



**HAL**  
open science

# Étude des paralogues ARHGAP35/p190A et ARHGAP5/p190B et de leur impact dans le cancer de l'endomètre

Mathilde Pinault

► **To cite this version:**

Mathilde Pinault. Étude des paralogues ARHGAP35/p190A et ARHGAP5/p190B et de leur impact dans le cancer de l'endomètre. Médecine humaine et pathologie. Université de Bordeaux, 2022. Français. NNT : 2022BORD0379 . tel-04560218

**HAL Id: tel-04560218**

**<https://theses.hal.science/tel-04560218>**

Submitted on 26 Apr 2024

**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 SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ  
Spécialité Biologie Cellulaire et Physiopathologie

Par Mathilde PINAULT

**Étude des paralogues *ARHGAP35/p190A* et  
*ARHGAP5/p190B* et de leur impact dans le cancer de  
l'endomètre**

Sous la direction du Dr. Violaine MOREAU

Soutenue le 9 décembre 2022

Membres du jury :

Dr. Violaine MOREAU <i>Directrice de recherche Inserm, Bordeaux</i>	Directrice de thèse
Dr. Isabelle SAGOT <i>Directrice de recherche CNRS, Bordeaux</i>	Présidente
Pr. Nicolas BOURMEYSTER <i>Professeur des universités-praticien hospitalier, Poitiers</i>	Rapporteur
Dr. Stéphanie CABANTOUS <i>Chargée de recherche CNRS, Toulouse</i>	Rapporteure
Dr. Sabrina CROCE <i>Praticienne hospitalière, Institut Bergonié, Bordeaux</i>	Invitée
Pr. Jean-François COTE <i>Professeur et Directeur de recherche, IRCM, Montréal</i>	Invité



## Résumé

---

Le cancer de l'endomètre est le 6<sup>ème</sup> cancer avec la plus forte incidence chez les femmes. Parmi les gènes responsables du développement de la maladie, *ARHGAP35* est retrouvé muté dans plus de 14% de ces tumeurs. Ce gène code pour la protéine p190RhoGAP-A (p190A), qui est un des principaux régulateurs de la GTPase RhoA. Elle partage 50% d'homologie avec son paralogue p190RhoGAP-B (p190B), codé par le gène *ARHGAP5*. Si les deux protéines comportent des similarités en termes de séquence et de fonctions, aucune étude n'a à ce jour fait de véritable comparaison entre les deux p190RhoGAPs. Le but de cette thèse a donc été de prendre en compte les deux paralogues pour comparer leurs fonctions et leur impact dans le contexte du cancer de l'endomètre. Tout d'abord, grâce à une analyse de la base de données TCGA, nous avons constaté qu'*ARHGAP5* est aussi muté dans les cancers de l'endomètre. En couplant ces données avec l'étude d'échantillons de patientes, nous avons montré que les altérations de p190A et p190B sont co-occurentes. Par la suite, nous avons utilisé la technologie CRISPR/Cas9 pour générer un knockout de chacune des protéines. Les modèles cellulaires obtenus ont permis de montrer que l'extinction de p190A et p190B altère non seulement l'organisation du cytosquelette, mais aussi la prolifération des cellules tumorales, et que leur impact est additionnel. Enfin, la technique de BioID nous a permis d'identifier de manière globale les protéines partenaires de p190A et p190B. Ainsi, nos données précisent l'impact des altérations de p190A/*ARHGAP35* et p190B/*ARHGAP5* dans le cancer de l'endomètre, et fournissent des ressources qui seront utiles aux prochaines études sur les p190RhoGAPs.

## Abstract

---

Endometrial cancer is the 6th most common cancer in women worldwide. Among the genes responsible for the disease progression, *ARHGAP35* is found mutated in more than 14% of endometrial tumors. It codes for the protein p190RhoGAP-A (p190A), which is one of the main regulators of the GTPase RhoA. P190A shares 50% homology with its paralog p190RhoGAP-B (p190B), encoded by *ARHGAP5*. Although both proteins are very similar in terms of sequence and function, no study have properly compared the two paralogs. Thus, the aim of this thesis is to address the two p190RhoGAPs and to compare their impact in the context of endometrial cancer. First, based on a study on TCGA database, we have highlighted that *ARHGAP5*, like *ARHGAP35*, is mutated in endometrial carcinomas. Together with a study on patient samples, these data showed that alterations of p190A and p190B are co-occurent. We have then used CRISPR/Cas9 technology to create a knockout of either protein in endometrial cancer cells. Using these cellular models, we have shown that the extinction of p190A and p190B alters the cytoskeletal organization of tumoral cells, and their proliferation as well. Moreover, these effects are additive. Next, we have used the BioID technique to establish a global interactome of p190A and p190B proteins. Finally, our data give new insights on the impact of p190A/*ARHGAP35* and p190B/*ARHGAP5* alterations in endometrial cancers, and provide useful resources for the next studies on the p190RhoGAPs.



# Remerciements

---

Je tiens d'abord à remercier les Dr. Nicolas Bourmeyster et Stéphanie Cabantous d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce manuscrit. Merci aussi au Dr. Isabelle Sagot d'avoir accepté la présidence de mon jury de thèse.

Merci au Dr. Violaine Moreau pour m'avoir confié cette thèse, suite à mes stages de Master. Merci pour ces années (ne les comptons pas !) passées à tes côtés. Merci pour toutes les opportunités que tu m'as offertes. Merci pour ta présence et ta disponibilité sans failles.

Je remercie aussi le Dr. Valérie Lagrée qui a été présente tout au long de cette expérience. Merci 1000 fois pour tes conseils, tes avis précieux et ta bienveillance.

Je remercie chaleureusement le Dr. Véronique Néaud. Travailler avec quelqu'un comme toi est une chance. Merci pour toutes les heures que tu as passé en culture pour ce projet ! Merci pour ta gentillesse, ta franchise, ton ouverture d'esprit, ton professionnalisme...

Je souhaite remercier toutes les personnes qui ont collaboré sur ce projet. Merci beaucoup au Dr. Sabrina Croce ainsi qu'à Valérie Vélasco pour la partie « tumeurs de patientes ». Cet aspect appliqué m'a passionnée. Merci aussi au Dr. Béatrice Turcq et à Valérie Prouzet-Mauleon pour votre aide précieuse sur la technologie CRISPR/Cas9. Je remercie aussi Atika Zouine pour toutes les séances de cytométrie. Merci à Sylvaine Di Tommaso et au Dr. Anne Aurélie Raymond pour votre gentillesse au labo, et pour votre aide et vos conseils sur la spectrométrie de masse (j'aurais été perdue sans vous !).

Merci au Pr. Jean-François Côté et à la future Dr. Chloé Apcher pour tout le travail réalisé sur le BioID ! Merci de m'avoir accueillie dans votre laboratoire pendant trois mois et de m'avoir fait me sentir comme chez moi. Merci pour votre bienveillance et tous vos conseils. Travailler avec vous a été un plaisir. Merci aussi à toute l'équipe du « labo Côté » à l'IRCM : Amélie, Andréane, Laura, Islam, Jonathan, Marie-Pier, Rebecca, Sarah, Viviane... Merci pour la bonne humeur quotidienne, pour la science, et pour vos conseils pour survivre au froid !

Revenons en France et aux personnes qui ont accompagné ma thèse bordelaise. Je souhaite remercier le Dr. Frédéric Saltel. Merci pour tes réflexions scientifiques et ta manière (nécessaire !) de recentrer le sujet. Merci aussi d'avoir supporté nos rires dans le bureau d'à côté...

Je remercie les Dr. Marion Bouchecareilh, Arnaud Jabouille et Clotilde Billottet. Merci pour votre bienveillance et pour les discussions (pas toujours) scientifiques.

Je remercie aussi Céline Léon et Nathalie Allain pour leur présence quotidienne au laboratoire. Merci d'être toujours là pour répondre à nos questions, et merci pour votre gentillesse !

Merci à tous ceux qui sans qui le labo ne serait pas le même : Léa, Camille, Lydia, Alexandra, Lucile, Benjamin, Cyril, Bertrand, Adèle, Arthur. Merci pour les P'tit Québec, les longues discussions en culture, les journées Team Building, et pour tout ce qui a fait la dynamique dans l'équipe ! Merci à Virginie Rocher et Nathalie Dugot pour votre présence et votre gentillesse. Merci aux Pr. Charles Balabaud et Paulette Bioulac-Sage pour votre sympathie. Merci à Jérémie, Hélène, Gina et Franck pour toute votre aide sur la vie au laboratoire.

Merci au Dr. Sara Basbous pour les samedis où nous avons plus discuté que travaillé, pour ton soutien, ton oreille attentive et tes conseils autant pro que perso. Merci pour ton amitié !

Je remercie les stagiaires, qui ont partagé quelques temps ce projet avec moi : Alexandra et Léa.

Enfin, merci à celles qui sont déjà parties vers de nouvelles expériences : Esra, Margaux, Manon, Aya. Merci pour les discussions, les conseils, les soirées Game of Thrones, les pauses café... Un merci spécial au Dr. Capucine Héraud pour m'avoir formée à mon arrivée au labo et pour avoir partagé le « sujet p190 » avec moi. Je te souhaite tout le meilleur aux Etats-Unis !

Entre l'aspect professionnel et l'aspect plus personnel de ces remerciements, il y a la future Dr. Mélanie Moreau. Merci d'avoir partagé cette thèse avec moi. Merci d'avoir été mon deuxième cerveau et de m'avoir soutenue dans les moments de doute. Merci pour les rires (il y en a eu beaucoup), pour les apéros, pour les plantes (spéciale dédicace à Gaston, Briana, Bertie Croupton,...). Merci pour notre amitié, tu n'es pas près de te débarrasser de moi ! ♥

Merci à Matthieu et François d'être des si belles rencontres. Merci pour les soirées ciné, les BK à emporter, les bières en terrasse...

Merci à mes « copains de Limoges », les p'tits loups ♥ Ju', Angie, Arthur, Jordan, Alix. Merci d'être toujours fidèles au poste depuis tant d'années. Merci de votre soutien sans faille. Merci pour tous les moments passés ensemble, les discussions interminables, les fous rires, les « Guépards d'eau » et les « Turtle Bell ». Ces amitiés-là sont presque la famille. Que dire ? Love !

Retour au Canada, je veux remercier la seule, l'unique : la coloc' Guizot ! Lucas, Clémence, Benoit & Diane, Tyffaine, Victor, Alice, Marc, Lola,... sans oublier la pôtite Edith. Merci d'avoir rendu mon séjour inoubliable, d'avoir été ma petite famille là-bas à Montréal. Pour les soirées des plus calmes aux plus arrosées, pour les sorties patin sur les lacs gelés, pour les voyages, et pour les discussions pendant des heures dans le canapé qu'on ne pouvait jamais quitter. ♥

Merci aux teams des écuries Novum et de l'Oxer de Bellevue. Merci à tous les copains pour les apéros, les « merde pour dimanche », les « tu mets quelle couverture à ton cheval ce soir ? », et pour les discussions pendant des heures après les cours de saut. Un merci particulier à Claire et à Paul-Antoine pour m'avoir soutenue et conseillée pendant cette incroyable aventure qu'a été l'achat de mon cheval. Mention spéciale à Léa, Laura et Gwenn qui se sont occupées de mon Calisto lorsque je ne pouvais pas le faire. Et même s'il ne lira jamais ces lignes : merci à lui. ♥

Merci à mes piliers, ma famille. Merci à la *Dij' Family* : Mamie, Papy, Chloé, Léa, Arthur, Eva, Jade, Aline, Nico, Patrice, Sandrine. Plus largement, merci à tout le « Clan Monnet » : Martine, Lucette, Gilbert, Céline, Manon, Maxime, Laëticia, Noam, Guillaume, Thaïs, Lukas, et tous les autres... Merci à celui sans qui aucun de nous ne serait là : Papy Jean. Je souhaite à tout le monde d'avoir une famille aussi géniale que la nôtre !

Merci à mes parents, les meilleurs du monde. Merci d'être là et de m'aimer quoi qu'il se passe. Merci de me soutenir dans toutes mes décisions, bonnes ou mauvaises. Je vous aime très fort.

Last but not least, merci à ma petite soeur, Agathe, Gathou, Mon 'ti Boubouille. Merci d'avoir vécu avec moi pendant ces 3 ans. Merci d'être la meilleure sœur de la Terre. Je suis très fière de voir la personne que tu deviens. Ne laisse jamais personne te dire que tu n'es pas incroyable. Je t'aime ♥





# Table des matières

---

<b>Introduction .....</b>	<b>15</b>
<b>Chapitre 1 – Le cancer de l’endomètre.....</b>	<b>16</b>
1. L’endomètre .....	16
1.1. Anatomie utérine et rôle de l’endomètre.....	16
1.2. L’endomètre au cours du cycle menstruel.....	17
1.3. Pathologies associées à l’endomètre.....	18
2. Le cancer de l’endomètre .....	19
2.1. Épidémiologie .....	19
2.2. Classification .....	19
2.3. Prise en charge thérapeutique.....	21
3. Voies moléculaires impliquées .....	23
3.1. Classification moléculaire des cancers de l’endomètre .....	23
3.2. Signalisation dans l’endomètre physiologique et pathologique .....	25
<b>Chapitre 2 – Cytosquelette d’actine et RhoGTPases .....</b>	<b>29</b>
1. Le cytosquelette d’actine.....	30
1.1. Présentation générale du cytosquelette.....	30
1.2. Fonctions du cytosquelette d’actine.....	30
1.3. Formation des microfilaments.....	31
2. Les architectures du réseau d’actine .....	35
2.1. Les structures d’actine dans la cellule.....	35
2.2. Migration cellulaire : filopodes et lamellipodes.....	36
2.3. Invasion cellulaire : invadosomes .....	37
2.4. Contractilité cellulaire : fibres de stress et cortex.....	39
3. Les RhoGTPases .....	42
3.1. Présentation des RhoGTPases.....	42
3.2. Les régulateurs des RhoGTPases.....	44
3.3. Signalisation <i>via</i> les effecteurs des RhoGTPases.....	49
<b>Chapitre 3 - Les protéines p190RhoGAPs .....</b>	<b>52</b>
1. Rôles physiologiques et pathologiques des p190RhoGAPs .....	52
1.1. Présentation des p190RhoGAPs .....	52
1.2. Revue p190RhoGAPs, the ARHGAP35- and ARHGAP5-Encoded Proteins, in Health and Disease 52	
2. Données récentes sur la régulation des p190RhoGAPs.....	77
3. Les p190RhoGAPs dans le cancer de l’endomètre .....	78
<b>Objectifs de la thèse .....</b>	<b>80</b>
<b>Résultats .....</b>	<b>84</b>
<b>Partie 1 – Établissement des modèles d’étude .....</b>	<b>85</b>
1. Introduction .....	85
2. Résultats .....	86
2.1. Validation des anticorps.....	86
2.2. Knockout des gènes <i>ARHGAP35</i> et <i>ARHGAP5</i> .....	89
2.3. Introduction de mutations associées au cancer dans le gène <i>ARHGAP35</i> .....	92
3. Matériel et méthodes .....	101

<b>Partie 2 – Étude de l’impact des p190RhoGAPs dans le cancer de l’endomètre .....</b>	<b>105</b>
1. Article : p190A/ <i>ARHGAP35</i> and p190B/ <i>ARHGAP5</i> proteins in endometrial cancer, a novel cancer-relevant paralog interaction .....	105
2. Résultats complémentaires .....	133
2.1. Expression des p190RhoGAPs dans des échantillons de tumeurs d’endomètre .....	133
2.2. Caractérisation des cellules Huh7 p190A KO .....	136
2.3. Analyse de l’impact des mutations d’ <i>ARHGAP35</i> associées au cancer .....	137
<b>Partie 3 – Identification des partenaires de p190A et p190B .....</b>	<b>139</b>
1. Introduction .....	139
2. Résultats .....	140
2.1. Ajustement de l’expression de p190A et p190B fusionnées à BirA* .....	140
2.2. Identification des partenaires de p190A et p190B par BioID.....	142
3. Matériel et méthodes complémentaires.....	146
<b><i>Discussion et Conclusion</i> .....</b>	<b>147</b>
<b><i>Bibliographie</i>.....</b>	<b>153</b>
<b><i>Annexes</i> .....</b>	<b>162</b>
<b><i>Annexe 1 – Article : Identification of an inhibitory domain in p190RhoGAP responsible for masking its functional GAP domain</i> .....</b>	<b>163</b>
<b><i>Annexe 2 – Liste des protéines identifiées en BioID</i> .....</b>	<b>197</b>
<b><i>Annexe 3 – Publications, communications scientifiques et formations</i>.....</b>	<b>200</b>



# Table des illustrations

---

Figure 1 : Anatomie utérine et structure de l'endomètre.....	16
Figure 2 : Illustration schématique du cycle menstruel humain.....	17
Figure 3 : Caractéristiques clinicopathologiques des types communs de cancers de l'endomètre. ....	20
Figure 4 : Classification moléculaire des cancers de l'endomètre. ....	24
Figure 5 : Signalisation de l'estradiol (E2) et impact sur la prolifération dans les cellules endométriales. .....	26
Figure 6 : Impact de l'estradiol (E2) sur la signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine.....	27
Figure 7 : Signalisation de la progestérone (P4), en synergie avec la voie de l'AMPC, dans le processus de décidualisation des cellules endométriales. ....	28
Figure 8 : Image en microscopie à fluorescence d'un fibroblaste en interphase .....	30
Figure 9 : Structure des molécules d'actine et du filament d'actine. ....	32
Figure 10 : Vue globale des différents types de protéines de liaison à l'actine. ....	34
Figure 11 : Structures du cytosquelette d'actine dans des cellules en cours de migration et d'invasion. .....	35
Figure 12 : Organisation des filopodes. ....	36
Figure 13 : Organisation des filaments d'actine dans un lamellipode. ....	37
Figure 14 : Différentes organisations des invadosomes. ....	38
Figure 15 : Structure d'un podosome et d'un invadopode.....	39
Figure 16 : Organisation des fibres de stress. ....	40
Figure 17 : Structure du cortex cellulaire.....	41
Figure 18 : Membres de la famille des RhoGTPases chez l'Homme. ....	42
Figure 19 : Représentation des différents domaines le long de la séquence d'une RhoGTPase.. ....	43
Figure 20 : Le cycle des RhoGTPases.....	44
Figure 21 : Organisation des domaines de la famille des protéines GEF-DBL chez l'Homme.....	45
Figure 22 : Organisation des domaines de la famille des protéines GEF-DOCK chez l'Homme. ....	46
Figure 23 : Organisation en domaines des protéines de la famille GAP. ....	47
Figure 24 : Structure en ruban représentant le domaine GAP de p50RhoGAP. ....	48
Figure 25 : Schéma résumant l'impact des RhoGTPases Rac1 et RhoA dans l'activation de la cycline D1 et la progression du cycle cellulaire.....	51
Figure 26 : Régulation intramoléculaire de p190A. ....	77
Figure 27 : Modèle proposé par Frank et al. pour illustrer le rôle des p190RhoGAPs dans le maintien de la CIP <i>via</i> la répression de YAP. ....	79
Figure 28 : Représentation schématique de la technologie CRISPR/Cas9. ....	86
Figure 29 : Représentation des sites de fixation des anticorps anti-p190A et anti-p190B sur leur protéine cible respective. ....	87
Figure 30 : Westerns blots effectués pour valider la spécificité des anticorps anti-p190A et anti-p190B utilisés dans le projet.....	88
Figure 31 : Exemples représentatifs des analyses effectuées pour valider les clones KO <i>ARHGAP35</i> . 90	
Figure 32 : Exemples représentatifs des analyses effectuées pour valider les clones KO <i>ARHGAP5</i> . ..	92
Figure 33 : Représentation schématique de la stratégie $\Delta$ 865-870.....	93
Figure 34 : Test des différentes conditions de transfection des complexes RNP $\Delta$ 865-870 dans les cellules Huh7. ....	94
Figure 35 : Criblage par PCR des clones Huh7 $\Delta$ 865-870. ....	95
Figure 36 : Représentation schématique de la stratégie $\Delta$ PLS. ....	96
Figure 37 : Criblage des cellules transfectées avec les complexes RNP pour induire la délétion $\Delta$ PLS. La protéine modifiée p190A $\Delta$ PLS apparaît à 123 kDa. ....	97
Figure 38 : Illustration schématique des plasmides utilisés pour créer la mutation ponctuelle S866F. .....	98

Figure 39 : Représentation schématique de la stratégie S866F.....	99
Figure 40 : Extrait des chromatogrammes suite au séquençage des cellules Huh7 transfectées pour induire la mutation ponctuelle S866F.....	100
Figure 41 : Contrôles de marquages immunohistochimiques. ....	133
Figure 42 : Niveau d'expression des p190RhoGAPs dans des tumeurs de sous-type endométrioïde. ....	134
Figure 43 : Niveau d'expression des p190RhoGAPs dans des tumeurs peu différenciée, à cellules claires et séreuses.....	135
Figure 44 : Caractérisation fonctionnelle des cellules Huh7 p190A KO.....	136
Figure 45 : Réexpression ( <i>rescue</i> ) de p190A WT ou muté dans les cellules HEC-1-A KO p190A. ....	138
Figure 46 : Représentation schématique des étapes de l'expérience de BioID.....	140
Figure 47 : Ajustement de l'expression des protéines de fusion pour la mise en place des expériences de BioID. ....	141
Figure 48 : Mise en place de la technique de BioID.....	142
Figure 49 : Bubble plot représentant les 20 fonctions cellulaires les plus enrichies dans l'analyse BioID. ....	143
Figure 50 : Identification de PDLIM7 comme partenaire des deux p190RhoGAPs et protéine localisant aux CLANs. ....	145

## Liste des abréviations

---

### A

ABP : *Actin Binding Proteins*  
ACTA1 : *Actin alpha 1*  
ACTA2 : *Actin alpha 2*  
ACTC1 : *Actin alpha cardiac muscle 1*  
ACTG1 : *Actin gamma 1*  
ACTG2 : *Actin gamma 2*  
ADN : Acide Désoxyribonucléique  
ADP : Adénosine DiPhosphate  
AKT : Protéine Kinase B  
AMPC : AMP cyclique  
APC : *Adenomatous Polyposis Coli*  
ARNcr : ARN CRISPR  
ARNg : ARN guide  
ARNm : ARN messenger  
ARNtrac : ARN CRISPR transactivante  
Arp2/3 : *Actin Related Protein 2/3*  
ATCC : *American Type Culture Collection*  
ATP : Adénosine TriPhosphate

### B-C

BiID : *proximity-dependent biotinylation*  
C/EBP $\beta$  : *CCAAT-Enhancer-Binding Protein  $\beta$*   
CDC42 : *Cell Division Control protein 42 homolog*  
CDK1 : *Cyclin Dependent Kinase 1*  
CDK3 : *Cyclin Dependent Kinase 3*  
CIP : *Contact Inhibition of cell Proliferation*  
CLANs : Cross Linked Actin Networks  
CLIP70 : *Cytoplasmic Linker Protein 170*  
CNV : *Copy Number Variations*  
CRE : *cAMP-Response Elements*  
CREB : *cAMP Response Element-Binding protein*  
CRISPR : *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*  
CTNNB1 : *Catenin Beta 1*

### D

DBL : *Diffuse B-cell Lymphoma*  
DDRs : Récepteurs à Domaine Discoïdine  
DH : *DBL Homology domain*  
DHR-1 : *DOCK homology region 1*

DHR-2 : *DOCK homology region 2*  
DMEM : *Dulbecco's Modified Eagle Medium*  
DOCK : *Dedicator of Cytokinesis*

## **E**

E2 : Estradiol  
EB1 : *End-Binding protein 1*  
Ena/VASP : *SignificanceEnabled/VAsodilator-Stimulated Phosphoprotein*  
ER : Récepteur aux Estrogènes  
ERK : *Extracellular signal-regulated kinases*  
ERM : Ezrin, Radixin, Moesin

## **F**

FBXW7 : *F-Box and WD repeat domain containing 7*  
FGF : *Fibroblast Growth Factor*  
FIGO : *International Federation of Gynecology and Obstetrics*  
FOXO1 : *Forkhead box O1*  
FZD-2 : Récepteur *Frizzled 2*

## **G**

GAP : *GTPase-Activating Proteins*  
GDI : *Guanine Nucleotide Dissociation Inhibitors*  
GDP : Guanosine Di-Phosphate  
GEF : *Guanine Nucleotide Exchange Factors*  
GFP : *Green Fluorescent Protein*  
GPCR : Récepteur couplé aux protéines G  
Grb2 : *Growth factor receptor-bound protein 2*  
GTP : Guanosine Tri-Phosphate

## **H**

HAND2 : *helix-loop-helix transcription factor*  
HDR : *Homology-directed repair*  
HIFI : *High-fidelity*  
HRAS : homologue de *Harvey Rat sarcoma virus*

## **I**

IGF-R : Récepteur à l'insuline  
IHC : Immunohistochimie  
IMC : Indice de Masse Corporelle  
IPA : *Ingenuity Pathway Analysis*  
IQGAP : *IQ motif containing GTPase activating protein 1*

## **J-K**

JNK : *c-jun terminal kinase*

KD : *Knockdown*

KO : *Knockout*

KRAS : *homologue de Kirsten rat sarcoma virus*

## **L-M**

LIMK : *LIM domain kinase*

MAPK : *Mitogen-activated protein kinase*

MEC : *Matrice ExtraCellulaire*

MIIP : *Migration and Invasion Inhibitory Protein*

MLC : *Myosin Light Chain*

MMP : *MétalloProtéases*

MMR : *Mismatch Repair*

MSI : *Microsatellite Instability*

MYPT1 : *Myosin Phosphatase Target Subunit 1*

## **N**

NFκB : *Nuclear factor kappa B*

NGS : *Next-Generation Sequencing*

NHEJ : *Non-Homologous End-Joining*

NMU : *Neuromedin U*

## **O-P**

OMS : *Organisme Mondial de la Santé*

p190A : *p190RhoGAP-A*

p190B : *p190RhoGAP-B*

P4 : *Progestérone*

P53 : *Tumor protein 53*

PAI-1 : *Plasminogen Activator Inhibitor-1*

PAK1 : *P21 (RAC1) Activated Kinase 1*

PAM : *Protospacer Adjacent Motif*

PCR : *Polymerase Chain Reaction*

PDLIM7 : *PDZ And LIM Domain 7*

PEI : *Polyethylenimine*

PH : *Pleckstrin Homology domain*

PI3K : *Phosphoinositide 3-Kinase*

PIK3CA : *Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha*

PIK3RI : *Phosphoinositide-3-Kinase Regulatory Subunit 1*

PKA : *Protéine Kinase A*

PLS : *Protrusion Localization Sequence*

POLE : *DNA Polymerase Epsilon*

PR : *Récepteur à la Progestérone*



PTEN : *Phosphatase and TENsin homolog*

## **R**

Rac1 : *Rac family small GTPase 1*

RAS : *Rat sarcoma virus*

RBD : *Rho Binding Domain*

RHO : *RAS Homologous*

RhoA : *Ras homolog family member A*

RhoH : *Ras homolog family member H*

RhoU : *Ras homolog family member U*

RhoV : *Ras homolog family member V*

RNP : *ribonucléoprotéique (complexe)*

ROCK : *Rho associated coiled-coil containing protein kinase*

ROS : *Reactive Oxygen Species*

RPL22 : *Ribosomal protein L22*

## **S**

SH3 : *SRC Homology 3 Domain*

shRNA : *short hairpin RNA*

siRNA : *silencing RNA*

SOPK : *Syndrome des Ovaires Polykystiques*

SRF : *Serum Response Factor*

STAT5 : *Signal Transducer and Activator of Transcription 5*

## **T**

TCF/LEF : *T Cell Factor/Lymphoid Enhancer Factor Family*

TCGA : *The Cancer Genome Atlas*

TEM : *Transition Epithélio-Mésenchimaleuse*

TF : *Facteur Tissulaire*

Tks5 : *Tyrosine kinase substrate with 5 SH3 domains*

## **W-Y**

WASP : *Wiskott Aldrich Syndrome Protein*

WT : *Wild Type*

YFP : *Yellow Fluorescent Protein*

# Introduction

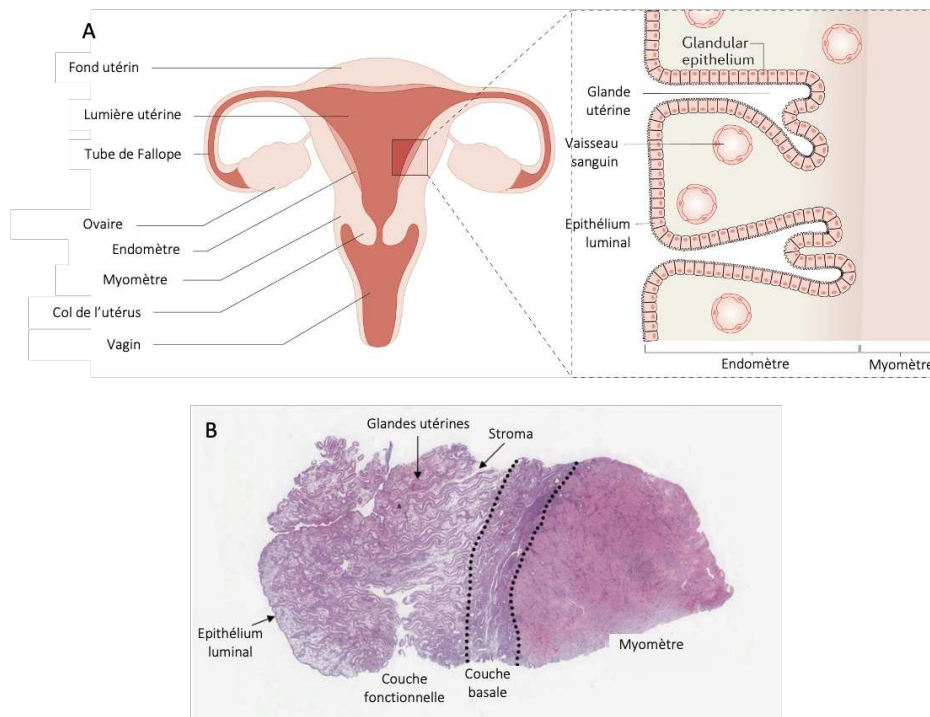
# Chapitre 1 – Le cancer de l’endomètre

## 1. L’endomètre

### 1.1. Anatomie utérine et rôle de l’endomètre

L’endomètre est la muqueuse constituant la paroi interne de l’utérus. Il est en contact avec la lumière utérine d’un côté, et entouré par le muscle utérin appelé myomètre de l’autre. Il est composé de deux couches : une couche basale en contact avec le myomètre, et une couche fonctionnelle en contact avec la lumière (Figure 1 ; Tempest et al., 2018) .

Le rôle physiologique de l’endomètre est de préparer la nidation puis de maintenir l’embryon en cas de grossesse. Ainsi, il s’agit d’un tissu à la dynamique particulière qui se décidualise, et qui a la propriété de se régénérer à chaque cycle menstruel. Étymologiquement, le terme décidualisation signifie « mourir, tomber ou se détacher ». La décidualisation consiste en la transformation des cellules mésenchymateuses de l’endomètre en cellules dites déciduales, arrondies, productrices d’hormones et facteurs de croissances. C’est ce phénomène qui prépare les conditions optimales à la nidation. Ce tissu tient donc un rôle essentiel dans la reproduction : un endomètre dit « réceptif » est un prérequis essentiel au succès de l’implantation de l’embryon (Critchley et al., 2020; Strowitzki et al., 2006).



**Figure 1 : Anatomie utérine et structure de l'endomètre.** (A) L’endomètre est la paroi interne de l’utérus. Représentation adaptée d’après Makker et al., 2022. (B) Coupe histologique dans l’épaisseur d’une biopsie d’endomètre et myomètre sub-endométrial teinté à l’hématoxyline et éosine (100X). Adapté d’après Tempest et al. 2018.

## 1.2. L'endomètre au cours du cycle menstruel

Pendant le cycle menstruel, l'endomètre subit des modifications morphologiques précises en réponse à des facteurs hormonaux (Figure 2). Les principaux protagonistes sont l'estradiol (E2) et la progestérone (P4). Le cycle commence lors des menstruations (environ 5 jours), suivies de la phase proliférative jusqu'au jour 14. Pendant cette phase, l'estradiol domine dans l'environnement endométrial. Le tissu et les vaisseaux subissent une importante prolifération et s'épaississent. Commence ensuite la phase sécrétrice pendant laquelle un pic de progestérone est nécessaire à l'établissement d'une grossesse dans un endomètre « préparé » par l'estradiol. Cette forte concentration en P4 est responsable d'un gonflement des cellules endométriales qui, sans grossesse, initialise le processus de décidualisation en fin de phase sécrétrice, donc de nouvelles menstruations (Corner and Allen, 1928; Noyes et al., 1950). Toutes les phases du cycle de l'endomètre sont associées à des phases du cycle ovarien correspondantes (Figure 2).

Le cycle menstruel dure en moyenne 28 jours, et il se produit plus de 400 cycles au cours de la vie d'une femme. Ceci souligne la singularité du tissu qu'est l'endomètre. Quatre-cent fois, il subit des cycles d'inflammation et une décidualisation suite à quoi il a la capacité de se réparer sans laisser de cicatrices et sans perte de fonction (Jabbour et al., 2006).

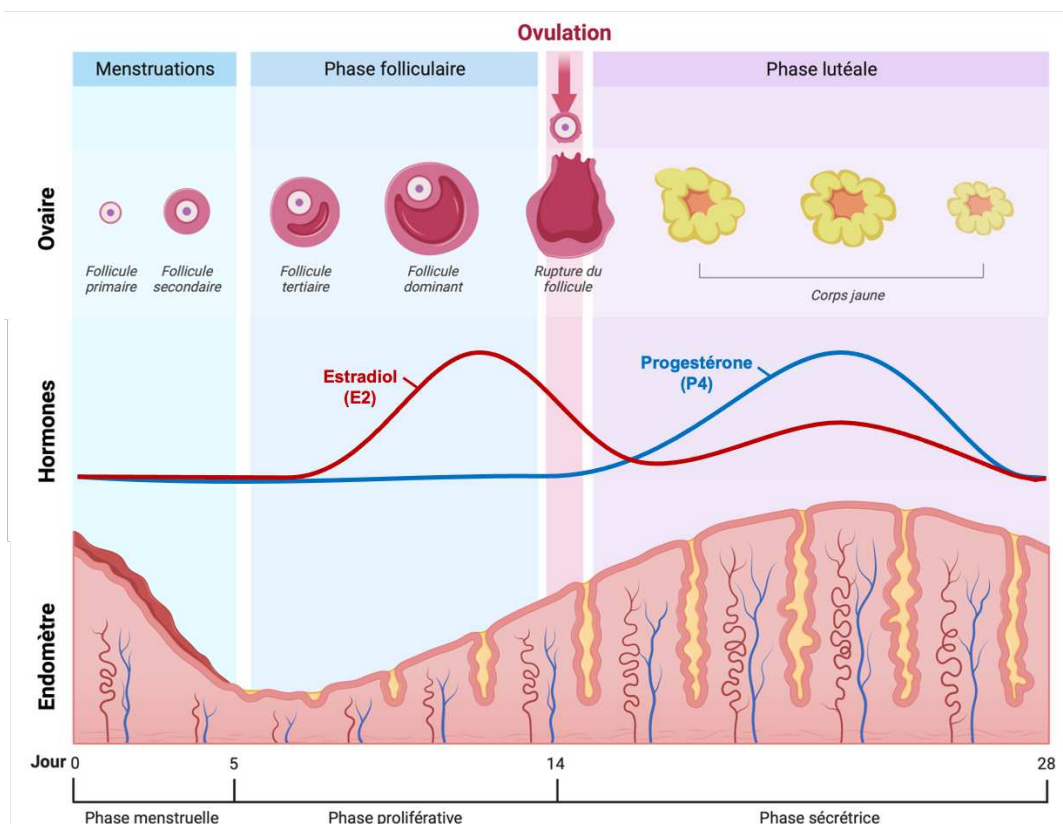


Figure 2 : Illustration schématique du cycle menstruel humain. De bas en haut, les jours et les phases du cycle endométrial sont représentés avec les modifications de l'endomètre. Ils sont associés aux fluctuations d'estradiol et de progestérone au milieu de la figure. Les phases du cycle ovarien correspondantes sont représentées sur la partie supérieure. Créé avec BioRender.com.

### 1.3. Pathologies associées à l'endomètre

Toute perturbation dans l'équilibre des hormones précitées peut conduire à des pathologies. Aujourd'hui, les femmes sont de plus en plus nombreuses à souffrir de pathologies de l'endomètre. D'un côté, trop de progestérone génère un endomètre dit « fin », dont la conséquence directe est un défaut d'implantation de l'embryon (El-Toukhy et al., 2008; Lebovitz and Orvieto, 2014). De l'autre, une résistance à la progestérone et une dominance d'estradiol conduisent à des douleurs pelviennes chroniques, des saignements utérins anormaux, et là-encore à de l'infertilité. L'endométriose fait partie de ces pathologies et est caractérisée par la croissance d'un tissu similaire à l'endomètre à l'extérieur de l'utérus. Une théorie largement acceptée est que des menstruations rétrogrades (i.e. qui remontent dans l'organisme plutôt que d'être évacuées) en seraient à l'origine. L'adénomyose a des similarités avec l'endométriose. Il s'agit de l'infiltration de tissus similaires à l'endomètre dans le myomètre. Ces deux maladies, endométriose et adénomyose, touchent respectivement 10% et plus de 20% des femmes. Le syndrome des ovaires polykystiques (SOPK) génère lui-aussi une résistance à la progestérone au niveau de l'endomètre. Il peut conduire à une hyperplasie endométriale, qui correspond à une prolifération excessive des cellules endométriales et un épaissement du tissu (Arafah et al., 2021; MacLean and Hayashi, 2022).

Une hyperplasie endométriale est un terrain de prédilection pour le développement d'une tumeur maligne. On estime que le SOPK augmente de 2,7 fois le risque d'apparition d'un cancer de l'endomètre. En revanche, la présence d'adénomyose et d'endométriose n'est pas corrélée de manière claire au développement de ce cancer.

## 2. Le cancer de l'endomètre

### 2.1. Épidémiologie

#### 2.1.1. Incidence

Le cancer de l'endomètre, ou cancer du corps de l'utérus, est classé 6<sup>ème</sup> en termes d'incidence chez les femmes. En 2020, 417 367 nouveaux cas ont été diagnostiqués dans le monde (Sung et al., 2021). Cette incidence en augmentation (+1,3% par an) est notamment due à l'augmentation des facteurs de risque dans le style de vie moderne. La majorité des patientes sont âgées (entre 65 et 75 ans), en surpoids (IMC de plus de 25) et ont une source identifiable d'œstrogènes sans opposition de progestérone. D'autres facteurs de risque existent tels qu'un syndrome métabolique (hypertension, diabète), des menstruations précoces ou une ménopause tardive, la prise de tamoxifène pour le traitement d'un cancer du sein, ou bien des prédispositions familiales et génétiques (Colombo et al., 2016). L'obésité étant associée à environ 50% des cancers de l'endomètre, il est compréhensible que l'incidence majeure apparaisse dans les pays développés avec un pic en Amérique du Nord et en Europe (incidences respectives 21,1 pour 100 000 et 20,2 pour 100 000 femmes) (Sung et al., 2021).

#### 2.1.2. Mortalité

Soixante-sept pourcent des patientes sont diagnostiquées à un stade précoce de la maladie pour lequel la survie à 5 ans est favorable, d'environ 81%. Cependant, la survie à 5 ans diminue radicalement pour les stades avancés : respectivement 17% et 15% pour les stades IVA et IVB (Makker et al., 2021). De plus, si la survie globale des cancers augmente depuis les années 1970, les cancers du corps utérin sont les seuls à voir leur survie à 5 ans diminuer au fil des années, reflétant vraisemblablement un manque d'avancées dans les traitements des pathologies féminines. Les décès des suites de tumeurs de l'endomètre sont ceux qui augmentent le plus dans le monde : +2% par an. En 2020, 97 370 femmes sont mortes d'un cancer de l'endomètre (Islami et al., 2021; Sung et al., 2021).

### 2.2. Classification

#### 2.2.1. Classification histologique

La première classification des cancers de l'endomètre a été proposée en 1983 par Bokhman. Elle était fondée sur des critères cliniques et moléculaires et constitue la base de la classification actuelle. Le type I, composé des tumeurs endométrioïdes, est le plus fréquent (80-90%) et a un pronostic favorable. Ces tumeurs expriment fortement les récepteurs aux œstrogènes et sont

hormonodépendantes. Le type II est dit *non endométrioïde*, composé entre autres des tumeurs séreuses, à cellules claires, indifférenciées, et représente 10 à 20% des tumeurs avec un pronostic défavorable. Les tumeurs de type II expriment moins les récepteurs aux estrogènes. (Bokhman, 1983; Colombo et al., 2016; Makker et al., 2021).

Les tumeurs de l'endomètre étant très hétérogènes, la classification s'est largement affinée (Figure 3 ; Koskas et al., 2021). D'abord, l'analyse histologique permet de déterminer le type de tumeur et le grade. L'OMS a publié en 2020 la classification en vigueur qui comprend : les carcinomes endométrioïdes, mucineux, séreux, à cellules claires, indifférenciés, les tumeurs neuroendocrines et les carcinomes mixtes. Le grade est ensuite associé selon les critères suivants :

- GX : Grade ne pouvant pas être déterminé
- G1 : Bien différencié
- G2 : Modérément différencié
- G3 : Peu ou indifférencié

Les carcinomes de grade 1 et grade 2 sont considérés de « bas grade ». Les carcinomes de grade 3 sont considérés de « haut grade » et leur pronostic est défavorable. Les carcinomes séreux et à cellules claires sont généralement considérés comme haut grade par définition.

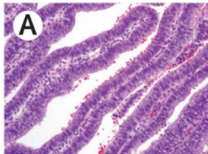
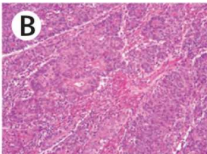
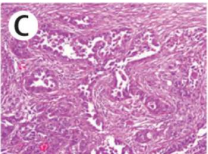
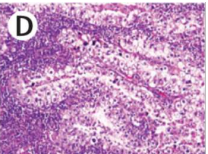
				
<b>Type histologique</b>	Endométrioïde	Endométrioïde	Séreux	Cellules claires
<b>Grade histologique</b>	Bas	Haut	Haut	Haut
<b>Métastases</b>	Peu communes	Ganglions lymphatiques Organes distants	Ganglions lymphatiques Péritoine Organes distants	Ganglions lymphatiques Péritoine -/+
<b>Pronostic</b>	Favorable	Mauvais	Mauvais*	Mauvais*

Figure 3 : Caractéristiques clinicopathologiques des types communs de cancers de l'endomètre. (A) Carcinome endométrioïde de grade 1, composé de glandes bien visibles. (B) Carcinome endométrioïde de grade 3 comportant des structures tumorales solides en croissance. (C) Carcinome séreux composé de cellules atypiques avec des noyaux pléiomorphiques. (D) Carcinome à cellules claires composé de cellules cuboïdales avec un cytoplasme clair. \*Tumeurs diagnostiquées fréquemment à un stade avancé. Figure modifiée d'après Murali et al., 2014.

### 2.2.2. Classification FIGO

A la classification histologique, s'ajoute la classification chirurgicale communément utilisée selon le système FIGO (*International Federation of Gynecology and Obstetrics*). La dernière mise à jour a été publiée en 2021. Le stade FIGO traduit l'étendue de la maladie et est détaillé dans le Tableau 1.

Tableau 1 : Classification FIGO du cancer de l'endomètre. Traduit d'après Koskas et al., 2021.

Stade FIGO	
I*	Tumeur limitée au corps de l'utérus
IA*	Pas ou peu d'invasion du myomètre
IB*	Invasion égale ou supérieure à la moitié du myomètre
II*	Tumeur envahissant le stroma cervical, mais pas d'extension en dehors de l'utérus
III*	Extension locale et/ou régionale de la tumeur
IIIA*	Tumeur envahissant la séreuse du corps de l'utérus et/ou les annexes
IIIB*	Envahissement vaginal et/ou paramétrial
IIIC*	Atteinte des ganglions lymphatiques régionaux
IIIC1*	Ganglions pelviens positifs
IIIC2*	Ganglions lomboaortiques positifs avec ou sans les ganglions pelviens
IV*	Tumeur envahissant la muqueuse vésicale et/ou intestinale et/ou métastases à distance
IVA*	Tumeur envahissant la muqueuse vésicale et/ou intestinale
IVB*	Métastases à distance, incluant des métastases intra-abdominales et/ou ganglions inguinaux

\*Peuvent être de grade 1, 2 ou 3

### 2.3. Prise en charge thérapeutique

Un grand nombre de patientes consulte suite à des métrorragies (saignements entre les menstruations ou après la ménopause). Si un cancer de l'endomètre est diagnostiqué, les examens sont effectués de manière à classer la tumeur : examen gynécologique, échographie pelvienne et biopsie sont nécessaires. La classification (type, stade, grade) permet d'établir un protocole thérapeutique (Colombo et al., 2016; Koskas et al., 2021).

#### 2.3.1. Stades précoces

Pour un cancer de l'endomètre de stade I ou II, l'approche classique est chirurgicale et une hystérectomie totale (ablation de l'utérus) est effectuée. Les ovaires peuvent aussi être retirés pour palier à un risque de métastase ovarienne. Les patientes de moins de 40 ans pour lesquelles il faut préserver la fertilité représentent 4% des cancers de l'endomètre. La tumeur est en général de bas grade (Lee et al., 2007). Pour préserver leur fertilité, un traitement à base de progestines (dérivés de progestérone) peut être prescrit. Si les patientes sont non répondeuses ou en récurrence, une



hystérectomie est néanmoins préconisée. Suite à la chirurgie, les traitements adjuvants ne sont pas nécessaires pour les patientes à bas risque (Creutzberg et al., 2000). Les patientes à haut risque (grade 3 et comorbidités) peuvent nécessiter une radiothérapie et curiethérapie dans les semaines qui suivent la chirurgie (Wortman et al., 2018; Wright et al., 2009)

### 2.3.2. Stades avancés

Dans le cas de tumeurs de stades avancés, la chimiothérapie entre en ligne de compte. Pour les cancers de stade III, une approche chirurgicale est d'abord effectuée par résection pelvienne totale. Elle est suivie de thérapie adjuvante sous forme de radiothérapie et/ou chimiothérapie. Pour les cancers de stade IV, la chirurgie est simplement cytoréductrice et suivie de chimiothérapie (Shih et al., 2011). Les combinaisons de chimiothérapie les plus couramment utilisées dans le cadre du cancer de l'endomètre sont doxorubicin-cisplatine-paclitaxel et carboplatine-paclitaxel. C'est cette dernière combinaison qui est le mieux tolérée et recommandée (Miller et al., 2020).

### 3. Voies moléculaires impliquées

Compte tenu des informations données jusqu'ici, il est évident que l'endomètre est un tissu hautement dynamique et fortement dépendant des hormones. Nous allons voir ici quelle est la classification moléculaire du cancer de l'endomètre et en quoi les principaux gènes et protéines impliqués peuvent impacter la fonctionnalité normale des cellules endométriales pour favoriser le développement du cancer.

#### 3.1. Classification moléculaire des cancers de l'endomètre

En 2013, le *Cancer Genome Atlas* (TCGA) a publié une étude génomique sur 373 cancers de l'endomètre. Ils y ont décrit 4 groupes pouvant avoir des pronostics distincts, caractérisés par des panels de mutations et par des altérations en termes de nombre de copies pour différents gènes (CNV : *Copy number variations*) (Levine et al., 2013). Cette classification a ensuite été complétée et confirmée par d'autres études prenant notamment en compte des analyses immunohistochimiques (Stelloo et al., 2015; Talhouk et al., 2015). Les caractéristiques de chaque groupe sont décrites ci-après, et résumées dans la Figure 4.

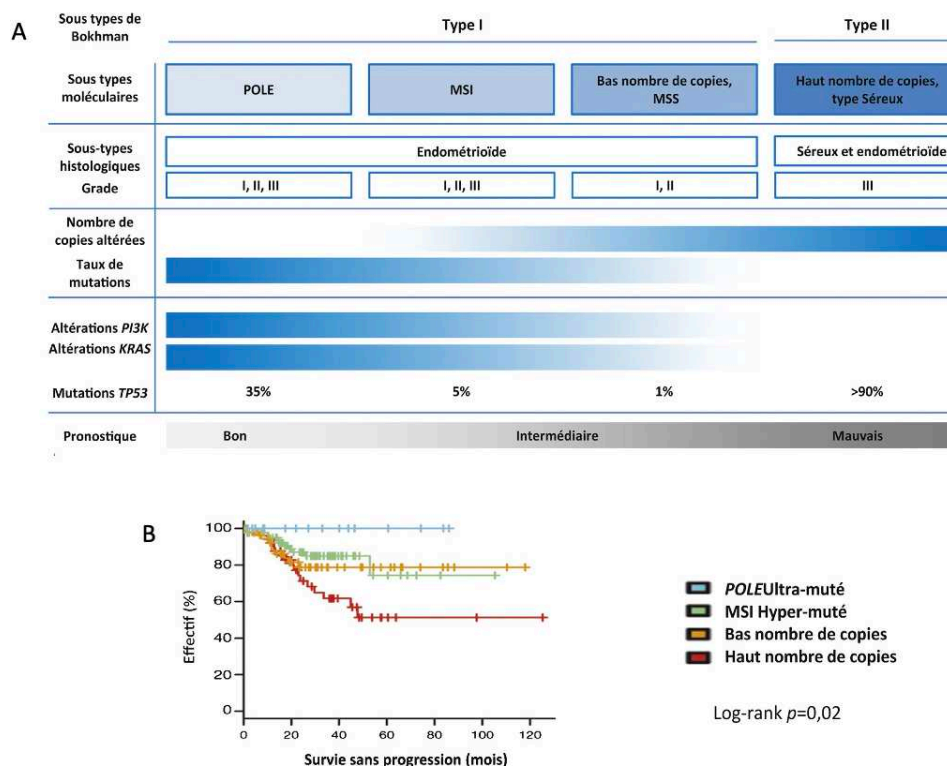


Figure 4 : Classification moléculaire des cancers de l'endomètre. (A) Résumé des caractéristiques de chaque groupe. (B) Survie sans progression des 4 groupes moléculaires. Figure d'après Genestie et al., 2017.

### 3.1.1. Les tumeurs ultramutées POLE

La première catégorie est constituée de tumeurs portant toutes des mutations sur le gène *POLE*, et pour lesquelles la survie sans progression est la meilleure. *POLE* code pour une sous-unité catalytique de l'ADN polymérase epsilon, qui est impliquée dans la réplication et la réparation de l'ADN. L'ADN des cellules est alors fortement altéré, et on parle de tumeurs ultramutées. Parmi les mutations, nombreuses sont enrichies dans ce groupe de tumeurs : *PTEN* (94%), *FBXW7* (82%), *PIK3CA* (71%), *PIK3RI* (65%) et *KRAS* (53%). De plus, une analyse de l'expression des ARNm a montré une dérégulation de gènes impliqués dans le métabolisme cellulaire dans ce groupe.

### 3.1.2. Les tumeurs hypermutées

Le second groupe est composé de tumeurs portant des instabilités microsatellitaires (*microsatellite instability* : MSI). Ce phénomène résulte d'une déficience du système de réparation de l'ADN (*Mismatch Repair* : MMR), et est associé au Syndrome de Lynch dans 5 à 10% des cas. Ce dernier est une prédisposition héréditaire qui est justement causée par des mutations dans les gènes du système MMR. Les individus avec un Syndrome de Lynch ont 40 à 60% de risque de développer un cancer de l'endomètre au cours de leur vie (Sehgal et al., 2014). Les tumeurs endométriales ayant des

MSI sont dites hypermutées. Elles portent des altérations dans le gène *RPL22*, et de fréquentes mutations dans le gène *KRAS*.

### 3.1.3. Les tumeurs p53 WT

Les tumeurs « p53 WT » représentent la moitié des cancers de l'endomètre. Elles sont décrites comme des tumeurs à faible taux mutationnel et à faible CNV. De manière intéressante, elles ont la plus haute fréquence en mutations du gène *CTNNB1* ( $\beta$ -caténine, 50%). Le pronostic pour ce groupe est en général favorable.

### 3.1.4. Les tumeurs p53 mutées

Le quatrième et dernier groupe est constitué des tumeurs dites « p53 mutées ». Celles-ci ont un faible taux mutationnel mais de nombreuses CNV. Ce groupe porte des mutations p53 reconnaissables histologiquement, avec en général un phénotype séreux. Ces tumeurs sont de haut grade avec un mauvais pronostic.

## 3.2. Signalisation dans l'endomètre physiologique et pathologique

Pour comprendre pourquoi les gènes cités dans la partie 3.1. sont retrouvés mutés, il faut revenir sur la physiologie normale de l'endomètre. En comprenant le rôle des différentes signalisations pendant le cycle menstruel, nous pourrions déduire l'impact de leurs altérations, et leur implication dans le développement du cancer.

### 3.2.1. Phase de prolifération

Entre les jours 5 et 14 du cycle menstruel, l'endomètre subit une importante phase de prolifération. Elle est dirigée par la forte concentration en œstrogènes. Ceux-ci se fixent sur leurs récepteurs (ER) dans les cellules endométriales (Fuentes and Silveyra, 2019). Le dimère estradiol (E2) - ER ainsi créé peut transiter jusqu'au noyau des cellules pour aller activer la transcription de gènes (Figure 5). Parmi eux se trouvent des gènes impliqués dans la progression de la phase G1 à la phase S du cycle cellulaire tels que la cycline D1, cycline D3, CDK1 ou CDK3. Le complexe E2-ER joue aussi un rôle au niveau cytosolique où il active les récepteurs à l'Insuline (IGF-R). Une boucle de rétrocontrôle positif se joue entre les deux récepteurs (ER et IGF-R) qui se phosphorylent l'un et l'autre. Ils recrutent

ensuite différentes kinases, et activent en parallèle les voies Ras/MAPK et PI3K/AKT (Zhu et al., 2014). La conséquence de cette signalisation est une augmentation de la prolifération et une diminution de l'apoptose.

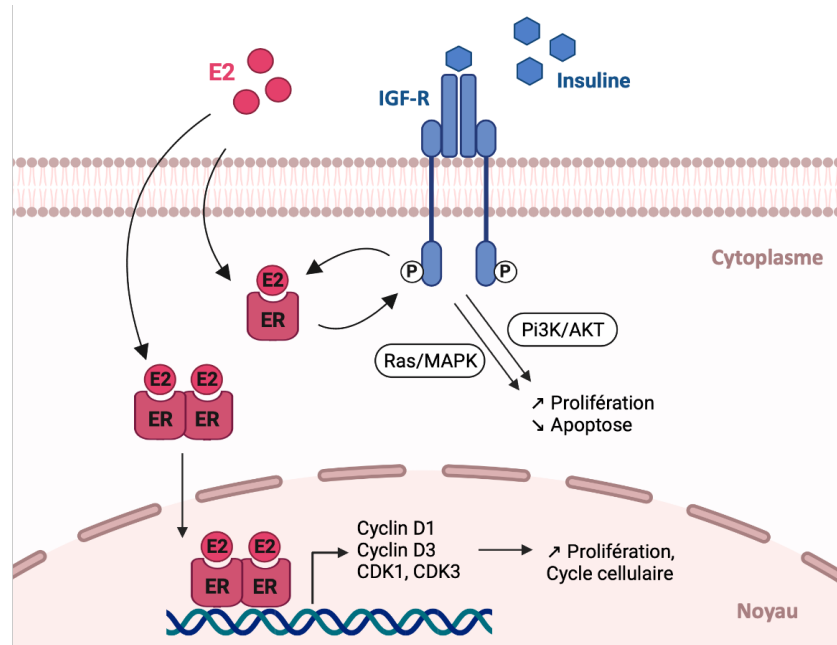


Figure 5 : Signalisation de l'estradiol (E2) et impact sur la prolifération dans les cellules endométriales. ER : Récepteur aux Estrogènes, IGF-R : Récepteur à l'insuline. Figure créée avec BioRender.com.

Une autre voie de signalisation importante pour la prolifération des cellules endométriales est la voie canonique Wnt/ $\beta$ -caténine (Figure 6). Il a été montré que les œstrogènes augmentent l'expression des ligands Wnt4 et Wnt5, ainsi que du récepteur FZD-2 (*Frizzled 2*). En cas d'activation de ce récepteur, la signalisation permet à la  $\beta$ -caténine d'être libérée et transloquée au noyau. Elle peut ainsi se fixer sur des facteurs de transcription de la famille TCF/LEF pour activer la transcription de gènes liés à la prolifération tels que c-Myc ou la Cycline D1 notamment (Wang et al., 2010).

