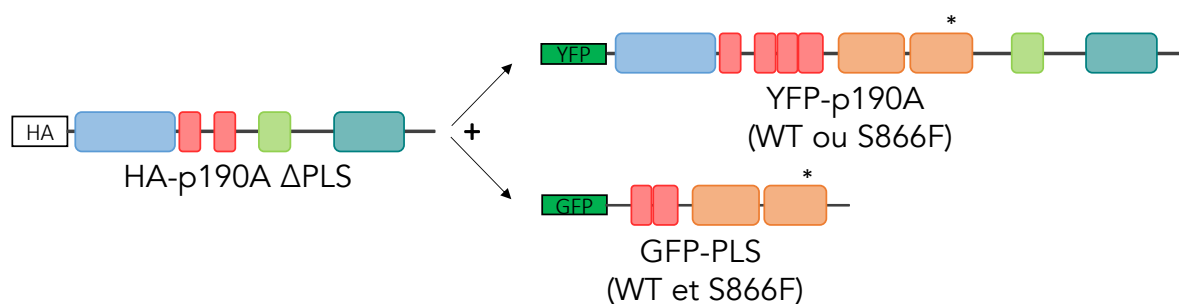
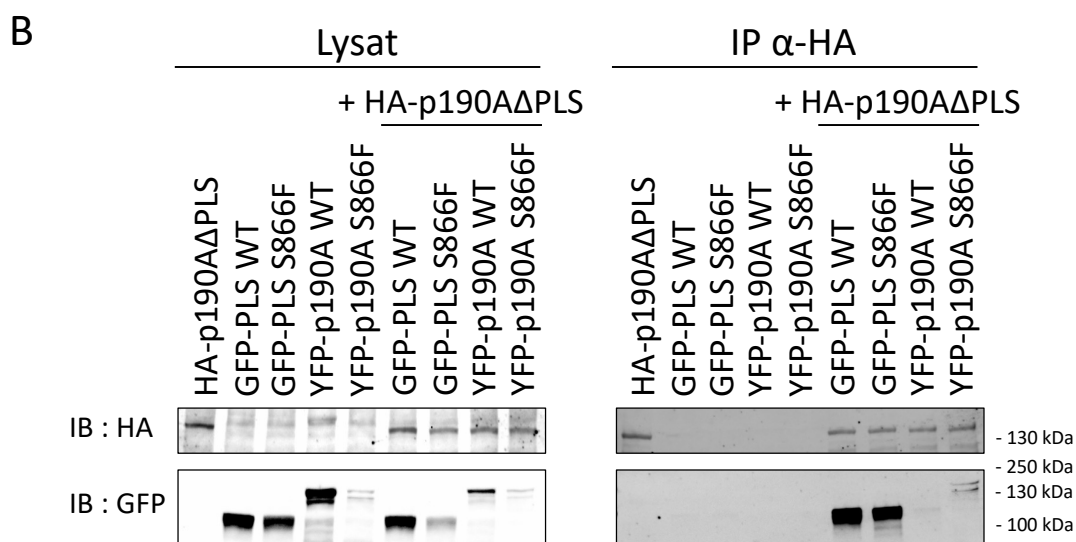
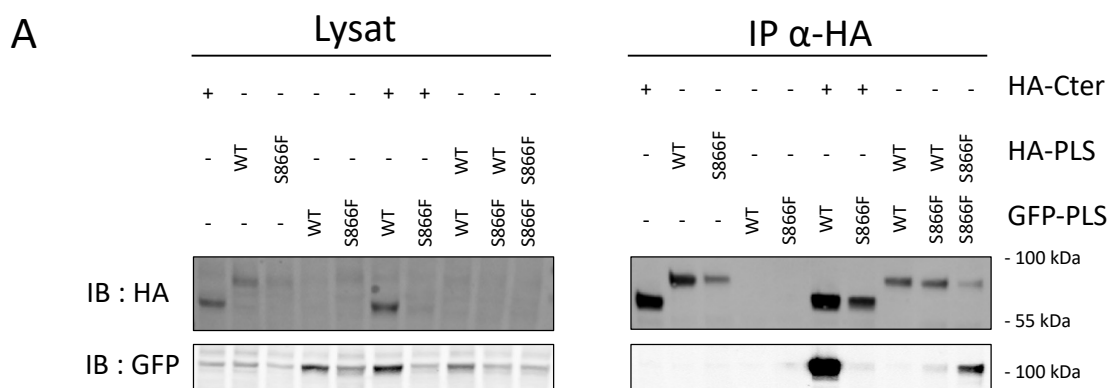
Le PLS est impliqué dans l'interaction avec le domaine Cter de 190A donc nous avons recherché si le domaine PLS était important également à l'interaction intermoléculaire de p190A. Pour cela, nous avons étudié (1) l'interaction de deux domaines PLS isolés et (2) l'interaction de la protéine p190A dépourvue de domaine PLS (p190A  $\Delta$ PLS) avec la protéine p190A entière.

Dans un premier temps, nous avons analysé l'interaction de deux domaines PLS isolés (sauvage ou muté S866F). Les résultats démontrent que deux PLS sauvages n'interagissent pas ensemble, un PLS WT et un PLS S866F interagissent très faiblement tandis que deux PLS mutés S866F interagissent de manière très forte (**Figure 48A**). Les domaines PLS seraient impliqués dans l'interaction intermoléculaire p190A/p190A.

Dans un second temps, dans le but de compléter l'analyse de l'implication du domaine PLS dans l'interaction intermoléculaire de p190A, des expériences de CoIP ont été effectuées avec la protéine HA-p190A  $\Delta$ PLS (**Figure 48B**).

La protéine p190A  $\Delta$ PLS n'interagit pas avec p190A WT mais semble interagir avec p190A S866F. Ceci confirme la forte interaction intermoléculaire p190A/p190A identifiée avec des protéines p190A mutées S866F.

De plus, la protéine p190A  $\Delta$ PLS interagit très fortement avec le PLS sauvage et le PLS muté S866F. Ceci indique que l'interaction intermoléculaire ne se fait pas uniquement *via* le domaine PLS mais pourrait impliquer le domaine Nter car le PLS muté S866F n'interagit pas avec le domaine Cter de p190A.



**Figure 48 : L'interaction intermoléculaire de p190A est possible via l'interaction des domaines PLS.**

(A) Expérience de CoIP des domaines PLS WT ou muté S866F (fusionné à la GFP ou avec une étiquette HA). IP  $\alpha$ -HA de HA-PLS (WT ou S866F) et analyse par Western Blot de son interaction avec GFP-PLS (WT ou S866F).

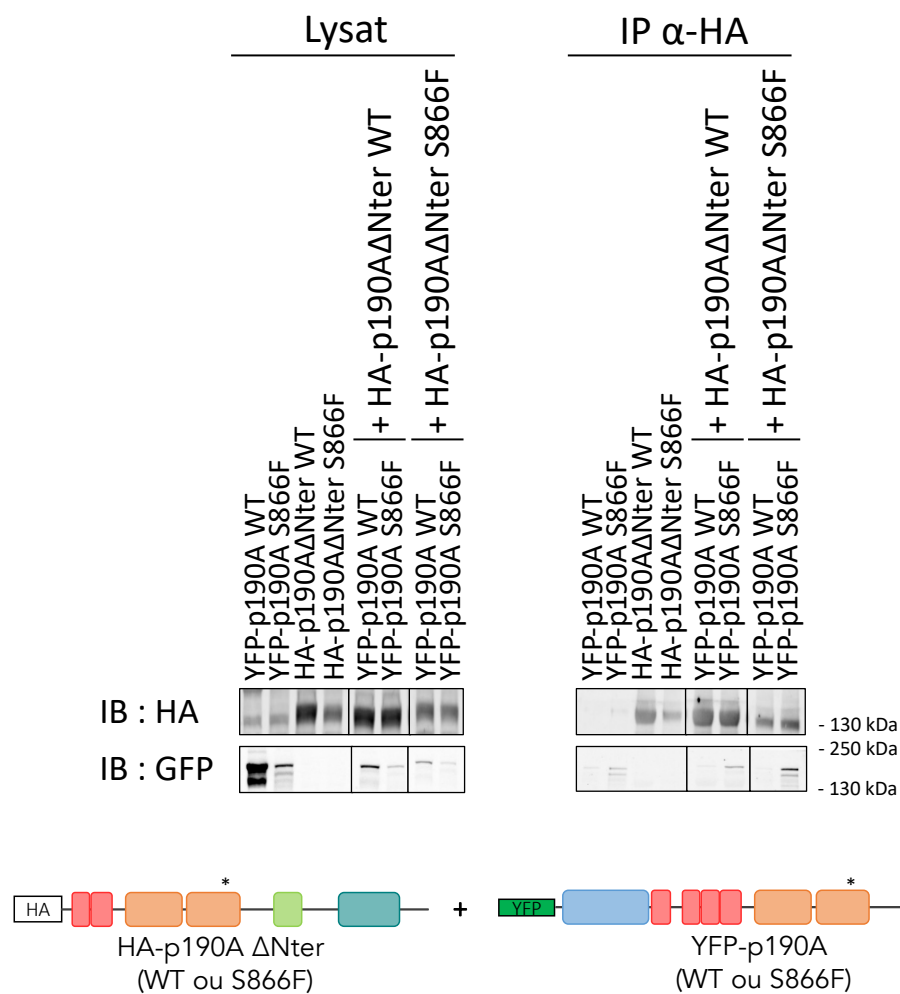
(B) Expérience de CoIP avec une IP  $\alpha$ -HA de HA-p190A  $\Delta$ PLS et analyse par Western Blot de son interaction avec YFP-p190A (WT ou S866F) ou GFP-PLS (WT ou S866F).

### 3.2.3. Implication du domaine Nter dans l'interaction p190A/p190A

Nous avons ensuite analysé l'implication du domaine Nter de p190A dans l'interaction intermoléculaire. Pour cela, nous avons généré d'une part, une construction permettant l'expression de la protéine p190A dépourvue de son domaine Nter (p190A  $\Delta$ Nter) et d'autre part une construction permettant l'expression de la protéine p190A sans domaine Nter mais avec un domaine PLS muté S866F (p190A  $\Delta$ Nter S866F). Une expérience de CoIP a été réalisée afin d'évaluer l'interaction de p190A  $\Delta$ Nter (sauvage ou mutée S866F) avec la protéine p190A sauvage ou mutée S866F.

D'après les résultats de CoIP présentés sur la **figure 49**, la protéine p190A  $\Delta$ Nter sauvage n'interagit pas avec la protéine p190A sauvage et très faiblement avec la protéine p190A mutée S866F. La protéine p190A sans domaine Nter semble se comporter de la même manière que la protéine p190A ce qui suggère que le domaine Nter ne serait pas impliqué dans l'interaction intermoléculaire. Ce résultat semble confirmé lorsque la protéine p190A  $\Delta$ Nter S866F est utilisée pour la CoIP. Cette protéine n'interagit pas avec la protéine p190A sauvage mais interagit fortement avec la protéine p190A mutée S866F (**Figure 49**).

Ces résultats suggèrent que la protéine p190A  $\Delta$ Nter agit de façon similaire à la protéine p190A entière et que le domaine Nter n'est pas impliqué dans l'interaction intermoléculaire de p190A.



**Figure 49 : Analyse de l'implication du domaine Nter dans l'interaction intermoléculaire.**

Expérience de CoIP avec une IP  $\alpha$ -HA de HA-p190A  $\Delta$ Nter (WT ou mutée S866F) et analyse par Western Blot de son interaction avec YFP-p190A (WT ou mutée S866F).

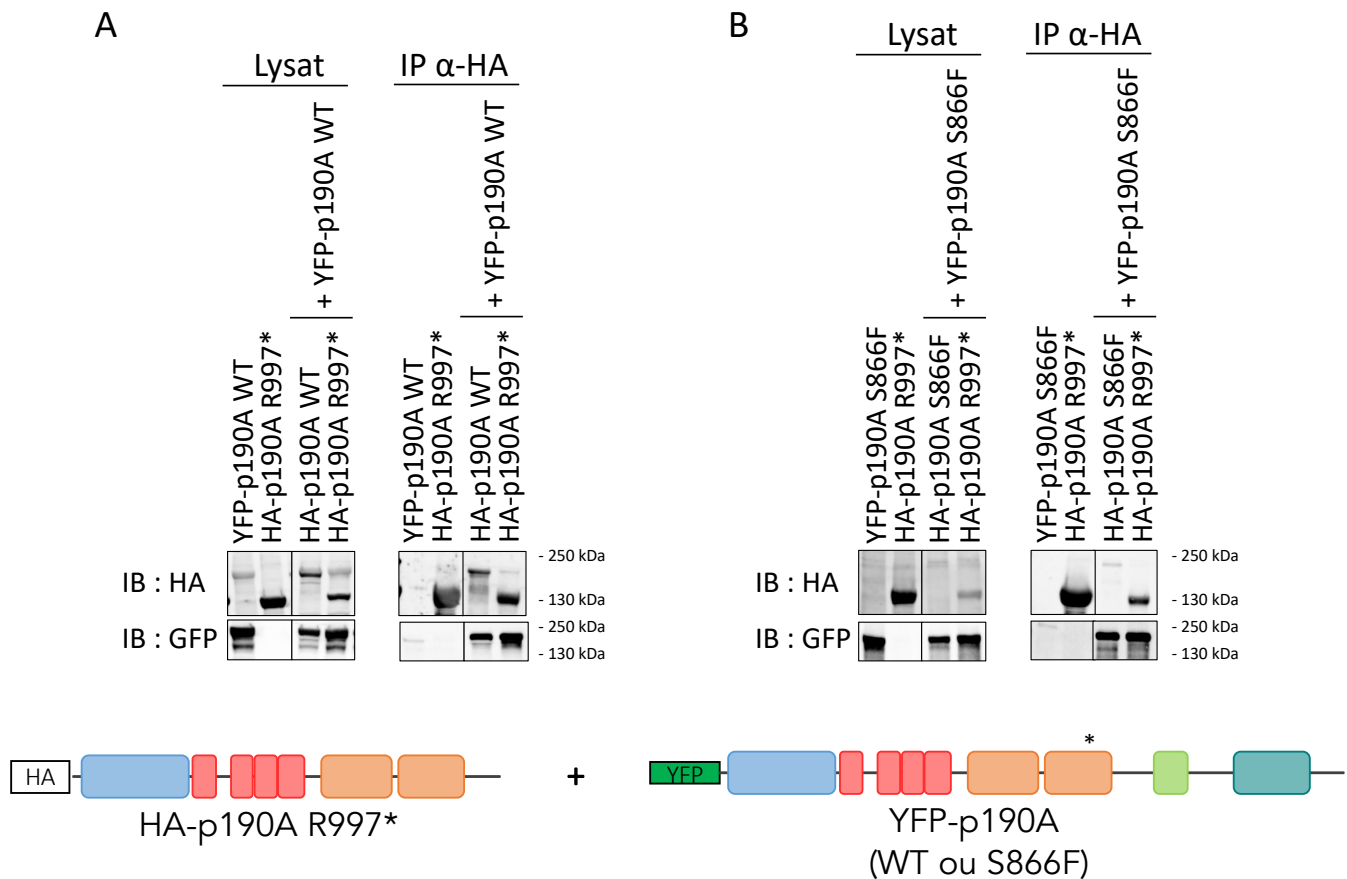
### 3.2.4. Implication du domaine Cter dans l'interaction p190A/p190A

Enfin, nous avons analysé l'implication du domaine Cter dans l'interaction intermoléculaire. Pour cela, nous avons utilisé un mutant p190A R997\* qui entraîne la délétion du domaine Cter (et donc du domaine GAP). Une expérience de CoIP a été réalisée afin d'évaluer l'interaction de p190A R997\* avec la protéine p190A sauvage ou p190A mutée S866F.

Les résultats montrent que la protéine p190A sauvage interagit avec une autre protéine p190A sauvage (comme observé **Figure 46**). De la même manière, deux protéines p190A présentant la mutation S866F sont capables d'interagir. Ces interactions sont

également retrouvées entre la protéine p190A R997\* sans domaine Cter et la protéine p190A sauvage ou mutée S866F (**Figure 50A&50B**).

Il semble que le domaine Cter ne soit pas impliqué dans l'interaction intermoléculaire de p190A.



**Figure 50 : Analyse de l'implication du domaine Cter dans l'interaction intermoléculaire.**

(A) Expérience de CoIP avec une IP α-HA de HA-p190A WT ou du mutant R997\* et analyse par Western Blot de son interaction avec YFP-p190A WT.

(B) Expérience de CoIP avec une IP α-HA de HA-p190A S866F ou du mutant R997\* et analyse par Western Blot de son interaction avec YFP-p190A S866F.

### 3.3. Conclusion sur les changements de conformation des protéines p190RhoGAPs

Dans cette partie, nos résultats sont en faveur d'un changement de conformation de la protéine p190A par une double régulation intramoléculaire et intermoléculaire (**Tableau 5**).

La protéine p190A sauvage présenterait ainsi une interaction intramoléculaire entre les domaines PLS et Cter et dans une plus faible mesure, une interaction intramoléculaire entre les domaines PLS et Nter. Ceci suggère qu'une conformation en double repliement des domaines Nter et Cter sur le PLS n'est pas à exclure. Une interaction intermoléculaire entre deux protéines p190RhoGAPs a également été détectée. Cette interaction intermoléculaire semble être présente entre deux protéines p190A, mais également entre une protéine p190A et une protéine p190B.

	p190A WT	p190A S866F
Localisation aux lamellipodes*	+++	-
Localisation aux invadosomes	+++	+++
Activité GAP*	+	+++
Interaction PLS/Cter	+++	-
Interaction PLS/Nter	+	+++
Interaction PLS/PLS	+	+++
Interaction p190A/p190A	+	+++
Interaction p190A/p190B	+++	Non testé

**Tableau 5 : Bilan des données concernant la régulation de p190RhoGAPs.**

Bilan des différentes données issues des résultats précédents du laboratoire (\*) et des principaux résultats acquis au cours de ma thèse amenant à un modèle de changement de conformation entre la protéine p190A WT et la protéine p190A mutée S866F.

L'introduction d'une simple mutation au niveau de la sérine 866 dans le PLS de p190A suffit à modifier ces interactions. En effet, la mutation S866F augmente l'interaction intramoléculaire entre le PLS et le domaine Nter de la protéine et abolit le repliement du PLS sur le domaine Cter. Plus encore, cette mutation semble permettre une interaction intermoléculaire plus forte entre deux protéines p190A. Dans cette conformation combinant interactions intra et intermoléculaires, le mutant p190A S866F resterait dans une configuration ouverte ce qui rendrait accessible plus facilement le domaine GAP pour fixer et réguler RhoA.

## 4. Étude de nouveaux partenaires de p190A

Pour compléter l'étude des mécanismes de régulation de p190A, nous avons recherché de nouveaux partenaires protéiques potentiels de p190A. Pour cela, nous avons réalisé une immunoprécipitation de HA-p190A WT et HA-p190A S866F (à partir de lysats protéiques de cellules HEK293T transfectées) suivie d'une analyse en spectrométrie de masse (**Figure 51A**).

Plus de 700 protéines interagissant avec p190A ont été trouvées. Parmi ces protéines, environ 20 interagissent exclusivement avec la forme sauvage de p190A tandis qu'une quinzaine interagit spécifiquement avec la forme mutée S866F. Nous pouvons noter que près de 650 protéines identifiées interagissent majoritairement avec p190A S866F (**Figure 51B**).

De nombreuses protéines identifiées sont en lien avec la dégradation par le protéasome, la traduction ou la régulation de la division cellulaire, ce qui est cohérent avec ce que nous avons déjà observé dans le criblage double hybride et cohérent avec les données de la littérature (**Annexe 1**).

### 4.1. Le protéasome

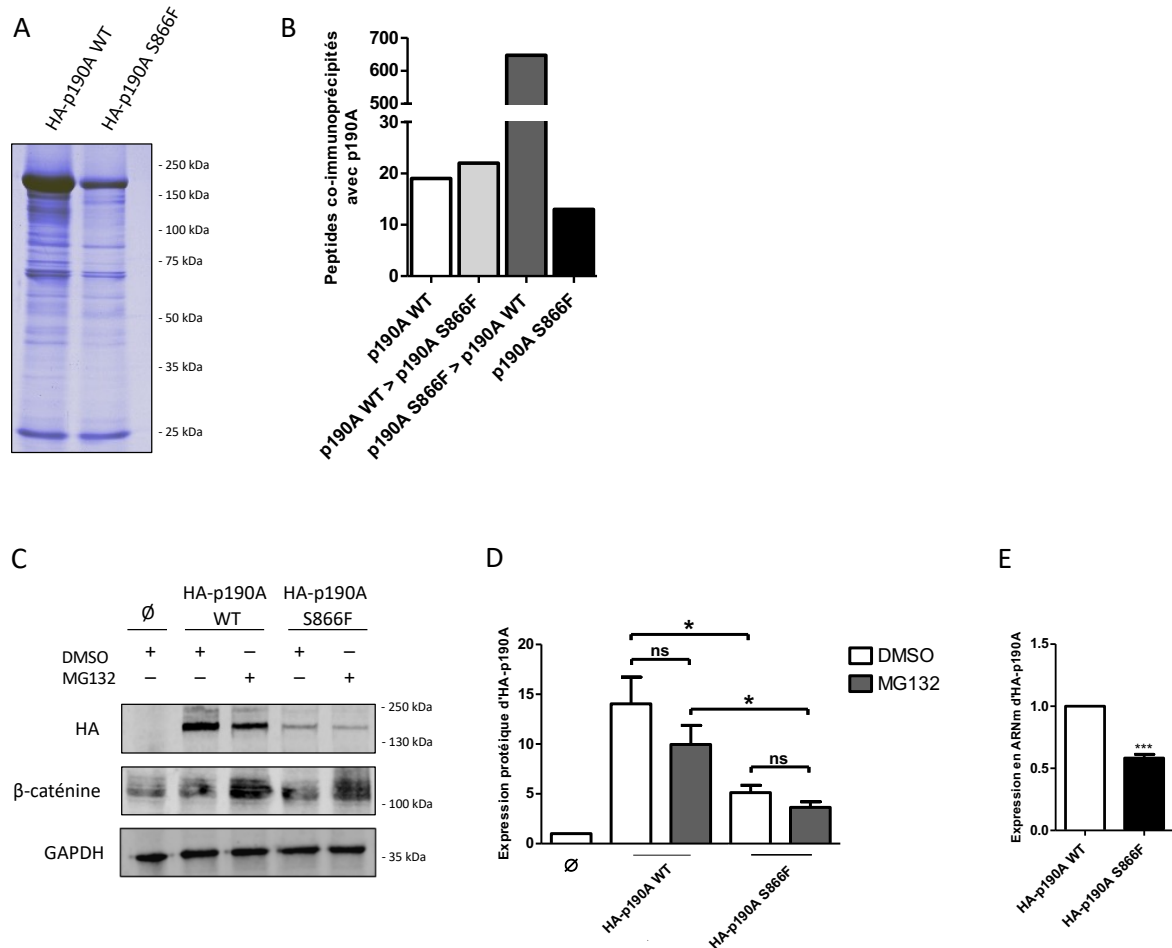
Des études ont montré une régulation de l'expression de p190A, notamment au moment de la mitose, impliquant une dégradation de la protéine par le protéasome (Su, Agati, and Parsons 2003 ; Naoe et al. 2010). De manière intéressante, parmi les protéines identifiées dans cette analyse d'interactome, douze membres du complexe enzymatique du protéasome interagissent préférentiellement avec p190A S866F (**Annexe 1**).

Le protéasome est un complexe multi-protéique faisant partie du système UPS (ubiquitin-proteasome system) contrôlant la protéolyse dans les cellules eucaryotes (Karatas and Bouche-careilh 2020). Ce système permet la reconnaissance et la poly-ubiquitination de substrats par des ubiquitine ligases. Ensuite, l'élimination des chaînes poly-ubiquitinylées grâce aux enzymes DUB (deubiquitinating enzymes) est associée à la dégradation par le protéasome.

Dans la plupart de nos expériences, nous avons souvent observé une différence d'expression de p190A mutée S866F par rapport à p190A sauvage (**Figure 51C&51D**). Ces



résultats suggèrent une possible dégradation protéique plus importante de p190A mutée dans les cellules. Nous avons donc analysé si le protéasome est impliqué dans la différence d'expression de p190A WT et mutée.



**Figure 51 : L'interactome de p190A (WT et S866F) montre l'enrichissement de deux complexes pouvant réguler l'expression de p190A dans les cellules.**

(A) Coloration au bleu colloïdal du produit de migration des immunoprécipitats de HA-p190A WT et HA-p190A S866F.

(B) Quantification des peptides interagissant exclusivement ou préférentiellement avec l'une des deux formes de p190A.

(C) Traitement des cellules avec 50  $\mu$ M de MG132 (inhibiteur du protéasome) pendant 4 heures avant extraction protéique et analyse par Western Blot. Le marquage de la  $\beta$ -caténine sert de contrôle positif du traitement au MG132 tandis que la GAPDH est le contrôle de charge.

(D) Quantification du Western Blot en (C).

(E) Expression en ARNm par qRT-PCR de HA-p190A WT et HA-p190A S866F.

Un test statistique ANOVA une voie a été réalisé avec \*\*\* :  $p < 0,001$  ; \* :  $p < 0,05$  et ns : non significatif ( $p > 0,05$ ).

Pour cela, nous avons utilisé le MG132, inhibiteur du protéasome. Les cellules HEK293T, transfectées au préalable par un plasmide permettant l'expression de HA-p190A WT ou HA-p190A S866F, ont été traitées avec une concentration de 50 $\mu$ M de MG132 pendant 4 heures avant extraction et analyse par Western Blot. Le marquage de la  $\beta$ -caténine sert de contrôle positif car de nombreuses études ont montré sa dégradation par le protéasome (Ji et al. 2019). Cependant, l'expression de p190A S866F n'est pas restaurée par l'inhibition du protéasome (**Figure 51C&51D**).

Une régulation croisée existe entre le protéasome et l'autophagie, un autre mécanisme de dégradation protéique (Nam et al. 2017). Mais aucune compensation ne semble expliquer la différence d'expression entre p190A WT et p190A S866F (données non montrées).

Un mécanisme de dégradation protéique n'explique pas la différence d'expression protéique entre les formes sauvage et mutée S866F de p190A. La régulation d'expression pourrait se produire à un stade transcriptionnel ou un stade traductionnel.

Afin d'analyser si la variation d'expression de la forme mutée de p190A est présente au niveau de l'ARNm, nous avons observé les quantités d'ARNm des formes surexprimées de p190A par une analyse par qRT-PCR. Les résultats démontrent que la diminution de l'expression protéique de p190A S866F est également retrouvée au niveau de l'ARNm (**Figure 51E**). Ceci suggère une régulation au niveau transcriptionnelle qu'il reste à confirmer.

## 4.2. La machinerie de traduction

L'analyse de l'interactome de p190A a également mis en évidence la présence de nombreux facteurs d'initiation de la traduction (eIF) fortement enrichis (**Annexe 1**). Ce complexe est nécessaire à la mise en place des phases initiales de la traduction, notamment les sous-unités eIF3 qui sont les facteurs majeurs de la régulation de la traduction (Z. Dong and Zhang 2006).

Ces résultats suggèrent un rôle de p190A dans la régulation de la traduction et sont en adéquation avec les données de la littérature. En effet, une analyse par spectrométrie de masse a montré l'interaction de p190A avec treize sous-unités du complexe eIF3 (Parasuraman et al. 2017). De plus, une machinerie de traduction est présente au niveau des invadosomes où p190A se localise (Ezzoukhry et al. 2018). Ainsi, p190A pourrait jouer un rôle dans le contrôle de la traduction au sein des invadosomes. Cette piste reste à explorer.

Toutefois, il existe un lien entre les mécanismes de régulation de la traduction et la prolifération cellulaire. En effet, la dérégulation de la mise en place de l'étape d'initiation de la traduction entraîne des altérations dans l'expression génique menant à un défaut de régulation de la prolifération cellulaire (Dong and Zhang 2006 ; Zheng et al. 2021). Par le biais d'interaction de p190A avec des facteurs d'initiation de la traduction et des protéines en lien avec la prolifération cellulaire, p190A pourrait avoir un rôle dans ces deux processus.

### 4.3. La mitose

L'analyse de l'interactome de p190A par spectrométrie de masse a mis en évidence des protéines reliées à la prolifération cellulaire et plus particulièrement à la mitose indiquant un rôle de p190A dans la régulation de la prolifération cellulaire (**Annexe 1**). Deux études ont déjà montré un rôle de p190A dans la prolifération cellulaire et notamment au cours de la mitose, dans la régulation du fuseau mitotique.

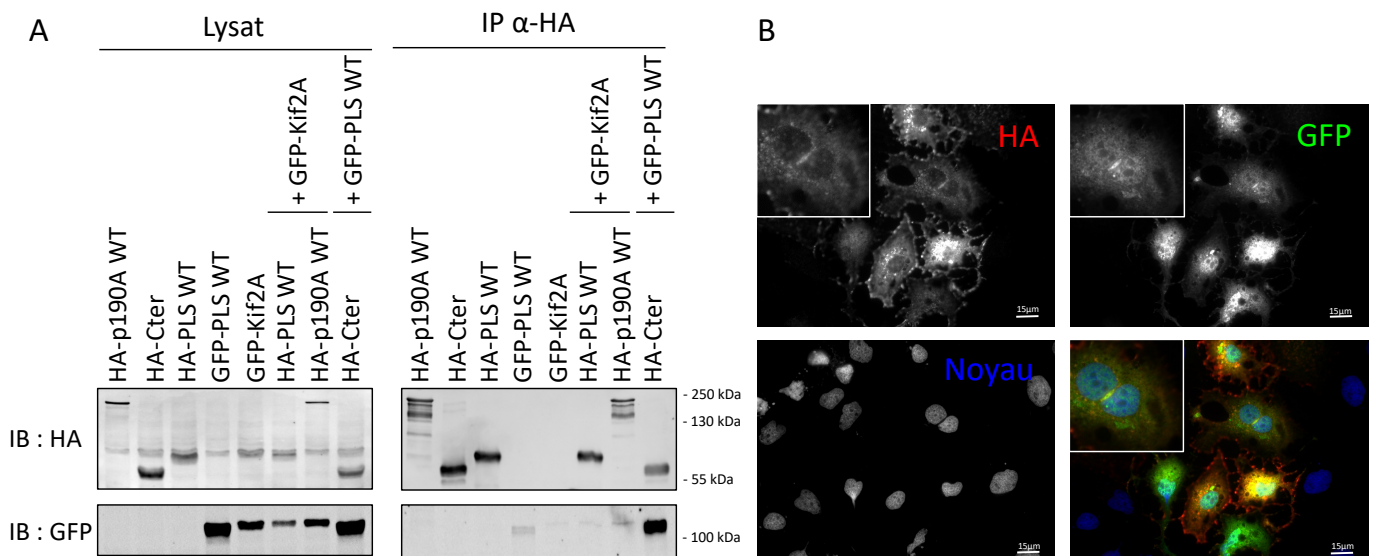
La première étude a montré que la formation d'un complexe entre p190A et l'anilline permet une modulation du taux de RhoA-GTP au niveau de l'anneau de cytokinèse. RhoA permet la progression de la division cellulaire par recrutement de l'actine et de la myosine II favorisant la contractilité. L'extinction de p190A entraîne une augmentation de l'activité de RhoA au niveau de l'anneau de cytokinèse résultant en un défaut de division des cellules filles (Manukyan et al. 2015).

Dans la seconde étude, p190A est indispensable pour prévenir la fragmentation du fuseau mitotique. La présence de p190A est nécessaire à l'activation de la kinase Aurora A au niveau des deux pôles dirigeant la ségrégation chromosomique. L'extinction de p190A entraîne l'altération de localisation de la kinésine Kif2A participant à l'organisation du fuseau mitotique et à la dépolymérisation des microtubules. Ce défaut de recrutement de Kif2A au

niveau des pôles explique le défaut de la fragmentation du fuseau mitotique et donc l'altération de la progression de la mitose (Manukyan et al. 2018).

De manière intéressante, parmi les protéines identifiées lors du criblage double hybride (réalisé avec le PLS en appât), deux isoformes de la protéine Kif2A ont été mis en avant (**Tableau 4**). En lien avec l'implication de p190A dans le cycle cellulaire, nous avons voulu confirmer l'interaction de Kif2A avec le domaine PLS de p190A. Pour cela, par des expériences de CoIP, nous avons analysé l'interaction des protéines HA-PLS WT ou avec HA-p190A WT avec GFP-Kif2A. Toutefois, les résultats n'ont pas permis de mettre en évidence d'interaction entre le domaine PLS et Kif2A (**Figure 52A**).

Cependant, par l'analyse de la localisation des protéines HA-p190A et GFP-Kif2A surexprimées dans des cellules Huh7, par immunofluorescence, nous avons observé une colocalisation de HA-p190A WT et GFP-Kif2A au niveau de l'anneau de cytokinèse, en fin de mitose (**Figure 52B**).



**Figure 52 : p190A et Kif2A colocalisent au niveau de l'anneau de cytokinèse, en fin de mitose.**

(A) Expérience de CoIP avec une IP α-HA de HA-PLS WT ou HA-p190A WT et analyse par Western Blot de l'interaction avec GFP-Kif2A. La condition HA-Cter + GFP-PLS WT sert de contrôle positif.

(B) Marquage par immunofluorescence de HA-p190A WT et GFP-Kif2A dans des cellules Huh7. Les noyaux ont été marqués avec le Hoescht.

Ce stade de division étant très peu représenté sur les lames observées, une synchronisation des cellules semble être indispensable afin de pouvoir observer une colocalisation entre Kif2A et p190A.

En conclusion, au cours de cette première partie, nous avons mis en évidence que la conformation de p190A régule son activité GAP par masquage/démasquage du domaine Cter de p190A avec une interaction intramoléculaire. De manière intéressante, nous avons également démontré une interaction intermoléculaire p190A/p190A et aussi p190A/p190B. Ceci suggère donc que les protéines p190A et p190B pourraient être régulées de façon complémentaire ou de façon antagoniste. Des expériences complémentaires sont nécessaires pour compléter notre modèle de régulation de p190RhoGAPs.

# Partie 2

—

Étude de p190RhoGAP dans  
le cancer de l'endomètre



Comme décrit dans l'introduction de ce manuscrit, le gène *ARHGAP35* codant pour p190A est significativement muté dans les cancers de l'endomètre.

Mes travaux de thèse décrits précédemment montrent qu'un lien physique entre p190A et p190B existe. Les protéines p190RhoGAP présentent un fort degré d'homologie et des fonctions similaires, notamment de régulation de RhoA. Par leur activité GAP, ces deux protéines régulent de nombreux processus biologiques comme la prolifération, la migration et l'invasion dérégulés dans le cancer. Ainsi, nos résultats nous ont incités à débiter une analyse comparative de p190A et p190B dans le cancer de l'endomètre. Cette analyse est réalisée dans un premier temps sur des lignées issues de cancer de l'endomètre puis dans un second temps, sur des échantillons provenant de patientes atteintes d'un cancer de l'endomètre.

## 1. Analyse de p190RhoGAP *in vitro*

### 1.1. Analyse de l'expression de p190RhoGAP dans les lignées de cancer de l'endomètre

Nous avons tout d'abord recherché de possibles mutations des gènes *ARHGAP35* et *ARHGAP5* dans des lignées de cancer de l'endomètre. D'après le site CCLE, les données de séquençage montrent que dans un ensemble de 31 lignées cellulaires, 42% ne sont pas mutées tandis que 58% présentent au moins une mutation des gènes *ARHGAP35* ou *ARHGAP5*.