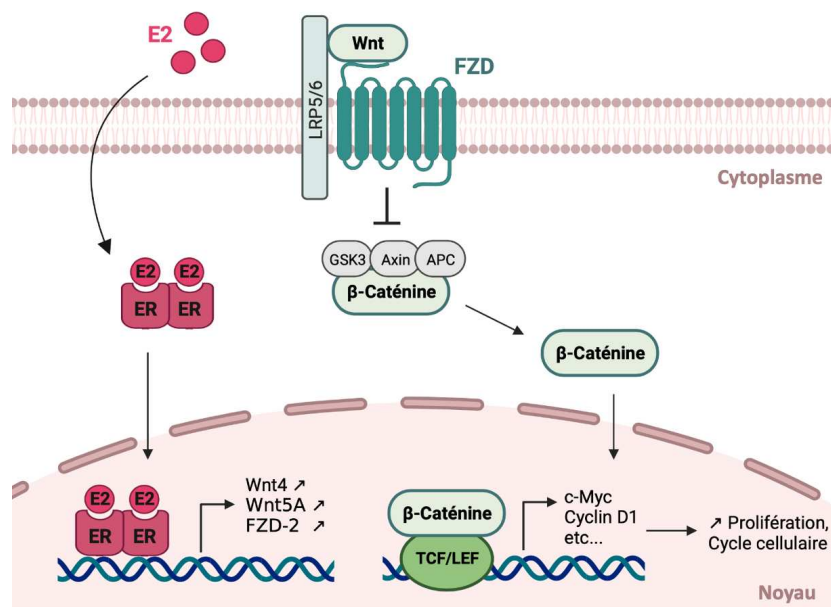


Figure 6 : Impact de l'estradiol (E2) sur la signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine. ER : Récepteur aux Estrogènes, FZD : récepteur Frizzled. Figure créée avec BioRender.com

Étant donné que la plupart des cancers de l'endomètre se développent sur une hyperplasie, il est logique que cette phase de prolifération soit la première considérée. Ceci explique comment une exposition aux œstrogènes constante favorise le développement d'une tumeur. Ceci explique aussi pourquoi les gènes codant pour des protéines de ces voies de signalisation sont fréquemment mutés dans les cancers de l'endomètre : nous avons cité plus haut *PIK3CA*, *PIK3RI*, *KRAS* ou encore *CTNNB1* notamment.

### 3.2.2. Phase de décidualisation

La décidualisation arrive suite à la phase sécrétrice et au pic de progestérone. Cette dernière permet aux cellules du stroma de se différencier en cellules déciduales. Elles pourront alors soit fournir des nutriments lors de l'implantation de l'embryon, ou bien « tomber » lors des menstruations. Ces cellules ne sont pas vouées à être viables, c'est pourquoi tous les mécanismes mis en place grâce à la signalisation de l'estradiol doivent être inversés.

Dans cette signalisation, la progestérone (P4) agit en synergie avec l'AMP cyclique (AMPC) (Figure 7). La production d'AMPC active la voie de signalisation PKA. Il en résulte une phosphorylation du facteur de transcription CREB qui se fixe à l'ADN sur des sites spécifiques (*cAMP-response elements* : CRE). C'est cette fixation qui permet la transcription de gènes impliqués dans la décidualisation. Parmi eux, on retrouve la protéine p53 dont la signalisation induit un blocage au point de contrôle G2/M du cycle cellulaire et favorise l'apoptose des cellules (Pohnke et al., 2004). Ce phénomène est amplifié par

la transcription de FOXO1 qui inhibe la cycline B et CDK1 (Maruyama and Yoshimura, 2008). Sont aussi transcrits les gènes STAT5 et C/EBP $\beta$ . Les protéines issues de l'activation de ces 3 derniers gènes, FOXO1, STAT5 et C/EBP $\beta$ , peuvent à leur tour interagir avec le complexe formé par la P4 sur son récepteur (P4 - PR) (Gellersen and Brosens, 2003). Ce groupe de protéines permet la transcription de gènes spécifiques de la décidualisation, notamment Src, HAND2 (*helix-loop-helix transcription factor*) et FGF (*Fibroblast Growth Factor*). L'expression des récepteurs aux estrogènes (ER) est aussi inhibée par la P4, phénomène indispensable à la régulation entre ces deux hormones (Makieva et al., 2018). Enfin, une étude sur des cellules d'endomètre a montré que la signalisation induite par la progestérone inhibe la signalisation de Wnt (Wang et al., 2009).

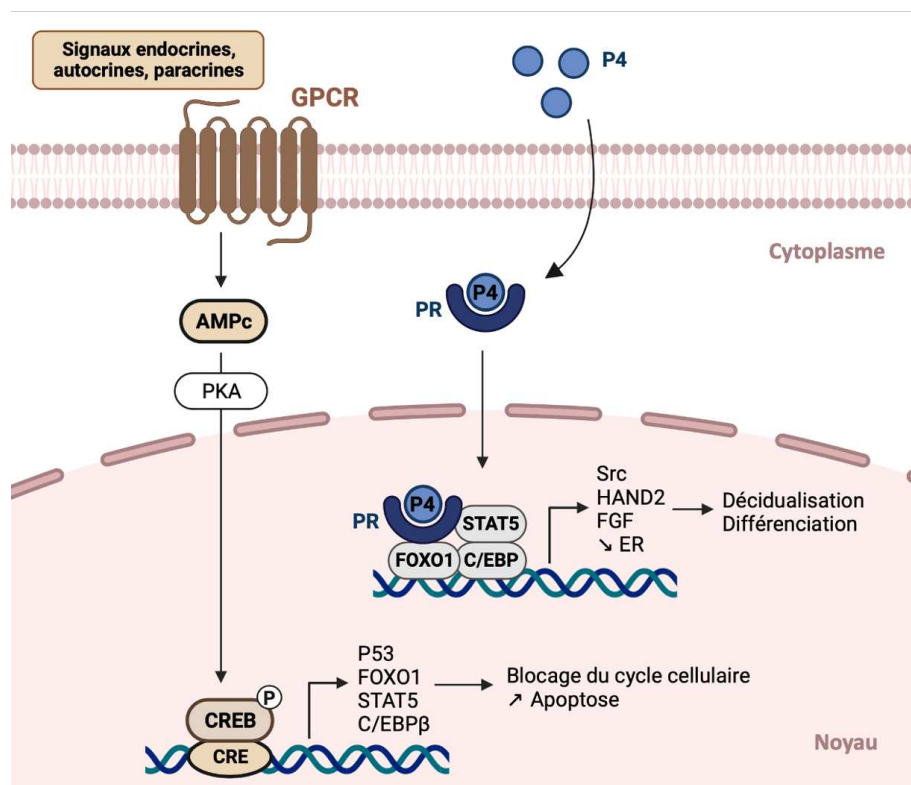


Figure 7 : Signalisation de la progestérone (P4), en synergie avec la voie de l'AMPc, dans le processus de décidualisation des cellules endométriales. GPCR : Récepteur couplé aux protéines G, AMPc : AMP cyclique, PKA : Protéine Kinase A, CRE : *cAMP-response elements*, PR : récepteur à la progestérone, ER : récepteur aux estrogènes. Figure créée avec BioRender.com.

En parallèle des voies de prolifération, d'autres protéines telles que le TF (facteur tissulaire) ou encore PAI-1 (*plasminogen activator inhibitor-1*), qui sont des facteurs de coagulation, voient leur expression être modulée sous l'effet de la progestérone pour contrôler les saignements. Tout saignement anormal dans le cas d'un cancer de l'endomètre résulte donc d'une perte de contrôle de ces protéines en cas d'absence de la progestérone (Lockwood et al., 1994).

### 3.2.3. Fenêtre d'implantation de l'embryon : migration

Une fonction souvent négligée dans les cellules endométriales est la migration. Dans l'endomètre physiologique, à l'étape d'implantation d'un embryon, des cellules déciduales hautement mobiles viennent entourer celui-ci (Berkhout et al., 2018). Un remaniement du tissu a lieu pour permettre à l'embryon d'envahir l'endomètre. Cette signalisation de migration passe par un remaniement du cytosquelette des cellules. Ceci a lieu grâce à l'action des protéines de la famille des RhoGTPases, en particulier une dynamique entre RhoA et Rac1 (Grewal et al., 2010, 2008).

La grossesse est associée à un risque réduit de cancer de l'endomètre (Colombo et al., 2016). Il paraît alors cohérent de dire que les changements qu'elle entraîne au niveau des cellules endométriales aient un effet antitumoral, et qu'ils soient inversés dans le cas du développement de la maladie. Or il semble paradoxal de dire qu'une augmentation de la migration puisse être antitumorale, étant donné qu'elle fait partie des *Hallmarks of Cancer* définies par Hanahan and Weinberg (2011).

Plusieurs revues ont proposé des mécanismes expliquant l'implication des RhoGTPases dans le cancer de l'endomètre. Makieva et al. (2018) décrivent que la P4 activerait exclusivement une voie non-canonique de Wnt/ $\beta$ -Caténine dans les cellules endométriales au moment de l'implantation, qui permettrait une activation de RhoA/ROCK. Un cancer induit par une trop forte exposition aux E2 limiterait donc l'activation des RhoGTPases. A l'inverse, Zubor et al. (2020) décrivent plutôt des mécanismes d'activation importante de cette voie dans le cancer de l'endomètre. Ceux-ci peuvent passer par une délétion de MIIP (*Migration and Invasion Inhibitory Protein*), ou bien par l'action du neuropeptide NMU, qui ont tous deux la conséquence d'activer Rac1 et RhoA dans les cellules endométriales (Lin et al., 2016; Wang et al., 2016). De plus, une activité anormale de RhoA/ROCK a déjà été décrite dans d'autres pathologies de l'endomètre telles que l'endométriose et l'adénomyose (Jiang et al., 2018; Yotova et al., 2011).

Globalement, peu d'études à ce jour permettent de comprendre de manière claire comment sont impactés les RhoGTPases et le cytosquelette dans les cellules des cancers de l'endomètre.

## Chapitre 2 – Cytosquelette d'actine et RhoGTPases

---



# 1. Le cytosquelette d'actine

## 1.1. Présentation générale du cytosquelette

Le cytosquelette porte le nom de « squelette » à juste titre : il forme l'ossature des cellules. Il constitue le support structural qui leur confère une forme. Cependant, contrairement à un « squelette » au sens où on l'entend, le cytosquelette est une structure dynamique et adaptative dont les composants sont en flux constant. Grâce à cette dynamique, le cytosquelette permet aux cellules de bouger au travers des tissus, de changer de forme, ou encore de résister à des pressions venant de l'environnement extérieur. Il est aussi un élément essentiel lors de la division cellulaire.

Le cytosquelette des cellules est composé de 3 types de filaments :

- Les microtubules sont de longs tubes constitués de tubuline. Ils servent de structure à la cellule et permettent le transport de molécules à l'intérieur de celle-ci. Les microtubules constituent le fuseau mitotique et jouent un rôle essentiel lors de la division cellulaire.
- Les filaments intermédiaires sont composés d'un groupe hétérogène de protéines. Ils assurent la résistance mécanique des cellules soumises à une contrainte physique.
- Les microfilaments sont composés d'actine. Leurs caractéristiques sont détaillées ci-après.

Une illustration de l'organisation des différents filaments du cytosquelette dans une cellule est proposée ci-dessous (Figure 8). Pour que le système fonctionne, le cytosquelette nécessite la présence de ces 3 types de filaments avec leur régulation au niveau local, permettant des successions d'assemblage et désassemblage qui génèrent la dynamique. En plus de cela, les trois types de filaments interagissent entre eux de manière coordonnée pour assurer les différentes fonctions de la cellule : structure, migration, mais aussi division cellulaire (Hohmann and Dehghani, 2019; Karp, 2010).

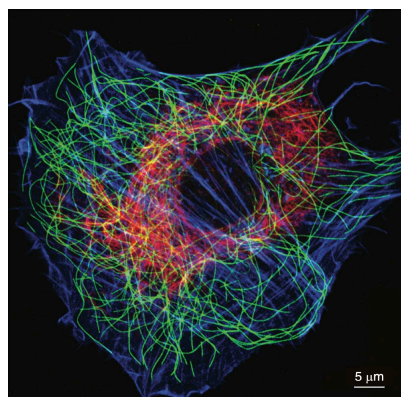


Figure 8 : Image en microscopie à fluorescence d'un fibroblaste en interphase, marqué avec de la phalloïdine (bleu, marque l'actine), et avec des anticorps dirigés contre les microtubules (vert) et les filaments intermédiaires (rouge). D'après Pollard & Goldman, 2018.

## 1.2. Fonctions du cytosquelette d'actine

### 1.2.1. Fonctions physiologiques

La mobilité des cellules dans l'organisme est essentielle. Dès le développement embryonnaire, des mouvements de groupes de cellules donnent sa forme à l'organisme et permettent la création des différents organes. Chez l'adulte, de nombreux types cellulaires sont mobiles : des mouvements de neurones permettent la formation de synapses, la contraction des cellules musculaires permet à l'organisme de bouger, la migration des cellules immunitaires permet la destruction de pathogènes, et même des cellules initialement non mobiles peuvent migrer en cas de blessure pour réparer le tissu qu'elles constituent. Tous ces différents types cellulaires ont des formes différentes qui s'adaptent selon leur fonction et leur environnement.

Les différentes architectures et mouvements cellulaires reposent majoritairement sur le cytosquelette d'actine. Ils sont médiés par l'assemblage et désassemblage des microfilaments qui forment différentes structures dans la cellule. Nous citerons ci-après les lamellipodes, les filopodes, les fibres de stress et le cortex cellulaire. La formation de ces structures a lieu en réponse à des stimuli externes auxquels la cellule doit s'adapter, c'est pourquoi le cytosquelette a aussi un rôle de transduction de signaux. En plus de ces fonctions, le cytosquelette d'actine est essentiel pendant la mitose car il forme l'anneau de cytokinèse. Les microfilaments d'actine et leur dynamique sont régulés par un groupe de protéines de liaison à l'actine (ABP : *Actin Binding Proteins*) (Blanchoin et al., 2014; Revenu et al., 2004).

### 1.2.2. Fonctions dans les pathologies

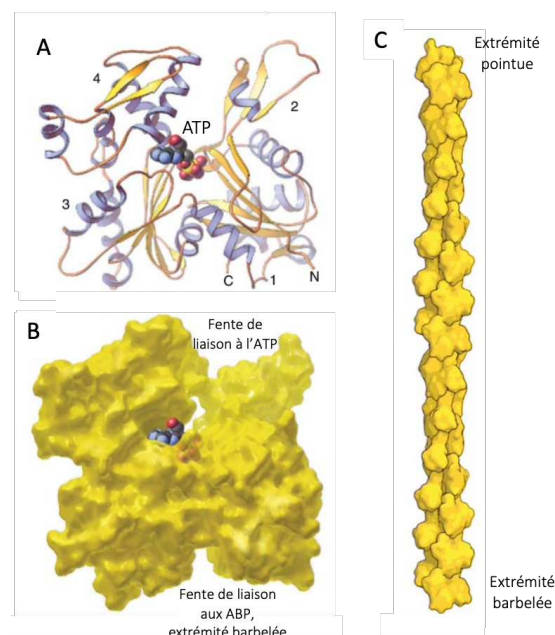
De par ses fonctions, toute anomalie dans le cytosquelette d'actine ou dans ses régulateurs altère fondamentalement les cellules. Les dysfonctionnements du cytosquelette d'actine sont retrouvés dans de nombreuses pathologies. L'altération de migration des cellules immunitaires génère des immunodéficiences. Des mutations dans le gène de l' $\alpha$ -actine provoquent des myopathies. Le cytosquelette peut aussi être détourné par la bactérie *Listeria monocytogenes* lors d'une infection, ce qui facilite la survie du pathogène. Enfin, le cytosquelette d'actine est souvent impacté dans les cancers où la migration et l'invasion cellulaire sont associées à l'apparition de métastases. Il impacte aussi la rigidité et la contractilité des cellules tumorales, deux propriétés qui ont été associées à l'agressivité tumorale.

## 1.3. Formation des microfilaments

### 1.3.1. Le monomère d'actine

Chez l'Homme, 3 isoformes d'actine existent : l' $\alpha$ -actine est présente dans les muscles squelettiques, cardiaques et lisses, la  $\beta$ -actine dans les cellules non musculaires, et la  $\gamma$ -actine dans les cellules musculaires et non musculaires. Ils sont respectivement codés par 3 gènes (*ACTA1*, *ACTC1*, *ACTA2*), 1 gène (*ACTB*) et 2 gènes (*ACTG1*, *ACTG2*). Les monomères d'actine sont des protéines d'environ 45 kDa, et sont à la base de la formation en hélice des filaments d'actine. Les isoformes diffèrent entre eux de seulement quelques acides aminés à leur extrémité N-terminale. Cette petite différence semble être suffisante pour leur conférer des spécificités en termes de localisation subcellulaire et d'interaction avec les ABP. C'est la composition entre les isoformes d'actine qui permet d'assurer les fonctions du cytosquelette dans les différents types cellulaires (Herman, 1993; Perrin and Ervasti, 2010).

L'actine est décrite comme une protéine de 375 acides aminés dont la forme tridimensionnelle est plutôt plate. Elle est composée de deux domaines principaux notés  $\alpha$  et  $\beta$ , communément appelés domaines interne et externe à cause de leur positionnement dans le filament. Deux fentes existent entre ces domaines. La fente supérieure permet la fixation d'ATP et d'un cation divalent ( $Mg^{2+}$  dans les cellules) qui stabilise son interaction avec la protéine. La fente inférieure, dite « fente de liaison à des cibles » (*target-binding cleft*) est un site de liaison majeur aux ABP. Toutefois la nomenclature actuelle considère 4 sous-domaines notés 1 à 4 (Figure 9A, B) (Dominguez, 2004; Pollard, 2016).



**Figure 9 : Structure des molécules d'actine et du filament d'actine.** (A, B) Représentations 3D d'une molécule d'actine liée à l'ATP. Les 4 sous-domaines sont notés 1, 2, 3 et 4. N : extrémité amino-terminale, C : extrémité carboxy-terminale. (C) Reconstitution d'un filament d'actine montrant le positionnement des extrémités barbelée et pointue. Modifié d'après Pollard, 2016.

### 1.3.2. Assemblage du polymère

Le monomère d'actine est communément appelé actine G pour actine globulaire et le polymère est appelé actine F pour filamenteuse. En conditions physiologiques, l'actine G polymérise

spontanément. La polymérisation du filament d'actine est décrite en deux grandes étapes : la nucléation et l'élongation. La première est lente et énergétiquement défavorable, la seconde est beaucoup plus rapide. La nucléation consiste en l'assemblage d'un dimère puis l'addition d'une troisième sous-unité. Les dimères et trimères d'actine sont très instables. C'est après l'addition d'une quatrième sous-unité que le polymère prend une forme hélicoïdale et devient stable : la phase d'élongation commence. A l'addition d'un monomère, l'ATP lié à celui-ci est hydrolysé en ADP de manière irréversible.

Le filament d'actine est une double hélice polarisée. Concrètement, son élongation a lieu de manière rapide à l'extrémité positive (+), appelée extrémité « barbée » (*barbed end*) alors qu'il se dissocie à l'extrémité négative (-) appelée « pointue » (*pointed end*) (Figure 9C). En termes de structure, la fente de liaison aux ABP est à l'extrémité + tandis que la fente de liaison à l'ATP est à l'extrémité -. Ceci justifie le fait que l'extrémité barbée soit plus affine pour fixer un nouveau monomère lié à l'ATP. Finalement, la dynamique entre les deux extrémités du filament d'actine crée un effet de tapis roulant (*treadmilling*) qui est notamment à l'origine de mouvements cellulaires.

### 1.3.3. Les nucléateurs de l'actine

L'initiation de la polymérisation de l'actine, ou nucléation, est thermodynamiquement défavorable. Elle nécessite donc l'action d'autres protéines. C'est le rôle du complexe **Arp2/3** qui contient deux protéines « apparentées à l'actine » et qui fournit une matrice à laquelle les monomères d'actine peuvent s'ajouter. Arp2/3 produit un réseau de courts filaments ramifiés appelés actine branchée. Il nécessite d'être activé par des activateurs de nucléation. Les plus importants sont les *Wiskott–Aldrich syndrome protein*, parmi lesquels on trouve **WASp** et **WAVE**. La nucléation est aussi assurée grâce aux **formines** (dont fait partie mDia). Celles-ci protègent l'extrémité du filament et l'ancrent à la membrane. Elles produisent des filaments longs, non ramifiés.

### 1.3.4. Les protéines de liaison à l'actine

Dans les cellules, environ la moitié de l'actine totale est polymérisée et les filaments sont assemblés et désassemblés en dizaines de secondes. Cette dynamique est dirigée grâce aux protéines de liaison à l'actine (ABP). Les ABP agissent à tous les niveaux de la polymérisation des filaments d'actine (Figure 10). Certaines maintiennent un pool de monomères d'actine disponibles pour être polymérisés, c'est le cas des **thymosines**. D'autres protéines favorisent l'élongation du filament, comme la **profiline** qui est recrutée par les formines, et qui se fixe à un monomère pour catalyser son accrochage à un polymère en formation. Les protéines **Ena/VASP** (*Vasodilator-Stimulated Protein*) agissent aussi dans l'élongation en protégeant l'extrémité du filament d'actine et en l'encrant à la

membrane. Cette action est similaire à celle des formines, mais Ena/VASP ne peut pas « nucléer » l'actine. La longueur d'un filament d'actine est contrôlée par des protéines de coiffe qui se fixent aux extrémités pour stopper les réactions de polymérisation et de dépolymérisation. Des protéines de dépolymérisation existent comme la **cofiline** qui se fixe à l'extrémité pointue pour favoriser la fragmentation et le désassemblage des monomères. Certaines ABP peuvent servir de liaison entre deux filaments et modifient alors la structure tridimensionnelle d'une population de filaments d'actine. Ces protéines possèdent au moins deux sites de liaison à l'actine et servent de « pont » entre deux filaments. L' **$\alpha$ -actinine** et la **filamine** par exemple, créent des maillages d'actine branchée. Ceux-ci sont par ailleurs stabilisés par la **cortactine**. La **fascin** quant à elle, génère un assemblage en faisceaux. Enfin, la **myosine**, protéine « moteur », permet le déplacement de vésicules le long des microfilaments et, dans certaines cellules, elle permet aux filaments d'actine, via l'hydrolyse de l'ATP, d'exercer une force de contraction. Le complexe formé entre la myosine et l'actine est appelé **actomyosine** (Karp, 2010; Pollard, 2016).

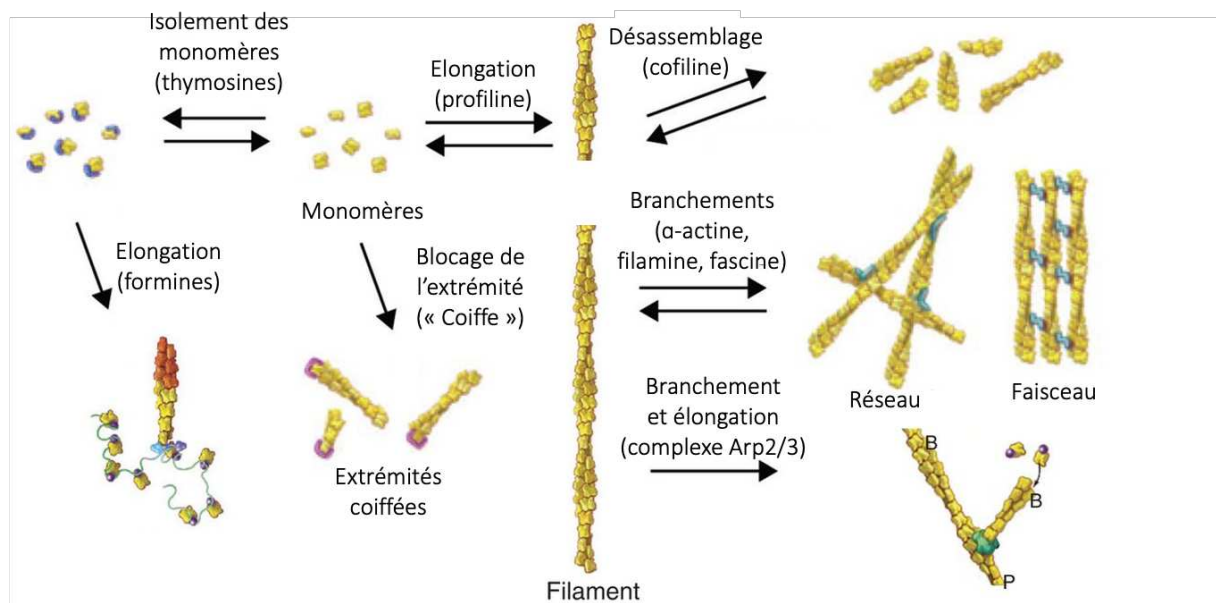


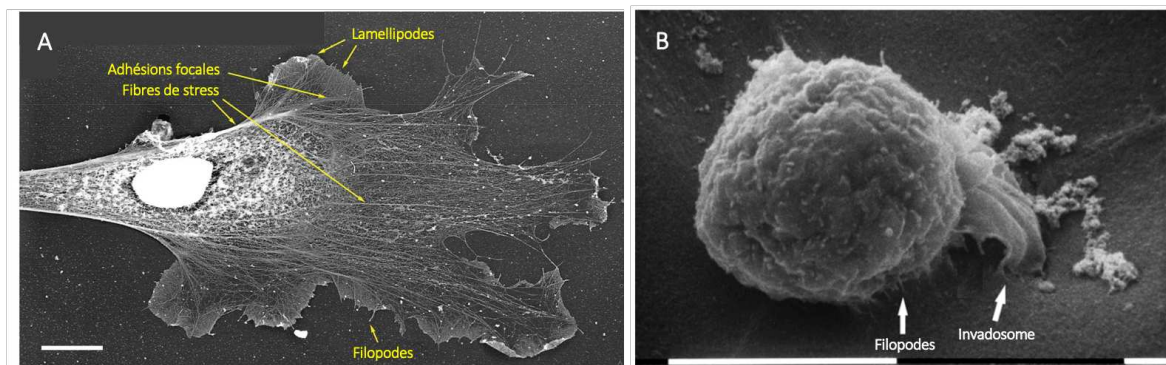
Figure 10 : Vue globale des différents types de protéines de liaison à l'actine. Modifié d'après Pollard, 2016.

## 2. Les architectures du réseau d'actine

### 2.1. Les structures d'actine dans la cellule

Nous avons détaillé jusqu'ici la fonction et les composants du cytosquelette d'actine. Pour comprendre leur fonctionnement, il est important de comprendre les différentes architectures qu'adopte ce réseau d'actine. Nous nous concentrerons ici sur les structures liées à la migration et à l'invasion.

La mobilité d'une cellule a lieu grâce à la formation de protrusions d'actine à l'avant de la cellule selon la direction de migration, suivie de l'adhésion au substrat. L'arrière de la cellule devra subir des événements inverses de perte d'adhésion et contractilité cellulaire. La cellule s'est ainsi déplacée. Dans des conditions physiologiques en 3 dimensions, la cellule a besoin de dégrader la matrice extracellulaire pour se frayer un chemin au travers des tissus. Ces phénomènes ont lieu grâce à des architectures du réseau d'actine au niveau subcellulaire. Nous décrivons ici les lamellipodes et les filopodes qui gouvernent la migration, les invadosomes qui permettent l'invasion, ainsi que les fibres de stress et le cortex qui permettent à la cellule d'être mécaniquement stable et confèrent sa contractilité. Des images de cellules possédant ces différents types d'architectures sont présentées sur la Figure 11.

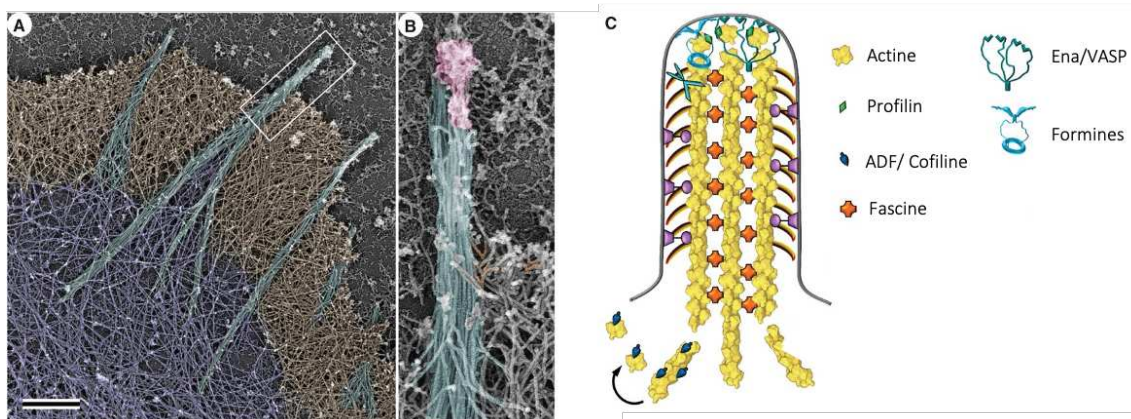


**Figure 11 : Structures du cytosquelette d'actine dans des cellules en cours de migration et d'invasion.** (A) Image de microscopie électronique du cytosquelette d'un fibroblaste de *Xenopus laevis* en migration. Modifié d'après Svitkina, 2018. (B) Image de microscopie électronique à balayage de cellule MDA-MB-231 (cancer du sein) en cours d'invasion. La cellule est en culture 3D sur un filtre millipore recouvert de matrigel. Modifié d'après Franchi et al., 2020. Les structures d'actine sont notées sur les images. Barres d'échelle : 10 $\mu$ M.

## 2.2. Migration cellulaire : filopodes et lamellipodes

### 2.2.1. Les filopodes

Les filopodes sont de fines projections composées d'un groupe de filaments d'actine parallèles les uns aux autres (Figure 12). L'extrémité positive du filament d'actine se trouve vers la membrane plasmique. Cette orientation est due à la présence de la formine et des protéines Ena/VASP qui favorisent le maintien de l'extrémité barbée au niveau de la membrane ainsi que l'élongation des filaments (Homem and Peifer, 2009; Svitkina et al., 2003). La principale protéine de liaison qui permet de former le faisceau de filaments parallèles dans le filopode est la fascine (Vignjevic et al., 2006). De par leur finesse, ces structures ne confèrent pas une grande force de migration. Elles ont un rôle sensitif permettant à la cellule d'établir un contact avec l'environnement. Les filopodes peuvent guider la migration de la cellule en explorant l'environnement, ou créer des connexions avec d'autres cellules voisines (Mattila and Lappalainen, 2008).

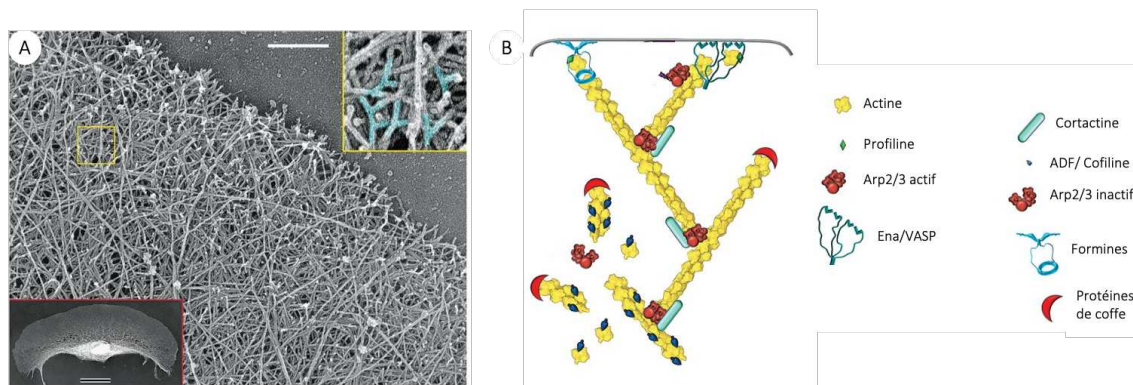


**Figure 12 : Organisation des filopodes.** (A) Image de microscopie électronique à transmission du cytosquelette à l'avant d'une cellule de mélanome de souris en culture. Les faisceaux d'actine (cyan) qui forment le filopode s'étendent à l'avant de la cellule, traversent l'actine branchée du lamellipode (marron), et sont parfois reliés au cytosquelette du reste du cytoplasme (violet). Barre d'échelle : 1mm. (B) Zoom sur une portion de l'image A montrant les filaments d'actine parallèles (cyan) et un complexe de protéine régulatrices (rose) du filopode. (C) Illustration de l'organisation moléculaire du filopode. La fonction de chacune des protéines est indiquée dans le texte. Modifié d'après Svitkina, 2018.

### 2.2.2. Les lamellipodes

Les lamellipodes sont des structures plus complexes car ramifiées (Figure 13). Il s'agit de projections décrites comme plates, plus épaisses que les filopodes. L'apparition d'un lamellipode a lieu grâce au complexe Arp2/3 qui est activé par un facteur de nucléation, le complexe WAVE. Ce dernier nécessite une activation par la RhoGTPase Rac1. Dans le cas du lamellipode, l'initiation d'un nouveau filament grâce à Arp2/3 a lieu à partir du côté d'un filament déjà formé avec un angle de 70°C entre

les deux filaments (Mullins et al., 1998). Les branchements créés par Arp2/3 sont stabilisés grâce à la cortactine (Weaver et al., 2001). Les filaments ne sont donc pas tous orientés vers la membrane en croissance comme dans le filopode, mais il est proposé que les facteurs formine et Ena/VASP agissent ici pour maintenir l'orientation de la protrusion (Blanchoin et al., 2014). Les lamellipodes sont responsables de la migration cellulaire. De par leur épaisseur et leur composition en actine branchée, ils sont vecteurs de force. Ils permettent l'attachement de la cellule, ainsi que de la tirer vers l'avant. Cette force motrice se fait grâce à la myosine. Elle permet par ailleurs d'augmenter la dynamique des filaments d'actine dans le lamellipode en augmentant leur désassemblage (Wilson et al., 2010).



**Figure 13 : Organisation des filaments d'actine dans un lamellipode.** (A) Images de microscopie électronique à transmission montrant l'organisation d'un lamellipode dans un kératinocyte de poisson. L'image en bas à gauche montre la cellule entière en migration. Barres d'échelle : 500nm (image principale), 10  $\mu$ m (image du bas). (B) Illustration de l'organisation moléculaire d'un réseau d'actine branchée. La fonction de chacune des protéines est expliquée dans le texte. Modifié d'après Svitkina, 2018.

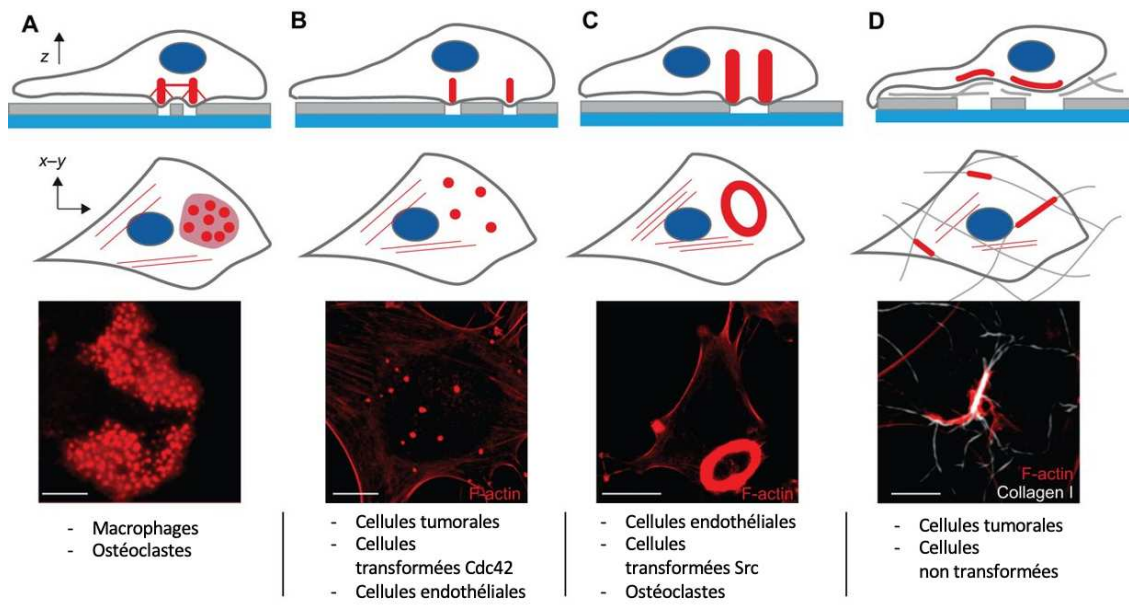
## 2.3. Invasion cellulaire : invadosomes

### 2.3.1. Podosomes, invadopodes, invadosomes

Les podosomes sont de petites protrusions (0.4  $\mu$ m de long) créées aux points de contact entre la cellule et la matrice extracellulaire (MEC). Ils sont constitués d'un réseau de filaments d'actine en colonnes qui entourent une petite invagination tubulaire et perpendiculaire à la membrane plasmique. On parle de structure en anneau. Ce sont des structures adhésives qui fournissent un point d'ancrage à la cellule dans la MEC. A l'intérieur de l'anneau, des protéines de dégradation de la matrice peuvent être sécrétées. En parallèle, les invadopodes ont été décrits comme des structures de taille plus importante (jusqu'à plusieurs  $\mu$ m de long), aussi associées à la dégradation de la MEC, plutôt présentes dans les cellules tumorales. Les différents types cellulaires peuvent présenter des structures d'invasion de tailles et formes variées (Figure 14). Certaines structures sont à la limite entre les podosomes et les



invadosomes, et la frontière entre les deux types de structures s'est troublée jusqu'à ce qu'elles soient regroupées sous le nom d'invadosomes (Linder et al., 2022).

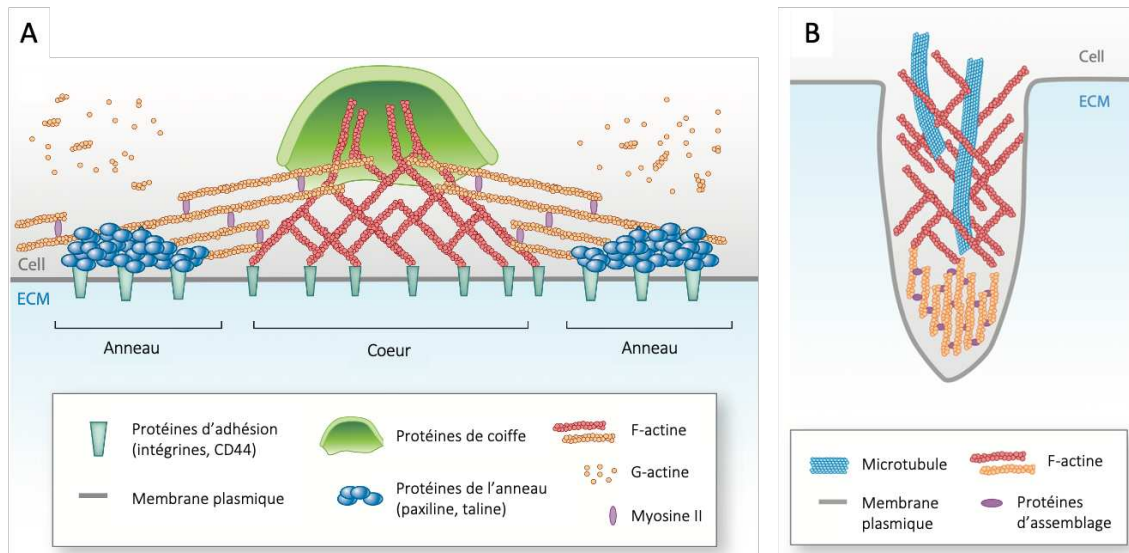


**Figure 14 : Différentes organisations des invadosomes.** Représentation schématique des différentes organisations d'invadosomes selon l'orientation en z et x-y (haut), associée à des images de microscopie confocale représentatives et aux types cellulaires concernés (bas). (A) Invadosomes en agrégats. (B) Invadosomes en points. (C) Invadosomes en rosettes. (D) Invadosomes linéaires (rouge) formés le long de fibres de collagène I (blanc). Barres d'échelle : 10µM. Modifié d'après (Di Martino et al., 2016).

### 2.3.2. Formation et composantes des invadosomes

Les invadosomes apparaissent au niveau de sites où la contractilité liée à l'actomyosine est réduite, via une régulation négative de la RhoGTPase RhoA (Kaverina et al., 2003). Ils sont induits par la présence de récepteurs que sont les intégrines dans le cas des structures en anneau. Des invadosomes existent aussi sous forme linéaire, induits par le collagène fibrillaire de type I, dans lesquels on ne retrouve pas d'intégrines mais des récepteurs à domaine discoidine (DDR) (Juin et al., 2012). Si les ABP qui interviennent dans l'apparition des invadosomes varient selon les types cellulaires, certains événements comme la signalisation des kinases Src et Pi3K ainsi que le recrutement de la protéine adaptatrice Tks5 arrivent tôt dans le processus (Hoshino et al., 2013; Seals et al., 2005). Les filaments d'actine  $\gamma$  existent sous deux formes (Figure 15). Le cœur de l'invadosome est constitué d'actine branchée qui croît grâce à Arp2/3 activée ici par N-WASP, lui-même activé par la RhoGTPase Cdc42. La dynamique de l'invadosome est médiée par la cortactine qui stabilise la structure, et la cofiline qui génère la dépolymérisation. L'anneau du podosome est constitué de faisceaux parallèles d'actine. Cette structure cœur-anneau est moins définie dans les invadopodes où c'est plutôt la pointe de la structure qui est composée d'actine linéaire. Ces filaments d'actine

parallèles sont initiés et allongés respectivement grâce à la formine et à la fascine. L'activité de dégradation a lieu grâce au recrutement de métalloprotéases (MMP) à la membrane plasmique. Comme les autres structures d'actine, les invadosomes subissent une dynamique et ne persistent en général pas plus d'une heure (Linder et al., 2022).



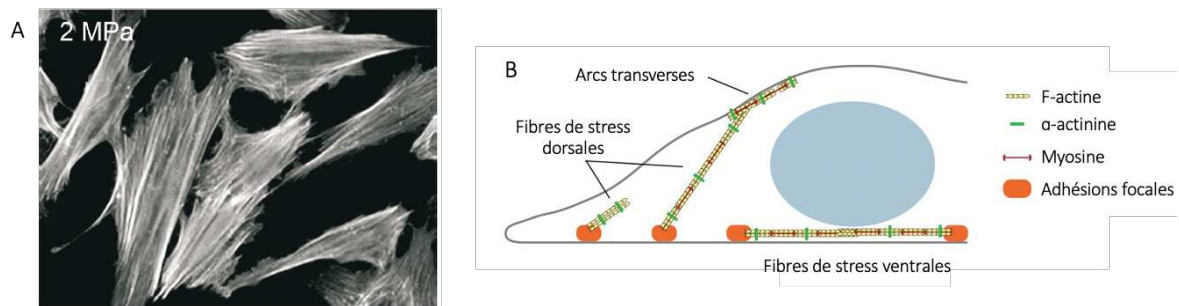
**Figure 15 : Structure d'un podosome et d'un invadopode.** (A) Schématisation d'un podosome. Le cœur de F-actine (rouge) est entouré d'un anneau contenant des protéines d'adhésion (bleu). (B) Schématisation d'un invadopode qui forme une protrusion dans la matrice extracellulaire où l'organisation cœur/anneau est moins définie. Figure modifiée d'après Linder et al., 2011.

## 2.4. Contractilité cellulaire : fibres de stress et cortex

### 2.4.1. Les fibres de stress

Les fibres de stress ne sont pas situées au niveau de la membrane plasmique, mais « traversent » la cellule (Figure 16). Elles sont constituées de faisceaux d'actine anti-parallèle et associées à la myosine II qui leur confère des propriétés contractiles (Naumanen et al., 2008). Les fibres de stress dirigées vers le front de migration sont dites ventrales, auquel cas elles lient des sites d'adhésion focale (sites qui connectent la cellule au substrat). Les fibres de stress qui constituent les arcs transverses sont situées juste derrière les branchements des lamellipodes et ne sont pas ancrées aux sites d'adhésion. Il existe aussi des fibres de stress dites dorsales, mais celles-ci n'ont pas de propriétés contractiles. Dans les cellules non mobiles, les fibres de stress sont généralement épaisses et stables alors qu'elles sont moins nombreuses et plus minces dans les cellules en migration (Pellegrin and Mellor, 2007).

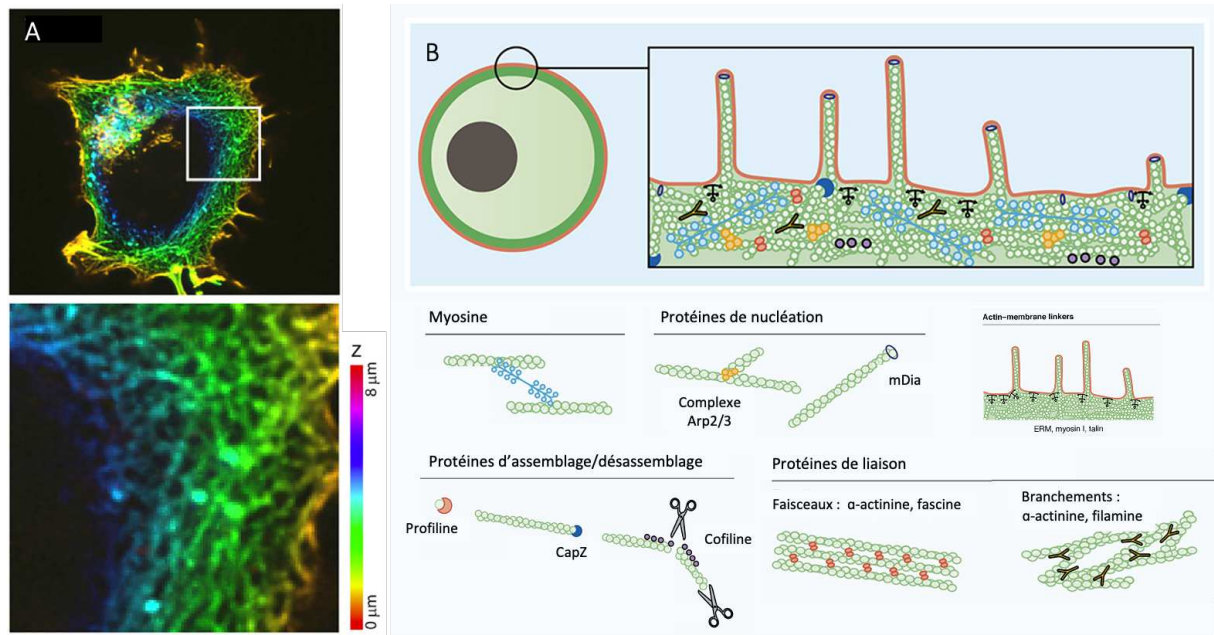
La formation des fibres de stress a été directement associée à la forme mDia1 et à ROCK, activés par la RhoGTPase RhoA (Leung et al., 1996; Watanabe, 1997). Dans cette formation, l' $\alpha$ -actinine joue non seulement un rôle de protéine de pontage pour stabiliser le faisceau, mais elle peut aussi fonctionner comme un médiateur de signaux (Vallénus et al., 2000). Les différents types de fibres de stress peuvent varier en termes de morphologie et de signature moléculaire. Quoiqu'il en soit, toutes sont dépendantes de l'activité de la myosine et une inhibition de celle-ci génère un désassemblage des fibres de stress (Burrige and Guilly, 2016).



**Figure 16 : Organisation des fibres de stress.** (A) Fibroblastes en culture sur un support rigide (2 MPa) ayant développé des fibres de stress épaisses et alignées. D'après Tojkander et al., 2012. (B) Illustration des différents types de fibres de stress et de leur organisation dans la cellule. La fonction des protéines représentées est décrite dans le texte. Modifié d'après Pellegrin and Mellor, 2007.

#### 2.4.2. Le cortex d'actine

Le cortex d'actine est une structure contractile située en bordure de la membrane plasmique (Figure 17). Il mesure quelques centaines de nanomètres d'épaisseur (Eghiaian et al., 2015). Il est constitué d'un mélange de filaments en faisceaux et branchés, avec des filaments orientés parallèlement et perpendiculairement à la membrane. Le cortex peut être régulé par de nombreuses ABP citées dans les parties précédentes. Parmi celles-ci, les plus importantes dans la formation du cortex sont Arp2/3 et mDia (Bovellan et al., 2014). La structure est liée à la membrane plasmique par les protéines de la famille ERM (Ezrin, Radixin, Moesin). Une fois formé, le cortex confère sa forme et sa rigidité à la cellule. Sa dynamique est donc essentielle dans les changements de conformation liés à la migration (Hohmann and Dehghani, 2019).



**Figure 17 : Structure du cortex cellulaire.** (A) Image de microscopie à super résolution du cortex de cellules embryonnaires de souris. D'après Xia et al., 2019. (B) Représentation schématique de l'organisation du cortex cellulaire. D'après Chugh and Paluch, 2018.

### 3. Les RhoGTPases

Dans la partie précédente, toutes les architectures d'actine étaient associées à des ABP. Ces complexes structuraux sont eux-mêmes régulés par des protéines de la famille des RhoGTPases : nous avons cité plus haut Rac1, RhoA, et Cdc42. La présente partie aura pour objet de décrire cette famille de protéines qui est d'une importance capitale pour le fonctionnement du cytosquelette d'actine dans la cellule.

#### 3.1. Présentation des RhoGTPases

##### 3.1.1. De la famille Ras aux RhoGTPases

Suite à l'identification de *HRAS* (homologue de *Harvey Rat sarcoma virus*) et *KRAS* (homologue de *Kirsten rat sarcoma virus*) dans les années 1960, les gènes de la famille RAS ont été établis comme les premiers gènes impliqués dans les cancers en 1982 (Der et al., 1982; Parada et al., 1982; Santos et al., 1982). C'est en 1985 que les gènes *RHO* sont mis en évidence et décrits comme partageant plusieurs propriétés avec les RAS, d'où leur nom de *RAS Homologous*, abrégé en RHO (Madaule and Axel, 1985).

Aujourd'hui, les protéines Rho sont une branche majeure de la superfamille des petites GTPases RAS (Wennerberg et al., 2005). La famille Rho contient 20 gènes qui codent pour 22 protéines (Figure 18). Parmi celles-ci, les plus étudiées sont RhoA, Rac1 et Cdc42 que nous avons déjà citées et qui ont une activité considérée comme classique. D'autres RhoGTPases sont plus atypiques concernant leur activité GTPasique : c'est le cas des protéines Rnd ainsi que RhoBT1 et 2, RhoH, RhoU et RhoV.

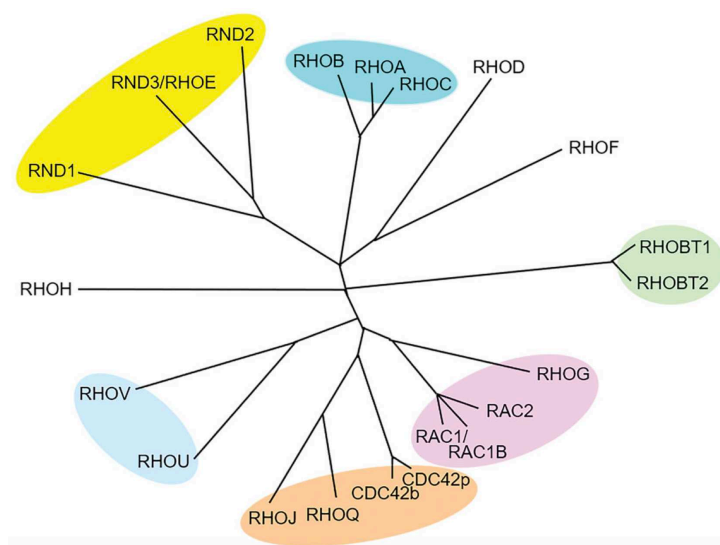


Figure 18 : Membres de la famille des RhoGTPases chez l'Homme. D'après Hodge et al., 2020.

### 3.1.2. Structure des RhoGTPases

Les membres de la famille des RhoGTPases possèdent une forte homologie quant à leur structure et leur séquence. Ce sont des protéines monomériques d'environ 21 à 25 KDa.

En termes de structure, la signature des RhoGTPases est le domaine G qui permet la liaison et l'hydrolyse du nucléotide Guanine (Figure 19). Ce domaine est de 20 KDa et il constitue l'essentiel de la structure des protéines. Il est composé de 6 feuillets  $\beta$  entourés de 5 hélices  $\alpha$ . Il est caractérisé par la présence de motifs conservés notés G1 à G5 de l'extrémité N- vers l'extrémité C-terminale. Le motif G1, aussi appelé P-loop, permet l'interaction avec les phosphates  $\beta$  et  $\gamma$  du nucléotide. Les motifs G2 et G3 sont compris dans les régions Switch I et Switch II. Ils lient le groupement phosphate en  $\gamma$  du GTP ou GDP, et les domaines switch changeront alors la conformation de la protéine selon la nature du nucléotide. Ce changement de conformation donne l'état d'activation de la GTPase. Du côté C-terminal, les motifs G4 et G5 stabilisent la liaison du nucléotide. Les séquences des motifs G sont indiquées sur la Figure 19. Entre les motifs G4 et G5, une « région insert » étend le domaine G et est spécifique de la famille RhoGTPases. Enfin, l'extrémité C-terminale des RhoGTPases est décrite comme hypervariable et comprend une « boîte CAAX » nécessaire à la localisation subcellulaire de la protéine (Bourne et al., 1991; Schaefer et al., 2014).

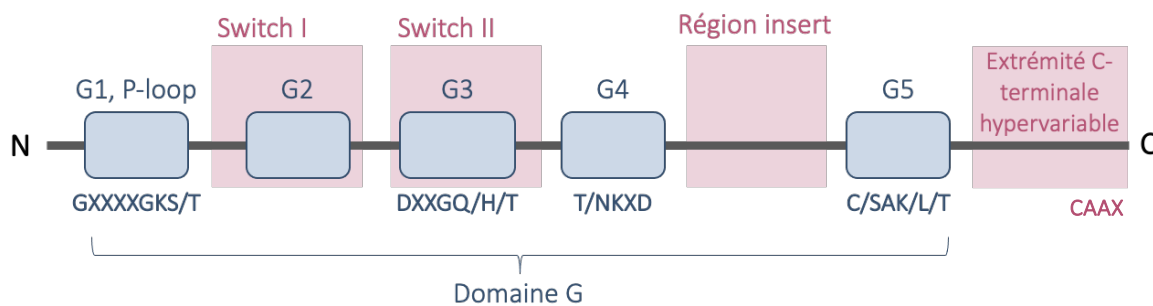
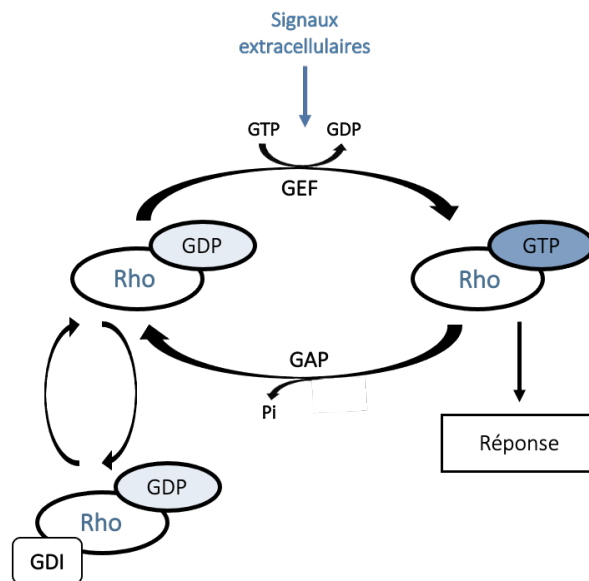


Figure 19 : Représentation des différents domaines le long de la séquence d'une RhoGTPase. La protéine est représentée de sa région N- à C-terminale. Les motifs du domaine G sont représentés en bleu, leurs séquences constantes sont annotées sous chacune d'elles. Les autres régions structurant la protéine sont représentées en rose.

### 3.1.3. Activité GTPasique

Nous avons vu que le cœur de la structure des RhoGTPases consiste en un domaine G capable de lier le nucléotide Guanine. Il est maintenant compréhensible que l'activité des RhoGTPases soit, comme leur nom l'indique, l'hydrolyse du Guanosine Tri-Phosphate (GTP) en Guanosine Di-Phosphate (GDP). Elles sont considérées comme de véritables « interrupteurs moléculaires » vis-à-vis de la signalisation cellulaire. En effet, elles oscillent entre un état actif lié au GTP et un état inactif lié au GDP

(Figure 20). C'est sous leur état actif qu'elles peuvent effectuer leur fonction de régulatrices auprès de leurs protéines effectrices. Les RhoGTPases classiques sont majoritairement retrouvées sous un état inactif lié au GDP dans les cellules. En revanche, les RhoGTPases atypiques citées plus haut sont retrouvées liées au GTP et donc constitutivement actives. Le fait qu'elles soient considérées comme ayant une activité GTPasique est par ailleurs remis en question (Jaffe and Hall, 2005). Quoi qu'il en soit, pour que leur activité ait lieu de manière correcte, elle nécessite d'être régulée. C'est le rôle des protéines GEF, GAP et GDI que nous aborderons dans la partie suivante.



**Figure 20 : Le cycle des RhoGTPases.** Les RhoGTPases cyclent entre un état actif lié au GTP et un état inactif lié au GDP. Leur activité est régulée par les familles des GEF, des GAP et des GDI. Une RhoGTPase liée au GTP peut interagir avec ses effecteurs pour médier une réponse.

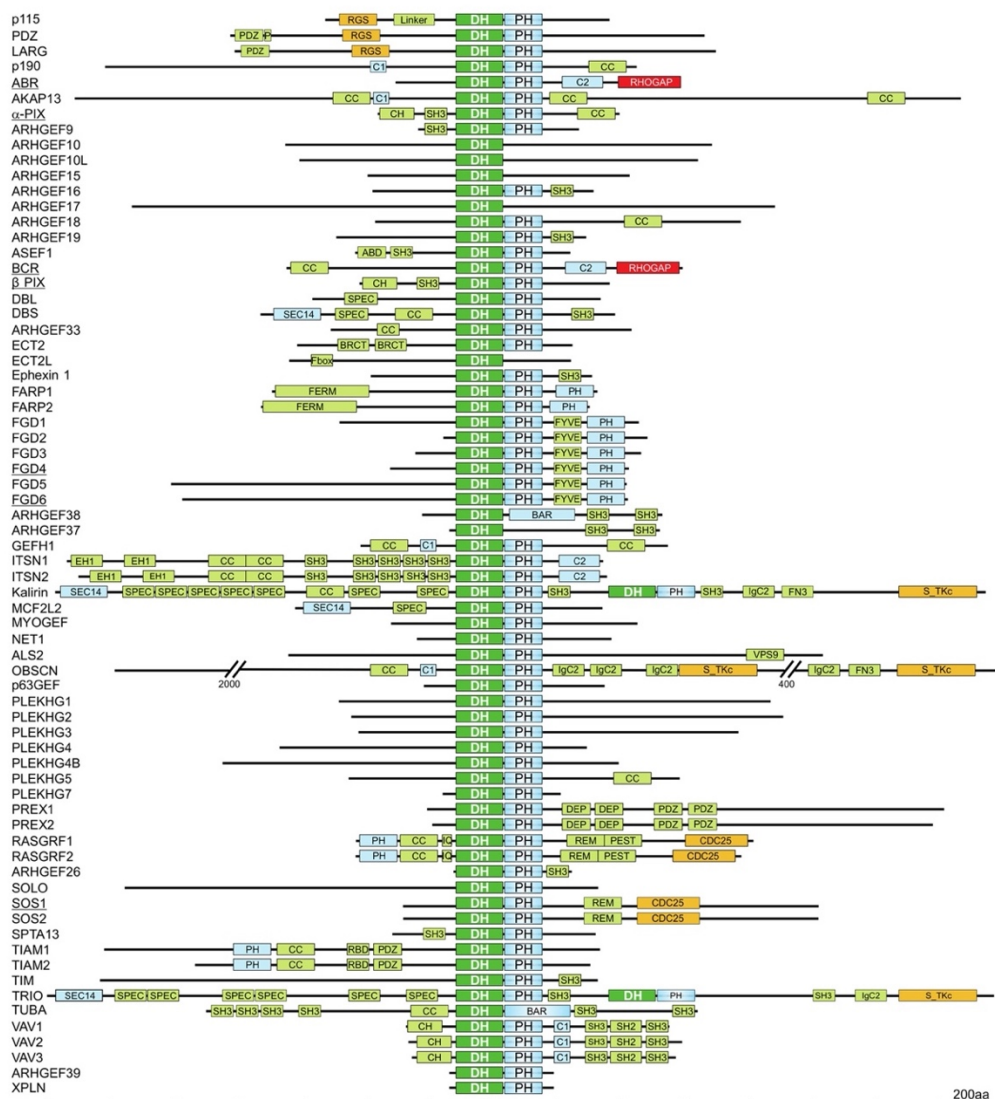
### 3.2. Les régulateurs des RhoGTPases

#### 3.2.1. Les GEF

Les RhoGTPases étant majoritairement présentes dans la cellule sous leur forme inactive liée au GDP, il est nécessaire que des protéines régulatrices « aident » l'échange de GDP en GTP. C'est le rôle des protéines de la famille GEF (*Guanine Nucleotide Exchange Factors*). Ces protéines catalysent l'échange en réduisant l'affinité de la RhoGTPase pour le GDP. Le GDP est alors décroché de la RhoGTPase et peut être remplacé par du GTP. Ce mécanisme repose sur le fait qu'une fois le GDP décroché, les RhoGTPases ont plus d'affinité pour le GTP que pour la GEF et se sépareront de la seconde en se liant à la première.

Les protéines GEF sont classées en deux sous-familles selon leur structure : DBL (*Diffuse B-cell Lymphoma*) et DOCK (*Dedicator of Cytokinesis*). Les GEF DBL activent directement les RhoGTPases.

Elles sont constituées d'un domaine DH-PH pour « *DBL Homology domain* » suivi d'un « *Pleckstrin Homology domain* ». Le domaine DH est un domaine catalytique très efficace qui augmente jusqu'à  $10^7$  fois l'échange de nucléotide sur la RhoGTPase. Le domaine PH quant à lui dirige la GEF vers ses GTPases qui se trouvent à la membrane. En dehors de ces deux domaines, les GEF sont une famille très diverse de protéines comme l'illustre la Figure 21. La famille des DOCK active spécifiquement Rac1 et Cdc42. Elle est composée de 11 membres qui comportent deux domaines conservés (Figure 22). Le DHR-1 (*DOCK homology region 1*) facilite la localisation de la DOCK au niveau des compartiments membranaires et le DHR-2 (*DOCK homology region 2*) catalyse l'échange du GDP en GTP (Cook et al., 2014; Laurin and Côté, 2014; Mosaddeghzadeh and Ahmadian, 2021).



**Figure 21 : Organisation des domaines de la famille des protéines GEF-DBL chez l'Homme.** Le domaine commun DH est indiqué en vert et le domaine PH en bleu. Les domaines indiqués en vert clair sont impliqués dans les interactions avec d'autres protéines, et ceux en rouge et en orange dans des activités enzymatiques. L'échelle au bas de la figure représente les acides aminés avec des incréments de 200. D'après Mosaddeghzadeh and Ahmadian, 2021.



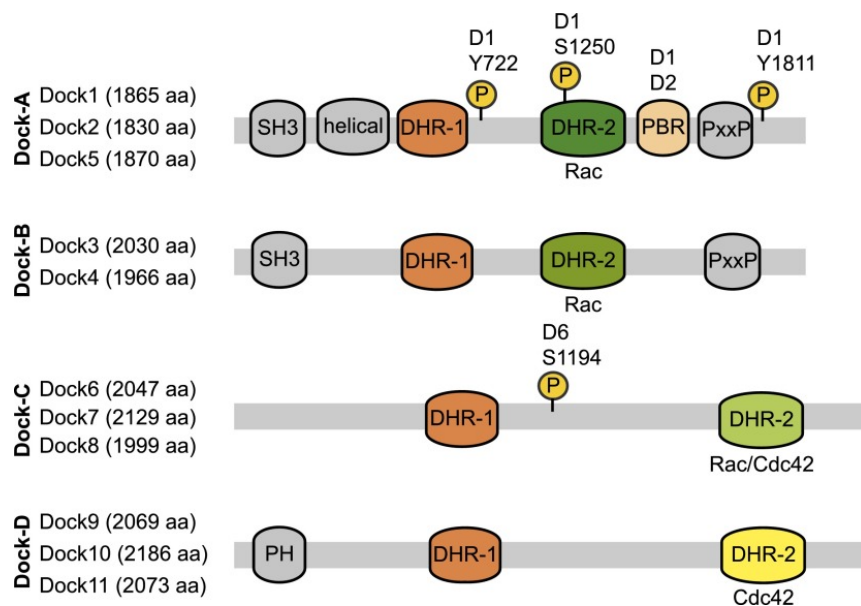


Figure 22 : Organisation des domaines de la famille des protéines GEF-DOCK chez l'Homme. Les protéines DOCK sont subdivisées en 4 sous-familles. Elles possèdent deux domaines conservés DHR-1 et DHR-2. Sur les sous-familles Dock-A/B, le domaine SH3 (N-terminal) médie leur interaction avec les protéines de structures Elmo. Le domaine PxxP quant à lui coordonne l'interaction avec des protéines adaptatrices contenant un domaine SH3 (Crk, Grb2). Les membres de la sous-famille Dock-D ont un domaine PH (N-terminal) qui permet leur translocation à la membrane plasmique. Les phosphorylations qui ont lieu sur ces protéines sont représentées en jaune. Figure d'après Laurin and Côté, 2014.

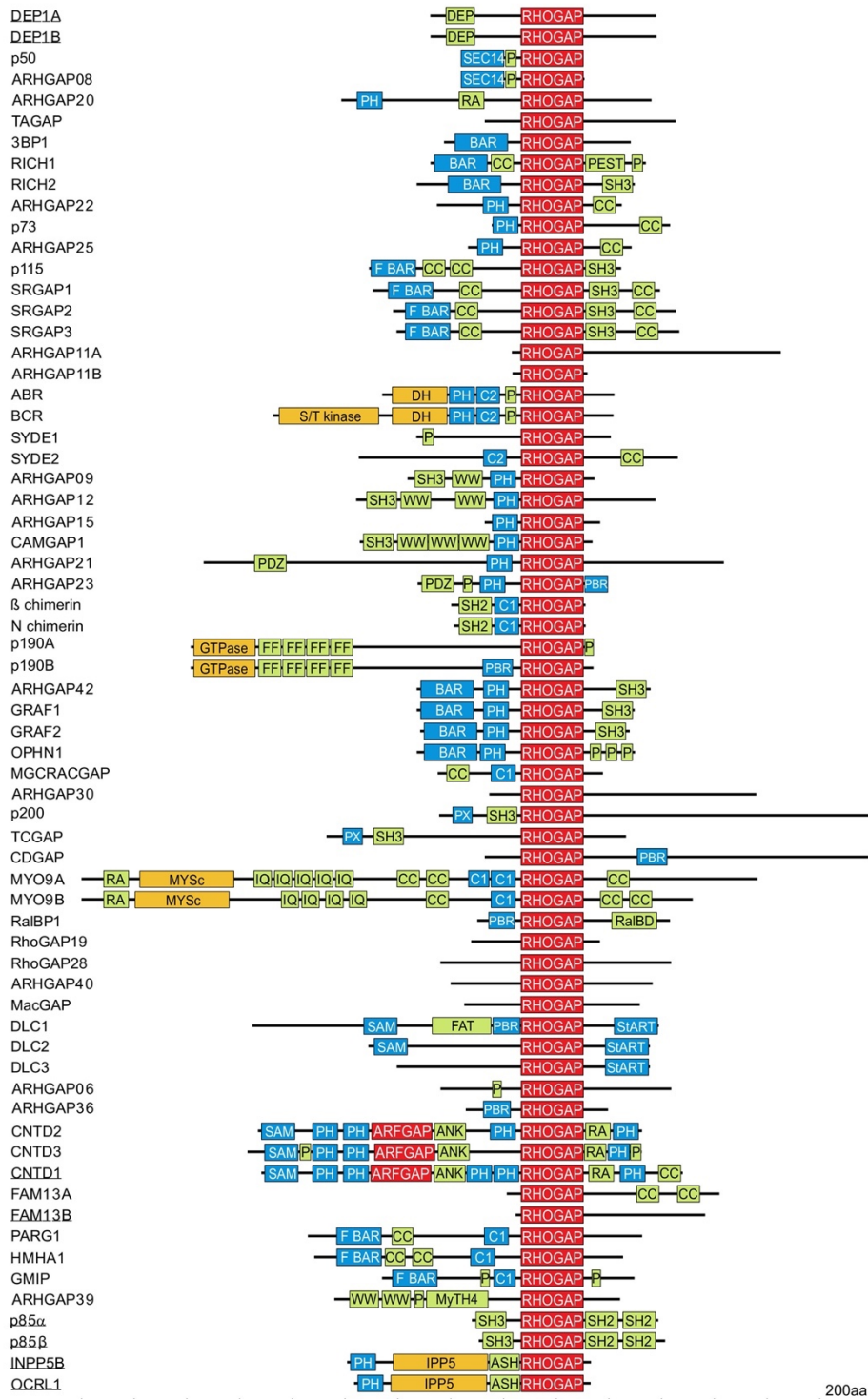
### 3.2.2. Les GAP

L'hydrolyse du GTP est une action lente pour la RhoGTPase afin de retourner à son état inactif. Cette activité peut être catalysée par la présence des protéines GAP.

Les membres de la famille des GAP possèdent un domaine GAP conservé de 150 résidus qui leur permet de se lier aux protéines Rho associées au GTP et stimule l'hydrolyse du GTP (Eberth et al., 2005; Scheffzek and Ahmadian, 2005). Environ 80 protéines GAP existent chez l'Homme, ce qui est bien supérieur aux RhoGTPases qui ne sont que 20. Ceci suggère que plusieurs RhoGAP peuvent impacter la fonction d'une même GTPase, et que l'activité de ces protéines est très spécifique. Chacune d'elles a des propriétés différentes en termes de RhoGTPase(s) cible(s) et d'expression dans les tissus. Il a récemment été montré que le domaine GAP peut être masqué pour réguler négativement la protéine GAP. Ce phénomène peut avoir lieu *via* d'autres protéines telles que p120RasGAP (Jaiswal et al., 2014), mais aussi *via* un repliement de la GAP elle-même (Héraud, Pinault et al., en cours de publication, annexe 1). En dehors du domaine GAP, cette famille de protéines est aussi composée de plusieurs domaines qui diffèrent selon les cas (Figure 23).

Structurellement, le domaine GAP est composé de 9 hélices  $\alpha$  (Figure 24). C'est une arginine conservée entre les membres de la famille GAP qui permet l'interaction avec la RhoGTPase. Cette liaison entraîne une rotation de 20° de la GTPase qui place l'arginine catalytique de la GAP dans son

site actif. Cette conformation permet de stabiliser l'étape de transition pendant l'hydrolyse du GTP (Barrett et al., 1997; Mosaddeghzadeh and Ahmadian, 2021).



**Figure 23 : Organisation en domaines des protéines de la famille GAP.** Le domaine GAP fonctionnel commun à tous les membres est noté en rouge. Parmi les autres domaines, certains sont impliqués dans la liaison à la membrane plasmique (en bleu), dans des interactions protéiques (en vert clair), et dans des activités enzymatiques (en orange et en rouge). L'échelle au bas de la figure représente les acides aminés avec des incréments de 200. D'après Mosaddeghzadeh and Ahmadian, 2021.

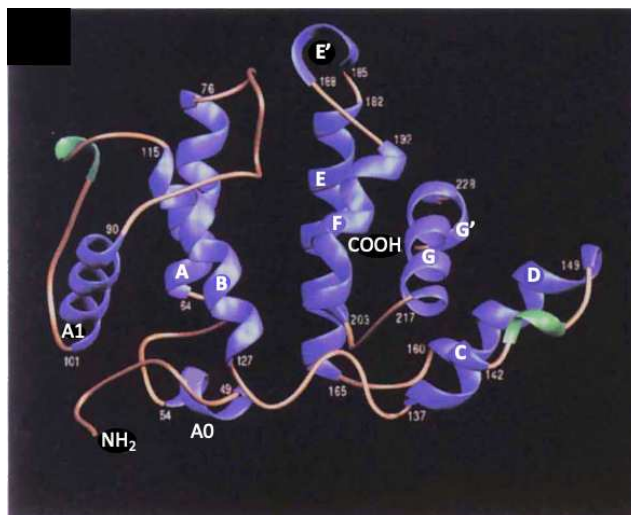


Figure 24 : Structure en ruban représentant le domaine GAP de p50RhoGAP. De l'extrémité N- à C-terminale, les hélices sont notées de A0 à G. La structure comprend 9 hélices  $\alpha$ , et deux courts « tours d'hélices » notés E' et G'. Les numéros d'acides aminés de début et de fin de chacune des hélices sont représentés. Figure modifiée d'après Barrett et al., 1997.

### 3.2.3. Les GDI

Le dernier groupe de protéines régulant les RhoGTPases est la famille des GDI (*Guanine Nucleotide Dissociation Inhibitors*). Ces protéines servent de navettes aux RhoGTPases. Pour se faire, la RhoGTPase est décrochée d'une « membrane donneuse » et liée à la GDI en un complexe RhoGTPase-GDI qui déplace la RhoGTPase vers le nouveau compartiment cellulaire où elle est libérée (Garcia-Mata et al., 2011). Ce complexe RhoGTPase-GDI garde la GTPase dans un état inactif et la protège de la dégradation.

Si les protéines GEF et GAP sont nombreuses, il n'existe que 3 GDI chez l'Homme. Elles sont logiquement appelées RhoGDI $\alpha$ /RhoGDI1, RhoGDI $\beta$ /RhoGDI2 et RhoGDI $\gamma$ /RhoGDI3. La protéine RhoGDI1 est exprimée de manière ubiquitaire, RhoGDI2 est spécifique des cellules hématopoïétiques, et RhoGDI3 est fortement exprimée dans le cerveau, les poumons, les reins et les testicules. Structuellement, la région N-terminale des GDI est appelée « bras régulateur ». Elle se lie aux régions Switch des RhoGTPases pour inhiber la dissociation du GDP et les garder sous une conformation inactive. C'est l'extrémité N-terminale de la GDI qui attire la région hypervariable des RhoGTPases responsable de leur liaison à la membrane plasmique. Les charges négatives de la GDI attirent les charges positives de cette région hypervariable, la RhoGTPase est décrochée de la membrane pour être déplacée dans la cellule (Ahmad Mokhtar et al., 2021; Longenecker et al., 1999; Mosaddeghzadeh and Ahmadian, 2021).

### 3.3. Signalisation *via* les effecteurs des RhoGTPases

Une fois fonctionnelles et associées à des GEF, GAP et GDI, les RhoGTPases peuvent interagir avec leurs cibles moléculaires et générer des signaux dans la cellule. Dans le cas de RhoA, Rac1 et Cdc42, plus de 70 cibles ont été identifiées (Bustelo et al., 2007). Nous aborderons ici les principaux processus dans lesquels elles interviennent.

#### 3.3.1. Régulation du cytosquelette d'actine

La plupart des RhoGTPases jouent des rôles essentiels dans la régulation et la conformation du cytosquelette d'actine. Les deux effecteurs les plus étudiés dans ce processus sont les kinases ROCK et la formine mDia. ROCK1 et ROCK2 sont des effecteurs de RhoA, RhoB et RhoC. Structurellement, elles sont caractérisées par une superhélice (structure qualifiée de *coiled-coil*) qui comprend le domaine de liaison à la RhoGTPase (RBD : *Rho Binding Domain*). ROCK activée peut à son tour phosphoryler MLC (*Myosin Light Chain*) qui active la myosine (de même, par phosphorylation). Ce phénomène augmente la contractilité des cellules en participant notamment à la formation des fibres de stress (Riento and Ridley, 2003). Comme déjà décrit, mDia permet l'assemblage des fibres d'actine en faisceau dans diverses structures subcellulaires.

Cdc42 impacte aussi le cytosquelette d'actine en activant WASP et N-WASP. Ces protéines interagissent directement avec le complexe Arp2/3 qui est au cœur de la formation des structures d'actine branchée. Ainsi, la surexpression de ces deux protéines augmente fortement la polymérisation de l'actine (Reicher et al., 2012). Rac1 aussi peut activer le complexe Arp2/3 *via* WAVE, qui constitue un mécanisme central dans la formation des protrusions de type lamellipodes. Enfin, un autre effecteur de Cdc42 et Rac1 est PAK1. Celui-ci phosphoryle la kinase LIM, qui elle-même génère l'activation de la cofiline. Comme vu précédemment, la cofiline désassemble les filaments d'actine. Ce mécanisme permet donc une régulation négative du cytosquelette (Ohashi et al., 2000).

#### 3.3.2. Régulation des microtubules

Un second rôle des RhoGTPases tout autant essentiel à la cellule est celui de régulation des microtubules. Pour se faire, un effecteur de Cdc42 et Rac1 est IQGAP. Il s'agit d'une protéine de structure qui interagit avec CLIP70 à l'extrémité des microtubules. Ce complexe favorise l'élongation des microtubules. RhoA est aussi impliquée dans l'élongation des microtubules de par l'activation de mDia. Celle-ci interagit avec le complexe EB1 (*End-Binding protein 1*) / APC (*adenomatous polyposis coli*) qui s'associe à l'extrémité des microtubules. De plus, l'activation de PAK1 par Cdc42 et Rac1 phosphoryle la stathmine qui est un régulateur majeur des microtubules. La stathmine séquestre les

tubulines  $\alpha$  et  $\beta$  pour former le complexe T2S. Dans ce complexe, la tubuline devient non phosphorylable (Cardama et al., 2017; Wojnacki et al., 2014).

### 3.3.3. Transduction de signaux cellulaires

En dehors de leurs implications vis-à-vis du cytosquelette, les RhoGTPases agissent dans diverses transductions de signaux. Elles régulent notamment l'activation de plusieurs facteurs de transcription tels que SRF (*Serum Response Factor*), NF $\kappa$ B, ou encore JNK (*c-jun terminal kinase*). Ces signalisations ont pour impact de moduler l'expression de gènes.

La polymérisation de l'actine par RhoA libère et active MAL. Celui-ci est transloqué au noyau où il joue le rôle de coactivateur du facteur de transcription SRF. NF $\kappa$ B est quant à lui activé par les RhoGTPases en réponse à des stimuli par des cytokines inflammatoires. En parallèle, Rac1 et Cdc42 stimulent la production de ROS (*Reactive Oxygen Species*) qui permettrait un second mécanisme de régulation, indirecte cette fois, de NF $\kappa$ B. Enfin, l'activation de JNK a lieu via la phosphorylation successive des MAP kinases dont au moins 4 MAP KKK sont des cibles directes des RhoGTPases : MLK2, MLK3, MEKK4 et MEKK1 (Jaffe and Hall, 2005).

### 3.3.4. Régulation du cycle cellulaire

Les RhoGTPases ont des rôles de régulation du cycle cellulaire et de sa progression. Elles régulent par exemple l'expression de la cycline D1 impliquée dans la transition G1/S (Figure 25). Rac1 induit l'expression de la cycline D1 *via* l'activation du facteur de transcription NF $\kappa$ B (cité ci-dessus). RhoA est aussi responsable du contrôle de l'activation de cette cycline. Elle active en effet les kinases ROCK et LIMK qui génèrent l'apparition de fibres de stress et d'adhésions focales. Ceci permet le regroupement et la signalisation des intégrines qui activent la voie Ras/ERK. C'est cette voie qui permet l'expression de la cycline D1 en milieu de phase G1 (Villalonga et al., 2006). RhoA est aussi impliquée dans la mitose *via* son effecteur ROCK qui est responsable de la rétractation des cellules au début du processus. Les interactions RhoA/mDia1 et Cdc42/mDia3 sont nécessaires à l'assemblage du fuseau mitotique (cf. *Régulation des microtubules* ci-dessus) et à l'attachement des microtubules aux kinétochores. Aux étapes tardives de la mitose, les RhoGTPases sont directement impliquées dans la séparation des deux cellules filles car elles régulent la contractilité de l'anneau de cytokinèse (David et al., 2012).

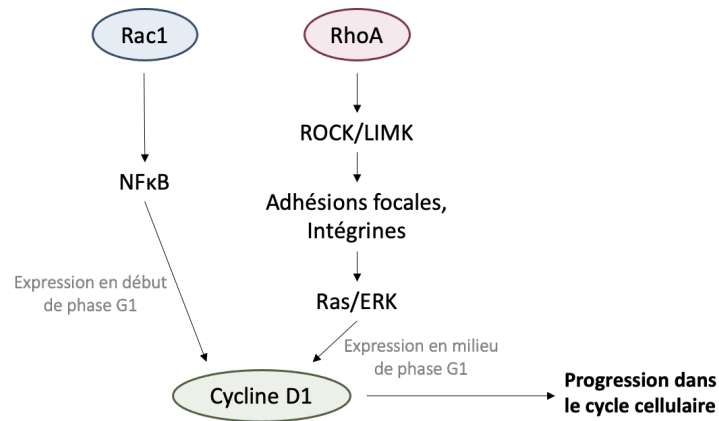


Figure 25 : Schéma résumant l'impact des RhoGTPases Rac1 et RhoA dans l'activation de la cycline D1 et la progression du cycle cellulaire.

### 3.3.5. Signalisation anormale des RhoGTPases dans les cancers

La conclusion de cette partie est que les RhoGTPases, ainsi que leur fine régulation, sont nécessaires pour réguler la plupart des mécanismes cellulaires essentiels. Des mutations ou anomalies dans l'expression des RhoGTPases et des GEF, GAP et GDI peuvent donc favoriser l'apparition et le développement de cancers. C'est l'activation constitutive des GTPases (en particulier RhoA) et des GEF qui est majoritairement associée à la transformation maligne des cellules (Fritz et al., 1999). En regard, les GAP sont maintenant considérées comme des régulateurs clés des processus de cancérisation (Kreider-Letterman et al., 2022). On retrouve des altérations de ces différentes familles de protéines dans de nombreux types de cancers : pancréas, sein, peau, prostate, testicules, colon, foie, poumon, estomac ou encore endomètre (Cardama et al., 2017; Grise et al., 2009; Zubor et al., 2020).

# Chapitre 3 - Les protéines p190RhoGAPs

---

## 1. Rôles physiologiques et pathologiques des p190RhoGAPs

### 1.1. Présentation des p190RhoGAPs

En 1992, Settleman et al. ont identifié et cloné une protéine de 190 KDa interagissant avec p120RasGAP. Elle a été logiquement appelée p190. En 1995, Burbelo et al. ont identifié une seconde p190 notée B, elle aussi capable d'interagir avec p120RasGAP et comportant plus de 50% d'homologie avec la première.

Les deux paralogues p190RhoGAPs sont depuis appelées p190RhoGAP-A et p190RhoGAP-B (ci-après appelées p190A et p190B). Elles sont codées respectivement par les gènes *ARHGAP35* et *ARHGAP5*. Ces derniers proviennent certainement d'une duplication de gènes et sont situés sur deux chromosomes différents (locus 19q13.3 et 14.q12 respectivement). Les p190RhoGAPs possèdent 50% d'homologie dans leur séquence et ont une organisation moléculaire très similaire. Tout cela pris en compte, il est logique que ces protéines partagent des rôles identiques dans les cellules. En effet, ce sont des RhoGAPs. Leur rôle le plus décrit est donc de réguler les RhoGTPases. Elles sont notamment des régulateurs majeurs de RhoA, mais peuvent aussi réguler Rac1 et Cdc42. Elles possèdent aussi d'autres fonctions dans les cellules, pour lesquelles elles peuvent avoir chacune leurs spécificités.

Au-delà de leurs fonctions physiologiques, les p190RhoGAPs impactent plusieurs processus pathologiques. C'est le cas notamment de maladies neurologiques. Elles sont aussi fréquemment mutées dans les cancers, et leur impact semble être dépendant du contexte. Au global, il est important de garder à l'esprit que la plupart des données publiées concernent p190A. A ce jour, moins d'informations sont connues sur p190B.

Dans la partie 1.2., la revue *p190RhoGAPs, the ARHGAP35- and ARHGAP5-Encoded Proteins, in Health and Disease* publiée par notre équipe en 2019 détaille les différents aspects connus des p190RhoGAPs : leur aspect moléculaire, ainsi que leurs fonctions physiologiques et pathologiques.

### 1.2. Revue p190RhoGAPs, the ARHGAP35- and ARHGAP5-Encoded Proteins, in Health and Disease

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> University of Bordeaux, UMR1053 Bordeaux Research In Translational Oncology, BaRITOn, Bordeaux F-33000, France

<sup>3</sup> Equipe Labellisée Fondation pour la Recherche Médicale (FRM) 2018, 75007 Paris, 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



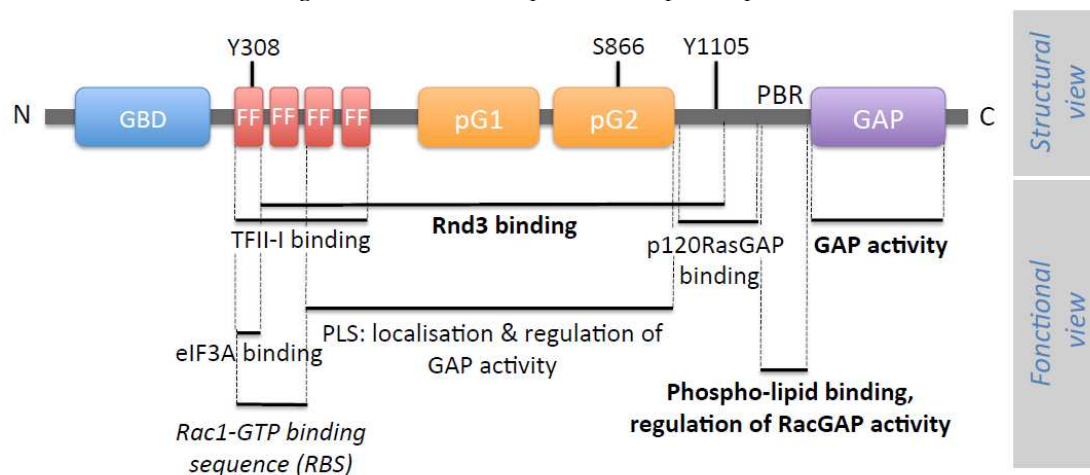
cycle is determinant for the accomplishment of signaling cascades and downstream cellular processes. The main regulators of the GDP/GTP cycle of Rho GTPases are the guanine nucleotide exchange factors (GEFs) and the GTPase-activating proteins (GAPs), allowing, respectively, GTPase activation or inhibition.

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 (~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.

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).

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 Levay et al. Cell Signal. 2013
P120RasGAP		ND	GST pulldown, 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 pulldown, 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 pulldown / HEK293T cells, HPAEC	Adherent junction formation	Wildenberg et al., Cell. 2006 Zebda et al., JBC. 2013
TFII-I		N-terminal region	GST-pulldown, 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, CaSki, 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>					
<b>RhoA</b>		ND	Filter binding assay, immunofluorescence / human foreskin fibroblasts	Cell migration and invasion	Burbelo et al., JBC. 1995
<b>P120RasGAP</b>	ND	ND	Co-IP / normal foreskin fibroblast, HT-1080, RD cells	Cell adhesion	Burbelo et al., JBC. 1995
<b>P120Catenin</b>	ND	ND	Co-IP, immunofluorescence, GST pull-down / T47D cells	Adherent junction formation	Ponik et al., MBoC 2013
<b>Rnd1/2/3</b>		aa16-93 (Rnd3)	2-hybrid, GST pull-down, coIP, direct (GST) / Cos7 cells	p190 GAP activity	Wennerberg et al., Curr Biol 2003
<b>Rac1</b>		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
<b>Src (Y1105)</b>	ND	ND	CoIP/MDA-MB-468 cancer cells	Neoplastic multinucleation	Wu et al., Oncogene. 2014
<b>MCT1</b>	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. (in supplementary material).

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].

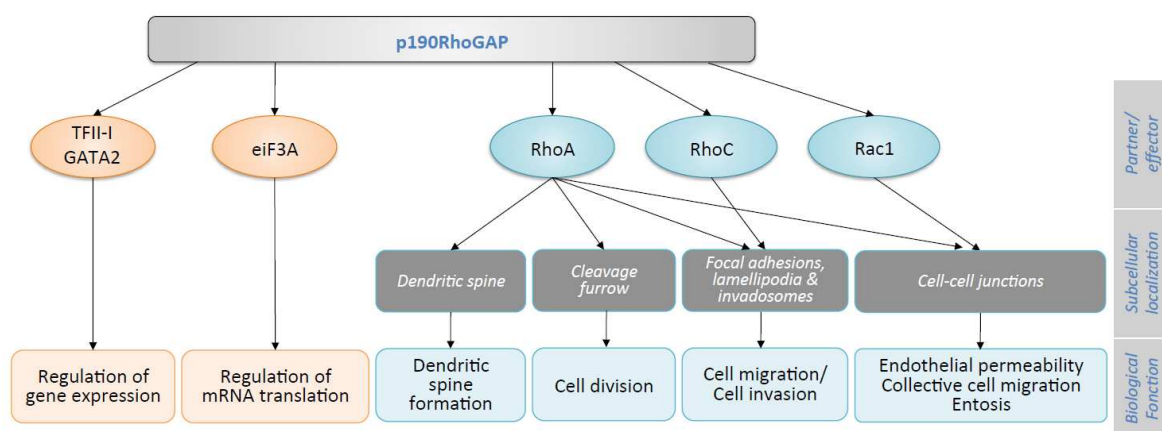
Moreover, in this former middle domain, the regions encompassing residues 382–1007 in p190A/B and residues 382–607 in p190B were shown to interact, respectively, with the atypical Rho family member Rnd3 [21], and the active Rac1 [22], modifying p190RhoGAP activities. Thus, p190RhoGAP function appears 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 neuritogenesis 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<sup>+/-</sup> 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	Kandoth 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.Asn946Glu/X11	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	↑° 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	↑° 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
<b>p190B</b>						
<b>Hepatocellular carcinoma</b>	47 T	Up	IHC	Positive correlation between the expression levels of CD147 and	Role in HCC progression by regulation of cell movement	Chen et al. Cancer Cell Int. 2016

				p190B	through p190B and CD147	
<b>Nasopharyngeal carcinoma</b>	52 T	Up	RT-qPCR, WB	$\nearrow^{\circ}$ miR-744 > $\nearrow^{\circ}$ 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 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>							
<b>Osteosarcoma</b>	MG63	Loss (si p190A)	nd	Decrease	nd	Increase of apoptosis	Zhao et al. Tumor Biol. 2014
<b>Breast cancer</b>	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

<b>Lung adenocarcinoma</b>	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
<b>Glioma</b>	PDGF/Gtv-a cells	Gain (WT GAP domain)	nd	Inhibition of PDGF-induced proliferation	nd	nd	Wolf et al. Genes Dev. 2003
<b>Renal cancer</b>	RCC, 786-O	Loss (si p190A)	nd	nd	nd	Restore fibronectin matrix assembly	Feijoo-Cuaresma. J Biol Chem. 2008
<b>Melanoma</b>	BLM human melanoma cells	Loss (si p190A)	p120ctn allows p190-RhoA interaction and RhoA activation	nd	E-cadherin melanoma transfected 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
<b>Squamous cell carcinoma</b>	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
<b>Pancreatic cancer</b>	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
<b>Human Papillomavirus</b>	HaCat, CaSki, C33A, U2OS, HT1080	Gain (plasmids p190A-HA)	Interaction MD p190A & CR3 of HPV E7	nd	nd	Decrease actin stress fiber formation, cell spreading	Todorovic et al. J Virology. 2014
<b>Cancer</b>	Huh7, MDA-MB-231, MEF	Gain (plasmids p190A-HA)	$\Delta$ PLS, S886F and $\Delta$ 865-870 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>							
	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
<b>Breast cancer</b>	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
<b>Hepatocellular carcinoma</b>	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
<b>Nasopharyngeal carcinoma</b>	NPC cell lines	Loss (si p190B)	nd	nd	Abrogates migration and invasion induced by miR-744	nd	Fang et al. Oncotarget. 2015
<b>Cancer</b>	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-R997\* 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 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, doi:10.14670/HH-17.915.
2. Haga, R.B.; Ridley, A.J. Rho GTPases: Regulation and roles in cancer cell biology. *Small GTPases* **2016**, *7*, 207–221, doi:10.1080/21541248.2016.1232583.
3. Hall, A. Rho family GTPases. *Biochem. Soc. Trans.* **2012**, *40*, 1378–1382, doi:10.1042/BST20120103.
4. Stiegler, A.L.; Boggon, T.J. The N-Terminal GTPase Domain of p190RhoGAP Proteins Is a PseudoGTPase. *Structure* **2018**, *26*, 1451–1461.e1454, doi:10.1016/j.str.2018.07.015.
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.
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, doi:10.1016/S0171-9335(99)80019-3.
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, doi:10.1016/j.cellsig.2013.03.004.
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.
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.
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.
14. Foster, R.; Hu, K.Q.; Shaywitz, D.A.; Settleman, J. p190 RhoGAP, the major RasGAP-associated protein, binds GTP directly. *Mol. Cell. Boil.* **1994**, *14*, 7173–7181.

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.
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, doi:10.1074/jbc.M116.769216.
17. Stiegler, A.L.; Boggon, T.J. p190RhoGAP proteins contain pseudoGTPase domains. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 506, doi:10.1038/s41467-017-00483-x.
18. Stiegler, A.L.; Boggon, T.J. PseudoGTPase domains in p190RhoGAP proteins: A mini-review. *Biochem. Soc. Trans.* **2018**, *46*, 1713–1720, doi:10.1042/BST20180481.
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, doi:10.1080/21541248.2017.1280584.
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, doi:10.1083/jcb.201601063.
21. Wennerberg, K.; Forget, M.A.; Ellerbroek, S.M.; Arthur, W.T.; Burrridge, 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.
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.
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.
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.
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.
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.
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, doi:10.1016/j.cub.2004.03.062.
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, doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-0997.
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), e12993, doi:10.1111/eci.12993.
30. McCormick, F. ras GTPase activating protein: Signal transmitter and signal terminator. *Cell* **1989**, *56*, 5–8.
31. O'Connor, K.; Chen, M. Dynamic functions of RhoA in tumor cell migration and invasion. *Small GTPases* **2013**, *4*, 141–147, doi:10.4161/sgtp.25131.
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, doi:10.1242/jcs.046870.
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.
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.
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, doi:10.1016/j.cell.2006.09.046.
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, doi:10.1016/j.yexcr.2009.02.014.
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, doi:10.1016/j.devcel.2007.11.020.

38. Noren, N.K.; Arthur, W.T.; BurrIDGE, K. Cadherin engagement inhibits RhoA via p190RhoGAP. *J. Boil. Chem.* **2003**, *278*, 13615–13618.
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, doi:10.1074/jbc.M112.432757.
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, doi:10.1038/ncb2133.
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, doi:10.1038/s41556-018-0268-z.
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, doi:10.1091/mbc.E12-05-0386.
43. Fais, S.; Overholtzer, M. Cell-in-cell phenomena in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2018**, *18*, 758–766, doi:10.1038/s41568-018-0073-9.
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, doi:10.1016/j.cell.2007.10.040.
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, doi:10.1038/cr.2014.137.
46. Su, L.; Agati, J.M.; Parsons, S.J. p190RhoGAP is cell cycle regulated and affects cytokinesis. *J. Cell Boil.* **2003**, *163*, 571–582, doi:10.1083/jcb.200308007.
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, doi:10.1242/jcs.151647.
48. Mikawa, M.; Su, L.; Parsons, S.J. Opposing roles of p190RhoGAP and Ect2 RhoGEF in regulating cytokinesis. *Cell Cycle* **2008**, *7*, 2003–2012, doi:10.4161/cc.7.13.6128.
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, doi:10.1007/s00412-018-0670-0.
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.
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.
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, doi:10.1038/35070042.
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.
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, doi:10.1038/cddis.2017.37.
55. Wheeler, A.P.; Ridley, A.J. Why three Rho proteins? RhoA, RhoB, RhoC, and cell motility. *Exp. Cell Res.* **2004**, *301*, 43–49, doi:10.1016/j.yexcr.2004.08.012.
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, doi:10.1083/jcb.201011038.
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, doi:10.1016/j.cub.2011.03.039.
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, doi:10.1242/jcs.123547.

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.
61. Ligeti, E.; Settleman, J. Regulation of RhoGAP specificity by phospholipids and prenylation. *Methods Enzymol.* **2006**, *406*, 104–117, doi:10.1016/S0076-6879(06)06009-5.
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.
63. Roy, A.L. Biochemistry and biology of the inducible multifunctional transcription factor TFII-I. *Gene* **2001**, *274*, 1–13.
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, doi:10.1038/nature07765.
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.
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, doi:10.1159/000095116.
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.
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, doi:10.1210/me.2002-0428.
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, doi:10.1210/me.2005-0426.
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, doi:10.1016/j.ydbio.2011.09.006.
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, doi:10.1093/brain/awx066.
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, doi:10.1523/JNEUROSCI.2138-12.2013.
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, doi:10.1523/JNEUROSCI.2730-11.2012.
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, doi:10.1016/j.jpsychires.2017.06.005.
75. Selva, J.; Egea, G. Ethanol increases p190RhoGAP activity, leading to actin cytoskeleton rearrangements. *J. Neurochem.* **2011**, *119*, 1306–1316, doi:10.1111/j.1471-4159.2011.07522.x.
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.
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.
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.
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.
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.

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, doi:10.1038/nature12912.
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.
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, doi:10.1038/ng.3564.
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, doi:10.1016/j.ccell.2018.06.013.
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, doi:10.1371/journal.pgen.1006242.
87. Horpaopan, S.; Spier, I.; Zink, A.M.; Altmuller, 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, doi:10.1002/ijc.29215.
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.
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, doi:10.1371/journal.pone.0197561.
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.
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, doi:10.1038/ng.2760.
92. Wolf, R.M.; Draghi, N.; Liang, X.; Dai, C.; Uhrbom, L.; Eklöf, C.; Westermarck, 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, doi:10.1101/gad.1040003.
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.
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, doi:10.1111/j.1349-7006.2006.00242.x.
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, doi:10.1074/jbc.M804520200.
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, doi:10.1002/jcb.24778.
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 Galphai3 functionally opposes CXCL12-stimulated RhoA activation and cell invasion. *Cell. Signal.* **2014**, *26*, 2551–2561, doi:10.1016/j.cellsig.2014.07.008.
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, doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-0561.
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, doi:10.1074/jbc.M807834200.

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, doi:10.1177/1947601911402680.
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, doi:10.1083/jcb.201710058.
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, doi:10.1007/s13277-014-2563-z.
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, doi:10.1155/2014/396947.
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, doi:10.1371/journal.pone.0086103.
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, doi:10.3892/ijco.2013.2096.
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, doi:10.1186/s12967-017-1192-x.
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, doi:10.1038/sj.onc.1206577.
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.
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, doi:10.1038/onc.2014.125.
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, doi:10.18632/oncotarget.3754.
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, doi:10.1038/onc.2013.42.
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, doi:10.1186/bcr2352.
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, doi:10.1186/s12935-016-0344-z.
115. Monaghan-Benson, E.; Wittchen, E.S.; Doerschuk, C.M.; Burrridge, K. A Rnd3/p190RhoGAP pathway regulates RhoA activity in idiopathic pulmonary fibrosis fibroblasts. *Mol. Boil. Cell* **2018**, *29*, 2165–2175, doi:10.1091/mbc.E17-11-0642.
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, doi:10.1371/journal.pgen.1005785.
117. Porter, A.P.; Papaioannou, A.; Malliri, A. Deregulation of Rho GTPases in cancer. *Small GTPases* **2016**, *7*, 123–138, doi:10.1080/21541248.2016.1173767.

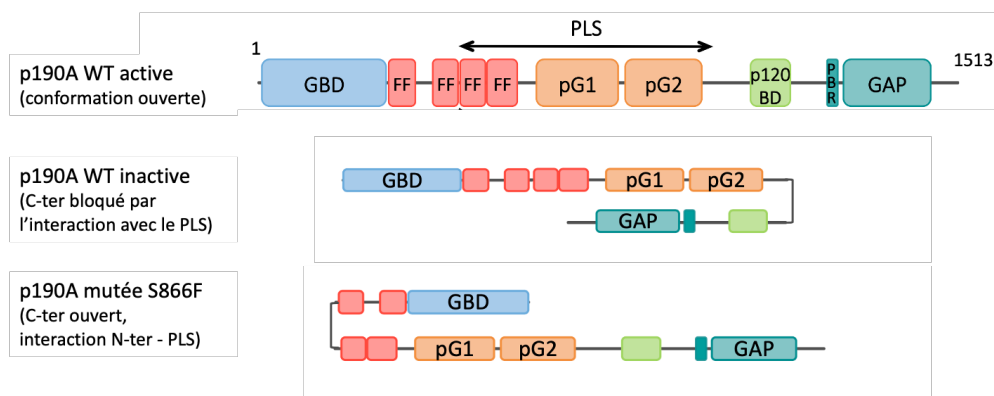


## 2. Données récentes sur la régulation des p190RhoGAPs

Comme indiqué dans la revue, les p190RhoGAPs comportent un domaine PLS (*Protrusion Localization Sequence*). Les études de notre équipe à ce sujet se sont concentrées sur p190A, mais la ressemblance entre les deux paralogues laisse supposer un domaine similaire sur p190B.

Le PLS a été décrit comme un domaine fonctionnel s'étendant entre les acides aminés 380 à 971. Il est le domaine minimal nécessaire à la localisation de p190A aux protrusions membranaires (lamellipodes, filopodes). C'est donc ce domaine qui permet l'adressage de p190A aux zones riches en actine où RhoA nécessite d'être régulée. Le PLS permet aussi la régulation de la protéine. En effet, la délétion de ce domaine génère une augmentation de l'affinité de p190A pour RhoA active (Binamé et al., 2016). Plus récemment, les résultats du Dr. Capucine Héraud ont confirmé que le PLS était aussi nécessaire à la localisation de p190A au niveau de structures d'actine liées à l'invasion telles que les invadosomes (Héraud et al., en cours de publication ; Annexe 1).

Pour expliquer le rôle de ce domaine PLS en termes de régulation et de fonction, des expériences de criblage double hybride et de co-immunoprécipitation ont été effectuées. Elles ont permis de montrer que le PLS peut en fait interagir avec p190A elle-même. Plus précisément, il peut interagir avec le domaine C-terminal (proche du domaine GAP) de p190A. Il bloque ainsi le domaine GAP et régule négativement l'activité envers les RhoGTPases (Figure 26). Ceci a été confirmé par la diminution de cette interaction dans le cas de mutations au niveau du PLS (S866F,  $\Delta$ 865-870). En effet, si le PLS est muté, il interagit préférentiellement avec l'extrémité N-terminale de la protéine, laissant le domaine GAP libre d'interagir avec les RhoGTPases. Finalement, grâce à ces données, notre équipe a proposé un modèle de régulation intramoléculaire de p190A par repliement du domaine C-terminal vers le PLS (Héraud et al., en cours de publication ; Annexe 1).



**Figure 26 : Régulation intramoléculaire de p190A.** Dans sa conformation active, la protéine est ouverte et le domaine GAP est libre d'interagir avec les RhoGTPases. Cette activité peut être inactivée par une interaction du PLS bloquant le domaine GAP. Enfin, si le domaine PLS est muté, une interaction de l'extrémité N-terminale avec le PLS a préférentiellement lieu laissant libre le domaine GAP. Figure adaptée de Héraud et al., en cours de publication, Annexe 1.



### 3. Les p190RhoGAPs dans le cancer de l'endomètre

Nous citons dans la revue l'étude à grande échelle de Lawrence et al., dans laquelle *ARHGAP35* a été retrouvé muté dans 2% des cancers totaux et 14% des cancers de l'endomètre. Il est donc considéré significativement muté dans ce type de cancer (Lawrence et al., 2014). Plusieurs autres données supportent cette implication d'*ARHGAP35*. D'une part dans le développement des cancers : *ARHGAP35* a été classé parmi le top 30 des gènes les plus significativement mutés parmi 12 types de cancers (Kandoth et al., 2013). D'autre part, les mutations d'*ARHGAP35* ont été soulignées comme impliquées dans la transformation maligne des lésions précurseurs vers le carcinome endométrioïde (Wang et al., 2019).

Récemment, une étude de Wen et al. a abordé plus précisément l'impact de p190A dans le contexte du cancer de l'endomètre. Les mutations de p190A conduiraient à une régulation négative de l'expression de la protéine. Une extinction d'expression de p190A à l'aide de shRNA a alors été effectuée dans une lignée cellulaire de carcinome de l'endomètre (Ishikawa). Le résultat est une augmentation de la croissance et de la migration des cellules, suggérant que p190A impacte négativement ces fonctions. Les auteurs de cette étude sont allés plus loin en montrant que les mutations de p190A génèrent une translocation au noyau de la protéine YAP. Ceci permet la transcription de gènes en aval de la voie Hippo/YAP, et favorise des mécanismes pro-tumoraux en aval de cette voie : prolifération, migration et transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) (Wen et al., 2020).

Ces données concordent avec un article de Frank et al. qui montre aussi une localisation de YAP dans le cytoplasme des cellules lorsque p190A est exprimée. Cette étude a par ailleurs été étendue à p190B. Les auteurs ont travaillé sur des modèles de Knockdown (KD) de p190A, p190B ou les deux, dans des cellules épithéliales (MDCK) et dans une lignée cellulaire cancéreuse d'endomètre (HEC-1-A). Ils ont conclu qu'en régulant simultanément la voie Hippo/YAP et la voie RhoA/ROCK, p190A et p190B promeuvent l'inhibition par contact des cellules tumorales (CIP : *contact inhibition of cell proliferation*). A l'inverse, l'altération de p190A dans les cancers, tout comme le KD, permettrait l'activation de la voie RhoA/ROCK, la translocation de YAP au noyau, et l'expression de gènes permettant aux cellules de passer outre la CIP. Ceci permettrait aux cellules tumorales de croître anormalement (Frank et al., 2018).

Via la voie Hippo/YAP, ces données indiquent que p190A et p190B, auraient une action anti-tumorale dans les cancers de l'endomètre. Les mutations dans le gène *ARHGAP35* auraient donc pour conséquence de réguler négativement la protéine pour favoriser le développement du cancer.

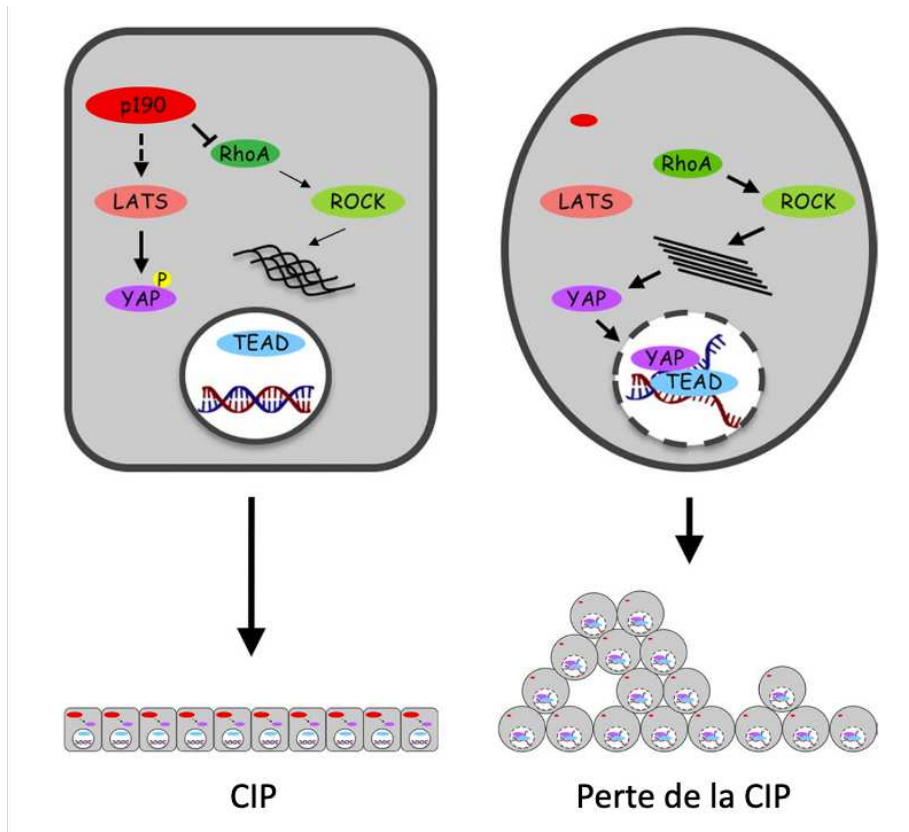


Figure 27 : Modèle proposé par Frank et al. pour illustrer le rôle des p190RhoGAPs dans le maintien de la CIP *via* la répression de YAP. D'après Frank et al., 2018.

Finalement, face à ces données, des publications récentes montrent la présence de mutations dans l'endomètre sain. Il a en effet été souligné que l'endomètre est un tissu qui comporte de nombreuses mutations, parfois associées au cancer. Le gène *ARHGAP35* est ainsi fréquemment muté dans le tissu sain, plus encore même que dans l'endomètre pathologique. Le détail de ces mutations et leur impact sur les fonctions de la protéine n'a cependant pas été exploré à ce jour (Moore et al., 2020; Suda et al., 2018).

# Objectifs de la thèse

Le nombre de cas et la mortalité encore en augmentation des cancers de l'endomètre en fait une pathologie pour laquelle il est nécessaire de trouver de nouveaux axes thérapeutiques. Les cancers de l'endomètre sont très hétérogènes. Ceci peut être mis en regard des différentes classifications qui existent en termes histologique, clinique, ou encore moléculaire. Cette dernière classification, plus récente, a apporté des précisions. Elle a favorisé l'étude de différentes voies de signalisation dont l'impact est majeur dans le développement du cancer : voies liées à la prolifération et au cycle cellulaire principalement. Cependant, une voie aux implications majeures et encore trop peu étudiée dans l'endomètre est celle des RhoGTPases.

En agissant au niveau du cytosquelette, les RhoGTPases permettent en effet de moduler la morphologie des cellules. Elles leur confèrent la capacité de s'ancrer à la surface de l'utérus dans le cas de l'endomètre. Lors du développement d'un cancer, la dynamique et les différentes architectures du cytosquelette permettent aux cellules de dégrader la matrice extracellulaire et de migrer au travers des tissus. Ces processus invasifs sont à la base de l'évolution vers des stades avancés de la maladie. La régulation très fine des RhoGTPases est donc un facteur essentiel à prendre en compte dans ce contexte.

Les p190RhoGAPs sont des régulateurs majeurs de la voie RhoA. Leur impact ne se limite pas à cette GTPase car elles peuvent aussi réguler d'autres protéines de la même famille. De plus, des données récentes leur confèrent un rôle dans des mécanismes indépendants des RhoGTPases tels que la régulation de la transcription de gènes ou de la traduction d'ARNm. Le gène *ARHGAP35*, codant pour p190A, est retrouvé significativement muté dans les cancers, avec une particularité pour les cancers de l'endomètre (14%). La question se pose donc de l'impact exact qu'a cette protéine non seulement sur le cytosquelette des cellules endométriales, mais aussi sur leurs fonctions de manière globale.

Enfin, depuis leur caractérisation dans les années 1990, les deux p190RhoGAPs sont décrites comme très similaires en termes de séquence (50%), d'organisation moléculaire et de fonction. Cependant la majorité des études se concentre sur l'un des deux paralogues, et aucune étude n'a vraiment mis en perspective la fonction de l'une par rapport à l'autre.

L'objectif de ma thèse a été de comparer moléculairement et fonctionnellement les deux paralogues p190A et p190B dans le contexte du cancer de l'endomètre. Le premier axe de travail a été **l'établissement des modèles cellulaires pour cette étude**, par l'utilisation de la technologie CRISPR/Cas9. Dans le cœur de l'étude, nous avons commencé par comparer les **altérations des deux p190RhoGAPs en termes de mutations et d'expression dans les cancers de l'endomètre** : d'abord à l'aide de bases de données en ligne, puis avec des échantillons de tumeurs de patientes obtenus en collaboration avec l'Institut Bergonié. Les lignées cellulaires délétées pour p190A et p190B ont permis de comprendre, au niveau cellulaire et moléculaire, l'impact de ces altérations et de les comparer.

Enfin, le troisième axe de travail a été **l'identification globale des partenaires de p190A et p190B**, en collaboration avec le laboratoire du Dr. Jean-François Côté à Montréal. Nous avons utilisé une technique de BioID vis à vis des deux paralogues pour identifier et comparer leurs interactants dans les cellules.



# Résultats

# Partie 1 – Établissement des modèles d'étude

---

## 1. Introduction

Le premier aspect de la thèse était l'établissement de modèles d'études pour le reste du projet. Cette partie aborde donc des questions techniques. Les anticorps anti-p190A et anti-p190B étant des outils clés pour tout le projet, nous avons d'abord validé ceux que nous allions utiliser. Ceci a été fait par Western Blot, avec différents modèles cellulaires. Pour les parties suivantes, deux lignées cellulaires ont été utilisées : les Huh7, lignée humaine de carcinome hépatocellulaire, a déjà été utilisée lors des précédentes études au laboratoire (Binamé et al., 2016). Il s'agissait donc d'une lignée que nous maîtrisons en termes de culture et d'expression des p190RhoGAPs. La seconde lignée, HEC-1-A, est une lignée de carcinome endométrial humain pertinente pour l'étude dans le contexte du cancer de l'endomètre. Nous avons mis en place deux stratégies en parallèle. La première était d'éteindre l'expression de p190A ou p190B grâce à un Knockout (KO) du gène *ARHGAP35* ou *ARHGAP5*. Ceci a été effectué sur les deux lignées Huh7 et HEC-1-A. La seconde était d'induire des mutations retrouvées dans les cancers, directement au locus dans le gène *ARHGAP35*. Nous avons mis en place cette stratégie dans les cellules Huh7. Pour les deux aspects, nous avons utilisé la technique CRISPR/Cas9 en collaboration avec la plateforme CRISP'Edit à Bordeaux.

CRISPR/Cas9 est un système qui a révolutionné l'édition génique au cours de ces dernières années. Il est basé sur le système immunitaire adaptatif des bactéries (Figure 28). L'acronyme CRISPR, relatif aux séquences répétées du génome bactérien, signifie « *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* ». Cas, pour « *CRISPR-associated* », fait référence à la protéine intervenant dans ce processus pour « découper » l'ADN (Jinek et al., 2012). En pratique, pour éditer le génome, les cellules ont été transfectées avec une protéine Cas9. Celle-ci a été couplée à un ARN guide (ARNg), composé d'un « squelette » appelé ARNtracr et d'une séquence ARNcr spécifique de l'ADN génomique ciblé (Figure 28). L'ARNg guide la Cas9 en se fixant à l'ADN qui lui est complémentaire. La Cas9 reconnaît alors une petite séquence appelée PAM (*Protospacer Adjacent Motif*) dans l'ADN et clive précisément 3 nucléotides en amont. La précision en termes de séquences des ARNg et du PAM confère toute sa puissance à cette technique d'édition génique.