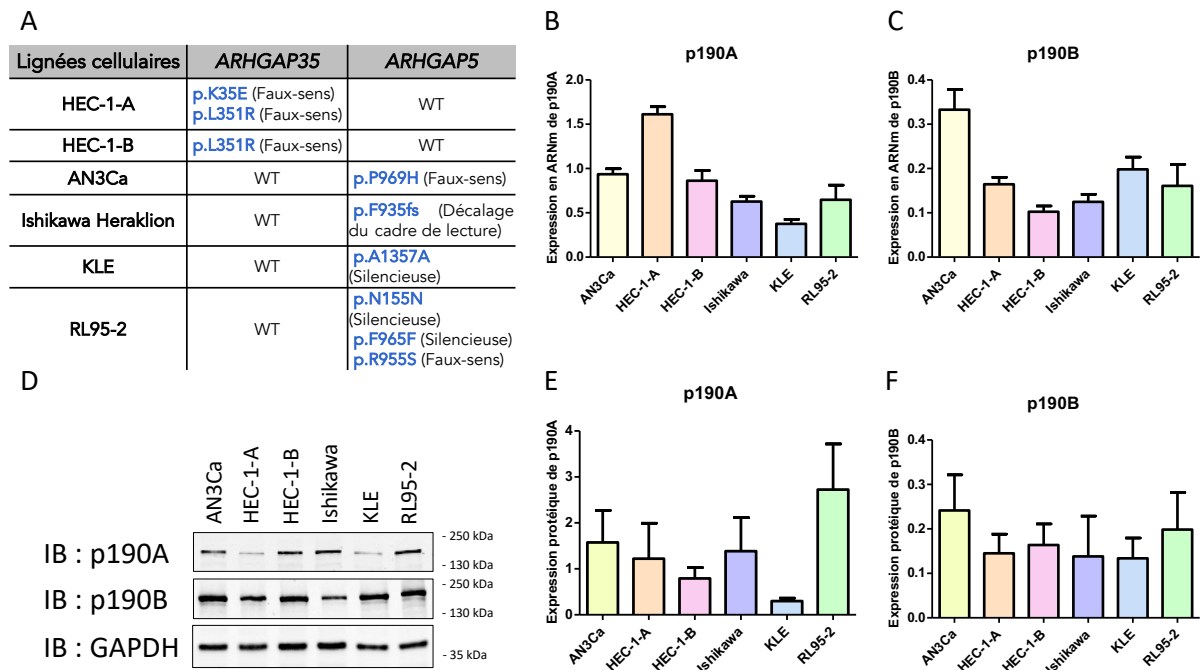
Au sein de ces lignées mutées, 1/3 présente une mutation uniquement d'*ARHGAP35*, 1/3 présente une mutation uniquement d'*ARHGAP5* et 1/3 est mutée sur *ARHGAP35* et *ARHGAP5*. Parmi les 6 lignées de cancer de l'endomètre disponibles au laboratoire, les lignées HEC-1-A et HEC-1-B sont mutées *ARHGAP35* tandis que les lignées AN3Ca, Ishikawa, KLE et RL95-2 présentent au moins une mutation du gène *ARHGAP5* (**Figure 53A**).

Nous avons ensuite analysé si les mutations de ces gènes ont un impact sur l'expression des protéines p190RhoGAP. Pour cela, une analyse des quantités d'ARNm et de protéines a été réalisée par qRT-PCR et par Western Blot, respectivement.

La quantité d'ARNm de p190A, résultant de l'expression du gène *ARHGAP35*, est plutôt homogène dans les 6 lignées (**Figure 53B**) malgré une légère augmentation dans la lignée HEC-



1-A. Concernant p190B, les quantités d'ARNm sont également homogènes dans les différentes lignées testées avec cependant une augmentation pour la lignée AN3Ca (**Figure 53C**).



**Figure 53 : Les lignées cellulaires de cancer de l'endomètre ont des expressions variables des p190RhoGAPs.**

(A) Tableau compilant les lignées issues de cancer de l'endomètre disponibles au laboratoire et les mutations des gènes *ARHGAP35* et *ARHGAP5* retrouvées dans ces lignées.

(B) (C) Quantité d'ARNm de p190A (B) et p190B (C) analysée par qRT-PCR.

(D) Révélation des marquages de p190A et de p190B par Western Blot. La GAPDH sert de contrôle de charge.

(E) (F) Quantification de l'expression protéique de p190A (E) et p190B (F) analysée par Western Blot (D), unité arbitraire.

La protéine p190A est présente de façon homogène dans les différentes lignées. La quantité de protéine présente dans la lignée RL95-2 est plus importante que dans les autres lignées testées (**Figure 53D&53E**). La protéine p190B est présente en quantité relativement homogène dans l'ensemble des lignées (**Figure 53D&53F**).

De plus, il ne semble pas y avoir de profils d'expression distincts entre les lignées HEC-1-A et HEC-1-B (mutées sur *ARHGAP35*) et les lignées AN3Ca, Ishikawa, KLE et RL95-2 (mutées sur *ARHGAP5*). Aucune corrélation entre la présence de mutations et l'expression de p190RhoGAPs n'est mise en évidence.

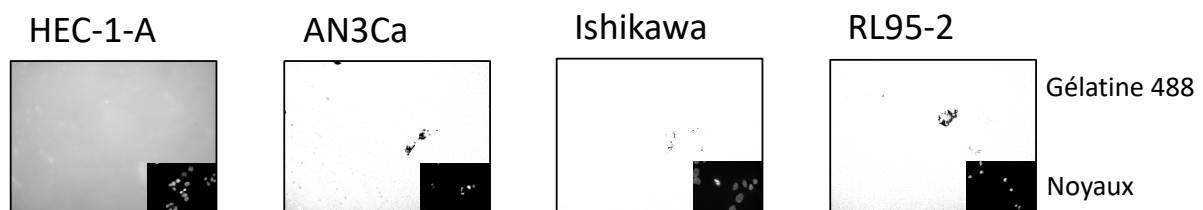
Nous avons voulu évaluer l'impact des mutations présentes dans les différentes lignées cellulaires sur des processus biologiques différents. Étant donné que p190RhoGAP régule *via* RhoA le remodelage du cytosquelette d'actine, nous avons étudié l'impact de p190RhoGAP et de ses mutations sur l'invasion et la prolifération des cellules.

## 1.2. Analyse des fonctions biologiques de p190RhoGAP *in vitro*

### 1.2.1. Évaluation de la capacité invasive des lignées de cancer de l'endomètre

Comme démontré précédemment, les protéines p190A et p190B se localisent aux invadosomes (**Figure 45**). Les invadosomes sont des structures d'actine impliquées dans l'invasion cellulaire. Nous avons donc analysé la capacité invasive des lignées de cancer de l'endomètre. Pour cela, nous avons réalisé un test de dégradation d'une matrice de gélatine fluorescente. La présence de zones noires correspond aux zones d'absence de fluorescence donc, aux zones où les cellules ont dégradé la matrice fluorescente (**Figure 54**).

Il semble que les différentes lignées cellulaires testées dégradent très peu voire ne dégradent pas la matrice sous-jacente (**Figure 54**). La lignée HEC-1-A ne présente aucune zone de dégradation de la matrice de gélatine fluorescente. Pour les lignées AN3Ca, Ishikawa et RL95-2, il semble que quelques petites zones noires de dégradation soient visibles mais celles-ci sont très peu nombreuses.



**Figure 54 : Les lignées cellulaires provenant de carcinomes de l'endomètre n'ont pas de capacités invasives.**

Images de microscopie à épifluorescence des lignées HEC-1-A (mutée *ARHGAP35*) et les lignées AN3Ca, Ishikawa et RL95-2 (mutées *ARHGAP5*). Les cellules ont étéensemencées sur une matrice de gélatine fluorescente afin d'analyser la présence de zones de dégradation de la gélatine (zones noires). Les noyaux ont été marqués avec le Hoescht.

Ces résultats sont en adéquation avec les analyses préliminaires d'immunofluorescence ne montrant pas la présence d'invadosomes dans ces cellules (données non montrées). De nouvelles expériences sont à réaliser afin d'évaluer le rôle des mutations de p190RhoGAP dans l'invasion.

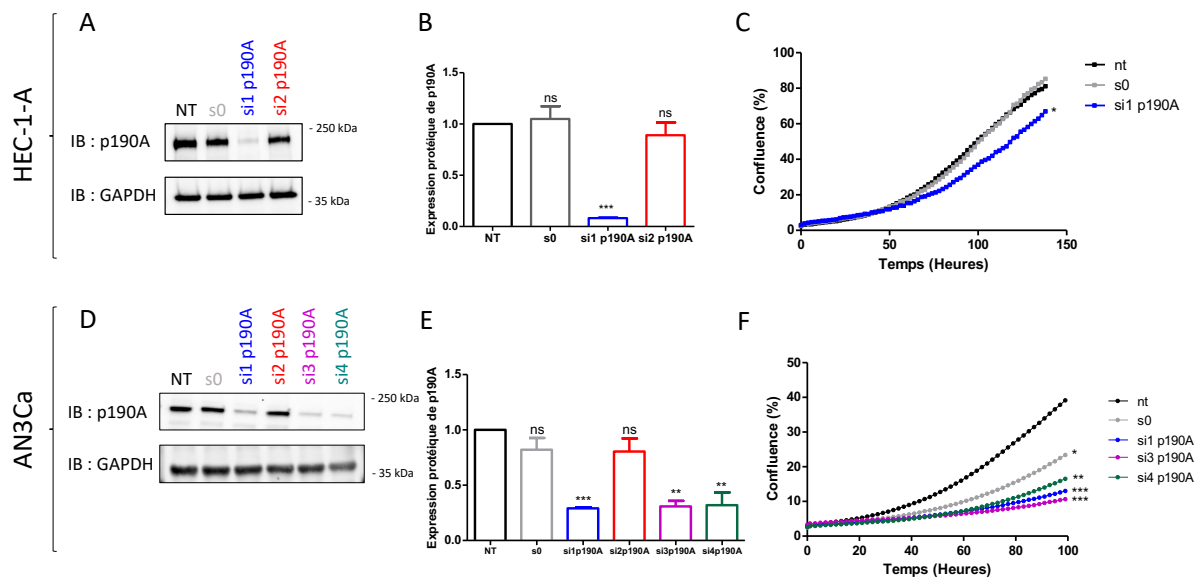
### 1.2.2. Étude de l'impact de p190RhoGAP dans la prolifération cellulaire

Comme décrit dans la partie 1.4.3, les protéines p190RhoGAPs sont impliquées dans la prolifération cellulaire. De plus, dans les différentes approches de recherche d'interactants de p190A ou de p190B, nous avons identifié de nombreuses protéines en lien avec la régulation de la mise en place du fuseau mitotique et de la cytokinèse, en fin de mitose telles que Kif2A.

Nous avons donc étudié l'impact de l'extinction de p190A, par une stratégie d'ARN interférent, sur la prolifération cellulaire. Pour cela, nous avons utilisé uniquement les lignées HEC-1-A et AN3Ca qui présentent soit une protéine p190A mutée dans la lignée HEC-1-A soit une protéine p190B mutée dans la lignée AN3Ca.

Les résultats montrent qu'une diminution de l'expression de p190A par le si1 p190A entraîne une diminution de la prolifération des HEC-1-A par rapport aux conditions contrôles « NT » et « s0 » (**Figure 55A&55B&55C**). Il en est de même avec la lignée AN3Ca, la diminution d'expression de p190A par les différents siRNA p190A (si1, si3 et si4) diminue fortement la prolifération des cellules (**Figure 55D&55E&55F**).

D'après ces résultats, p190A semble nécessaire à la prolifération des cellules tumorales d'endomètre. Il nous faut désormais poursuivre cette étude dans les autres lignées de cancer de l'endomètre. De plus, nous intégrerons l'analyse de l'extinction de p190B dans ces lignées afin de compléter ces données fonctionnelles. Ces perspectives nous permettront de conclure sur le rôle des protéines p190RhoGAP dans le processus de prolifération des cellules tumorales.



**Figure 55 : L'extinction de p190A dans les lignées HEC-1-A et AN3Ca entraîne une diminution de la prolifération cellulaire.**

(A) Extinction de p190A dans la lignée HEC-1-A, analysée par Western Blot. La GAPDH sert de contrôle de charge.

(B) Quantification de l'expression protéique de p190A analysée par Western Blot.

(C) Analyse de la prolifération cellulaire des HEC-1-A à l'aide du vidéomicroscope Incucyte.

(D) Extinction de p190A dans la lignée AN3Ca, analysée par Western Blot. La GAPDH sert de contrôle de charge.

(E) Quantification de l'expression protéique de p190A analysée par Western Blot.

(F) Analyse de la prolifération cellulaire des AN3Ca à l'aide du vidéomicroscope Incucyte.

Un test statistique ANOVA une voie a été réalisé avec \*\*\* :  $p < 0,005$  ; \*\* :  $p < 0,01$  ; \* :  $p < 0,05$  et ns (non significatif) :  $p > 0,05$ .

Notre analyse comparative *in vitro* des p190RhoGAPs dans le cadre du cancer de l'endomètre est complétée par une étude clinique d'échantillons de tissus provenant de patientes atteintes de cancer de l'endomètre.

## 2. Étude de l'expression de p190A et p190B dans des tissus humains de cancer de l'endomètre

À ce jour, aucune étude publiée dans la littérature n'associe l'analyse conjointe de p190A et de p190B. Dans le but d'analyser le rôle de p190RhoGAP dans le cancer de l'endomètre, en parallèle de l'étude *in vitro*, une analyse sur tissus humains a été initiée.

En collaboration avec le Dr. Sabrina Croce de l'Institut Bergonié, nous avons pu obtenir des échantillons de tissus d'endomètre congelés provenant de 16 patientes atteintes de carcinomes de l'endomètre (**Tableau 6**).

Ces carcinomes ont été classés par une analyse histologique : sept cas de cancers endométrioïdes, sept cas de cancers séreux, un cas de cancer à cellules claires ainsi qu'un carcinome peu différencié donc non classé. Afin d'analyser l'expression d'*ARHGAP5* et d'*ARHGAP35* dans ces tumeurs, les échantillons ont été broyés puis les protéines et les ARN en ont été extraits pour les analyser par WB et par qRT-PCR, respectivement.

Patiente		Échantillon de tissu sain	Échantillon de tissu tumoral	Diagnostic
LF592	P1	Non	Oui (1)	Carcinome peu différencié
LF623	P2	Oui (1)	Oui (3)	Adénocarcinome endométrioïde de grade II
LF773*	P3	Oui (1)	Oui (1)	Carcinome à cellules claires
LH004	P4	Non	Oui (3)	Adénocarcinome endométrioïde de grade II
LI365	P5	Non	Oui (1)	Adénocarcinome endométrioïde de grade II
LK386*	P6	Oui (1)	Oui (1)	Carcinome séreux
LL477	P7	Non	Oui (1)	Carcinome séreux
LN527	P8	Oui (1)	Oui (1)	Adénocarcinome endométrioïde de grade I
LN802	P9	Oui (1)	Oui (1)	Adénocarcinome endométrioïde de grade I
LR244	P10	Oui (1)	Oui (1)	Carcinome séreux
MB922	P11	Oui (1)	Oui (3)	Carcinome séreux
MG595	P12	Oui (1)	Oui (2)	Adénocarcinome endométrioïde de grade III
MJ862*	P13	Oui (1)	Oui (1)	Carcinome séreux
MJ869	P14	Oui (1)	Oui (1)	Adénocarcinome endométrioïde de grade I
ML349	P15	Oui (1)	Oui (1)	Carcinome séreux
MU348	P16	Oui (1)	Oui (3)	Carcinome séreux

■ Peu différencié  
 ■ À cellules claires  
 ■ Séreux  
 ■ Endométrioïde (tout grade confondu)  
     ■ Grade I  
     ■ Grade II  
     ■ Grade III

**Tableau 6 : Liste des échantillons de tissus sains ou tumoraux d'endomètre.**

Dans ce tableau sont référencés, le nombre de tissu provenant d'échantillons sains ou tumoraux ainsi que les sous-types histologiques associés à chaque patiente : à cellules claires (jaune), séreux (rose) et endométrioïde (bleu). Un échantillon provient d'une tumeur peu différenciée (vert).

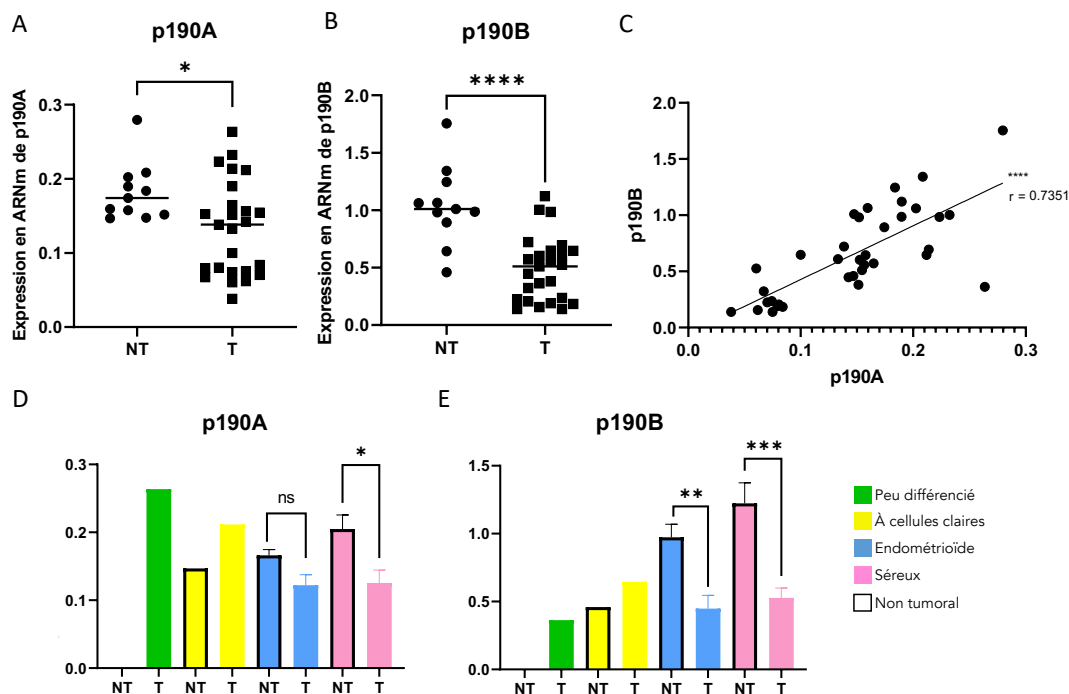
\* Représente les patientes décédées.

## 2.1. Analyse de l'expression des gènes codant p190RhoGAP

Tout d'abord, nous avons étudié les quantités d'ARNm relatives à l'expression des gènes *ARHGAP35* et *ARHGAP5* codant les protéines p190RhoGAP, par qRT-PCR.

Les résultats montrent que les quantités en ARNm d'*ARHGAP35* et d'*ARHGAP5* sont significativement diminuées dans les échantillons non tumoraux (NT) par rapport aux échantillons tumoraux (T) (**Figure 56A&56B**).

De plus, une corrélation positive très forte ( $r=0,73$ ) est retrouvée entre les quantités en ARNm d'*ARHGAP35* et d'*ARHGAP5* (**Figure 56C**).



**Figure 56 : La quantité d'ARNm de p190A et p190B diminue significativement dans les échantillons tumoraux.**

(A) (B) Quantité d'ARNm de p190A (A) et p190B (B) analysée par qRT-PCR en comparant les échantillons sains (NT) des échantillons tumoraux (T).

(C) Corrélation positive entre les quantités d'ARNm de p190A et p190B.  $r$  est le coefficient de corrélation.

(D) (E) Quantité d'ARNm de p190A (D) et p190B (E) analysée par qRT-PCR en comparant les sous-types histologiques.

Un test statistique t-test ou ANOVA une voie a été réalisé avec \*\*\*\* :  $p < 0,001$  ; \*\*\* :  $p < 0,005$  ; \*\* :  $p < 0,01$  ; \* :  $p < 0,05$  et ns (non significatif) :  $p > 0,05$ .

La quantité d'ARNm de p190A semble varier selon le sous-type histologique. En effet, nous observons une diminution non significative de la quantité de p190A dans les échantillons tumoraux des tumeurs endométrioïdes, en comparaison avec les contrôles non tumoraux (**Figure 56D**). Pour les tumeurs séreuses, la quantité d'ARNm de p190A est significativement inférieure dans les échantillons tumoraux par rapport aux échantillons non tumoraux (**Figure 56D**).

Concernant la quantité d'ARNm de p190B, nous mettons en évidence une diminution significative dans les échantillons tumoraux des carcinomes endométrioïdes et séreux, en comparaison aux contrôles non tumoraux (**Figure 56E**).

## 2.2. Analyse de l'expression protéique de p190RhoGAP

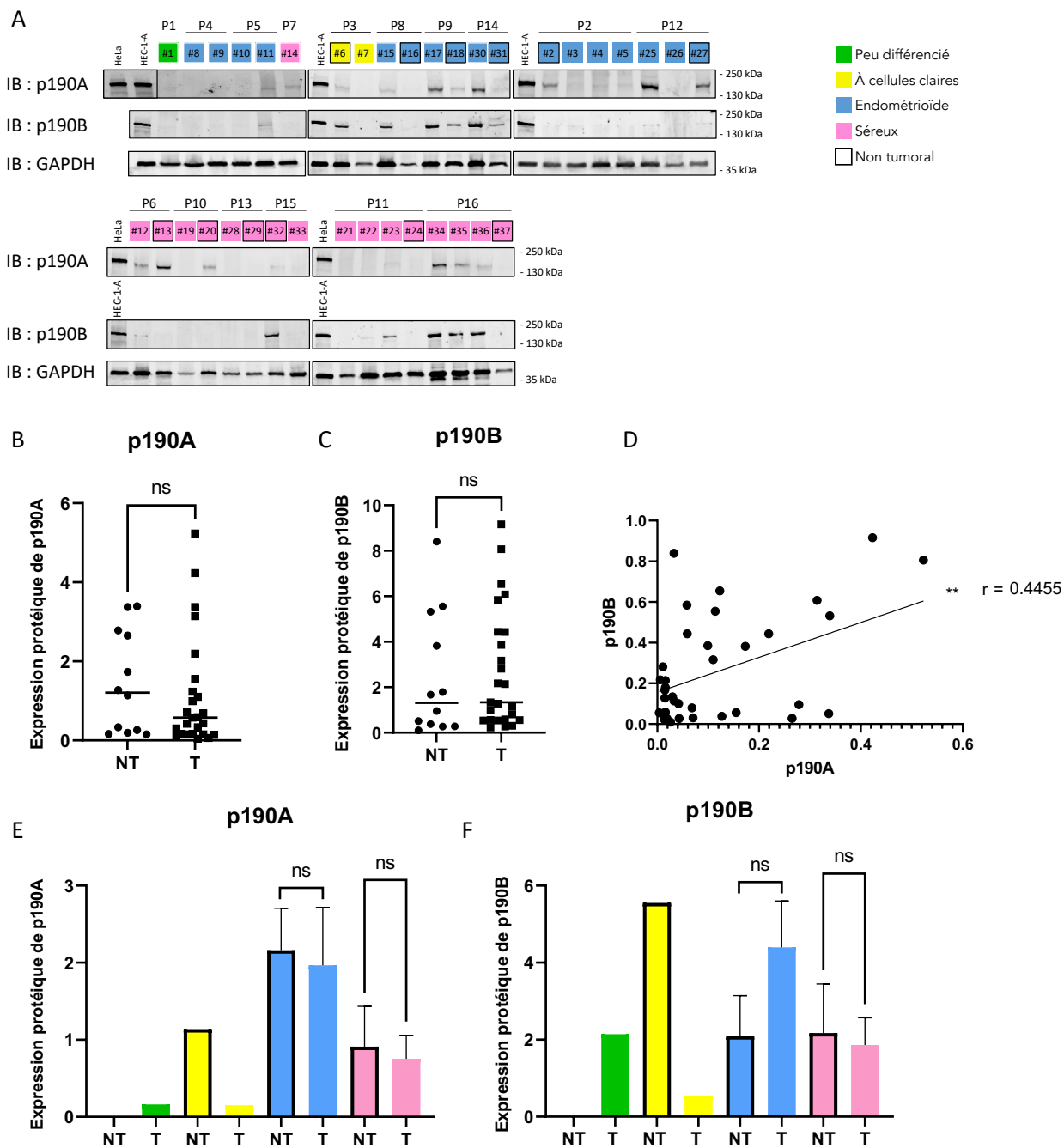
En parallèle, nous avons analysé l'expression protéique de p190RhoGAP dans les échantillons de tissus de patientes atteintes de cancer de l'endomètre par Western Blot. Nous avons utilisé la lignée cellulaire HEC-1-A en contrôle positif ainsi que pour la normalisation des quantités d'expression.

Les résultats montrent que l'expression protéique de p190A et de p190B varie de manière importante dans les différents tissus normaux et tumoraux. L'analyse globale montre que l'expression protéique de p190A tend à diminuer dans les échantillons non tumoraux (NT) par comparaison aux échantillons tumoraux (T) (**Figure 57A&57B**). L'expression protéique de p190B ne semble pas varier entre les échantillons non tumoraux (NT) et les échantillons tumoraux (T) (**Figure 57A&57C**).

Cependant, il existe une forte corrélation positive ( $r=0,44$ ) entre les expressions protéiques de p190A et de p190B (**Figure 57D**).

L'expression de p190A entre les différents sous-types semble varier. En effet, dans les échantillons provenant de carcinomes endométrioïdes, l'expression de p190A semble plus importante que l'expression dans les carcinomes séreux (**Figure 57E**).

L'expression protéique de p190B semble également varier dans les carcinomes séreux où nous observons une augmentation de l'expression dans les carcinomes endométrioïdes par rapport aux carcinomes séreux (**Figure 57F**).



**Figure 57 : L'expression protéique de p190RhoGAPs est corrélée positivement dans les échantillons d'endomètre.**

(A) Analyse par Western Blot de l'expression protéique de p190A et de p190B. La GAPDH sert de contrôle de charge.

(B) (C) Quantification de l'expression protéique de p190A (B) et p190B (C) analysée par Western Blot en comparant les échantillons sains (NT) des échantillons tumoraux (T).

(D) Corrélation positive entre les expressions protéique de p190A et de p190B.  $r$  est le coefficient de corrélation.

(E) (F) Quantification de l'expression protéique de p190A (E) et p190B (F) analysée par Western Blot en comparant les sous-types histologiques.

P représente chaque patiente identifiée dans le tableau 6.

Un test statistique t-test ou ANOVA une voie a été réalisé, ns (non significatif) :  $p > 0,05$  et  $**$  :  $p < 0,01$ .



D'après ces résultats, nous pouvons dire que l'expression protéique de p190RhoGAP varie selon les sous-types de cancers de l'endomètre, en comparaison avec les contrôles non tumoraux.

Dans le cas du carcinome à cellules claires de notre cohorte, l'expression protéique de p190A et de p190B semble plus importante dans le contrôle non tumoral que l'échantillon tumoral (**Figure 57E&57F**). Les quantités d'ARNm de p190A et p190B ne semblent pas varier dans les échantillons non tumoraux et tumoraux (**Figure 56D&56E**). Cependant, il s'agit d'un unique cas de carcinome à cellules claires donc nous ne pouvons pas émettre de conclusion. Des cas supplémentaires de carcinomes de l'endomètre sont nécessaires afin de pouvoir confirmer ces résultats.

Cette analyse sur tissus humains montre, au niveau ARNm, une variation d'expression de p190A et p190B dans les échantillons de tumeurs en comparaison au tissu non tumoral. Cela indiquerait un rôle protecteur de p190RhoGAP car l'expression de ces protéines est plus importante dans les échantillons non tumoraux. Cependant l'analyse de l'expression protéique par Western Blot n'a, pour l'instant, pas permis d'obtenir des résultats cohérents. Pour compléter les résultats d'expression protéique, une analyse de la localisation de p190RhoGAP (p190A et p190B) dans les tissus (tumeurs et sains) est en cours par immunohistochimie (IHC) afin d'évaluer si la localisation est diffuse ou spécifique de certains types cellulaires.

En parallèle, l'acquisition des données moléculaires sur la classification des carcinomes de l'endomètre, ainsi que des données de séquençage des gènes *ARHGAP35* et *ARHGAP5* sont en cours.

L'ensemble des résultats obtenus par ces différentes approches nous permettra de mieux comprendre le rôle des protéines p190RhoGAPs dans le cancer de l'endomètre.





# Discussion et conclusion



L'acquisition de capacités pro-migratoires et pro-invasives des cellules est une des caractéristiques du cancer et est liée au remodelage du cytosquelette d'actine. La régulation fine et coordonnée des GTPases Rho est essentielle afin de réguler des fonctions biologiques telles que la migration ou l'invasion des cellules tumorales. Les GTPases Rho, régulateurs majeurs du cytosquelette d'actine, ainsi que leurs régulateurs sont des cibles thérapeutiques dans le cadre du cancer. Les protéines p190RhoGAPs, régulateurs négatifs de RhoA, sont des cibles potentielles, notamment par le fort taux de mutations identifiées dans les tumeurs.

Au cours de ma thèse, dans une première partie, j'ai étudié plusieurs aspects de la régulation des protéines p190RhoGAPs : leur localisation, leur fonction et leur conformation, à l'aide des mutations retrouvées dans les tumeurs. Puis, dans une seconde partie, j'ai réalisé une étude comparée de p190A et de p190B dans le cadre du cancer de l'endomètre à l'aide de lignées cellulaires mais également à partir d'échantillons de patientes.

## Partie 1 – Mécanismes de régulation de p190RhoGAPs dans la cellule

Une régulation rapide de l'activité de p190RhoGAP est requise au niveau des structures d'actine afin de réguler négativement RhoA. Nous avons mis en évidence que le domaine PLS de p190A est impliqué dans la régulation de la localisation de la protéine au niveau de structures d'actine et de l'activité RhoGAP de p190A. Le modèle ainsi que les mécanismes de régulation de p190RhoGAP seront discutés dans cette partie.

### 1.1. Le PLS régule la localisation de la protéine

Tout d'abord, nous avons confirmé que le domaine PLS est un domaine fonctionnel important pour p190A. Précédemment, le domaine PLS a été identifié comme essentiel à la localisation de p190A aux lamellipodes et à la migration cellulaire (Binamé et al. 2016).

Les invadosomes sont également des structures d'actine impliquées dans l'invasion cellulaire qui, en couplant des activités de polymérisation de l'actine et de dégradation de la

matrice environnante, permettent aux cellules d'envahir les tissus afin de former des métastases à distance. Étant donné que plusieurs études ont montré que p190A régule les GTPases Rho au niveau des invadosomes, par exemple RhoC et RhoQ (TC10), nous nous sommes intéressés à l'implication du PLS dans la localisation de p190A aux invadosomes (Bravo-Cordero et al. 2011 ; Hülsemann et al. 2021).

Dans un premier temps, nous avons complété les données disponibles concernant la localisation de p190A aux invadosomes (Nakahara et al. 1998 ; Burgstaller and Gimona 2004 ; Guegan et al. 2008 ; Crimaldi, Courtneidge, and Gimona 2009). Nous avons mis en évidence la localisation de la protéine p190A endogène au niveau de plusieurs organisations d'invadosomes, (1) rosettes dans des fibroblastes où Src est activé, (2) points dans des cellules de cancer du foie et (3) invadosomes linéaires dans des cellules tumorales déposées sur une matrice de collagène de type I.

Ensuite, nous avons mis en évidence l'importance du domaine PLS dans la localisation aux invadosomes de type rosette en utilisant une protéine dépourvue du PLS.

La cortactine, NPF de classe II, se localise aux invadosomes et il a été montré que la cortactine interagit avec p190A et est requise pour la localisation de p190A aux lamellipodes (Markwell et al. 2019 ; Campellone and Welch 2010 ; Binamé et al. 2016). Nous nous sommes intéressés à l'impact de son extinction sur la localisation de p190A aux invadosomes. De plus, l'introduction des mutations retrouvées dans les tumeurs S866F et  $\Delta$ 865-870, dans le PLS, inhibe la localisation de p190A aux lamellipodes et altèrent la directionnalité de la migration des cellules, nous avons complété nos résultats avec l'analyse de la localisation aux invadosomes des formes mutées de p190A (Binamé et al. 2016).

D'après nos résultats, ni l'extinction de la cortactine et ni l'introduction de mutations S866F et  $\Delta$ 865-870 n'altère la localisation de p190A aux invadosomes. Afin de compléter ces données, il serait intéressant d'évaluer l'impact de l'extinction de la cortactine sur la localisation aux invadosomes des formes mutées de p190A avant d'exclure son rôle potentiel dans l'adressage de p190A aux invadosomes.

Toutefois, le mécanisme permettant la localisation de p190A aux invadosomes semble donc différent de celui permettant la localisation de p190A aux lamellipodes. La kinase PYK2 se localise aux invadosomes et l'interaction de PYK2 avec p190A est impliquée dans l'invasion

de cellules cancéreuses du sein (Zrihan-Licht et al. 2000 ; Genna et al. 2018). L'hypothèse que PYK2 puisse être impliqué dans le mécanisme d'adressage de p190A (sauvage et mutée) aux invadosomes est donc émise.

Bien que les formes mutées de p190A se localisent toujours aux invadosomes, ces mutants peuvent altérer la fonction de dégradation de la MEC, d'autant que p190B, est impliquée dans le recrutement de MT1-MMP à la membrane plasmique de cellules endothéliales (Guegan et al. 2008). Pour cela, nous avons réalisé un test de dégradation de matrice fluorescente afin d'évaluer les capacités invasives des cellules. Malheureusement, à cause de difficulté d'expression de p190A sauvage ou mutée, ni l'approche par transfection transitoire, ni l'approche par transduction lentivirale ne nous a pas permis de conclure sur la capacité invasive différentielle des cellules exprimant p190A sauvage ou mutées S866F et  $\Delta$ 865-870.

Des expériences complémentaires sont nécessaires afin de mieux comprendre le mécanisme d'adressage de p190A aux invadosomes et l'impact des mutations S866F et  $\Delta$ 865-870 de p190A dans l'invasion cellulaire.

## 1.2. Le PLS régule l'activité GAP de la protéine

Un rôle de régulation de l'activité RhoGAP par le domaine PLS a déjà été mis en évidence (Binamé et al. 2016). Nous avons confirmé ce résultat par une quantification du ratio actine F/actine G. Ces résultats suggèrent un repliement auto-inhibiteur du domaine GAP impliquant le domaine PLS (Binamé et al. 2016 ; Bidaud-Meynard et al. 2017). Un mécanisme d'auto-inhibition médié par Rac1 a également été proposé pour p190B ce qui renforce l'hypothèse d'un repliement auto-inhibiteur des protéines p190RhoGAPs (Bustos et al. 2008). De plus, le repliement auto-inhibiteur de plusieurs protéines GEF et GAP a déjà été démontré (Rossman, Der, and Sondek 2005 ; Bos, Rehmann, and Wittinghofer 2007 ; Eberth et al. 2009 ; Elvers et al. 2012 ; Liu et al. 2013 ; Chang et al. 2020). Par exemple, le domaine BAR de la protéine GAP OPHN1 bloque la régulation des GTPases Rho en masquant le domaine GAP, par une interaction intramoléculaire ou intermoléculaire (Eberth et al. 2009).

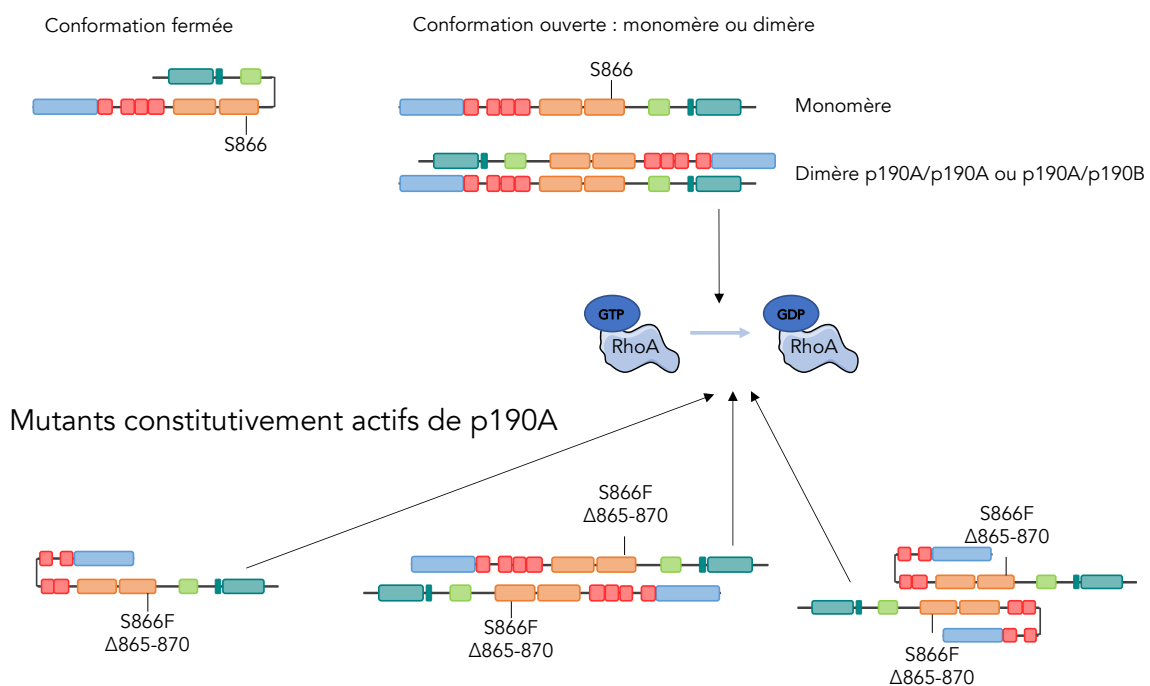


Au cours de ma thèse, par un criblage double hybride et des expériences de CoIP, nous avons pu confirmer cette hypothèse et mettre en évidence un modèle de régulation en nous basant sur les domaines d'interaction de p190A avec le domaine PLS. Dans le **tableau 5**, sont résumées les interactions mises en évidence avec le domaine PLS.