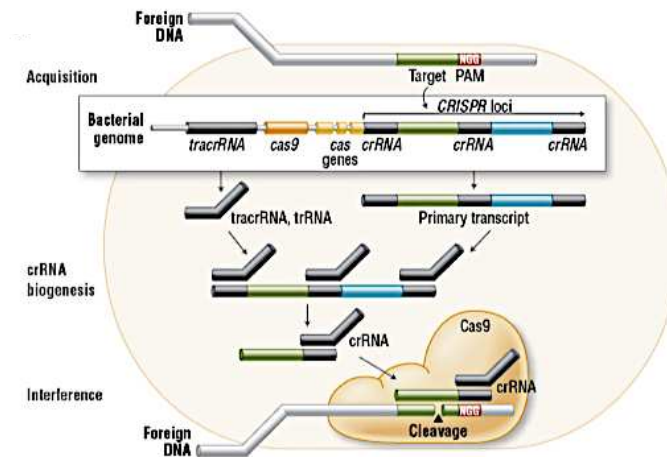


Figure 28 : Représentation schématique de la technologie CRISPR/Cas9. Vue d'ensemble du mécanisme CRISPR/Cas dans la bactérie. Brièvement, pour dégrader un ADN étranger, la bactérie produit un ARNcr et un ARNtracr qui s'assemblent (ARNg). Ce duplex guide une protéine, la Cas9, jusqu'à l'ADN étranger pour le reconnaître et le cliver. Modifié d'après Reis et al., 2014.

## 2. Résultats

### 2.1. Validation des anticorps

Le projet étant notamment constitué de l'établissement de lignées KO p190A et p190B, il a été nécessaire de s'assurer de la spécificité des anticorps utilisés. En effet, des anticorps non spécifiques auraient induit un biais majeur dans la validation des modèles Knockout, mais aussi dans le reste du projet par ailleurs. En d'autres termes, les anticorps respectivement anti-p190A et anti-p190B devaient reconnaître uniquement leur protéine cible et non son paralogue. Deux anticorps anti-p190A et deux anticorps anti-p190B ont été utilisés. Ils sont présentés dans le Tableau 2 et dans la Figure 29. L'intérêt de ces anticorps est que chacun permet de cibler le début (région N-terminale) et la fin (région C-terminale) de la séquence des deux protéines p190A et p190B.

Tableau 2 : Détail des anticorps utilisés pour rechercher l'expression de p190A et p190B au cours du projet.

Protéine cible	Référence de l'anticorps	Clone	Espèce	Fournisseur
p190RhoGAP-A	610149	Clone 30	Souris	BD Transd. Lab.
p190RhoGAP-A	R3150	Clone D2D6	Souris	Sigma
p190RhoGAP-B	611612	Clone 54	Souris	BD Transd. Lab.
p190RhoGAP-B	#2562S	Polyclonal	Lapin	Cell signaling

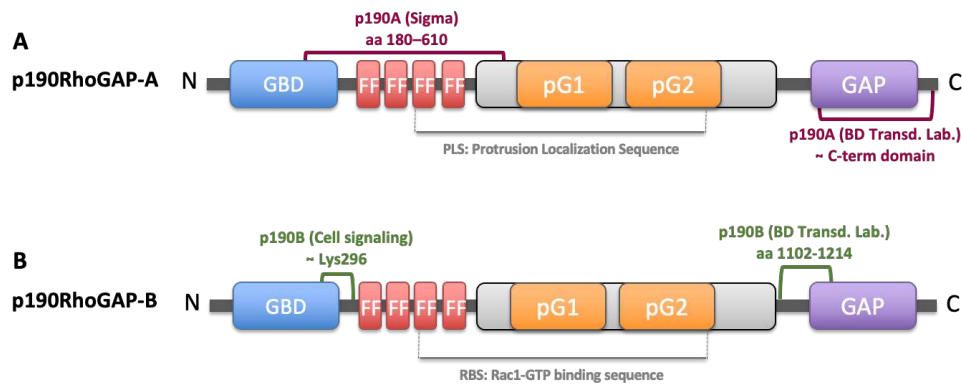


Figure 29 : Représentation des sites de fixation des anticorps anti-p190A et anti-p190B sur leur protéine cible respective.

Pour valider ces anticorps, des Western Blots ont été effectués avec chacun d'eux. Différents échantillons protéiques ont été utilisés. D'abord, deux lignées cellulaires permettant de révéler ou non les protéines p190A et p190B endogènes (ces deux lignées obtenues au cours de ma thèse sont décrites plus en détails dans la partie suivante 2.2) :

- Cellules HEC-1-A p190A KO, qui expriment p190B à 190KDa mais pas p190A
- Cellules HEC-1-A p190B KO, qui expriment p190A à 190KDa mais pas p190B

Ensuite, des cellules HEK293T ont été transfectées avec des plasmides pour exprimer des régions précises de p190A ou p190B :

- YFP-p190A permet de surexprimer p190A entière, liée à un tag YFP, construction qui a une taille un peu plus importante que la protéine endogène (poids moléculaire attendu : 218 KDa)
- p190A N-ter est la région N-terminale de la protéine (poids moléculaire attendu : 62 KDa)
- p190A PLS correspond au domaine PLS de la protéine (poids moléculaire attendu : 67 KDa)
- p190A C-ter correspond à la région C-terminale de la protéine (poids moléculaire attendu : 50 KDa)
- p190B PLS correspond à l'équivalent du domaine PLS de la protéine (poids moléculaire attendu : 67 KDa)
- p190B C-ter 2H correspond à la région C-terminale de la protéine, définie comme interagissant avec P190A lors d'un criblage double hybride effectué lors de précédentes études au laboratoire (poids moléculaire attendu : 17 KDa)

Les résultats de ces Western Blots (Figure 30) montrent que les deux anticorps utilisés pour révéler p190A révèlent la protéine comme attendu, et sont spécifiques de celle-ci. L'anticorps anti-p190B de *BD Transduction Laboratories* est aussi spécifique de p190B. Le second anticorps anti-p190B (*Cell Signaling*) est moins spécifique. En effet, il permet de révéler la construction p190A-YFP ce qui ne devrait pas être le cas. Parmi les constructions plasmidiques, il permet aussi de révéler le domaine PLS de p190A plutôt que celui de p190B. Cependant, il permet bien de révéler la protéine endogène p190B et non p190A. Nous l'avons donc considéré comme utilisable pour la validation d'extinction de p190B endogène dans l'établissement du Knockout par CRISPR/Cas9 (ci-dessous).

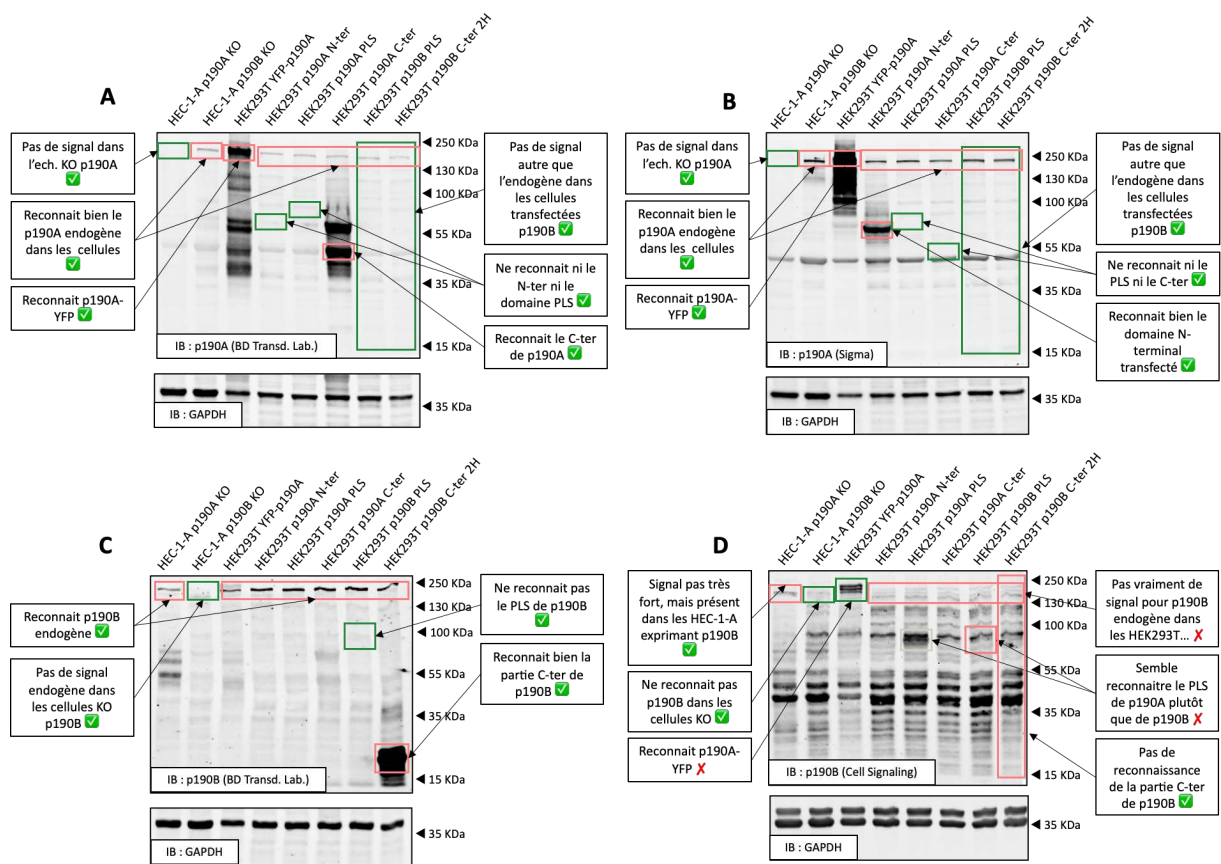


Figure 30 : Westerns blots effectués pour valider la spécificité des anticorps anti-p190A et anti-p190B utilisés dans le projet. Le détail de la confirmation (✓) ou non (✗) de la spécificité des anticorps est noté sur chaque figure. Les protéines qui étaient prédites comme reconnues sont encadrées en rouges, celles qui étaient prédites comme non reconnues sont encadrées en vert sur les membranes. (A) Anticorps anti-p190A de BD Transduction Laboratories, clone 30. (B) Anticorps anti-p190A de Sigma, clone D2D6. (C) Anticorps anti-p190B de BD Transduction Laboratories, clone 54. (D) Anticorps anti-p190B de Cell Signaling, polyclonal.

## 2.2. Knockout des gènes *ARHGAP35* et *ARHGAP5*

### 2.2.1. Établissement des cellules KO

Pour éteindre l'expression de p190A, nous avons établi un Knockout du gène *ARHGAP35*. Le principe était de designer des ARNg qui guideraient la Cas9 jusqu'au gène *ARHGAP35* pour y créer une coupure double brin. Dû aux processus de réparation aléatoire de l'ADN, certaines des cellules ont, suite à la coupure, comporté des insertions ou délétions dans la séquence du gène. Si ces indels impliquent un décalage dans le cadre ouvert de lecture, alors un codon stop prématuré apparaît presque invariablement. Ceci conduit à une protéine tronquée que la cellule reconnaît et dégrade, ou bien à pas d'expression de la protéine. Dans un cas comme dans l'autre, p190A n'est pas présente.

Nous avons défini 2 ARNcr ciblant préférentiellement le début de la séquence codante d'*ARHGAP35* (Tableau 5). Nous pouvions ainsi tester les deux, et ne garder que celui montrant la meilleure efficacité de modification du gène. Les complexes ribonucléoprotéiques (RNP) ont été créés en associant un ARNg (composé d'un ARNcr et d'un ARNtracr) et une Cas9 HIFI. Ces complexes ont été transfectés dans les cellules Huh7 et HEC-1-A. Deux types de transfection ont été testés : *forward* et *reverse*. Sur les pools de cellules transfectées, le locus d'ADN ciblé a été amplifié par PCR puis séquencé par la technique Sanger. L'analyse des séquences a permis d'attester de l'efficacité de modification (Tableau 3). Nous avons ainsi conclu que, pour les deux lignées, la transfection de l'ARNg 1 en *reverse* avait été la plus efficace. Ce sont donc ces pools de cellules qui ont été utilisés pour la suite de l'expérience.

Tableau 3 : Efficacité de transfection des ARNg pour le Knockout d'*ARHGAP35* sur les pools de cellules Huh7 et HEC-1-A.

		Transfection <i>Forward</i>		Transfection <i>Reverse</i>	
Huh7	ARNg 1	% indels : 1	Score KO : 1	% indels : 53	Score KO : 48
	ARNg 2	% indels : 31	Score KO : 30	% indels : 29	Score KO : 29
HEC-1-A	ARNg 1	% indels : 3	Score KO : 3	% indels : 36	Score KO : 35
	ARNg 2	% indels : 0	Score KO : 1	% indels : 7	Score KO : 7

Scores issus de l'analyse avec le logiciel Synthego (<https://ice.synthego.com>).

% indels : pourcentage d'allèles comprenant une insertion ou délétion au locus.

Score KO : prédiction du pourcentage d'allèles effectivement knockout.

Les cellules transfectées avec l'ARNg 1 ont été triées à raison d'une cellule par puits au cytomètre en flux, puis amplifiées pour créer des clones issus d'une cellule. En faisant cela, nous avons créé de nouvelles lignées cellulaires génétiquement homogènes. Pour chaque clone, l'expression de

p190A a été testée par Western Blot (Figure 31A, B). Les clones ne présentant pas d'expression de p190A ont été validés en amplifiant le locus du gène par PCR, suivi d'un séquençage Sanger. Un exemple représentatif d'analyse des séquences est présenté pour chacune des lignées Huh7 et HEC-1-A sur la Figure 31. Dans le sens de lecture, les chromatogrammes montrent d'abord une séquence nette, puis se brouillent au niveau du site clivé par la Cas9 signifiant que des insertions et délétions sont apparues sur les différents allèles (Figure 31C, D). Grâce à une analyse bioinformatique, les chromatogrammes ont pu être décomposés pour comprendre précisément quelles modifications ont eu lieu. Dans le cas des exemples montrés ici, les insertions ou délétions sont d'un nombre de nucléotide qui n'est pas un multiple de 3 (équivalent à un codon) (Figure 31E, F). Un tel résultat implique donc un décalage du cadre ouvert de lecture et dans la plupart des cas l'apparition d'un codon stop prématuré. Ceci confirme le knockout de p190A dans ces clones. A titre informatif, nous avons testé respectivement 16 et 17 clones pour les lignées Huh7 et HEC-1-A.

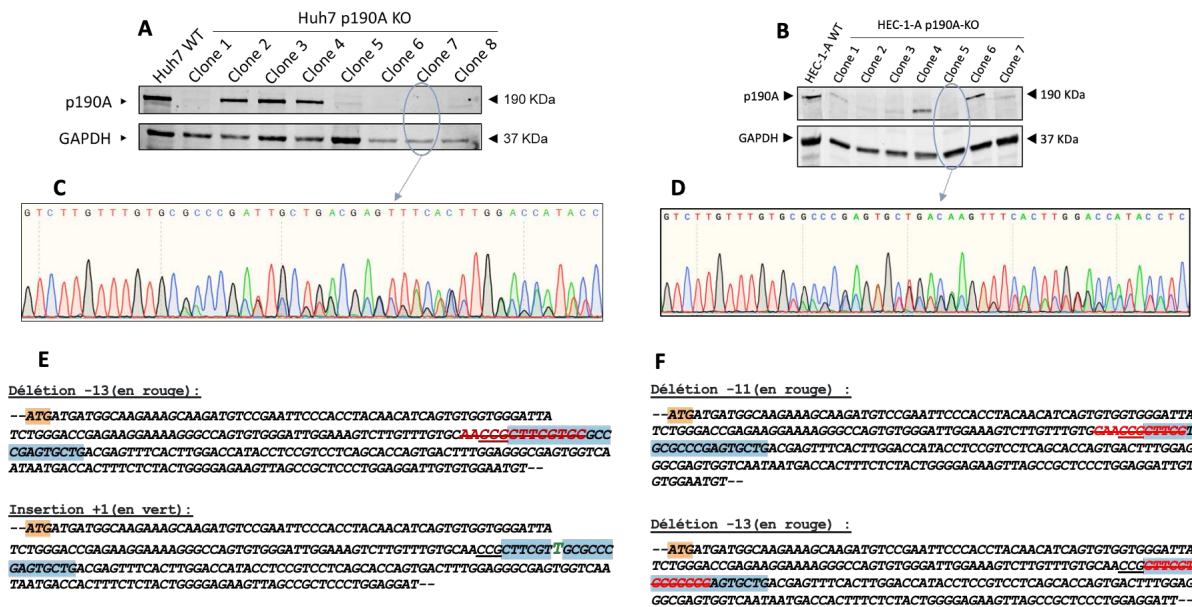


Figure 31 : Exemples représentatifs des analyses effectuées pour valider les clones KO *ARHGAP35*. (A, B) Western Blots montrant l'expression ou non de p190A dans les différents clones Huh7 (A) et HEC-1-A (B). (C, D) Extraits de chromatogrammes issus des séquençages sanger pour le clone 7 Huh7 (C) et pour le clone 5 HEC-1-A (D). (E, F) Décomposition de la séquence du gène *ARHGAP35* pour chaque allèle du clone 7 Huh7 (E) et du clone 5 HEC-1-A (F). Le codon START (ATG) est surligné en orange. La séquence ciblée par l'ARNg est surlignée en bleu et le PAM reconnu par la Cas9 est souligné. Les nucléotides délétés ou insérés suite à la coupure par la Cas9 sont respectivement notés en rouge et en vert.

Pour éteindre l'expression de p190B, la même stratégie a été appliquée. Deux ARNcr ont été choisis (Tableau 5), ciblant le début de la séquence codante d'*ARHGAP5*. Les cellules Huh7 et HEC-1-A ont été transfectées avec les complexes RNP créés. La transfection reverse ayant le mieux fonctionné dans le cas du KO d'*ARHGAP35*, elle a été utilisée pour le KO d'*ARHGAP5*. Sur les pools de cellules

transfectées, le locus du gène ciblé par les ARNg a été amplifié par PCR et séquencé par la méthode Sanger. L'analyse bioinformatique des résultats a indiqué l'efficacité de modification de chacun des ARNg (Tableau 4). C'est l'ARNg 1 qui était le plus efficace pour établir le KO dans les deux lignées.

Tableau 4 : Efficacité de transfection des ARNg pour le Knockout de p190B sur les pools de cellules Huh7 et HEC-1-A.

Transfection Reverse			
Huh7	ARNg 1	% indels : 45	Score KO : 44
	ARNg 2	% indels : 18	Score KO : 15
HEC-1-A	ARNg 1	% indels : 40	Score KO : 35
	ARNg 2	% indels : 10	Score KO : 9

Scores issus de l'analyse avec le logiciel Synthego (<https://ice.synthego.com>).

% indels : pourcentage d'allèles comprenant une insertion ou délétion au locus.

Score KO : prédiction du pourcentage d'allèles effectivement knockout.

Les cellules transfectées avec l'ARNg 1 ont été, comme précédemment, triées au cytomètre en flux afin d'amplifier des clones issus d'une seule cellule. L'expression de la protéine p190B dans ces clones a été testée par Western Blot (Figure 32A, B). Ensuite, le locus ciblé par le gRNA a été amplifié par PCR et séquencé par Sanger. Les clones Huh7 ainsi analysés présentaient un chromatogramme où 3 séquences se superposaient (Figure 32C). Ceci a rendu l'analyse bioinformatique plus complexe. Cependant sur l'exemple du clone 10 présenté ici, les allèles prédits comprenaient -11, -10, -5 ou +1 nucléotide(s). Nous considérons donc que le clone 10 est bien KO pour *ARHGAP5*. Dans le cas des HEC-1-A, les deux allèles ont été plus simplement analysés et nous avons, comme dans le cas d'*ARHGAP35*, pu confirmer le KO du gène *ARHGAP5* (Figure 32D, E).

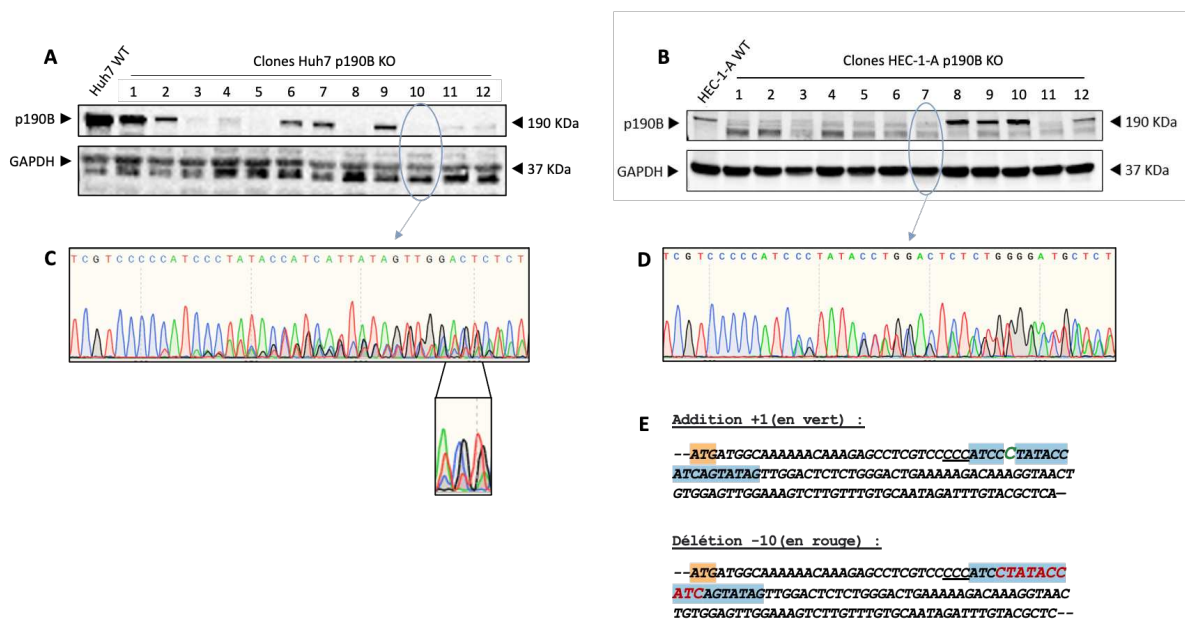


Figure 32 : Exemples représentatifs des analyses effectuées pour valider les clones KO *ARHGAP5*. (A, B) Western Blots montrant l'expression ou non de p190B dans les différents clones Huh7 (A) et HEC-1-A (B). (C, D) Extraits de chromatogrammes issus des séquençages sanger pour le clone 10 Huh7 (C) et pour le clone 7 HEC-1-A (D). Un zoom sur le chromatogramme du clone 10 Huh7 montre la superposition de 3 séquences. (E) Décomposition de la séquence du gène *ARHGAP5* pour chaque allèle du clone 7 HEC-1-A. Le codon START (ATG) est surligné en orange. La séquence ciblée par l'ARNg est surlignée en bleu et le PAM reconnu par la Cas9 est souligné. Les nucléotides insérés ou délévés suite à la coupure par la Cas9 sont respectivement notés en vert et en rouge.

### 2.3. Introduction de mutations associées au cancer dans le gène *ARHGAP35*

L'idée d'introduire des mutations de p190A directement au locus, dans le gène *ARHGAP35* des cellules Huh7, venait en continuité de la précédente étude au laboratoire (Binamé et al., 2016). Dans cette étude, plusieurs mutations associées aux tumeurs ont été analysées. Parmi elles, la délétion  $\Delta 865-870$  et la mutation S866F ont été montrées comme activant l'activité GAP de p190A et conférant une migration aléatoire aux cellules Huh7. De plus, la délétion du domaine fonctionnel PLS de p190A a un impact similaire à ces mutations. Ces altérations de la protéine ont été étudiées grâce à des transfections transitoires. Pour pouvoir étudier plus avant leur impact sur les phénomènes d'invasion et de migration cellulaire, il était nécessaire d'établir des lignées exprimant stablement p190A mutée. C'est la raison pour laquelle nous avons utilisé CRISPR/Cas9 pour tenter de les générer.

### 2.3.1. Délétion $\Delta$ 865-870

La délétion  $\Delta$ 865-870 est une délétion de 5 acides aminés dans la protéine p190A, qui sont codés par 15 bases dans le gène *ARHGAP35* (Figure 33). La stratégie consistait à retirer ces 15 bases de l'ADN génomique des cellules. Pour cette délétion, nous avons mis au point un complexe RNP composé d'un ARNcr choisi pour pouvoir s'hybrider sur la séquence à déléter, associé à un ARNtracr et à une Cas9 HIFI. Le PAM est ainsi positionné de manière à ce que la Cas9 clive l'ADN dans la séquence à supprimer. Ce complexe a été utilisé avec une matrice de recombinaison. Celle-ci est une séquence d'ADN identique à la séquence cible sans les 15 bases à retirer, et longue de 100 bases (50 bases de part et d'autre de la séquence à enlever) (Tableau 5). L'utilisation de ces éléments permet la mise en place, dans les cellules, du processus de recombinaison homologue. Pour réparer l'ADN suite à la coupure par la Cas9, les cellules prennent la matrice de recombinaison comme modèle. Elles répliquent donc leur ADN sans les 15 bases codant pour les 5 acides aminés à déléter.

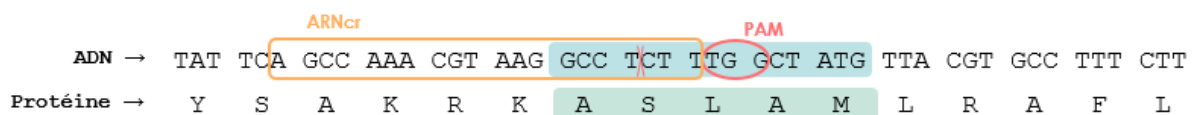


Figure 33 : Représentation schématique de la stratégie  $\Delta$ 865-870. La séquence protéique de p190A est représentée en bas, avec la séquence à déléter en vert (acides aminés A, S, L, A, M). La séquence en ADN correspondante est représentée en haut, avec les codons à déléter en bleu. L'ARNcr est complémentaire de la séquence encadrée en orange à laquelle il peut s'apparier. La Cas9, guidée par l'ARNcr, reconnaît la séquence PAM encadrée en rouge (ici, TGG). Elle clive l'ADN 3 bases en amont du PAM, au site représenté par une croix rouge.

Les complexes ARNcr, ARNtracr et Cas9 ont été transfectés dans les cellules Huh7. Afin d'optimiser la recombinaison homologue, un réactif appelé *HDR Enhancer* (IDT) a été testé à plusieurs concentrations. Comme dans le cas de l'établissement du knockout, une PCR a été réalisée sur le pool de cellules transfectées (Figure 34). Suite à la PCR effectuée avec les amorces appelées S1 et AS1-2, l'amplicon attendu de 277 paires de bases apparaît. La délétion attendue est donc bien présente dans les cellules. Cependant, la présence d'une seconde bande plus haute sur cette PCR, ainsi que le fait que la bande sur la PCR S1 – AS1-1 ne soit pas nette, indiquent que des événements de recombinaison inattendus ont pu avoir lieu au site de coupure.



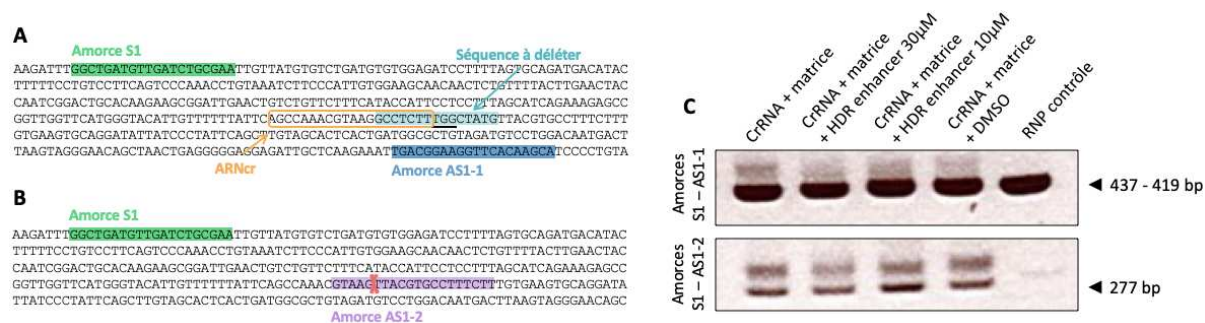
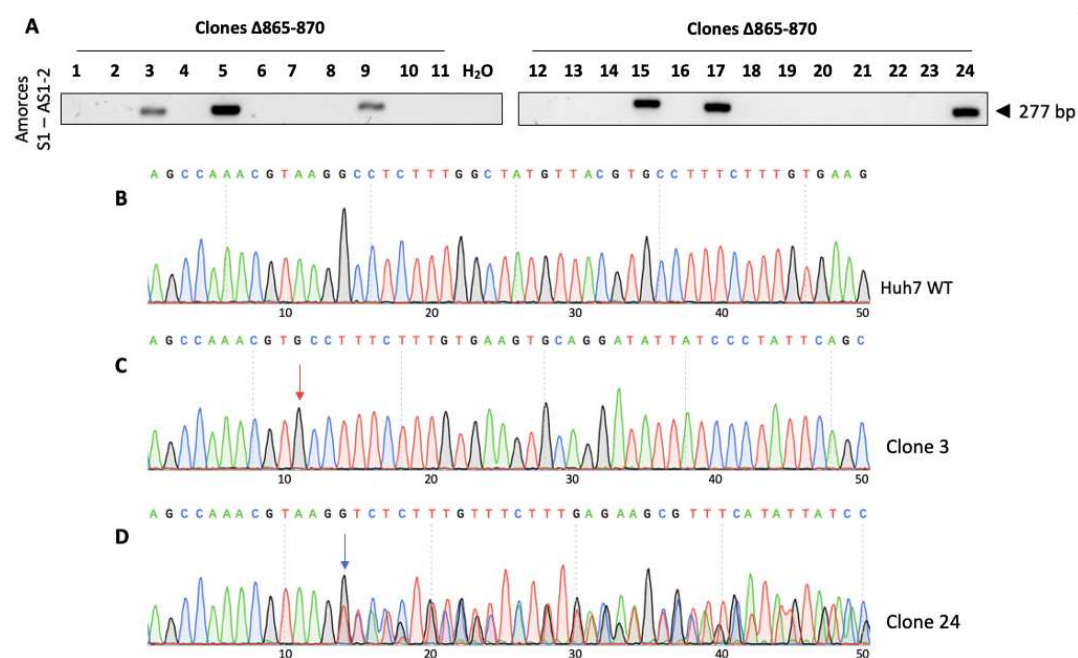


Figure 34 : Test des différentes conditions de transfection des complexes RNP  $\Delta$ 865-870 dans les cellules Huh7. (A) Représentation de la séquence d'ADN à déléter (turquoise), du site de fixation de l'amorce S1 (vert) et de l'amorce AS1-1 (bleu). Ces deux amorces encadrent la séquence à déléter. Le positionnement de l'ARNcr est encadré en orange. (B) Représentation de la même séquence, après avoir retiré les bases à déléter. La fusion entre les extrémités 3' et 5' est faite au site représenté d'une croix rouge. L'amorce S1 est de nouveau représentée en vert et l'amorce AS1-2, qui chevauche le site de fusion, est représentée en violet. (C) Résultats des PCR effectuées sur les cellules transfectées selon les conditions indiquées, avec les couples d'amorces représentés sur les parties A et B de la figure. Un HDR enhancer, réactif commercial, a été utilisé sur une partie des échantillons pour favoriser la recombinaison homologue. Un complexe RNP ne ciblant aucun gène a été utilisé comme contrôle négatif.

Par la suite, les cellules ont été triées à une cellule par puits dans des plaques 96 puits au cytomètre en flux. Comme précédemment, le but était de créer des clones issus d'une cellule unique. Ces clones ont été amplifiés et criblés par PCR avec les amorces S1 et AS1-2. Dans ce cas, l'amorce antisens ne s'apparie que si la fusion attendue après la délétion des 15 nucléotides a eu lieu. Les clones n°3, 5, 9, 15, 17 et 24 présentent un résultat positif à cette PCR (Figure 35A). Dans le cas des clones pour lesquels aucun signal n'apparaît, l'amorce antisens n'a pas pu s'apparier.

La région de la délétion  $\Delta$ 865-870 a été séquencée pour les clones présentant un résultat positif suite à cette PCR, ainsi que pour un contrôle Huh7 WT. Un extrait des résultats de ce séquençage est présenté (Figure 35B, C, D). Pour le contrôle Huh7 WT, le chromatogramme présente la séquence sauvage de cette région du gène *ARHGAP35*. Le clone 3 présente un chromatogramme net, ce qui signifie que la séquence est homozygote (Figure 35C). Cependant la séquence diffère du WT à partir de la Guanine numérotée 11 (pointée par une flèche rouge). Il y a donc eu une coupure et une fusion à cet endroit. L'alignement de la séquence a montré que la délétion effectuée ici est de 24 bases codant pour 8 acides aminés et conservant le cadre ouvert de lecture. Ce clone présente donc une délétion des acides aminés 864 à 872 de p190A qui sont KASLAMLRL. Pour le clone 24, le chromatogramme présente une séquence identique au WT qui se brouille à partir de la Guanine numérotée 14 (pointée d'une flèche bleue) (Figure 35D). Le chromatogramme se brouille à partir du site où la Cas9 a clivé l'ADN. L'analyse de cette séquence a montré que ce clone est hétérozygote : il présente un allèle sauvage et un allèle avec la délétion attendue  $\Delta$ 865-870. Les autres clones séquencés présentaient tous des événements de recombinaison avec des insertions non attendues (résultats non présentés). Avec les clones qui ont été criblés, nous avons donc obtenus des événements proches, mais pas l'exacte délétion  $\Delta$ 865-870 homozygote que nous recherchions.



**Figure 35 : Criblage par PCR des clones Huh7  $\Delta$ 865-870.** (A) Résultats de la PCR effectuée avec les amorces S1 et AS1-2 dont l’amorce antisens chevauche la fusion créée suite à la délétion. Le contrôle négatif est annoté H<sub>2</sub>O. (B, C, D) Extraits des résultats du séquençage Sanger du site de la délétion sur les cellules contrôle Huh7 WT (B), et sur les clones Huh7  $\Delta$ 865-870 numérotés 3 (C) et 24 (D). Les flèches rouge et bleue représentent les sites de recombinaison suite à la coupure par la Cas9

### 2.3.2. Délétion $\Delta$ PLS

La délétion du domaine PLS est une délétion de 593 acides aminés (F378 – S971), soit 1779 paires de bases dans l’ADN (Figure 36). La totalité du domaine PLS est codée par l’exon 1 du gène *ARHGAP35*. Pour cette délétion, nous avons mis au point des complexes RNP comme précédemment. Deux complexes RNP ont été formés avec deux ARNg différents. La Cas9 est ainsi amenée à effectuer deux coupures dans l’ADN de part et d’autre de la séquence codant pour le PLS. La séquence PAM reconnue par la Cas9 ayant restreint les possibilités, six bases codant pour deux acides aminés (KW) sont déléetées en plus de la séquence codant pour le PLS dans cette stratégie. Étant donné la taille importante du fragment à retirer, nous n’avons pas utilisé de matrice de recombinaison. Les deux coupures générées font que le mécanisme de réparation NHEJ est mis en œuvre dans les cellules. Le but est de sélectionner les cellules où ce mécanisme aura joint les deux extrémités 3’ et 5’ créées sans introduire d’insertion ni délétion supplémentaire dans le gène.

A

```

...VERYIRDAHTFALSCKKNLQVETSARSNVNVDLAFSTLVQLIDKSPGKTKIIPYFEALKQSQOQIAT
AKDKYEWLVSRIKHNHNENWLSVSRKMQASPEYQDYDYLEGTQKAKKLFQHIHRLKHEHIERRKLY
LAALPLAFEAALPNLDEIDHLGCIKAKKLETKPEFLKFFVLEEETPVDATSHIDNMENERIPFDLMD
TVPBAEALYEAHLEKLRNERKRVEMRRAFKFNLETSFFITPGKPWEARSFIMNEDFYQWLEESVYTDI
YGHQKQI IDKAKEEFQELLESELYELELDAKPSKEMGVIQDVLGEEQRFKAIYKSSKQSDAL
ILKHIHFVYHPTKECPSCPACVDAKIEHLISSRFRPSDRNQNLSLDPNIDRINLVILGKDALPES
WPMEIRALCTNDKQVVIDGKMYELSLRPIEGNVRLPVNSFQPTTFQPHGCLCLYNSKESLSYVVEISIE
KSRETLGRRDNHLVHLPLTLILVNKRGTSGETLHSLIQGQQIASKLQCVLPDPAAGIYGRNIN
EKQISQVLKGLLSDKRNINLVSSTASIKDLADVDLRIVMCLMGDPFSADDILFPVLQSQTKSSHCG
SNNSVLELPIGLHKKRIELSVLSYSSFSIRKSRLVHGYIVFYSARKKASLAMLRAFLCEVQDIPI
QLVALTDGAVDVLNDLDSRQLTEGEEIAQIIDGRFTSIPCSQPOHKLEIHPFFKDVVEKKNII EAT
HMYDNAEACSTTEEVFNPSFRAGSPLSNLQDSSEDI EPSYSLFREDTSLPLSKDHSLSMELEGN
DGLSFIMSNFESKLNKVPVPPVKPKPVVHFEITKGDLSYLDQHRDQQRKSVSSPWLQDQDFDPSDY
AEPMDAVVKPRNEENIYSPVHDSQTKIITIRNINAKQSNNGSNGSDSEMDTSSLERGRKVSIVSKP
VLYRTRCTRLGRFASVYRTSFSVGSDDLELGPTRKKEEDQASQYKGDNAVIPYETDEDFRRRNILRSL...

```

B

```

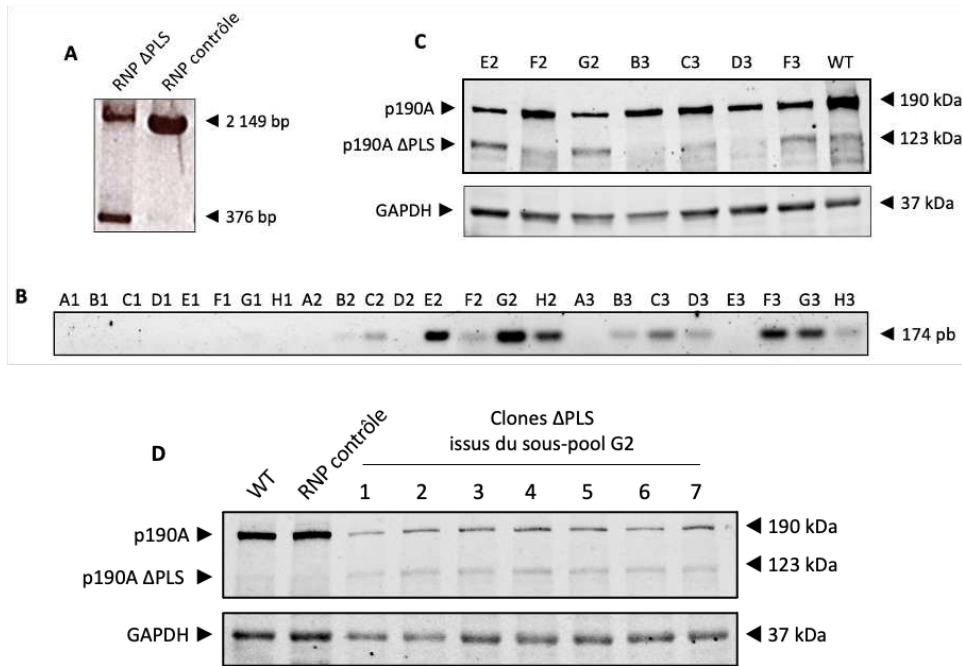
ARNCr 1
CCACGCCTCAAGCATGAGCATATCGAGCGTAGGAGAAAGCTGTACCTGGCAGCCCTGCCATTAGCTTTTGAAGC
TCTTTATACCTAATCTAGATGAATAGACCACCTAAGCTGCATAAAGCCAAAAGCTCTTAGAAACCAAGCCAGA
ATCTCTTG AAGGGTTTGTGTGCTTGAAGAGACCCOATGGGATGCCACCAGTCACATTGACACATGAAAAAG
AACGGATTCCTTTGATTATGGATACCGTCCCTGCAGAGCAGCTATACGAGGCCACTTAGAGAAGCTGAGGA
ACGAAAGGAAAGAGTTGAGATGCGAAGGCCCTTAAAGAAACCTCGAGACTTCTCTTTTATAACTCCCGGAA
AGCCTTGGAGAGGCCCTAGTTTATATGATGAGGATTTCTACAGTGGCTGGAGAAATCTGTATAGATG
ATATTTATGGCAACACCAAAAGCAATTTATAGATAAAGCAAGAGAAATTTACAGAGTCTCTTGGAAATTT
CAGATTTGTTTATGAAGTGGAGCTGGATGCTAAGCCAGCAGAGGAAGATGGTGTATTACAGATGTCCTGG
GAGAGAAACAGCGATTAAAGCATTACAAAGCTTCAAGCAGAGCTGTATGCCCTTATTCTGAACACATTCAAT
TTGTGTACCCCAACAAAGAGACATGCCCCAGCTGCCAGCTTGTGGAGCCTAGATTGAGCATTGATTA
GTCTCGGTTTATCGGCGCTGACCGGAATCAGAAAATTCACCTCTGACCCTAAGATTAGATAATCAACT
TGTTATATTGGCAAGAGCGCTTCCCGAGAGTTGCCAATGAGATTGAGCTTTGTACAAATGATGACA
AGTATGTAGATAGTAAATGTATGAGCTTCCCTGAGCCAAATAGAGGGGAATGTCAGCTTCTGTGAGACT
CTTTCAGAGCCCAACATTCAGCCACCGCTGTCTGTCTTACAATTAAGAAAGTATGATCTCTATGATG
TGGAAAGTATAGAGAAGTAGAGAGTCCACGCTGGCCCGCGGGATAATCAATTAGTCCATCCCTTACAT
TAATTTGGTTAACAAGAGAGAGACACAGTGGAGAGACTGTGATAGCTTAATACAGCAAGTCAACAAATTTG
CTAGCAACTTCAGTGTCTTTCTGACCTGCTTCTGCTGGCATTGGTTACGGAGCAGCAATTAATGAAAGC
AAATCAGTCAAGTTTGAAGGACTCTGACTCTAAGCTAATTAACCTGGTCACTTACTGCTAGCATCA
AAGATTGGCTGATGTTGATCTGCGAATTTGTTATGTTGCTGATGTGGAGATCCTTTAGTGGAGATGACATAC
TTTTCTCTGCTTTCAGTCCCAACCTGTAATCTTCCATTTGGGAAGCAACACTCTGTTTACTTGAAGTAC
CAATCGGACTGACAGAAAGCGGATTTGAACTGTCTTTCTTACATCACTCTCTTTAGCATAAGAGCC
GGTTGGTTATGGTACATGTTTATTCAGCCAAAGTAAAGCCCTTTGGCTATGTTAGCTGCTCTCTT
TGAAGTGGAGATATATCCCTATTCAGCTGTAGACTCACTGATGGGCTGTAGATGCTCGCAAGTACT
TAGTAGGCAACAGCTAAGTGGGGAGGAGATTGCTCAGAAGATTGACGAGGTTTAACTCCCGGGAGGA
GCCACCCAGCATAACTGAGATTTTCCACCTTTTAAAGATTGGTGGAAAAAAGAACATATCGAGG
CTCATATATGATGATAATGCTGCGAGGCTGTAGCACCACAGAGGTTTAACTCCCGGGAGGA
TCACCGCTGCAACTCAACTGAGGATTCAGAAGAGATATCGAGCATTCTAGCCTGTTTGGAGAGAC
AGTCACTGCTCTCTGCAAGACCATTTAAGCTCTCTATGGAAGTGGAGGAAATGATGGCTGCTCTTC
ATTATGAGCAATTTGAGAGTAACTGAACAACAAAGTACCTCCGCGCTCAACCAAGCCCTCTGCTCAATTT
ARNCr 2

```

**Figure 36 : Représentation schématique de la stratégie ΔPLS.** (A) Représentation d'un extrait de la séquence protéique de p190A, comprenant le PLS (bleu) et deux acides aminés supplémentaires qui sont délétés dans cette stratégie (rouge). (B) Représentation d'un extrait de la séquence du gène *ARHGAP35*, contenant la séquence codant pour le PLS (bleu). Les deux ARNcr utilisés sont représentés en vert et en jaune sur la séquence. Les deux motifs PAM sont soulignés (respectivement TGG et CGG) et les deux sites de coupure par la Cas9 sont indiqués par des croix rouges. Suite à ces deux coupures, l'évènement attendu est que les extrémités 3' et 5' générées soient jointes par le processus de réparation NHEJ, générant une délétion de la séquence présente entre les deux sites de coupure (PLS).

Les complexes RNP ont été transfectés dans les cellules Huh7. Une PCR a été effectuée sur le pool de cellules transfectées, avec des amorces encadrant le domaine PLS. Le résultat a montré la présence d'une bande à 2149 pb correspondant au PLS entier. La bande attendu à 376 pb correspondant au PLS délété était présente mais de faible intensité (Figure 37A). Nous avons alors cherché à obtenir des groupes de cellules enrichis en cellules transformées. Pour cela, grâce au cytomètre en flux, 10 cellules par puits ont été ensemencées dans une plaque 96 puits. Nous les avons appelé des « sous-pools ». Ces cellules ont été amplifiées et une partie d'entre elles a été testée par PCR et Western Blot (Figure 37B, C). Les résultats de ces deux expériences indiquent que les sous-pools E2, G2 et F3 étaient les plus enrichis en cellules comportant la délétion ΔPLS. Ils ont donc été utilisés afin de former des clones grâce au cytomètre en flux, en triant une cellule par puits.

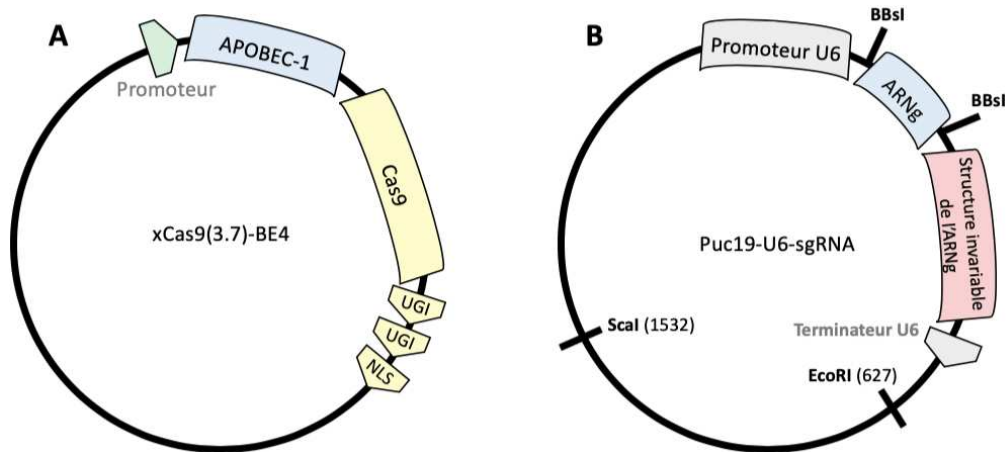
Finalement, la manière évidente de vérifier la délétion du domaine PLS dans les clones finaux était de révéler la taille de la protéine p190A. Le résultat obtenu a été similaire dans les clones issus des 3 sous-pools. Un résultat représentatif est indiqué ci-dessous (Figure 37D). L'anticorps ciblant p190A fait apparaître deux bandes claires dans les clones ΔPLS : à 190KDa (protéine entière) et à 123KDa (p190A ΔPLS). Les cellules obtenues grâce à cette technique étaient donc toutes hétérozygotes avec un allèle sauvage et un allèle ΔPLS. Nous n'avons pas réussi à obtenir de clone homozygote ΔPLS dans cette lignée Huh7.



**Figure 37 : Criblage des cellules transfectées avec les complexes RNP pour induire la délétion  $\Delta$ PLS.** (A) PCR effectuée sur les cellules Huh7 transfectées avec les complexes RNP  $\Delta$ PLS ou avec un complexe RNP contrôle ne ciblant aucun gène. (B) PCR effectuée sur les sous-pools de cellules Huh7 transfectées avec les complexes RNP  $\Delta$ PLS puis ensemencées à 10 cellules par puits. L’amorce sens utilisée est positionnée sur la fusion générée après délétion du PLS. (C) Western Blot réalisé sur les sous-pools de cellules  $\Delta$ PLS présentant un résultat positif suite à la PCR. La protéine modifiée p190A  $\Delta$ PLS apparaît à 123 kDa. (D) Western Blot réalisé sur les clones finaux  $\Delta$ PLS, montrant l’apparition d’une p190A à 123 kDa en plus d’une p190A résiduelle à 190kDa.

### 2.3.3. Mutation S866F

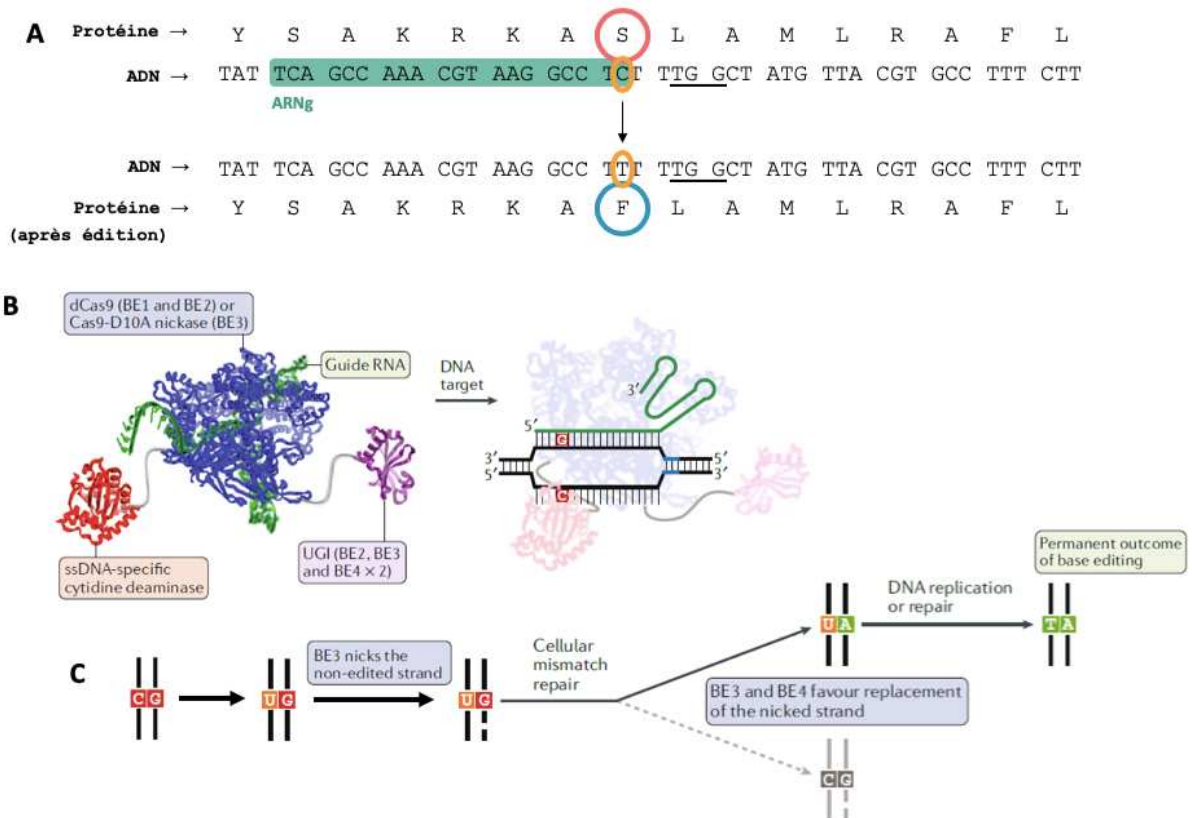
Pour générer la mutation S866F, deux plasmides ont été testés : xCas9(3.7)-BE4 et xCas9(3.7)-BE3 (Figure 38A). Ceux-ci sont composés du gène codant pour une Cas9 associé au gène APOBEC1 codant pour une cytidine déaminase. C’est l’expression de cette dernière qui permet la création de la mutation. Ces plasmides ont été associés à un vecteur pUC19 modifié dans lequel nous avons inséré des ARNg complémentaires de la séquence d’ADN génomique à modifier (Figure 38B).



**Figure 38** : Illustration schématique des plasmides utilisés pour créer la mutation ponctuelle S866F. (A) Le plasmide xCas9(3.7)-BE4 est composé du gène codant pour une Cas9 ne générant que des coupures simple brin (nickase). Le gène APOBEC-1 y est associé et code pour une cytidine déaminase dont le rôle est de retirer un groupement amine d'une cytidine pour en faire un uracile. Les deux gènes UGI codent pour une protéine inhibitrice des uracile-ADN glycosylases, afin que l'uracile créé ne soit pas retiré de l'ADN par la cellule. Enfin, la séquence NLS (*Nuclear Localization Sequence*) adresse le complexe protéique formé au noyau. Le plasmide xCas9(3.7)-BE3 a une construction similaire (Rees and Liu, 2018). (B) Le plasmide pUC19 modifié est utilisé pour insérer une séquence variable d'ARNg de notre choix entre les sites de restriction BbsI. Il comprend déjà la partie codant pour la structure invariable de l'ARNg.

La mutation ponctuelle S866F a été introduite par un système dit de « *base editing* » (Figure 39). La stratégie établie pour créer cette mutation ne comprenait pas de coupure double brin par la Cas9. En effet, les plasmides utilisés contiennent le gène codant pour une Cas9 partiellement inactivée ne pouvant effectuer que des coupures simple brin (nickase). Celle-ci est associée à une cytidine déaminase et à un ARNg. Dans la cellule, après expression des plasmides, le complexe Nickase-Cytidine déaminase-ARNg est adressé précisément jusqu'à la zone codant pour la sérine 866 d'*ARHGAP35*, où l'ARNg vient s'hybrider (Figure 39A). La cytidine déaminase retire un groupement amine de la cytidine du codon TCT qui code pour cette sérine. La cytidine devient une uridine qui est lue comme une thymine par l'ADN polymérase. Ainsi, au moment de la réplication de l'ADN, une adénine est placée sur le brin opposé. Finalement, le codon TCT est modifié en TTT, et il ne code plus pour une sérine mais pour une phénylalanine.

L'action nickase de la Cas9 permet d'optimiser ce mécanisme. Le complexe Cas9 – Cytidine déaminase pouvant « entourer » la double hélice d'ADN (Figure 39B), la Cas9 clive le brin opposé à celui de la cytidine désaminée. Ceci permet d'éviter que la cellule ne mette en place un processus de recombinaison homologue qui se baserait sur le brin complémentaire pour remédier à la présence anormale de l'uridine dans l'ADN. La cellule favorise la réparation du brin clivé, et une thymine est placée face à l'uridine. Elle-même, à la prochaine réplication, est changée en adénine.



**Figure 39 : Représentation schématique de la stratégie S866F.** (A) Extrait de la séquence de la protéine p190A suivie de la séquence d'ADN codante (en haut). La sérine 866 est entourée en rouge. L'ARNg s'apparie sur la séquence en vert, et conduit la Cas9 à reconnaître le PAM souligné. Grâce à l'action de la cytidine déaminase, la cytidine du codon TCT devient une thymine. Le codon TTT code alors pour une Phénylalanine (entourée en bleu). (B) Représentation schématique du complexe formé par la Cas9 (bleue), la cytidine déaminase (rouge) et l'ARNg (vert). Suite à l'appariement de l'ARNg sur l'ADN dont il est complémentaire, le complexe vient entourer la double hélice. La Cas9 clive le brin sur lequel l'ARNg est apparié, et la cytidine déaminase exerce son activité sur le brin opposé. (C) Sous l'action de la cytidine déaminase, la cytidine devient une uridine (U). Pour empêcher l'excision de cette base anormale dans l'ADN, la Cas9 clive le brin opposé. Le mécanisme de réparation favorise ainsi l'apparition d'une paire de base T-A au lieu de C-G. (Figures B et C modifiées d'après Rees & Liu, 2018)

En pratique, les cellules Huh7 ont été transfectées puis amplifiées, et un séquençage de la région codant pour la sérine 866 a été effectué (Figure 40). Les chromatogrammes obtenus suite à l'utilisation des deux plasmides xCas9-BE3 et xCas9-BE4 sont similaires. La séquence est identique à la séquence sauvage. La cytidine marquée d'une flèche bleue sur les chromatogrammes est celle du codon TCT codant pour la sérine 866. Si elle avait été déaminée comme attendu, un signal rouge représentant une thymine serait apparu sous le signal représentant la cytosine (bleu). Ce n'est pas le cas ici. Cette technique était encore très récente au moment où nous l'avons mise en œuvre, et donc mal connue (Rees and Liu, 2018). On sait aujourd'hui que l'efficacité des systèmes Cas9/cytidine déaminase est très dépendante du contexte génétique, voire épigénétique, dans lequel se trouve le site à modifier. C'est probablement la raison pour laquelle cette modification n'a pas fonctionné dans notre cas.

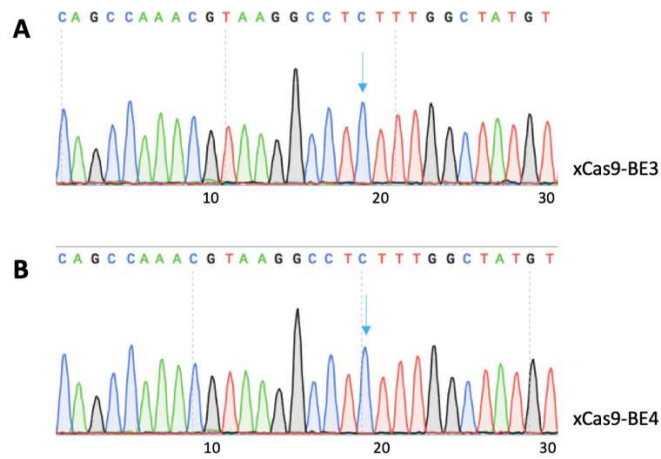


Figure 40 : Extrait des chromatogrammes suite au séquençage des cellules Huh7 transfectées pour induire la mutation ponctuelle S866F. Le séquençage a été effectué par la méthode de Sanger. Les flèches bleues indiquent la cytidine ciblée par la cytidine déaminase. (A) Cellules transfectées avec le plasmide xCas9-BE3. (B) Cellules transfectées avec le plasmide xCas9-BE4.