Nous proposons un modèle où la protéine sauvage est présente sous deux formes dans la cellule : (1) une forme repliée, auto-inhibée, du PLS masquant le domaine catalytique et (2) une forme ouverte, active où une régulation localisée de RhoA est nécessaire (**Figure 58**). Localement, un système d'activation rapide de p190A par la levée de l'auto-inhibition permettrait une inhibition de RhoA. La présence des deux formes permettrait d'éviter une suractivation de p190A et donc une inactivation incontrôlée de RhoA, induite par la protéine en conformation ouverte, qui serait délétère pour la cellule.

Ce modèle a été complété avec l'analyse des mutations S866F et  $\Delta$ 865-870 qui miment la perte du domaine PLS au niveau de la localisation aux lamellipodes et de l'augmentation de l'activité GAP. L'interaction entre le PLS muté (S866F ou  $\Delta$ 865-870) et le domaine Cter est perdue suggérant l'ouverture du domaine Cter de la protéine, explication de l'augmentation de l'activité GAP. En parallèle, un repliement des domaines Nter et PLS a été identifié ce qui suggère que le repliement PLS/Cter n'est pas le seul mécanisme de régulation du repliement de p190A (**Figure 58**).

p190A WT



**Figure 58 : Proposition d'un modèle de régulation des protéines p190RhoGAPs.**

De plus, nous avons mis en évidence une interaction intermoléculaire entre les protéines p190A et p190B, par un criblage double hybride et des expériences de CoIP, indiquant une interaction entre ces protéines. L'intégration de p190B dans le modèle de régulation de p190A est donc une perspective intéressante à investiguer dans le futur.

Nous avons démontré une interaction intermoléculaire de p190A, par des expériences de CoIP et de BRET. Ainsi, nous avons mis en évidence l'interaction de deux protéines p190A renforcée par l'introduction de la mutation S866F et impliquant le domaine PLS de ces deux protéines (**Figure 58**).

Au travers de notre modèle de régulation de p190A, la régulation de l'activité RhoGAP par le PLS semble donc agir par le biais d'une interaction intramoléculaire et d'une interaction intermoléculaire de p190A.

Comme il a été montré dans la revue (Chapitre 3), l'activité GAP de p190A est régulée par des modifications post-traductionnelles et des partenaires protéiques qui pourraient intervenir en tant que commutateur conformationnel en favorisant ou en levant l'auto-inhibition (Héraud et al. 2019). La simple mutation de la sérine 866 suffit à modifier l'interaction du PLS/Cter et PLS/Nter donc nous avons émis l'hypothèse d'une régulation de la conformation de p190A par la phosphorylation. Une analyse de spectrométrie de masse n'a pas montré que la sérine 866 était phosphorylée tandis qu'un traitement à la phosphatase n'a pas modifié l'interaction PLS/Cter.

A l'instar de l'interaction de la protéine ELMO nécessaire à l'activation de DOCK1-5, nous avons également recherché parmi les interactants connus de p190A, des partenaires protéiques capable de moduler l'interaction PLS/Cter (Liu et al. 2013 ; Chang et al. 2020). Notre approche ciblée ne nous a pas permis d'identifier un partenaire protéique de p190A capable de moduler cette interaction PLS/Cter. Une approche globale en cours nous apporte des pistes à explorer afin de compléter notre modèle de régulation de p190A. Des enzymes à activité hydrolase ou oxydoréductases ainsi que des protéines en lien avec le cytosquelette d'actine ont été identifiées.

Il a été montré que l'interaction de la folliculine avec des dimères de la GTPase Rag favorisait son recrutement au lysosome (Sancak et al. 2010). De plus, la folliculine est impliquée dans le processus d'implantation embryonnaire, processus qui nécessite la coordination de GTPases durant les événements d'apposition, d'adhésion et d'invasion de

l'endomètre maternel (Leiva et al. 2021 ; Liang et al. 2021). Étant donné que la folliculine interagit avec le PLS sauvage mais que cette interaction n'est pas retrouvée avec le complexe PLS/Cter, il serait potentiellement intéressant d'analyser si la folliculine pouvait empêcher l'interaction PLS/Cter et favoriser l'ouverture de p190A.

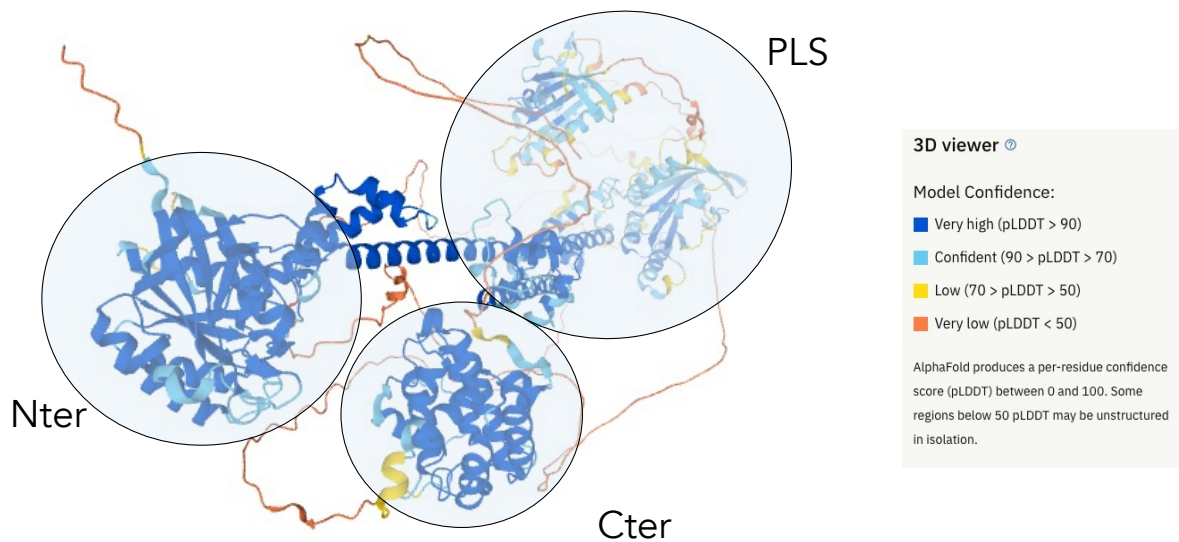
### 1.3. Structure tridimensionnelle de la protéine

Afin de mieux comprendre ce modèle conformationnel, la résolution de la structure tridimensionnelle (3D) de p190A est essentielle. À ce jour, la structure de certains domaines (GBD, FF, pG1 et GAP) ont pu être résolues (Bonet et al. 2009 ; Stiegler and Boggon 2017 ; Stiegler and Boggon 2018a ; Stiegler and Boggon 2018b). Cependant, ni la structure 3D de la protéine entière p190A, ni celle du domaine PLS ou bien celle du domaine Cter2h, le domaine minimal identifié comme interagissant avec le PLS, n'ont été résolues.

En collaboration, nous avons initié ce projet mais la difficulté de purification de la protéine (du fait de sa taille importante) rend compliquée la résolution de la structure de p190A par cristallographie.

Néanmoins, des chercheurs ont mis au point un logiciel de prédiction de structure 3D de protéine, AlphaFold (Jumper et al. 2021). Il s'agit d'un système d'intelligence artificielle qui combine notamment les informations de structure issues de bases de données avec les alignements de séquence grâce à un algorithme amélioré par des approches d'apprentissage (« deep learning »). Ce site de prédiction nous permet de représenter en 3D la structure de la protéine p190A humaine sauvage (**Figure 59**).

Nous pouvons observer les 3 domaines (Nter, PLS et Cter) séparés par de grandes boucles de couleur orange, présentant un score faible de prédiction de séquence. De par leur composition en acides aminés, la prédiction des structures secondaires au sein de ces boucles n'est pas permise. Au sein du domaine PLS, deux plus petits domaines sont identifiables avec les feuilletts  $\beta$ , ce sont les domaines pseudoGTPases pG1 et pG2 (Stiegler and Boggon 2017 ; Stiegler and Boggon 2018b).



**Figure 59 : Prédiction de structure en 3 dimensions de p190A sauvage.**  
D'après le logiciel AlphaFold.

La prédiction d'une interaction entre les résidus T840 et S866 est identifiée mais aucune interaction n'est montrée entre les domaines PLS et Cter. Aucune mutation de la tyrosine 840 n'a été mise en évidence dans la littérature. De plus, lors de notre analyse des phosphorylations de p190A par spectrométrie de masse, la thréonine 840, tout comme la sérine 866 n'ont pas été retrouvées phosphorylées. Néanmoins, nous pouvons observer une proximité des domaines PLS et Cter ce qui confirmerait l'interaction intramoléculaire observée *in vitro*.

La comparaison des structures de la protéine p190A sauvage avec la protéine p190A mutée S866F pourrait nous permettre de mieux comprendre le changement de conformation de p190A lors de l'introduction de cette mutation ainsi que l'identification d'acide aminé important dans le repliement tridimensionnel de la protéine. Ainsi, les modifications structurales engendrées par la mutation apporteraient des informations complémentaires au modèle de la régulation fonctionnelle de la protéine.

Le modèle de régulation proposé, en combinant une interaction auto-inhibitrice et une interaction intermoléculaire, permet d'associer la régulation de la localisation et l'activité GAP de p190RhoGAP qui sont indispensables à la régulation fine et contrôlée de RhoA, notamment aux lamellipodes et aux invadosomes.

## Partie 2 – Étude de p190RhoGAP dans le cancer de l'endomètre

Le gène *ARHGAP35* est significativement muté dans près de 15% des cancers de l'endomètre mais le rôle de p190A dans ce type de tumeurs, tout comme celui de p190B, ne sont pas clairement définis (M. S. Lawrence et al. 2014). Alors que nous avons démontré une interaction entre p190A et p190B et qu'aucune analyse conjointe de ces protéines n'a été réalisée à ce jour, nous avons initié une étude de p190A et p190B dans des lignées issues de cancer de l'endomètre ainsi que des échantillons de patientes.

### 2.1. Analyse de p190RhoGAP *in vitro*

Tout d'abord, afin de compléter les données disponibles sur le rôle de p190RhoGAPs dans le cancer, nous avons analysé l'implication de p190A sur les capacités de prolifération des cellules de cancer de l'endomètre, de par la localisation de p190A à l'anneau de cytokinèse que nous avons confirmé (Manukyan et al. 2015 ; Manukyan et al. 2018). Étant donné qu'une grande majorité des mutations retrouvées pour p190A sont des mutations non-sens suggérant une perte de fonction de la protéine, nous avons étudié l'impact d'une perte d'expression, par ARN interférent, sur la prolifération des cellules de cancer de l'endomètre (M. S. Lawrence et al. 2014).

L'extinction de p190A dans des lignées de cancers de l'endomètre exprimant une forme mutée de p190B (AN3Ca) ou une forme mutée de p190A (HEC-1-A) diminue de façon significative la prolifération des cellules cancéreuses. Ces résultats suggèrent donc un rôle oncogénique de p190A déjà démontré dans le cancer colorectal, l'adénocarcinome pulmonaire ou l'ostéosarcome (L. Li et al. 2016 ; Notsuda et al. 2013 ; Zhao et al. 2014).

Ensuite, nous avons évalué les capacités d'invasion des lignées de cancer de l'endomètre, p190A se localisant aux invadosomes (Nakahara et al. 1998 ; Hülsemann et al. 2021). Aucune des lignées cellulaires testées (mutations d'*ARHGAP35* ou d'*ARHGAP5*) ne semble favoriser l'invasion de ces cellules.

Les lignées de cancer de l'endomètre ne sont pas de bons modèles d'étude de l'invasion cellulaire car les MMPs sont peu exprimées en comparaison avec d'autres cancers gynécologiques (Schröpfer et al. 2010).

Cependant, les lignées étudiées sont uniquement des lignées issues de tumeurs de type endométrioïde, de meilleur pronostic. L'étude de cellules provenant de tumeurs de type séreux est une perspective intéressante car ces tumeurs sont plus invasives et présentent un mauvais pronostic. De plus, la présence de mutations de p190A semble avoir un effet protecteur sur la survie de patientes atteintes de cancer de l'endomètre (**Figure 35**). Ainsi, cela expliquerait la quasi absence de dégradation de la MEC observée *in vitro*.

Une stratégie d'extinction totale de p190A ou de p190B est en cours, par une approche de Knock-Out (KO) grâce à la technologie de CRISPR/Cas9. Actuellement, cette stratégie est utilisée avec la lignée HEC-1-A, présentant une forme mutée de p190A. Il serait intéressant de réaliser cette stratégie avec d'autres lignées cellulaires :

- MFE280 : p190A sauvage – p190B sauvage ;
- KLE : p190A sauvage – p190B mutée (mais mutation silencieuse) ;
- AN3Ca : p190A sauvage – p190B mutée ;
- JHUEM2 : p190A mutée – p190B mutée.

L'ajout d'un contrôle de cellules non tumorales d'endomètre serait un contrôle nécessaire mais aucune lignée cellulaire d'endomètre sain n'est utilisée dans la littérature, ni commercialisée. Nous souhaitons donc, grâce à notre collaboration avec le Dr. Sabrina Croce, établir des cultures cellulaires à partir de prélèvements frais de carcinome de l'endomètre (pièce d'hystérectomies).

Lorsque ces modèles cellulaires seront mis en place, nous voulons analyser le rôle de p190A, de p190B et de leurs mutations dans les processus biologiques associés au cancer.

## 2.2. Étude de p190RhoGAP dans des échantillons de tumeurs

Dans le but de corrélérer les niveaux d'expression en ARN et en protéines de p190A et p190B avec le statut mutationnel de ces protéines, nous avons analysé l'expression des protéines p190RhoGAPs.

Alors que l'analyse *in vitro* ne nous permet pas de mettre en évidence de profils distincts entre les lignées mutées pour p190A ou les lignées mutées pour p190B, l'analyse des échantillons d'endomètre montre des tendances (au niveau protéique) voire des variations significatives d'expression (au niveau ARN) de p190RhoGAPs.

L'analyse comparative des échantillons tumoraux et non tumoraux met en évidence une diminution significative de la quantité d'ARNm de p190A et de p190B dans les échantillons tumoraux en comparaison aux échantillons non tumoraux (**Figures 56&57**). De manière intéressante, nous démontrons une corrélation positive entre les quantités d'ARN et de protéines de p190A et de p190B.

La régulation de l'activité RhoGAP par l'interaction de protéines GAP a déjà été identifiée. C'est le cas de p120RasGAP, par exemple, qui en interagissant avec DLC1 inhibe son activité GAP tandis qu'une interaction avec p190A favorise son adressage à la membrane plasmique et son activation (Jaiswal et al. 2014 ; Bradley et al. 2006).

Étant donné l'interaction intermoléculaire p190A/p190B démontrée au cours de ma thèse, ceci suggère une coopération et une potentielle régulation de p190A par p190B et/ou de p190B par p190A. Les hypothèses d'un mécanisme synergique ou d'un mécanisme antagoniste régulant les fonctions associées aux protéines p190RhoGAPs. Toutefois, ces hypothèses restent à explorer.

Nous pouvons noter une différence entre les profils d'expression en ARN et en protéine. La présence de mutations pourrait empêcher le ciblage des microARNs (miARNs) en 3'UTR en entraînant ainsi une augmentation de l'expression. En effet, en s'appariant à des ARNm, les miARNs guident la répression de leur traduction en protéine voire leur dégradation. Des miARNs ciblant l'expression des p190RhoGAP ont été notamment identifiés: miR-20a pour p190A, miR-137, miR-744 ou miR-486-5 pour p190B (Qiang et al. 2014 ; Tian et al. 2020 ;

Fang et al. 2015 ; J. Wang et al. 2014). Par exemple, l'expression de miR-744 et miR-486-5 a été corrélée avec l'expression de p190B et la progression tumorale dans des carcinomes nasopharyngés et cancers du poumon, respectivement (Fang et al. 2015 ; J. Wang et al. 2014).

Par ailleurs, une publication récente a montré la co-existence pour p190A d'un ARN circulaire et d'un ARN linéaire dans des cas de carcinome hépatocellulaire (Y. Li et al. 2021). En effet, les chercheurs ont identifié la présence de ces deux types d'ARN se traduisaient en deux protéines p190A avec des rôles opposés. L'ARN linéaire est traduit en une protéine allant exercer son activité GAP de RhoA et ainsi réguler la migration et l'invasion des cellules cancéreuses. La protéine traduite à partir de l'ARN circulaire a un rôle oncogénique en liant TFII-I, un facteur de transcription qui régule l'expression d'oncogènes activant les processus de prolifération, migration et invasion tumorales.

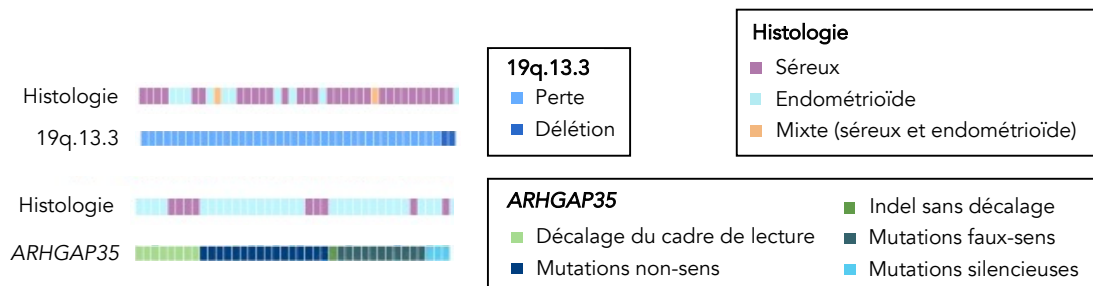
Afin d'évaluer si l'expression de p190RhoGAP est régulée au niveau transcriptionnel ou traductionnel, des analyses de séquençage ARNs des échantillons d'endomètre nous permettrait d'étudier la présence d'ARN et/ou de miARNs en comparant les échantillons tumoraux aux échantillons non tumoraux.

Néanmoins, l'analyse de l'expression protéique de p190RhoGAPs devra être confirmée par de nouveaux Western Blot. Pour cela, l'utilisation d'anticorps ciblant différents épitopes de p190A et de p190B sera réalisée en parallèle.

Toutefois, nous pouvons noter, au niveau de l'expression protéique de p190A, la différence entre les échantillons provenant de tumeurs de type endométrioïde en comparaison avec les cas de tumeurs de type séreux. En effet, les tumeurs endométrioïdes présentent une expression protéique de p190A supérieure à celle des tumeurs séreuses. Ceci est cohérent avec les données sur le site TumorPortal. En effet, pour les cas de cancers de l'endomètre de type endométrioïde, de nombreuses tumeurs présentent des mutations pour le gène *ARHGAP35* (**Figure 60**). Pour les tumeurs de type séreux, une délétion du locus chromosomique où est présent le gène *ARHGAP35* semble être prédominante (**Figure 60**). Ce locus chromosomique, 19q13.3, est connu pour être délété dans de nombreuses tumeurs solides comme le gliome ou des cancers du pancréas, de l'ovaire ou de la thyroïde (Tikoo et al. 2000 ; Wolf et al. 2003 ; Zack et al. 2013). De plus, les tumeurs endométrioïdes ont un



meilleur pronostic que les tumeurs séreuses donc cela confirme l'hypothèse d'un effet protecteur des mutations de p190A.



**Figure 60 : La classification histologique des carcinomes de l'endomètre est liée avec la régulation du gène d'ARHGAP35.**

Les carcinomes de l'endomètre de type séreux présentent majoritairement une perte du locus chromosomique 19q13.3 alors que ceux de type endométrioïde sont plutôt mutés pour *ARHGAP35*. D'après le site TumorPortal.

La classification moléculaire des carcinomes de l'endomètre a mis en évidence un groupe de tumeurs, avec un bon pronostic clinique, présentant des mutations de l'ADN polymérase *POLE* (León-Castillo, Gilvazquez, et al. 2020). Ce groupe est caractérisé par la présence de très nombreuses mutations, plus de 100 mutations/mégabase. Le séquençage des tumeurs pourrait nous indiquer si les mutations du gène *ARHGAP35* sont corrélées avec celles retrouvées pour *POLE*. Si c'est le cas, la présence de mutations d'*ARHGAP35* serait un facteur de meilleur pronostic clinique.

De ce fait, l'accès aux données cliniques des cas de notre cohorte ainsi que le séquençage des gènes *ARHGAP35* et *ARHGAP5* dans ces tumeurs nous permettrait une analyse complète de nos résultats préliminaires. Ensuite, l'analyse de p190A et de p190B dans les tissus par IHC nous donnera des informations concernant la localisation de ces protéines dans les tissus d'endomètre aussi bien au niveau des différentes cellules qui composent le tissu mais aussi au niveau subcellulaire. Enfin, une cohorte de plus grande ampleur est indispensable afin de compléter notre étude en intégrant des cas supplémentaires pour les différents sous-types de cancer de l'endomètre.

**En conclusion, ce travail de thèse a permis d'apporter de nouvelles informations dans la régulation des protéines p190RhoGAPs grâce à l'étude de mutations retrouvées dans les tumeurs.**

**Des approches biochimiques ont fourni de nouvelles connaissances fondamentales sur la régulation et la conformation des protéines p190RhoGAPs. Ainsi, nous proposons un nouveau modèle de régulation de p190RhoGAPs par un changement de conformation alliant des interactions intramoléculaire et intermoléculaire. L'étude de mutations retrouvées dans les tumeurs de l'endomètre a permis d'enrichir ce modèle. Cela nous permet de mieux comprendre l'impact des mutations sur la conformation des protéines, leur régulation mais également sur le comportement des cellules tumorales.**

**Bien que l'ensemble des mécanismes de régulation de p190RhoGAPs ne soient pas élucidés, ce travail de thèse permet d'amener de nouvelles informations concernant l'implication des protéines p190RhoGAPs dans le cancer.**



# Références bibliographiques



- Abercrombie, M., J. E. Heaysman, and S. M. Pegrum. 1970a. 'The Locomotion of Fibroblasts in Culture. I. Movements of the Leading Edge'. *Experimental Cell Research* 59 (3): 393–98. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(70\)90646-4](https://doi.org/10.1016/0014-4827(70)90646-4).
- Abercrombie, M., J. E. Heaysman, and S. M. Pegrum. 1970b. 'The Locomotion of Fibroblasts in Culture. II. "RRuffling"'. *Experimental Cell Research* 60 (3): 437–44. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(70\)90537-9](https://doi.org/10.1016/0014-4827(70)90537-9).
- Abercrombie, M., J. E. Heaysman, and S. M. Pegrum. 1970c. 'The Locomotion of Fibroblasts in Culture. 3. Movements of Particles on the Dorsal Surface of the Leading Lamella'. *Experimental Cell Research* 62 (2): 389–98. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(70\)90570-7](https://doi.org/10.1016/0014-4827(70)90570-7).
- Acevedo, Alejandro, and Christian González-Billault. 2018. 'Crosstalk between Rac1-Mediated Actin Regulation and ROS Production'. *Free Radical Biology & Medicine* 116 (February): 101–13. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.01.008>.
- Aguilar, Byron J., Yaxue Zhao, Huchen Zhou, Shouquan Huo, Yan-Hua Chen, and Qun Lu. 2019. 'Inhibition of Cdc42–Intersectin Interaction by Small Molecule ZCL367 Impedes Cancer Cell Cycle Progression, Proliferation, Migration, and Tumor Growth'. *Cancer Biology & Therapy* 20 (6): 740–49. <https://doi.org/10.1080/15384047.2018.1564559>.
- Ahmad Mokhtar, Ana Masara Binti, Samrein B. M. Ahmed, Nicola J. Darling, Matthew Harris, Helen R. Mott, and Darcera Owen. 2021. 'A Complete Survey of RhoGDI Targets Reveals Novel Interactions with Atypical Small GTPases'. *Biochemistry* 60 (19): 1533–51. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.1c00120>.
- Akula, Murali K., Mohamed X. Ibrahim, Emil G. Ivarsson, Omar M. Khan, Israel T. Kumar, Malin Erlandsson, Christin Karlsson, et al. 2019. 'Protein Prenylation Restrains Innate Immunity by Inhibiting Rac1 Effector Interactions'. *Nature Communications* 10 (1): 3975. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11606-x>.
- Amato, Clelia, Peter A. Thomason, Andrew J. Davidson, Karthic Swaminathan, Shehab Ismail, Laura M. Machesky, and Robert H. Insall. 2019. 'WASP Restricts Active Rac to Maintain Cells' Front-Rear Polarization'. *Current Biology: CB* 29 (24): 4169–4182.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.10.036>.
- Amin, Ehsan, Mamta Jaiswal, Urszula Derewenda, Katarina Reis, Kazem Nouri, Katja T. Koessmeier, Pontus Aspenström, Avril V. Somlyo, Radovan Dvorsky, and Mohammad R. Ahmadian. 2016. 'Deciphering the Molecular and Functional Basis of RHOGAP Family Proteins'. *The Journal of Biological Chemistry* 291 (39): 20353–71. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.736967>.
- Antón, Inés M., Carla Gómez-Oro, Sergio Rivas, and Francisco Wandosell. 2020. 'Crosstalk between WIP and Rho Family GTPases'. *Small GTPases* 11 (3): 160–66. <https://doi.org/10.1080/21541248.2017.1390522>.
- Arrington, Megan E., Brenda Temple, Antje Schaefer, and Sharon L. Campbell. 2020. 'The Molecular Basis for Immune Dysregulation by the Hyperactivated E62K Mutant of the GTPase RAC2'. *The Journal of Biological Chemistry* 295 (34): 12130–42. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.012915>.
- Arthur, William T., Lawrence A. Quilliam, and Jonathan A. Cooper. 2004. 'Rap1 Promotes Cell Spreading by Localizing Rac Guanine Nucleotide Exchange Factors'. *The Journal of Cell Biology* 167 (1): 111–22. <https://doi.org/10.1083/jcb.200404068>.
- Aspenström, Pontus, Aino Ruusala, and Dirk Pacholsky. 2007. 'Taking Rho GTPases to the next Level: The Cellular Functions of Atypical Rho GTPases'. *Experimental Cell Research* 313 (17): 3673–79. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2007.07.022>.

- Bagci, Halil, Neera Sriskandarajah, Amélie Robert, Jonathan Boulais, Islam E. Elkholi, Viviane Tran, Zhen-Yuan Lin, et al. 2020. 'Mapping the Proximity Interaction Network of the Rho-Family GTPases Reveals Signalling Pathways and Regulatory Mechanisms'. *Nature Cell Biology* 22 (1): 120–34. <https://doi.org/10.1038/s41556-019-0438-7>.
- Bao, Hongyu, Fudong Li, Chongyuan Wang, Na Wang, Yiyang Jiang, Yajun Tang, Jihui Wu, and Yunyu Shi. 2016. 'Structural Basis for the Specific Recognition of RhoA by the Dual GTPase-Activating Protein ARAP3'. *The Journal of Biological Chemistry* 291 (32): 16709–19. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.736140>.
- Bao, Yulong, Takei Kake, Akira Hanashima, Yui Nomiya, Kaoru Kubokawa, and Sumiko Kimura. 2012. 'Actin Capping Proteins, CapZ ( $\beta$ -Actinin) and Tropomodulin in Amphioxus Striated Muscle'. *Gene* 510 (1): 78–86. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2012.07.081>.
- Basbous, Sara, Roberta Azzarelli, Emilie Pacary, and Violaine Moreau. 2020. 'Pathophysiological Functions of Rnd Proteins'. *Small GTPases* 0 (0): 1–22. <https://doi.org/10.1080/21541248.2020.1829914>.
- Bass, Mark D., Mark R. Morgan, Kirsty A. Roach, Jeffrey Settleman, Andrew B. Goryachev, and Martin J. Humphries. 2008. 'P190RhoGAP Is the Convergence Point of Adhesion Signals from Alpha 5 Beta 1 Integrin and Syndecan-4'. *The Journal of Cell Biology* 181 (6): 1013–26. <https://doi.org/10.1083/jcb.200711129>.
- Beaty, Brian T., Ved P. Sharma, Jose J. Bravo-Cordero, Mark A. Simpson, Robert J. Eddy, Anthony J. Koleske, and John Condeelis. 2013. 'B1 Integrin Regulates Arg to Promote Invadopodial Maturation and Matrix Degradation'. *Molecular Biology of the Cell* 24 (11): 1661–75. <https://doi.org/10.1091/mbc.E12-12-0908>.
- Beco, S. de, K. Vaidžiulytė, J. Manzi, F. Dalier, F. di Federico, G. Cornilleau, M. Dahan, and M. Coppey. 2018. 'Optogenetic Dissection of Rac1 and Cdc42 Gradient Shaping'. *Nature Communications* 9 (1): 4816. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07286-8>.
- Berdeaux, Rebecca L., Begoña Díaz, Lomi Kim, and G. Steven Martin. 2004. 'Active Rho Is Localized to Podosomes Induced by Oncogenic Src and Is Required for Their Assembly and Function'. *The Journal of Cell Biology* 166 (3): 317–23. <https://doi.org/10.1083/jcb.200312168>.
- Bidaud-Meynard, Aurélien, Fabien Binamé, Valérie Lagrée, and Violaine Moreau. 2017. 'Regulation of Rho GTPase Activity at the Leading Edge of Migrating Cells by P190RhoGAP'. *Small GTPases* 10 (2): 99–110. <https://doi.org/10.1080/21541248.2017.1280584>.
- Billottet, Clotilde, Patricia Rottiers, Florence Tatin, Christine Varon, Edith Reuzeau, Jean-Léon Maître, Frédéric Saltel, Violaine Moreau, and Elisabeth Génot. 2008. 'Regulatory Signals for Endothelial Podosome Formation'. *European Journal of Cell Biology, FEBS Workshop: Invadopodia, Podosomes and Focal Adhesions in Tissue Invasion*, 87 (8): 543–54. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2008.02.006>.
- Binamé, Fabien, Aurélien Bidaud-Meynard, Laure Magnan, Léo Piquet, Bertille Montibus, Anne Chabadel, Frédéric Saltel, Valérie Lagrée, and Violaine Moreau. 2016. 'Cancer-Associated Mutations in the Protrusion-Targeting Region of P190RhoGAP Impact Tumor Cell Migration'. *The Journal of Cell Biology* 214 (7): 859–73. <https://doi.org/10.1083/jcb.201601063>.
- Biou, Valérie, and Jacqueline Cherfils. 2004. 'Structural Principles for the Multispecificity of Small GTP-Binding Proteins'. *Biochemistry* 43 (22): 6833–40. <https://doi.org/10.1021/bi049630u>.
- Bischoff, F. R., and H. Ponstingl. 1991. 'Catalysis of Guanine Nucleotide Exchange on Ran by the Mitotic Regulator RCC1'. *Nature* 354 (6348): 80–82. <https://doi.org/10.1038/354080a0>.
- 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>.

- Blangy, Anne, and Philippe Fort. 2013. 'Chapter Eight - Targeting the Dbl and Dock-Family RhoGEFs: A Yeast-Based Assay to Identify Cell-Active Inhibitors of Rho-Controlled Pathways'. In *The Enzymes*, edited by Fuyuhiko Tamanoi, 33:169–91. Inhibitors of the Ras Superfamily G-Proteins, Part A. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416749-0.00008-7>.
- Bodakuntla, Satish, A. S. Jijumon, Cristopher Villablanca, Christian Gonzalez-Billault, and Carsten Janke. 2019. 'Microtubule-Associated Proteins: Structuring the Cytoskeleton'. *Trends in Cell Biology* 29 (10): 804–19. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2019.07.004>.
- Boissier, P., and U. Huynh-Do. 2014. 'The Guanine Nucleotide Exchange Factor Tiam1: A Janus-Faced Molecule in Cellular Signaling'. *Cellular Signalling* 26 (3): 483–91. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2013.11.034>.
- Bonet, R., L. Ruiz, E. Aragón, P. Martín-Malpartida, and M. J. Macias. 2009. 'NMR Structural Studies on Human P190-A RhoGAPFF1 Revealed That Domain Phosphorylation by the PDGF-Receptor Alpha Requires Its Previous Unfolding'. *Journal of Molecular Biology* 389 (2): 230–37. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2009.04.035>.
- Booth, Alexander J. R., Guy B. Blanchard, Richard J. Adams, and Katja Röper. 2014. 'A Dynamic Microtubule Cytoskeleton Directs Medial Actomyosin Function during Tube Formation'. *Developmental Cell* 29 (5): 562–76. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2014.03.023>.
- Bos, Johannes L., Holger Rehmann, and Alfred Wittinghofer. 2007. 'GEFs and GAPs: Critical Elements in the Control of Small G Proteins'. *Cell* 129 (5): 865–77. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.05.018>.
- Boudhraa, Zied, Euridice Carmona, Diane Provencher, and Anne-Marie Mes-Masson. 2020. 'Ran GTPase: A Key Player in Tumor Progression and Metastasis'. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 8: 345. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00345>.
- Boulter, Etienne, Rafael Garcia-Mata, Christophe Guilluy, Adi Dubash, Guendalina Rossi, Patrick J. Brennwald, and Keith Burridge. 2010. 'Regulation of Rho GTPase Crosstalk, Degradation and Activity by RhoGDI1'. *Nature Cell Biology* 12 (5): 477–83. <https://doi.org/10.1038/ncb2049>.
- Boulter, Etienne, Dominique Grall, Sébastien Cagnol, and Ellen Van Obberghen-Schilling. 2006. 'Regulation of Cell-Matrix Adhesion Dynamics and Rac-1 by Integrin Linked Kinase'. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 20 (9): 1489–91. <https://doi.org/10.1096/fj.05-4579fje>.
- Bourne, Henry R., David A. Sanders, and Frank McCormick. 1990. 'The GTPase Superfamily: A Conserved Switch for Diverse Cell Functions'. *Nature* 348 (6297): 125–32. <https://doi.org/10.1038/348125a0>.
- Bourne, Henry R., David A. Sanders, and Frank McCormick. 1991. 'The GTPase Superfamily: Conserved Structure and Molecular Mechanism'. *Nature* 349 (6305): 117–27. <https://doi.org/10.1038/349117a0>.
- Bradley, Alexander O., Christina L. Vizcarra, Hannah M. Bailey, and Margot E. Quinlan. 2020. 'Spire Stimulates Nucleation by Cappuccino and Binds Both Ends of Actin Filaments'. *Molecular Biology of the Cell* 31 (4): 273–86. <https://doi.org/10.1091/mbc.E19-09-0550>.
- Bradley, William D., Samuel E. Hernández, Jeffrey Settleman, and Anthony J. Koleske. 2006. 'Integrin Signaling through Arg Activates P190RhoGAP by Promoting Its Binding to P120RasGAP and Recruitment to the Membrane'. *Molecular Biology of the Cell* 17 (11): 4827–36. <https://doi.org/10.1091/mbc.e06-02-0132>.
- Branch, Kevin M., Daisuke Hoshino, and Alissa M. Weaver. 2012. 'Adhesion Rings Surround Invadopodia and Promote Maturation'. *Biology Open* 1 (8): 711–22. <https://doi.org/10.1242/bio.20121867>.



- Bravo-Cordero, Jose Javier, Matthew Oser, Xiaoming Chen, Robert Eddy, Louis Hodgson, and John Condeelis. 2011. 'A Novel Spatiotemporal RhoC Activation Pathway Locally Regulates Cofilin Activity at Invadopodia'. *Current Biology: CB* 21 (8): 635–44. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.03.039>.
- Bray, Kristi, Melissa Gillette, Jeanette Young, Elizabeth Loughran, Melissa Hwang, James Cooper Sears, and Tracy Vargo-Gogola. 2013. 'Cdc42 Overexpression Induces Hyperbranching in the Developing Mammary Gland by Enhancing Cell Migration'. *Breast Cancer Research: BCR* 15 (5): R91. <https://doi.org/10.1186/bcr3487>.
- Bros, Matthias, Katharina Haas, Lorna Moll, and Stephan Grabbe. 2019. 'RhoA as a Key Regulator of Innate and Adaptive Immunity'. *Cells* 8 (7): E733. <https://doi.org/10.3390/cells8070733>.
- Brunet, Nicolas, Annie Morin, and Birgitta Olofsson. 2002. 'RhoGDI-3 Regulates RhoG and Targets This Protein to the Golgi Complex through Its Unique N-Terminal Domain'. *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 3 (5): 342–57. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0854.2002.30504.x>.
- Bryce, Nicole S., Emily S. Clark, Ja'Mes L. Leysath, Joshua D. Currie, Donna J. Webb, and Alissa M. Weaver. 2005. 'Cortactin Promotes Cell Motility by Enhancing Lamellipodial Persistence'. *Current Biology: CB* 15 (14): 1276–85. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.06.043>.
- Burgstaller, Gerald, and Mario Gimona. 2004. 'Actin Cytoskeleton Remodelling via Local Inhibition of Contractility at Discrete Microdomains'. *Journal of Cell Science* 117 (2): 223–31. <https://doi.org/10.1242/jcs.00839>.
- Burridge, Keith, and Christophe Guilly. 2016. 'Focal Adhesions, Stress Fibers and Mechanical Tension'. *Experimental Cell Research* 343 (1): 14–20. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2015.10.029>.
- Burridge, Keith, and Krister Wennerberg. 2004. 'Rho and Rac Take Center Stage'. *Cell* 116 (2): 167–79. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(04\)00003-0](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(04)00003-0).
- Buschman, Matthew D., Paul A. Bromann, Pilar Cejudo-Martin, Fang Wen, Ian Pass, and Sara A. Courtneidge. 2009. 'The Novel Adaptor Protein Tks4 (SH3PXD2B) Is Required for Functional Podosome Formation'. *Molecular Biology of the Cell* 20 (5): 1302–11. <https://doi.org/10.1091/mbc.e08-09-0949>.
- Bustos, Rodrigo I., Marie-Annick Forget, Jeffrey E. Settleman, and Steen H. Hansen. 2008. 'Coordination of Rho and Rac GTPase Function via P190B RhoGAP'. *Current Biology: CB* 18 (20): 1606–11. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.09.019>.
- Cai, Juntong, Miranda K. Culley, Yutong Zhao, and Jing Zhao. 2018. 'The Role of Ubiquitination and Deubiquitination in the Regulation of Cell Junctions'. *Protein & Cell* 9 (9): 754–69. <https://doi.org/10.1007/s13238-017-0486-3>.
- Calvayrac, Olivier, Anne Pradines, and Gilles Favre. 2018. 'RHOB Expression Controls the Activity of Serine/Threonine Protein Phosphatase PP2A to Modulate Mesenchymal Phenotype and Invasion in Non-Small Cell Lung Cancers'. *Small GTPases* 9 (4): 339–44. <https://doi.org/10.1080/21541248.2016.1234429>.
- 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>.
- Carazo-Salas, R. E., O. J. Gruss, I. W. Mattaj, and E. Karsenti. 2001. 'Ran-GTP Coordinates Regulation of Microtubule Nucleation and Dynamics during Mitotic-Spindle Assembly'. *Nature Cell Biology* 3 (3): 228–34. <https://doi.org/10.1038/35060009>.
- Cassandri, Matteo, Artem Smirnov, Flavia Novelli, Consuelo Pitolli, Massimiliano Agostini, Michal Malewicz, Gerry Melino, and Giuseppe Raschella. 2017. 'Zinc-Finger Proteins in Health and Disease'. *Cell Death Discovery* 3 (1): 1–12. <https://doi.org/10.1038/cddiscovery.2017.71>.

- Castillo-Lluva, Sonia, Michael H. Tatham, Richard C. Jones, Ellis G. Jaffray, Ricky D. Edmondson, Ronald T. Hay, and Angeliki Malliri. 2010. 'SUMOylation of the GTPase Rac1 Is Required for Optimal Cell Migration'. *Nature Cell Biology* 12 (11): 1078–85. <https://doi.org/10.1038/ncb2112>.
- Cau, Julien, and Alan Hall. 2005. 'Cdc42 Controls the Polarity of the Actin and Microtubule Cytoskeletons through Two Distinct Signal Transduction Pathways'. *Journal of Cell Science* 118 (Pt 12): 2579–87. <https://doi.org/10.1242/jcs.02385>.
- Cerutti, Camilla, and Anne J. Ridley. 2017. 'Endothelial Cell-Cell Adhesion and Signaling'. *Experimental Cell Research* 358 (1): 31–38. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2017.06.003>.
- Chabadel, Anne, Inmaculada Bañon-Rodríguez, David Cluet, Brian B. Rudkin, Bernhard Wehrle-Haller, Elisabeth Genot, Pierre Jurdic, Ines M. Anton, and Frédéric Saltel. 2007. 'CD44 and B3 Integrin Organize Two Functionally Distinct Actin-Based Domains in Osteoclasts'. *Molecular Biology of the Cell* 18 (12): 4899–4910. <https://doi.org/10.1091/mbc.E07-04-0378>.
- Chang, Fumin, Christopher Lemmon, Daniel Lietha, Michael Eck, and Lewis Romer. 2011. 'Tyrosine Phosphorylation of Rac1: A Role in Regulation of Cell Spreading'. *PLOS ONE* 6 (12): e28587. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028587>.
- Chang, Huang-Ming, Yu-Ying Lin, Pei-Chun Tsai, Chung-Tiang Liang, and Yu-Ting Yan. 2014. 'The FYVE Domain of Smad Anchor for Receptor Activation (SARA) Is Required to Prevent Skin Carcinogenesis, but Not in Mouse Development'. *PloS One* 9 (8): e105299. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105299>.
- Chang, Leifu, Jing Yang, Chang Hwa Jo, Andreas Boland, Ziguo Zhang, Stephen H. McLaughlin, Afnan Abu-Thuraia, et al. 2020. 'Structure of the DOCK2-ELMO1 Complex Provides Insights into Regulation of the Auto-Inhibited State'. *Nature Communications* 11 (1): 3464. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17271-9>.
- 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>.
- Cheng, Kwai W., John P. Lahad, Joseph W. Gray, and Gordon B. Mills. 2005. 'Emerging Role of RAB GTPases in Cancer and Human Disease'. *Cancer Research* 65 (7): 2516–19. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-0573>.
- Chereau, David, Malgorzata Boczkowska, Aneta Skwarek-Maruszczyńska, Ikuko Fujiwara, David B. Hayes, Grzegorz Rebowski, Pekka Lappalainen, Thomas D. Pollard, and Roberto Dominguez. 2008. 'Leiomodin Is an Actin Filament Nucleator in Muscle Cells'. *Science (New York, N.Y.)* 320 (5873): 239–43. <https://doi.org/10.1126/science.1155313>.
- Cherfils, Jacqueline, and Mahel Zeghouf. 2013. 'Regulation of Small GTPases by GEFs, GAPs, and GDIs'. *Physiological Reviews* 93 (1): 269–309. <https://doi.org/10.1152/physrev.00003.2012>.
- Chhabra, Ekta Seth, and Henry N. Higgs. 2007. 'The Many Faces of Actin: Matching Assembly Factors with Cellular Structures'. *Nature Cell Biology* 9 (10): 1110–21. <https://doi.org/10.1038/ncb1007-1110>.
- Chiba, Shigeru, Terukazu Enami, Seishi Ogawa, and Mamiko Sakata-Yanagimoto. 2015. 'G17V RHOA: Genetic Evidence of GTP-Unbound RHOA Playing a Role in Tumorigenesis in T Cells'. *Small GTPases* 6 (2): 100–103. <https://doi.org/10.4161/21541248.2014.988088>.
- Clayton, Natasha S., and Anne J. Ridley. 2020. 'Targeting Rho GTPase Signaling Networks in Cancer'. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 8: 222. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00222>.
- Colicelli, John. 2004. 'Human RAS Superfamily Proteins and Related GTPases'. *Science's STKE : Signal Transduction Knowledge Environment* 2004 (250): RE13. <https://doi.org/10.1126/stke.2502004re13>.

- Colombo, Ilaria, Eleonora Zaccarelli, Maria Del Grande, Federica Tomao, Francesco Multinu, Ilaria Betella, Jonathan A Ledermann, Antonio Gonzalez-Martin, Cristiana Sessa, and Nicoletta Colombo. 2020. 'ESMO Management and Treatment Adapted Recommendations in the COVID-19 Era: Gynaecological Malignancies'. *ESMO Open* 5 (Suppl 3): e000827. <https://doi.org/10.1136/esmooopen-2020-000827>.
- Cook, Danielle R., Kent L. Rossman, and Channing J. Der. 2014. 'Rho Guanine Nucleotide Exchange Factors: Regulators of Rho GTPase Activity in Development and Disease'. *Oncogene* 33 (31): 4021–35. <https://doi.org/10.1038/onc.2013.362>.
- Cortes, Jose R., Alberto Ambesi-Impiombato, Lucile Couronné, S. Aidan Quinn, Christine S. Kim, Ana Carolina da Silva Almeida, Zachary West, et al. 2018. 'RHOA G17V Induces T Follicular Helper Cell Specification and Promotes Lymphomagenesis'. *Cancer Cell* 33 (2): 259-273.e7. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.01.001>.
- Côté, Jean-François, Andrea B. Motoyama, Jason A. Bush, and Kristiina Vuori. 2005. 'A Novel and Evolutionarily Conserved PtdIns(3,4,5)P3-Binding Domain Is Necessary for DOCK180 Signaling'. *Nature Cell Biology* 7 (8): 797–807. <https://doi.org/10.1038/ncb1280>.
- Côté, Jean-François, and Kristiina Vuori. 2002. 'Identification of an Evolutionarily Conserved Superfamily of DOCK180-Related Proteins with Guanine Nucleotide Exchange Activity'. *Journal of Cell Science* 115 (24): 4901–13. <https://doi.org/10.1242/jcs.00219>.
- Cramer, Louise P. 2013. 'Mechanism of Cell Rear Retraction in Migrating Cells'. *Current Opinion in Cell Biology* 25 (5): 591–99. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2013.05.001>.
- Crimaldi, Luca, Sara A. Courtneidge, and Mario Gimona. 2009. 'Tks5 Recruits AFAP-110, P190RhoGAP, and Cortactin for Podosome Formation'. *Experimental Cell Research* 315 (15): 2581–92. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2009.06.012>.
- Davis, Matthew J., Byung Hak Ha, Edna C. Holman, Ruth Halaban, Joseph Schlessinger, and Titus J. Boggon. 2013. 'RAC1P29S Is a Spontaneously Activating Cancer-Associated GTPase'. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110 (3): 912–17. <https://doi.org/10.1073/pnas.1220895110>.
- De La Cruz, E. M., A. Mandinova, M. O. Steinmetz, D. Stoffler, U. Aebi, and T. D. Pollard. 2000. 'Polymerization and Structure of Nucleotide-Free Actin Filaments'. *Journal of Molecular Biology* 295 (3): 517–26. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1999.3390>.
- Del Pozo, Miguel Angel, William B. Kiosses, Nazilla B. Alderson, Nahum Meller, Klaus M. Hahn, and Martin Alexander Schwartz. 2002. 'Integrins Regulate GTP-Rac Localized Effector Interactions through Dissociation of Rho-GDI'. *Nature Cell Biology* 4 (3): 232–39. <https://doi.org/10.1038/ncb759>.
- Derewenda, Urszula, Arkadiusz Oleksy, Andra S. Stevenson, Justyna Korczynska, Zbigniew Dauter, Andrew P. Somlyo, Jacek Otlewski, Avril V. Somlyo, and Zygmunt S. Derewenda. 2004. 'The Crystal Structure of RhoA in Complex with the DH/PH Fragment of PDZRhoGEF, an Activator of the Ca<sup>2+</sup> Sensitization Pathway in Smooth Muscle'. *Structure* 12 (11): 1955–65. <https://doi.org/10.1016/j.str.2004.09.003>.
- DerMardirossian, Céline, Andreas Schnelzer, and Gary M. Bokoch. 2004. 'Phosphorylation of RhoGDI by Pak1 Mediates Dissociation of Rac GTPase'. *Molecular Cell* 15 (1): 117–27. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.05.019>.
- Destaing, Olivier, Emmanuelle Planus, Daniel Bouvard, Christiane Oddou, Cedric Badowski, Valentine Bossy, Aurelia Raducanu, Bertrand Fourcade, Corinne Albiges-Rizo, and Marc R. Block. 2010. 'B1A Integrin Is a Master Regulator of Invadosome Organization and Function'. *Molecular Biology of the Cell* 21 (23): 4108–19. <https://doi.org/10.1091/mbc.E10-07-0580>.

- Di Martino, Julie, Elodie Henriët, Zakaria Ezzoukhry, Jacky G. Goetz, Violaine Moreau, and Frederic Saltel. 2016. 'The Microenvironment Controls Invadosome Plasticity'. *Journal of Cell Science* 129 (9): 1759–68. <https://doi.org/10.1242/jcs.182329>.
- Di Martino, Julie, Lisa Paysan, Caroline Gest, Valérie Lagrée, Amélie Juin, Frédéric Saltel, and Violaine Moreau. 2014. 'Cdc42 and Tks5: A Minimal and Universal Molecular Signature for Functional Invadosomes'. *Cell Adhesion & Migration* 8 (3): 280–92. <https://doi.org/10.4161/cam.28833>.
- Diaz, Begoña, Gidon Shani, Ian Pass, Diana Anderson, Manuela Quintavalle, and Sara A. Courtneidge. 2009. 'Tks5-Dependent, Nox-Mediated Generation of Reactive Oxygen Species Is Necessary for Invadopodia Formation'. *Science Signaling* 2 (88): ra53. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2000368>.
- Ding, Baojin, and Masood Sepelhirmanesh. 2021. 'Nucleocytoplasmic Transport: Regulatory Mechanisms and the Implications in Neurodegeneration'. *International Journal of Molecular Sciences* 22 (8): 4165. <https://doi.org/10.3390/ijms22084165>.
- Dominguez, Roberto, and Kenneth C. Holmes. 2011. 'Actin Structure and Function'. *Annual Review of Biophysics* 40: 169–86. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-042910-155359>.
- Dong, Guoying, Bo Wang, Yifei An, Juan Li, Xin Wang, Jihui Jia, and Qing Yang. 2018. 'SIRT1 Suppresses the Migration and Invasion of Gastric Cancer by Regulating ARHGAP5 Expression'. *Cell Death & Disease* 9 (10): 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-1033-8>.
- Dong, Zizheng, and Jian-Ting Zhang. 2006. 'Initiation Factor EIF3 and Regulation of mRNA Translation, Cell Growth, and Cancer'. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 59 (3): 169–80. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2006.03.005>.
- Donnelly, Sara K., Ina Weisswange, Markus Zettl, and Michael Way. 2013. 'WIP Provides an Essential Link between Nck and N-WASP during Arp2/3-Dependent Actin Polymerization'. *Current Biology: CB* 23 (11): 999–1006. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.04.051>.
- Dovas, Athanassios, Youngsil Choi, Atsuko Yoneda, Hinke A. B. Multhaupt, Seung-Hae Kwon, Dongmin Kang, Eok-Soo Oh, and John R. Couchman. 2010. 'Serine 34 Phosphorylation of Rho Guanine Dissociation Inhibitor (RhoGDI $\alpha$ ) Links Signaling from Conventional Protein Kinase C to RhoGTPase in Cell Adhesion'. *The Journal of Biological Chemistry* 285 (30): 23296–308. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.098129>.
- Dransart, Estelle, Annie Morin, Jacqueline Cherfils, and Birgitta Olofsson. 2005. 'Uncoupling of Inhibitory and Shuttling Functions of Rho GDP Dissociation Inhibitors'. *The Journal of Biological Chemistry* 280 (6): 4674–83. <https://doi.org/10.1074/jbc.M409741200>.
- Duan, Lei, Srikumar M. Raja, Gengsheng Chen, Sumeet Virmani, Stetson H. Williams, Robert J. Clubb, Chandrani Mukhopadhyay, et al. 2011. 'Negative Regulation of EGFR-Vav2 Signaling Axis by Cbl Ubiquitin Ligase Controls EGF Receptor-Mediated Epithelial Cell Adherens Junction Dynamics and Cell Migration'. *The Journal of Biological Chemistry* 286 (1): 620–33. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.188086>.
- Dubash, A., K. Wennerberg, R. Garcia-Mata, M. Menold, W. Arthur, and K. Burridge. 2007. 'A Novel Role for Lsc/P115 RhoGEF and LARG in Regulating RhoA Activity Downstream of Adhesion to Fibronectin'. *Journal of Cell Science*. <https://doi.org/10.1242/jcs.003806>.
- Eberth, Alexander, Richard Lundmark, Lothar Gremer, Radovan Dvorsky, Katja T. Koessmeier, Harvey T. McMahon, and Mohammad Reza Ahmadian. 2009. 'A BAR Domain-Mediated Autoinhibitory Mechanism for RhoGAPs of the GRAF Family'. *The Biochemical Journal* 417 (1): 371–77. <https://doi.org/10.1042/BJ20081535>.
- El Atat, Oula, Amira Fakhri, and Mirvat El-Sibai. 2019. 'RHOG Activates RAC1 through CDC42 Leading to Tube Formation in Vascular Endothelial Cells'. *Cells* 8 (2): E171. <https://doi.org/10.3390/cells8020171>.

- Ellerbroek, Shawn M., Krister Wennerberg, and Keith Burridge. 2003. 'Serine Phosphorylation Negatively Regulates RhoA in Vivo\*'. *Journal of Biological Chemistry* 278 (21): 19023–31. <https://doi.org/10.1074/jbc.M213066200>.
- Elders, Margitta, Sandra Beck, Anna Fotinos, Melanie Ziegler, and Meinrad Gawaz. 2012. 'The GRAF Family Member Oligophrenin1 Is a RhoGAP with BAR Domain and Regulates Rho GTPases in Platelets'. *Cardiovascular Research* 94 (3): 526–36. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvs079>.
- Endo, Makoto, Joseph E. Druso, and Richard A. Cerione. 2020. 'The Two Splice Variant Forms of Cdc42 Exert Distinct and Essential Functions in Neurogenesis'. *The Journal of Biological Chemistry* 295 (14): 4498–4512. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.011837>.
- Etienne-Manneville, Sandrine. 2018. 'Cytoplasmic Intermediate Filaments in Cell Biology'. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 34 (October): 1–28. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100617-062534>.
- Ezzoukhry, Zakaria, Elodie Henriët, Fabrice P. Cordelières, Jean-William Dupuy, Marlène Maître, Nathan Gay, Sylvaine Di-Tommaso, et al. 2018. 'Combining Laser Capture Microdissection and Proteomics Reveals an Active Translation Machinery Controlling Invadosome Formation'. *Nature Communications* 9 (1): 2031. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04461-9>.
- Fang, Yuan, Xiaoxia Zhu, Jian Wang, Na Li, Dianhe Li, Nazmus Sakib, Zhou Sha, and Wen Song. 2015. 'MiR-744 Functions as a Proto-Oncogene in Nasopharyngeal Carcinoma Progression and Metastasis via Transcriptional Control of ARHGAP5'. *Oncotarget* 6 (15): 13164–75. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3754>.
- Fazio, Antonietta, Eric Owusu Obeng, Isabella Rusciano, Maria Vittoria Marvi, Matteo Zoli, Sara Mongiorgi, Giulia Ramazzotti, et al. 2020. 'Subcellular Localization Relevance and Cancer-Associated Mechanisms of Diacylglycerol Kinases'. *International Journal of Molecular Sciences* 21 (15): E5297. <https://doi.org/10.3390/ijms21155297>.
- Fiegen, Dennis, Lars-Christian Haeusler, Lars Blumenstein, Ulrike Herbrand, Radovan Dvorsky, Ingrid R. Vetter, and Mohammad R. Ahmadian. 2004. 'Alternative Splicing of Rac1 Generates Rac1b, a Self-Activating GTPase'. *The Journal of Biological Chemistry* 279 (6): 4743–49. <https://doi.org/10.1074/jbc.M310281200>.
- Field, Christine M., and Péter Lénárt. 2011. 'Bulk Cytoplasmic Actin and Its Functions in Meiosis and Mitosis'. *Current Biology: CB* 21 (19): R825–830. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.07.043>.
- Fiévet, Bruno, Daniel Louvard, and Monique Arpin. 2007. 'ERM Proteins in Epithelial Cell Organization and Functions'. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1773 (5): 653–60. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.06.013>.
- Filipenko, Nolan R., Sarah Attwell, Calvin Roskelley, and Shoukat Dedhar. 2005. 'Integrin-Linked Kinase Activity Regulates Rac- and Cdc42-Mediated Actin Cytoskeleton Reorganization via Alpha-PIX'. *Oncogene* 24 (38): 5837–49. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208737>.
- Finlin, B. S., C. L. Gau, G. A. Murphy, H. Shao, T. Kimel, R. S. Seitz, Y. F. Chiu, et al. 2001. 'RERG Is a Novel Ras-Related, Estrogen-Regulated and Growth-Inhibitory Gene in Breast Cancer'. *The Journal of Biological Chemistry* 276 (45): 42259–67. <https://doi.org/10.1074/jbc.M105888200>.
- Ford, Bradley, Karlheinz Skowronek, Sean Boykevisch, Dafna Bar-Sagi, and Nicolas Nassar. 2005. 'Structure of the G60A Mutant of Ras: Implications for the Dominant Negative Effect'. *The Journal of Biological Chemistry* 280 (27): 25697–705. <https://doi.org/10.1074/jbc.M502240200>.
- Frank, Scott R., Clemens P. Köllmann, Phi Luong, Giorgio G. Galli, Lihua Zou, André Bernards, Gad Getz, Raffaele A. Calogero, Morten Frödin, and Steen H. Hansen. 2018. 'P190 RhoGAP Promotes Contact Inhibition in Epithelial Cells by Repressing YAP Activity'. *The Journal of Cell Biology* 217 (9): 3183–3201. <https://doi.org/10.1083/jcb.201710058>.

- Friesland, Amy, Yaxue Zhao, Yan-Hua Chen, Lie Wang, Huchen Zhou, and Qun Lu. 2013. 'Small Molecule Targeting Cdc42–Intersectin Interaction Disrupts Golgi Organization and Suppresses Cell Motility'. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110 (4): 1261–66. <https://doi.org/10.1073/pnas.1116051110>.
- Fritz, G., C. Brachetti, F. Bahlmann, M. Schmidt, and B. Kaina. 2002. 'Rho GTPases in Human Breast Tumours: Expression and Mutation Analyses and Correlation with Clinical Parameters'. *British Journal of Cancer* 87 (6): 635–44. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6600510>.
- Fritz, Gerhard, Ingo Just, and Bernd Kaina. 1999. 'Rho GTPases Are Over-Expressed in Human Tumors'. *International Journal of Cancer* 81 (5): 682–87. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0215\(19990531\)81:5<682::AID-IJC2>3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0215(19990531)81:5<682::AID-IJC2>3.0.CO;2-B).
- Fujiwara, Ikuko, Shiro Suetsugu, Sotaro Uemura, Tadaomi Takenawa, and Shin'ichi Ishiwata. 2002. 'Visualization and Force Measurement of Branching by Arp2/3 Complex and N-WASP in Actin Filament'. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 293 (5): 1550–55. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(02\)00421-7](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(02)00421-7).
- Gao, Yuan, J. Bradley Dickerson, Fukun Guo, Jie Zheng, and Yi Zheng. 2004. 'Rational Design and Characterization of a Rac GTPase-Specific Small Molecule Inhibitor'. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (20): 7618–23. <https://doi.org/10.1073/pnas.0307512101>.
- García, Esther, Gareth E. Jones, Laura M. Machesky, and Inés M. Antón. 2012. 'WIP: WASP-Interacting Proteins at Invadopodia and Podosomes'. *European Journal of Cell Biology* 91 (11–12): 869–77. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2012.06.002>.
- García, Esther, Chiara Ragazzini, Xinzi Yu, Elena Cuesta-García, Jorge Bernardino de la Serna, Tobias Zech, David Sarrió, Laura M. Machesky, and Inés M. Antón. 2016. 'WIP and WICH/WIRE Co-Ordinately Control Invadopodium Formation and Maturation in Human Breast Cancer Cell Invasion'. *Scientific Reports* 6 (1): 23590. <https://doi.org/10.1038/srep23590>.
- Garcia-Guzman, Miguel, Fabrizio Dolfi, Michael Russello, and Kristiina Vuori. 1999. 'Cell Adhesion Regulates the Interaction between the Docking Protein P130Cas and the 14-3-3 Proteins \*'. *Journal of Biological Chemistry* 274 (9): 5762–68. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.9.5762>.
- Garcia-Mata, Rafael, Etienne Boulter, and Keith Burridge. 2011. 'The "Invisible Hand": Regulation of RHO GTPases by RHOGDIs'. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 12 (8): 493–504. <https://doi.org/10.1038/nrm3153>.
- Garrett, M D, A J Self, C van Oers, and A Hall. 1989. 'Identification of Distinct Cytoplasmic Targets for Ras/R-Ras and Rho Regulatory Proteins'. *Journal of Biological Chemistry* 264 (1): 10–13. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)31215-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)31215-2).
- Gasper, Raphael, and Fred Wittinghofer. 2020. 'The Ras Switch in Structural and Historical Perspective'. *Biological Chemistry* 401 (1): 143–63. <https://doi.org/10.1515/hsz-2019-0330>.
- Gemble, Simon, Anthony Simon, Carole Pennetier, Marie Dumont, Solène Hervé, Franz Meitinger, Karen Oegema, et al. 2019. 'Centromere Dysfunction Compromises Mitotic Spindle Pole Integrity'. *Current Biology: CB* 29 (18): 3072–3080.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.07.052>.
- Genestie, Catherine, Alexandra Leary, Mojgan Devouassoux, and Aurélie Auguste. 2017. 'Classification histologique et moléculaire des cancers de l'endomètre et leurs implications dans la thérapeutique'. *Bulletin du Cancer* 104 (12): 1001–12. <https://doi.org/10.1016/j.bulcan.2017.08.004>.
- Genna, Alessandro, Stefanie Lapetina, Nikola Lukic, Shams Twafra, Tomer Meirson, Ved P. Sharma, John S. Condeelis, and Hava Gil-Henn. 2018. 'Pyk2 and FAK Differentially Regulate Invadopodia Formation and Function in Breast Cancer Cells'. *The Journal of Cell Biology* 217 (1): 375–95. <https://doi.org/10.1083/jcb.201702184>.

- Georgess, Dan, Irma Machuca-Gayet, Anne Blangy, and Pierre Jurdic. 2014. 'Podosome Organization Drives Osteoclast-Mediated Bone Resorption'. *Cell Adhesion & Migration* 8 (3): 191–204. <https://doi.org/10.4161/cam.27840>.
- Gonzalez, David M., and Damian Medici. 2014. 'Signaling Mechanisms of the Epithelial-Mesenchymal Transition'. *Science Signaling* 7 (344): re8. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2005189>.
- Gorelik, Anna, Tamar Sapir, Lih Ben-Reuven, and Orly Reiner. 2018. 'Complement C3 Affects Rac1 Activity in the Developing Brain'. *Frontiers in Molecular Neuroscience* 11: 150. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00150>.
- Grizot, S., J. Fauré, F. Fieschi, P. V. Vignais, M. C. Dagher, and E. Pebay-Peyroula. 2001. 'Crystal Structure of the Rac1-RhoGDI Complex Involved in NADPH Oxidase Activation'. *Biochemistry* 40 (34): 10007–13. <https://doi.org/10.1021/bi010288k>.
- Gryaznova, Tetyana, Sergii Kropyvko, Mariia Burdyniuk, Olga Gubar, Valentyna Kryklyva, Liudmyla Tsyba, and Alla Rynditch. 2015. 'Intersectin Adaptor Proteins Are Associated with Actin-Regulating Protein WIP in Invadopodia'. *Cellular Signalling* 27 (7): 1499–1508. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2015.03.006>.
- Guegan, Fabien, Florence Tatin, Thierry Leste-Lasserre, Guillaume Drutel, Elisabeth Genot, and Violaine Moreau. 2008. 'P190B RhoGAP Regulates Endothelial-Cell-Associated Proteolysis through MT1-MMP and MMP2'. *Journal of Cell Science* 121 (Pt 12): 2054–61. <https://doi.org/10.1242/jcs.025817>.
- Guillemot, Jean-Claude, Benjamin A. Kruskal, Chaker N. Adra, Shaochun Zhu, Jone-Long Ko, Peter Burch, Karl Nocka, Kurt Seetoo, Elizabeth Simons, and Bing Lim. 1996. 'Targeted Disruption of Guanosine Diphosphate–Dissociation Inhibitor for Rho-Related Proteins, GDID4: Normal Hematopoietic Differentiation but Subtle Defect in Superoxide Production by Macrophages Derived From In Vitro Embryonal Stem Cell Differentiation'. *Blood* 88 (7): 2722–31. <https://doi.org/10.1182/blood.V88.7.2722.bloodjournal8872722>.
- Guilluy, Christophe, Vinay Swaminathan, Rafael Garcia-Mata, E. Timothy O'Brien, Richard Superfine, and Keith Burridge. 2011. 'The Rho GEFs LARG and GEF-H1 Regulate the Mechanical Response to Force on Integrins'. *Nature Cell Biology* 13 (6): 722–27. <https://doi.org/10.1038/ncb2254>.
- Guo, Zhong, Mohammad Reza Ahmadian, and Roger S. Goody. 2005. 'Guanine Nucleotide Exchange Factors Operate by a Simple Allosteric Competitive Mechanism'. *Biochemistry* 44 (47): 15423–29. <https://doi.org/10.1021/bi0518601>.
- 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>.
- Hahn, Silvia, and Gabriel Schlenstedt. 2011. 'Importin  $\beta$ -Type Nuclear Transport Receptors Have Distinct Binding Affinities for Ran-GTP'. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 406 (3): 383–88. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.02.051>.
- Hall, Alan. 1998. 'Rho GTPases and the Actin Cytoskeleton'. *Science* 279 (5350): 509–14. <https://doi.org/10.1126/science.279.5350.509>.
- Hanahan, D., and R. A. Weinberg. 2000. 'The Hallmarks of Cancer'. *Cell* 100 (1): 57–70. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81683-9).
- Hanahan, D., and Robert A. Weinberg. 2011. 'Hallmarks of Cancer: The next Generation'. *Cell* 144 (5): 646–74. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.
- Harada, Takamasa, Joe Swift, Jerome Irianto, Jae-Won Shin, Kyle R. Spinler, Avathamsa Athirasala, Rocky Diegmiller, P. C. Dave P. Dingal, Irena L. Ivanovska, and Dennis E. Discher. 2014. 'Nuclear Lamin Stiffness Is a Barrier to 3D Migration, but Softness Can Limit Survival'. *The Journal of Cell Biology* 204 (5): 669–82. <https://doi.org/10.1083/jcb.201308029>.

- Harvey, J. J. 1964. 'An Unidentified Virus Which Causes the Rapid Production of Tumours in Mice'. *Nature* 204 (4963): 1104–5. <https://doi.org/10.1038/2041104b0>.
- He, Hua, Fangyan Dai, Long Yu, Xingyu She, Yong Zhao, Jianmin Jiang, Xiaosong Chen, and Shouyuan Zhao. 2002. 'Identification and Characterization of Nine Novel Human Small GTPases Showing Variable Expressions in Liver Cancer Tissues'. *Gene Expression* 10 (5–6): 231–42. <https://doi.org/10.3727/000000002783992406>.
- Héraud, Capucine, Mathilde Pinault, Valérie Lagrée, and Violaine Moreau. 2019. 'P190RhoGAPs, the ARHGAP35- and ARHGAP5-Encoded Proteins, in Health and Disease'. *Cells* 8 (4): E351. <https://doi.org/10.3390/cells8040351>.
- Herrmann, C., M. R. Ahmadian, F. Hofmann, and I. Just. 1998. 'Functional Consequences of Monoglucosylation of Ha-Ras at Effector Domain Amino Acid Threonine 35'. *The Journal of Biological Chemistry* 273 (26): 16134–39. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.26.16134>.
- Hodge, Richard G., and Anne J. Ridley. 2016. 'Regulating Rho GTPases and Their Regulators'. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 17 (8): 496–510. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.67>.
- Hodis, Eran, Ian R. Watson, Gregory V. Kryukov, Stefan T. Arold, Marcin Imielinski, Jean-Philippe Theurillat, Elizabeth Nickerson, et al. 2012. 'A Landscape of Driver Mutations in Melanoma'. *Cell* 150 (2): 251–63. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.06.024>.
- Hoffman, Gregory R., Nicolas Nassar, and Richard A. Cerione. 2000. 'Structure of the Rho Family GTP-Binding Protein Cdc42 in Complex with the Multifunctional Regulator RhoGDI'. *Cell* 100 (3): 345–56. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80670-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80670-4).
- Hohmann, Tim, and Faramarz Dehghani. 2019. 'The Cytoskeleton-A Complex Interacting Meshwork'. *Cells* 8 (4): E362. <https://doi.org/10.3390/cells8040362>.
- Hu, Qian, Xiao Lin, Linxiaoxiao Ding, Yinduo Zeng, Danmei Pang, Nengtai Ouyang, Yanqun Xiang, and Herui Yao. 2018. 'ARHGAP42 Promotes Cell Migration and Invasion Involving PI3K/Akt Signaling Pathway in Nasopharyngeal Carcinoma'. *Cancer Medicine* 7 (8): 3862–74. <https://doi.org/10.1002/cam4.1552>.
- Huang, Guo-Hui, Zhao-Liang Sun, Hong-Jiang Li, and Dong-Fu Feng. 2017. 'Rho GTPase-Activating Proteins: Regulators of Rho GTPase Activity in Neuronal Development and CNS Diseases'. *Molecular and Cellular Neurosciences* 80 (April): 18–31. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2017.01.007>.
- Hülsemann, Maren, Colline Sanchez, Polina V. Verkhusha, Vera Des Marais, Serena P. H. Mao, Sara K. Donnelly, Jeffrey E. Segall, and Louis Hodgson. 2021. 'TC10 Regulates Breast Cancer Invasion and Metastasis by Controlling Membrane Type-1 Matrix Metalloproteinase at Invadopodia'. *Communications Biology* 4 (1): 1–23. <https://doi.org/10.1038/s42003-021-02583-3>.
- Humphries, Brock A., Zhishan Wang, and Chengfeng Yang. 2020. 'MicroRNA Regulation of the Small Rho GTPase Regulators-Complexities and Opportunities in Targeting Cancer Metastasis'. *Cancers* 12 (5): E1092. <https://doi.org/10.3390/cancers12051092>.
- Husson, Clotilde, Louis Renault, Dominique Didry, Dominique Pantaloni, and Marie-France Carlier. 2011. 'Cordon-Bleu Uses WH2 Domains as Multifunctional Dynamizers of Actin Filament Assembly'. *Molecular Cell* 43 (3): 464–77. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.07.010>.
- Innocenti, Metello, Emanuela Frittoli, Isabella Ponzanelli, John R. Falck, Saskia M. Brachmann, Pier Paolo Di Fiore, and Giorgio Scita. 2003. 'Phosphoinositide 3-Kinase Activates Rac by Entering in a Complex with Eps8, Abi1, and Sos-1'. *The Journal of Cell Biology* 160 (1): 17–23. <https://doi.org/10.1083/jcb.200206079>.