### 3. Matériel et méthodes

#### Culture cellulaire

La lignée cellulaire Huh7 a été cultivée dans un milieu DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) contenant 4,5g/L de glucose et du Glutamax (Gibco). Le milieu a été complété avec 10% de sérum de veau foetal (Eurobio). La lignée HEC-1-A a été cultivée dans un milieu *McCoy's 5a Modified* contenant du Glutamax (Gibco), et complété avec 10% de sérum de veau foetal (Eurobio). Toutes les cellules ont été cultivées dans une atmosphère humidifiée à 37°C et à 5% de CO<sub>2</sub>. Les deux lignées utilisées pour ce travail ont été commandées à l'*American Type Culture Collection* (ATCC). Elles ont été authentifiées de manière régulière et l'absence de mycoplasme a été vérifiée par PCR.

#### Systèmes CRISPR/Cas9 à base de complexes ribonucléoprotéiques

Les séquences des ARNcr ont été définies pour s'apparier aux séquences cibles dans les gènes *ARHGAP35* et *ARHGAP5* (Tableau 5). Elles ont été définies grâce au logiciel CRISPOR (<http://crispor.tefor.net>), et validées grâce au logiciel IDT ([https://www.idtdna.com/site/order/designtool/index/CRISPR\\_SEQUENCE](https://www.idtdna.com/site/order/designtool/index/CRISPR_SEQUENCE)). Ces ARNcr ont été mélangés à concentration identique (200µM) avec des ARNtracr puis laissés 5 minutes à 95°C pour former les duplex ARNcr + ARNtracr. Les duplex ont été ajoutés à une protéine Cas9 HIFI (*High-fidelity*) (IDT) pour former les complexes ribonucléoprotéiques complets. Un réactif Cas9 PLUS (Invitrogen) a été ajouté au mélange pour optimiser la formation des complexes. Après 5 minutes d'incubation à température ambiante, la matrice de recombinaison a été ajoutée quand nécessaire (4µM).

Tableau 5 : Tableau récapitulatif des séquences d'ARNg et de matrices d'ADN utilisées avec les complexes RNP CRISPR/Cas9.

Stratégie	Éléments utilisés	Séquences
KO p190A	2 ARNcr testés	ARNcr 1 : 5' -CAGCACTCGGGCGCACGAAG-3' ARNcr 2 : 5' -TGCAGGGCCGTGCTTTCGATG-3'
KO p190B	2 ARNcr testés	ARNcr 1 : 5' -CTATACTGATGGTATAGGAT-3' ARNcr 2 : 5' -TCAGTATAGTTGGACTCTCT-3'
Δ865-870	ARNcr Matrice de recombinaison	5' AGCCAAACGTAAGGCCTCTT 3' 5' -AGAGCCGGTTGGTTCATGGGTACATTGTTTTT TATTCAGCCAAACGTAAGTTACGTGCCTTTCTTTG TGAAGTGCAGGATATTATCCCTATTCAGCTTGT-3'
ΔPLS	2 ARNcr utilisés ensemble	5' -CCAAGCCAGAATTCTTGAAG-3' 5' -AAGAGGTGTTTAACTCCCC-3'



### **Système CRISPR/Cas9 à base de cytidine déaminase**

Pour générer la mutation S866F, les plasmides xCas9(3.7)-BE3 et xCas9(3.7)-BE4 ont été offerts par David Liu (Addgene plasmides #108380 et #108381). La séquence codant pour l'ARNg a été clonée au sein d'un plasmide pUC19 modifié. Pour cet ARNg, deux oligonucléotides ont été utilisés : 5'-ACACCGAGGCCTCTTTGGCTATGTTAG-3' et 5'-AAAACATAACATAGCCAAAGAGGCCTCG-3' (Eurogentec). Les extrémités de ces fragments d'ADN ont été phosphorylées grâce à une polynucléotide kinase T4 (Fermentas) et de l'ATP (1mM), avec lesquels ils ont été incubés 30 minutes à 37°C dans un tampon adéquat (Fermentas). Ces oligonucléotides étant complémentaires, ils ont ensuite été hybridés par une incubation de 5 minutes à 95°C puis un retour lent à température ambiante. Le plasmide pUC19 modifié a été linéarisé par digestion enzymatique par BbsI (50ng/μL) et déphosphorylé grâce à une phosphatase FastAP (Fermentas). Les extrémités cohésives simple brin ACAC et AAAA permettent un clonage dans ce vecteur pUC19 modifié. Ce clonage a été réalisé à l'aide du kit Quick Ligation™ (New England Biolabs).

### **Transfections**

Les transfections de complexes RNP ont été effectuées sur des cellules Huh7 et HEC-1-A adhérentes (*forward*) ou non adhérentes (*reverse*), à raison de  $4 \cdot 10^4$  cellules en plaque 96 puits. Le réactif CRISPMAX™ (ThermoFisher Scientific) a été dilué dans de l'Opti-MEM, et cette dilution a été ajoutée aux complexes RNP. Après 20 minutes d'incubation à température ambiante, ce mélange a été ajouté dans le milieu de culture des cellules. Le milieu de culture a été changé 24 heures après la transfection. Les transfections d'ADN ont été effectuées sur des cellules adhérentes, 24 heures après l'ensemencement. Les cellules Huh7 ont été transfectées à environ 70% de confluence avec de la PromoFectin-Hepatocyte (PromoCell), selon le protocole du fournisseur.

### **Criblage par PCR**

Lors d'un passage,  $4 \cdot 10^4$  cellules ont été centrifugées 5 minutes à 1 000 rpm. Le culot cellulaire a été lavé avec du PBS 1X. La PCR a été effectuée directement sur les cellules grâce au kit *Phire Tissue Direct PCR Master Mix* (ThermoFisher Scientific). Pour cela, un additif permettant la libération de l'ADN a été dilué dans un tampon associé, selon les recommandations du fournisseur. Le culot cellulaire a été re-suspendu dans cette solution. Après 5 minutes d'incubation à température ambiante, les échantillons ont été chauffés 2 minutes à 98°C. La PCR a été réalisée dans le mix PCR *Phire Tissue Direct PCR Master Mix*. Les amorces utilisées sont présentées dans le Tableau 6. Les ADN amplifiés ont été séquencés par la méthode Sanger (Genewiz). L'analyse et la décomposition des chromatogrammes ont été effectuées grâce aux logiciels Synthego (<https://ice.synthego.com/#/>) et Tide (<https://tide.nki.nl/>).

Tableau 6 : Liste des amorces utilisées dans le cadre du criblage des cellules modifiées par CRISPR/Cas9.

Identification de l'amorce	Séquence	Température de fusion (T <sub>m</sub> )	Stratégie associée
KO-A S1	5' -GCGATGAGAGGTGGTGAACA-3'	65,1°C	KO p190A
KO-A AS1-1	5' -CAGCTGATGCAAGCTTGGTC-3'	64,8°C	KO p190A
KO-A AS1-2	5' -GCTTCCGTCTGGCATTGT-3'	64,5°C	KO p190A
KO-B S1	5' -TATGGTGCTTTGTTGTAAACATCT-3'	62,1°C	KO p190B
KO-B AS1	5' -TATGGTGCTTTGTTGTAAACATCT-3'	65°C	KO p190B
S1	5' -GGCTGATGTTGATCTGCGAA-3'	60,1°C	Δ865-870 et S866F
AS1-1	5' -TGCTTGTGAACCTTCCGTCA-3'	61,5°C	Δ865-870 et S866F
AS1-2	5-AAGAAAGGCACGTAACCTTAC-3'	54,9°C	Δ865-870
S2	5' -AGCATGAGCATATCGAGCGT-3'	61,2°C	ΔPLS
AS2	5' -ACAGGCTGTAAGATGGCTCG-3'	61,5°C	ΔPLS
S3	5' -CCGCCTCAAGCATGAGCATA-3'	62,1°C	ΔPLS
AS3	5' -TGACTGGCGGAGGTACTTTG-3'	61,3°C	ΔPLS
S4	5' -AGGAGAAAGCTGTACCTGGC-3'	61,2°C	ΔPLS
AS4	5' -CCCGGGCAAGAATTCTGG-3'	62,6°C	ΔPLS
S5	5' -AAGCCAGAATTCTTGCCCG-3'	62,7°C	ΔPLS
AS5	5' -AGACAGCCATCATTCCCT-3'	60,8°C	ΔPLS

### Western Blot

Les cellules ont été lysées de façon mécanique, sur glace, à l'aide d'un grattoir dans un tampon Ripa (50 mM Tris HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.5% sodium deoxycholate, 5mM EDTA, 0.1% SDS) complété avec des inhibiteurs de protéases 1X (Complete Mini EDTA, Roche) de phosphatases 1X (PhosphoSTOP, Roche). Trente µg de lysat protéique ont été repris dans du tampon Laemmli (Biorad)/β-mercaptoéthanol (Sigma), et les protéines ont été dénaturées à 95°C pendant 5 minutes. Les échantillons ont été déposés dans un gel de polyacrylamide 10% (kit Fast Cast, Biorad), dont la migration a été faite dans du tampon de migration (Tris Base 6g/l, Glycine 28,8g/l, SDS 0,1%). Les protéines ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose grâce au système TransBlot turbo (BioRad). La membrane a été saturée avec du tampon de blocage TBS-T/BSA 5%. Les anticorps primaires ont été incubés à 4°C sur la nuit, dilués au 1/1000ème dans du TBS-T/5% BSA. Les anticorps utilisés sont les suivants : anti-p190A et anti-p190B monoclonaux de souris (respectivement 610149 et 611612, BD Transd. Lab.), anti-GAPDH polyclonal de lapin (sc-25778, Santa-Cruz Biotechnology). Après 3 rinçages au TBS-T, les membranes ont été incubées dans des anticorps secondaires (IRDye, LI-COR, 1/5000ème) pendant une heure à température ambiante, sous agitation. Trois rinçages ont été effectués au TBS-T avant de révéler les membranes avec le système Chemidoc (Biorad).

### **Caractérisation fonctionnelle**

La prolifération a été analysée *via* la confluence des cellules dans un système IncuCyte®. La migration a été analysée en effectuant une blessure dans un tapis cellulaire. La fermeture de la blessure a été mesurée grâce au système IncuCyte®. Pour analyser la dégradation de la matrice extracellulaire, les cellules ont étéensemencées sur une matrice de gélatine fluorescente Oregon 488 (Invitrogen) surplombée de Collagène I de queue de rat (Corning), comme indiqué dans Di Martino et al., 2017. Après 48 heures sur cette matrice, les cellules ont été fixées avec du paraformaldéhyde 4%, et une immunofluorescence a été réalisée. La gélatine a été photographiée au microscope à épifluorescence, et l'aire de dégradation a été mesurée grâce au logiciel Image J.

## Partie 2 – Étude de l'impact des p190RhoGAPs dans le cancer de l'endomètre

---

1. Article : p190A/*ARHGAP35* and p190B/*ARHGAP5* proteins in endometrial cancer, a novel cancer-relevant paralog interaction

## p190A/ARHGAP35 and p190B/ARHGAP5 proteins in endometrial cancer, a novel cancer-relevant paralog interaction

Mathilde PINAULT<sup>1</sup>, Capucine HERAUD<sup>1</sup>, Véronique NEAUD<sup>1</sup>, Valérie VALESCO<sup>2</sup>, Valérie PROUZET-MAULEON<sup>3</sup>, Béatrice TURCQ<sup>3</sup>, Anne-Aurélié RAYMOND<sup>1,4</sup>, Sabrina CROCE<sup>2</sup>, Valérie LAGREE<sup>1</sup>, Violaine MOREAU<sup>1,#</sup>

<sup>1</sup> BRIC (BoRdeaux Institute of onCology), UMR1312, INSERM, Univ. Bordeaux, F-33000, Bordeaux, France;

<sup>2</sup> Department of Biopathology, Institut Bergonié, 33076 Bordeaux, France;

<sup>3</sup> CRISP'Edit, UAR 005 TBMcore, Bordeaux, F-33076, France

<sup>4</sup> Oncoprot, UAR 005 TBMcore, Bordeaux, F-33076, France.

# Corresponding author

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

**Running title:** p190A and p190B paralogs in endometrial cancers

**Abbreviations:** The abbreviations used are: CNV, copy number variation; Cter, Carboxy-terminal; GAP, GTPase-Activating Protein; GBD, GTP-binding domain; GTPase, guanosine triphosphate hydrolase; HTM; Human Trabecular Meshwork; Nter, Amino-terminal; PLS, protrusion localization sequence; Ras, Rat sarcoma; Rho, Ras homolog; WT, wild-type.

## ABSTRACT

Endometrial cancer is the first gynecological malignancy worldwide, with an estimated 320 000 new cases annually. Several studies highlight *ARHGAP35* as a new significantly mutated gene in these tumors. It encodes for the protein p190RhoGAP-A, which is a major regulator of the small GTPases family of proteins. By analyzing human endometrial cancer samples, we found a co-occurrence of mutations in *ARHGAP35* and *ARHGAP5* genes and we reported that both are less expressed at the mRNA level in tumoral samples compared to healthy tissues. We were interested in understanding the impact of p190A/B under-expression in endometrial cancer and to study the relationship between the two paralogs. To do so, we have used CRISPR/Cas9 to generate HEC-1-A knockout cells for p190A and p190B. We found that removal of each paralog led to a similar actin remodeling phenotype with the formation of Cross-Linked Actin Networks (CLANs), dependent on Rho/ROCK pathway. A proteomic analysis on p190A and p190B knockout cells also highlighted similar affected functions. Finally, our study demonstrates a synthetic lethality between both p190A and p190B where removal of both is deleterious in endometrial cancer cells, unveiling a potential actionable vulnerability.

## INTRODUCTION

Endometrial carcinoma is one of the most common malignancies of the female reproductive system. The vast majority (over 90%) of endometrial tumors are diagnosed in women over the age of 50. Histologically, endometrial carcinomas are divided into two types (Type I and Type II). Type I endometrial carcinomas representing more than 80% of endometrial carcinomas are endometrioid, oestrogen-dependent adenocarcinomas. Type II endometrial carcinomas are oestrogen-independent, such as uterine papillary serous carcinoma and clear cell carcinomas. Molecular analysis has divided endometrial carcinomas into 4 subtypes: the *POLE*-mut subtype, which is ultramutated and associated with *POLE* (encoding DNA polymerase Epsilon) mutations; the mismatch repair-deficient subtype, which is hypermutated and associated with microsatellite instability; a subtype associated with TP53 mutations with high copy number variation (CNV); and finally a subtype with no particular abnormality and low CNV (1, 2). These four molecular classes are correlated with patient survival: while *POLE*-mutated tumours are associated with a good prognosis, TP53-mutated tumours have a poor prognosis (1). With the development of new therapeutic strategies, survival rates for patients with endometrial carcinomas have improved considerably. However, many patients respond poorly to treatment and rapidly develop recurrence and metastasis. Therefore, understanding the underlying mechanisms of tumour cell proliferation, migration and invasion is important to explore new targets for treating patients with endometrial carcinomas.

Sequencing of tumour exomes has identified *ARHGAP35* as a gene significantly mutated in 14% of endometrial tumours (3, 4), placing *ARHGAP35* in the list of the 30 most frequently mutated genes in human cancers. The *ARHGAP35* gene encodes p190RhoGAP-A (p190A), which belongs to the family of GTPase-Activating Proteins (GAPs), proteins that regulate the activity of small GTPases of the Rho family. Nevertheless, this gene appears in the list of strict paralogs, together with the *ARHGAP5* gene, which encodes p190RhoGAP-B (p190B) (5) (<http://ohnologs.curie.fr/>). Whereas *ARHGAP35* was recently studied in endometrial cancer (6, 7), the status and impact of its paralog remains unknown. In most of human cells, the two paralogs *ARHGAP35*/p190A and *ARHGAP5*/p190B are co-expressed (8–10). These proteins of 190kDa show over 51% sequence identity, and share the same domain organization with their GAP domain responsible for the GAP activity at their C-terminal. In addition, from the N-terminal to the C-terminal, they show a GBD domain for "GTP Binding Domain" capable of binding GTP, four FF domains that are involved in interactions with protein partners and a central domain composed of two pseudo-GTPase domains. Recently, we identified that a part of the central domain in p190A is responsible for the auto-inhibition of the GAP activity and for the regulation of the protein localization (11–13). Through the control of RhoA, p190 proteins are key regulators of the organisation of the actin cytoskeleton. Both proteins co-localise to structures involved in migration

such as lamellipodia. We have also shown that p190A and p190B localise to structures involved in extracellular matrix degradation and cell invasion such as invadosomes (12).

Paralogous genes, that reflect the high degree of redundancy in the human genome, are ancestrally duplicated genes that frequently retain, at least partially, overlapping functions. Because of the resulting buffering effect, paralogous genes are less likely to be essential for cell growth than non-paralogous ("singleton") genes. Nevertheless, two paralogs may exhibit synthetic lethality where removal of both is deleterious but individual loss is tolerated. Since cancer cell genomes commonly harbour deletions and inactivating mutations in paralogs, synthetic lethality-type interactions between paralogs represent an exploitable avenue for anti-cancer therapy (14–16). The project proposed here aims to study the interplay between p190A and p190B in endometrial cancer and to investigate these paralogs as potential targets. Herein, we address the p190 paralog dependency and interaction in endometrial cancer.



## RESULTS

### Expression of *ARHGAP35* and *ARHGAP5* genes are both altered in endometrial carcinomas

The TCGA PanCancer Atlas regroups 529 samples of Uterine Corpus Endometrial Carcinomas (UCEC), representing all three tumor types: endometrioid, serous and mixed serous/endometrioid carcinomas (**Figure 1A**). Analysis of these data revealed that somatic mutations, either missense or truncating mutations, are found at a frequency of about 21% and 10% for respectively *ARHGAP35* and *ARHGAP5* genes in endometrial carcinomas (**Figure 1B**). Mutations, that include missense, nonsense and in-frame deletions, were found all along the coding sequence, without hot spots (**Figure 1C**). We further analyzed the co-occurrence of *ARHGAP35* or *ARHGAP5* mutations with mutations in the twelve most commonly mutated genes in UCEC. We confirmed the co-occurrence of *ARHGAP35* and *POLE* mutations as previously reported (6). Interestingly, we found a strong co-occurrence of mutations in both p190 paralogs in the TCGA cohort (**Figure 1D**). Consequently, we also found a strong co-occurrence of *ARHGAP5* and *POLE* mutations. In terms of potential prognostic value, we found that tumors bearing co-alteration of *ARHGAP35* and *ARHGAP5* genes have a better prognosis than those with only one altered gene or no alteration (**Figure 1E**).

The impact of *ARHGAP35* mutations was recently explored for p190A GAP activity, demonstrating either loss-of-functions, gain-of-functions or no functional impact (7). Thus, at this stage, it is difficult to anticipate the outcome for cancer cells. But, regardless of mutations, we found that mRNA expression of both genes was altered in a large number of endometrial tumors. Indeed, in comparison to normal samples, *ARHGAP35* and *ARHGAP5* mRNA expressions were found significantly downregulated in endometrial carcinomas (**Figure 2A**). Interestingly, we further found a positive correlation between both paralog expressions (**Figure 2B**).

We further explored their expression in a cohort of 37 samples from 16 patients, where we quantified both gene expressions by qRT-PCR on mRNA extracted from frozen samples. Our data confirmed data from TCGA, demonstrating that *ARHGAP35* and *ARHGAP5* gene expressions were significantly downregulated in tumor samples when compared to normal uterine tissues (**Figure 2C**). Again, data analysis shows a striking positive correlation between *ARHGAP35* and *ARHGAP5* mRNA expressions (**Figure 2D**).

Finally, we explored the expression of *ARHGAP35* and *ARHGAP5* in endometrial cancer cell lines (**Figure 3**). We found that both paralogs were co-expressed in all tested cell lines at the mRNA and protein levels. We noticed that mRNA and protein levels were not strictly correlated, suggesting post-transcriptional and/or post-translational regulations. Moreover, expression of p190A and p190B were independent on the mutational status of the encoding genes (**Table S2**). Indeed, based on data extracted from the Cancer Cell Line Encyclopedia (CCLE) database (Broad Institute), HEC1A and HEC1B

cell lines are bearing mutations on *ARHGAP35* gene, whereas AN3Ca, Ishikawa, KLE and RL95-2 cells lines are mutated on *ARHGAP5* gene.

### **p190A and p190B protein alterations impact similar pathways in endometrial cancer cells**

In order to gain further insight into p190A and p190B involvement in endometrial cancer, we generated *ARHGAP35* or *ARHGAP5* knockout (KO) cells and explored their phenotype and behavior. To generate p190A-KO and p190B-KO cell lines, we used CRISPR/Cas9 method with specific sgRNAs in HEC1A endometrial cells, which we found easy to transfect and to analyze by fluorescence microscopy. As shown in Figure 4A and Supplementary Figure 1, p190A or p190B protein expression was completely silenced in several HEC-1-A cell clones. Interestingly, we found that removal of one paralog did not alter the expression of the other one (**Figure 4A**). Two KO clones of each paralog were further used for phenotyping. P190 proteins being modulators of Rho family members, we first analyzed the impact of both KO on actin cytoskeleton organization. WT and p190-KO HEC1A cells were stained using fluorescent phalloidin and analyzed by confocal microscopy using the same laser intensities. Consistent with a loss of Rho GAP activity, we found a striking and significant increase in F-actin staining in both p190A- and p190B-KO cells, when compared to WT cells (**Figure 4B-C**).

A closer analysis of the F-actin organization revealed an unusual remodeling into geodesic F-actin structures in both p190A- and p190B-KO cells (**Figure 4D**). These structures that show a regular polygonal network of actin fibers, were reminiscent of the, so-called, cross-linked actin networks (CLANs), mainly described in human trabecular meshwork (HTM) cells (17, 18). Respectively, 26% and 21% of p190A and p190B-KO cells displayed CLANs (**Figure 4E**). We found that alpha-actinin co-localized with each F-actin dot within the networks in HEC1A cells, as described in HTM cells (18) (**Figure S2**), confirming that those p190-KO-induced structures are related to CLANs. To analyze whether CLANs were dependent on RhoA/ROCK pathway, which is expected to be over-activated upon p190A or p190B silencing, we treated p190-KO clones with the Y27632 inhibitor, targeting Rho-kinase ROCK (**Figure S3A-B**). We first found that p-MYPT1/MYPT1 ratio was increased upon p190A and p190B KO, and this increase was rescued by Y27632 treatment (**Figure S3A**). In parallel, we found a strong decrease in the number of CLANs upon ROCK inhibition (**Figure S3B**), demonstrating that p190-KO-induced CLANs were generated through an increase of RhoA/ROCK activity in HEC1A cells.

Following this atypical reorganization of the actin cytoskeleton, we further analyzed KO cell migration using wound-healing assay (**Figure 4F-G**). We found that migration is slightly reduced for KO cells when compared to normal HEC1A cells, demonstrating that both p190 paralog expressions are required for proper endometrial tumor cell migration.

Altogether, this analysis, done in parallel for p190A- and p190B-KO clones demonstrated that both paralogs are involved at the same extend in actin remodeling, RhoA/ROCK pathway activation and cell

migration in HEC1A cells. Moreover, these data suggest that, in endometrial cells, loss of p190A is not compensated by p190B and vice-versa.

### **Targeting both p190A and p190B reveals vulnerabilities in endometrial cancer cells**

In order to better describe and compare alterations upon p190A or p190B loss, we performed a global proteomic analysis using mass spectrometry. A total of 1550 proteins in p190A-KO HEC1A cells and of 507 in p190B-KO cells showed altered expression in both clones compared with control cells (**Figures 5A and C**). A total of 1222 proteins were up-regulated (>2-fold) and 136 were down-regulated (<2-fold) upon p190A KO, whereas 190 proteins were up-regulated and 152 were down-regulated upon p190B KO. To investigate the functional association of the differentially expressed proteins, we conducted Ingenuity Pathway Analysis to identify the most significant pathways that were altered in p190A-KO and p190B-KO HEC-1A cells. Interestingly, even if altered proteins were different, the analysis pointed out similar signaling pathways. Besides the pathways of cellular organization and cellular movement that were related to alteration of the actin cytoskeleton, we found alteration in other pathways such as cell death and survival, cell proliferation and cellular response to therapeutics suggesting that both p190A and p190B may likely interfere with these pathways (**Figures 5B and D**). Thus, we focused on the potential role of p190A and p190B in endometrial cell proliferation and cellular response to therapeutics. Cell growth was monitored using the IncuCyte® system by analyzing the occupied area (percentage of confluence) of cells over time. We found that both p190A and p190B KO clones were affected in their growth rate, with a higher impact upon p190B loss (**Figure 6A**). We further tested the cellular response of p190-KO clones towards cisplatin, which remains the most current therapy used for endometrial tumors. Upon treatment with 100  $\mu$ M of cisplatin, we found that, as WT cells, p190-KO cells are strongly affected in their growth (**Figure S4**), suggesting that loss of p190A or p190B did not modify HEC-1-A cell response to cisplatin. Thus, we decided to further explore the potential synthetic lethality between the two paralogs. To do so, we used RNA interference to knock-down the second paralog in KO clones, and analyzed HEC1A cell growth in these conditions (**Figure 6B-D**). We found that removal of p190B in p190A-KO cells led to a strong decrease of cell growth (**Figure 6C**), whereas removal of p190A in p190B-KO cells led to only a small impact (**Figure 6D**), reflecting probably a threshold effect of silencing. This experiment of single and double silencing of paralogs was repeated using exclusively RNA interference in HEC1A, Ishikawa and RL95-2 cells (**Figure 6E-G**). We found that removal of both paralogs was deleterious in HEC1A and RL95-2 cells whereas individual loss was tolerated in RL95-2 cells. Altogether, these data demonstrate that p190A and p190B proteins harbor synthetic lethality-type interactions that may represent an exploitable avenue for therapy against endometrial cancer

## DISCUSSION

*ARHGAP35/p190A* and *ARHGAP5/p190B* are paralogs ubiquitously expressed in tissues. Herein we addressed their expression and function in endometrial cancer, in which *ARHGAP35* was reported to be frequently mutated and described as a cancer gene (3, 4). In this study, we revealed that *ARHGAP5* gene is also mutated in endometrial tumors, even if at a lower frequency than *ARHGAP35* gene. Interestingly, a co-occurrence of *ARHGAP35* and *ARHGAP5* mutations occurs in endometrial cancer, reflecting paralog's interplay and suggesting a common mechanism responsible for mutation appearance. We also found a co-occurrence of *ARHGAP35* or *ARHGAP5* and *POLE* mutations in endometrial cancer. *POLE* gene encodes the catalytic subunit of the DNA polymerase Epsilon, and *POLE* mutations were associated with the disruption of the exonuclease activity of the polymerase required for its proofreading function. Whether *ARHGAP35* and *ARHGAP5* mutations are a consequence of this *POLE* dysfunction remains to be explored. However, some insight comes from normal endometrial tissues. Indeed, endometrium was described as one of the tissues that surprisingly displays frequent mutations in cancer genes (19, 20). *ARHGAP35* is the most frequently mutated gene in normal uterine endometrial epithelium (fraction of mutated samples of 0.34), even more frequently than in the corresponding endometrial cancer (20). On the other hand, *POLE* mutations remain at a very low frequency in normal endometrium, suggesting that emergence of *ARHGAP35* mutations is not due to DNA Polymerase Epsilon dysfunction. On the contrary, *POLE* mutations shown to increase genomic instability may lead to increased formation of neoantigens that may in turn favour an early immune elimination of the transformed cells. This hypothesis, which needs further exploration, would give a potential explanation to the diminution of frequency of *ARHGAP35* mutations in endometrial cancer compared to normal endometrium.

Regardless of mutations, we further demonstrated that *ARHGAP35* and *ARHGAP5* expressions are significantly downregulated in tumors when compared to non-tumoral tissues. Moreover, we described a positive correlation of expression between *ARHGAP35* and *ARHGAP5* genes, both in the TCGA cohort and in our own cohort. These results suggest that both paralogs may share common regulatory mechanisms, as already described for close paralogs (21). Thus, *ARHGAP35* and *ARHGAP5* may share common transcription factor binding sites in their promoters or enhancer elements active in endometrial cancers. However, it remains to be explored if this correlation in gene expression is specific of endometrial cancers. Even if *ARHGAP35* and *ARHGAP5* genes are not on the same chromosomes, evolutionary constraints in functional genome organization as three-dimensional chromatin architecture may be responsible for such concerted expression (22).

In order to mimic the low levels of proteins encoded by *ARHGAP35* and *ARHGAP5* genes in endometrial cancers, we generated and characterized KO cells. We found that KO of p190A or p190B led to an

important increase of actin filaments in cells. This phenotype is consistent with the fact that p190 proteins are negative regulators of Rho GTPases. Loss of these negative regulators favors G- to F-actin polymerization. But, in various cells such as fibroblasts, p190A or p190B was associated to the regulation of actin stress fibers formation through the control of RhoA activity (23–25). In contrast, we found that p190A- or p190B-KO cells displayed an atypical remodeling of the actin cytoskeleton, showing geodesic F-actin structures reminiscent of CLANs observed, mainly in HTM cells. HTM cells are endothelial-like cells in a sponge-like connective tissue located near the front of the eye and are responsible for regulating eye pressure. CLANs are thought to play a role in resistance of cells to increased intraocular pressure that is associated to glaucoma, by creating stiffer cells and tissue (17), but they were also associated to the pathology inducing trabecular meshwork dysfunction (26). The presence of CLANs in endometrial cancer cells upon p190A or p190B KO suggest that those cells might adapt differently to their environment, and increase endometrium stiffness. We further demonstrated that these actin networks are highly dependent on the RhoA/ROCK pathway and deleterious for cell migration. Whether CLANs are involved in the development of endometrial pathologies such as cancer is of interest and remains to be explored.

Global analysis of altered proteins upon p190A- or p190B-KO in HEC1A cells revealed that both proteins have overlapping functions. Indeed, similar cellular functions were altered upon silencing of each paralog, opening the path to create vulnerabilities in endometrial cancer cells. We thus explored their redundancy into cell growth assays. We found that removal of one paralog tends to decrease endometrial cell growth and that removal of both has a stronger impact. Until a certain threshold, reduced levels of p190A or/and p190B may remain tolerated in cancer cells due to a buffering effect between both. However, below this threshold that we mimic using co-knockdown of p190A and p190B, paralogs became essential and their loss, deleterious. Thus, these finding demonstrated the tight interplay between p190A and p190B proteins and open a new avenue to design novel strategy to target endometrial cancer cells.

## **EXPERIMENTAL PROCEDURES**

### **Cell lines**

HEC-1-A cell line was cultured in McCoy's 5A medium, An3Ca, HEC-1-B and Ishikawa cell lines were cultured in MEM complete medium, RL95-2 and KLE cell lines were cultured in DMEM:F-12 Medium. All media were supplemented with 10% FCS (Eurobio). Cells were maintained at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> humidified atmosphere. An3Ca, HEC-1-A, HEC-1-B, KLE and RL95-2 cell lines were purchased from American Type Culture Collection (ATCC). Ishikawa cell line was purchased from Sigma Aldrich. Cell lines were confirmed for the absence of mycoplasma by PCR.

### **RT-qPCR**

Frozen fractions of endometrial samples were crushed manually using a liquid nitrogen-cold mortar. mRNAs from both endometrial tissues and cultured cells were extracted using the Nucleospin RNA<sup>®</sup> kit from Macherey Nagel according to the manufacturer's instructions. cDNA was synthesized from 1 µg of total RNA with Maxima Reverse Transcriptase (Fermentas). 30 ng of cDNA were then subjected to PCR amplification on an RT-qPCR system using the CFX96 Real Time PCR detection system (Biorad). The SYBR<sup>®</sup> Green SuperMix for iQTM (Quanta Biosciences, Inc.) was used with the following PCR amplification cycles: initial denaturation (95 °C for 10 min), followed by 40 cycles of denaturation (95 °C for 15 s) and extension (60 °C for 1 min). Gene expression results were first normalized to an internal control with 18 S ribosomal RNA. Relative expression levels were calculated using the comparative (2- $\Delta\Delta$ CT) method.

### **Antibodies and reagents**

Mouse monoclonal anti-p190A (clone 30) and anti-p190B (clone 54) antibodies were purchased from DB Transduction Laboratories. Knockout cells were also screened using mouse monoclonal anti-p190A (clone D2D6) antibodies from Sigma and rabbit polyclonal antibodies (ref.2562S) from Cell Signaling. Mouse anti- $\alpha$ -Actinin (clone EA-53) antibodies were purchased from Sigma Aldrich. Rabbit (FL-335) and mouse (D-6) anti-GAPDH antibodies were obtained from Santa Cruz Biotechnology. Anti-mouse IRDYE680 and anti-rabbit IRDYE800 secondary antibodies were obtained from Eurobio Scientific. FluoProbes 488-phalloidin, 488-labeled secondary antibodies and 547-labeled secondary antibodies were purchased from Interchim.

### **Transfections**

Ribonucleoproteic complexes were transfected using Lipofectamine CRISPMAX<sup>™</sup> (ThermoFisher Scientific), and siRNAs were transfected using Lipofectamine RNAiMAX<sup>™</sup> (ThermoFisher Scientific)

according to the manufacturer's protocol. SiRNA p190A 1 and 2 sequence were respectively 5'-GCAGAAGUUGCAUGCCCUUAA-3' and 5'-GAACAGCGAUUUAAAGCAUUU-3'. SiRNA p190B 1 and 2 sequences were respectively 5'-AACGTGCAGCTGCATCTAAAT-3' and 5'-AATGAGAAGCATATCTGGTTA-3'.

### **Western blot analysis**

Cells were scraped off on ice and homogenized in Ripa lysis buffer (50 mM Tris HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.5% sodium deoxycholate, 5mM EDTA, 0.1% SDS) with protease and phosphatase inhibitors. Cell lysates were cleared of cellular debris and nuclei by a 10,000 g centrifugation step for 15 min. Lysates were denatured with Laemmli loading buffer containing 2.5% 2- $\beta$ -mercaptoethanol, analyzed by SDS-PAGE, and blotted onto nitrocellulose membranes. Blots were incubated overnight at 4°C with primary antibodies, and then incubated with infrared fluorescent dye-conjugated secondary antibodies (Eurobio), and activity was visualized with the Chemidoc infrared imaging system (Bio-Rad) and analyzed using ImageJ image analysis software.

### **PCR screening**

Knockout clones were screened by PCR followed by Sanger sequencing. For each clone, 4.104 cells were centrifuged 5 min at 1,000 rpm into a dry platelet. The PCR was made directly on the cells using the Phire Tissue Direct PCR Master Mix kit (ThermoFisher Scientific), according to the manufacturer's protocol. Primers sequences 5'-GCGATGAGAGGTGGTGAACA-3', 5'-CAGCTGATGCAAGCTTGGTC-3' and 5'-GCTTCCGTCTGGCATTGT-3' were used to screen the *ARHGAP35* KO cells. Primers sequences 5'-TATGGTGCTTTGTTGTAAACATCT-3' and 5'-TATGGTGCTTTGTTGTAAACATCT-3' were used to screen the *ARHGAP5* KO cells. Amplified DNA sequences were then sequenced by Sanger (Genewiz). Chromatograms decomposition and analysis were made using Synthego (<https://ice.synthego.com/#/>) and Tide (<https://tide.nki.nl/>).

### **Immunofluorescence and confocal imaging**

Cells were seeded on glass coverslips coated with fibronectin (ThermoFisher Scientific), for 48 hours. They were fixed with 4% PFA for 10 min at RT and permeabilized with 0.2% Triton X-100 for 5 min before incubation with various antibodies, as previously described (28). 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 $\times$ /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).

Phalloidin staining intensity was analyzed using ImageJ software, by measuring grey values across cells using images captured with the same laser intensities.

### **IncuCyte® assays**

Proliferation assays: Cells were seeded in 96-well plates (3.103 cells per well) and then monitored by the IncuCyte® Zoom videomicroscope (Essen Bioscience). Cell confluence and quantification was measured using the IncuCyte® imaging system. For Cisplatin experiments, Cisplatin was added at 100 µM.

Migration assays: Cells were seeded in appropriate 96-well plates (5.104 cells per well) (Essen Bioscience). After seeding, scratch was made using the Wound Maker (Essen Bioscience), and wound healing was monitored by the IncuCyte® Zoom videomicroscope. Quantification was measured using the IncuCyte® imaging system.

### **Label-free quantitative proteomics**

Cell lysis was performed in RIPA Buffer. 10 µg of proteins were loaded on a 10% acrylamide SDS-PAGE gel and proteins were visualized by Colloidal Blue staining. Sample preparation, protein digestion by trypsin and LC-MS parameters used for nanoLC-MS/MS analysis nanospray Orbitrap Fusion™ Lumos™ Tribrid™ Mass Spectrometer (Thermo Fisher Scientific, California, USA) were previously described (29). For protein identification, Mascot 2.5 algorithm through Proteome Discoverer 1.4 Software (Thermo Fisher Scientific Inc.) was used in batch mode by searching against the UniProt Homo sapiens database (74,489 entries, Reference Proteome Set, release date: May 16, 2019) from <http://www.uniprot.org/> website. Two missed enzyme cleavages were allowed for the trypsin. Mass tolerances in MS and MS/MS were set to 10 ppm and 0.6 Da. Oxidation of methionine and acetylation of lysine were searched as dynamic modifications. Carbamidomethylation on cysteine was searched as static modification. Raw LC-MS/MS data were imported in Proline Studio for feature detection, alignment, and quantification. Proteins identification was accepted only with at least two specific peptides with a pretty rank = 1 and with a protein FDR value less than 1.0% calculated using the “decoy” option in Mascot. Label-free quantification of MS1 spectra by extracted ion chromatograms (XIC) was carried out with parameters indicated previously (29). Protein ratios were median normalized.

### **Statistical analysis**

Statistical analysis was performed with Prism software (GraphPad Software) and data are presented as mean ± SEM of at least three independent experiments. Comparisons between two groups were analysed by t test, while comparisons between several groups were analyzed by 2-way Significance was accepted for values where \*, P < 0.05; \*\*, P < 0.01; \*\*\*, P < 0.001; and \*\*\*\*, P < 0.0001.



**Data Availability**— All data are contained in the manuscript.

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

**Acknowledgments**—We are grateful to Sylvaine Di Tommaso and Jean-William Dupuy (Bordeaux University) for their help in the proteomic approach.

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

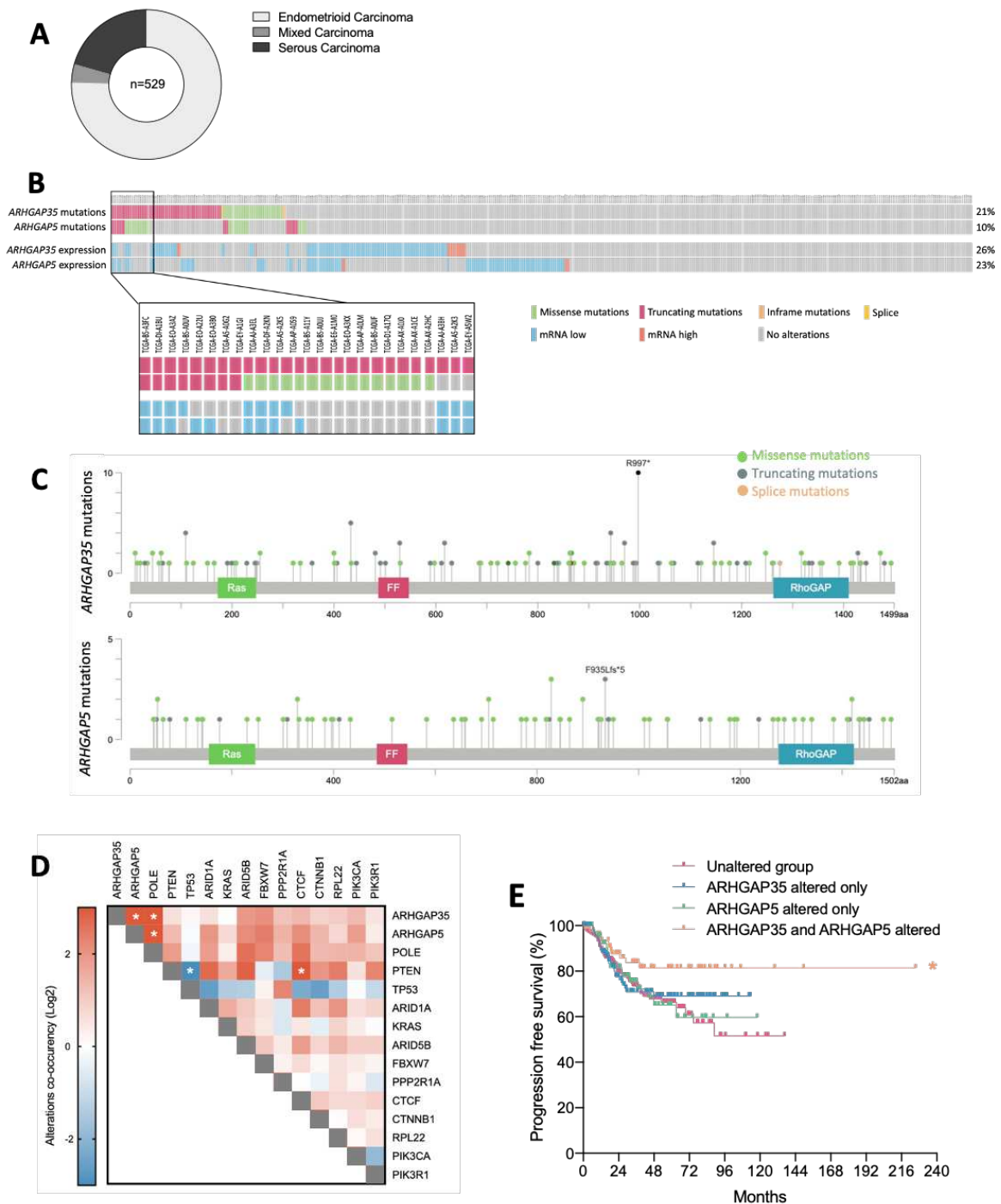
**Funding and additional information**— MP was supported by a PhD fellowship from both Fondation pour la Recherche Médicale and Région Nouvelle-Aquitaine. CH was supported by a PhD scholarship from the French Ministry of Research (MENESR) and an end-of-thesis fellowship from Fondation ARC pour la Recherche sur le Cancer and SIRIC BRIO. 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.

## REFERENCES

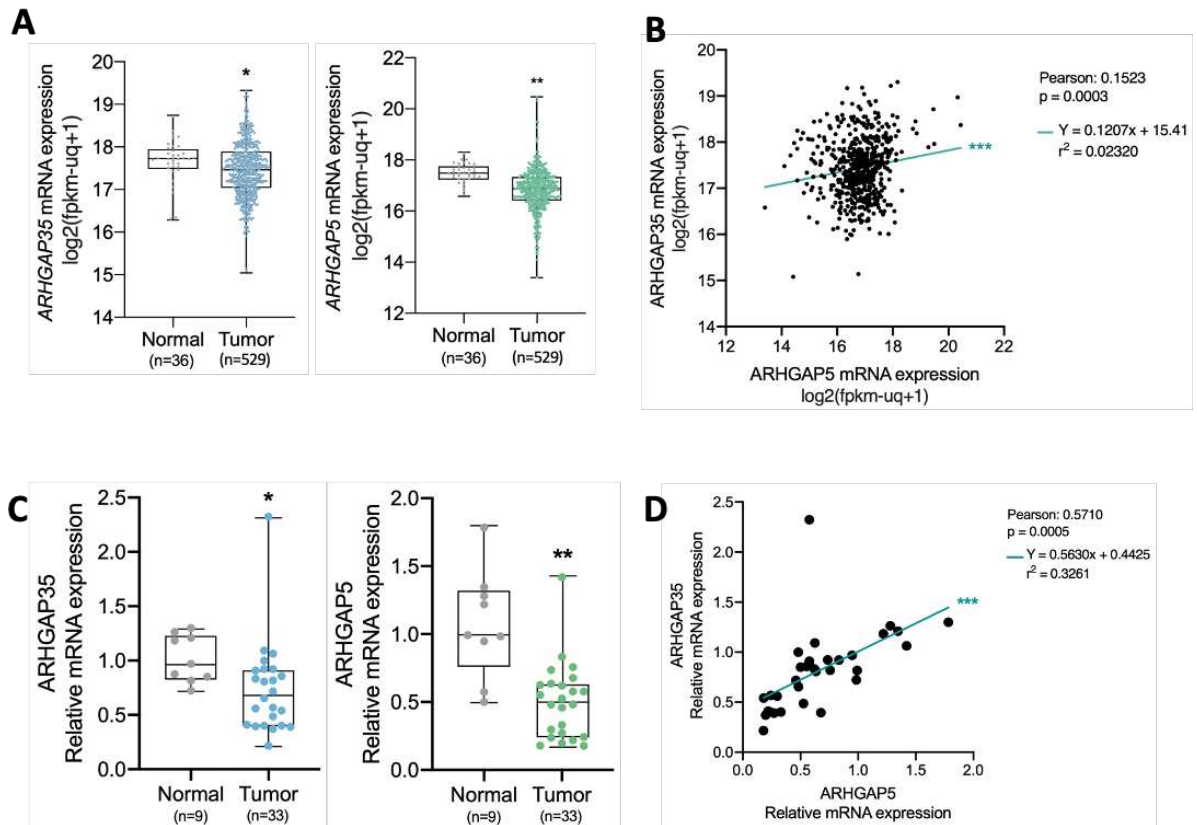
1. A. León-Castillo, S. M. de Boer, M. E. Powell, L. R. Mileskin, H. J. Mackay, A. Leary, H. W. Nijman, N. Singh, P. M. Pollock, P. Bessette, A. Fyles, C. Haie-Meder, V. T. H. B. M. Smit, R. J. Edmondson, H. Putter, H. C. Kitchener, E. J. Crosbie, M. de Bruyn, R. A. Nout, N. Horeweg, C. L. Creutzberg, T. Bosse, on behalf of the TransPORTEC consortium, Molecular Classification of the PORTEC-3 Trial for High-Risk Endometrial Cancer: Impact on Prognosis and Benefit From Adjuvant Therapy. *JCO* 38, 3388–3397 (2020).
2. The Cancer Genome Atlas Research Network, D. A. Levine, Integrated genomic characterization of endometrial carcinoma. *Nature* 497, 67–73 (2013).
3. C. Kandoth, 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, L. Ding, Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. *Nature* 502, 333–339 (2013).
4. M. S. Lawrence, P. Stojanov, C. H. Mermel, J. T. Robinson, L. A. Garraway, T. R. Golub, M. Meyerson, S. B. Gabriel, E. S. Lander, G. Getz, Discovery and saturation analysis of cancer genes across 21 tumour types. *Nature* 505, 495–501 (2014).
5. P. P. Singh, J. Arora, H. Isambert, A. Christos, Ed. Identification of Ohnolog Genes Originating from Whole Genome Duplication in Early Vertebrates, Based on Synteny Comparison across Multiple Genomes. *PLoS Comput Biol* 11, e1004394 (2015).
6. X. Wen, J. Wan, Q. He, M. Wang, S. Li, M. Jiang, Z. Qian, B. Liu, W. Lu, K. Wang, K. Gao, X. Wan, p190A inactivating mutations cause aberrant RhoA activation and promote malignant transformation via the Hippo-YAP pathway in endometrial cancer. *Sig Transduct Target Ther* 5, 81 (2020).
7. H. Yagi, I. Onoyama, K. Asanoma, M. Kawakami, S. Maenohara, K. Kodama, Y. Matsumura, N. Hamada, E. Hori, K. Hachisuga, M. Yasunaga, T. Ohgami, K. Okugawa, H. Yahata, K. Kato, Tumor-derived *ARHGAP35* mutations enhance the Gα13-Rho signaling axis in human endometrial cancer. *Cancer Gene Ther* (2022), doi:10.1038/s41417-022-00547-1.
8. R. I. Bustos, M. A. Forget, J. E. Settleman, S. H. Hansen, Coordination of Rho and Rac GTPase function via p190B RhoGAP. *Curr Biol* 18, 1606–11 (2008).
9. U. Herbrand, M. R. Ahmadian, p190-RhoGAP as an integral component of the Tiam1/Rac1-induced downregulation of Rho. *Biological chemistry* 387, 311–7 (2006).
10. C. Héraud, M. Pinault, V. Lagrée, V. Moreau, p190RhoGAPs, the *ARHGAP35*- and *ARHGAP5*-Encoded Proteins, in Health and Disease. *Cells* 8 (2019), doi:10.3390/cells8040351.
11. F. Binamé, A. Bidaud-Meynard, L. Magnan, L. Piquet, B. Montibus, A. Chabadel, F. Saltel, V. Lagrée, V. Moreau, Cancer-associated mutations in the protrusion-targeting region of p190RhoGAP impact tumor cell migration. *J. Cell Biol.* 214, 859–873 (2016).
12. C. Heraud, M. Pinault, V. Neaud, F. Saltel, V. Lagree, V. Moreau, Identification of an inhibitory domain in p190RhoGAP responsible for masking its functional GAP domain. Under revision (2022).
13. A. Bidaud-Meynard, F. Binamé, V. Lagrée, V. Moreau, Regulation of Rho GTPase activity at the leading edge of migrating cells by p190RhoGAP. *Small GTPases* 10, 99–110 (2019).
14. M. Dede, M. McLaughlin, E. Kim, T. Hart, Multiplex enCas12a screens detect functional buffering among paralogs otherwise masked in monogenic Cas9 knockout screens. *Genome Biol* 21, 262 (2020).
15. X. Feng, M. Tang, M. Dede, D. Su, G. Pei, D. Jiang, C. Wang, Z. Chen, M. Li, L. Nie, Y. Xiong, S. Li, J.-M. Park, H. Zhang, M. Huang, K. Szymonowicz, Z. Zhao, T. Hart, J. Chen, Genome-wide CRISPR

- screens using isogenic cells reveal vulnerabilities conferred by loss of tumor suppressors. *Sci. Adv.* 8, eabm6638 (2022).
16. P. C. R. Parrish, J. D. Thomas, A. M. Gabel, S. Kamlapurkar, R. K. Bradley, A. H. Berger, Discovery of synthetic lethal and tumor suppressor paralog pairs in the human genome. *Cell Reports* 36, 109597 (2021).
  17. J. Y. Bermudez, M. Montecchi-Palmer, W. Mao, A. F. Clark, Cross-linked actin networks (CLANs) in glaucoma. *Experimental Eye Research* 159, 16–22 (2017).
  18. M. S. Filla, A. Woods, P. L. Kaufman, D. M. Peters,  $\beta$ 1 and  $\beta$ 3 Integrins Cooperate to Induce Syndecan-4-Containing Cross-linked Actin Networks in Human Trabecular Meshwork Cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 47, 1956 (2006).
  19. L. Moore, D. Leongamornlert, T. H. H. Coorens, M. A. Sanders, P. Ellis, S. C. Dentre, K. J. Dawson, T. Butler, R. Rahbari, T. J. Mitchell, F. Maura, J. Nangalia, P. S. Tarpey, S. F. Brunner, H. Lee-Six, Y. Hooks, S. Moody, K. T. Mahbubani, M. Jimenez-Linan, J. J. Brosens, C. A. Iacobuzio-Donahue, I. Martincorena, K. Saeb-Parsy, P. J. Campbell, M. R. Stratton, The mutational landscape of normal human endometrial epithelium. *Nature* 580, 640–646 (2020).
  20. K. Suda, H. Nakaoka, K. Yoshihara, T. Ishiguro, R. Tamura, Y. Mori, K. Yamawaki, S. Adachi, T. Takahashi, H. Kase, K. Tanaka, T. Yamamoto, T. Motoyama, I. Inoue, T. Enomoto, Clonal Expansion and Diversification of Cancer-Associated Mutations in Endometriosis and Normal Endometrium. *Cell Reports* 24, 1777–1789 (2018).
  21. A. Purmann, J. Toedling, M. Schueler, P. Carninci, H. Lehrach, Y. Hayashizaki, W. Huber, S. Sperling, Genomic organization of transcriptomes in mammals: Coregulation and cofunctionality. *Genomics* 89, 580–587 (2007).
  22. J. Ibn-Salem, E. M. Muro, M. A. Andrade-Navarro, Co-regulation of paralog genes in the three-dimensional chromatin architecture. *Nucleic Acids Res* 45, 81–91 (2017).
  23. P. D. Burbelo, S. Miyamoto, A. Utani, S. Brill, K. M. Yamada, A. Hall, Y. Yamada, p190-B, a new member of the Rho GAP family, and Rho are induced to cluster after integrin cross-linking. *The Journal of biological chemistry* 270, 30919–26 (1995).
  24. K. Wennerberg, M. A. Forget, S. M. Ellerbroek, W. T. Arthur, K. Burridge, J. Settleman, C. J. Der, S. H. Hansen, Rnd proteins function as RhoA antagonists by activating p190 RhoGAP. *Curr Biol* 13, 1106–15 (2003).
  25. W. T. Arthur, K. Burridge, RhoA inactivation by p190RhoGAP regulates cell spreading and migration by promoting membrane protrusion and polarity. *Mol Biol Cell* 12, 2711–20 (2001).
  26. M. Sun, W. Liu, M. Zhou, ANGPTL7 is transcriptionally regulated by SP1 and modulates glucocorticoid-induced cross-linked actin networks in trabecular meshwork cells via the RhoA/ROCK pathway. *Cell Death Discov.* 8, 50 (2022).
  27. A. Juin, C. Billottet, V. Moreau, O. Destaing, C. Albiges-Rizo, J. Rosenbaum, E. Génot, F. Saltel, Physiological type I collagen organization induces the formation of a novel class of linear invadosomes. *Mol. Biol. Cell* 23, 297–309 (2012).
  28. V. Moreau, F. Tatin, C. Varon, E. Genot, Actin can reorganize into podosomes in aortic endothelial cells, a process controlled by Cdc42 and RhoA. *Molecular and cellular biology* 23, 6809–22 (2003).
  29. Deutsch EW, Bandeira N, Sharma V, Perez-Riverol Y, Carver JJ, Kundu DJ, et al. The ProteomeXchange consortium in 2020: enabling ‘big data’ approaches in proteomics. *Nucleic Acids Res.* 48, 1145–52 (2020).



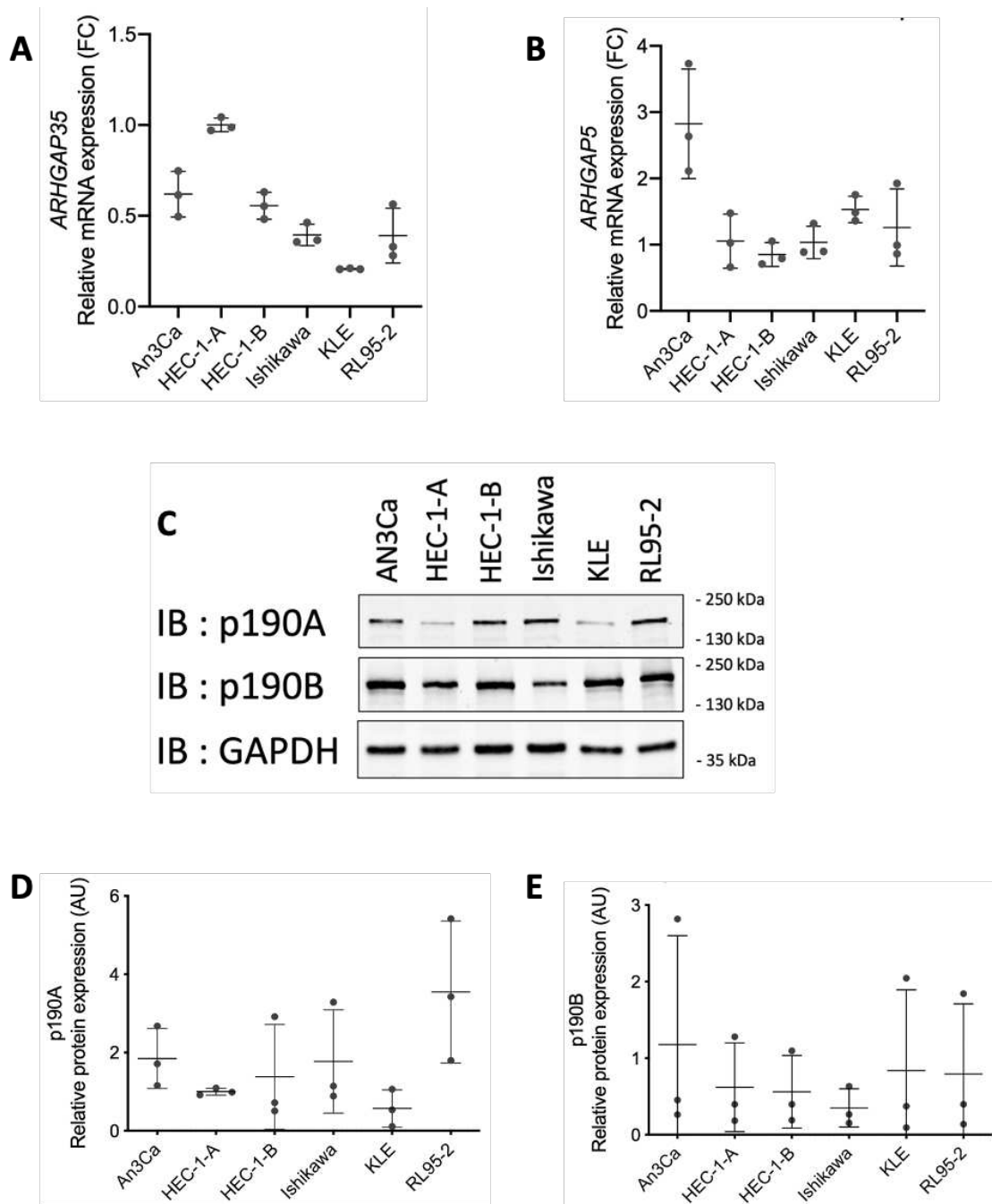
**Figure 1 – Alterations in *ARHGAP35* and *ARHGAP5* genes in Uterine Corpus Endometrial Carcinoma (TGCA, Pan Cancer Atlas)**

(A) Distribution of the UCEC tumor subtypes in the TGCA cohort (n=529). (B) Representation of the alterations (ie. mutations and mRNA expression) of *ARHGAP35* and *ARHGAP5* across 529 UCEC cases from TCGA. (C) Lollipop plots showing the repartition of somatic mutations identified in UCEC on p190A (up) and p190B (down) proteins. (D) Co-occurrence of *ARHGAP35* and *ARHGAP5* mutations with 13 most commonly mutated genes in UCEC. Log2 Odds Ratio quantifies how strongly the presence or absence of alterations in A are associated with the presence or absence of alterations in B in the selected samples.  $OR = (Neither * Both) / (A Not B * B Not A)$ .  $*\log_2ratio > 3$ . (E) Progression free survival curve of UCEC cases altered for *ARHGAP35*, *ARHGAP5* or both compared to unaltered group.  $*p < 0.05$ .