- Innocenti, Metello, Pierluigi Tenca, Emanuela Frittoli, Mario Faretta, Arianna Tocchetti, Pier Paolo Di Fiore, and Giorgio Scita. 2002. 'Mechanisms through Which Sos-1 Coordinates the Activation of Ras and Rac'. *The Journal of Cell Biology* 156 (1): 125–36. <https://doi.org/10.1083/jcb.200108035>.
- Jacob, Abitha, and Rytis Prekeris. 2015. 'The Regulation of MMP Targeting to Invadopodia during Cancer Metastasis'. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 3 (February): 4. <https://doi.org/10.3389/fcell.2015.00004>.
- Jacquemet, Guillaume, Hellyeh Hamidi, and Johanna Ivaska. 2015. 'Filopodia in Cell Adhesion, 3D Migration and Cancer Cell Invasion'. *Current Opinion in Cell Biology* 36 (October): 23–31. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2015.06.007>.
- Jacquemet, Guillaume, Mark R. Morgan, Adam Byron, Jonathan D. Humphries, Colin K. Choi, Christopher S. Chen, Patrick T. Caswell, and Martin J. Humphries. 2013. 'Rac1 Is Deactivated at Integrin Activation Sites through an IQGAP1-Filamin-A-RacGAP1 Pathway'. *Journal of Cell Science* 126 (Pt 18): 4121–35. <https://doi.org/10.1242/jcs.121988>.
- Jaffe, Aron B., and Alan Hall. 2005. 'Rho GTPases: Biochemistry and Biology'. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 21: 247–69. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.21.020604.150721>.
- Jaiswal, Mamta, Radovan Dvorsky, and Mohammad Reza Ahmadian. 2013. 'Deciphering the Molecular and Functional Basis of Dbl Family Proteins: A Novel Systematic Approach toward Classification of Selective Activation of the Rho Family Proteins'. *The Journal of Biological Chemistry* 288 (6): 4486–4500. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.429746>.
- Jaiswal, Mamta, Radovan Dvorsky, Ehsan Amin, Sarah L. Risse, Eyad K. Fansa, Si-Cai Zhang, Mohamed S. Taha, et al. 2014. 'Functional Cross-Talk between Ras and Rho Pathways: A Ras-Specific GTPase-Activating Protein (P120RasGAP) Competitively Inhibits the RhoGAP Activity of Deleted in Liver Cancer (DLC) Tumor Suppressor by Masking the Catalytic Arginine Finger'. *The Journal of Biological Chemistry* 289 (10): 6839–49. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.527655>.
- Jayo, Asier, Maddy Parsons, and Josephine C. Adams. 2012. 'A Novel Rho-Dependent Pathway That Drives Interaction of Fascin-1 with p-Lin-11/Isl-1/Mec-3 Kinase (LIMK) 1/2 to Promote Fascin-1/Actin Binding and Filopodia Stability'. *BMC Biology* 10 (August): 72. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-10-72>.
- Ji, Lei, Bo Lu, Raffaella Zamponi, Olga Charlat, Robert Aversa, Zinger Yang, Frederic Sigoillot, et al. 2019. 'USP7 Inhibits Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling through Promoting Stabilization of Axin'. *Nature Communications* 10 (1): 4184. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12143-3>.
- Jiang, Wei, Raffaella Sordella, Guang-Chao Chen, Shweta Hakre, Ananda L. Roy, and Jeffrey Settleman. 2005. 'An FF Domain-Dependent Protein Interaction Mediates a Signaling Pathway for Growth Factor-Induced Gene Expression'. *Molecular Cell* 17 (1): 23–35. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.11.024>.
- Johnston, Adam B., Denise M. Hilton, Patrick McConnell, Britney Johnson, Meghan T. Harris, Avital Simone, Gaya K. Amarasinghe, John A. Cooper, and Bruce L. Goode. 2018. 'A Novel Mode of Capping Protein-Regulation by Twinfilin'. *ELife* 7 (October): e41313. <https://doi.org/10.7554/eLife.41313>.
- Johnstone, Cameron N., Sergi Castellví-Bel, Laura M. Chang, Xavier Bessa, Hiroshi Nakagawa, Hideki Harada, Raphael K. Sung, Josep M. Piqué, Antoni Castells, and Anil K. Rustgi. 2004. 'ARHGAP8 Is a Novel Member of the RHOGAP Family Related to ARHGAP1/CDC42GAP/P50RHOGAP: Mutation and Expression Analyses in Colorectal and Breast Cancers'. *Gene* 336 (1): 59–71. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2004.01.025>.

- Jones, Eleanor L., Janet L. Wee, Maria C. Demaria, Jessica Blakeley, Po Ki Ho, Javier Vega-Ramos, Jose A. Villadangos, et al. 2016. 'Dendritic Cell Migration and Antigen Presentation Are Coordinated by the Opposing Functions of the Tetraspanins CD82 and CD37'. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 196 (3): 978–87. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1500357>.
- Juin, Amélie, Clotilde Billottet, Violaine Moreau, Olivier Destaing, Corinne Albiges-Rizo, Jean Rosenbaum, Elisabeth Génot, and Frédéric Saltel. 2012. 'Physiological Type I Collagen Organization Induces the Formation of a Novel Class of Linear Invadosomes'. *Molecular Biology of the Cell* 23 (2): 297–309. <https://doi.org/10.1091/mbc.E11-07-0594>.
- Juin, Amélie, Julie Di Martino, Birgit Leitinger, Elodie Henriet, Anne-Sophie Gary, Lisa Paysan, Jeremy Bomo, et al. 2014. 'Discoidin Domain Receptor 1 Controls Linear Invadosome Formation via a Cdc42-Tuba Pathway'. *The Journal of Cell Biology* 207 (4): 517–33. <https://doi.org/10.1083/jcb.201404079>.
- Jumper, John, Richard Evans, Alexander Pritzel, Tim Green, Michael Figurnov, Olaf Ronneberger, Kathryn Tunyasuvunakool, et al. 2021. 'Highly Accurate Protein Structure Prediction with AlphaFold'. *Nature* 596 (7873): 583–89. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>.
- Jung, Haiyoung, Suk Ran Yoon, Jeewon Lim, Hee Jun Cho, and Hee Gu Lee. 2020. 'Dysregulation of Rho GTPases in Human Cancers'. *Cancers* 12 (5): E1179. <https://doi.org/10.3390/cancers12051179>.
- Kakiuchi, Miwako, Takashi Nishizawa, Hiroki Ueda, Kengo Gotoh, Atsushi Tanaka, Akimasa Hayashi, Shogo Yamamoto, et al. 2014. 'Recurrent Gain-of-Function Mutations of RHOA in Diffuse-Type Gastric Carcinoma'. *Nature Genetics* 46 (6): 583–87. <https://doi.org/10.1038/ng.2984>.
- Karatas, Esra, and Marion Bouchecareilh. 2020. 'Alpha 1-Antitrypsin Deficiency: A Disorder of Proteostasis-Mediated Protein Folding and Trafficking Pathways'. *International Journal of Molecular Sciences* 21 (4): E1493. <https://doi.org/10.3390/ijms21041493>.
- Kastenhuber, Edward, and Scott Lowe. 2017. 'Putting P53 in Context'. *Cell* 170 (6): 1062–78. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.08.028>.
- Katakai, Tomoya, Naoyuki Kondo, Yoshihiro Ueda, and Tatsuo Kinashi. 2014. 'Autotaxin Produced by Stromal Cells Promotes LFA-1-Independent and Rho-Dependent Interstitial T Cell Motility in the Lymph Node Paracortex'. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 193 (2): 617–26. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1400565>.
- Katoh, Hironori, and Manabu Negishi. 2003. 'RhoG Activates Rac1 by Direct Interaction with the Dock180-Binding Protein Elmo'. *Nature* 424 (6947): 461–64. <https://doi.org/10.1038/nature01817>.
- Kelpsch, Daniel J., and Tina L. Tootle. 2018. 'Nuclear Actin: From Discovery to Function'. *Anatomical Record (Hoboken, N.J.: 2007)* 301 (12): 1999–2013. <https://doi.org/10.1002/ar.23959>.
- Kilian, Lucia Sophie, Jakob Voran, Derk Frank, and Ashraf Yusuf Rangrez. 2021. 'RhoA: A Dubious Molecule in Cardiac Pathophysiology'. *Journal of Biomedical Science* 28 (1): 33. <https://doi.org/10.1186/s12929-021-00730-w>.
- Kiyokawa, E., Y. Hashimoto, T. Kurata, H. Sugimura, and M. Matsuda. 1998. 'Evidence That DOCK180 Up-Regulates Signals from the CrkII-P130(Cas) Complex'. *The Journal of Biological Chemistry* 273 (38): 24479–84. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.38.24479>.
- Kiyokawa, E, Yuko Hashimoto, Shin Kobayashi, Haruhiko Sugimura, Takeshi Kurata, and Michiyuki Matsuda. 1998. 'Activation of Rac1 by a Crk SH3-Binding Protein, DOCK180'. *Genes & Development* 12 (21): 3331–36.
- Klooster, Jean Paul ten, Zahara M. Jaffer, Jonathan Chernoff, and Peter L. Hordijk. 2006. 'Targeting and Activation of Rac1 Are Mediated by the Exchange Factor Beta-Pix'. *The Journal of Cell Biology* 172 (5): 759–69. <https://doi.org/10.1083/jcb.200509096>.

- Krauthammer, Michael, Yong Kong, Byung Hak Ha, Perry Evans, Antonella Bacchiocchi, James P McCusker, Elaine Cheng, et al. 2012. 'Exome Sequencing Identifies Recurrent Somatic RAC1 Mutations in Melanoma'. *Nature Genetics* 44 (9): 1006–14. <https://doi.org/10.1038/ng.2359>.
- Krebs, Angela M., Julia Mitschke, María Lasierra Losada, Otto Schmalhofer, Melanie Boerries, Hauke Busch, Martin Boettcher, et al. 2017. 'The EMT-Activator Zeb1 Is a Key Factor for Cell Plasticity and Promotes Metastasis in Pancreatic Cancer'. *Nature Cell Biology* 19 (5): 518–29. <https://doi.org/10.1038/ncb3513>.
- Kukimoto-Niino, Mutsuko, Kentaro Ihara, Kazutaka Murayama, and Mikako Shirouzu. 2021. 'Structural Insights into the Small GTPase Specificity of the DOCK Guanine Nucleotide Exchange Factors'. *Current Opinion in Structural Biology* 71 (December): 249–58. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2021.08.001>.
- Kunimura, Kazufumi, Takehito Uruno, and Yoshinori Fukui. 2019. 'DOCK Family Proteins: Key Players in Immune Surveillance Mechanisms'. *International Immunology* 32 (1): 5–15. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxz067>.
- Kurokawa, Kazuo, Yasuyuki Suda, and Akihiko Nakano. 2016. 'Sar1 Localizes at the Rims of COPII-Coated Membranes in Vivo'. *Journal of Cell Science* 129 (17): 3231–37. <https://doi.org/10.1242/jcs.189423>.
- Lamorte, Louie, Sonia Rodrigues, Veena Sangwan, Christopher E. Turner, and Morag Park. 2003. 'Crk Associates with a Multimolecular Paxillin/GIT2/Beta-PIX Complex and Promotes Rac-Dependent Relocalization of Paxillin to Focal Contacts'. *Molecular Biology of the Cell* 14 (7): 2818–31. <https://doi.org/10.1091/mbc.e02-08-0497>.
- Lawrence, Michael S., Petar Stojanov, Craig H. Mermel, James T. Robinson, Levi A. Garraway, Todd R. Golub, Matthew Meyerson, Stacey B. Gabriel, Eric S. Lander, and Gad Getz. 2014. 'Discovery and Saturation Analysis of Cancer Genes across 21 Tumour Types'. *Nature* 505 (7484): 495–501. <https://doi.org/10.1038/nature12912>.
- Lawrence, Rosalie E., Simon A. Fromm, Yangxue Fu, Adam L. Yokom, Do Jin Kim, Ashley M. Thelen, Lindsey N. Young, et al. 2019. 'Structural Mechanism of a Rag GTPase Activation Checkpoint by the Lysosomal Folliculin Complex'. *Science (New York, N.Y.)* 366 (6468): 971–77. <https://doi.org/10.1126/science.aax0364>.
- Lawson, Campbell D, and Keith Burridge. 2014. 'The On-off Relationship of Rho and Rac during Integrin-Mediated Adhesion and Cell Migration'. *Small GTPases* 5 (1): e27958. <https://doi.org/10.4161/sgtp.27958>.
- Lawson, Campbell D., and Anne J. Ridley. 2018. 'Rho GTPase Signaling Complexes in Cell Migration and Invasion'. *The Journal of Cell Biology* 217 (2): 447–57. <https://doi.org/10.1083/jcb.201612069>.
- Lehman, Heather L., Michal Kidacki, Joshua I. Warrick, and Douglas B. Stairs. 2018. 'NFkB Hyperactivation Causes Invasion of Esophageal Squamous Cell Carcinoma with EGFR Overexpression and P120-Catenin down-Regulation'. *Oncotarget* 9 (13): 11180–96. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.24358>.
- Leiva, Natalia L., Mariela B. Nolly, Mariángeles Ávila Maniero, Antonella D. Losinno, and Maria Teresa Damiani. 2021. 'Rab Proteins: Insights into Intracellular Trafficking in Endometrium'. *Reproductive Sciences (Thousand Oaks, Calif.)* 28 (1): 12–22. <https://doi.org/10.1007/s43032-020-00256-w>.
- Lemmens, Bennie, and Arne Lindqvist. 2019. 'DNA Replication and Mitotic Entry: A Brake Model for Cell Cycle Progression'. *The Journal of Cell Biology* 218 (12): 3892–3902. <https://doi.org/10.1083/jcb.201909032>.

- León-Castillo, Alicia, Stephanie M. de Boer, Melanie E. Powell, Linda R. Mileskin, Helen J. Mackay, Alexandra Leary, Hans W. Nijman, et al. 2020. 'Molecular Classification of the PORTEC-3 Trial for High-Risk Endometrial Cancer: Impact on Prognosis and Benefit From Adjuvant Therapy'. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 38 (29): 3388–97. <https://doi.org/10.1200/JCO.20.00549>.
- León-Castillo, Alicia, Ester Gilvazquez, Remi Nout, Vincent Thbm Smit, Jessica N. McAlpine, Melissa McConechy, Stefan Kommos, et al. 2020. 'Clinicopathological and Molecular Characterisation of "multiple-Classifer" Endometrial Carcinomas'. *The Journal of Pathology* 250 (3): 312–22. <https://doi.org/10.1002/path.5373>.
- Lewis, Raymond A., Sawako Yamashiro, David S. Gokhin, and Velia M. Fowler. 2014. 'Functional Effects of Mutations in the Tropomyosin-Binding Sites of Tropomodulin1 and Tropomodulin3'. *Cytoskeleton (Hoboken, N.J.)* 71 (7): 395–411. <https://doi.org/10.1002/cm.21179>.
- Li, Hoi-Yeung, Kan Cao, and Yixian Zheng. 2003. 'Ran in the Spindle Checkpoint: A New Function for a Versatile GTPase'. *Trends in Cell Biology* 13 (11): 553–57. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2003.09.003>.
- Li, Hongyan, Lei Yang, Hui Fu, Jianshe Yan, Ying Wang, Hua Guo, Xishan Hao, Xuehua Xu, Tian Jin, and Ning Zhang. 2013. 'Association between Gai2 and ELMO1/Dock180 Connects Chemokine Signalling with Rac Activation and Metastasis'. *Nature Communications* 4 (April): 1706. <https://doi.org/10.1038/ncomms2680>.
- Li, Li, Yong-Min Li, Ping Zhou, Xi-Shan Wang, Gui-Yu Wang, Xu-Hai Zhao, Bin-Bin Cui, Yan-Lu Ren, Xin-Shu Dong, and Zhi-Qi Chen. 2016. 'Abnormal Expression of P190RhoGAP in Colorectal Cancer Patients with Poor Survival'. *American Journal of Translational Research* 8 (10): 4405–14.
- Li, Yan, Bing Chen, Jingjing Zhao, Qin Li, Siyuan Chen, Tianan Guo, Yuchen Li, et al. 2021. 'HNRNPL Circularizes ARHGAP35 to Produce an Oncogenic Protein'. *Advanced Science (Weinheim, Baden-Wuerttemberg, Germany)* 8 (13): 2001701. <https://doi.org/10.1002/advs.202001701>.
- Liang, Jingjie, Kui Li, Kaiyu Chen, Junyong Liang, Ti Qin, Jiayi He, Shuang Shi, Qiang Tan, and Zhengguang Wang. 2021. 'Regulation of ARHGAP19 in the Endometrial Epithelium: A Possible Role in the Establishment of Uterine Receptivity'. *Reproductive Biology and Endocrinology: RB&E* 19 (1): 2. <https://doi.org/10.1186/s12958-020-00689-7>.
- Lim, Yangmi, Ssang-Taek Lim, Alok Tomar, Margaret Gardel, Joie A. Bernard-Trifilo, Xiao Lei Chen, Sean A. Uryu, et al. 2008. 'PyK2 and FAK Connections to P190Rho Guanine Nucleotide Exchange Factor Regulate RhoA Activity, Focal Adhesion Formation, and Cell Motility'. *The Journal of Cell Biology* 180 (1): 187–203. <https://doi.org/10.1083/jcb.200708194>.
- Liu, Xiangrong, Fengjuan Li, Zhu Pan, Wenning Wang, and Wenyu Wen. 2013. 'Solution Structure of the SH3 Domain of DOCK180'. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 81 (5): 906–10. <https://doi.org/10.1002/prot.24236>.
- Loirand, Gervaise, Christophe Guilluy, and Pierre Picaud. 2006. 'Regulation of Rho Proteins by Phosphorylation in the Cardiovascular System'. *Trends in Cardiovascular Medicine* 16 (6): 199–204. <https://doi.org/10.1016/j.tcm.2006.03.010>.
- Lorente, Mar, Ana García-Casas, Nélida Salvador, Angélica Martínez-López, Estibaliz Gabicagoeascoa, Guillermo Velasco, Lucía López-Palomar, and Sonia Castillo-Lluva. 2019. 'Inhibiting SUMO1-Mediated SUMOylation Induces Autophagy-Mediated Cancer Cell Death and Reduces Tumour Cell Invasion via RAC1'. *Journal of Cell Science* 132 (20): jcs234120. <https://doi.org/10.1242/jcs.234120>.
- Ma, Xuda, Yamei Dang, Xiaowen Shao, Xuechun Chen, Fei Wu, and Yongmei Li. 2019. 'Ubiquitination and Long Non-Coding RNAs Regulate Actin Cytoskeleton Regulators in Cancer Progression'. *International Journal of Molecular Sciences* 20 (12): E2997. <https://doi.org/10.3390/ijms20122997>.

- 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>.
- Mammoto, Akiko, Kip M. Connor, Tadanori Mammoto, Chong Wing Yung, Dongeun Huh, Christopher M. Aderman, Gustavo Mostoslavsky, Lois E. H. Smith, and Donald E. Ingber. 2009. 'A Mechanosensitive Transcriptional Mechanism That Controls Angiogenesis'. *Nature* 457 (7233): 1103–8. <https://doi.org/10.1038/nature07765>.
- Mandal, Shyamali, Keith R. Johnson, and Margaret J. Wheelock. 2008. 'TGF-Beta Induces Formation of F-Actin Cores and Matrix Degradation in Human Breast Cancer Cells via Distinct Signaling Pathways'. *Experimental Cell Research* 314 (19): 3478–93. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2008.09.013>.
- Manukyan, Arkadi, Kirsten Ludwig, Sergio Sanchez-Manchinelly, Sarah J. Parsons, and P. Todd Stukenberg. 2015. 'A Complex of P190RhoGAP-A and Anillin Modulates RhoA-GTP and the Cytokinetic Furrow in Human Cells'. *Journal of Cell Science* 128 (1): 50–60. <https://doi.org/10.1242/jcs.151647>.
- Manukyan, Arkadi, Lilit Sargsyan, Sarah J. Parsons, and P. Todd Stukenberg. 2018. 'P190RhoGAP Prevents Mitotic Spindle Fragmentation and Is Required to Activate Aurora A Kinase at Acentriolar Poles'. *Chromosoma* 127 (3): 375–86. <https://doi.org/10.1007/s00412-018-0670-0>.
- Marignani, P. A., and C. L. Carpenter. 2001. 'Vav2 Is Required for Cell Spreading'. *The Journal of Cell Biology* 154 (1): 177–86. <https://doi.org/10.1083/jcb.200103134>.
- Markwell, Steven M., Amanda G. Ammer, Erik T. Interval, Jessica L. Allen, Brenen W. Papenberg, River A. Hames, Johnathan E. Castaño, Dorothy A. Schafer, and Scott A. Weed. 2019. 'Cortactin Phosphorylation by Casein Kinase 2 Regulates Actin-Related Protein 2/3 Complex Activity, Invadopodia Function, and Tumor Cell Invasion'. *Molecular Cancer Research: MCR* 17 (4): 987–1001. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-18-0391>.
- Martin, Adam C., and Bob Goldstein. 2014. 'Apical Constriction: Themes and Variations on a Cellular Mechanism Driving Morphogenesis'. *Development (Cambridge, England)* 141 (10): 1987–98. <https://doi.org/10.1242/dev.102228>.
- 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>.
- Michaelson, D., J. Silletti, G. Murphy, P. D'Eustachio, M. Rush, and M. R. Philips. 2001. 'Differential Localization of Rho GTPases in Live Cells: Regulation by Hypervariable Regions and RhoGDI Binding'. *The Journal of Cell Biology* 152 (1): 111–26. <https://doi.org/10.1083/jcb.152.1.111>.
- Miller, Nichol L. G., Christine Lawson, Xiao Lei Chen, Ssang-Taek Lim, and David D. Schlaepfer. 2012. 'Rgnef (P190RhoGEF) Knockout Inhibits RhoA Activity, Focal Adhesion Establishment, and Cell Motility Downstream of Integrins'. *PLoS One* 7 (5): e37830. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037830>.
- Minard, Meghan E., Lee-Su Kim, Janet E. Price, and Gary E. Gallick. 2004. 'The Role of the Guanine Nucleotide Exchange Factor Tiam1 in Cellular Migration, Invasion, Adhesion and Tumor Progression'. *Breast Cancer Research and Treatment* 84 (1): 21–32. <https://doi.org/10.1023/B:BREA.0000018421.31632.e6>.
- Mira, Jean-Paul, Valerie Benard, John Groffen, Lurayne C. Sanders, and Ulla G. Knaus. 2000. 'Endogenous, Hyperactive Rac3 Controls Proliferation of Breast Cancer Cells by a P21-Activated Kinase-Dependent Pathway'. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (1): 185–89.
- Miralles, Francesc, Guido Posern, Alexia-Ileana Zaromytidou, and Richard Treisman. 2003. 'Actin Dynamics Control SRF Activity by Regulation of Its Coactivator MAL'. *Cell* 113 (3): 329–42. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)00278-2](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00278-2).

- Mitra, Satyajit K, and David D Schlaepfer. 2006. 'Integrin-Regulated FAK–Src Signaling in Normal and Cancer Cells'. *Current Opinion in Cell Biology*, Cell-to-cell contact and extracellular matrix, 18 (5): 516–23. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2006.08.011>.
- Moreau, V., F. Frischknecht, I. Reckmann, R. Vincentelli, G. Rabut, D. Stewart, and M. Way. 2000. 'A Complex of N-WASP and WIP Integrates Signalling Cascades That Lead to Actin Polymerization'. *Nature Cell Biology* 2 (7): 441–48. <https://doi.org/10.1038/35017080>.
- Moreau, Violaine, Florence Tatin, Christine Varon, and Elisabeth Génot. 2003. 'Actin Can Reorganize into Podosomes in Aortic Endothelial Cells, a Process Controlled by Cdc42 and RhoA'. *Molecular and Cellular Biology* 23 (19): 6809–22. <https://doi.org/10.1128/MCB.23.19.6809-6822.2003>.
- Morin, Annie, Fabrice P Cordelières, Jacqueline Cherfils, and Birgitta Olofsson. 2010. 'RhoGDI3 and RhoG'. *Small GTPases* 1 (3): 142–56. <https://doi.org/10.4161/sgtp.1.3.15112>.
- Mosaddeghzadeh, Niloufar, and Mohammad Reza Ahmadian. 2021. 'The RHO Family GTPases: Mechanisms of Regulation and Signaling'. *Cells* 10 (7): 1831. <https://doi.org/10.3390/cells10071831>.
- Moshfegh, Yasmin, Jose Javier Bravo-Cordero, Veronika Miskolci, John Condeelis, and Louis Hodgson. 2014. 'A Trio-Rac1-Pak1 Signalling Axis Drives Invadopodia Disassembly'. *Nature Cell Biology* 16 (6): 574–86. <https://doi.org/10.1038/ncb2972>.
- Mouly, Laetitia, Julia Gilhodes, Anthony Lemarié, Elizabeth Cohen-Jonathan Moyal, Christine Toulas, Gilles Favre, Olivier Sordet, and Sylvie Monferran. 2019. 'The RND1 Small GTPase: Main Functions and Emerging Role in Oncogenesis'. *International Journal of Molecular Sciences* 20 (15): E3612. <https://doi.org/10.3390/ijms20153612>.
- Müller, Paul M., Juliane Rademacher, Richard D. Bagshaw, Celina Wortmann, Carolin Barth, Jakobus van Unen, Keziban M. Alp, et al. 2020. 'Systems Analysis of RhoGEF and RhoGAP Regulatory Proteins Reveals Spatially Organized RAC1 Signalling from Integrin Adhesions'. *Nature Cell Biology* 22 (4): 498–511. <https://doi.org/10.1038/s41556-020-0488-x>.
- Murphy, Danielle A., and Sara A. Courtneidge. 2011. 'The “ins” and “Outs” of Podosomes and Invadopodia: Characteristics, Formation and Function'. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 12 (7): 413–26. <https://doi.org/10.1038/nrm3141>.
- Murphy, Natasha P., Helen R. Mott, and Darerca Owen. 2021. 'Progress in the Therapeutic Inhibition of Cdc42 Signalling'. *Biochemical Society Transactions* 49 (3): 1443–56. <https://doi.org/10.1042/BST20210112>.
- Nakahara, H., S. C. Mueller, M. Nomizu, Y. Yamada, Y. Yeh, and W. T. Chen. 1998. 'Activation of Beta1 Integrin Signaling Stimulates Tyrosine Phosphorylation of P190RhoGAP and Membrane-Protrusive Activities at Invadopodia'. *The Journal of Biological Chemistry* 273 (1): 9–12. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.1.9>.
- Nam, Taewook, Jong Hyun Han, Sushil Devkota, and Han-Woong Lee. 2017. 'Emerging Paradigm of Crosstalk between Autophagy and the Ubiquitin-Proteasome System'. *Molecules and Cells* 40 (12): 897–905. <https://doi.org/10.14348/molcells.2017.0226>.
- Naoe, Hideaki, Kimi Araki, Osamu Nagano, Yusuke Kobayashi, Jo Ishizawa, Tatsuyuki Chiyoda, Takatsune Shimizu, et al. 2010. 'The Anaphase-Promoting Complex/Cyclosome Activator Cdh1 Modulates Rho GTPase by Targeting P190 RhoGAP for Degradation'. *Molecular and Cellular Biology* 30 (16): 3994–4005. <https://doi.org/10.1128/MCB.01358-09>.
- Narumiya, Shuh, and Dean Thumkeo. 2018. 'Rho Signaling Research: History, Current Status and Future Directions'. *FEBS Letters* 592 (11): 1763–76. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13087>.

- Navarro-Lérida, Inmaculada, Miguel Sánchez-Álvarez, and Miguel Ángel del Pozo. 2021. 'Post-Translational Modification and Subcellular Compartmentalization: Emerging Concepts on the Regulation and Physiopathological Relevance of RhoGTPases'. *Cells* 10 (8): 1990. <https://doi.org/10.3390/cells10081990>.
- Nimnual, Anjaruwee S., Laura J. Taylor, and Dafna Bar-Sagi. 2003. 'Redox-Dependent Downregulation of Rho by Rac'. *Nature Cell Biology* 5 (3): 236–41. <https://doi.org/10.1038/ncb938>.
- Nishimura, Koutarou, Toshihiko Oki, Jiro Kitaura, Shinji Kuninaka, Hideyuki Saya, Asako Sakae-Sawano, Atsushi Miyawaki, and Toshio Kitamura. 2013. 'APC(CDH1) Targets MgcRacGAP for Destruction in the Late M Phase'. *PloS One* 8 (5): e63001. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063001>.
- Norwood, Fiona LM, Andrew J Sutherland-Smith, Nicholas H Keep, and John Kendrick-Jones. 2000. 'The Structure of the N-Terminal Actin-Binding Domain of Human Dystrophin and How Mutations in This Domain May Cause Duchenne or Becker Muscular Dystrophy'. *Structure* 8 (5): 481–91. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(00\)00132-5](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(00)00132-5).
- Notsuda, Hirotsugu, Akira Sakurada, Chiaki Endo, Yoshinori Okada, Akira Horii, Hiroshi Shima, and Takashi Kondo. 2013. 'P190A RhoGAP Is Involved in EGFR Pathways and Promotes Proliferation, Invasion and Migration in Lung Adenocarcinoma Cells'. *International Journal of Oncology* 43 (5): 1569–77. <https://doi.org/10.3892/ijo.2013.2096>.
- Nürnberg, Alexander, Thomas Kitzing, and Robert Grosse. 2011. 'Nucleating Actin for Invasion'. *Nature Reviews. Cancer* 11 (3): 177–87. <https://doi.org/10.1038/nrc3003>.
- Ohta, Yasutaka, John H. Hartwig, and Thomas P. Stossel. 2006. 'FilGAP, a Rho- and ROCK-Regulated GAP for Rac Binds Filamin A to Control Actin Remodelling'. *Nature Cell Biology* 8 (8): 803–14. <https://doi.org/10.1038/ncb1437>.
- Olson, Michael F. 2016. 'Rho GTPases, Their Post-Translational Modifications, Disease-Associated Mutations and Pharmacological Inhibitors'. *Small GTPases* 9 (3): 203–15. <https://doi.org/10.1080/21541248.2016.1218407>.
- Orgaz, Jose L, Cecilia Herraiz, and Victoria Sanz-Moreno. 2014. 'Rho GTPases Modulate Malignant Transformation of Tumor Cells'. *Small GTPases* 5 (4): e983867. <https://doi.org/10.4161/sgtp.29019>.
- Osiak, Anna-Eleonora, Gerhardt Zenner, and Stefan Linder. 2005. 'Subconfluent Endothelial Cells Form Podosomes Downstream of Cytokine and RhoGTPase Signaling'. *Experimental Cell Research* 307 (2): 342–53. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2005.03.035>.
- O'Toole, Timothy E., Katarzyna Bialkowska, Xiaohong Li, and Joan E. B. Fox. 2011. 'Tiam1 Is Recruited to B1-Integrin Complexes by 14-3-3 $\zeta$  Where It Mediates Integrin-Induced Rac1 Activation and Motility'. *Journal of Cellular Physiology* 226 (11): 2965–78. <https://doi.org/10.1002/jcp.22644>.
- Páez, David, Melissa J. Labonte, Pierre Bohanes, Wu Zhang, Leonor Benhanim, Yan Ning, Takeru Wakatsuki, Fotios Loupakis, and Heinz-Josef Lenz. 2012. 'Cancer Dormancy: A Model of Early Dissemination and Late Cancer Recurrence'. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 18 (3): 645–53. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-2186>.
- Palazzo, A. F., H. L. Joseph, Y. J. Chen, D. L. Dujardin, A. S. Alberts, K. K. Pfister, R. B. Vallee, and G. G. Gundersen. 2001. 'Cdc42, Dynein, and Dynactin Regulate MTOC Reorientation Independent of Rho-Regulated Microtubule Stabilization'. *Current Biology: CB* 11 (19): 1536–41. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(01\)00475-4](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(01)00475-4).

- Palomero, Teresa, Lucile Couronné, Hossein Khiabani, Mi-Yeon Kim, Alberto Ambesi-Impiombato, Arianne Perez-Garcia, Zachary Carpenter, et al. 2014. 'Recurrent Mutations in Epigenetic Regulators, RHOA and FYN Kinase in Peripheral T Cell Lymphomas'. *Nature Genetics* 46 (2): 166–70. <https://doi.org/10.1038/ng.2873>.
- 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* 68 (February): 37–44. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2020.08.012>.
- Parasuraman, Prasanna, Peter Mulligan, James A. Walker, Bihua Li, Myriam Boukhali, Wilhelm Haas, and Andre Bernards. 2017. 'Interaction of P190A RhoGAP with EIF3A and Other Translation Preinitiation Factors Suggests a Role in Protein Biosynthesis'. *The Journal of Biological Chemistry* 292 (7): 2679–89. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.769216>.
- Parisis, Nikolaos, Liliana Krasinska, Bethany Harker, Serge Urbach, Michel Rossignol, Alain Camasses, James Dewar, Nathalie Morin, and Daniel Fisher. 2017. 'Initiation of DNA Replication Requires Actin Dynamics and Formin Activity'. *The EMBO Journal* 36 (21): 3212–31. <https://doi.org/10.15252/embj.201796585>.
- Passarello, Kelly, Shiney Kurian, and Valerie Villanueva. 2019. 'Endometrial Cancer: An Overview of Pathophysiology, Management, and Care'. *Seminars in Oncology Nursing, Gynecology Oncology*, 35 (2): 157–65. <https://doi.org/10.1016/j.soncn.2019.02.002>.
- Paterson, Elyse K., and Sara A. Courtneidge. 2018. 'Invadosomes Are Coming: New Insights into Function and Disease Relevance'. *The FEBS Journal* 285 (1): 8–27. <https://doi.org/10.1111/febs.14123>.
- Pertz, Olivier. 2010. 'Spatio-Temporal Rho GTPase Signaling - Where Are We Now?' *Journal of Cell Science* 123 (Pt 11): 1841–50. <https://doi.org/10.1242/jcs.064345>.
- Pertz, Olivier, Louis Hodgson, Richard L. Klemke, and Klaus M. Hahn. 2006. 'Spatiotemporal Dynamics of RhoA Activity in Migrating Cells'. *Nature* 440 (7087): 1069–72. <https://doi.org/10.1038/nature04665>.
- Pichot, Christina S., Constadina Arvanitis, Sean M. Hartig, Samuel A. Jensen, John Bechill, Saad Marzouk, Jindan Yu, Jeffrey A. Frost, and Seth J. Corey. 2010. 'Cdc42-Interacting Protein 4 Promotes Breast Cancer Cell Invasion and Formation of Invadopodia through Activation of N-WASP'. *Cancer Research* 70 (21): 8347–56. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-4149>.
- Pickup, Michael W, Janna K Mouw, and Valerie M Weaver. 2014. 'The Extracellular Matrix Modulates the Hallmarks of Cancer'. *EMBO Reports* 15 (12): 1243–53. <https://doi.org/10.15252/embr.201439246>.
- Pillé, J.-Y., C. Denoyelle, J. Varet, J.-R. Bertrand, J. Soria, P. Opolon, H. Lu, et al. 2005. 'Anti-RhoA and Anti-RhoC siRNAs Inhibit the Proliferation and Invasiveness of MDA-MB-231 Breast Cancer Cells in Vitro and in Vivo'. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 11 (2): 267–74. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2004.08.029>.
- Pinotsis, Nikos, Karolina Zielinska, Mrigya Babuta, Joan L. Arolas, Julius Kostan, Muhammad Bashir Khan, Claudia Schreiner, et al. 2020. 'Calcium Modulates the Domain Flexibility and Function of an  $\alpha$ -Actinin Similar to the Ancestral  $\alpha$ -Actinin'. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 117 (36): 22101–12. <https://doi.org/10.1073/pnas.1917269117>.
- Pollard, Thomas D. 2003. 'The Cytoskeleton, Cellular Motility and the Reductionist Agenda'. *Nature* 422 (6933): 741–45. <https://doi.org/10.1038/nature01598>.
- Pollard, Thomas D. 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. 2017. 'What We Know and Do Not Know About Actin'. *Handbook of Experimental Pharmacology* 235: 331–47. [https://doi.org/10.1007/164\\_2016\\_44](https://doi.org/10.1007/164_2016_44).
- Porter, Andrew P., Alexandra Papaioannou, and Angeliki Malliri. 2016. 'Deregulation of Rho GTPases in Cancer'. *Small GTPases* 7 (3): 123–38. <https://doi.org/10.1080/21541248.2016.1173767>.
- Pozo, Miguel A. del, Nazilla B. Alderson, William B. Kiosses, Hui-Hsien Chiang, Richard G. W. Anderson, and Martin A. Schwartz. 2004. 'Integrins Regulate Rac Targeting by Internalization of Membrane Domains'. *Science* 303 (5659): 839–42. <https://doi.org/10.1126/science.1092571>.
- Pullikuth, Ashok K., and Andrew D. Catling. 2010. 'Extracellular Signal-Regulated Kinase Promotes Rho-Dependent Focal Adhesion Formation by Suppressing P190A RhoGAP'. *Molecular and Cellular Biology* 30 (13): 3233–48. <https://doi.org/10.1128/MCB.01178-09>.
- Qiang, Xiao-Fei, Zheng-Wei Zhang, Qian Liu, Nan Sun, Liang-Liang Pan, Jing Shen, Tong Li, Chen Yun, Hui Li, and Li-Hua Shi. 2014. 'MiR-20a Promotes Prostate Cancer Invasion and Migration through Targeting ABL2'. *Journal of Cellular Biochemistry* 115 (7): 1269–76. <https://doi.org/10.1002/jcb.24778>.
- Rafikov, Ruslan, Christiana Dimitropoulou, Saurabh Aggarwal, Archana Kangath, Christine Gross, Daniel Pardo, Shruti Sharma, et al. 2014. 'Lipopolysaccharide-Induced Lung Injury Involves the Nitration-Mediated Activation of RhoA'. *The Journal of Biological Chemistry* 289 (8): 4710–22. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.547596>.
- Ravi, Archana, Shelly Kaushik, Aarthi Ravichandran, Catherine Qiurong Pan, and Boon Chuan Low. 2015. 'Epidermal Growth Factor Activates the Rho GTPase-Activating Protein (GAP) Deleted in Liver Cancer 1 via Focal Adhesion Kinase and Protein Phosphatase 2A'. *The Journal of Biological Chemistry* 290 (7): 4149–62. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.616839>.
- Remedios, C. G. dos, D. Chhabra, M. Kekic, I. V. Dedova, M. Tsubakihara, D. A. Berry, and N. J. Nosworthy. 2003. 'Actin Binding Proteins: Regulation of Cytoskeletal Microfilaments'. *Physiological Reviews* 83 (2): 433–73. <https://doi.org/10.1152/physrev.00026.2002>.
- Ridley, Anne J. 2015. 'Rho GTPase Signalling in Cell Migration'. *Current Opinion in Cell Biology* 36 (October): 103–12. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2015.08.005>.
- Rivier, Paul, Michel Mubalama, and Olivier Destaing. 2021. 'Small GTPases All over Invadosomes'. *Small GTPases*, January, 1–11. <https://doi.org/10.1080/21541248.2021.1877081>.
- Roberts, P. J., and C. J. Der. 2007. 'Targeting the Raf-MEK-ERK Mitogen-Activated Protein Kinase Cascade for the Treatment of Cancer'. *Oncogene* 26 (22): 3291–3310. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210422>.
- Roberts, Patrick J., Natalia Mitin, Patricia J. Keller, Emily J. Chenette, James P. Madigan, Rachel O. Currin, Adrienne D. Cox, Oswald Wilson, Paul Kirschmeier, and Channing J. Der. 2008. 'Rho Family GTPase Modification and Dependence on CAAX Motif-Signaled Posttranslational Modification'. *The Journal of Biological Chemistry* 283 (37): 25150–63. <https://doi.org/10.1074/jbc.M800882200>.
- Rodríguez-Fdez, Sonia, and Xosé R. Bustelo. 2019. 'The Vav GEF Family: An Evolutionary and Functional Perspective'. *Cells* 8 (5): 465. <https://doi.org/10.3390/cells8050465>.
- Rogers, Stephen L., Ursula Wiedemann, Nico Stuurman, and Ronald D. Vale. 2003. 'Molecular Requirements for Actin-Based Lamella Formation in Drosophila S2 Cells'. *The Journal of Cell Biology* 162 (6): 1079–88. <https://doi.org/10.1083/jcb.200303023>.
- Romero, Stéphane, Christophe Le Clainche, Dominique Didry, Coumaran Egile, Dominique Pantaloni, and Marie-France Carlier. 2004. 'Formin Is a Processive Motor That Requires Profilin to Accelerate Actin Assembly and Associated ATP Hydrolysis'. *Cell* 119 (3): 419–29. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.09.039>.