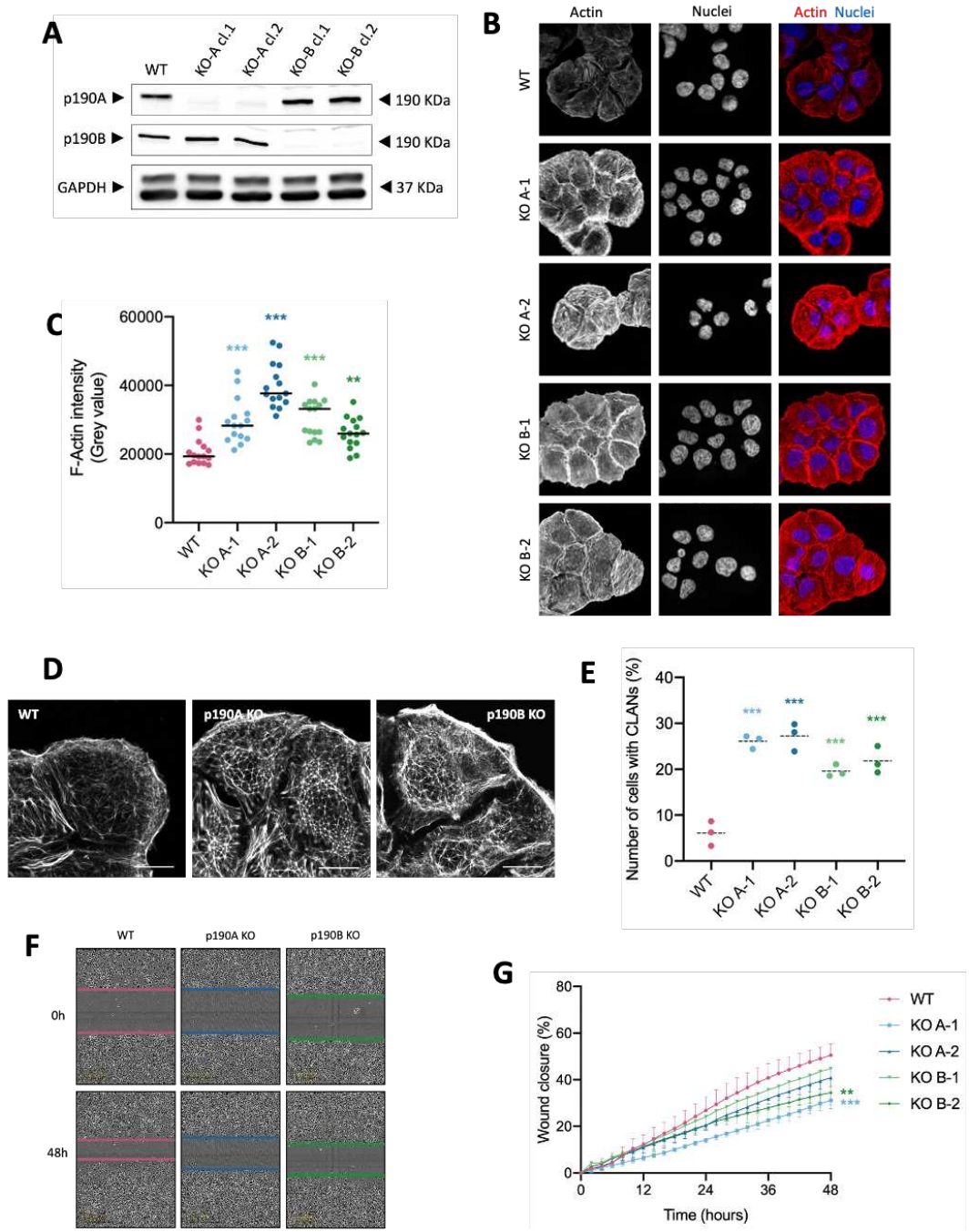


**Figure 2 – Correlation of mRNA level between *ARHGAP35* and *ARHGAP5* in endometrial tumors**

(A) mRNA expression of *ARHGAP35* (left) and *ARHGAP5* (right) between endometrial tumors and healthy tissues in the TCGA cohort. (B) Correlation between *ARHGAP35* and *ARHGAP5* mRNA expression the TCGA cohort. (C) mRNA expression of *ARHGAP35* (left) and *ARHGAP5* (right) in endometrial patient samples. (D) Correlation between *ARHGAP35* and *ARHGAP5* mRNA expression in endometrial patient samples. (C,D) Represented values are Fold Change relative to mean of normal tissues. Figures A, C were analyzed by t tests, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

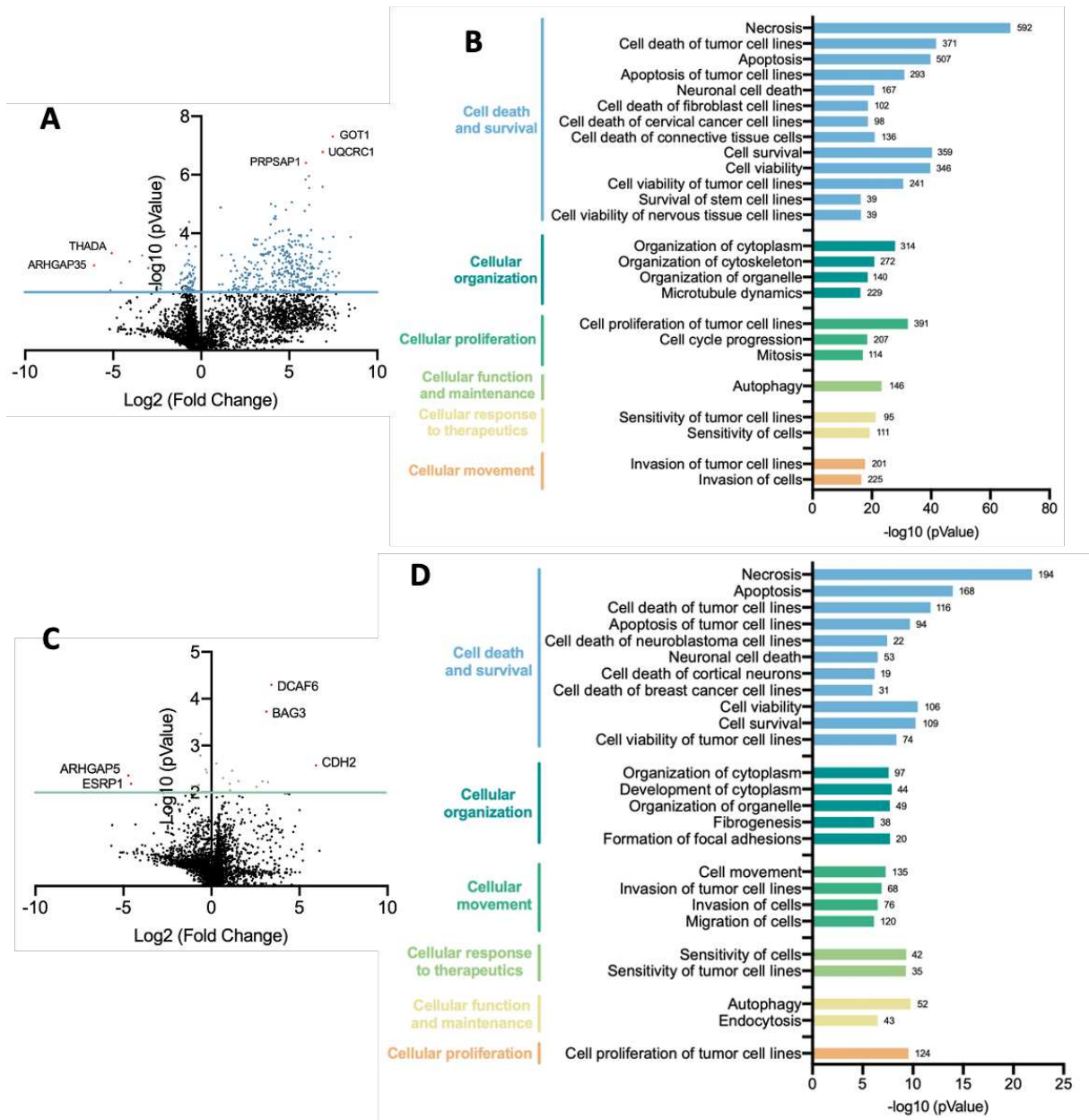


**Figure 3 – Expression of ARHGAP35/p190A and ARHGAP5/p190B in endometrial cancer cell lines** (A,B) mRNA expression of ARHGAP35 (A) and ARHGAP5 (B) in 6 endometrial cell lines. Fold Change values were calculated after HEC-1-A  $\Delta\Delta Ct$  mean. (C) Western blot showing p190A and p190B protein expression in 6 endometrial cell lines. (D,E) Quantification of p190A (D) and p190B (E) protein expression. AU: arbitrary unit.



**Figure 4 – Phenotypal and functional impact of p190A and p190B Knockout in HEC-1-A cells**

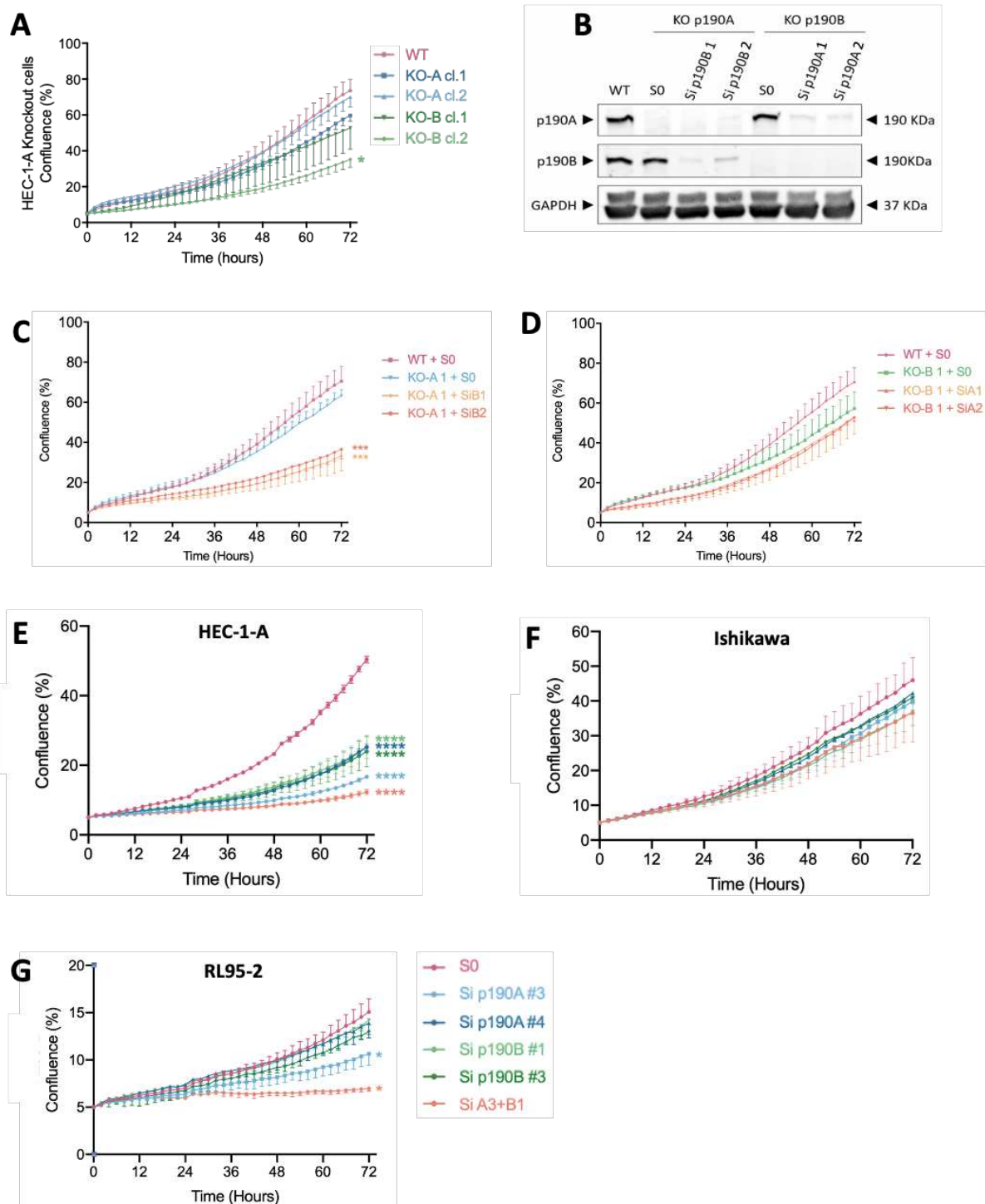
(A) Western Blot shows the absence of expression of p190A and p190B in the KO HEC-1-A compared with basal expression in the WT cells. (B) Photos of HEC-1-A cells at the same exposure time, stained with Phalloidin and Dapi. (C) Quantification of F-Actin intensity in HEC-1-A cells when considered at the same exposure time. Mean fluorescence intensity was measured across the cells, in triplicate, with n=5 cells each time representing 15 measured points on the figure. Mean is represented by the black line. (D) Phalloidin staining showing the reorganization of the actin cytoskeleton with appearance of CLANs structure in the knockout cells. (E) Quantification of the number of cells containing CLANs. Quantification was made in triplicate with n>100 cells for each condition; mean is represented by the dashed line. (F) Representative images of Wound healing assay at T=0h and T=48h. (G) Cell migration represented by wound closure across time. Scale bars: 10µM. Figures C, E, G were analyzed by 2-way ANOVA, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 when compared to WT condition.



**Figure 5 – Global proteomic analysis of p190A and p190B KO cells compared with WT HEC-1-A**

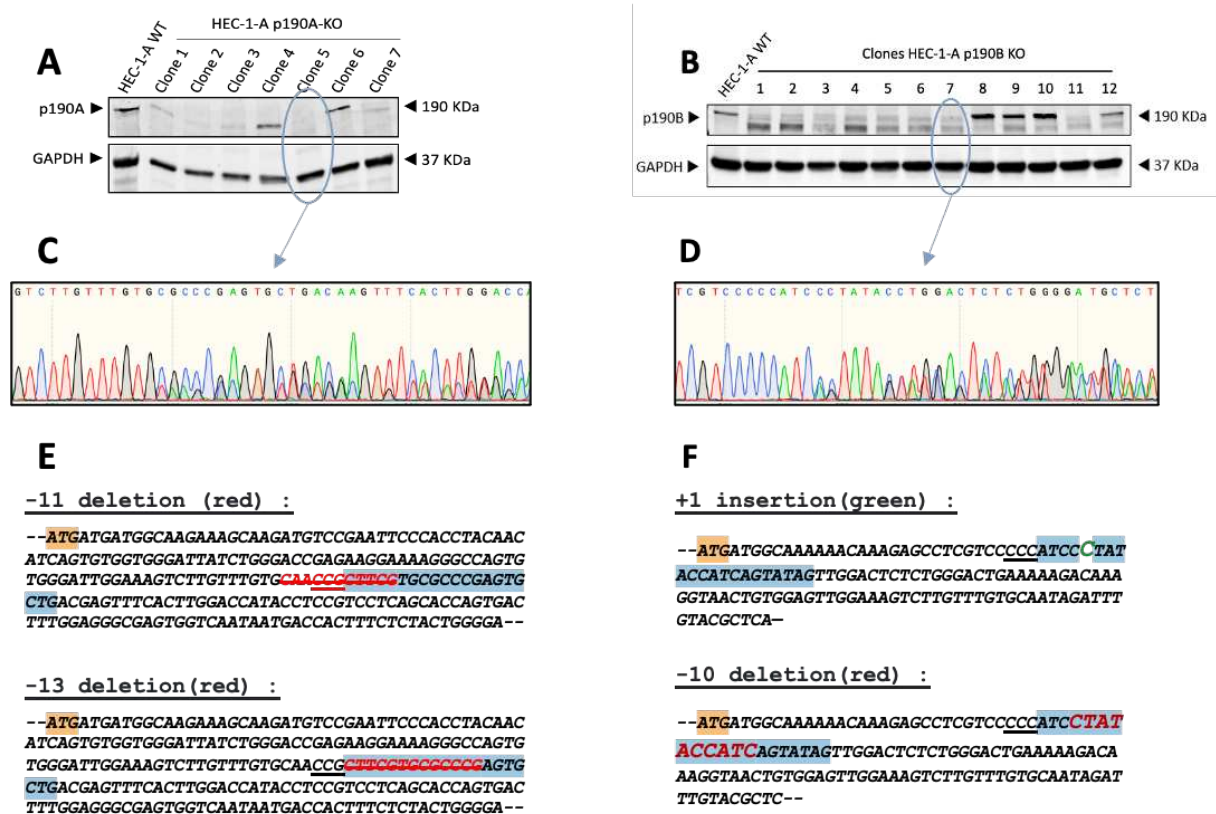
(A,B) Volcano Plot highlighting the top up- and downregulated proteins in p190A KO (A) and in p190B KO (B) cells compared to WT HEC-1-A. FC were calculated for each protein after the WT value. (C,D) IPA enrichment analysis of the top deregulated cellular functions in p190A KO (A) and in p190B KO (B) HEC-1-A cells. Number of deregulated proteins in each category are represented at the extremity of the bars.





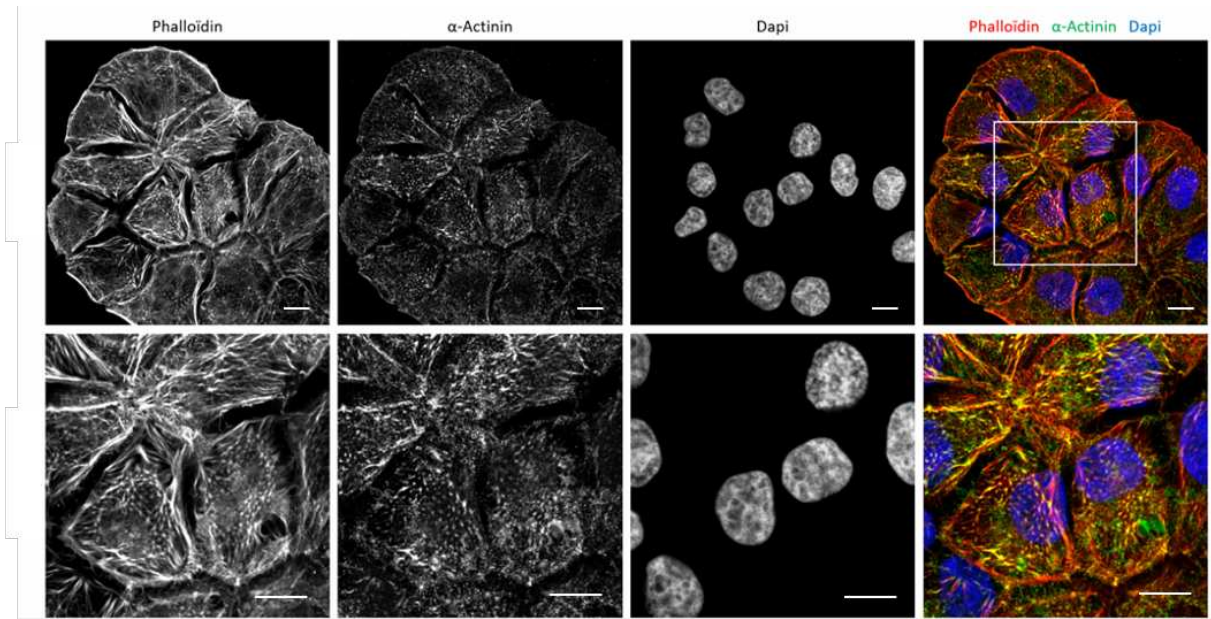
**Figure 6 – Alterations in both p190RhoGAPs alters cellular proliferation of endometrial cell lines**

(A) Proliferation of WT HEC-1-A cells vs p190A and p190B knockout clones. (B) Western Blot showing the extinction of p190A and p190B with siRNA to create a double KD/KO of p190A and p190B. (C, D) Proliferation of cells with siRNA p190B in KO A (C) and with siRNA p190A in KO B (D). (E,F,G) Proliferation of HEC-1-A (E), Ishikawa (F), RL95-2 (G) endometrial cell lines with extinction of p190A and/or p190B using siRNAs. Figures were analyzed by 2-way ANOVA, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$  when compared to WT condition.

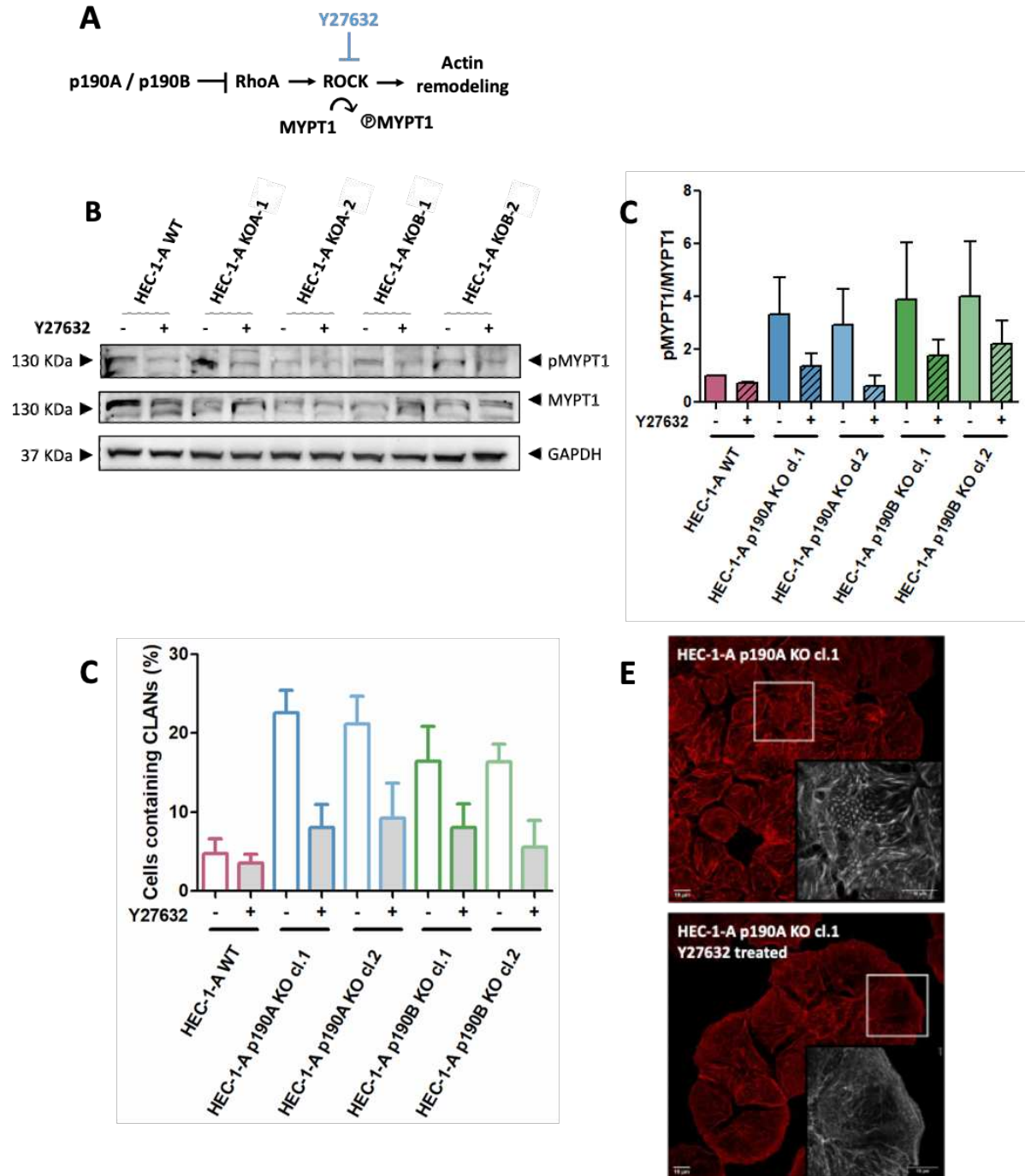


**Supplementary Figure 1 – Screening of the HEC-1-A clones after applying the CRISPR/Cas9 technique to produce knockout of p190A (left) and p190B (right).**

(A, B) Western Blots showing the expression or extinction of p190A (A) and p190B (B) proteins in the clones. (C, D) Representative images of Sanger sequencing completed on clones in which the protein was unexpressed. (E, F) Predicted sequence of each allele after Sanger chromatogram analysis. Clones p190A KO #3 and #5, and clones p190B KO #7 and #11, were used in this study and renamed KO-A 1, KO-A 2, KO-B 1 and KO-B 2 respectively.

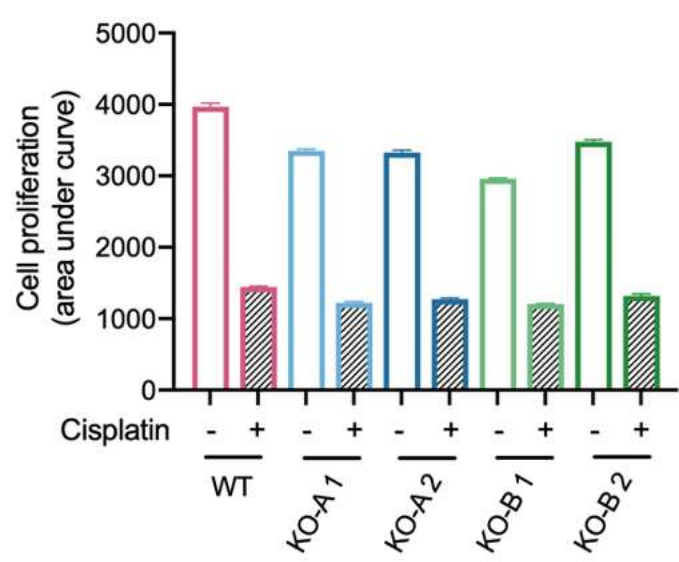


**Supplementary Figure 2 – Alpha-actinin colocalizes with CLANs in HEC-1-A p190A/B Knockout cells.** Representative confocal images of HEC-1-A p190A KO (clone 1) cells containing CLANs. Phalloidin and  $\alpha$ -actinin staining colocalize in the structures (yellow spots). Similar images were observed for the p190B KO cells. Scale bars: 10 $\mu$ M.



**Supplementary Figure 3 – CLANs formation is dependent on RhoA/ROCK pathway in p190A- and p190B-KO HEC1A cells.**

(A) Representation of the RhoA/ROCK pathway regulated by the p190RhoGAPs. Y27632 (in blue) is used to inhibit ROCK. (B) Western Blot showing the decrease in MYPT1 phosphorylation in HEC-1-A cells treated with Y27632. (C) Quantification of the Western Blot. (D) Quantification of the presence of CLANs in HEC-1-A cells treated or not with Y27632. (E) Representative confocal images of HEC-1-A p190A KO cells untreated (up) or treated (down) with W27632. Scale bars: 10 $\mu$ M.



**Supplementary Figure 4 – p190A/B Knockout did not confer cisplatin resistance to HEC-1-A cells.**

Cells were untreated or treated with Cisplatin (100  $\mu$ M) for 72 hours. Cell proliferation was measured during treatment using the IncuCyte system.

**Supplementary Table 1: ARHGAP35/p190A and ARHGAP5/p190B expression in endometrial patient samples**

Patient	Diagnostic	Follow Up	ARHGAP35/p190A mRNA*	ARHGAP5/p190B mRNA*
P1	Undifferentiated, FIGO stage IA, grade 3	NED	<b>2.323</b>	0.577
P2	Endometrioid, FIGO stage II, grade 2	NED	0.646	<b>0.307</b>
P3	Clear cell, FIGO stage IIIC, grade 3	DWD	1.092	0.625
P4	Endometrioid, FIGO stage II, grade 2	NED	<b>0.457</b>	<b>0.251</b>
P5	Endometrioid, FIGO stage IA, grade 2	NED	0.541	<b>0.180</b>
P6	Serous, FIGO stage IVB, grade 3	DWD	<b>0.395*</b>	0.677
P7	Endometrioid, FIGO stage IIIC, grade 3	T	0.922	0.736
P8	Endometrioid, FIGO stage IB, grade 1	NED	0.654	0.482
P9	Endometrioid, FIGO stage IA, grade 1	DOD	1.063	1.420
P10	Serous, FIGO stage IB, grade 2	T	0.921	0.833
P11	Serous, FIGO stage IA	NED	<b>0.336</b>	<b>0.259</b>
P12	Endometrioid, FIGO stage IB, grade 3	T	0.845	0.587
P13	Serous, FIGO stage IA	DOD	0.717	<b>0.459</b>
P14	Endometrioid, FIGO stage IA, grade 1	NED	0.818	0.757
P15	Serous, FIGO stage IV, grade 3	AWD	0.646	0.581
P16	Serous, FIGO stage IVB	AWD	0.910	0.577

\* mRNA level is represented by the Fold Change.

Significant values are in red (over expression) and in blue (under expression).

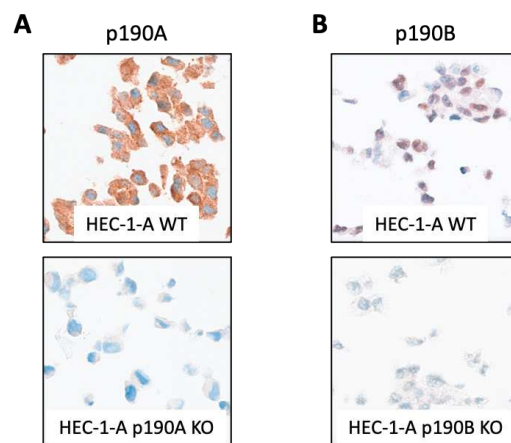
**Supplementary Table 2 - Status of *ARHGAP35* & *ARHGAP5* in endometrial cancer cell lines**

<b>Cell lines</b>	<b><i>ARHGAP35</i></b>	<b><i>ARHGAP5</i></b>
An3Ca	WT	p.P969H (Missense)
HEC-1-A	p.K35E (Missense) p.L351R (Missense)	WT
HEC-1-B	p.L351R (Missense)	WT
Ishikawa	WT	p.F935fs (Frameshift)
KLE	WT	p.A1357A (Silent)
RL95-2	WT	p.N155N (Silent) p.F965F (Silent) p.R955S (Missense)

## 2. Résultats complémentaires

### 2.1. Expression des p190RhoGAPs dans des échantillons de tumeurs d'endomètre

Dans l'article ci-dessus, nous avons présenté les niveaux d'expression des p190RhoGAPs en ARNm dans des échantillons de tumeurs d'endomètre. Pour certains de ces mêmes cas de patientes (cf. numéros de patientes dans la *Supplementary Table 1* ci-dessus), des marquages immunohistochimiques (IHC) ont été réalisés. Le contrôle de ceux-ci a été effectué sur les lignées cellulaires HEC-1-A WT, et HEC-1-A p190A et p190B KO qui n'exprimaient plus les protéines, respectivement (Figure 41). Ces contrôles ont permis de confirmer la spécificité des anticorps pour leur protéine cible.

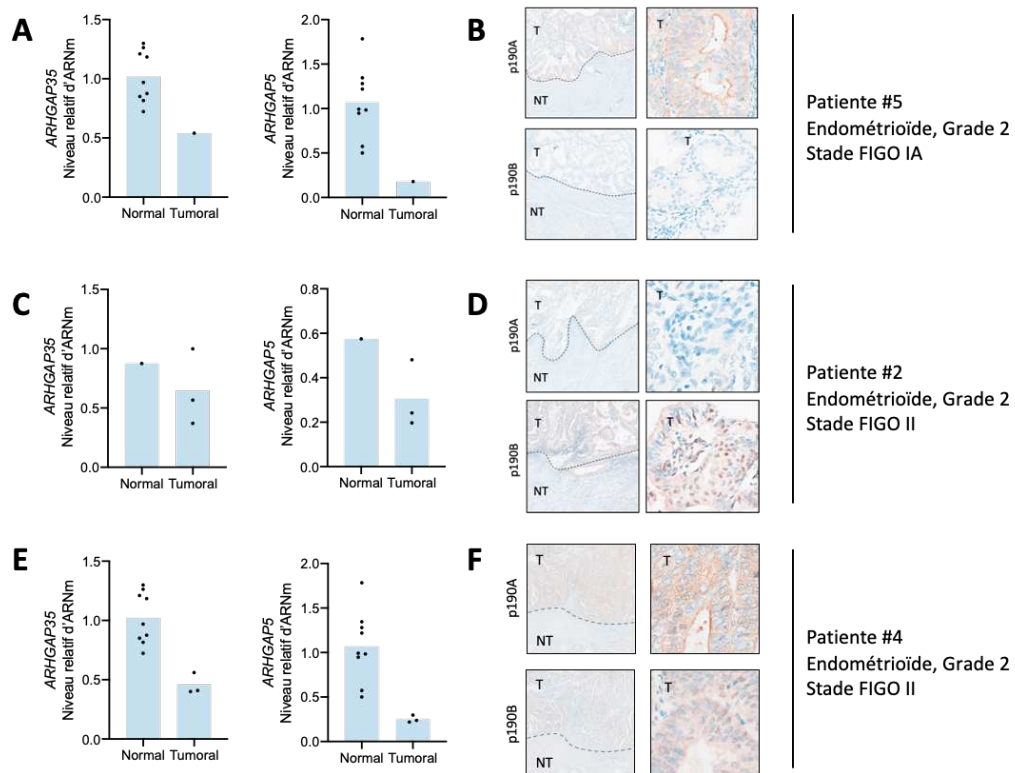


**Figure 41 : Contrôles de marquages immunohistochimiques.** (A) Marquage de p190A sur la lignée cellulaire HEC-1-A WT qui exprime la protéine et sur la lignée p190A KO qui ne l'exprime pas. (B) Marquage de p190B sur la lignée cellulaire HEC-1-A WT qui exprime la protéine et sur la lignée p190B KO qui ne l'exprime pas.

Les marquages p190A et p190B ont été réalisés sur des coupes tumorales sur lesquelles du myomètre sain était observable. Nous avons ainsi pu comparer les niveaux d'expression et la localisation des deux p190RhoGAPs dans les cellules de ces tissus endométriaux (Figure 42, Figure 43). Les marquages sont représentés ci-dessous, et mis en regard du niveau d'expression en ARNm pour chaque tumeur. De manière générale, le myomètre des échantillons est toujours négatif pour les marquages p190A et p190B (ou alors très faiblement positif). Cette observation vient contrarier le fait que l'expression en ARNm diminue dans les tumeurs. Le marquage de la protéine p190A est cytoplasmique avec un enrichissement membranaire. p190A a aussi été retrouvé enrichi au niveau des zones de sécrétion (ou zones mucineuses) dans ces tumeurs. Le marquage de p190B quant à lui est hétérogène dans un même tissu. Certaines cellules l'expriment, d'autres non. Comme p190A, il peut être membranaire, mais est surtout enrichi dans les noyaux des cellules.



Les tumeurs du sous-type endométrioïde sont les plus fréquentes parmi les cancers de l'endomètre. Il s'agit aussi du sous-type présentant le plus fréquemment des mutations d'*ARHGAP35* (Frank et al., 2018). Dans ces tumeurs, la diminution d'expression des deux p190RhoGAPs a lieu en parallèle au niveau de l'ARNm (Figure 42). Elle augmente cependant au niveau protéique (marquages IHC) entre le myomètre complètement négatif et la zone tumorale positive. Les marquages restent par ailleurs d'un niveau relativement faible dans ces tumeurs de stades précoces, comparativement aux tumeurs de stades plus avancés présentées après.



**Figure 42 : Niveau d'expression des p190RhoGAPs dans des tumeurs de sous-type endométrioïde.** Les cas sont présentés du stade le moins avancé (patiente #5) aux plus avancés (patientes #2 et #4). (A, C, E) Niveaux d'expression de p190A (gauche) et p190B (droite) en ARNm. Fold Change relatif à la moyenne des tissus non tumoraux. Pour les cas pour lesquels nous ne disposons pas de tissu normal, la totalité des valeurs des autres échantillons normaux est présentée. (B, D, F) Images représentatives des marquages immunohistochimiques de p190A (haut) et p190B (bas).

Les tumeurs non endométrioïdes sont composées de tumeurs non différenciées, à cellules claires et séreuses. Ces sous-types sont fréquemment diagnostiqués à des stades plus avancés que les tumeurs endométrioïdes. Dans ces cas, l'expression des p190RhoGAPs en ARNm entre les tissus normaux et tumoraux est plus variable et ne corrèle pas toujours (Figure 43). Le niveau d'expression en protéine (marquages d'IHC) est là encore négatif dans les fractions non tumorales des tissus. Dans

les régions tumorales, plusieurs de ces tumeurs ont un marquage très fort des deux protéines p190A et p190B. Par ailleurs, ce marquage très intense est retrouvé spécifiquement dans les zones d'invasion (patiente #3). Seuls les échantillons de la patiente #7 diffèrent ici des autres. Ils présentent un marquage faible pour les deux p190RhoGAPs au niveau tumoral.

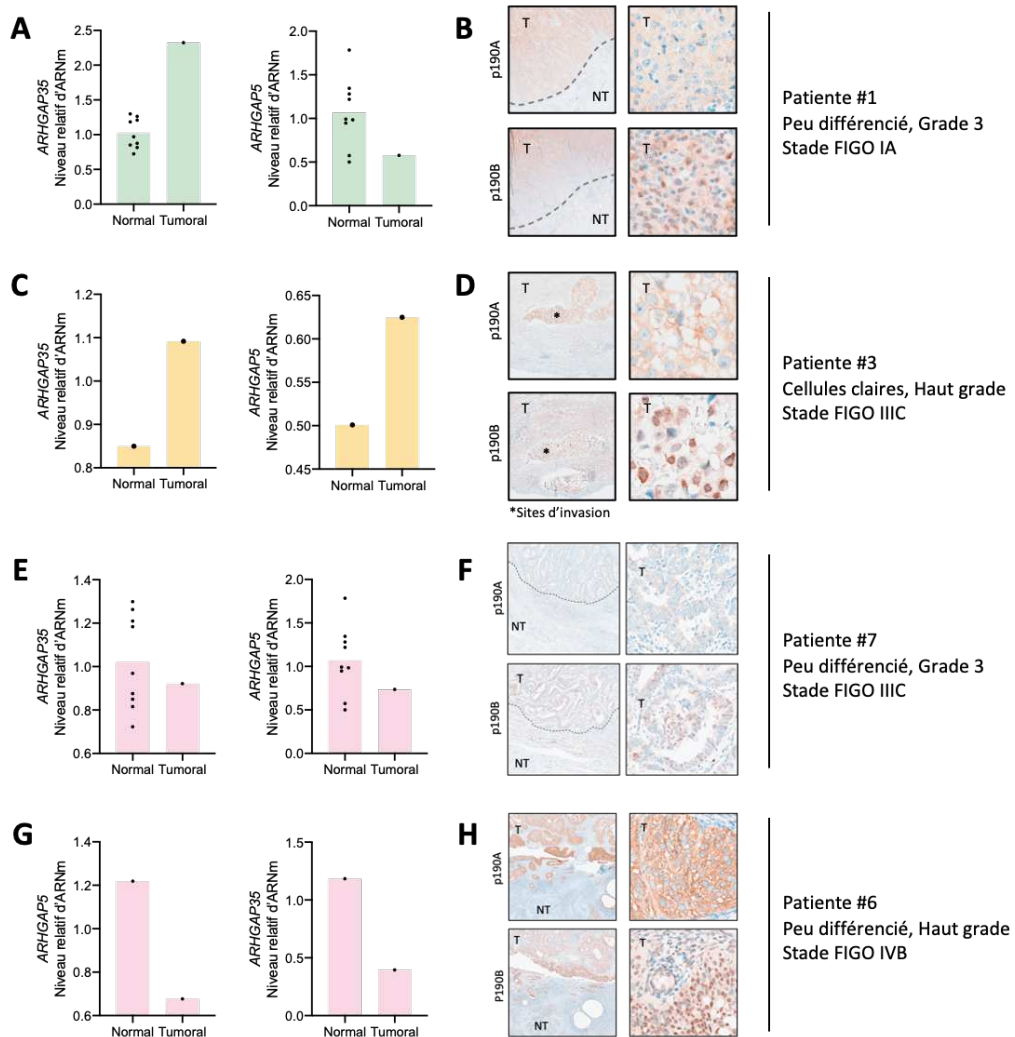


Figure 43 : Niveau d'expression des p190RhoGAPs dans des tumeurs peu différenciée (vert), à cellules claires (jaune), et séreuses (rose). (A, C, E, G) Niveaux d'expression de p190A (gauche) et p190B (droite) en ARNm. Fold Change relatif à la moyenne des tissus non tumoraux. Pour les cas pour lesquels nous ne disposons pas de tissu normal, la totalité des valeurs des autres échantillons normaux est présentée. (B, D, F, H) Images représentatives des marquages immunohistochimiques de p190A (haut) et p190B (bas). Les numéros de patientes sont relatifs au tableau présenté dans l'article ci-dessus.

## 2.2. Caractérisation des cellules Huh7 p190A KO

Les lignées cellulaires HEC-1-A p190A et p190B KO ont été caractérisées fonctionnellement ci-dessus. Étant donné qu'un Knockout avait aussi été produit dans la lignée Huh7 (cf. partie *Knockout des gènes ARHGAP35 et ARHGAP5*), nous avons caractérisé fonctionnellement celui-ci.

La caractérisation de deux clones Huh7 p190A KO est présentée ici. Ils ont été renommés clones 1 et 2 pour la simplicité de lecture. Les deux ont été validés comme vu précédemment par Western Blot et par séquençage Sanger. Les résultats montrent que les cellules Huh7 p190A KO, comme c'était déjà le cas pour les HEC-1-A ci-dessus, ont une tendance à moins proliférer (Figure 44A). L'analyse de *Scratch assay*, ou réparation de blessure, montre qu'ils ont aussi tendance à moins migrer (Figure 44B, C). Finalement, les cellules ont été ensemencées sur des lamelles de verre recouvertes d'une matrice de gélatine fluorescente et collagène de type I. L'impact de l'extinction de p190A sur la capacité des cellules à dégrader cette matrice extracellulaire a donné un résultat moins clair entre les deux clones KO et les cellules sauvages (Figure 44D, E).

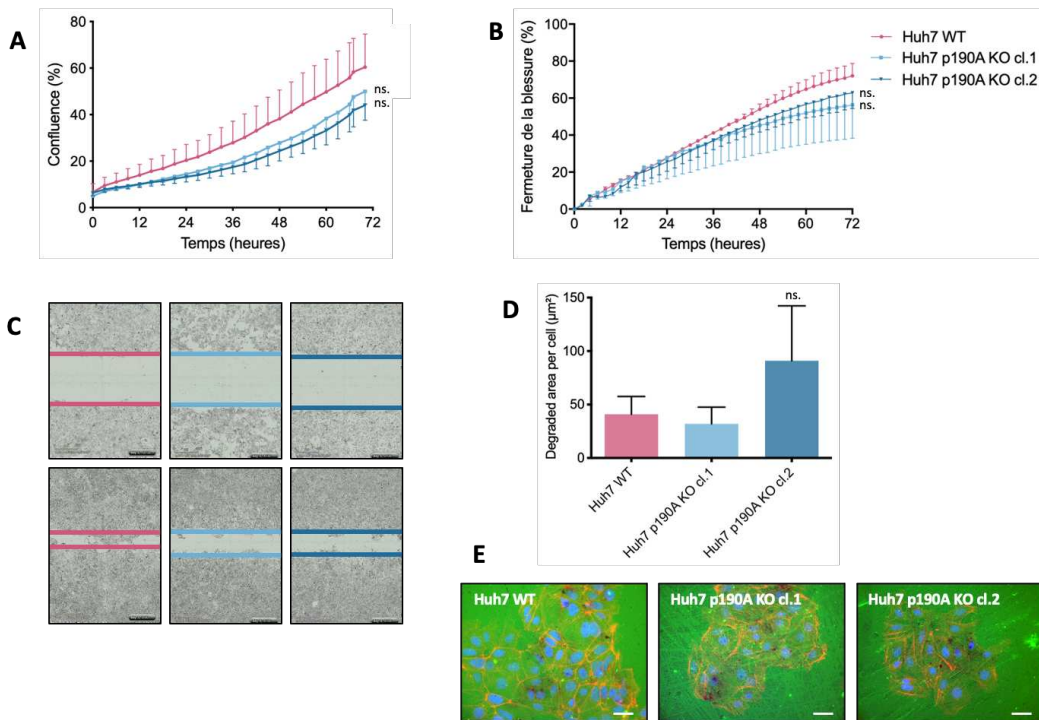


Figure 44 : Caractérisation fonctionnelle des cellules Huh7 p190A KO. (A) Prolifération cellulaire. (B, C) Migration cellulaire représentée par la réparation d'une blessure. (D, E) Dégradation de la matrice extracellulaire. Barres d'échelle : 20µM. Les figures A, B et C ont été analysées grâce à un microscope IncuCyte.

### 2.3. Analyse de l'impact des mutations d'*ARHGAP35* associées au cancer

Suite à la caractérisation des cellules KO, p190A a été réexprimée dans les HEC-1-A KO p190A. Ceci a permis de confirmer que les phénotypes observés étaient bien dus au Knockout de p190A, et non à des potentiels *off target* (ARNg qui aurait pu cibler un autre gène de manière aspécifique). Pour cette réexpression, les cellules ont été infectées par des particules lentivirales pour exprimer p190A sauvage ou bien mutée (Figure 45A). Les mêmes mutations que celles présentées dans la partie *Introduction de mutations associées au cancer dans le gène ARHGAP35* ont été exprimées ici : S866F,  $\Delta$ 865-870 et  $\Delta$ PLS.

Comme abordé dans l'article, l'intensité du marquage de la F-Actine dans les cellules traduit l'importance de polymérisation de celle-ci. Si les cellules KO p190A voient l'intensité de F-Actine significativement augmentée comparativement aux cellules WT, la réexpression de p190A WT rétabli le phénotype sauvage. Ceci confirme le fait que l'augmentation de polymérisation d'actine observée est strictement due à l'absence de p190A dans ces cellules. En revanche, la réexpression de protéines mutées (S866F,  $\Delta$ 865-870,  $\Delta$ PLS) ne permet pas de rétablir le phénotype sauvage et les cellules montrent là-encore une polymérisation de l'actine importante (Figure 45B, C).

Ces variations de polymérisation de l'actine sont directement liées à l'activité GAP de p190A. En effet, la protéine régule de manière indirecte et *via* ses effecteurs, la polymérisation de l'actine. Il est donc logique que les cellules p190A KO aient une actine polymérisée importante, et que la réexpression de p190A WT dans ces cellules restaure un phénotype sauvage. Cependant, l'expression de p190A mutée dans ces cellules indique que l'activité GAP de la protéine n'est pas complètement effective, la régulation de la polymérisation de l'actine n'a donc pas lieu dans ces cas. Ceci suggère que les mutations utilisées ici seraient des mutations « perte de fonction ». Cette donnée vient cependant contredire une précédente étude du laboratoire qui montrait que ces mutations sont plutôt « gain de fonction », et confèrent à la protéine une activité GAP supérieure à p190A WT (Binamé et al., 2016).

Ainsi, même si ces protéines mutées ont une forte capacité à fixer RhoA (Binamé et al., 2016) et subsistent dans une configuration ouverte (Héraud et al., Annexe 1), leur fonction de régulation de la polymérisation de l'actine est altérée. Leur défaut de localisation subcellulaire (Binamé et al., 2016) pourrait être responsable de cette altération fonctionnelle. Ainsi ces mutants de p190A permettent de découpler localisation et fonction de la protéine. Cette analyse permet de montrer que, au-delà de la fonction GAP, la localisation de la protéine est indispensable pour un bon contrôle de la polymérisation d'actine.

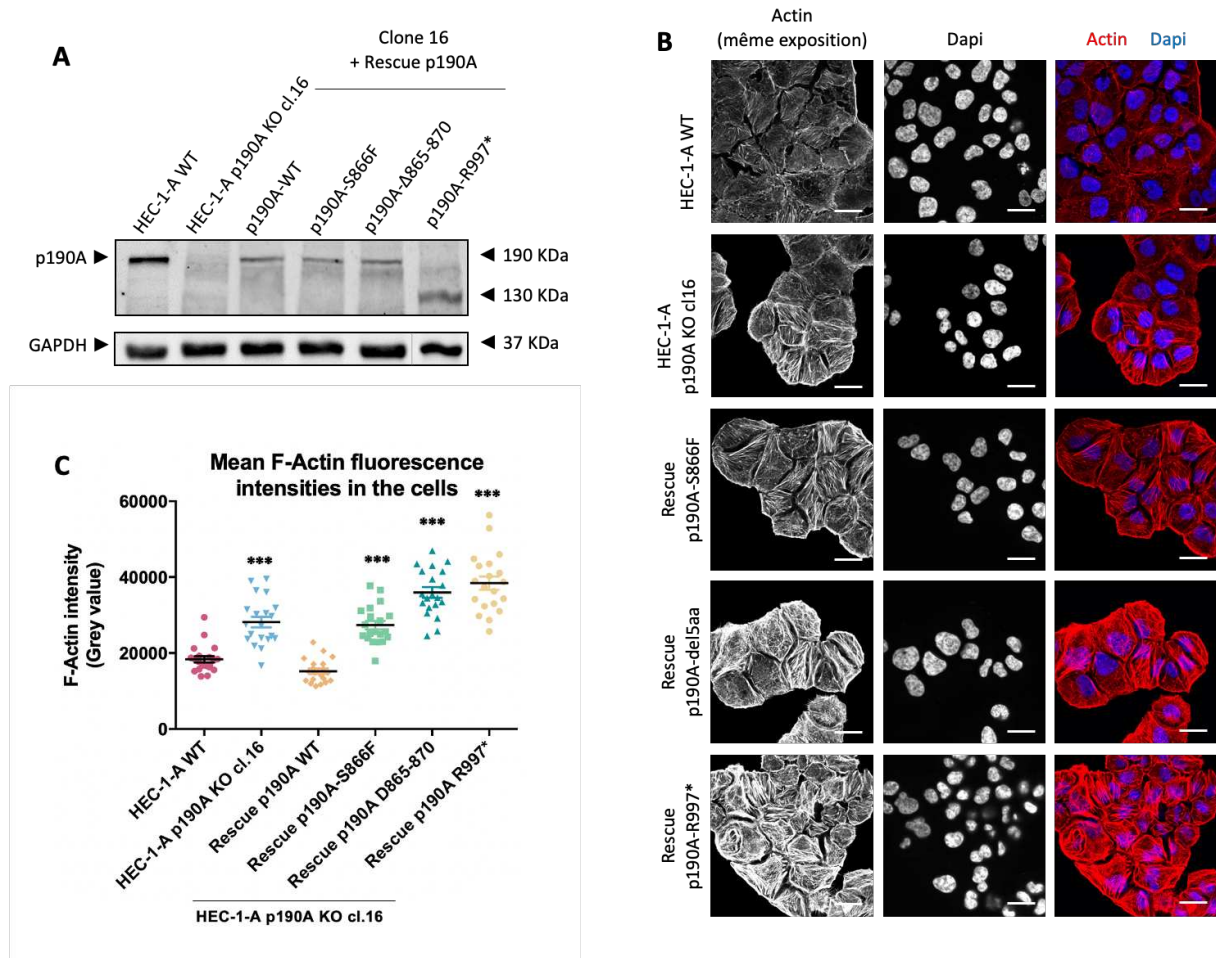


Figure 45 : Réexpression (*rescue*) de p190A WT ou muté dans les cellules HEC-1-A KO p190A. (A) Western Blot montrant l'expression de p190A dans les cellules WT, KO, et dans les cellules *rescue*. (B) Images prises au microscope confocal Leica SP5, à la même exposition pour toutes les conditions. La F-Actine est marquée par la Phalloïdine, et les noyaux par le Dapi. (C) Quantification de l'intensité du marquage de la F-actine pour les différentes conditions. Analyse par 2-way Anova, \*\*\* $p < 0,001$ . Barres d'échelle : 20 $\mu$ M.

## Partie 3 – Identification des partenaires de p190A et p190B

---

### 1. Introduction

Pour comprendre les fonctions des protéines p190A et p190B dans les cellules, un facteur clé est l'identification de leurs partenaires. Nous avons défini une stratégie permettant de mettre en évidence de manière globale les protéines interagissant directement ou indirectement avec p190A et p190B. Une telle étude permet non seulement de comprendre les voies de signalisation dans lesquelles ces protéines jouent un rôle, mais également dans quels compartiments cellulaires ce rôle peut avoir lieu. En effet, si une p190RhoGAP interagit avec des protéines connues pour être localisées dans un compartiment donné de la cellule (un organite particulier par exemple), ceci sous-entend que l'action de la protéine p190RhoGAP dans la signalisation en question a lieu dans ce compartiment.

Pour cette étude, c'est la technique de BioID (*proximity-dependent biotinylation*) qui a été utilisée. Ce travail a été effectué en collaboration avec l'équipe du Pr. Jean-François Côté et avec l'aide de la future Dr. Chloé Apcher, dans leur laboratoire à Montréal. Cette équipe avait déjà développé une expertise dans la mise en place du BioID vis-à-vis des protéines de la famille des RhoGTPases (Bagci et al., 2019). Afin de mener à bien ce projet, j'ai effectué un séjour de 3 mois à Montréal de Novembre 2021 à Février 2022.

Pour engager leurs fonctions, les RhoGTPases agissent par interaction avec leurs régulateurs et effecteurs. Il en est de même pour les protéines GAP, qui appartiennent à ces régulateurs et dont font partie les p190RhoGAPs. Cependant, les interactions de ces protéines sont souvent labiles et ont lieu selon les dynamiques mises en place dans la cellule. Elles sont donc souvent difficiles à identifier par des techniques de biochimie classique. L'avantage du BioID est qu'il permet d'identifier par biotinylation irréversible les protéines interagissant avec l'appât (ici, p190A et p190B), dans le contexte dynamique des cellules. En pratique, la protéine appât est fusionnée à une biotine ligase (BirA\*), et exprimée dans une lignée cellulaire (dans notre cas, la lignée HEK293T) (Figure 46). La présence de BirA\* permet d'étiqueter par la fixation d'une biotine (biotinylation) les protéines et complexes protéiques venant au contact de l'appât. On parle d'identification par proximité. Par la suite, les cellules sont lysées et les protéines biotinylées peuvent être immunoprécipitées grâce à l'affinité de la biotine pour des billes de streptavidine. Elles peuvent finalement être identifiées par spectrométrie de masse.

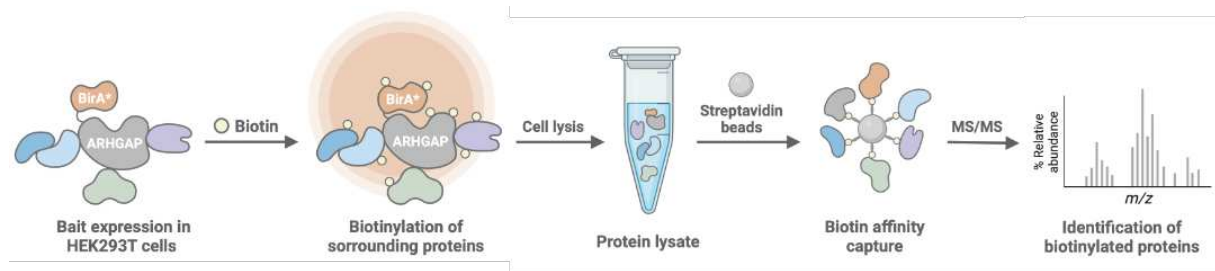


Figure 46 : Représentation schématique des étapes de l'expérience de BioID. Figure réalisée avec BioRender.com.