- Rosenberg, Brian J., Hava Gil-Henn, Christopher C. Mader, Tiffany Halo, Taofei Yin, John Condeelis, Kazuya Machida, Yi I. Wu, and Anthony J. Koleske. 2017. 'Phosphorylated Cortactin Recruits Vav2 Guanine Nucleotide Exchange Factor to Activate Rac3 and Promote Invadopodial Function in Invasive Breast Cancer Cells'. *Molecular Biology of the Cell* 28 (10): 1347–60. <https://doi.org/10.1091/mbc.E16-12-0885>.
- Rosenberger, Georg, Inka Jantke, Andreas Gal, and Kerstin Kutsche. 2003. 'Interaction of AlphaPIX (ARHGEF6) with Beta-Parvin (PARVB) Suggests an Involvement of AlphaPIX in Integrin-Mediated Signaling'. *Human Molecular Genetics* 12 (2): 155–67. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddg019>.
- Rossman, Kent L., Channing J. Der, and John Sondek. 2005. 'GEF Means Go: Turning on RHO GTPases with Guanine Nucleotide-Exchange Factors'. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 6 (2): 167–80. <https://doi.org/10.1038/nrm1587>.
- Rottner, Klemens, Jan Hänisch, and Kenneth G. Campellone. 2010. 'WASH, WHAMM and JMY: Regulation of Arp2/3 Complex and Beyond'. *Trends in Cell Biology* 20 (11): 650–61. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2010.08.014>.
- Routhier, Alissa, Michelle Astuccio, Deanna Lahey, Nicholas Monfredo, Alyssa Johnson, William Callahan, Amy Partington, et al. 2010. 'Pharmacological Inhibition of Rho-Kinase Signaling with Y-27632 Blocks Melanoma Tumor Growth'. *Oncology Reports* 23 (3): 861–67.
- Ruest, P. J., S. Roy, E. Shi, R. L. Mernaugh, and S. K. Hanks. 2000. 'Phosphospecific Antibodies Reveal Focal Adhesion Kinase Activation Loop Phosphorylation in Nascent and Mature Focal Adhesions and Requirement for the Autophosphorylation Site'. *Cell Growth & Differentiation: The Molecular Biology Journal of the American Association for Cancer Research* 11 (1): 41–48.
- Sager, Garrett, Tomasz Szul, Eunjoo Lee, Ryoichi Kawai, John F. Presley, and Elizabeth Sztul. 2021. 'Modeling the Dynamic Behaviors of the COPI Vesicle Formation Regulators, the Small GTPase Arf1 and Its Activating Sec7 Guanine Nucleotide Exchange Factor GBF1 on Golgi Membranes'. *Molecular Biology of the Cell* 32 (5): 446–59. <https://doi.org/10.1091/mbc.E20-09-0587>.
- Sakurai-Yageta, Mika, Chiara Recchi, Gaëlle Le Dez, Jean-Baptiste Sibarita, Laurent Daviet, Jacques Camonis, Crislyn D'Souza-Schorey, and Philippe Chavrier. 2008. 'The Interaction of IQGAP1 with the Exocyst Complex Is Required for Tumor Cell Invasion Downstream of Cdc42 and RhoA'. *Journal of Cell Biology* 181 (6): 985–98. <https://doi.org/10.1083/jcb.200709076>.
- Sala, Margaux, Manon Ros, and Frédéric Saltel. 2020. 'A Complex and Evolutive Character: Two Face Aspects of ECM in Tumor Progression'. *Frontiers in Oncology* 10 (August): 1620. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.01620>.
- Salvi, Amrita, and Thirumaran Thanabalu. 2017. 'WIP Promotes In-Vitro Invasion Ability, Anchorage Independent Growth and EMT Progression of A549 Lung Adenocarcinoma Cells by Regulating RhoA Levels'. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 482 (4): 1353–59. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.12.040>.
- Sancak, Yasemin, Liron Bar-Peled, Roberto Zoncu, Andrew L. Markhard, Shigeyuki Nada, and David M. Sabatini. 2010. 'Regulator-Rag Complex Targets MTORC1 to the Lysosomal Surface and Is Necessary for Its Activation by Amino Acids'. *Cell* 141 (2): 290–303. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.02.024>.
- Schaks, Matthias, Hermann Döring, Frieda Kage, Anika Steffen, Thomas Klünemann, Wulf Blankenfeldt, Theresia Stradal, and Klemens Rottner. 2021. 'RhoG and Cdc42 Can Contribute to Rac-Dependent Lamellipodia Formation through WAVE Regulatory Complex-Binding'. *Small GTPases* 12 (2): 122–32. <https://doi.org/10.1080/21541248.2019.1657755>.

- Schaks, Matthias, Shashi P. Singh, Frieda Kage, Peter Thomason, Thomas Klünemann, Anika Steffen, Wulf Blankenfeldt, Theresia E. Stradal, Robert H. Insall, and Klemens Rottner. 2018. 'Distinct Interaction Sites of Rac GTPase with WAVE Regulatory Complex Have Non-Redundant Functions in Vivo'. *Current Biology: CB* 28 (22): 3674-3684.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.10.002>.
- Scheffzek, K., I. Stephan, O. N. Jensen, D. Illenberger, and P. Gierschik. 2000. 'The Rac-RhoGDI Complex and the Structural Basis for the Regulation of Rho Proteins by RhoGDI'. *Nature Structural Biology* 7 (2): 122–26. <https://doi.org/10.1038/72392>.
- Schlaepfer, David D., Satyajit K. Mitra, and Dusko Ilic. 2004. 'Control of Motile and Invasive Cell Phenotypes by Focal Adhesion Kinase'. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1692 (2–3): 77–102. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2004.04.008>.
- Schmidt, G., P. Sehr, M. Wilm, J. Selzer, M. Mann, and K. Aktories. 1997. 'Gln 63 of Rho Is Deamidated by Escherichia Coli Cytotoxic Necrotizing Factor-1'. *Nature* 387 (6634): 725–29. <https://doi.org/10.1038/42735>.
- 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>.
- Schröpfer, Andrea, Ulrike Kammerer, Michaela Kapp, Johannes Dietl, Sonja Feix, and Jelena Anacker. 2010. 'Expression Pattern of Matrix Metalloproteinases in Human Gynecological Cancer Cell Lines'. *BMC Cancer* 10 (October): 553. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-10-553>.
- Schwartz, Samantha L., Canhong Cao, Olena Pylypenko, Alexey Rak, and Angela Wandinger-Ness. 2007. 'Rab GTPases at a Glance'. *Journal of Cell Science* 120 (22): 3905–10. <https://doi.org/10.1242/jcs.015909>.
- Settleman, J., V. Narasimhan, L. C. Foster, and R. A. Weinberg. 1992. 'Molecular Cloning of cDNAs Encoding the GAP-Associated Protein P190: Implications for a Signaling Pathway from Ras to the Nucleus'. *Cell* 69 (3): 539–49. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90454-k](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90454-k).
- Shang, Xun, Fillipo Marchioni, Nisha Sipes, Chris R. Evelyn, Moran Jerabek-Willemsen, Stefan Duhr, William Seibel, Matthew Wortman, and Yi Zheng. 2012. 'Rational Design of Small Molecule Inhibitors Targeting RhoA Subfamily Rho GTPases'. *Chemistry & Biology* 19 (6): 699–710. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2012.05.009>.
- Shi, Ting-Ting, Gang Li, and Hong-Tao Xiao. 2016. 'The Role of RhoJ in Endothelial Cell Biology and Tumor Pathology'. *BioMed Research International* 2016: 6386412. <https://doi.org/10.1155/2016/6386412>.
- Shifrin, Yulia, Pamela D. Arora, Yasutaka Ohta, David A. Calderwood, and Christopher A. McCulloch. 2009. 'The Role of FilGAP-Filamin A Interactions in Mechanoprotection'. *Molecular Biology of the Cell* 20 (5): 1269–79. <https://doi.org/10.1091/mbc.e08-08-0872>.
- Shimizu, Yoshihiko, Dean Thumkeo, Jeongsin Keel, Toshimasa Ishizaki, Hiroko Oshima, Masanobu Oshima, Yoichi Noda, Fumio Matsumura, Makoto M. Taketo, and Shuh Narumiya. 2005. 'ROCK-I Regulates Closure of the Eyelids and Ventral Body Wall by Inducing Assembly of Actomyosin Bundles'. *Journal of Cell Biology* 168 (6): 941–53. <https://doi.org/10.1083/jcb.200411179>.
- Simanshu, Dharendra K., Dwight V. Nissley, and Frank McCormick. 2017. 'RAS Proteins and Their Regulators in Human Disease'. *Cell* 170 (1): 17–33. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.06.009>.
- Soufo, Hervé Joël Defeu, and Peter L. Graumann. 2003. 'Actin-like Proteins MreB and Mbl from Bacillus Subtilis Are Required for Bipolar Positioning of Replication Origins'. *Current Biology: CB* 13 (21): 1916–20. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2003.10.024>.

- Srivastava, S K, R H Wheelock, S A Aaronson, and A Eva. 1986. 'Identification of the Protein Encoded by the Human Diffuse B-Cell Lymphoma (Dbl) Oncogene.' *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83 (23): 8868–72.
- Stanger, Ben Z. 2012. 'Quit Your YAPing: A New Target for Cancer Therapy'. *Genes & Development* 26 (12): 1263–67. <https://doi.org/10.1101/gad.196501.112>.
- Steffen, Anika, Jan Faix, Guenter P. Resch, Joern Linkner, Juergen Wehland, J. Victor Small, Klemens Rottner, and Theresia E. B. Stradal. 2006. 'Filopodia Formation in the Absence of Functional WAVE- and Arp2/3-Complexes'. *Molecular Biology of the Cell* 17 (6): 2581–91. <https://doi.org/10.1091/mbc.e05-11-1088>.
- Stevens, Meredith, Joseph T. Rabban, Karuna Garg, Jessica Van Ziffle, Courtney Onodera, James P. Grenert, Iwei Yeh, Boris C. Bastian, Charles Zaloudek, and David A. Solomon. 2019. 'Well-Differentiated Papillary Mesothelioma of the Peritoneum Is Genetically Defined by Mutually Exclusive Mutations in TRAF7 and CDC42'. *Modern Pathology* 32 (1): 88–99. <https://doi.org/10.1038/s41379-018-0127-2>.
- Stiegler, Amy L., and Titus J. Boggon. 2017. 'P190RhoGAP Proteins Contain PseudoGTPase Domains'. *Nature Communications* 8 (1): 506. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00483-x>.
- Stiegler, Amy L., and Titus J. Boggon. 2018a. 'The N-Terminal GTPase Domain of P190RhoGAP Proteins Is a PseudoGTPase'. *Structure (London, England: 1993)* 26 (11): 1451-1461.e4. <https://doi.org/10.1016/j.str.2018.07.015>.
- Stiegler, Amy L., and Titus J. Boggon. 2018b. 'PseudoGTPase Domains in P190RhoGAP Proteins: A Mini-Review'. *Biochemical Society Transactions* 46 (6): 1713–20. <https://doi.org/10.1042/BST20180481>.
- Strassheim, Derek, Evgenia Gerasimovskaya, David Irwin, Edward C. Dempsey, Kurt Stenmark, and Vijaya Karoor. 2019. 'RhoGTPase in Vascular Disease'. *Cells* 8 (6): E551. <https://doi.org/10.3390/cells8060551>.
- Su, Ling, Joyce M. Agati, and Sarah J. Parsons. 2003. 'P190RhoGAP Is Cell Cycle Regulated and Affects Cytokinesis'. *The Journal of Cell Biology* 163 (3): 571–82. <https://doi.org/10.1083/jcb.200308007>.
- Sun, Hua, Johannes S. Schlondorff, Elizabeth J. Brown, Henry N. Higgs, and Martin R. Pollak. 2011. 'Rho Activation of MDia Formins Is Modulated by an Interaction with Inverted Formin 2 (INF2)'. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (7): 2933–38. <https://doi.org/10.1073/pnas.1017010108>.
- Tabuchi, Akiko, Marcel Estevez, Jennifer A. Henderson, Ruth Marx, Jun Shiota, Hiroyasu Nakano, and Jay M. Baraban. 2005. 'Nuclear Translocation of the SRF Co-Activator MAL in Cortical Neurons: Role of RhoA Signalling'. *Journal of Neurochemistry* 94 (1): 169–80. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2005.03179.x>.
- Takahashi, Kazuo, Takuya Sasaki, Akiko Mammoto, Kenji Takaishi, Takaaki Kameyama, Sachiko Tsukita, Shoichiro Tsukita, and Yoshimi Takai. 1997. 'Direct Interaction of the Rho GDP Dissociation Inhibitor with Ezrin/Radixin/Moesin Initiates the Activation of the Rho Small G Protein\*'. *Journal of Biological Chemistry* 272 (37): 23371–75. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.37.23371>.
- Takano, Tetsuya, Mengya Wu, Shinichi Nakamuta, Honda Naoki, Naruki Ishizawa, Takashi Namba, Takashi Watanabe, et al. 2017. 'Discovery of Long-Range Inhibitory Signaling to Ensure Single Axon Formation'. *Nature Communications* 8 (1): 33. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00044-2>.
- Tao, Wen, Marie-Dominique Filippi, Jeffrey R. Bailey, Simon J. Atkinson, Bret Connors, Andrew Evan, and David A. Williams. 2002. 'The TRQQKRP Motif Located near the C-Terminus of Rac2 Is Essential for Rac2 Biologic Functions and Intracellular Localization'. *Blood* 100 (5): 1679–88.

- Tcherkezian, Joseph, Eric I. Danek, Sarah Jenna, Ibtissem Triki, and Nathalie Lamarche-Vane. 2005. 'Extracellular Signal-Regulated Kinase 1 Interacts with and Phosphorylates CdGAP at an Important Regulatory Site'. *Molecular and Cellular Biology* 25 (15): 6314–29. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.15.6314-6329.2005>.
- Thumkeo, Dean, Yoshihiko Shimizu, Satoko Sakamoto, Shuichi Yamada, and Shuh Narumiya. 2005. 'ROCK-I and ROCK-II Cooperatively Regulate Closure of Eyelid and Ventral Body Wall in Mouse Embryo'. *Genes to Cells: Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms* 10 (8): 825–34. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2005.00882.x>.
- Thumkeo, Dean, Ryota Shinohara, Keisuke Watanabe, Hirohide Takebayashi, Yosuke Toyoda, Kiyoshi Tohyama, Toshimasa Ishizaki, Tomoyuki Furuyashiki, and Shuh Narumiya. 2011. 'Deficiency of MDia, an Actin Nucleator, Disrupts Integrity of Neuroepithelium and Causes Periventricular Dysplasia'. *PLoS One* 6 (9): e25465. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025465>.
- Tian, Tian, Zhan-Hong Chen, Zongheng Zheng, Yubo Liu, Qi Zhao, Yuying Liu, Huijun Qiu, et al. 2020. 'Investigation of the Role and Mechanism of ARHGAP5-Mediated Colorectal Cancer Metastasis'. *Theranostics* 10 (13): 5998–6010. <https://doi.org/10.7150/thno.43427>.
- Tikoo, A., S. Czekay, C. Viars, S. White, J. K. Heath, K. Arden, and H. Maruta. 2000. 'P190-A, a Human Tumor Suppressor Gene, Maps to the Chromosomal Region 19q13.3 That Is Reportedly Deleted in Some Gliomas'. *Gene* 257 (1): 23–31. [https://doi.org/10.1016/s0378-1119\(00\)00387-5](https://doi.org/10.1016/s0378-1119(00)00387-5).
- Todorovic, Biljana, Anthony C. Nichols, Jennifer M. Chitilian, Michael P. Myers, Trevor G. Shepherd, Sarah J. Parsons, John W. Barrett, Lawrence Banks, and Joe S. Mymryk. 2014. 'The Human Papillomavirus E7 Proteins Associate with P190RhoGAP and Alter Its Function'. *Journal of Virology* 88 (7): 3653–63. <https://doi.org/10.1128/JVI.03263-13>.
- Tomar, Alok, Ssang-Taek Lim, Yangmi Lim, and David D. Schlaepfer. 2009. 'A FAK-P120RasGAP-P190RhoGAP Complex Regulates Polarity in Migrating Cells'. *Journal of Cell Science* 122 (Pt 11): 1852–62. <https://doi.org/10.1242/jcs.046870>.
- Tong, Junfeng, Laiji Li, Barbara Ballermann, and Zhixiang Wang. 2016. 'Phosphorylation and Activation of RhoA by ERK in Response to Epidermal Growth Factor Stimulation'. *PLoS ONE* 11 (1): e0147103. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147103>.
- Turner, C. E., M. C. Brown, J. A. Perrotta, M. C. Riedy, S. N. Nikolopoulos, A. R. McDonald, S. Bagrodia, S. Thomas, and P. S. Leventhal. 1999. 'Paxillin LD4 Motif Binds PAK and PIX through a Novel 95-KD Ankyrin Repeat, ARF-GAP Protein: A Role in Cytoskeletal Remodeling'. *The Journal of Cell Biology* 145 (4): 851–63. <https://doi.org/10.1083/jcb.145.4.851>.
- Tzircotis, George, Vania M. M. Braga, and Emmanuelle Caron. 2011. 'RhoG Is Required for Both FcyR- and CR3-Mediated Phagocytosis'. *Journal of Cell Science* 124 (Pt 17): 2897–2902. <https://doi.org/10.1242/jcs.084269>.
- Uezu, Akiyoshi, Hirokazu Okada, Hideji Murakoshi, Cosmo D. del Vescovo, Ryohei Yasuda, Dario Diviani, and Scott H. Soderling. 2012. 'Modified SH2 Domain to Phototrap and Identify Phosphotyrosine Proteins from Subcellular Sites within Cells'. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109 (43): E2929–38. <https://doi.org/10.1073/pnas.1207358109>.
- Unbekandt, Mathieu, and Michael F. Olson. 2014. 'The Actin-Myosin Regulatory MRCK Kinases: Regulation, Biological Functions and Associations with Human Cancer'. *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)* 92 (3): 217–25. <https://doi.org/10.1007/s00109-014-1133-6>.
- Varon, Christine, Florence Tatin, Violaine Moreau, Ellen Van Obberghen-Schilling, Samantha Fernandez-Sauze, Edith Reuzeau, Ijsbrand Kramer, and Elisabeth Génot. 2006. 'Transforming Growth Factor Beta Induces Rosettes of Podosomes in Primary Aortic Endothelial Cells'. *Molecular and Cellular Biology* 26 (9): 3582–94. <https://doi.org/10.1128/MCB.26.9.3582-3594.2006>.

- Vemula, Venukumar, Tamás Huber, Marko Ušaj, Beáta Bugyi, and Alf Månsson. 2021. 'Myosin and Gelsolin Cooperate in Actin Filament Severing and Actomyosin Motor Activity'. *The Journal of Biological Chemistry* 296 (June): 100181. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.015863>.
- Venit, Tomas, S. Raza Mahmood, Martin Endara-Coll, and Piergiorgio Percipalle. 2020. 'Nuclear Actin and Myosin in Chromatin Regulation and Maintenance of Genome Integrity'. *International Review of Cell and Molecular Biology* 355: 67–108. <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2020.05.001>.
- Waddell, Nicola, Marina Pajic, Ann-Marie Patch, David K. Chang, Karin S. Kassahn, Peter Bailey, Amber L. Johns, et al. 2015. 'Whole Genomes Redefine the Mutational Landscape of Pancreatic Cancer'. *Nature* 518 (7540): 495–501. <https://doi.org/10.1038/nature14169>.
- Wang, Dunrui, Xiaolan Qian, Beatriz Sanchez-Solana, Brajendra K. Tripathi, Marian E. Durkin, and Douglas R. Lowy. 2020. 'Cancer-Associated Point Mutations in the DLC1 Tumor Suppressor and Other Rho-GAPs Occur Frequently and Are Associated with Decreased Function'. *Cancer Research* 80 (17): 3568–79. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-19-3984>.
- Wang, J., X. Tian, R. Han, X. Zhang, X. Wang, H. Shen, L. Xue, et al. 2014. 'Downregulation of MiR-486-5p Contributes to Tumor Progression and Metastasis by Targeting Protumorigenic ARHGAP5 in Lung Cancer'. *Oncogene* 33 (9): 1181–89. <https://doi.org/10.1038/onc.2013.42>.
- Wang, Lei, Linda Yang, Yongneng Luo, and Yi Zheng. 2003. 'A Novel Strategy for Specifically Down-Regulating Individual Rho GTPase Activity in Tumor Cells'. *The Journal of Biological Chemistry* 278 (45): 44617–25. <https://doi.org/10.1074/jbc.M308929200>.
- Wang, Yao, Mei Yu, Jia-Xin Yang, Dong-Yan Cao, Ying Zhang, Hui-Mei Zhou, Zhen Yuan, and Keng Shen. 2019. 'Genomic Comparison of Endometrioid Endometrial Carcinoma and Its Precancerous Lesions in Chinese Patients by High-Depth Next Generation Sequencing'. *Frontiers in Oncology* 9: 123. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00123>.
- Wegner, A. 1982. 'Treadmilling of Actin at Physiological Salt Concentrations. An Analysis of the Critical Concentrations of Actin Filaments'. *Journal of Molecular Biology* 161 (4): 607–15. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(82\)90411-9](https://doi.org/10.1016/0022-2836(82)90411-9).
- Wen, Xiaoli, Jing Wan, Qizhi He, Mengfei Wang, Shuangdi Li, Mei Jiang, Zhen Qian, et al. 2020. 'P190A Inactivating Mutations Cause Aberrant RhoA Activation and Promote Malignant Transformation via the Hippo-YAP Pathway in Endometrial Cancer'. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 5 (1): 81. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-0170-6>.
- Wennerberg, Krister, and Channing J. Der. 2004. 'Rho-Family GTPases: It's Not Only Rac and Rho (and I like It)'. *Journal of Cell Science* 117 (8): 1301–12. <https://doi.org/10.1242/jcs.01118>.
- Wennerberg, Krister, Marie-Annick Forget, Shawn M. Ellerbroek, William T. Arthur, Keith Burridge, Jeffrey Settleman, Channing J. Der, and Steen H. Hansen. 2003. 'Rnd Proteins Function as RhoA Antagonists by Activating P190 RhoGAP'. *Current Biology: CB* 13 (13): 1106–15. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(03\)00418-4](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(03)00418-4).
- Wennerberg, Krister, Kent L. Rossman, and Channing J. Der. 2005. 'The Ras Superfamily at a Glance'. *Journal of Cell Science* 118 (5): 843–46. <https://doi.org/10.1242/jcs.01660>.
- Winder, Steven J., and Kathryn R. Ayscough. 2005. 'Actin-Binding Proteins'. *Journal of Cell Science* 118 (4): 651–54. <https://doi.org/10.1242/jcs.01670>.
- Wineland, Dylane M., Daniel J. Kelsch, and Tina L. Tootle. 2018. 'Multiple Pools of Nuclear Actin'. *Anatomical Record (Hoboken, N.J.: 2007)* 301 (12): 2014–36. <https://doi.org/10.1002/ar.23964>.

- Wioland, Hugo, Berengere Guichard, Yosuke Senju, Sarah Myram, Pekka Lappalainen, Antoine Jégou, and Guillaume Romet-Lemonne. 2017. 'ADF/Cofilin Accelerates Actin Dynamics by Severing Filaments and Promoting Their Depolymerization at Both Ends'. *Current Biology: CB* 27 (13): 1956-1967.e7. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.05.048>.
- Wolf, Rebecca M., Nicole Draghi, Xiquan Liang, Chengkai Dai, Lene Uhrbom, Charlotta Eklöf, Bengt Westermark, Eric C. Holland, and Marilyn D. Resh. 2003. 'P190RhoGAP Can Act to Inhibit PDGF-Induced Gliomas in Mice: A Putative Tumor Suppressor Encoded on Human Chromosome 19q13.3'. *Genes & Development* 17 (4): 476–87. <https://doi.org/10.1101/gad.1040003>.
- Woolner, Sarah, Lori L. O'Brien, Christiane Wiese, and William M. Bement. 2008. 'Myosin-10 and Actin Filaments Are Essential for Mitotic Spindle Function'. *The Journal of Cell Biology* 182 (1): 77–88. <https://doi.org/10.1083/jcb.200804062>.
- Xue, Bo, Cedric Leyrat, Jonathan M. Grimes, and Robert C. Robinson. 2014. 'Structural Basis of Thymosin-B4/Profilin Exchange Leading to Actin Filament Polymerization'. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (43): E4596-4605. <https://doi.org/10.1073/pnas.1412271111>.
- Yang, Jing, Sendurai A Mani, Joana Liu Donaher, Sridhar Ramaswamy, Raphael A Itzykson, Christophe Come, Pierre Savagner, Inna Gitelman, Andrea Richardson, and Robert A Weinberg. 2004. 'Twist, a Master Regulator of Morphogenesis, Plays an Essential Role in Tumor Metastasis'. *Cell* 117 (7): 927–39. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.06.006>.
- Ying, Han, Sandra L. Biroc, Wei-Wei Li, Bruno Alicke, Jian-Ai Xuan, Rene Pagila, Yasuhiro Ohashi, Toshiya Okada, Yoichi Kamata, and Harald Dinter. 2006. 'The Rho Kinase Inhibitor Fasudil Inhibits Tumor Progression in Human and Rat Tumor Models'. *Molecular Cancer Therapeutics* 5 (9): 2158–64. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-05-0440>.
- Yu, Fa-Xing, Bin Zhao, and Kun-Liang Guan. 2015. 'Hippo Pathway in Organ Size Control, Tissue Homeostasis, and Cancer'. *Cell* 163 (4): 811–28. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.10.044>.
- Yu, Fei, Tian Tian, Bin Deng, Tianpei Wang, Qi Qi, Meng Zhu, Caiwang Yan, et al. 2019. 'Multi-Marker Analysis of Genomic Annotation on Gastric Cancer GWAS Data from Chinese Populations'. *Gastric Cancer: Official Journal of the International Gastric Cancer Association and the Japanese Gastric Cancer Association* 22 (1): 60–68. <https://doi.org/10.1007/s10120-018-0841-y>.
- Zack, Travis I., Stephen E. Schumacher, Scott L. Carter, Andre D. Cherniack, Gordon Saksena, Barbara Tabak, Michael S. Lawrence, et al. 2013. 'Pan-Cancer Patterns of Somatic Copy Number Alteration'. *Nature Genetics* 45 (10): 1134–40. <https://doi.org/10.1038/ng.2760>.
- Zagryazhskaya-Masson, Anna, Pedro Monteiro, Anne-Sophie Macé, Alessia Castagnino, Robin Ferrari, Elvira Infante, Aléria Duperray-Susini, et al. 2020. 'Intersection of TKS5 and FGD1/CDC42 Signaling Cascades Directs the Formation of Invadopodia'. *The Journal of Cell Biology* 219 (9): e201910132. <https://doi.org/10.1083/jcb.201910132>.
- Zerial, Marino, and Heidi McBride. 2001. 'Rab Proteins as Membrane Organizers'. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2 (2): 107–17. <https://doi.org/10.1038/35052055>.
- Zhao, Jinmin, Hua Xu, Maolin He, and Yang Wu. 2014. 'Glucocorticoid Receptor DNA Binding Factor 1 Expression and Osteosarcoma Prognosis'. *Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 35 (12): 12449–58. <https://doi.org/10.1007/s13277-014-2563-z>.
- Zheng, Xucai, Shengying Wang, Shikai Hong, Jianjun Liu, and Chenghao Jiang. 2021. 'Knockdown of EIF3a Attenuated Cell Growth in K1 Human Thyroid Cancer Cells'. *Genes & Genomics* 43 (4): 379–88. <https://doi.org/10.1007/s13258-021-01048-5>.

Zou, Qingping, Xin Xiao, Ying Liang, Lina Peng, Zheng Guo, Wei Li, and Wenqiang Yu. 2018. 'MiR-19a-Mediated Downregulation of RhoB Inhibits the Dephosphorylation of AKT1 and Induces Osteosarcoma Cell Metastasis'. *Cancer Letters* 428 (August): 147–59. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2018.04.027>.

Zrihan-Licht, S., Y. Fu, J. Settleman, K. Schinkmann, L. Shaw, I. Keydar, S. Avraham, and H. Avraham. 2000. 'RAFTK/Pyk2 Tyrosine Kinase Mediates the Association of P190 RhoGAP with RasGAP and Is Involved in Breast Cancer Cell Invasion'. *Oncogene* 19 (10): 1318–28. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203422>.

Zubor, Pavol, Zuzana Dankova, Zuzana Kolkova, Veronika Holubekova, Dusan Brany, Sandra Mersakova, Marek Samec, et al. 2020. 'Rho GTPases in Gynecologic Cancers: In-Depth Analysis toward the Paradigm Change from Reactive to Predictive, Preventive, and Personalized Medical Approach Benefiting the Patient and Healthcare'. *Cancers* 12 (5): 1292. <https://doi.org/10.3390/cancers12051292>.