## 2. Résultats

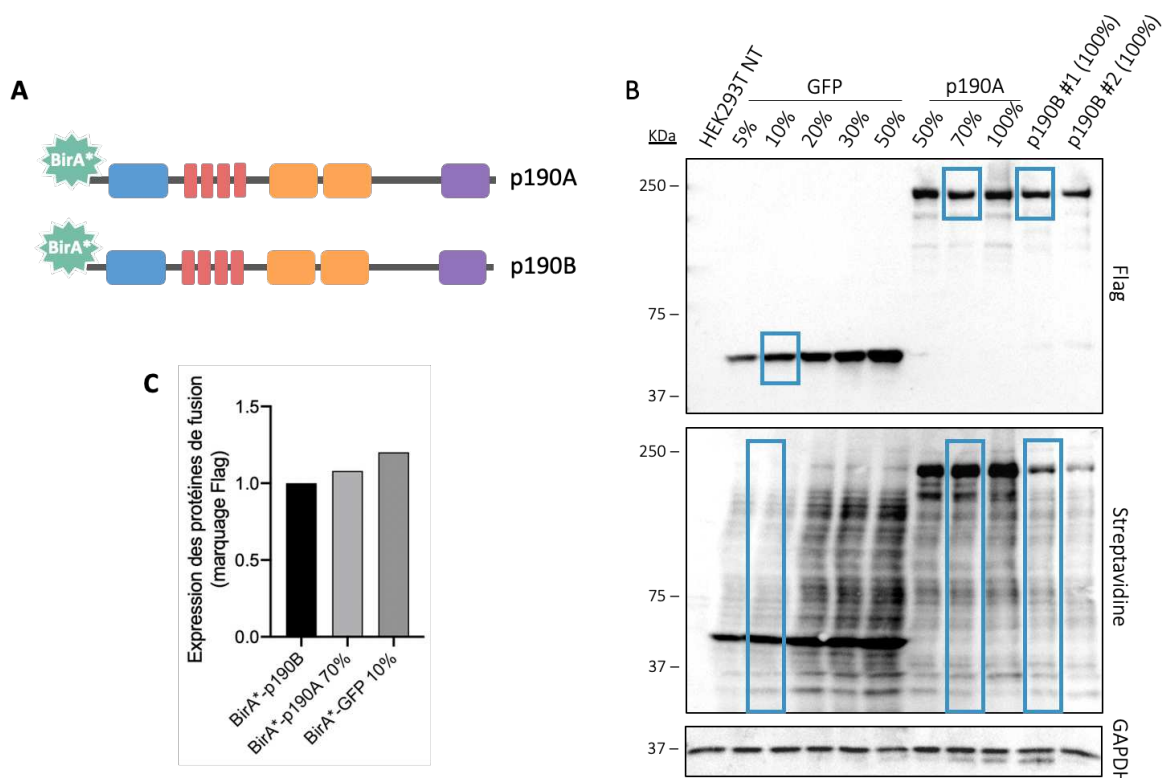
### 2.1. Ajustement de l'expression de p190A et p190B fusionnées à BirA\*

La technique de BioID nécessite l'expression d'une construction composée de l'appât (p190A et p190B dans notre cas) associé à une Biotine Ligase (BirA\*) isolée d'*Escherichia coli*. Cette BirA\* permettra la fixation d'une biotine (biotinylation) sur les protéines se trouvant à proximité de l'appât dans la cellule (Roux et al., 2012). Cette technique se base donc sur les interactions de proximité entre les protéines.

Ceci étant dit, la première étape a été de construire les plasmides permettant la production des constructions BirA\*-p190A et BirA\*-p190B. La biotine ligase a été fusionnée du côté N-terminal de chacune des protéines (Figure 47A) dans des plasmides pDEST comprenant une étiquette Flag. L'expression de ceux-ci dans les cellules HEK293T a demandé un ajustement. En effet, les p190RhoGAPs étant des protéines de grande taille, obtenir un niveau d'expression satisfaisant en expression transitoire est souvent délicat. Ceci était d'autant plus le cas que les protéines de fusion exprimées ici étaient des constructions composées de BirA\*, p190A/B, et de l'étiquette Flag.

Le niveau d'expression recherché devait être comparable à celui du contrôle négatif de l'expérience de BioID : une construction BirA\*-GFP. Pour ajuster les niveaux d'expression, nous nous sommes basés sur la protéine de fusion dont l'expression après transfection était la moins importante parmi les 3 (BirA\*-p190A, BirA\*-p190B, BirA\*-GFP). Il s'agissait de BirA\*-p190B. L'ajustement a été effectué par dilutions de cellules. Concrètement, pour avoir un niveau maximal de protéine BirA\*-p190B dans les échantillons, nous avons utilisé 100% de cellules transfectées pour produire les lysats protéiques BirA\*-p190B. Dans le cas des deux autres protéines de fusion, exprimées de manière plus importante après transfection, nous avons dilué les cellules transfectées avec des cellules non transfectées. Le but final était que le niveau de protéine de fusion soit le même dans tous les

échantillons protéiques avant l'expérience de BioID. Plusieurs dilutions ont donc été testées. Le niveau d'expression des constructions a été visualisé grâce au marquage Flag par Western Blot, et le niveau de biotinylation que celles-ci ont généré a été visualisé grâce à la streptavidine (Figure 47B). Finalement, le niveau d'expression et de biotinylation le plus équivalent à BirA\*-p190B était celui des échantillons BirA\*-p190A 70% (ie. 70% de cellules transfectées dans 30% de cellules non transfectées), et BirA\*-GFP 10% (ie. 10% de cellules transfectées dans 90% de cellules non transfectées) (Figure 47C). Ces conditions ont donc été utilisées pour les expériences de BioID (ci-dessous).



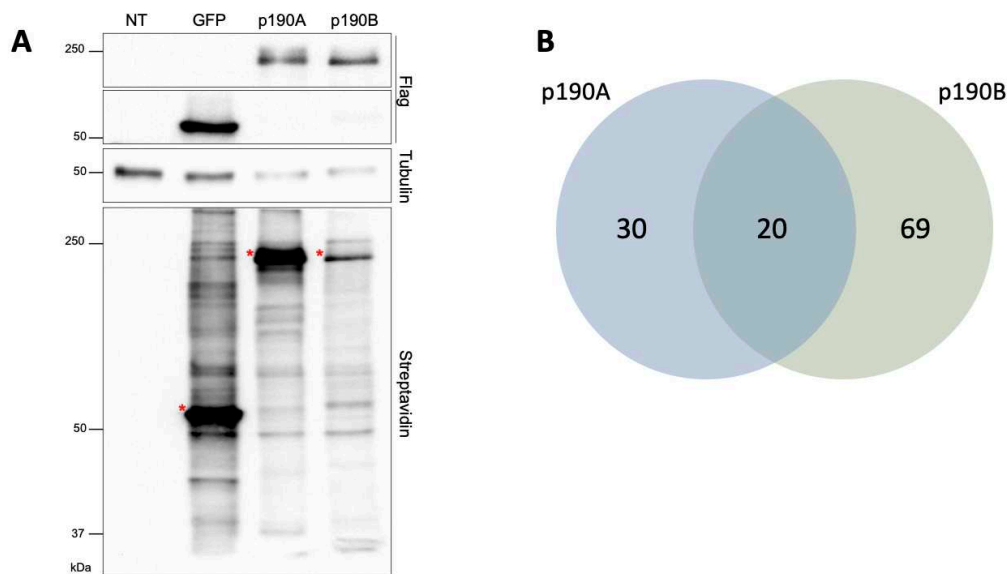
**Figure 47 : Ajustement de l'expression des protéines de fusion pour la mise en place des expériences de BioID.** (A) Représentation schématique de la fusion de la biotine ligase BirA\* à l'extrémité C-terminale des protéines p190A et p190B. (B) Western Blot réalisé avec des dilutions de cellules transfectées (pourcentages affichés) dans des cellules non transfectées pour équilibrer le niveau de protéine de fusion entre les différentes conditions. Les conditions encadrées en bleu ont été utilisées pour les expériences de BioID. (C) Quantification du niveau d'expression des protéines de fusion BirA\*-p190B, BirA\*-p190A et BirA\*-GFP dans les conditions utilisées pour la réalisation des expériences de BioID. Normalisé sur BirA\*-p190B.



## 2.2. Identification des partenaires de p190A et p190B par BioID

En accord avec les ajustements ci-dessus, les trois protéines p190A, p190B et GFP, fusionnées à BirA\*, ont été exprimées dans des cellules HEK293T *via* des vecteurs plasmidiques. L'application de biotine dans le milieu de culture des cellules pendant une durée totale de 24 heures a permis la biotinylation des protéines à proximité par BirA\*. L'expression des constructions et la biotinylation générée ont été vérifiées par Western Blot (Figure 48A). L'expression étant équivalente entre les constructions, nous avons considéré cette équivalence dans la suite. Suite à la lyse des cellules et comme décrit plus haut (Figure 46), des billes de streptavidine ont été appliquées sur les lysats pour immunoprécipiter spécifiquement les protéines biotinylées. Après une étape de digestion des protéines par de la trypsine, les échantillons ont été analysés par spectrométrie de masse.

Pour les deux protéines p190A et p190B, les résultats ont permis d'identifier 4 368 interactions de proximité. Parmi celles-ci, 139 étaient significatives : 50 concernaient p190A, 89 concernaient p190B, et 20 d'entre elles étaient communes (Figure 48B). La liste des 139 protéines est donnée en Annexe 2.



**Figure 48 : Mise en place de la technique de BioID.** (A) Western Blot montrant l'expression des constructions (Flag) et la biotinylation générée (Streptavidine) lors des expériences de BioID. p190A : BirA\*-Flag-p190A ; p190B : BirA\*-Flag-p190B ; GFP : BirA\*-Flag-GFP. \*Auto biotinylation. (B) Diagramme de Venn montrant le nombre de protéines identifiées comme interagissant significativement avec p190A, p190B ou les deux.

Pour avoir une vision globale des résultats générés grâce au BioID, les fonctions cellulaires impliquant les 139 protéines interagissant significativement avec p190A ou p190B ont été analysées dans le logiciel IPA (*Ingenuity Pathway Analysis*, Qiagen). Les fonctions liées à l'organisation du cytosquelette sont les plus significativement représentées dans les deux cas p190A et p190B, ce qui est cohérent avec toutes les données décrites jusqu'ici. Cependant, les fonctions comprenant le plus grand nombre de protéines dans le cas du BioID sur p190B sont liées à la mort cellulaire : nécrose et apoptose. Ceci peut être mis en regard des courbes de survie dans l'article ci-dessus. Enfin, il est à noter que plusieurs fonctions impliquant des vésicules (endocytose, transport de vésicules...) apparaissent dans le cas du BioID sur p190A.

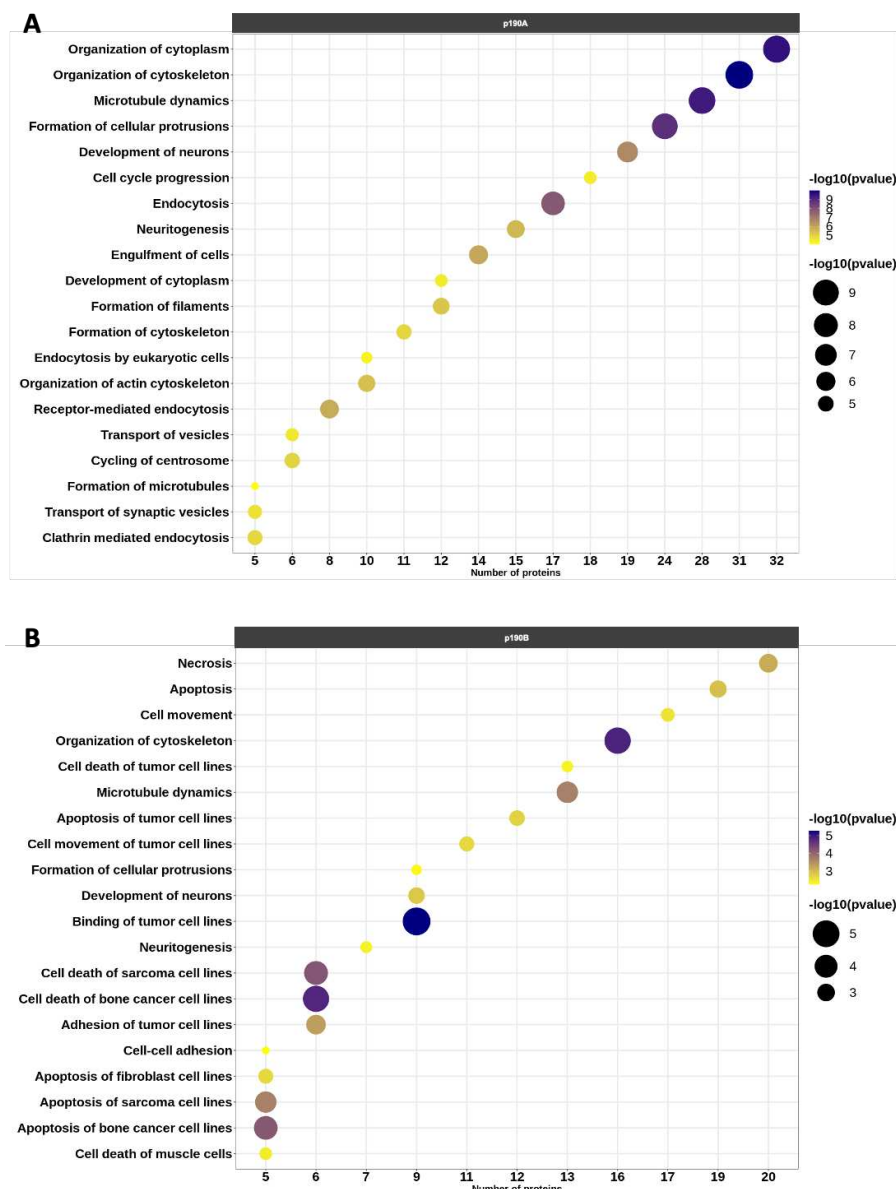


Figure 49 : Bubble plot représentant les 20 fonctions cellulaires les plus enrichies dans l'analyse BioID. Résultats obtenus grâce au logiciel IPA (*Ingenuity Pathway Analysis*, Qiagen). (A) p190A. (B) p190B.

L'analyse des partenaires de manière individuelle est nécessaire pour mieux comprendre le rôle de p190A et p190B dans les cellules. Ceci permettra par ailleurs de confirmer les résultats du BioID. Pour commencer, nous nous sommes concentrés sur les protéines partenaires communes aux deux p190. Celles-ci ont été analysées grâce au logiciel String DB (<https://string-db.org>) pour générer un interactome selon les interactions déjà connues dans la littérature entre ces protéines (Figure 50A). Pour mieux comprendre la formation des structures de Cross Linked Actin Networks (CLANs) montrées dans l'article ci-dessus, nous nous sommes concentrés sur les protéines liées au cytosquelette parmi les résultats (en rouge sur la Figure 50A). Une étude bibliographique a permis de sélectionner PDLIM7, une protéine de structure du cytosquelette déjà connue comme interagissant avec la protéine  $\alpha$ -actinine, elle-même présente dans les CLANs (Filla et al., 2011; Nakagawa et al., 2000). Pour confirmer les résultats de BioID, et pour savoir si PDLIM7 était effectivement impliquée dans la formation des CLANs, des immunomarquages ont été réalisés sur les cellules HEC-1-A. La qualité des marquages ne nous a pas permis d'identifier de manière claire la colocalisation entre p190A/B et PDLIM7 dans les cellules HEC-1-A (données non présentées). En revanche, nous avons mis en évidence la localisation de PDLIM7 au niveau de zones riches en actine telles que les lamellipodes, zones où les p190RhoGAPs sont classiquement localisées de par leur fonction de régulation du cytosquelette (Figure 50B). Ce même marquage dans les cellules HEC-1-A KO pour p190A et p190B montre une colocalisation claire entre les « nœuds » formés par les CLANs (marquage d'Actine) et le marquage PDLIM7 (Figure 50C).

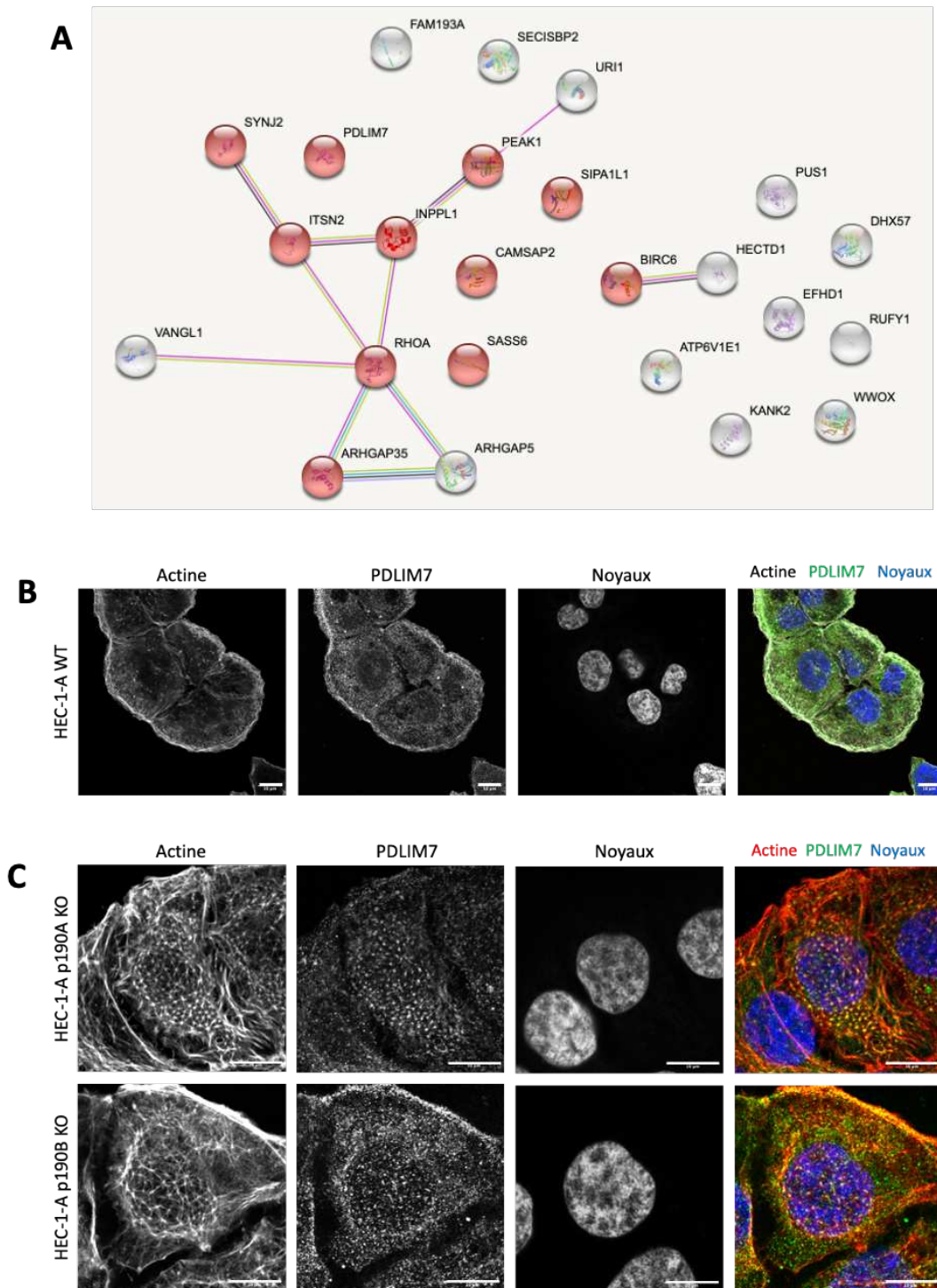


Figure 50 : Identification de PDLIM7 comme partenaire des deux p190rhoGAPs et protéine localisant aux CLANs. (A) Analyse à l'aide du logiciel String DB (<https://string-db.org>) des partenaires communs à p190A et à p190B identifiés en BioID. Les protéines impliquées dans la dynamique du cytosquelette sont représentées en rouge. (B) Images de microscopie confocale montrant la localisation de PDLIM7 dans les cellules HEC-1-A WT. (C) Images de microscopie confocale montrant la localisation de PDLIM7 au niveau des CLANs dans les cellules HEC-1-A p190A/B KO. Barres d'échelle : 10µM.

### 3. Matériel et méthodes complémentaires

#### Construction des plasmides

Les séquences codant pour p190A et p190B ont été extraites respectivement d'un plasmide pKH3-p190 (Addgene #15547) et d'un plasmide pcDNA3.1+/C-(K)DYK - ARHGAP5 (GenScript réf.OHu27244) par digestion enzymatique. Elles ont été insérées par ligation dans un plasmide pcDNA5-pDEST-FRT-BirA\*-Flag-NT fourni par le Dr. Gingras (Lunenfeld Tanenbaum Research Institute).

#### Culture cellulaire et transfections

La lignée cellulaire HEK293T a été cultivée dans un milieu DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) contenant 4,5g/L de glucose, du Glutamax (Sigma-Aldrich), et 1% de pénicilline-streptomycine (Winsent). Le milieu a été complété avec 10% de sérum de veau fœtal (Eurobio). La lignée cellulaire HEC-1-A a été cultivée dans un milieu *McCoy's 5a Modified* contenant du Glutamax (Gibco), et complété avec 10% de sérum de veau fœtal (Eurobio). Toutes les cellules ont été cultivées dans une atmosphère humidifiée à 37°C et à 5% de CO<sub>2</sub>. Les transfections plasmidiques ont été effectuées avec du Polyéthylèneimine (PEI) selon le protocole du fournisseur. Pour la biotinylation, les cellules ont été traitées avec de la biotine (50µM) pendant 24h.

#### Expériences de BioID

Le BioID a été réalisé comme décrit dans le protocole Nahlé et al., 2022. Brièvement, les lysats protéiques clarifiés ont été incubés avec 5µL de billes de streptavidine (GE Healthcare) à 4°C pendant 3h. Les billes ont été lavées 3 fois avec du tampon de lyse, puis avec du bicarbonate d'ammonium (ABC, 50mM). De la trypsine (1µg, Sigma Aldrich) a été ajoutée aux échantillons pour la digestion sur la nuit avant des étapes de lavage à l'eau. Les échantillons ont été séchés au SpeedVac puis re-suspendus dans de l'acide formique 5% et conservés à -80°C. Ils ont été injectés dans un spectromètre de masse LTQ-Orbitrap Velos.

#### Analyse bioinformatique

Les données de spectrométrie de masse ont été analysées grâce au logiciel ProHits, comme indiqué dans Bagci et al., 2019. Les protéines interagissant significativement avec p190A et p190B ont ensuite été intégrées dans le logiciel IPA (*Ingenuity Pathway Analysis*, Qiagen).

# **Discussion et Conclusion**

Les protéines p190RhoGAPs sont deux paralogues très similaires en termes de séquence et de structure. *ARHGAP35/p190A* est retrouvé significativement muté dans les cancers, notamment dans 14% des cancers de l'endomètre (Lawrence et al., 2014). Son rôle dans ce contexte a déjà été abordé dans plusieurs études (Frank et al., 2018; Wen et al., 2020). Cependant, aucune étude ne met vraiment en parallèle p190A et p190B pour comparer leurs fonctions, mais aussi pour mieux comprendre les interactions qui ont lieu entre ces deux paralogues. Cette thèse a permis de mieux comprendre les similarités entre ces protéines, la compensation s'opère si l'une d'elles est altérée, et l'impact de leurs altérations dans le cancer de l'endomètre.

## 1. Établissement des modèles d'étude

Dans la première partie, nous abordons les aspects techniques de la mise en place des modèles cellulaires pour l'étude des p190RhoGAPs. La validation de la spécificité des anticorps anti-p190A et anti-p190B était un préambule nécessaire à une telle étude, notamment compte tenu de la similarité entre les deux paralogues. Nous avons ensuite utilisé la technologie CRISPR/Cas9 pour mettre en place deux stratégies en parallèle. D'abord, la création de lignées cellulaires présentant un Knockout de p190A ou p190B a été le fondement du reste de l'étude. Ceci nous a permis d'étudier l'impact de la diminution d'expression de ces protéines qui était observée dans les cancers de l'endomètre. Si l'étude s'est concentrée sur la lignée cellulaire HEC-1-A qui était une lignée de cancer de l'endomètre, les résultats ont été confirmés grâce à la lignée Huh7. Cette dernière a eu un véritable rôle de contrôle dans notre réflexion car elle a été utilisée lors des précédentes études au laboratoire (Binamé et al., 2016). Nous connaissions donc déjà bien son phénotype. Le knockout de p190B a été délicat à établir dans cette lignée, les résultats suggérant la présence 3 allèles suite au séquençage du gène *ARHGAP5*. Ceci était cependant en concordance avec des données précédemment publiées montrant une amplification de la région chromosomique 14q12 qui comprend le gène *ARHGAP5* dans les cellules Huh7 (Gen et al., 2009). Par ailleurs, la même lignée Huh7 a été utilisée pour tenter d'établir des mutations associées au cancer directement au locus du gène *ARHGAP35*. Ceci a été l'occasion d'utiliser différentes stratégies CRISPR/Cas9, dont certaines étaient encore très novatrices (l'utilisation d'une cytidine déaminase notamment). Cependant, le criblage des clones générés n'a pas permis de créer facilement les mutations dans cette lignée cellulaire en particulier. Pour des questions de temps et de pertinence quant au sujet du cancer de l'endomètre, nous avons donc fait le choix de concentrer nos efforts sur les cellules HEC-1-A KO pour la suite de l'étude.

## 2. Étude de l'impact des p190RhoGAPs dans le cancer de l'endomètre

Le gène *ARHGAP35*, codant pour p190A, a été classé parmi le top 30 des gènes les plus mutés dans les cancers chez l'Homme (Kandoth et al., 2013), et notamment impliqué dans le développement des cancers de l'endomètre (Lawrence et al., 2014; Wang et al., 2019). Compte tenu de la similarité de son paralogue *ARHGAP5*, codant pour p190B, la question s'est posée des altérations de celui-ci dans les cancers de l'endomètre, et/ou d'une probable compensation de p190A par p190B. Plus globalement, par le biais de cette étude, nous étions en mesure de comparer les fonctions des deux protéines.

Grâce à l'analyse des cas de cancers de l'endomètre de la base de données TCGA PanCancer Atlas, nous avons montré que le gène *ARHGAP5* est lui-aussi muté dans ces tumeurs. Ces données ont été couplées aux résultats obtenus sur notre cohorte d'échantillons de tumeurs d'endomètre, en collaboration avec l'Institut Bergonié (Bordeaux). Ceci a confirmé que l'expression des deux paralogues *ARHGAP35/p190A* et *ARHGAP5/p190B* est altérée au niveau ARNm dans ces tumeurs comparativement aux tissus sains. De plus, une corrélation existe entre l'expression des deux paralogues. Pour mieux comprendre les raisons de cette corrélation, les promoteurs des deux gènes pourront être comparés. Nous pourrions vérifier si cette corrélation se retrouve au niveau protéique, mais aussi si elle se retrouve dans d'autres tissus, notamment entre des tissus sains, qu'ils soient endométriaux ou non.

L'expression des deux protéines a alors été explorée grâce aux lignées HEC-1-A KO pour p190A et p190B. Elles ont confirmé qu'à l'extinction d'un des paralogues, le second ne voit pas son expression augmenter en compensation. En termes de phénotype, les deux knockouts génèrent une augmentation significative de la polymérisation de l'actine ce qui était attendu compte tenu du rôle des p190RhoGAPs dans la régulation des RhoGTPases. Cette régulation est par ailleurs dépendante de la voie RhoA/ROCK. Or, comme dit dans l'introduction, le nombre de protéines de la famille GAP est bien plus important que celui des RhoGTPases. Nos données suggèrent donc que les p190RhoGAPs sont des GAP majeures pour la régulation de RhoA dans le cancer de l'endomètre. Les cellules présentant un knockout voient aussi leur cytosquelette d'actine remodelé de manière importante, avec l'apparition de structures d'actine en réseau appelées CLANs (*Cross Linked Actin Networks*). Des structures similaires ont été précédemment décrites dans le contexte du glaucome. Cette maladie est caractérisée par l'augmentation de la pression à l'intérieur de l'œil. Les structures de CLANs conféreraient donc une rigidité aux cellules en leur permettant de résister à la pression. Cette rigidité ne permet pas aux cellules de se mouvoir (processus qui demande une certaine flexibilité), ce qui a été confirmé par le fait que les cellules HEC-1-A p190A/B KO migrent moins que les cellules WT. En revanche, elle pourrait leur permettre de s'accrocher au tissu de l'endomètre pour que la tumeur



puisse s'y développer, ou encore de résister à la pression intratumorale. Ces hypothèses pourront être vérifiées grâce à des analyses de biologie cellulaire (test d'adhésion cellulaire, culture 3D de sphéroïdes respectivement), tout comme la présence des CLANs dans d'autres lignées cellulaires que les HEC-1-A. Finalement, il sera nécessaire de rechercher si ces structures apparaissent chez les patientes, notamment en effectuant des cultures primaires de cellules endométriales.

Pour avoir un point de vue plus global, une analyse protéomique a été réalisée en comparant les cellules HEC-1-A p190A/B KO aux cellules WT. Si des protéines différentes apparaissaient dérégulées, cette analyse a confirmé que les mêmes fonctions cellulaires étaient impactées suite aux deux knockouts. Parmi elles, en dehors des fonctions liées au cytosquelette et à la migration cellulaire, des fonctions de prolifération et mort cellulaires étaient impactées. Pour comprendre dans quelle mesure elles l'étaient, la prolifération des cellules a été analysée dans le cas des KO, mais aussi à l'aide de siRNA. Le knockout de p190A ou p190B diminue légèrement la prolifération cellulaire, et celle-ci est plus significativement diminuée dans le cas d'un double KO/KD. L'extinction de ces deux protéines révèle donc des vulnérabilités des cellules tumorales. Ainsi, comme proposé dans l'article, cette sensibilité créée par la double extinction des paralogues pourrait être envisagée comme cible pour impacter les cellules tumorales de l'endomètre. Ces données corrélerent avec le fait que les patientes atteintes d'un cancer de l'endomètre avec des altérations d'*ARHGAP35* et/ou d'*ARHGAP5* présentent une meilleure survie sans progression (Figure 1E de l'article) que les cas non altérés. Elles sont cependant en contradiction avec l'étude de Wen et al. dans laquelle l'extinction de p190A dans des cellules Ishikawa (lignée de cancer de l'endomètre) augmentait la prolifération cellulaire (Wen et al., 2020). Quoi qu'il en soit, suite aux résultats de l'analyse protéomique, il sera nécessaire d'étudier l'impact de l'extinction de p190A et p190B sur la mort cellulaire (fonction sortie en top dans nos résultats). Ceci pourra être fait grâce à des mesures de l'intégration de l'iodure de propidium, ou de l'affinité de l'annexine V, en cytométrie de flux. Par ailleurs, la cytotoxicité due à l'extinction des p190RhoGAPs pourra être mesurée (par exemple grâce au kit CellTiter-Glo®, Promega). Finalement, le traitement des cellules HEC-1-A au cisplatine a été effectué à une dose à laquelle cette lignée cellulaire est sensible (100µM) (Lin et al., 2021; Wu et al., 2021). Des doses moins importantes pourront être testées pour analyser l'incidence du KO des p190RhoGAPs sur la résistance au traitement.

Plus récemment, l'étude sur notre cohorte d'échantillons de tumeurs d'endomètre a fourni de nouvelles données grâce aux marquages immunohistochimiques de p190A et p190B. Sur les coupes marquées, les tissus sains (myomètre) ne présentent globalement pas de marquage des protéines, alors que celles-ci sont présentes de manière plus importante dans les portions tumorales. Ces observations ne semblent donc pas confirmer la diminution d'expression observée en ARNm dans les tissus tumoraux. Une expression forte des p190RhoGAPs semble par ailleurs associée aux tumeurs les

plus invasives de notre cohorte. Cependant, dans l'état actuel, les marquages sur 7 cas de cancers présentés ici restent une cohorte réduite pour tirer des conclusions strictes. De plus, nous ne disposons pas du statut mutationnel d'*ARHGAP35* et *ARHGAP5* pour ces cas. Il n'est donc pas possible de savoir dans quelle mesure l'activité des protéines p190A et p190B y est impactée. L'augmentation de la taille de la cohorte pour ces marquages d'IHC et le séquençage NGS des deux gènes seront donc des conditions nécessaires dans le futur si nous souhaitons conclure quant à l'impact des altérations liées au cancer sur les protéines p190A et p190B elles-mêmes.

### 3. Identification des partenaires de p190A et p190 grâce à la méthode de BioID

La dernière partie de ce travail a été effectuée en collaboration avec l'équipe du Pr. Jean-François Côté à Montréal où j'ai eu la chance de travailler pendant 3 mois. En utilisant la technique de BioID, nous avons établi un interactome global des deux protéines p190A et p190B. En comparaison à des méthodes de biologie moléculaire classiques, le BioID permet d'identifier les interactions même labiles dans le contexte dynamique de la cellule. Parmi les protéines identifiées et liées au cytosquelette, nous avons souligné PDLIM7. Celle-ci est présente au niveau des structures d'actine riches en p190A/B. Dans les cellules HEC-1-A p190A/B KO, PDLIM7 se localise au niveau des structures de CLANs. Une protéine de la même famille, PDLIM1, avait été précédemment identifiée dans les CLANs de cellules de glaucome (Clark et al., 2013). Dans ce même article, p190B a aussi été identifiée au niveau de ces structures. Les interactions entre les p190RhoGAPs, PDLIM7 et les CLANs, tout comme le rôle exact de PDLIM7 dans leur formation, reste à présent à explorer. Ceci pourra être fait d'abord en analysant le niveau d'expression PDLIM7 dans les cellules p190A/B KO comparativement aux cellules WT, par Western Blot. D'autre part, l'extinction de PDLIM7 via des siRNA nous indiquera si cette protéine est nécessaire à la formation et/ou au maintien des CLANs.

Plus globalement, les protéines retrouvées dans le BioID étaient enrichies dans les processus cellulaires liés au cytosquelette. Concernant p190B, elles étaient aussi fortement enrichies dans des processus de mort cellulaire. Ceci peut être mis en regard des résultats de protéomique obtenus dans les HEC-1-A KO pour p190A/B, dans lesquels les fonctions de mort cellulaire étaient impactées. Les protéines et les fonctions issues de ces analyses de BioID continueront d'être étudiées par la suite au laboratoire. Nous ciblerons des protéines supplémentaires liées au cytosquelette : l'Intersectine 2 (*ITSN2*) qui est une GEF de Cdc42 et contrôle le fuseau mitotique (Rodriguez-Fraticelli et al., 2010), et SPAR (*SIPA1L1*) qui est impliquée dans l'organisation du cytosquelette et interagit avec l' $\alpha$ -actinine

(Hoe et al., 2009). L'interaction avec les protéines MRTFA et MRTFB est aussi retrouvée dans les deux BioID, même si significative seulement dans le cas de p190B. Ces protéines étant des cofacteurs du facteur de transcription SRF (cf. Introduction partie 3.3.3), dont l'activité est médiée par les RhoGTPases, l'interaction et l'impact fonctionnel entre les p190RhoGAPs et ce cofacteur seront étudiés. Pour toutes ces protéines, les interactions avec p190A et p190B pourront être confirmées par des immunomarquages, des expériences de PLA (*Proximity Ligation Assay*) ou encore des co-immunoprécipitations. Comme pour PDLIM7, l'expression de ces protéines dans le cas du KO des p190RhoGAPs sera analysée par Western Blot, et les fonctions cellulaires seront analysées grâce à l'extinction des différents partenaires (siRNA).

Finalement, ces données de BioID sont de véritables ressources et l'étude de ces interactions permettra de comprendre de manière précise le rôle des p190RhoGAPs dans les fonctions cellulaires. Elles permettront aussi de comparer les deux paralogues, et de peut-être souligner leurs singularités.

## Conclusion générale

**Tout comme *ARHGAP35/p190A*, nous avons montré qu'*ARHGAP5/p190B* est muté dans les cancers de l'endomètre. Les deux protéines corrélient entre elles, et voient l'expression de leur ARNm diminuer dans les tumeurs comparativement aux tissus sains. Cette diminution ne semble cependant pas si évidente au niveau protéique et une étude prenant en compte les mutations dans nos échantillons sera nécessaires pour tirer des conclusions supplémentaires.**

**Pour la première fois, notre étude a permis de mettre en regard les deux paralogues p190A et p190B dans le cancer de l'endomètre. En les étudiant en parallèle, nous avons pu souligner leurs similarités. Nous avons confirmé que l'extinction de l'une n'augmente pas l'expression de l'autre. Leurs rôles similaires permettent néanmoins une compensation en termes de fonction. Ainsi, à l'extinction des deux protéines, cette compensation n'ayant plus lieu a révélé une vulnérabilité des cellules tumorales.**

**Finalement, l'étude des interactions de p190A et p190B grâce au BioID a permis de produire une véritable ressource. Elle sera utilisée dans la suite de l'étude pour analyser l'impact des paralogues dans de nouvelles voies de signalisation, et peut-être pour souligner non plus les similarités, mais les différences que peuvent avoir p190A et p190B.**

# Bibliographie

- Ahmad Mokhtar, A.M. binti, Ahmed, S.B.M., Darling, N.J., Harris, M., Mott, H.R., Owen, D., 2021. A Complete Survey of RhoGDI Targets Reveals Novel Interactions with Atypical Small GTPases. *Biochemistry* 60, 1533–1551. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.1c00120>
- Arafah, M., Rashid, S., Akhtar, M., 2021. Endometriosis: A Comprehensive Review. *Advances in Anatomic Pathology* 28, 30–43. <https://doi.org/10.1097/PAP.000000000000288>
- Bagci, H., Sriskandarajah, N., Robert, A., Boulais, J., Elkholi, I.E., Tran, V., Lin, Z.-Y., Thibault, M.-P., Dubé, N., Faubert, D., Hipfner, D.R., Gingras, A.-C., Côté, J.-F., 2019. Mapping the proximity interaction network of the Rho-family GTPases reveals signalling pathways and regulatory mechanisms. *Nat Cell Biol*. <https://doi.org/10.1038/s41556-019-0438-7>
- Barrett, T., Xiao, B., Dodson, E.J., Dodson, G., Ludbrook, S.B., Nurmahomed, K., Gamblin, S.J., Musacchio, A., Smerdon, S.J., Eccleston, J.F., 1997. The structure of the GTPase-activating domain from p50rhoGAP. *Nature* 385, 458–461. <https://doi.org/10.1038/385458a0>
- Berkhout, R.P., Lambalk, C.B., Huirne, J., Mijatovic, V., Repping, S., Hamer, G., Mastenbroek, S., 2018. High-quality human preimplantation embryos actively influence endometrial stromal cell migration. *J Assist Reprod Genet* 35, 659–667. <https://doi.org/10.1007/s10815-017-1107-z>
- Binamé, F., Bidaud-Meynard, A., Magnan, L., Piquet, L., Montibus, B., Chabadel, A., Saltel, F., Lagrée, V., Moreau, V., 2016. Cancer-associated mutations in the protrusion-targeting region of p190RhoGAP impact tumor cell migration. *J Cell Biol* 214, 859–873. <https://doi.org/10.1083/jcb.201601063>
- Blanchoin, L., Boujemaa-Paterski, R., Sykes, C., Plastino, J., 2014. Actin Dynamics, Architecture, and Mechanics in Cell Motility. *Physiological Reviews* 94, 235–263. <https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2013>
- Bokhman, J.V., 1983. Two pathogenetic types of endometrial carcinoma. *Gynecologic Oncology* 15, 10–17. [https://doi.org/10.1016/0090-8258\(83\)90111-7](https://doi.org/10.1016/0090-8258(83)90111-7)
- Bourne, H.R., Sanders, D.A., McCormick, F., 1991. The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature* 349, 117–127. <https://doi.org/10.1038/349117a0>
- Bovellan, M., Romeo, Y., Biro, M., Boden, A., Chugh, P., Yonis, A., Vaghela, M., Fritzsche, M., Moulding, D., Thorogate, R., Jégou, A., Thrasher, A.J., Romet-Lemonne, G., Roux, P.P., Paluch, E.K., Charras, G., 2014. Cellular Control of Cortical Actin Nucleation. *Current Biology* 24, 1628–1635. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.05.069>
- Burbelo, P.D., Miyamoto, S., Utani, A., Brill, S., Yamada, K.M., Hall, A., Yamada, Y., 1995. p190-B, a New Member of the Rho GAP Family, and Rho Are Induced to Cluster after Integrin Cross-linking. *Journal of Biological Chemistry* 270, 30919–30926. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.52.30919>
- Burridge, K., Guilly, C., 2016. Focal adhesions, stress fibers and mechanical tension. *Experimental Cell Research* 343, 14–20. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2015.10.029>
- Bustelo, X.R., Sauzeau, V., Berenjeno, I.M., 2007. GTP-binding proteins of the Rho/Rac family: regulation, effectors and functions in vivo. *Bioessays* 29, 356–370. <https://doi.org/10.1002/bies.20558>
- Cardama, G.A., Gonzalez, N., Maggio, J., Menna, P.L., Gomez, D.E., 2017. Rho GTPases as therapeutic targets in cancer (Review). *International Journal of Oncology* 51, 1025–1034. <https://doi.org/10.3892/ijo.2017.4093>
- Chugh, P., Paluch, E.K., 2018. The actin cortex at a glance. *Journal of Cell Science* 131, jcs186254. <https://doi.org/10.1242/jcs.186254>
- Clark, R., Nosie, A., Walker, T., Faralli, J.A., Filla, M.S., Barrett-Wilt, G., Peters, D.M., 2013. Comparative Genomic and Proteomic Analysis of Cytoskeletal Changes in Dexamethasone-Treated Trabecular Meshwork Cells. *Molecular & Cellular Proteomics* 12, 194–206. <https://doi.org/10.1074/mcp.M112.019745>
- Colombo, N., Creutzberg, C., Amant, F., Bosse, T., González-Martín, A., Ledermann, J., Marth, C., Nout, R., Querleu, D., Mirza, M.R., Sessa, C., Abal, M., Altundag, O., Amant, F., van Leeuwenhoek, A.,

- Banerjee, S., Bosse, T., Casado, A., de Agustín, L.C., Cibula, D., Colombo, N., Creutzberg, C., del Campo, J.-M., Emons, G., Goffin, F., González-Martín, A., Greggi, S., Haie-Meder, C., Katsaros, D., Kesic, V., Kurzeder, C., Lax, S., Lécuru, F., Ledermann, J., Levy, T., Lorusso, D., Mäenpää, J., Marth, C., Matias-Guiu, X., Morice, P., Nijman, H.W., Nout, R., Powell, M., Querleu, D., Mirza, M.R., Reed, N., Rodolakis, A., Salvesen, H., Sehouli, J., Sessa, C., Taylor, A., Westermann, A., Zeimet, A.G., 2016. ESMO-ESGO-ESTRO Consensus Conference on Endometrial Cancer: diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology* 27, 16–41. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdv484>
- Cook, D.R., Rossman, K.L., Der, C.J., 2014. Rho guanine nucleotide exchange factors: regulators of Rho GTPase activity in development and disease. *Oncogene* 33, 4021–4035. <https://doi.org/10.1038/onc.2013.362>
- Corner, W., Allen, M., 1928. PHYSIOLOGY OF THE CORPUS LUTEUM II. Production of a special uterine reaction (progestational proliferation) by extracts of the corpus luteum. *American Journal of Physiology* 14.
- Creutzberg, C.L., Wárlám-Rodenhuis, C.C., van de Steen-Banasik, E., Beerman, H., van Lent, M., 2000. Surgery and postoperative radiotherapy versus surgery alone for patients with stage-1 endometrial carcinoma: multicentre randomised trial. *THE LANCET* 355, 8.
- Critchley, H.O.D., Maybin, J.A., Armstrong, G.M., Williams, A.R.W., 2020. Physiology of the Endometrium and Regulation of Menstruation. *Physiological Reviews* 100, 1149–1179. <https://doi.org/10.1152/physrev.00031.2019>
- David, M., Petit, D., Bertoglio, J., 2012. Cell cycle regulation of Rho signaling pathways. *Cell Cycle* 11, 3003–3010. <https://doi.org/10.4161/cc.21088>
- Der, C.J., Krontiris, T.G., Cooper, G.M., 1982. Transforming genes of human bladder and lung carcinoma cell lines are homologous to the ras genes of Harvey and Kirsten sarcoma viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 79, 3637–3640. <https://doi.org/10.1073/pnas.79.11.3637>
- Di Martino, J., Henriët, E., Ezzoukhry, Z., Goetz, J.G., Moreau, V., Saltel, F., 2016. The microenvironment controls invadosome plasticity. *Journal of Cell Science jcs.182329*. <https://doi.org/10.1242/jcs.182329>
- Di Martino, J., Henriët, E., Ezzoukhry, Z., Mondal, C., Bravo-Cordero, J.J., Moreau, V., Saltel, F., 2017. 2D and 3D Matrices to Study Linear Invadosome Formation and Activity. *JoVE* 54911. <https://doi.org/10.3791/54911>
- Dominguez, R., 2004. Actin-binding proteins – a unifying hypothesis. *Trends in Biochemical Sciences* 29, 572–578. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2004.09.004>
- Eberth, A., Dvorsky, R., Becker, C.F.W., Beste, A., Goody, R.S., Ahmadian, M.R., 2005. Monitoring the real-time kinetics of the hydrolysis reaction of guanine nucleotide-binding proteins. *Biological Chemistry* 386. <https://doi.org/10.1515/BC.2005.127>
- Eghiaian, F., Rigato, A., Scheuring, S., 2015. Structural, Mechanical, and Dynamical Variability of the Actin Cortex in Living Cells. *Biophysical Journal* 108, 1330–1340. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2015.01.016>
- El-Toukhy, T., Coomarasamy, A., Khairy, M., Sunkara, K., Seed, P., Khalaf, Y., Braude, P., 2008. The relationship between endometrial thickness and outcome of medicated frozen embryo replacement cycles. *Fertility and Sterility* 89, 832–839. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2007.04.031>
- Filla, M.S., Schwinn, M.K., Nosie, A.K., Clark, R.W., Peters, D.M., 2011. Dexamethasone-Associated Cross-Linked Actin Network Formation in Human Trabecular Meshwork Cells Involves  $\beta 3$  Integrin Signaling. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 52, 2952. <https://doi.org/10.1167/iovs.10-6618>
- Franchi, M., Piperigkou, Z., Karamanos, K.-A., Franchi, L., Masola, V., 2020. Extracellular Matrix-Mediated Breast Cancer Cells Morphological Alterations, Invasiveness, and Microvesicles/Exosomes Release. *Cells* 9, 2031. <https://doi.org/10.3390/cells9092031>
- Frank, S.R., Köllmann, C.P., Luong, P., Galli, G.G., Zou, L., Bernardis, A., Getz, G., Calogero, R.A., Frödin, M., Hansen, S.H., 2018. p190 RhoGAP promotes contact inhibition in epithelial cells by repressing YAP activity. *Journal of Cell Biology* 217, 3183–3201. <https://doi.org/10.1083/jcb.201710058>
- Fritz, G., Just, I., Kaina, B., 1999. Rho GTPases are over-expressed in human tumors. *Int. J. Cancer* 81,

- 682–687. [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)
- Fuentes, N., Silveyra, P., 2019. Estrogen receptor signaling mechanisms. *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology* 116, 135–170. <https://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2019.01.001>
- Garcia-Mata, R., Boulter, E., Burridge, K., 2011. The “invisible hand”: regulation of RHO GTPases by RHOGDIs. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12, 493–504. <https://doi.org/10.1038/nrm3153>
- Gellersen, B., Brosens, J., 2003. Cyclic AMP and progesterone receptor cross-talk in human endometrium: a decidualizing affair. *Journal of Endocrinology* 178, 357–372. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1780357>
- Gen, Y., Yasui, K., Zen, K., Nakajima, T., Tsuji, K., Endo, M., Mitsuyoshi, H., Minami, M., Itoh, Y., Tanaka, S., Taniwaki, M., Arii, S., Okanoue, T., Yoshikawa, T., 2009. A novel amplification target, ARHGAP5, promotes cell spreading and migration by negatively regulating RhoA in Huh-7 hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Letters* 275, 27–34. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2008.09.036>
- Genestie, C., Leary, A., Devouassoux, M., Auguste, A., 2017. Classification histologique et moléculaire des cancers de l'endomètre et leurs implications dans la thérapeutique. *Bulletin du Cancer* 104, 1001–1012. <https://doi.org/10.1016/j.bulcan.2017.08.004>
- Grewal, S., Carver, J., Ridley, A.J., Mardon, H.J., 2010. Human Endometrial Stromal Cell Rho GTPases Have Opposing Roles in Regulating Focal Adhesion Turnover and Embryo Invasion In Vitro. *Biology of Reproduction* 83, 75–82. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.109.080630>
- Grewal, S., Carver, J.G., Ridley, A.J., Mardon, H.J., 2008. Implantation of the human embryo requires Rac1-dependent endometrial stromal cell migration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 16189–16194. <https://doi.org/10.1073/pnas.0806219105>
- Grise, F., Bidaud, A., Moreau, V., 2009. Rho GTPases in hepatocellular carcinoma. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* 1795, 137–151. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2008.12.003>
- Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2011. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144, 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Herman, I.M., 1993. Actin isoforms. *Current Opinion in Cell Biology* 5, 48–55. [https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(05\)80007-9](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(05)80007-9)
- Hoe, H.-S., Lee, J.-Y., Pak, D.T.S., 2009. Combinatorial morphogenesis of dendritic spines and filopodia by SPAR and  $\alpha$ -actinin2. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 384, 55–60. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.04.069>
- Hohmann, Dehghani, 2019. The Cytoskeleton—A Complex Interacting Meshwork. *Cells* 8, 362. <https://doi.org/10.3390/cells8040362>
- Homem, C.C.F., Peifer, M., 2009. Exploring the Roles of Diaphanous and Enabled Activity in Shaping the Balance between Filopodia and Lamellipodia. *MBoC* 20, 5138–5155. <https://doi.org/10.1091/mbc.e09-02-0144>
- Hoshino, D., Branch, K.M., Weaver, A.M., 2013. Signaling inputs to invadopodia and podosomes. *Journal of Cell Science* jcs.079475. <https://doi.org/10.1242/jcs.079475>
- Islami, F., Ward, E.M., Sung, H., Cronin, K.A., Tangka, F.K.L., Sherman, R.L., Zhao, J., Anderson, R.N., Henley, S.J., Yabroff, K.R., Jemal, A., Benard, V.B., 2021. Annual Report to the Nation on the Status of Cancer, Part 1: National Cancer Statistics. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* 113, 1648–1669. <https://doi.org/10.1093/jnci/djab131>
- Jabbour, H.N., Kelly, R.W., Fraser, H.M., Critchley, H.O.D., 2006. Endocrine Regulation of Menstruation. *Endocrine Reviews* 27, 17–46. <https://doi.org/10.1210/er.2004-0021>
- Jaffe, A.B., Hall, A., 2005. RHO GTPASES: Biochemistry and Biology. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 21, 247–269. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.21.020604.150721>
- Jaiswal, M., Dvorsky, R., Amin, E., Risse, S.L., Fansa, E.K., Zhang, S.-C., Taha, M.S., Gauhar, A.R., Nakhaei-Rad, S., Kordes, C., Koessmeier, K.T., Cirstea, I.C., Olayioye, M.A., Häussinger, D., Ahmadian, M.R., 2014. Functional Cross-talk between Ras and Rho Pathways. *Journal of Biological Chemistry* 289, 6839–6849. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.527655>
- Jiang, C., Gong, W., Chen, R., Ke, H., Qu, X., Yang, W., Cheng, Z., 2018. RhoA/ROCK/ARHGAP26 signaling in the eutopic and ectopic endometrium is involved in clinical characteristics of adenomyosis. *J Int*

- Med Res 46, 5019–5029. <https://doi.org/10.1177/0300060518789038>
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J.A., Charpentier, E., 2012. A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science* 337, 816–821. <https://doi.org/10.1126/science.1225829>
- Juin, A., Billottet, C., Moreau, V., Destaing, O., Albiges-Rizo, C., Rosenbaum, J., Génot, E., Saltel, F., 2012. Physiological type I collagen organization induces the formation of a novel class of linear invadosomes. *MBoC* 23, 297–309. <https://doi.org/10.1091/mbc.e11-07-0594>
- Kandoth, C., McLellan, M.D., Vandin, F., Ye, K., Niu, B., Lu, C., Xie, M., Zhang, Q., McMichael, J.F., Wyczalkowski, M.A., Leiserson, M.D.M., Miller, C.A., Welch, J.S., Walter, M.J., Wendl, M.C., Ley, T.J., Wilson, R.K., Raphael, B.J., Ding, L., 2013. Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. *Nature* 502, 333–339. <https://doi.org/10.1038/nature12634>
- Karp, G., 2010. Chapitre 9 : Le cytosquelette et la motilité cellulaire, in: Bouharmont, J. (Tran.), *Biologie cellulaire et moléculaire*. De Boeck, Bruxelles [Paris].
- Kaverina, I., Stradal, T.E.B., Gimona, M., 2003. Podosome formation in cultured A7r5 vascular smooth muscle cells requires Arp2/3-dependent de-novo actin polymerization at discrete microdomains. *Journal of Cell Science* 116, 4915–4924. <https://doi.org/10.1242/jcs.00818>
- Koskas, M., Amant, F., Mirza, M.R., Creutzberg, C.L., 2021. Cancer of the corpus uteri: 2021 update. *Int J Gynecol Obstet* 155, 45–60. <https://doi.org/10.1002/ijgo.13866>
- Kreider-Letterman, G., Carr, N.M., Garcia-Mata, R., 2022. Fixing the GAP: The role of RhoGAPs in cancer. *European Journal of Cell Biology* 101, 151209. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2022.151209>
- Laurin, M., Côté, J.-F., 2014. Insights into the biological functions of Dock family guanine nucleotide exchange factors. *Genes Dev.* 28, 533–547. <https://doi.org/10.1101/gad.236349.113>
- 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., 2014. Discovery and saturation analysis of cancer genes across 21 tumour types. *Nature* 505, 495–501. <https://doi.org/10.1038/nature12912>
- Lebovitz, O., Orvieto, R., 2014. Treating patients with “thin” endometrium – an ongoing challenge. *Gynecol Endocrinol* 30, 409–414.
- Lee, N.K., Cheung, M.K., Shin, J.Y., Husain, A., Teng, N.N., Berek, J.S., Kapp, D.S., Osann, K., Chan, J.K., 2007. Prognostic Factors for Uterine Cancer in Reproductive-Aged Women 109, 8.
- Leung, T., Chen, X.Q., Manser, E., Lim, L., 1996. The p160 RhoA-binding kinase ROK alpha is a member of a kinase family and is involved in the reorganization of the cytoskeleton. *Mol Cell Biol* 16, 5313–5327. <https://doi.org/10.1128/MCB.16.10.5313>
- Levine, D.A., 2013. Integrated genomic characterization of endometrial carcinoma. *Nature* 497, 67–73. <https://doi.org/10.1038/nature12113>
- Lin, C.-K., Liu, S.-T., Wu, Z.-S., Wang, Y.-C., Huang, S.-M., 2021. Mechanisms of Cisplatin in Combination with Repurposed Drugs against Human Endometrial Carcinoma Cells. *Life* 11, 160. <https://doi.org/10.3390/life11020160>
- Lin, T.-Y., Wu, F.-J., Chang, C.-L., Li, Z., Luo, C.-W., 2016. NMU signaling promotes endometrial cancer cell progression by modulating adhesion signaling. *Oncotarget* 7, 10228–10242. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7169>
- Linder, S., Cervero, P., Eddy, R., Condeelis, J., 2022. Mechanisms and roles of podosomes and invadopodia. *Nat Rev Mol Cell Biol.* <https://doi.org/10.1038/s41580-022-00530-6>
- Linder, S., Wiesner, C., Himmel, M., 2011. Degrading Devices: Invadosomes in Proteolytic Cell Invasion. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 27, 185–211. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-092910-154216>
- Lockwood, C.J., Krikun, G., Papp, C., Toth, E., Markiewicz, L., Wang, E.-Y., Kerényi, T., Zhou, X., Hausknecht, V., Papp, Z., Schatz, F., 1994. The Role of Progestationally Regulated Stromal Cell Tissue Factor and Type-1 Plasminogen Activator Inhibitor (PAI-1) in Endometrial Hemostasis and Menstruation. *Ann NY Acad Sci* 734, 57–79. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1994.tb21736.x>
- Longenecker, K., Read, P., Derewenda, U., Dauter, Z., Liu, X., Garrard, S., Walker, L., Somlyo, A.V., Nakamoto, R.K., Somlyo, A.P., Derewenda, Z.S., 1999. How RhoGDI binds Rho. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 55, 1503–1515. <https://doi.org/10.1107/S090744499900801X>