# Annexes



## Annexe 1 : Résultats de l'interactome de p190A (sauvage et mutée S866F)

### Interactants en lien avec le protéasome

Gène	Protéine
PSMA2	Proteasome subunit A2
PSMA6	Proteasome subunit A6
PSMA7	Proteasome subunit A7
PSMB5	Proteasome subunit B5
PSMB6	Proteasome subunit B6
PSMC1	Proteasome subunit C1
PSMC2	Proteasome subunit C2
PSMC3	Proteasome subunit C3
PSMD3	Proteasome subunit D3
PSMD4	Proteasome subunit D4
PSMD12	Proteasome subunit D12
PSMD13	Proteasome subunit D13
ADRM1	Proteasomal ubiquitin receptor ADRM1
BRCC3	E3 ubiquitin-protein ligase CHIP
STUB1	E3 ubiquitin-protein ligase CHIP
UBA1	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1
UBB	Polyubiquitin-B
SUGT1	Protein SGT1 homolog

### Interactants en lien avec la traduction

Gène	Protéine
EIF2B3	Eukaryotic translation initiation factor 2B3
EIF2S3	Eukaryotic translation initiation factor 2S3
EIF3B	Eukaryotic translation initiation factor 3B
EIF3CL	Eukaryotic translation initiation factor 3CL
EIF3D	Eukaryotic translation initiation factor 3D
EIF3E	Eukaryotic translation initiation factor 3E
EIF3F	Eukaryotic translation initiation factor 3F
EIF3G	Eukaryotic translation initiation factor 3G
EIF3I	Eukaryotic translation initiation factor 3I
EIF3L	Eukaryotic translation initiation factor 3L
EIF4A1	Eukaryotic translation initiation factor 4A1
EIF4B	Eukaryotic translation initiation factor 4B
EIF5	Eukaryotic translation initiation factor 5
EIF5A	Eukaryotic translation initiation factor 5A
EIF6	Eukaryotic translation initiation factor 6

### Interactants en lien avec la mitose

Gène	Protéine
SEPT2	Septin-2
RANBP1	Ran-specific GTPase-activating protein
FKBP4	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP4
RANGAP1	Ran GTPase-activating protein 1
SUGT1	Protein SGT1 homolog

## Annexe 2 : Alignement des séquences protéiques de p190A (humain) et p190B (humain) - Uniprot

Identical positions	749
Identity	49.05%
Similar positions	448
Program	CLUSTALO

BLAST Align Download

Entry	Entry name	Protein names	Organism	Gene name
Q9NRY4	RHG35_HUMAN	Rho GTPase-activating protein 35	Homo sapiens (Human)	ARHGAP35 GRF1, GRLF1, KIAA1722, P190A, p190ARHOGAP
Q13017	RHG05_HUMAN	Rho GTPase-activating protein 5	Homo sapiens (Human)	ARHGAP5 RHOGAP5
Q9NRY4 Q13017	RHG35_HUMAN RHG05_HUMAN	1 1	MMMARKQDVRIPTYNISVVGLSGTEKEKGCQCGIGKSCLCNRFVRSAPSADEFHLDHSTSVLST -MMAKNKEPRPPSYTISIVGLSGTEKDKGCGVGKSCLCNRFVRSKADEEYPEHTSVLST	60 59
Q9NRY4 Q13017	RHG35_HUMAN RHG05_HUMAN	61 60	SDFGGRVNNHDFLYWGEVSRSLDCVECKMHIVEQTEFIDDQTFQPHRSTALQPYIKRA IDFGGRVNNHDFLYWGDIIQNSDEGVECKIHVIEQTEFIDDQTFQPHRSTNLQPYIKRA	120 119
Q9NRY4 Q13017	RHG35_HUMAN RHG05_HUMAN	121 120	AATKLASAELMYFCTDQGLGLEDFEQKMPDGKLLVDGFLGIDVSRGMRNRFDDQLKF AASKLQSAELMYICTDQGLGLEDFEQKMPDGKLLVDGFLGIDVSRGMRNRFDDQLKF	180 179
Q9NRY4 Q13017	RHG35_HUMAN RHG05_HUMAN	181 180	VSNLYNQLAKTKKPIVVVLTCKDEGVERYIRDAHTFALSCKNLQVETSARSNVNVDLAF VNNLFVQLSKSKKPIIAATKCECDVDHYLREVOAFASKNLNVVETSARFNVIETCF	240 239
Q9NRY4 Q13017	RHG35_HUMAN RHG05_HUMAN	241 240	STLVQLIDKSRGKTKIIPYFEALQOOSQIATAKDKYEWLVSRIKHNHNLWLSVSRMQ TALVQMLDKTRSKPKIIPYLDAYKTQRLVVTATDKFEKLVQTV-RDYHATWKTVSNLKK	300 298
Q9NRY4 Q13017	RHG35_HUMAN RHG05_HUMAN	301 299	ASPEYQDYVYLEGTQKAKLFLQHIHRLKHEIERRRKLALPLAFALIPNLDEIDH NHPDYEYINLEGRKARNTFSKHIEQLKQEHIRKREYINTLPRAFNTLLNLEEIEH	360 358
Q9NRY4 Q13017	RHG35_HUMAN RHG05_HUMAN	361 359	LSCIKAKKLETKPEFLKWFVLEETFPWDATSHIDNMENERIPFDLMDTVPAEQLYEAHL LNWSEALKMEKRAFQLCFVLEKTFWDETDHIKDINDRRIPFDLLSTLEAEKVYQNHV	420 418
Q9NRY4 Q13017	RHG35_HUMAN RHG05_HUMAN	421 419	EKLNRERKRVEMRAFENLETSPFITPGKPWEEARSPIMNEDFYQWLEESVYMDIYGKH QHLISEKRRVEMKEKFKTKLEKIQFISPGQWEEVMCFVMEDEAYKYITEADSKVEYGRH	480 478
Q9NRY4 Q13017	RHG35_HUMAN RHG05_HUMAN	481 479	QKQIIDKAKEEFQELLESELYELEDKAPSKEMGVIQDVLGEEQRFKALQKLAQER QREIVEKAKEEFQEMLEFSELYELEDLNAIPSSDKMSEIHTVLSSEPPRYKALQKLAPDR	540 538
Q9NRY4 Q13017	RHG35_HUMAN RHG05_HUMAN	541 539	DALLKHIHFVYHPTKETCPSPACVDKIEHLISSRFIRPSDRNQKNSLSDPNIDRNL ESLLKHIHFVYHPTKETCLSGQNCNTDIKVEQLLASLLQLDHRGLRIYHDSNTIDKVNLI	600 598
Q9NRY4 Q13017	RHG35_HUMAN RHG05_HUMAN	601 599	VILGKDGGLARELANEIRALCTNDKDYVIDGMYELSLRPIEGNVRLPVNSFQPTTFQPHG FILGKDGGLARELANEIRTQS-TDEYALDGIYELDLRPVDAKSPYFLSQLWTAAFKPHG	660 657
Q9NRY4 Q13017	RHG35_HUMAN RHG05_HUMAN	661 658	CLCLYNSKESLSYVVESIEKSREST-LGRDRNHLVHLPLTLILVNRKGDTSGETLHSLIQ CFVFNIESLSFIEGFIKIRTEASQIRKDKYMANLFFLLLANQRDSI-SKNLFIILRH	719 716
Q9NRY4 Q13017	RHG35_HUMAN RHG05_HUMAN	720 717	QQQIASKLQCVFLDPASAGIYGRNINEKIOSVQLGLLDS-KRNLNLVSTASIKDLA QQQLANKLQCFVDPVAG--TYPRKFNETQIKQALRGVLESVKHNLVSPVPANKDLS	778 774
Q9NRY4 Q13017	RHG35_HUMAN RHG05_HUMAN	779 775	DVDLRIVMLCMGDPFSAADDILFPVLQSQCTCKSHSGSNVLELPIGLHKKRIEIVSL EADLRIVMCAMGDPFSDVLIISPLFDSHSCAAQAGNNSLMDLKIIEGKRRRIQITIL	838 834
Q9NRY4 Q13017	RHG35_HUMAN RHG05_HUMAN	839 835	SYHSSFSIRKSRLVHGYIVFYSAKRKASLAMLRAFLCEVQDIIPIQLVALTDGAVDVLND SYHSSIGVRKDELVHGYILVYSAKRKASLMLRAFLSEVQDIPVQLVAVTDSQADFFEN	898 894
Q9NRY4 Q13017	RHG35_HUMAN RHG05_HUMAN	899 895	DLREQLTEGEEIAQEI DGRFTSIPC-SQPQKLEIFHPFFKDVEKKNIEATHMYDNA EAIKELMTEGEEIATEITAKFTALYSLSQYHRQTEVFTLFSVLEKKNMIENSYLSDNT	957 954
Q9NRY4 Q13017	RHG35_HUMAN RHG05_HUMAN	958 955	AEACSTTEEVFN-SPRAGSPLCNSNLQDSEEDIEPSYSLFREDTSLPSSLKDHSLKSMEL RESTHQSEDFVLPSPRDCFPYNNYFSDSDDEAPPYSPISGDDVQLLPTPSDRSRYRLDL	1016 1014
Q9NRY4 Q13017	RHG35_HUMAN RHG05_HUMAN	1017 1015	EGNDGLSFIMSN-FESKLNKVPVPPVKKPVPVHFEITK---GDLSYLDQGHDRDQGRKSV EGNEYPIHSTPNCHDHERNHKVPVPPVKKPVPVTKVKNLDPNLLKTEIAGIGKNPRKQT	1071 1074
Q9NRY4 Q13017	RHG35_HUMAN RHG05_HUMAN	1072 1075	SSSPWLQDGFDP-SDYAEPMADVVKPRNEENIYSVPHDSTQGGKIITIRNINKAQSNGS SRVPLAHPEDMDPSDNYAEPIDTIFKQGYSDIYVVPDSDNRKIRNSFVNTQGDDE	1130 1134
Q9NRY4 Q13017	RHG35_HUMAN RHG05_HUMAN	1131 1135	GNDSDEMTSSLERGRKVSIVSKPVLYRTRCTR--LGRFASRYTSFVSGSDDEL---- N-GFS--DRTSKSHGE----RRFSKYKSKTLFSKAKSYRRRTHSDASDEAFTTSK	1183 1185
Q9NRY4 Q13017	RHG35_HUMAN RHG05_HUMAN	1184 1186	---GPIRKEEDQA---SQYKGDNAVIPYETDEDPR---RRNILRSLRRNTKPKPKP TKRGRHRGSEEDPILLSVETWKGGINPAITSDQELDDKMKKTKHKVDEKDKKQKTKK	1232 1245
Q9NRY4 Q13017	RHG35_HUMAN RHG05_HUMAN	1233 1246	PRPSITKATWESNYFGVPLTTVVTPPEKPIPIFIERCIEYIETAGLSTEGIYRVSGNKSEM NFNPPTRRNWESNYFGVPLQDLVTAERKPIPLFVEKVEFIEDTGLCTEGLYRVSGNKTDQ	1292 1305
Q9NRY4 Q13017	RHG35_HUMAN RHG05_HUMAN	1293 1306	ESLQRQFDQDHNLDLAEKDFVTNTVAGAMKSFSELPPDPLVYNNMQIDLVEAHKINDREQ DNIQKQFDQDHNINLVSMEVTNAVAGALKAFADLPDPLIYSLHPELLEAAKIPDKTE	1352 1365
Q9NRY4 Q13017	RHG35_HUMAN RHG05_HUMAN	1353 1366	KLHALKEVLKFKPKENHEVFKYVISHLNKVSNNKVNLMTSENLSICFWPTLMRPDFSTM RLHALKEIVKFKFHVNYDVFYVITHLNRVQQKINLMTADNLISICFWPTLMRPDFSTM	1412 1425
Q9NRY4 Q13017	RHG35_HUMAN RHG05_HUMAN	1413 1426	DALTATRTYQTIIELEFIQCCPFYFNRIPEPPGARPSPSAVASTVPFLTSTPVTSPS EFLSTTKIHQSVVETFIQCCQFFYNGEIVETTNIVAPPPSPNGQ-----LVPEFMV	1472 1477
Q9NRY4 Q13017	RHG35_HUMAN RHG05_HUMAN	1473 1478	PPQSPPTTQSPMQPLLPQLQAHTL PLQLPPLPQLIQPLQDPLGI--I	1499 1502

# Annexe 3 : Alignement des séquences protéiques de p190A (rat) et p190B (humain) - Uniprot

Identical positions	750
Identity	48.924%
Similar positions	446
Program	CLUSTALO

Entry	Entry name	Protein names	Organism	Gene name
P81128	RHG35_RAT	Rho GTPase-activating protein 35	Rattus norvegicus (Rat)	Arhgap35 Grif1, P190A, p190ARHOGAP
Q13017	RHG05_HUMAN	Rho GTPase-activating protein 5	Homo sapiens (Human)	ARHGAP5 RHOGAP5

P81128	RHG35_RAT	1	MMMARKQDVRIPTYNISVVLGSGTEKEKGCQIGKSCLCNRFVPSADEFHLDTSVLST	60
Q13017	RHG05_HUMAN	1	--MAKNKEPRPPSYTISIVLGSSTKDKGNCVGRKSCLCNRFVRSKADEYVEHTSVLST	59
P81128	RHG35_RAT	61	SDFGGRVNNHDFLYWGEVSRSLDCEVCKMHIVEQTEFIDDTQFPHRSTALQPIKRA	120
Q13017	RHG05_HUMAN	60	IDFGGRVNNHDFLYWGDIIQNSDGVCEKIHVIEQTEFIDDTQFLPHRSTNLQPIKRA	119
P81128	RHG35_RAT	121	AATKLASAELMYFCFDQLGLEQDFEQKQMPDGKLLVDFGLLGDVSRGMNRNPDQLKF	180
Q13017	RHG05_HUMAN	120	AASKLQSAELMYICFDQLGLEQDFEQKQMPDGKLLVDFGLLGDVSRGMNRNPDQLKF	179
P81128	RHG35_RAT	181	VSNLYQLAKTKPIVIVLTKCDEGVERYIRDAHTFALSKNLQVETSARSNNVVDLAF	240
Q13017	RHG05_HUMAN	180	VNLFVQLSKSKKPIVIAATKCDECDHYLREVQAFASKNKLLVVEVSARFNVNIETCF	239
P81128	RHG35_RAT	241	STLVQLIDKSRGKTKIIPYFEALQSQOIAATKDKYEWLVRVSKSHNENWLSVRKMQ	300
Q13017	RHG05_HUMAN	240	TALVQLDKTRSKPKIIPYLDAYKTRQLVVTATDKFEKLVQTV--RDYHATWKTYSNKLK	298
P81128	RHG35_RAT	301	ASPEYQDYVYLEGTKAKKLFQHIHRLKHEIERRRKLALPLAFEALIPNLDEVDH	360
Q13017	RHG05_HUMAN	299	NHPDYEYINLEGRKARTFSKHIEQLKQEHIRKREYINTLPRAFNTLLPNEEIEH	358
P81128	RHG35_RAT	361	LSCIKAKLLETKEPEFLKQEVVLEETPWEDETSIINDMENERIPFDLMDTVPAEQLYETHL	420
Q13017	RHG05_HUMAN	359	LNWSEALKMEKRAFQLEEVVLEETPWEDETHIDKINDRIIPFDLMDTLEAEKVVQNHV	418
P81128	RHG35_RAT	421	EKLNRERKRAEMRRFAKENLETSPFITPGKPWEARSFIMNEDFYQWLEESVYMDIYKGH	480
Q13017	RHG05_HUMAN	419	QHLISEKRRVEMKEKFKTKLEKIQFISPGQPEWEEVMCFVMEDEAYKIITEADSKVEYGRH	478
P81128	RHG35_RAT	481	QKQIIDRAKEEFQELLEYSLEFYLELDAKPSKEMGVIQDLGEEQRFKALQKLAER	540
Q13017	RHG05_HUMAN	479	QRIVEKAKEEFQEMLFHESELFYDLDLNATPSSDKMSEIHTVLSSEPRYKALQKLAPDR	538
P81128	RHG35_RAT	541	DALILKHIHFVYHPTKECPSPACVDKIEHLISSRFIRPSDRNKNLSDPNIDRINL	600
Q13017	RHG05_HUMAN	539	ESLLKHIHFVYHPTKELTCLSGQNTDQKVEQLLASLLQDHDGRRLYHDSTNIDKVN	598
P81128	RHG35_RAT	601	VILGKDLARELANEIRALCTNDDKYVIDGMYELSLRPIEGNVRVLPVNSFQTPFPQHG	660
Q13017	RHG05_HUMAN	599	FILGKDLAQELANEIRTQS--TDDEYALDGIKIELDLRVPDAKSPYFLSQWTAAPKPHG	657
P81128	RHG35_RAT	661	CLCLYSKESLSYVVESIEKSRST--LGRDNLHVLPLTLLLVNKRGDTSGETLHSLIQ	719
Q13017	RHG05_HUMAN	658	CFVFNIESLSPIGEFIRTEASQIRKDKYMANLPPTLLIANGRDSI--SKNLPILRH	716
P81128	RHG35_RAT	720	QGQIASKIQCVFLDPASAGIYGRNINEKQISQVLKGLDS--KRNILNVSTASIKDLA	778
Q13017	RHG05_HUMAN	717	QGQLANLQCFVDPVAG--TYPRKFNQIKQALRGVLESVKNLDDVSPVPIANKLDS	774
P81128	RHG35_RAT	775	DVDLRIVMCLMGDPFSADDILSPVLQSTCKSSHCGSSNVLELPIGVHKKRIELSVL	838
Q13017	RHG05_HUMAN	774	EADLRIVMCAMGDPFSDVLIISPFLDHSCSAAQAGNNSLMDKIIEGKRRRIQITIL	834
P81128	RHG35_RAT	839	SYHSSFSIRKSRVHGYIVFYSAKRKASLMLRAPLCEVODIIPIQLVALTGDGIVDLDN	898
Q13017	RHG05_HUMAN	835	SYHSSIGVRKDELVHGYILVYSAKRKASMLRAPLSEVQDITPVQLVAVTDSQADFEN	894
P81128	RHG35_RAT	899	DLSREQLTEGEEIAEQIDGRFTSIPC--SQPQKLELFPFPKDVVEKKNIEATHMYDNL	957
Q13017	RHG05_HUMAN	895	EAKELMTEGEHIAETIAKFTALYSLSQYHRQTEVFTLFFSDVLEKKNMIENSYLSNT	954
P81128	RHG35_RAT	958	AECSTTEEVFNS PRAGSPICNSNLQDSDEEDVEPPSYHLFREDATLPSLKDHSKFSME	1016
Q13017	RHG05_HUMAN	955	RETHQSEDFVLP--PRDCFPYNN--YPSDDDETAAPPYPIGDVQLLPTSPDRSRYRLD	1013
P81128	RHG35_RAT	1017	LEGNDSLFSIMSN--FESKLNKVPVVKPKPPVHFEITKDL----SYLDQGHREGQRIS	1070
Q13017	RHG05_HUMAN	1014	LEGNEYPIHSTFNCHDHERNHKVPPIKPKVPVKTNVKLDPNLLKTIIEAGIKNPRKQ	1073
P81128	RHG35_RAT	1071	MSSSPWMPQDGFDP--SDYAEFMDAVKPKNEEENIYSVPHDSTOGKIITRNINKAQSNG	1129
Q13017	RHG05_HUMAN	1074	TSRVPLAHPEDMPSDNYAEPIDTIFKQGYSEIYVVPDSDNRKIRNSFVNTQGD	1133
P81128	RHG35_RAT	1130	SGNGSDSEMDTSSILERGRKVSASVKPVIYRTRCTRI--GRFASVYRTSFSVGSDDDELGPTR	1187
Q13017	RHG05_HUMAN	1134	E--NGF--SDRTSKSHG----ERRHSKYKYKSTLFSKAKSYRRTSHSDASDDEAFTTS	1184
P81128	RHG35_RAT	1188	KKREDQASQCYKGDNAVIVPE-----TDEDPR---RRNIIKLSIRNNTKPKPK	1231
Q13017	RHG05_HUMAN	1185	KTTRKGRHRGSEEDPLSPVETWKGIDNPATSDQLDDKMKKTKHKVEDKQKQKKT	1244
P81128	RHG35_RAT	1232	KRPSITKATWESNYFGVPLTWTVPEKPIPIFIERCIEYIETATGLSTEGIVRYSNGKSE	1291
Q13017	RHG05_HUMAN	1245	KNFNPPTRRNWESNYFGMPLQDLVTAEKPIPLFVEKCVFIETDGLCTEGLYRYSNGKTD	1304
P81128	RHG35_RAT	1292	MESLQRQFDQDHNLDLAEKDFVNTVAGAMKSFSELPDLPVPSMQIDLVEAHKINDRE	1351
Q13017	RHG05_HUMAN	1305	QDNIQKQFDQDHNINLVSMEVTVNAVAGALKAFADLPDPLIPLYSHPLELAAKIPDKT	1364
P81128	RHG35_RAT	1352	QKLHALKEVLKFKPKENHEVFKYIVSHLNRVSHNNKVNLMTSENLSICFWPTLMRDPFSS	1411
Q13017	RHG05_HUMAN	1365	ERLHALKEIVKFKHPVNVDFRYVITHLNRVSHNNKVNLMTADNLSICFWPTLMRDPFEN	1424
P81128	RHG35_RAT	1412	MDALTATRSYQTIIELEFIQCCPFYFNRIPEPPGAAPGPS----AMAPTVPFLTSTP	1466
Q13017	RHG05_HUMAN	1425	REFLSTTKIHQSVVETFIQCCQFFNYNGEIVETNIIVAPPSPNPGLVPEMPVPL----	1479
P81128	RHG35_RAT	1467	ATSQSPSPQSPPTPQSPMQPLSSQLQAEHTL	1499
Q13017	RHG05_HUMAN	1480	-----QLPPPLQPLIQPLQPLDPLGII--	1502

Domaines PLS de p190A et domaine « PLS-like » de p190B

Domaine Cter2h de p190A

Domaine Cter2h de p190B

# Annexe 4 : Alignement des séquences protéines de p190A (humain) et p190A (rat) - Uniprot

Entry	Entry name	Protein names	Organism	Gene name
<input type="checkbox"/> Q9NRY4	RHG35_HUMAN	<b>Rho GTPase-activating protein 35</b>	Homo sapiens (Human)	<b>ARHGAP35</b> GRF1, GRLF1, KIAA1722, P190A, p190ARHOGAP
<input type="checkbox"/> P81128	RHG35_RAT	<b>Rho GTPase-activating protein 35</b>	Rattus norvegicus (Rat)	<b>Arhgap35</b> Grif1, P190A, p190ARHOGAP

Identical positions	1,465
Identity	97.667%
Similar positions	26
Program	CLUSTALO

Q9NRY4	RHG35_HUMAN	1	MMMARKQDVRIPTYNISVVVLSGTEKEKGGCGIGKSCLCNRFVRSAPAEFHLDHTSVLST	60
P81128	RHG35_RAT	1	MMMARKQDVRIPTYNISVVVLSGTEKEKGGCGIGKSCLCNRFVRSAPAEFHLDHTSVLST	60
Q9NRY4	RHG35_HUMAN	61	SDFGGRVNNDFHLYWGEVSRSLDCVECKMHIVEQTEFIDDQTFQPHRSTALQPIKRA	120
P81128	RHG35_RAT	61	SDFGGRVNNDFHLYWGEVSRSLDCVECKMHIVEQTEFIDDQTFQPHRSTALQPIKRA	120
Q9NRY4	RHG35_HUMAN	121	AATKLASAEKLMYFCTDQLGLEQDFEQKMPDGKLLVDGFLGIDVSRGMNRRNFDQLKF	180
P81128	RHG35_RAT	121	AATKLASAEKLMYFCTDQLGLEQDFEQKMPDGKLLVDGFLGIDVSRGMNRRNFDQLKF	180
Q9NRY4	RHG35_HUMAN	181	VSNLYNQLAKTKKPIVVLTKCDEGVERYIRDAHTFALSCKNLQVETSARSNNVDLAF	240
P81128	RHG35_RAT	181	VSNLYNQLAKTKKPIVVLTKCDEGVERYIRDAHTFALSCKNLQVETSARSNNVDLAF	240
Q9NRY4	RHG35_HUMAN	241	STLVQLIDKSRGKTKIIPYFEALKQSQIATAKDKYEWLVSRIKSHNENWLSVSRKMQ	300
P81128	RHG35_RAT	241	STLVQLIDKSRGKTKIIPYFEALKQSQIATAKDKYEWLVSRIKSHNENWLSVSRKMQ	300
Q9NRY4	RHG35_HUMAN	301	ASPEYQDYVYLEGTQKAKKLFLOHHRKHEHIERRRKLILAALPLAFEALIPNLDEIDH	360
P81128	RHG35_RAT	301	ASPEYQDYVYLEGTQKAKKLFLOHHRKHEHIERRRKLILAALPLAFEALIPNLDEIDH	360
Q9NRY4	RHG35_HUMAN	361	LSCIKAKKLETKPEFLKWFVLEETPWDETSHTDNMENERIPFDLMDTVPAEQLYEAEHL	420
P81128	RHG35_RAT	361	LSCIKAKKLETKPEFLKWFVLEETPWDETSHTDNMENERIPFDLMDTVPAEQLYEAEHL	420
Q9NRY4	RHG35_HUMAN	421	EKLNRERKRVEMRRFAKFNLETSPPFITPGKPWEARSFIMNEDFYQWLEESVYMDIYKGH	480
P81128	RHG35_RAT	421	EKLNRERKRVEMRRFAKFNLETSPPFITPGKPWEARSFIMNEDFYQWLEESVYMDIYKGH	480
Q9NRY4	RHG35_HUMAN	481	QKQIIDKAKEEFQELLESELYELEDKAPSKEMGVIQDVLGEEQRFKALQKLAER	540
P81128	RHG35_RAT	481	QKQIIDKAKEEFQELLESELYELEDKAPSKEMGVIQDVLGEEQRFKALQKLAER	540
Q9NRY4	RHG35_HUMAN	541	DALLLKHIFVYHPTKETCPSPACVDAKIEHLISRRFIRPSDRNQKNSLSDPNIDRINL	600
P81128	RHG35_RAT	541	DALLLKHIFVYHPTKETCPSPACVDAKIEHLISRRFIRPSDRNQKNSLSDPNIDRINL	600
Q9NRY4	RHG35_HUMAN	601	VILGKDGRLARELANEIRALCTNDDKYVIDGKMYELSLRPIEGNVRPLVNSFQTFPFQPHG	660
P81128	RHG35_RAT	601	VILGKDGRLARELANEIRALCTNDDKYVIDGKMYELSLRPIEGNVRPLVNSFQTFPFQPHG	660
Q9NRY4	RHG35_HUMAN	661	CLCLYNSKESLSYVVEIEKSRSTLGRDRNHLVHPLTLILVNRKGDTSGETLHSLIQQ	720
P81128	RHG35_RAT	661	CLCLYNSKESLSYVVEIEKSRSTLGRDRNHLVHPLTLILVNRKGDTSGETLHSLIQQ	720
Q9NRY4	RHG35_HUMAN	721	GQQIASKLQCVFLDPASAGIGYGRNINEKQISQVLKGLLDSKRNINLVSTASIKDLADV	780
P81128	RHG35_RAT	721	GQQIASKLQCVFLDPASAGIGYGRNINEKQISQVLKGLLDSKRNINLVSTASIKDLADV	780
Q9NRY4	RHG35_HUMAN	781	DLRIVMCLMGDPFSAADDILFPVLSQTCCKSHCGSNNSVLELPIGLHKKRIELSVLSY	840
P81128	RHG35_RAT	781	DLRIVMCLMGDPFSAADDILFPVLSQTCCKSHCGSNNSVLELPIGLHKKRIELSVLSY	840
Q9NRY4	RHG35_HUMAN	841	HSSFIRKSRVHGYIVFYSAKRKASLAMLRAFLCEVQDIIPIQIQLVALTDGAVDVLNDL	900
P81128	RHG35_RAT	841	HSSFIRKSRVHGYIVFYSAKRKASLAMLRAFLCEVQDIIPIQIQLVALTDGAVDVLNDL	900
Q9NRY4	RHG35_HUMAN	901	SREQLTEGEEIAQEI DGRFTSIPCSQPQHKLEIFHPFFKDVVEKKNIEATHMYDNAEAE	960
P81128	RHG35_RAT	901	SREQLTEGEEIAQEI DGRFTSIPCSQPQHKLEIFHPFFKDVVEKKNIEATHMYDNAEAE	960
Q9NRY4	RHG35_HUMAN	961	CSTTEEVFNPRAGSPLCNSNLQDSEEDIE-PSYSLFREDTSLPSLKDHSKLSMELEGN	1019
P81128	RHG35_RAT	961	CSTTEEVFNPRAGSPLCNSNLQDSEEDIE-PSYSLFREDTSLPSLKDHSKLSMELEGN	1019
Q9NRY4	RHG35_HUMAN	1020	DGLSPIMSNFESKLNKVPVPPKPKPVHFEITKGDLSYLDQCHRDQQRKSVSSSPWLPQ	1079
P81128	RHG35_RAT	1020	DGLSPIMSNFESKLNKVPVPPKPKPVHFEITKGDLSYLDQCHRDQQRKSVSSSPWLPQ	1079
Q9NRY4	RHG35_HUMAN	1080	DGFDPSDYAEPMDAVVKPRNEENIYSVPHDSTQGGKIITIRNINKAQSNNGSDSEMD	1139
P81128	RHG35_RAT	1080	DGFDPSDYAEPMDAVVKPRNEENIYSVPHDSTQGGKIITIRNINKAQSNNGSDSEMD	1139
Q9NRY4	RHG35_HUMAN	1140	TSSLERGRKVSIVSKPVLRYRTRCTRLGRFASVYRTSFSVGSDELGPIRKKEEQASQGYK	1199
P81128	RHG35_RAT	1140	TSSLERGRKVSIVSKPVLRYRTRCTRLGRFASVYRTSFSVGSDELGPIRKKEEQASQGYK	1199
Q9NRY4	RHG35_HUMAN	1200	GDNAVI PYETDEDP RRRLILRS LRRTKPKPKPRPSITKATWESNYFGVPLTTVVTPEK	1259
P81128	RHG35_RAT	1200	GDNAVI PYETDEDP RRRLILRS LRRTKPKPKPRPSITKATWESNYFGVPLTTVVTPEK	1259
Q9NRY4	RHG35_HUMAN	1260	PIPIPIERICIEYIATGLSTEGYRVSGNKSSEMSLQRFQDQHNLDLAEKDFVTNTVAG	1319
P81128	RHG35_RAT	1260	PIPIPIERICIEYIATGLSTEGYRVSGNKSSEMSLQRFQDQHNLDLAEKDFVTNTVAG	1319
Q9NRY4	RHG35_HUMAN	1320	AMKSFSELPDPLVPYMQIDLVEAHKINDREQRLHALKEVLKPKPKENHEVFKYVISHL	1379
P81128	RHG35_RAT	1320	AMKSFSELPDPLVPYMQIDLVEAHKINDREQRLHALKEVLKPKPKENHEVFKYVISHL	1379
Q9NRY4	RHG35_HUMAN	1380	NKVSHNNKVNLMTSNLSICFWPTLMRPFDSMDALTATRSYQTIIELFIQCCPFFFYNR	1439
P81128	RHG35_RAT	1380	NKVSHNNKVNLMTSNLSICFWPTLMRPFDSMDALTATRSYQTIIELFIQCCPFFFYNR	1439
Q9NRY4	RHG35_HUMAN	1440	PITEPPGARPPSSAVASTVFFLTSTPVTSPQSPPPQSPPTPQSPMQPLLSQLQAEHTL	1499
P81128	RHG35_RAT	1440	PISEPPGAAPGSPSAMATVFFLTSTPATSQSPSPQSPPTPQSPMQPLLSQLQAEHTL	1499

## Annexe 5 : Matériels & Méthodes

### Culture cellulaire

Les cellules HEK293T et Huh7 ont été cultivées dans un milieu DMEM 4,5g/l de glucose (Gibco). Les lignées AN3Ca, HEC-1-B et Ishikawa ont été cultivées dans un milieu MEM (Gibco). Les cellules HEC-1-A ont été cultivées dans du milieu Mc Coys (Gibco) et les lignées KLE et RL95-2 dans du milieu DMEM : F12 (Gibco). Ces différents milieux de culture cellulaire utilisés ont été supplémentés avec 10% de sérum de vœu fœtal. Elles sont cultivées à 37°C dans une atmosphère à 5% de CO<sub>2</sub> et décollées avec de la trypsine (0,05% trypsine-EDTA, Gibco). Le traitement au MG132 a été ajouté au milieu de culture pour une concentration finale de 50 mM pendant 4h avant analyse.

### ARN interférent (siRNA)

Les cellules ont été transfectées avec des siRNA dirigés contre Cdc42, Cortactine, p120RasGAP, p190B, Rac1, RhoA, Rnd3 (**Tableau 7**) ou un siRNA contrôle (si Ctrl 5'-AATTCTCCGAACGTGTCACGT -3') lors d'un protocole en plusieurs étapes. Le premier jour, 4.10<sup>5</sup> cellules par boîte 6 cm ont étéensemencées. Le deuxième jour, un mélange Opti-MEM (Gibco), Lipofectamine RNAimax (Fisher Scientific) et siRNA a été ajouté aux cellules (selon le protocole du fournisseur). Les cellules sont placées à l'incubateur à 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>. Le lendemain, une fois le milieu changé, un nouveau mélange total contenant le siRNA, la Lipofectamine et l'Opti-MEM a été ajouté aux cellules et le tout a été incubé, avant utilisation des cellules 2 ou 3 jours plus tard (pour les expériences de ColP ou de prolifération, respectivement).

siRNA	Séquences 5' → 3'	Protéine ciblée
si1 Cdc42	AAGAUAAACUCACCACUGUCCA	Cdc42
si1 Cortactine	CCCAGAAAGACUAUGUGAAAGGGUU	Cortactine
si2 Cortactine	GGAGAAGCACGAGUCACAGAGAGAU	Cortactine
si1 p120	GAUGAAGCCACUACCCUAAUUU	p120RasGAP
si1 p190A	AAGGCAACCUUGGGAGAGUAAC	p190A
si2 p190A	AACCUCUCCAUCUGCUUCUGG	p190A
si3 p190A	GCAGAAGUUGCAUGCCCUUAA	p190A
si4 p190A	GAACAGCGAUUUAAAGCAUUU	p190A
si1 p190B	AACGUGCAGCUGCAUCUAAA	p190B
si2 Rac1	AAGGAGAUUGGUGCUGUAAAA	Rac1
si1 RhoA	GAAGUCAAGCAUUUCUGUC	RhoA
si1 Rnd3	UAGUAGAGCUCUCCAAUCACA	Rnd3

Tableau 7 : Liste des siRNAs utilisés.



## Génération des plasmides

- Clonage par PCR.

Les constructions des domaines identifiés lors du criblage double hybride, de l'équivalent du PLS pour p190B ont été générés par PCR, par sous-clonage dans un plasmide pKH3 (Addgene). Les plasmides utilisés pour les expériences de BRET ont été sous-clonés dans les vecteurs pcDNA3.1(+)-YFP-Luciférase ou pcDNA3.1(+)-Luciférase-YFP. Les constructions, matrices et amorces utilisées sont détaillées dans le **tableau 8**.

Plasmide généré	Matrice utilisée	Amorces Sens 5' → 3'	Amorces Anti-sens 5' → 3'
pKH3-p190A-Cter2h	pKH3-p190A	CGGGATCCCCGAGATCTTTCTACTTAGACC	GGAATTCAGGGTTTGGGCTTTGGTTTCTTG
pKH3-p190B-PLS	pcDNA3.1+/C-(K)DYK - ARHGAP5	GCG GGATCCTTTGTGGTGTAGAAAA	CGGAATTCAGATGGTAGAAAAACATC
pKH3-p190B-Cter2h	pcDNA3.1+/C-(K)DYK - ARHGAP5	CGGGATCCCCGGAGGCGCTTCAAATACAAATAT	GGAATTCCTTCTCAGCTGTAACCCAGATCCTG
pcDNA3.1 (+) YFP-p190A	pKH3-p190A	GTACCGGTGAATTCTGGTGGAGGCGGATC TATGATGATGGCAAGAAAAGCAAGATGTCC	CCCTCTAGAGTCGACCGGTACACAGC GTGTGTTCCGGCTTGGAGCTGAGAGG
pcDNA3.1 (+) Luc-p190A	pKH3-p190A	GTACCGGTGAATTCTGGTGGAGGCGGATC TATGATGATGGCAAGAAAAGCAAGATGTCC	CCCTCTAGAGTCGACCGGTACACAGC GTGTGTTCCGGCTTGGAGCTGAGAGG
pcDNA3.1 (+) p190A-Luc	pKH3-p190A	GGTACCGAGCTCGGATCCGCCAACCAT GATGATGGCAAGAAAAGCAAGATGTCC	GCCTCCACCAGAATTCACCGGTACACAG CGTGTGTTCCGGCTTGGAGCTGAGAGG
pcDNA3.1 (+) p190A-YFP	pKH3-p190A	GGTACCGAGCTCGGATCCGCCAACCAT GATGATGGCAAGAAAAGCAAGATGTCC	GCCTCCACCAGAATTCACCGGTACACAG CGTGTGTTCCGGCTTGGAGCTGAGAGG
pcDNA3.1 (+) YFP-PLS	pKH3-p190A	TACCGGTGAATTCTGGTGGAGGCGGATCTA TGTTTGTGTACTTGAAGAGGACACCATGGG	ATCTAGTCTAGACTCGAGCGGTTAG GAGTTGAATACCTCCTCAGTGGTGC
pcDNA3.1 (+) Luc-PLS	pKH3-p190A	TACCGGTGAATTCTGGTGGAGGCGGATCTA TGTTTGTGTACTTGAAGAGGACACCATGGG	ATCTAGTCTAGACTCGAGCGGTTAG GAGTTGAATACCTCCTCAGTGGTGC
pcDNA3.1 (+) PLS-Luc	pKH3-p190A	TGTCTGGATCCGCCACCATGTTTGT TGTACTTGAAGAGACACCATGGG	CACCAGAATTCACCGGTACCGGA GTTGAATACCTCCTCAGTGGTGC
pcDNA3.1 (+) PLS-YFP	pKH3-p190A	TGTCTGGATCCGCCACCATGTTTGT TGTACTTGAAGAGACACCATGGG	CACCAGAATTCACCGGTACCGGA GTTGAATACCTCCTCAGTGGTGC
pcDNA3.1 (+) YFP-Cter	pKH3-p190A	ACCGGTGAATTCTGGTGGAGGCGGATCTA TGGATCTTTCTACTTAGACCAAGGTCATCG	CCCTCTAGAGTCGACCGGTACACAGC GTGTGTTCCGGCTTGGAGCTGAGAGG
pcDNA3.1 (+) Luc-Cter	pKH3-p190A	ACCGGTGAATTCTGGTGGAGGCGGATCTA TGGATCTTTCTACTTAGACCAAGGTCATCG	CCCTCTAGAGTCGACCGGTACACAGC GTGTGTTCCGGCTTGGAGCTGAGAGG
pcDNA3.1 (+) Cter-Luc	pKH3-p190A	TGTCTGGATCCGCCACCATGGATC TTTCTACTTAGACCAAGGTCATCG	GCCTCCACCAGAATTCACCGGTACACAG CGTGTGTTCCGGCTTGGAGCTGAGAGG
pcDNA3.1 (+) Cter-YFP	pKH3-p190A	TGTCTGGATCCGCCACCATGGATC TTTCTACTTAGACCAAGGTCATCG	GCCTCCACCAGAATTCACCGGTACACAG CGTGTGTTCCGGCTTGGAGCTGAGAGG
pcDNA3.1 (+) YFP-p190A S866F	pKH3-p190A S866F	GTACCGGTGAATTCTGGTGGAGGCGGATC TATGATGATGGCAAGAAAAGCAAGATGTCC	CCCTCTAGAGTCGACCGGTACACAGC GTGTGTTCCGGCTTGGAGCTGAGAGG
pcDNA3.1 (+) Luc-p190A S866F	pKH3-p190A S866F	GTACCGGTGAATTCTGGTGGAGGCGGATC TATGATGATGGCAAGAAAAGCAAGATGTCC	CCCTCTAGAGTCGACCGGTACACAGC GTGTGTTCCGGCTTGGAGCTGAGAGG
pcDNA3.1 (+) p190A-Luc S866F	pKH3-p190A S866F	GGTACCGAGCTCGGATCCGCCAACCAT GATGATGGCAAGAAAAGCAAGATGTCC	GCCTCCACCAGAATTCACCGGTACACAG CGTGTGTTCCGGCTTGGAGCTGAGAGG

Tableau 8 : Liste des plasmides générés par clonage PCR et les amorces utilisées.

- Réalisation des mutants par mutagenèse dirigée.

La mutagenèse dirigée a été réalisée à l'aide du kit QuickChange II XL Site-Directed Mutagenesis® (Agilent Technologies), selon les instructions du fournisseur. Les mutants sont réalisés à partir du vecteur pKH3-p190A WT (p190A rat) dont la protéine présente 97% d'homologie avec la forme humaine (**Annexe 5**). La mutagenèse dirigée est basée sur la

réalisation d'une PCR en utilisant 10 ng de vecteur plasmidique comme matrice. Les modifications de bases ont été insérées grâce à l'utilisation de 125 ng d'amorces dont la séquence a été modifiée par rapport à la séquence sauvage (**Tableau 9**).

La PCR s'effectue de manière classique selon trois étapes : (1) dénaturation de l'ADN double brin à 95°C, (2) hybridation des deux amorces qui contiennent la mutation désirée à 60°C et (3) élongation par l'ADN polymérase High Fidelity PfuUltra à 68°C. Les plasmides obtenus (mutés et sauvages) ont été traités avec 1 µL de DpnI à 37°C pendant 1h. Cette endonucléase permet de sélectionner les plasmides contenant les mutations désirées.

Des bactéries ultracompetentes XL10-Gold sont transformées par 2 µL de réaction de PCR par choc thermique (30 secondes à 42°C) puis étalées sur milieu LB-agar supplémenté en ampicilline (100 µg/mL).

Amorces	Séquences 5' → 3'	Protéine ciblée
p190A Y1087F-Forward	GGATTTGATCCTTCTGACTTCGCAGAGCCCATGGATGCTGTGG	p190A
p190A Y1087F-Reverse	CCACAGCATCCATGGGCTCTGCGAAGTCAGAAGGATCAAATCC	p190A
p190A S866F-Forward	GCCAAACGTAAGGCCTTCTTGGCAATGTTA CGT	p190A
p190A S866F-Reverse	ACGTAACATTGCCAAGAAGGCCTTACGTTTGGC	p190A
p190A Y1105F-Forward	GAGGAAGAAAACATATTCTCAGTGCCCCACGAC	p190A
p190A Y1105F-Reverse	GTCGTGGGGCACTGAGAATATGTTTTCTTCCTC	p190A

Tableau 9 : Liste des amorces utilisés pour introduire des mutations par mutagenèse dirigée.

- Purification plasmidique et digestion enzymatique.

Les plasmides sauvage et mutés ont été purifiés à l'aide du kit NucleoBond® Xtra Maxi EF (Macherey-Nagel), selon les instructions du fournisseur. Les échantillons obtenus ont été dosés au lecteur de plaque Victor Nivo® (DO à 260nm). La présence de l'insert est vérifiée par digestion enzymatique par les enzymes de restriction EcoRI et BamHI. Le mélange réactionnel d'un volume final de 10 µL contient du tampon 10X FastDigest Buffer (Fermentas), 500 ng de plasmide, 1 µL d'enzyme EcoRI et BamHI (Fermentas). L'ensemble est incubé 30 minutes à 37°C. Les produits de digestion sont ensuite séparés par électrophorèse sur gel d'agarose 1% (m/v). L'ADN plasmidique des différents mutants est séquencé par la plateforme Genewiz selon le principe de séquençage Sanger.

### Transfection plasmidique

Les cellules HEK293T ont été transfectées avec des plasmides à l'aide de la Lipofectamine 2000 (Fisher Scientific). 4.10<sup>5</sup> ou 2.10<sup>6</sup> cellules ont étéensemencées en boîte 6 cm ou 10 cm, respectivement. 24h après ensemencement, un mélange Opti-MEM (Gibco), Lipofectamine 2000 et des plasmides a été ajouté aux cellules (selon le protocole du

fournisseur. En cas de transfection double ou triple, la concentration en plasmides a été ajustée. Les cellules ont ensuite été incubées à 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> pendant 24h avant leur utilisation. Les différents plasmides utilisés sont listés dans le **tableau 10**.

<b>Protéine</b>	<b>Vecteur plasmidique</b>	<b>Étiquette</b>	<b>Séquence</b>	<b>MW (kDa)</b>
HA-p190A WT	pKH3-p190A	HA	1-1513	190
HA-p190A S866F	pKH3-p190A S866F	HA	1-1513	190
YFP-p190A WT	pcDNA3.1(+YFP-p190A	YFP	1-1513	218
YFP-p190A S866F	pcDNA3.1(+YFP-p190A S866F	YFP	1-1513	218
HA-p190A ΔPLS	pKH3-p190AΔPLS	HA	1- 379 & 800-1513	130
HA-PLS WT	pKH3-p190A-PLS	HA	380-971	65
HA-PLS S866F	pKH3-p190A-PLS S866F	HA	380-971	65
HA-PLS Δ865-870	pKH3-p190A-PLS Δ865-870	HA	380-971	65
GFP-PLS WT	pEGFPC1-p190A-PLS	GFP	380-971	95
GFP-PLS S866F	pEGFPC1-p190A-PLS S866F	GFP	380-971	95
GFP-PLS Δ865-870	pEGFPC1-p190A-PLS Δ865-870	GFP	380-971	95
HA-Nter	pKH3-p190A-Nter	HA	1-533	60
HA-Nter2h	pKH3-p190A-Nter2h	HA	207-418	23
HA-GBD	pKH3-p190A-GBD	HA	1-257	30
HA-2FF	pKH3-p190A-2FF	HA	380-531	20
HA-4FF	pKH3-p190A-4FF	HA	251-533	30
HA-Cter	pKH3-p190A-Cter	HA	1055-1513	50
HA-Cter2h	pKH3-p190A-Cter2h	HA	1069-1231	18
HA-p120BD	pKH3-p190A-p120DB	HA	1055-1180	15
HA-GAP	pKH3-p190A-GAP	HA	1259-1513	30
HA-Cter Y1087F	pKH3-p190A-Cter Y1087F	HA	1055-1513	50
HA-Cter Y1105F	pKH3-p190A-Cter Y1105F	HA	1055-1513	50
HA-Cter Y 1105E	pKH3-p190A-Cter Y1105E	HA	1055-1513	50
HA-PLS_B	pKH3-p190B-PLS	HA	378-969	60
HA-Cter2h_B	pKH3-p190B-Cter2h	HA	1151-1272	18
HA-p190A ΔNter	pKH3-p190A ΔNter	HA	533-1513	130
HA-p190A ΔNter S866F	pKH3-p190A ΔNter S866F	HA	533-1513	130
HA-p190A R977*	pKH3-p190A R997*	HA	1-997	130
HA-p190A Y1087F	pKH3-p190A Y1087F	HA	1-1513	190
HA-p190A Y1105F	pKH3-p190A Y1105F	HA	1-1513	190
HA-p190A Y1087F & Y1105F	pKH3-p190A Y1087F & Y1105F	HA	1-1513	190
HA-p190A Y1283F	pKH3-p190A Y1283F	HA	1-1513	190
YFP-Cter	pcDNA3.1(+YFP-p190A-Cter	YFP	1055-1513	85

Protéine	Vecteur plasmidique	Étiquette	MW (kDa)
GFP-G12V Cdc42	pEGFP-C2 V12 Cdc42	GFP	50
Flag-p190B	pcDNA3.1+/C-(K)DYK - ARHGAP5	Flag	190
mCherry-Cortactine	pmCherry-Cortactin	mCherry	115
GFP-L61 Rac1	pCB6-GFP Rac1 L61	GFP	50
GFP-G14V RhoA	pCB6-GFP RhoA V14	GFP	50
GFP-Rnd3	pEGFP-C1 - Rnd3	GFP	50
Myc-p120RasGAP	pCMV6-RASA1	Myc	120

Tableau 10 : Liste des plasmides utilisés.

### Test de dégradation de la matrice

- Préparation des matrices de gélatine.

Des lamelles de verre ont été incubées sur des gouttes de 20µL de gélatine Oregon 488 1mg/ml (Invitrogen) pendant 20 minutes. Puis, les lamelles ont été fixées sur de la glutaraldéhyde 0,5% (Electron Microscopy Science) pendant 40 minutes. Elles ont enfin été lavées 3 fois avec du PBS 1X (Phosphate Buffer Saline, Gibco) puis conservées à 4°C jusqu'à utilisation. Les cellules ont ensuite étéensemencées et incubées à 37° pendant 24h avant analyse.

- Immunofluorescence.

Les cellules ont étéensemencées à  $4 \cdot 10^5$  cellules par puits sur des lamelles de matrice gélatine fluorescente puis incubées toute la nuit à 37°C. Elles ont ensuite été fixées avec de la paraformaldéhyde 4% pendant 10 minutes à température ambiante, puis rincées trois fois au PBS 1X. Après fixation, les cellules ont été perméabilisées avec dans une solution de PBS-Triton 0,2% pendant 10 minutes à température ambiante avant trois lavages au PBS.

Des gouttes de PBS 1X (4% BSA) contenant du Hœcsht au 1/10000<sup>ème</sup> pour marquer les noyaux. Les lamelles ont ensuite été rincées trois fois dans du PBS avant d'être montées sur les lames à l'aide du milieu de montage Fluoromont-G (SouthernBiotech). Les images ont été réalisées au microscope à épifluorescence Zeiss, puis analysées avec le logiciel ImageJ.

### Prolifération cellulaire

Les cellules ont étéensemencées à 4 000 cellules par puits dans une plaque 96 puits. Les cellules ont été suivies par vidéomicroscopie à l'aide de l'Incucyte® (Essen Bioscience). La confluence des cellules et la quantification ont été effectuées en utilisant le logiciel associé à l'Incucyte.

### **Extraction protéique**

Une fois à confluence, les cellules ont été lysées de façon mécanique, sur glace, à l'aide d'un grattoir dans un tampon de lyse (50 mM Tris, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% Nonidet P40) complétement avec des inhibiteurs de protéases et phosphatases 1X (Halt, Thermo Scientific).

Pour les extraits de tissu d'endomètre, un tampon RIPA (0,1% SDS, 1% NP40, 150mM NaCl, 1% sodium deoxyolate, 25mM Tris HCl pH 7,4) complétement avec des inhibiteurs de protéases 1X (Complete Mini EDTA, Roche) et des inhibiteurs de phosphatases 1X (PhosphoSTOP, Roche) a été ajouté au broyat et incubé sous agitation pendant 2 heures.

Le lysat est centrifugé 15 min à 13 000g à 4°C, puis le surnageant contenant les protéines a été conservé. Les extraits protéiques obtenus ont été dosés par la méthode Lowry à l'aide d'un kit selon les recommandations du fournisseur (kit DCTM Protein Assay, Biorad), puis lus au spectrophotomètre à 750nm.

### **Immunoprécipitation**

Un mg de lysat protéique (Huh7) a été incubé avec un anticorps anti-p190A (BD Trans Lab, #610149), un anticorps anti-p190B (BD Trans Lab, #611612) ou un anticorps contrôle (IgG) pendant la nuit en agitation à 4°C (selon les informations du fournisseur).

Quarante µl de billes magnétiques (Protéine G, Thermo Fisher) préalablement rincées par un tampon RIPA ont été ajoutées. Le mélange lysat-anticorps-billes est incubé à 4°C pendant 2h sous agitation. Cinq rinçages ont été effectués avec du tampon RIPA. Les billes ont été reprises dans du tampon Laemmli (Biorad)/β-mercaptoethanol (Sigma) à une concentration finale de 1X avant d'être dénaturées pendant 10 minutes à 95°C.

### **Co-immunoprécipitation**

De 1 à 2 mg de lysat protéique à partir de HEK293T transfectées ont été incubées avec les billes couplées à un anticorps anti-HA (Roche) pendant 30 minutes en agitation à 4°C (selon les informations du fournisseur). Trois cycles de centrifugation et rinçages ont été effectués avec du tampon de lyse (50 mM Tris, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% Nonidet P40). Puis les billes ont été reprises dans du tampon Laemmli (Biorad)/β-mercaptoethanol (Sigma) à une concentration finale de 1X avant d'être dénaturées pendant 10 minutes à 95°C.

### **Western Blot**

Trente µg de protéines sont repris dans du tampon Laemmli (Biorad)/β-mercaptoéthanol (Sigma) à une concentration finale de 1X, puis les protéines sont dénaturées à 95°C pendant 5 minutes. Les échantillons sont ensuite déposés dans un gel 10% d'acrylamide

(kit Fast Cast, Biorad), dont la migration a été faite à 100V pendant 1h15 dans un tampon de migration 1X (Tris Base 6g/l, Glycine 28,8g/l, SDS 0,1%). Les protéines ont ensuite été transférées sur une membrane de nitrocellulose à l'aide du Transblot Turbo de Biorad (programme de transfert 10 minutes, 25V, 1,3A).

La membrane a ensuite été saturée avec du tampon de blocage TBS-T/BSA5% (TBS 1X (Euromedex), Tween 1% (Sigma), BSA 5%) pendant 1 heure à température ambiante. Les anticorps primaires ont ensuite été incubés (**Tableau 11**) à 4°C toute la nuit, dilués au 1/1000<sup>ème</sup> dans du TBSTween-5% BSA. Le lendemain, trois rinçages au TBS-T 1X ont été réalisés avant l'incubation des anticorps secondaires (IRDye, LI-COR, 1/5000<sup>ème</sup>) pendant une heure à température ambiante, sous agitation. Trois rinçages ont été effectués au TBS-T 1X avant de révéler les membranes avec le Chemidoc (Biorad).

Anticorps	Clone	Espèce	Fournisseur	Référence
<b>Cdc42</b>	44	Mouse	BD Transd. Lab.	610929
<b>Cortactine</b>	Polyclonal	Rabbit	Cell signaling	#3503
<b>Cortactine</b>	Clone 4F11	Mouse	Millipore	05-180
<b>FLAG</b>	Clone M2	Mouse	Sigma	F1804
<b>FLAG</b>	Polyclonal	Goat	Santa Cruz	sc-807G
<b>GAPDH</b>	Polyclonal FL-335	Rabbit	Santa Cruz	sc-25778
<b>GAPDH</b>	Clone D-6	Mouse	Santa Cruz	sc-166545
<b>GFP</b>	Polyclonal	Rabbit	Santa Cruz	sc-8334
<b>HA</b>	Clone 12CA5	Mouse	Roche	1 583 816
<b>HA</b>	Clone 3F10	Rat	Roche	110867 423 001
<b>mCherry</b>	Polyclonal	Rabbit	Abcam	ab167453
<b>Myc</b>	Clone 9E10	Mouse	Santa Cruz	sc-40
<b>Myc</b>	Polyclonal	Rabbit	Abcam	ab9106
<b>p190A</b>	Clone 30/p190	Mouse	BD Transd. Lab.	610149
<b>p190A</b>	Clone D2D6	Mouse	Sigma	R3150
<b>p190B</b>	Clone 54	Mouse	BD Transd. Lab.	611612
<b>Rac1</b>	Polyclonal	Mouse	BD	#610651
<b>p120RasGAP</b>	Clone B4F8	Mouse	Santa Cruz	sc-63
<b>RhoA</b>	Clone 26C4	Mouse	Santa Cruz	sc-418
<b>Rnd3</b>	Clone 4	Mouse	Abcam	ab50316
<b>Rnd3</b>	Clone 4	Mouse	Cell signaling	#3664

Tableau 11 : Liste des anticorps utilisés.

### Spectrométrie de masse

Ces expériences ont été réalisées en collaboration avec la plateforme Oncoprot (TBM core, Bordeaux).

- Préparation des échantillons.

Des expériences de CoIP ont été réalisées sur les extraits protéiques (dans les conditions décrites dans le paragraphe CoIP). Les échantillons ont été dénaturés dans du Lamelli pendant 5 minutes à 95°C. La totalité des extraits a été chargée en triplicat sur un gel

SDS-PAGE à 10% d'acrylamide. La migration a été arrêtée lorsque les échantillons entraient dans le gel de résolution. Les protéines ont ensuite été visualisées par coloration au bleu colloïdal. Chaque bande SDS-PAGE a été découpée en morceaux de gel de 1 mm x 1 mm.

Les morceaux de gel ont été décolorés dans du bicarbonate d'ammonium 25 mM ( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ), 50% d'acétonitrile (ACN) et réduits en ACN pendant 10 min. Après élimination de l'ACN, les morceaux de gel ont été séchés à température ambiante. Les protéines ont d'abord été réduites dans du dithiothréitol 10 mM,  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  100 mM pendant 30 min à 56°C, puis alkylées dans de l'iodoacétamide 100 mM,  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  100 mM pendant 30 min à température ambiante et rétractées dans l'ACN pendant 10 min. Après élimination de l'ACN, les morceaux de gel ont été réhydratés avec du  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  100 mM pendant 10 min à température ambiante. Avant la digestion des protéines, les morceaux de gel ont été réduits en ACN pendant 10 min et séchés à température ambiante.

Les protéines ont été digérées en incubant chaque tranche de gel avec 10 ng/ $\mu\text{l}$  de trypsine (T6567, Sigma-Aldrich) dans 40 mM de  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , 10% d'ACN, réhydratées à 4°C pendant 10 min et finalement incubées pendant une nuit à 37°C. Les peptides résultants ont ensuite été extraits du gel par trois étapes : une première incubation dans  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  40 mM, ACN 10% pendant 15 min à température ambiante et deux incubations dans ACN 47,5%, acide formique 5% pendant 15 min à température ambiante. Les trois extractions collectées ont été regroupées avec le surnageant de digestion initiale, séchées dans un SpeedVac et remises en suspension avec 25  $\mu\text{l}$  d'acide formique à 0,1% avant l'analyse par nanoLC-MS/MS.

- Analyse nanoLC-MS/MS.

Les analyses nanoLC-MS/MS ont été réalisées en utilisant un système Nano-UPHLC Ultimate 3000 RSLC (Thermo Scientific) couplé à un spectromètre de masse Orbitrap Fusion Lumos Tribrid (Thermo Scientific). Chaque extrait peptidique a été chargé sur une précolonne PepMap C18 de 300  $\mu\text{m}$  x 5 mm (Thermo Scientific) à un débit de 10  $\mu\text{l}/\text{min}$ . Après 3 minutes de dessalage, les peptides ont été séparés sur une colonne EasySpray 50 cm (75  $\mu\text{m}$ , billes C18 2  $\mu\text{m}$ , taille des pores 100 Å, ES803, Thermo Scientific) avec un gradient linéaire de 4-40% de solvant B (acide formique à 0,1% dans 80% d'ACN) pendant 55 min. Le débit de séparation a été établi à 300 nL/min. Le spectromètre de masse fonctionne en mode ion positif à une tension d'aiguille de 2,0 kV.

Les données ont été acquises à l'aide du logiciel Xcalibur 4.1 dans un mode dépendant des données. Les balayages MS ( $m/z$  375-1500) ont été enregistrés à une résolution de  $R = 120000$  (@  $m/z$  200) et une cible AGC de  $4 \times 10^5$  ions collectés en 50 ms, suivi par un cycle rapide de 3 s pour l'acquisition MS/MS. Les ions précurseurs (2 à 7 états de charge) ont été isolés dans le quadrupole avec une fenêtre de masse de 1.6 Th et fragmentés en mode HCD et une énergie de collision normalisée de 30%.

Les données MS/MS ont été acquises avec l'Orbitrap avec une résolution de  $R = 30000$  (@  $m/z$  200), une cible AGC de  $5 \times 10^4$  ions et un temps maximal d'injection de 100 ms. Les précurseurs sélectionnés ont été exclus pendant 60 s.

- Bases de données et analyse des résultats.

L'algorithme Mascot 2.5, disponible via le logiciel Proteome Discoverer 2.3 (Thermo Fisher Scientific Inc.) a été utilisé pour l'identification des protéines en recherchant une base de données Homo Sapiens (RP\_UP000005640\_Homo\_Sapiens\_190516, 74489 entrées) sur le site <http://www.uniprot.org/>. Deux clivages enzymatiques manquants ont été autorisés. Les tolérances de masse de MS et MS/MS ont été établies à 10 ppm et 0,02 Da.

L'oxydation de la méthionine, l'acétylation de la lysine et la désamidation de l'asparagine et de la glutamine ont été recherchées en tant que modifications dynamiques. La carbamido-méthylation de la cystéine a été recherchée en tant que modification fixe.

Les données brutes de LC-MS/MS ont été importées sur Proline Studio pour la détection, l'alignement et la quantification. L'identification des protéines a été acceptée avec au moins 2 peptides spécifiques, FDR <1%. Les protéines ont été normalisées par rapport au contrôle, sans interférence de données. Enfin, le filtre d'enrichissement a été fait sur la significativité (t-test  $p < 0,05$ ) ainsi que sur la détection des protéines dans les 3 réplicats biologiques.

### **Broyage des tumeurs**

Les échantillons d'endomètre congelés sont conservés à  $-80^{\circ}\text{C}$ . Les tissus ont été broyés manuellement avec un pilon et un mortier refroidis à l'azote liquide. Entre chaque échantillon, le matériel a été nettoyé successivement avec du RBS dilué dans de l'eau chaude, de l'eau puis de l'éthanol 70%. Le papier aluminium protégeant la paillasse ainsi que les gants ont été changés entre chaque échantillon.

Le broyat a été récupéré dans deux tubes Eppendorf 1,5 ml déposés dans de la carboglace. Deux cents  $\mu\text{l}$  de tampon RIPA complétés ont été ajoutés à l'un des tubes pour en extraire les protéines. En parallèle, le second tube a été gardé dans la carboglace avant d'être utilisé afin d'extraire l'ARN.

### **Extraction ARN**

Les ARNs ont été extraits des échantillons d'endomètre à l'aide du kit NucleoSpin RNA (Macherey Nagel). 350  $\mu\text{l}$  de tampon de lyse contenant du  $\beta$ -mercaptoéthanol (10  $\mu\text{l}/\text{ml}$ ) ont été ajoutés au broyat de tissu d'endomètre. Le broyat lysé a été homogénéisé en le passant au moins 5 fois dans une aiguille 20G reliée à une seringue stérile. 350  $\mu\text{l}$  d'éthanol 70% est ajouté dans le tube et de nouveau le mélange est homogénéisé à la seringue. Le lysat a été



transféré sur une colonne puis la colonne a été dessalée. Un mélange de rDNase a été ajoutée aux échantillons avant plusieurs cycles de rinçage des colonnes. Les ARNs ont été élués dans de l'H<sub>2</sub>O (RNase free) et conservés à -20°C.

### **qRT-PCR**

#### - RT

Les ARN ont été dosés au lecteur de plaque Victor Nivo® (DO à 260nm) et dilués pour avoir 1 µg final d'ARN avec de l'H<sub>2</sub>O. Un µL d'hexamères (0,5µg/µl) et 1 µL de dNTP (10 mM) ont été ajoutés à l'ARN dilué pour obtenir de l'ADNc. Le programme sur le thermocycleur est lancé pendant 5 minutes à 70°C puis 12,5 µL de mix RT ont été ajoutés à chaque tube comprenant du tampon, un inhibiteur de RNases (Ribolock, Fermentas) et la reverse transcriptase (Maxima RT, Fermentas). L'incubation a été réalisée dans un PCR thermocycleur puis le programme relancé par 10 minutes à 25°C puis 30 minutes à 50°C et ensuite 5 minutes à 85°C.

#### - qPCR

Les RT sont dilués au 1/10. Le mix SyBR est préparé par gène d'intérêt avec du SyBR green, les amorces (10 µM) et de l'H<sub>2</sub>O. Dix µL de ce mix sont déposés dans chaque puits. Deux µL de cDNA sont ajoutés. Deux contrôles avec de l'H<sub>2</sub>O (négatif) et les échantillons de référence (positif) sont à prévoir. La plaque est centrifugée avant que la PCR ne soit lancée dans un thermocycleur CFX96 de Bio-Rad. Une dénaturation de 3 minutes à 95°C est réalisée puis l'amplification se fait durant 40 cycles, chaque cycle étant composé de 10 secondes à 95°C et de 30 secondes à 60°C. L'ensemble des données sont analysées avec un logiciel spécifique, Q base + et une quantification relative est réalisée pour chaque gène selon la méthode comparative des Ct. Les amorces Sens (Forward) et Anti-sens (Reverse) sont listés dans le **tableau 12**.

<b>Primers</b>	<b>Séquences 5' → 3'</b>	<b>Protéine ciblée</b>
H21r18S-Forward	GTAACCCGTTGAACCCATT	rRNA18S
H21r18S-Reverse	CCATCCAATCGGTAGTAGCG	rRNA18S
hP190B-Forward	GCTGACTTGAGAATTGTCATGTGC	p190B
hP190B-Reverse	AAGGAAGGGTGAAAGAATAAGATCC	p190B
hP190A-Forward	AGAAAGAGCCGGTTGGTTCAT	p190A
hP190A-Reverse	AACATAGCCAAAGAGGCCTTACG	p190A
HA-Forward	ACCCATACGATGTTCCAGATTACGC	HA
p190A(début)-Reverse	TTTCTCCTTCTCAGTGCCGGACAA	p190A

**Tableau 12 : Liste des amorces utilisés lors des expériences de qRT-PCR.**

## **BRET**

Les cellules HEK293T ont étéensemencées dans des plaques 12 puits 24h avant d'être transfectées de façon transitoire avec du polyéthylèneimine (PEI ; Polysciences, # 23966). Un ratio 4 : 1 (PEI/ADN) a été utilisé (Percherancier et al. 2005). Pour les courbes de titration, une concentration croissante de constructions YFP (de 0,01 à 2 mg) ont été transfectées avec une quantité fixe de constructions Luciférase (0,1 mg). Les cellules ont ensuite été incubées 24h avant d'être détachées et resuspendues dans du DMEM sans rouge phénol (Gibco). Les cellules ont étéensemencées dans une plaque 96 puits à une densité de  $10^5$  cellules par puits à fond clair (Greiner Bio One). Après une nouvelle incubation de 24h, les mesures de BRET sont réalisées par une lecture sur le lecteur de plaques Tristar2 (Berthold Technologies).

La coélentérazine H ( $5\mu\text{M}$  ; Nanolight Technology) est ajoutée directement sur les cellules avant lecture des signaux de fluorescence et de luminescence par détection aux longueurs d'onde de  $480 \pm 20$  nm et  $540 \pm 40$  nm pour la luciférase (donneur d'énergie) et YFP (accepteur d'énergie), respectivement.

Le signal de BRET est défini comme le ratio BRET des cellules coexprimant les constructions YFP et Luciférase en soustrayant le ratio BRET des cellules n'exprimant qu'une constructions Luciférase dans la même expérience (Hamdan et al. 2006).

## **Analyse statistique**

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel Prism (GraphPad). Les résultats sont représentés avec les moyennes  $\pm$  écart-type sur au moins 3 expériences indépendantes. Les comparaisons entre les groupes ont été analysés par le t-test lorsqu'il y avait deux conditions ou par un test ANOVA suivi d'un post-test Bonferroni lorsque le nombre de conditions était supérieur à 2. La corrélation entre deux variables a été analysée par le calcul du coefficient r de Pearson. La significativité a été acceptée suivant les valeurs suivantes : ns,  $p > 0,05$  ; \*,  $p < 0,05$  ; \*\*,  $p < 0,01$  ; \*\*\*,  $p < 0,001$  et \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

## Annexe 6 :

### Liste des publications

**Héraud C**, Pinault M, Neaud V, Saltel F, Lagrée V and Moreau V. *Identification of the PLS as an inhibitory domain responsible for masking of p190RhoGAP functional domain*. In preparation.

Abou Hammoud A, **Héraud C**, Moreau M, Marais S, Allain, N, Dourthe C, Raymond AA, Ezzoukhry Z, Moreau V and Saltel F. *DDR2 induces linear invadosomes to promote angiogenesis in a fibrillar type I collagen context*. In preparation.

**Héraud C**, Pinault M, Lagrée V and Moreau V. *p190RhoGAPs, the ARHGAP35 and ARHGAP5 encoded proteins, in health and disease*. Cells, 2019. Review. PMID: 31013840

Javary J, Allain-Courtois N, Saucisse N, Costet P, **Héraud C**, Benhamed F, Pierre R, Bure C, Pallarés-Lupón N, Do Cruzeiro M, Postic C, Cota D, Dubus P, Rosenbaum J, Benhamouche-Trouillet S. *Liver Reptin/RUVBL2 controls glucose and lipid metabolism with opposite actions on mTORC1 and mTORC2 signalling*. Gut, 2017. PMID: 29074727

### Participations à des congrès

17 <sup>èmes</sup> Journées annuelle du Cancéropôle Grand Sud-Ouest	Novembre 2021 Carcassonne, France
Journée de l'école doctorale SVS	Mai 2021 Virtual meeting
16 <sup>èmes</sup> Journées annuelle du Cancéropôle Grand Sud-Ouest	Novembre 2020 Virtual meeting
Journée de la fédération de recherche Transbiomed	Novembre 2019 Bordeaux, France
15 <sup>èmes</sup> Journées annuelle du Cancéropôle Grand Sud-Ouest	Novembre 2020 Arcachon, France

Invadosome consortium : Mechano-chemical signals in invasion	Juin 2019 London, UK
1 <sup>st</sup> Discoidin domain receptors (DDR) meeting	Mai 2019 Bordeaux, France
Journée de l'école doctorale	Mai 2019 Bordeaux, France
Bordeaux Cell Biology Gathering	Avril 2019 Bordeaux, France
Journées scientifiques du SIRIC BRIO	Mars 2019 Bordeaux, France
14 <sup>èmes</sup> Journées annuelle du Cancéropôle Grand Sud-Ouest	Novembre 2018 La Grande Motte, France
Journée Jeunes Chercheurs de la fédération de recherche Transbiomed	Juin 2018 Bordeaux, France
Cell Adhesion French Symposium	Mai 2018 Strasbourg, France
Bordeaux Cell Biology Gathering	Avril 2018 Bordeaux, France
13 <sup>èmes</sup> Journées annuelle du Cancéropôle Grand Sud-Ouest	Novembre 2017 Poitiers, France
Bordeaux Cell Biology Gathering	Avril 2017 Bordeaux, France

### **Communications orales**

#### **New insights into p190RhoGAP regulation at invadosomes from the study of cancer-associated mutations**

- Invadosome consortium : Mechano-chemical signals in invasion  
Jun 2019  
London, UK

#### **Characterization of cancer-associated mutations reveals a new mode of regulation for p190RhoGAP**

- Cell migration in health and diseases Course  
Jun 2018  
Paris, France
- 1<sup>st</sup> Cell Biology and Cancer Course  
Avril 2018  
Paris, France

## Posters

### **New insights into p190RhoGAP regulation from the study of cancer-associated mutations**

- 17<sup>èmes</sup> Journées annuelle du Cancéropôle Grand Sud-Ouest  
Novembre 2021  
Carcassonne, France
- Journée de l'école doctorale SVS  
Mai 2021  
Virtual meeting
- 16<sup>èmes</sup> Journées annuelle du Cancéropôle Grand Sud-Ouest Novembre 2020  
Virtual meeting

### **New insights into p190RhoGAP regulation at invadosomes from the study of cancer-associated mutations**

- Journée de la fédération de recherche Transbiomed  
Novembre 2019  
Bordeaux, France
- 15<sup>èmes</sup> Journées annuelle du Cancéropôle Grand Sud-Ouest  
Novembre 2020  
Arcachon, France
- Invadosome consortium : Mechano-chemical signals in invasion  
Juin 2019  
London, UK
- Journée de l'école doctorale  
Mai 2019  
Bordeaux, France

### **Characterization of cancer-associated mutations reveals a new mode of regulation for p190RhoGAP**

- 14<sup>èmes</sup> Journées annuelle du Cancéropôle Grand Sud-Ouest  
Novembre 2018  
La Grande Motte, France
- Journée Jeunes Chercheurs de la fédération  
de recherche Transbiomed  
Juin 2018  
Bordeaux, France
- Cell Adhesion French Symposium  
Mai 2018  
Strasbourg, France

### **Impact of cancer-associated mutations on p190RhoGAP activity and function**

- 13<sup>èmes</sup> Journées annuelle du Cancéropôle Grand Sud-Ouest  
Novembre 2017  
Poitiers, France

### **Prix et distinctions**

Bourse de 4ème année de thèse obtenue avec la fondation ARC pour la Recherche sur le Cancer	Juillet 2020
1er prix poster - Cell Adhesion French Symposium, Strasbourg	Mai 2018
Bourse de thèse obtenue avec le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche	Juillet 2017

### **Encadrement de stagiaires**

Audrey Boutillier, étudiante en 1ère année de BTS	05/2021 – 01/2021
Alexandra Escos, étudiante ingénieure à l'ENSTBB	06/2019 – 09/2019
Mathilde Pinault, étudiante en Master 1 et Master 2 à l'Université de Limoges	04/2018 – 06/2018 01/2019 – 06/2020

### **Promotion de la science et des métiers de la recherche**

Participation aux journées Declic (Dialogue entre chercheurs et lycéens pour les intéresser à la construction des savoirs)	Novembre 2018 Novembre 2017
--	--------------------------------

### **Formations réalisées au cours de la thèse**

Formation Immunohistochimie et utilisation du cryostat	Novembre 2020
Formation Intégrité scientifique	Juillet 2018
Formation Traitement et Analyse d'images sous Image	Janvier 2018
Formation Microscopie à épifluorescence et microscopie confocale	Octobre 2017



## Étude de la régulation de p190RhoGAPs : Implication dans le cancer

Au cours du développement tumoral, les cellules acquièrent des capacités migratoires et invasives leur permettant de se disséminer dans l'organisme et de créer des métastases à distance. Les GTPases de la famille Rho sont les principaux régulateurs du remodelage du cytosquelette d'actine. Une fine régulation spatio-temporelle des GTPases Rho est nécessaire dans la formation et le maintien des structures riches en actine impliquées notamment lors de la migration et l'invasion cellulaires. Les protéines p190RhoGAP (p190A et p190B) sont les principaux régulateurs négatifs de la GTPase RhoA. Les gènes *ARHGAP35* et *ARHGAP5*, codant p190A et p190B respectivement, sont retrouvés mutés dans le cancer. L'objectif de ce travail de thèse vise à mieux comprendre le rôle et la régulation des protéines p190RhoGAP dans le cancer.

Tout d'abord, nous avons identifié le domaine nécessaire et suffisant pour la localisation de p190A aux invadosomes, structures d'actine impliquées dans l'invasion cellulaire. Nous montrons que ce même domaine, nommé PLS, est impliqué dans la régulation de la conformation de p190A. Par l'analyse de l'impact de mutations retrouvées dans les tumeurs, nous proposons un modèle de régulation de p190RhoGAPs. Ce modèle combine une interaction auto-inhibitrice intramoléculaire et une interaction intermoléculaire. Parallèlement, nous avons initié une étude conjointe de p190A et p190B, dans des modèles cellulaires et des échantillons de patientes de cancer de l'endomètre, cancer présentant un fort taux de mutations des gènes *ARHGAP35* et *ARHGAP5*.

Ainsi, ce travail de thèse propose un nouveau mécanisme de régulation de p190RhoGAPs. Moduler ce mécanisme pourrait être une piste thérapeutique pour contrer l'impact des mutations dans les cellules tumorales.

**Mots clés :** GTPases Rho, Cytosquelette, Mutations, Structure, Endomètre

---

## Study of p190RhoGAPs regulation: involvement in cancer

During tumor development, cells acquire migratory and invasive capacities in order to invade surrounding tissues and promote metastasis. RhoGTPases are the main regulators of actin cytoskeleton remodeling. A tight spatio-temporal regulation of RhoGTPases is required for the formation and the maintenance of actin-based structures, especially those regulating cell migration and invasion. P190RhoGAP proteins (p190A and p190B) are the major negative regulators of RhoA GTPase. *ARHGAP35* and *ARHGAP5* genes, encoding p190A and p190B respectively, are mutated in cancer. My thesis project aims to better understand the role and the regulation of p190RhoGAP in cancer.

First, using a structure/function analysis, we identified the domain necessary and sufficient to localize p190A at invadosomes. We revealed that the same domain, named PLS, is required for regulating the folding and, thereby, the activity of the protein. Thanks to the study of cancer-associated mutations, we propose a new regulatory model for p190RhoGAPs. This model combines both intramolecular auto-inhibitory interaction and intermolecular interaction. Then, as *ARHGAP35* and *ARHGAP5* genes are mutated in a high percentage of endometrial cancers, we initiated a combined study of p190A and p190B, in cellular models and patient samples of endometrial cancer.

Altogether, this work reveals a new regulatory mechanism of p190RhoGAP. Modulating this mechanism could be a therapeutic target to counteract the impact of cancer-associated mutations in tumor cells.

**Keywords:** RhoGTPases, Cytoskeleton, Mutations, Structure, Endometrium

---