- MacLean, J.A., Hayashi, K., 2022. Progesterone Actions and Resistance in Gynecological Disorders. *Cells* 11, 647. <https://doi.org/10.3390/cells11040647>
- Madaule, P., Axel, R., 1985. A novel ras-related gene family. *Cell* 41, 31–40. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(85\)90058-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(85)90058-3)
- Makieva, S., Giacomini, E., Ottolina, J., Sanchez, A., Papaleo, E., Viganò, P., 2018. Inside the Endometrial Cell Signaling Subway: Mind the Gap(s). *IJMS* 19, 2477. <https://doi.org/10.3390/ijms19092477>
- Makker, V., MacKay, H., Ray-Coquard, I., Levine, D.A., Westin, S.N., Aoki, D., Oaknin, A., 2021. Endometrial cancer. *Nat Rev Dis Primers* 7, 88. <https://doi.org/10.1038/s41572-021-00324-8>
- Maruyama, T., Yoshimura, Y., 2008. Molecular and Cellular Mechanisms for Differentiation and Regeneration of the Uterine Endometrium. *Endocr J* 55, 795–810. <https://doi.org/10.1507/endocrj.K08E-067>
- Mattila, P.K., Lappalainen, P., 2008. Filopodia: molecular architecture and cellular functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 446–454. <https://doi.org/10.1038/nrm2406>
- Miller, D.S., Filiaci, V.L., Mannel, R.S., Cohn, D.E., Matsumoto, T., Tewari, K.S., DiSilvestro, P., Pearl, M.L., Argenta, P.A., Powell, M.A., Zweizig, S.L., Warshal, D.P., Hanjani, P., Carney, M.E., Huang, H., Cella, D., Zaino, R., Fleming, G.F., 2020. Carboplatin and Paclitaxel for Advanced Endometrial Cancer: Final Overall Survival and Adverse Event Analysis of a Phase III Trial (NRG Oncology/GOG0209). *JCO* 38, 3841–3850. <https://doi.org/10.1200/JCO.20.01076>
- Moore, L., Leongamornlert, D., Coorens, T.H.H., Sanders, M.A., Ellis, P., Dentro, S.C., Dawson, K.J., Butler, T., Rahbari, R., Mitchell, T.J., Maura, F., Nangalia, J., Tarpey, P.S., Brunner, S.F., Lee-Six, H., Hooks, Y., Moody, S., Mahbubani, K.T., Jimenez-Linan, M., Brosens, J.J., Iacobuzio-Donahue, C.A., Martincorena, I., Saeb-Parsy, K., Campbell, P.J., Stratton, M.R., 2020. The mutational landscape of normal human endometrial epithelium. *Nature* 580, 640–646. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2214-z>
- Mosaddeghzadeh, N., Ahmadian, M.R., 2021. The RHO Family GTPases: Mechanisms of Regulation and Signaling. *Cells* 10, 1831. <https://doi.org/10.3390/cells10071831>
- Mullins, R.D., Heuser, J.A., Pollard, T.D., 1998. The interaction of Arp2/3 complex with actin: Nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 6181–6186. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.11.6181>
- Murali, R., Soslow, R.A., Weigelt, B., 2014. Classification of endometrial carcinoma: more than two types. *The Lancet Oncology* 15, e268–e278. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(13\)70591-6](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(13)70591-6)
- Nahlé, S., Quirion, L., Boulais, J., Bagci, H., Faubert, D., Gingras, A.-C., Côté, J.-F., 2022. Defining the interactomes of proteins involved in cytoskeletal dynamics using high-throughput proximity-dependent biotinylation in cellulo. *STAR Protocols* 3, 101075. <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2021.101075>
- Nakagawa, N., Hoshijima, M., Oyasu, M., Saito, N., Tanizawa, K., Kuroda, S., 2000. ENH, Containing PDZ and LIM Domains, Heart/Skeletal Muscle-Specific Protein, Associates with Cytoskeletal Proteins through the PDZ Domain. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 272, 505–512. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.2787>
- Naumanen, P., Lappalainen, P., Hotulainen, P., 2008. Mechanisms of actin stress fibre assembly. *Journal of Microscopy* 231, 446–454. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.2008.02057.x>
- Noyes, R.W., Hertig, A.T., Rock, J., 1950. Dating the Endometrial Biopsy. *Fertility and Sterility* 1, 3–25. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(16\)30062-0](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(16)30062-0)
- Ohashi, K., Nagata, K., Maekawa, M., Ishizaki, T., Narumiya, S., Mizuno, K., 2000. Rho-associated Kinase ROCK Activates LIM-kinase 1 by Phosphorylation at Threonine 508 within the Activation Loop. *Journal of Biological Chemistry* 275, 3577–3582. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.5.3577>
- Parada, L.F., Tabin, C.J., Shih, C., Weinberg, R.A., 1982. Human EJ bladder carcinoma oncogene is homologue of Harvey sarcoma virus ras gene. *Nature* 297, 474–478. <https://doi.org/10.1038/297474a0>
- Pellegrin, S., Mellor, H., 2007. Actin stress fibres. *Journal of Cell Science* 120, 3491–3499. <https://doi.org/10.1242/jcs.018473>
- Perrin, B.J., Ervasti, J.M., 2010. The actin gene family: Function follows isoform. *Cytoskeleton* 67, 630–

634. <https://doi.org/10.1002/cm.20475>
- Pohnke, Y., Schneider-Merck, T., Fahnenstich, J., Kempf, R., Christian, M., Milde-Langosch, K., Brosens, J.J., Gellersen, B., 2004. Wild-Type p53 Protein Is Up-Regulated upon Cyclic Adenosine Monophosphate-Induced Differentiation of Human Endometrial Stromal Cells. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 89, 5233–5244. <https://doi.org/10.1210/jc.2004-0012>
- Pollard, T.D., 2016. Actin and Actin-Binding Proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 8, a018226. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a018226>
- Pollard, T.D., Goldman, R.D., 2018. Overview of the Cytoskeleton from an Evolutionary Perspective. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 10, a030288. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a030288>
- Rees, H.A., Liu, D.R., 2018. Base editing: precision chemistry on the genome and transcriptome of living cells. *Nat Rev Genet* 19, 770–788. <https://doi.org/10.1038/s41576-018-0059-1>
- Reicher, B., Joseph, N., David, A., Pauker, M.H., Perl, O., Barda-Saad, M., 2012. Ubiquitylation-Dependent Negative Regulation of WASp Is Essential for Actin Cytoskeleton Dynamics. *Mol Cell Biol* 32, 3153–3163. <https://doi.org/10.1128/MCB.00161-12>
- Revenu, C., Athman, R., Robine, S., Louvard, D., 2004. The co-workers of actin filaments: from cell structures to signals. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 635–646. <https://doi.org/10.1038/nrm1437>
- Riento, K., Ridley, A.J., 2003. ROCKs: multifunctional kinases in cell behaviour. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 446–456. <https://doi.org/10.1038/nrm1128>
- Rodriguez-Fraticelli, A.E., Vergarajauregui, S., Eastburn, D.J., Datta, A., Alonso, M.A., Mostov, K., Martín-Belmonte, F., 2010. The Cdc42 GEF Intersectin 2 controls mitotic spindle orientation to form the lumen during epithelial morphogenesis. *Journal of Cell Biology* 189, 725–738. <https://doi.org/10.1083/jcb.201002047>
- Roux, K.J., Kim, D.I., Raida, M., Burke, B., 2012. A promiscuous biotin ligase fusion protein identifies proximal and interacting proteins in mammalian cells. *Journal of Cell Biology* 196, 801–810. <https://doi.org/10.1083/jcb.201112098>
- Santos, E., Tronick, S.R., Aaronson, S.A., Pulciani, S., Barbacid, M., 1982. T24 human bladder carcinoma oncogene is an activated form of the normal human homologue of BALB- and Harvey-MSV transforming genes. *Nature* 298, 343–347. <https://doi.org/10.1038/298343a0>
- Schaefer, A., Reinhard, N.R., Hordijk, P.L., 2014. Toward understanding RhoGTPase specificity: structure, function and local activation. *Small GTPases* 5, e968004. <https://doi.org/10.4161/21541248.2014.968004>
- Scheffzek, K., Ahmadian, M.R., 2005. GTPase activating proteins: structural and functional insights 18 years after discovery. *Cell. Mol. Life Sci.* 62, 3014–3038. <https://doi.org/10.1007/s00018-005-5136-x>
- Seals, D.F., Azucena, E.F., Pass, I., Tesfay, L., Gordon, R., Woodrow, M., Resau, J.H., Courtneidge, S.A., 2005. The adaptor protein Tks5/Fish is required for podosome formation and function, and for the protease-driven invasion of cancer cells. *Cancer Cell* 7, 155–165. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2005.01.006>
- Sehgal, R., Sheahan, K., O'Connell, P., Hanly, A., Martin, S., Winter, D., 2014. Lynch Syndrome: An Updated Review. *Genes* 5, 497–507. <https://doi.org/10.3390/genes5030497>
- Settleman, J., Narasimhan, V., Foster, L.C., Weinberg, R.A., 1992. Molecular cloning of cDNAs encoding the GAP-associated protein p190: Implications for a signaling pathway from ras to the nucleus. *Cell* 69, 539–549. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90454-K](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90454-K)
- Shih, K.K., Yun, E., Gardner, G.J., Barakat, R.R., Chi, D.S., Leitao, M.M., 2011. Surgical cytoreduction in stage IV endometrioid endometrial carcinoma. *Gynecologic Oncology* 122, 608–611. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2011.05.020>
- Stelloo, E., Bosse, T., Nout, R.A., MacKay, H.J., Church, D.N., Nijman, H.W., Leary, A., Edmondson, R.J., Powell, M.E., Crosbie, E.J., Kitchener, H.C., Mileskin, L., Pollock, P.M., Smit, V.T., Creutzberg, C.L., 2015. Refining prognosis and identifying targetable pathways for high-risk endometrial cancer; a TRANSPORTEC initiative. *Mod Pathol* 28, 836–844. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2015.43>
- Strowitzki, T., Germeyer, A., Popovici, R., von Wolff, M., 2006. The human endometrium as a fertility-determining factor. *Human Reproduction Update* 12, 617–630.

- <https://doi.org/10.1093/humupd/dml033>
- Suda, K., Nakaoka, H., Yoshihara, K., Ishiguro, T., Tamura, R., Mori, Y., Yamawaki, K., Adachi, S., Takahashi, T., Kase, H., Tanaka, K., Yamamoto, T., Motoyama, T., Inoue, I., Enomoto, T., 2018. Clonal Expansion and Diversification of Cancer-Associated Mutations in Endometriosis and Normal Endometrium. *Cell Reports* 24, 1777–1789. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.07.037>
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R.L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., Bray, F., 2021. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA A Cancer J Clin* 71, 209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- Svitkina, T., 2018. The Actin Cytoskeleton and Actin-Based Motility. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 10, a018267. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a018267>
- Svitkina, T.M., Bulanova, E.A., Chaga, O.Y., Vignjevic, D.M., Kojima, S., Vasiliev, J.M., Borisy, G.G., 2003. Mechanism of filopodia initiation by reorganization of a dendritic network. *Journal of Cell Biology* 160, 409–421. <https://doi.org/10.1083/jcb.200210174>
- Talhok, A., McConechy, M.K., Leung, S., Li-Chang, H.H., Kwon, J.S., Melnyk, N., Yang, W., Senz, J., Boyd, N., Karnezis, A.N., Huntsman, D.G., Gilks, C.B., McAlpine, J.N., 2015. A clinically applicable molecular-based classification for endometrial cancers. *Br J Cancer* 113, 299–310. <https://doi.org/10.1038/bjc.2015.190>
- Tempest, N., Maclean, A., Hapangama, D., 2018. Endometrial Stem Cell Markers: Current Concepts and Unresolved Questions. *IJMS* 19, 3240. <https://doi.org/10.3390/ijms19103240>
- Tojkander, S., Gateva, G., Lappalainen, P., 2012. Actin stress fibers – assembly, dynamics and biological roles. *Journal of Cell Science jcs.098087*. <https://doi.org/10.1242/jcs.098087>
- Vallenius, T., Luukko, K., Mäkelä, T.P., 2000. CLP-36 PDZ-LIM Protein Associates with Nonmuscle  $\alpha$ -Actinin-1 and  $\alpha$ -Actinin-4. *Journal of Biological Chemistry* 275, 11100–11105. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.15.11100>
- Vignjevic, D., Kojima, S., Aratyn, Y., Danciu, O., Svitkina, T., Borisy, G.G., 2006. Role of fascin in filopodial protrusion. *Journal of Cell Biology* 174, 863–875. <https://doi.org/10.1083/jcb.200603013>
- Villalonga, P., Villalonga, P., Ridley, A.J., 2006. Rho GTPases and cell cycle control. *Growth Factors* 24, 159–164. <https://doi.org/10.1080/08977190600560651>
- Wang, Y., Hanifi-Moghaddam, P., Hanekamp, E.E., Kloosterboer, H.J., Franken, P., Veldscholte, J., van Doorn, H.C., Ewing, P.C., Kim, J.J., Grootegoed, J.A., Burger, C.W., Fodde, R., Blok, L.J., 2009. Progesterone Inhibition of Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling in Normal Endometrium and Endometrial Cancer. *Clinical Cancer Research* 15, 5784–5793. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-0814>
- Wang, Y., Hu, L., Ji, P., Teng, F., Tian, W., Liu, Y., Cogdell, D., Liu, J., Sood, A.K., Broaddus, R., Xue, F., Zhang, W., 2016. MIIP remodels Rac1-mediated cytoskeleton structure in suppression of endometrial cancer metastasis. *J Hematol Oncol* 9, 112. <https://doi.org/10.1186/s13045-016-0342-6>
- Wang, Y., van der Zee, M., Fodde, R., Blok, L.J., 2010. Wnt/ $\beta$ -Catenin and Sex Hormone Signaling In Endometrial Homeostasis and Cancer. *Oncotarget* 1, 674–684. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.201>
- Wang, Y., Yu, M., Yang, J.-X., Cao, D.-Y., Zhang, Y., Zhou, H.-M., Yuan, Z., Shen, K., 2019. Genomic Comparison of Endometrioid Endometrial Carcinoma and Its Precancerous Lesions in Chinese Patients by High-Depth Next Generation Sequencing. *Front. Oncol.* 9, 123. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00123>
- Watanabe, N., 1997. p140mDia, a mammalian homolog of *Drosophila* diaphanous, is a target protein for Rho small GTPase and is a ligand for profilin. *The EMBO Journal* 16, 3044–3056. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.11.3044>
- Weaver, A.M., Karginov, A.V., Kinley, A.W., Weed, S.A., Li, Y., Parsons, J.T., Cooper, J.A., 2001. Cortactin promotes and stabilizes Arp2/3-induced actin filament network formation. *Current Biology* 11, 370–374. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(01\)00098-7](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(01)00098-7)
- Wen, X., Wan, J., He, Q., Wang, M., Li, S., Jiang, M., Qian, Z., Liu, B., Lu, W., Wang, K., Gao, K., Wan, X., 2020. p190A inactivating mutations cause aberrant RhoA activation and promote malignant

- transformation via the Hippo-YAP pathway in endometrial cancer. *Sig Transduct Target Ther* 5, 81. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-0170-6>
- Wennerberg, K., Rossman, K.L., Der, C.J., 2005. The Ras superfamily at a glance. *Journal of Cell Science* 118, 843–846. <https://doi.org/10.1242/jcs.01660>
- Wilson, C.A., Tsuchida, M.A., Allen, G.M., Barnhart, E.L., Applegate, K.T., Yam, P.T., Ji, L., Keren, K., Danuser, G., Theriot, J.A., 2010. Myosin II contributes to cell-scale actin network treadmilling through network disassembly. *Nature* 465, 373–377. <https://doi.org/10.1038/nature08994>
- Wojnacki, J., Quassollo, G., Marzolo, M.-P., Cáceres, A., 2014. Rho GTPases at the crossroad of signaling networks in mammals: Impact of Rho-GTPases on microtubule organization and dynamics. *Small GTPases* 5, e28430. <https://doi.org/10.4161/sgtp.28430>
- Wortman, B.G., Creutzberg, C.L., Putter, H., Jürgenliemk-Schulz, I.M., Jobsen, J.J., Lutgens, L.C.H.W., van der Steen-Banasik, E.M., Mens, J.W.M., Slot, A., Kroese, M.C.S., van Triest, B., Nijman, H.W., Stelloo, E., Bosse, T., de Boer, S.M., van Putten, W.L.J., Smit, V.T.H.B.M., Nout, R.A., 2018. Ten-year results of the PORTEC-2 trial for high-intermediate risk endometrial carcinoma: improving patient selection for adjuvant therapy. *Br J Cancer* 119, 1067–1074. <https://doi.org/10.1038/s41416-018-0310-8>
- Wright, J.D., Fiorelli, J., Kansler, A.L., Burke, W.M., Schiff, P.B., Cohen, C.J., Herzog, T.J., 2009. Optimizing the management of stage II endometrial cancer: the role of radical hysterectomy and radiation. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 200, 419.e1-419.e7. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2008.11.003>
- Wu, Z.-S., Huang, S.-M., Wang, Y.-C., 2021. Palmitate Enhances the Efficacy of Cisplatin and Doxorubicin against Human Endometrial Carcinoma Cells. *IJMS* 23, 80. <https://doi.org/10.3390/ijms23010080>
- Xia, S., Lim, Y.B., Zhang, Z., Wang, Y., Zhang, S., Lim, C.T., Yim, E.K.F., Kanchanawong, P., 2019. Nanoscale Architecture of the Cortical Actin Cytoskeleton in Embryonic Stem Cells. *Cell Reports* 28, 1251-1267.e7. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.06.089>
- Yotova, I.Y., Quan, P., Leditznig, N., Beer, U., Wenzl, R., Tschugguel, W., 2011. Abnormal activation of Ras/Raf/MAPK and RhoA/ROCKII signalling pathways in eutopic endometrial stromal cells of patients with endometriosis. *Human Reproduction* 26, 885–897. <https://doi.org/10.1093/humrep/der010>
- Zhu, H., Hou, C.-C., Luo, L.-F., Hu, Y.-J., Yang, W.-X., 2014. Endometrial stromal cells and decidualized stromal cells: Origins, transformation and functions. *Gene* 551, 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2014.08.047>
- Zubor, P., Dankova, Z., Kolkova, Z., Holubekova, V., Brany, D., Mersakova, S., Samec, M., Liskova, A., Koklesova, L., Kubatka, P., Bujnak, J., Kajo, K., Mlyncek, M., Giordano, F.A., Golubnitschaja, O., 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, 1292. <https://doi.org/10.3390/cancers12051292>

# Annexes

*Annexe 1 – Article : Identification of an inhibitory domain in p190RhoGAP responsible for masking its functional GAP domain*

---

1 Identification of an inhibitory domain in p190RhoGAP responsible for masking  
2 its functional GAP domain

3

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

6

7 Bordeaux Institute of Oncology, BRIC U1312, INSERM, Université de Bordeaux, 33000  
8 Bordeaux, France

9

10

11 \*Corresponding author

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

13 **Running title:** Auto-inhibition of p190RhoGAP

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25 **Abbreviations:** The abbreviations used are: co-IP, co-immunoprecipitation; Cter, Carboxy-terminal;  
26 GAP, GTPase-Activating Protein; GBD, GTP-binding domain; GTPase, guanosine triphosphate  
27 hydrolase; Nter, Amino-terminal; PLS, protrusion localization sequence; Ras, Rat sarcoma; Rho, Ras  
28 homolog; WT, wild-type.

1 **ABSTRACT**

2 p190RhoGAP (p190A) is encoded by *ARHGAP35* which is found mutated in cancers. p190A is a  
3 negative regulator of RhoA in cells and must be targeted to RhoA-dependent actin-based structures  
4 to fulfill its roles. We previously identified a functional region of p190A called the PLS (protrusion  
5 localization sequence) required for localization of p190A to lamellipodia, but also for regulating the  
6 GAP activity of p190A. Here, we demonstrated that the PLS is required to target p190A to  
7 invadosomes. Cellular expression of a p190A construct devoid of the PLS (p190A $\Delta$ PLS) favored RhoA  
8 inactivation in a stronger manner than WT p190A, suggesting that the PLS is an auto-inhibitory  
9 domain of p190A GAP activity. To decipher this mechanism, we searched for PLS-interacting proteins  
10 using a two-hybrid screen. We found that the PLS can interact with p190A itself. Co-  
11 immunoprecipitation experiments demonstrated that the PLS interacts with a region in close  
12 proximity to the GAP domain. Furthermore, we demonstrated that this interaction is abolished if the  
13 PLS harbors cancer-associated mutations: the S866F point mutation and the  $\Delta$ 865-870 deletion. Our  
14 results are in favor of defining PLS as an inhibitory domain responsible for masking the p190A  
15 functional GAP domain. Thus, p190A could exist in cells under two forms; an inactive closed  
16 conformation with a masked GAP domain, and an open conformation allowing p190A GAP function.  
17 Altogether, our data unveil a new mechanism of p190A regulation.

18

19 **Keywords:** GTPase-activating protein (GAP), conformational change, Rho (Rho GTPase), structure-  
20 function, cancer, mutant, actin



## 1 INTRODUCTION

2 Small GTPases of the Rho family are molecular switches of key signaling pathways involved in  
3 cytoskeletal remodeling. A spatiotemporal regulation of Rho GTPases is required for achieving their  
4 key functions. For instance, efficient cell migration requires the sequential activation/inactivation of  
5 Rho GTPases, including RhoA, Rac1, and Cdc42, to generate cycles of membrane protrusion (i.e.  
6 lamellipodia and filopodia) and adhesion site assembly (i.e. stress fibers) (Pertz et al., 2006;  
7 Machacek et al., 2009; Mehidi et al., 2019). To this end, tight control of GTPase hydrolase activity is  
8 crucial, with one of the primary regulators of GDP/GTP cycling of Rho GTPases being GTPase-  
9 activating proteins (GAPs).

10 p190RhoGAP-A (also known as ARHGAP35 or GRLF1, and hereafter called p190A) is a GAP that acts  
11 on Rho GTPases. p190A plays important roles in actin regulatory pathways in numerous cell types  
12 and controls diverse cellular mechanisms, such as cell division, migration, and invasion, endothelial  
13 permeability and cell death (Héraud et al., 2019). The subcellular localization of p190A is highly  
14 regulated to fulfill these specific functions. Thus, p190A accumulates in actin-rich structures,  
15 including new adhesion sites (Tomar et al., 2009), lamellipodia/ruffles (McGlade et al., 1993; Binamé  
16 et al., 2016), invadosomes (Nakahara et al., 1998; Guegan et al., 2008), or cleavage furrows (Su et al.,  
17 2009). Given the enzymatic activity of p190A enhances GTP hydrolysis, p190A is mainly involved in  
18 the attenuation of the biological function of RhoA GTPase. However, p190A may also function as a  
19 signal terminator for Rac1 and RhoC (Héraud et al., 2019).

20 p190A is a large (~1500 amino acids (aa)) multi-domain protein with a C-terminal catalytic domain. In  
21 addition to this RhoGAP module, p190A contains three other structural domains. The N-terminal part  
22 of p190A harbors a GTP-binding domain (GBD), described recently as a class (ii) pseudo-GTPase  
23 domain, i.e. a nucleotide-binding and catalytically inactive GTPase (Stiegler and Boggon, 2018). There  
24 are also four motifs, the so-called FF motifs, in proximity to the GBD. These consist of 50 aa with two  
25 strictly conserved phenylalanine residues. Finally, the large domain between the FF and GAP domains  
26 contains two class (i) pseudo-GTPase domains (pG1 and pG2) that harbor neither nucleotide-binding  
27 activity nor catalytic activity (Stiegler and Boggon, 2017). Besides these structural domains, several  
28 functional domains have been characterized in p190A. A binding site for p120RasGAP, a GAP of the  
29 Ras GTPases, was identified between the pG2 and the GAP domain. Two Src-phosphorylated tyrosine  
30 residues (Y1087 and Y1105) are involved in the regulation of this interaction (Roof et al., 1998; Hu  
31 and Settleman, 1997). Furthermore, we identified another functional region (residues 380–971),  
32 including two FF motifs, pG1 and pG2, implicated in the regulation of subcellular localization and  
33 function of p190A. This region, named PLS for Protrusion Localization Sequence, is needed for the  
34 targeting of p190A to lamellipodia (Binamé et al., 2016). Whether the PLS is also required for  
35 targeting p190A to other actin-rich subcellular structures, such as invadosomes, remains to be  
36 explored. Importantly, we also previously showed that the PLS regulates the GAP activity of p190A  
37 (Binamé et al., 2016). A truncated protein devoid of the PLS (p190ΔPLS) exhibited an increased ability  
38 to constitutively bind active RhoA in comparison to the wild-type (WT) protein. How the PLS  
39 regulates p190A activity is unknown and is the focus of the present study.

40 p190A recently regained attention after being found mutated in cancers. Several large-scale studies  
41 mapping somatic variants across thousands of tumors identified *ARHGAP35* – the gene encoding  
42 p190A – as a new major cancer gene (Lawrence et al., 2014; Kandoth et al., 2013). *ARHGAP35*  
43 appears mutated in approximately 2% of tumors and is found significantly mutated in endometrial  
44 tumors (14%), lung squamous cell carcinoma (5%), lung adenocarcinoma (3%), and head and neck

1 cancer (3%) (Lawrence et al., 2014). Mutations in *ARHGAP35* were further confirmed in a study  
2 having identified new driver genes in lung carcinogenesis (Campbell et al., 2016). Most *ARHGAP35*  
3 mutations are nonsense mutations and frameshift deletions/insertions supporting a tumor-  
4 suppressor role for p190A. Given the GAP domain of p190A is localized in the C-terminus, these  
5 mutations are expected to produce a non-functional protein without GAP activity, as we found for  
6 the R997\* nonsense mutation (Binamé et al., 2016). Besides these mutations, many missense  
7 mutations have also been reported throughout the entire *ARHGAP35* sequence. Despite some  
8 potentially having no effect on protein function, we have shown that some mutations localized in the  
9 PLS and pG2 domain have a strong effect on GAP activity and cell behavior (Binamé et al., 2016).  
10 Indeed, the S866F point mutation and the in-frame 865–870 deletion, when ectopically expressed in  
11 tumor cells, can induce an increase in GAP activity and alter directed motility of tumor cells (Binamé  
12 et al., 2016). It is clear that the effects of such mutations require further investigation. Altogether,  
13 combining the identification and characterization of the PLS with the effects of the aforementioned  
14 missense mutations leads us to question if p190A could harbor an auto-inhibitory folding (Bidaud-  
15 Meynard et al., 2019).

16 Building on our previous results, we aimed to better characterize the involvement of the PLS domain  
17 in the regulation of p190A, i.e. localization and function. Herein, we confirmed that p190A localizes  
18 to various different invadosome organizations, such as dots, rosettes, and linear invadosomes. We  
19 found that deletion of the PLS in p190A alters these localizations. Using a global approach and  
20 biochemical analyzes, we demonstrated that the PLS interacts with a region in close proximity to the  
21 GAP domain. Our data thus are consistent with a specific folding of the molecule, involving the PLS  
22 and masking the GAP domain. We demonstrated that this interaction is lost upon introduction of  
23 S866F and  $\Delta$ 865–870 mutations, providing a molecular explanation to the gain of GAP function  
24 observed in cells expressing these mutants. Overall, our findings unveil a new mechanism involved in  
25 p190A regulation that identifies the PLS as an inhibitory domain responsible for masking the p190A  
26 functional domain.

## 1 RESULTS

### 2 **The PLS is required for modulating p190A invadosome localization**

3 The PLS region (Fig. 1A), encompassing two FF motifs, pG1, and pG2, was previously described as a  
4 regulator of p190A GAP function and required for targeting p190A to the lamellipodia of migrating  
5 cells (Binamé et al., 2016). We analyzed the involvement of the PLS domain in the targeting of p190A  
6 to invadosomes. We first confirmed that endogenous p190A localized to different invadosome types  
7 regardless of invadosome organization and stimuli. Endogenous p190A was found in spreading Huh6  
8 hepatocellular carcinoma cells in both dot-like invadopodia (cells plated on glass) and linear  
9 invadosomes (cells plated on glass coated with type I collagen fibers), but also in v-Src-induced  
10 rosettes in NIH-3T3 cells (Fig. S1A). We next analyzed the localization of several HA-tagged constructs  
11 to check whether the PLS domain is required for p190A localization to invadosomes. Similar to the  
12 full-length protein, we found that the PLS alone can localize to invadosomes in NIH-3T3 (Fig. 1B) and  
13 Huh6 cells (Fig. S1B). On the contrary, a p190A $\Delta$ PLS mutant (p190A lacking the PLS domain) remained  
14 cytosolic and was not correctly targeted to invadosomes (Fig. 1B and S1B). These new data  
15 confirmed the importance of the PLS in regulating the localization of p190A in addition to its GAP  
16 function.

17 We next investigated the role of the actin-binding protein cortactin in p190A targeting to  
18 invadosomes because we previously showed that cortactin is required for p190A targeting to  
19 lamellipodia (Binamé et al., 2016). Using the siRNA strategy, we depleted cortactin expression (Fig.  
20 S1C) and analyzed its impact on p190A localization (Fig. 1C). We found that endogenous p190A  
21 localized to rosettes in cortactin-depleted conditions, as it did in the control condition (Fig. 1C).  
22 These data revealed that cortactin is not involved in the recruitment of p190A to invadosomes, which  
23 is in contrast to its recruitment to extending lamellipodia.

### 24 **The PLS interacts with the C-terminal part of p190A**

25 We performed a yeast two-hybrid screen to identify interacting proteins to understand how this PLS  
26 domain could regulate p190A. The PLS domain of p190A was used as a bait in a two-hybrid screen of  
27 a highly complex human placenta cDNA library (92.3 million interactions). Interestingly, p190A itself  
28 was identified as interacting with the PLS. Indeed, 35 clones from human p190A were identified  
29 (Suppl. Table I) corresponding to two distinct regions of p190A: (i) region 2H#1 (aa 208–418),  
30 overlapping the end of the GBD and the first two FF motifs in the N-terminal part of the molecule,  
31 and (ii) region 2H#2 (aa 1069–1231), localized in the C-terminal part of p190A (Fig. 2A).

32 We co-expressed GFP-tagged PLS with HA-tagged domains of p190A in HEK293T cells to confirm  
33 these results. We used previously generated HA-tagged constructs (Binamé et al., 2016): HA-Nter (aa  
34 1–533) overlapping region 2H#1, and HA-Cter (aa 1055–1513) overlapping region 2H#2 (Suppl. Table  
35 II) (Fig. 2A). Using coimmunoprecipitation (co-IP) with anti-HA antibodies, as shown in Figure 2B we  
36 observed a strong interaction between the PLS and the Cter domain of p190A. However, despite  
37 identifying the region 2H#1 in the two-hybrid screen, interaction between the Nter domain and the  
38 PLS was barely detectable (Fig. 2B). This weak interaction may be due to the low expression of the  
39 HA-Nter construct in HEK293T cells.

40 To more precisely map the interacting domains of p190A in the N- and C-terminal parts, we  
41 performed co-IP experiments between the PLS and smaller p190A domains. Figure 2C revealed that  
42 while the PLS strongly interacted with the C-terminal domain of p190A, the interaction with the so-  
43 called p120-binding domain was reduced and the interaction with the GAP domain was almost

1 absent. Amongst the domains tested in the N-terminal part of p190A, only a weak interaction  
2 between the PLS with the GBD and the four FF domains (4FF) was observed (Fig. 2C); no conclusion  
3 can be drawn for the two FF domains (2FF) as we were unable to detect 2FF expression. We then  
4 generated HA-tagged constructs corresponding to the two regions identified in the two-hybrid  
5 screen, i.e. regions 2H#1 and 2H#2, and performed co-IPs with GFP-PLS. The 2H#2 region (HA-Cter2h)  
6 strongly interacted with the PLS, whereas no interaction with the 2H#1 region was detected (HA-  
7 Nter2h) (Fig. 2D). This finding indicated that the minimal region of p190A required for interaction  
8 with the PLS domain is between aa 1069–1231 in the Cter part. Overall, these results show an  
9 interaction between two distinct domains of p190A, involving the region close to the GAP domain  
10 and the PLS domain, suggesting thus an effect of this interaction on p190A function.

11 In order to evaluate the involvement of the PLS in the regulation of p190A GAP activity, we analyzed  
12 F-actin organization as a read-out of Rho GTPase activity. Huh7 cells were previously used to identify  
13 the PLS domain (Binamé et al., 2016) and are highly sensitive to RhoGAP activity increase. Indeed, we  
14 found that overexpression of the HA-tagged Cter domain of p190A, containing the GAP domain,  
15 strongly affected F-actin organization. The majority of Huh7 cells exhibited long membrane  
16 protrusions with a decrease in spreading; the so-called dendritic-like phenotype (Fig. 3A-B). We thus  
17 questioned whether co-expression of the PLS with the Cter domain could rescue this phenotype by  
18 interacting with the Cter domain. To investigate this, we expressed the GFP-tagged PLS domain in  
19 Huh7 cells either alone or in combination with the HA-tagged Cter. Expression of the PLS domain  
20 alone did not change Huh7 cell phenotype, whereas co-expression of the PLS domain with the Cter  
21 domain strongly reduced the dendritic-like phenotype observed with HA-Cter expression (Fig. 3A-B).  
22 Some cells also harbored an intermediate phenotype under Cter and PLS domain co-expression,  
23 suggesting a partial rescue of the normal phenotype (Fig. 3B). Therefore, our data demonstrate that  
24 through its interaction with the Cter domain, the PLS is able to inhibit the GAP activity of p190A.

25

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

27 Some aa localized in the C-terminal part and notably in the 2H#2 region of p190A have already been  
28 recognized as involved in the function and regulation of the protein. In fact, Y1087 and Y1105 were  
29 found implicated in p120RasGAP binding (Roof et al., 1998; Hu and Settleman, 1997). We attempted  
30 to check whether these aa could regulate or modulate the aforementioned interactions we  
31 demonstrated using phosphosite mutants. We introduced Y1105F, Y1087F, Y1087E, or Y1105E  
32 mutations by site-directed mutagenesis into the HA-Cter construct. We then performed co-IP  
33 experiments using these mutants and GFP-PLS (Fig. 4A). No change in the PLS/Cter interaction was  
34 observed using either the WT or mutated Cter domains. This result suggests that phosphorylation of  
35 these two specific residues is not implicated in the binding of the Cter domain with the PLS. We next  
36 considered whether phosphorylation was generally necessary for this interaction. Figure 4B shows  
37 that phosphatase treatment did not modify the interaction between the Cter and PLS domains,  
38 implying that phosphorylation is not involved in this molecular interaction.

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

40 The S866F point mutation and the small deletion of five amino acids ( $\Delta$ 865-870; thus including S866),  
41 were both previously described as cancer-associated mutations and as mutations mimicking PLS  
42 deletion in p190A function (Binamé et al., 2016). Given both mutations are localized within the PLS  
43 domain of p190A (Fig. 2A), we analyzed their effect on the PLS/Cter interaction. To do so, we  
44 introduced each mutation in the GFP-tagged PLS construct and monitored interaction with HA-

1 tagged Cter by co-IP. Interestingly, we showed that introducing the S866F mutation or deleting the  
2 five amino acids ( $\Delta$ 865-870) in the PLS abolished the interaction of the PLS domain with the Cter  
3 region of p190A (Fig. 4C and S2). We further examined the effect of these mutations on the weak  
4 PLS/Nter interaction. Conversely, we found that both mutations increased the interaction between  
5 the Nter and the PLS domain (Fig. 4D). The same results were obtained when co-IP experiments were  
6 performed with the Nter2h corresponding to the 2H#1 region (Fig. 4D). These findings suggest that  
7 both mutations could alter the conformation of p190A by modifying domain interactions. This would  
8 also imply that these mutations lead to the release of Cter and the PLS domain interaction, in turn  
9 unmasking the GAP domain and simultaneously increasing the interaction between the Nter part of  
10 p190A and the PLS.

11

## 12 **DISCUSSION**

13 Herein, we confirmed that the PLS of p190A is an important functional domain of p190A. This PLS  
14 domain, encompassing two FF motifs, pG1, and pG2, was previously identified in a structure/function  
15 analysis as the protrusion localization sequence of p190A (Binamé et al., 2016). Indeed, the PLS is  
16 both required and sufficient for p190A targeting to the lamellipodia and leading edges of migrating  
17 cells. Given invadosomes are also actin-based protrusions, where p190A has been shown to regulate  
18 Rho GTPases (such as RhoC/TC10 activities) (Bravo-Cordero et al., 2011; Hülsemann et al., 2021), we  
19 analyzed the involvement of the PLS in targeting p190A to invadosomes. We first complemented  
20 available data on invadosome localization of p190A (Nakahara et al., 1998; Burgstaller and Gimona,  
21 2004; Guegan et al., 2008; Crimaldi et al., 2009). We demonstrated that WT p190A can be found in  
22 all invadosome structure types, such as rosettes in vSrc-transformed fibroblasts, as well as in dots  
23 and linear invadosomes in Huh6 tumor cells. Using a truncated version of p190A, we demonstrated  
24 that the PLS is also required and sufficient for p190A targeting to these invadosome structures.  
25 However, the molecular mechanism of targeting remains to be explored as, unlike lamellipodia  
26 (Binamé et al., 2016), cortactin is not required to target p190A to these invasive actin-based  
27 structures.

28 We previously reported that the PLS is required for the negative regulation of p190A RhoGAP  
29 activity. We indeed described that RhoA activity decrease is stronger in cells expressing p190A $\Delta$ PLS  
30 versus p190AWT. This strong p190A $\Delta$ PLS effect arises from the drastic increase in the affinity of  
31 p190A for active RhoA (Binamé et al., 2016). Thus, these data strongly support a PLS-mediated  
32 inhibition of the GAP domain. Due to the presence of two pseudo-GTPase domains (pG1 and pG2) in  
33 the PLS we previously hypothesized that an intramolecular interaction could occur between pG1 or  
34 pG2 and the GAP domain (defined as a GTPase-interacting domain) (Bidaud-Meynard et al., 2019;  
35 Héraud et al., 2019). We performed a global approach to identify PLS-interacting proteins. The two-  
36 hybrid screen we performed was rather stringent as we only recovered 19 proteins in the very high  
37 to medium-high confidence ranges. Despite cortactin being previously identified as a protein  
38 interacting with the PLS (Binamé et al., 2016), cortactin was not recovered in this screen. However,  
39 we identified two p190A regions that do interact with the PLS. Using co-IP, we showed that the  
40 region corresponding to aa 1069–1231 strongly interacts with the PLS. Interestingly, this region  
41 excludes the GAP domain, but overlaps the p120RasGAP binding domain of p190A (aa 1055–1143)  
42 (Hu and Settleman, 1997) and the poly-basic region identified as crucial for p190A phospholipid  
43 binding (Levay et al., 2013; Ligeti et al., 2004). Experiments performed in Huh7 cells strongly

1 suggested that the PLS could inhibit the GAP function of p190A. Thus, our results are consistent with  
2 the determination of the PLS as an inhibitory domain responsible for p190A GAP activity repression.  
3 Given deletion of PLS increased the affinity of p190A for active RhoA, the PLS domain may act in *cis*  
4 through an intramolecular folding that masks the p190A catalytic domain (Fig. 5); this locked Cter  
5 conformation would result in an inactivated form of p190A. An auto-inhibitory control of GAP activity  
6 due to protein folding has already been described for several other GAPs, including p50RhoGAP,  
7 oligophrenin, Abr, and chimerins (Ligeti et al., 2012). Furthermore, the Bin-Amphiphysin-Rvs (BAR)  
8 domain of oligophrenin acts as a *cis*-acting inhibitory element that masks the GAP domain to prevent  
9 down-regulation of Rho GTPases (Eberth et al., 2009). It is noteworthy that we cannot exclude  
10 among our findings here a role of the PLS in a *trans*-inhibition via an inter-molecular interaction,  
11 even if to date p190A has never been found acting as a dimer.  
12 The hypothesis of this auto-inhibition mechanism raises questions regarding the release of the auto-  
13 inhibited state. Indeed, signals that may act as molecular conformation switches must activate p190A  
14 at its correct localization. Nevertheless, such signals remain to be identified. Protein partners and  
15 post-translational modifications, such as phosphorylation, are initial evident candidates. In this line,  
16 previous studies have proposed the involvement of Rac1 and Rnd3 for enhancing the RhoGAP  
17 activity of p190B, a paralog of p190A (Bustos et al., 2008). However, neither Rac1 nor Rnd3 were able  
18 to alter the p190A PLS/Cter interaction; the same result was also obtained using p120RasGAP (data  
19 not shown). We additionally exclude the involvement of phosphorylation in this study. The PLS/Cter  
20 interaction of p190A was not modified by neither mutations of tyrosine phosphosites in the  
21 p120RasGAP-binding domain nor phosphatase treatment.  
22 Our data highlight serine 866 as an important residue for p190A regulation. Indeed, the cancer-  
23 associated S866F missense mutation and the  $\Delta$ 865–870 deletion abolished the PLS/Cter interaction  
24 as shown by co-IP. Both mutations were previously shown to mimic the deletion of the PLS domain  
25 with a mislocalization and an increase in GAP activity. Thus, these new data provide a molecular  
26 explanation for the observed phenotypes and define these mutant proteins as constitutively active  
27 forms of p190A with an unmasked Cter domain (Fig. 5). Since phosphorylation is frequently involved  
28 in functional regulation, it was tempting to hypothesize that phosphorylation of serine 866 maintains  
29 p190A in its closed conformation, with dephosphorylation activating p190A. However, consistent  
30 with our phosphatase treatment data here, mass spectrometry analysis revealed that S866 is not  
31 phosphorylated in WT p190A (data not shown). The closed conformation of p190A, involving the  
32 PLS/Cter interaction, is likely not the only mechanism regulating p190A folding. Indeed, our two-  
33 hybrid screen results demonstrated that the Nter part of p190A may under some circumstances  
34 interact with the PLS. We found that the missense S866F mutation and  $\Delta$ 865-870 deletion strongly  
35 altered p190A conformation, favoring the PLS/Nter interaction instead of the PLS/Cter interaction,  
36 with a locked Nter and unlocked Cter conformation (Fig. 5).  
37 Altogether, our new data support an intramolecular model (Fig. 5) in which p190A is found in a  
38 closed conformation. This conformation may be opened upon stimulation, leading to the  
39 translocation and full activation of p190A restricted to actin-based structures, such as lamellipodia  
40 and invadosomes. Thus, the PLS domain is at the basis of a dual-effect system with independent  
41 membrane-localized and GAP-inhibitory functions that may operate simultaneously. In addition to  
42 S866F, other missense cancer-associated mutations may alter this mechanism and result in altered  
43 GAP function equivalent to non-sense mutations.

44

## 1 EXPERIMENTAL PROCEDURES

2

### 3 Cell lines

4 HEK293T, NIH-3T3-vSrc and Huh7 cell lines were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Media  
5 (DMEM) containing 4.5 g/l glucose and Glutamax (Gibco) supplemented with 10% FCS (Eurobio).  
6 Hepatocellular carcinoma Huh6 cells were maintained in DMEM containing 1 g/l glucose and  
7 Glutamax (Gibco) supplemented with 10% FCS (Eurobio). All cells were maintained at 37°C in a 5%  
8 CO<sub>2</sub> humidified atmosphere. HEK293T and Huh7 cell lines were purchased from American Type  
9 Culture Collection (ATCC). Huh6 cells were a gift from C. Perret (Cochin Institute, Paris), and NIH-3T3-  
10 vSrc cells from S. Courtneidge (Burham Institute for Medical Research, La Jolla, CA). Cell lines were  
11 confirmed for the absence of mycoplasma by PCR and authenticated by STR Matching analysis  
12 (ATCC).

### 13 Antibodies and reagents

14 Mouse monoclonal (clone 12CA5) and rat monoclonal (clone 3F10) anti-HA antibodies were  
15 purchased from Roche. Several anti-HA antibodies were screened, all showing a strong background  
16 by Western-blot. Mouse anti-p190A (clone D2D6) and rabbit polyclonal anti-GFP antibodies were  
17 obtained from Sigma, mouse anti-p190A antibody (clone 30) from BD. Rabbit polyclonal and mouse  
18 monoclonal (clone 4F11) anti-cortactin antibodies were purchased from Cell Signaling and Millipore,  
19 respectively. Rabbit anti-GAPDH (FL-335) antibody was obtained from Santa Cruz Biotechnology.  
20 Anti-mouse IRDYE680 and anti-rabbit IRDYE800 secondary antibodies were obtained from Eurobio  
21 Scientific. FluoProbes 488-phalloidin and 488-labeled secondary antibodies and 547-labeled  
22 secondary antibodies were purchased from Interchim. Hoescht 405 (34580, Invitrogen) was used to  
23 stain nuclei.

### 24 Two-hybrid screen

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

### 29 Transfection

30 DNA transfections in HEK293T cell line were performed using Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher  
31 Scientific), Huh6 and Huh7 cells were transfected using promofectin-hepatocyte transfection reagent  
32 (Promocell) and NIH-3T3-vSrc cells with JetPrime (PolyPlus Transfection) according to the  
33 manufacturer's instructions. siRNA oligos were purchased from Eurofins Genomics and transfected  
34 into NIH-3T3-vSrc cells with JetPrime (PolyPlus Transfection) according to the manufacturer's  
35 protocol. si1 Cortactin targets cortactin mRNA at 5'-CCCAGAAAGACUAUGUGAAAGGGUU-3' and si2  
36 Cortactin targets at 5'-GGAGAAGCACGAGUCACAGAGAGAU-3'. Control siRNA corresponds to AllStars  
37 Negative control from Qiagen.

38

### 39 Plasmid constructs

40 The pKH3-p190A-WT containing the rat full-length p190RhoGAP (GenBank under accession no.  
41 M94721) was a generous gift from I. Macara (Vanderbilt University, Nashville, TN). The two  
42 truncated p190A constructs (Nter 2h and Cter 2h) were engineered by PCR using the rat full-length  
43 p190RhoGAP as matrix and subcloned into pKH3 expression vector using BamHI and EcoRI restriction

1 sites. Point mutations were generated in the parental vector pKH3-p190A using site-directed  
2 mutagenesis with the QuikChange II XL kit according to the manufacturer's protocol (Agilent  
3 Technologies). The two mutated PLS constructs (PLS S866F and PLS Δ865-870) were generated by  
4 site-directed mutagenesis in the rat GFP-PLS construct. The four mutated Cter constructs (Cter  
5 Y1087F, Cter Y1087E, Cter Y1105F and Cter Y1105E) were generated by site-directed mutagenesis in  
6 the rat HA-Cter construct. All constructs were verified by DNA sequencing. All other p190 constructs  
7 (truncated and/or mutated p190A constructs) were previously generated and published (Binamé et  
8 al., 2016). All constructs used in this study are summarized in Supplemental Table II. All primers used  
9 for these constructs are listed in Supplementary Table III.

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

11 24h after transfection, cells were scraped off on ice and homogenized in Tris-HCl lysis buffer (50 mM  
12 Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, and 0.1% NP-40) with protease and phosphatase inhibitors. Cell  
13 lysates were centrifuged at 10,000g for 10 min to erase cellular debris and nuclei. Lysates were  
14 denatured with Laemmli loading buffer containing 2.5% 2-β-mercaptoethanol for 5 min and analysed  
15 by SDS-PAGE by blotting them onto nitrocellulose membranes. Blots were incubated overnight at 4°C  
16 or for one hour at room temperature with primary antibodies, and then incubated with infrared  
17 fluorescent dye-conjugated secondary antibodies (Eurobio). Activity was visualized with the Odyssey  
18 infrared imaging system (LI-COR Biosciences) and the Chemidoc infrared imaging system (Bio-Rad)  
19 and analyzed using ImageJ image analysis software. Anti-HA affinity matrix was obtained from Roche  
20 for immunoprecipitation assays and used following the manufacturer's protocol. Briefly, cells were  
21 extracted in the Tris-HCl buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, and 0.1% NP-40)  
22 supplemented with protease and phosphatase inhibitors and centrifuged for 10 min at 10,000g. One  
23 mg of the supernatant was incubated for 30 min with the beads. Bead pellets were washed three  
24 times with Tris-HCl buffer, resuspended in loading buffer before analysis by SDS-PAGE.

25

#### 26 **λ-phosphatase treatment**

27 Protein lysates were incubated with λ-phosphatase (New England Biolabs) with or without the  
28 recommended amount of the Halt Phosphatase Inhibitor Mixture (ThermoScientific) for 30 min at  
29 30°C. Samples were washed six times with buffer, according to the manufacturer's protocol, prior to  
30 co-immunoprecipitation and subsequent SDS-PAGE analysis.

#### 31 **Collagen I coating**

32 To induce linear invadosome formation, coverslips were prepared as previously described (Juin et al.,  
33 2012). Coverslips were coated with 0.5 mg/ml type I collagen (BD Biosciences, Bedford, MA) in  
34 Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS; Gibco). Collagen-coated coverslips were incubated for 4  
35 h at 37°C, after which they were washed gently in PBS (Invitrogen). Cells were seeded and fixed after  
36 5h of incubation at 37°C before staining.

#### 37 **Immunofluorescence and confocal imaging**

38 24h after transfection on glass coverslips, cells were fixed with 4% PFA for 10 min at RT and  
39 permeabilized with 0.2% Triton X-100 for 10 min before incubation with various antibodies, as  
40 previously described (Moreau et al., 2003). After staining, coverslips were mounted on slides with  
41 Fluoromount G mounting medium. Cells were imaged using an SP5 confocal microscope (Leica  
42 Biosystems) using a 63x/NA 1.4 Plan Neofluor objective lens and the LAS-AF-Lite 2.4.1 acquisition  
43 software (Leica Biosystems). To prevent contamination among fluorochromes, each channel was



1 imaged sequentially using the multitrack recording module before merging. Images were processed  
2 using LAS-AF-Lite 2.4.1 (Leica Biosystems) or ImageJ software (National Institutes of Health). For the  
3 colocalization, intensity curves of the relative staining of F-actin (red) and HA tag (green) were  
4 performed using Leica software, using images captured with the same laser intensities. For the  
5 quantification of the dendritic-like phenotype, around 50 transfected cells in each condition were  
6 analyzed through actin staining and their morphology using a Zeiss Axioplan 2 epifluorescence  
7 microscope. Scoring was performed, under the microscope, in 3 independent experiments, by two  
8 independent persons, in a blind manner.

#### 9 **Statistical analysis**

10 Statistical analysis was performed with Prism software (GraphPad Software) and data are presented  
11 as mean  $\pm$  SEM of at least three independent experiments. Comparisons between two groups were  
12 analysed by *t* test. Significance was accepted for values where \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P <$   
13  $0.001$ ; and \*\*\*\*,  $P < 0.0001$ .

14

15

1 **Data Availability**— All data are contained in the manuscript.

2

3

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

5

6 **Acknowledgments**— We thank Dr I. G. Macara (Vanderbilt University, USA) for DNA constructs. We  
7 are grateful to Drs C. Perret (Cochin Institute, Paris) and S. Courtneidge (Burham Institute for Medical  
8 Research, La Jolla, CA) for providing us cell lines. We thank Elina Bernoud (Rennes, France) for her  
9 help in performing Cortactin silencing experiments. Microscopy was done in the Bordeaux Imaging  
10 Center, a service unit of the CNRS-INSERM and Bordeaux University, member of the national  
11 infrastructure France BioImaging.

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

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

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

## 1 REFERENCES

- 2 Bidaud-Meynard, A., F. Binamé, V. Lagrée, and V. Moreau. 2019. Regulation of Rho GTPase activity at  
3 the leading edge of migrating cells by p190RhoGAP. *Small GTPases*. 10:99–110.  
4 doi:10.1080/21541248.2017.1280584.
- 5 Binamé, F., A. Bidaud-Meynard, L. Magnan, L. Piquet, B. Montibus, A. Chabadel, F. Saltel, V. Lagrée,  
6 and V. Moreau. 2016. Cancer-associated mutations in the protrusion-targeting region of  
7 p190RhoGAP impact tumor cell migration. *J. Cell Biol.* 214:859–873. doi:10.1083/jcb.201601063.
- 8 Bravo-Cordero, J.J., M. Oser, X. Chen, R. Eddy, L. Hodgson, and J. Condeelis. 2011. A novel  
9 spatiotemporal RhoC activation pathway locally regulates cofilin activity at invadopodia. *Curr Biol.*  
10 21:635–44. doi:10.1016/j.cub.2011.03.039.
- 11 Burgstaller, G., and M. Gimona. 2004. Actin cytoskeleton remodelling via local inhibition of  
12 contractility at discrete microdomains. *Journal of Cell Science*. 117:223–231. doi:10.1242/jcs.00839.
- 13 Campbell, J.D., A. Alexandrov, J. Kim, J. Wala, A.H. Berger, C.S. Pedamallu, S.A. Shukla, G. Guo, A.N.  
14 Brooks, B.A. Murray, M. Imielinski, X. Hu, S. Ling, R. Akbani, M. Rosenberg, C. Cibulskis, A.  
15 Ramachandran, E.A. Collisson, D.J. Kwiatkowski, M.S. Lawrence, J.N. Weinstein, R.G. Verhaak, C.J.  
16 Wu, P.S. Hammerman, A.D. Cherniack, G. Getz, N. Cancer Genome Atlas Research, M.N. Artyomov, R.  
17 Schreiber, R. Govindan, and M. Meyerson. 2016. Distinct patterns of somatic genome alterations in  
18 lung adenocarcinomas and squamous cell carcinomas. *Nat Genet.* 48:607–16. doi:10.1038/ng.3564.
- 19 Crimaldi, L., S.A. Courtneidge, and M. Gimona. 2009. Tks5 recruits AFAP-110, p190RhoGAP, and  
20 cortactin for podosome formation. *Experimental Cell Research*. 315:2581–2592.  
21 doi:10.1016/j.yexcr.2009.06.012.
- 22 Eberth, A., R. Lundmark, L. Gremer, R. Dvorsky, K.T. Koessmeier, H.T. McMahon, and M.R. Ahmadian.  
23 2009. A BAR domain-mediated autoinhibitory mechanism for RhoGAPs of the GRAF family. *Biochem*  
24 *J.* 417:371–377. doi:10.1042/BJ20081535.
- 25 Guegan, F., F. Tatin, T. Leste-Lasserre, G. Drutel, E. Genot, and V. Moreau. 2008. p190B RhoGAP  
26 regulates endothelial-cell-associated proteolysis through MT1-MMP and MMP2. *Journal of cell*  
27 *science*. 121:2054–61.
- 28 Héraud, C., M. Pinault, V. Lagrée, and V. Moreau. 2019. p190RhoGAPs, the ARHGAP35- and  
29 ARHGAP5-Encoded Proteins, in Health and Disease. *Cells*. 8. doi:10.3390/cells8040351.
- 30 Hu, K.Q., and J. Settleman. 1997. Tandem SH2 binding sites mediate the RasGAP-RhoGAP interaction:  
31 a conformational mechanism for SH3 domain regulation. *The EMBO journal*. 16:473–83.
- 32 Hülsemann, M., C. Sanchez, P.V. Verkhusha, V. Des Marais, S.P.H. Mao, S.K. Donnelly, J.E. Segall, and  
33 L. Hodgson. 2021. TC10 regulates breast cancer invasion and metastasis by controlling membrane  
34 type-1 matrix metalloproteinase at invadopodia. *Commun Biol.* 4:1091. doi:10.1038/s42003-021-  
35 02583-3.
- 36 Juin, A., C. Billottet, V. Moreau, O. Destaing, C. Albiges-Rizo, J. Rosenbaum, E. Génot, and F. Saltel.  
37 2012. Physiological type I collagen organization induces the formation of a novel class of linear

1 invadosomes. *Mol. Biol. Cell.* 23:297–309. doi:10.1091/mbc.E11-07-0594.

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

6 Lawrence, M.S., P. Stojanov, C.H. Mermel, J.T. Robinson, L.A. Garraway, T.R. Golub, M. Meyerson,  
7 S.B. Gabriel, E.S. Lander, and G. Getz. 2014. Discovery and saturation analysis of cancer genes across  
8 21 tumour types. *Nature.* 505:495–501. doi:10.1038/nature12912.

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

11 Ligeti, E., M.C. Dagher, S.E. Hernandez, A.J. Koleske, and J. Settleman. 2004. Phospholipids can switch  
12 the GTPase substrate preference of a GTPase-activating protein. *The Journal of biological chemistry.*  
13 279:5055–8.

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

16 Machacek, M., L. Hodgson, C. Welch, H. Elliott, O. Pertz, P. Nalbant, A. Abell, G.L. Johnson, K.M.  
17 Hahn, and G. Danuser. 2009. Coordination of Rho GTPase activities during cell protrusion. *Nature.*  
18 461:99–103.

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

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

26 Moreau, V., F. Tatin, C. Varon, and E. Genot. 2003. Actin can reorganize into podosomes in aortic  
27 endothelial cells, a process controlled by Cdc42 and RhoA. *Molecular and cellular biology.* 23:6809–  
28 22.

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

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

34 Roof, R.W., M.D. Haskell, B.D. Dukes, N. Sherman, M. Kinter, and S.J. Parsons. 1998. Phosphotyrosine  
35 (p-Tyr)-dependent and -independent mechanisms of p190 RhoGAP-p120 RasGAP interaction: Tyr  
36 1105 of p190, a substrate for c-Src, is the sole p-Tyr mediator of complex formation. *Molecular and  
37 cellular biology.* 18:7052–63.

- 1 Stiegler, A.L., and T.J. Boggon. 2017. p190RhoGAP proteins contain pseudoGTPase domains. *Nat*  
2 *Commun.* 8:506. doi:10.1038/s41467-017-00483-x.
- 3 Stiegler, A.L., and T.J. Boggon. 2018. The N-Terminal GTPase Domain of p190RhoGAP Proteins Is a  
4 PseudoGTPase. *Structure.* 26:1451-1461 e4. doi:10.1016/j.str.2018.07.015.
- 5 Su, L., O. Pertz, M. Mikawa, K. Hahn, and S.J. Parsons. 2009. p190RhoGAP negatively regulates Rho  
6 activity at the cleavage furrow of mitotic cells. *Exp Cell Res.* 315:1347–59.  
7 doi:10.1016/j.yexcr.2009.02.014.
- 8 Tomar, A., S.T. Lim, Y. Lim, and D.D. Schlaepfer. 2009. A FAK-p120RasGAP-p190RhoGAP complex  
9 regulates polarity in migrating cells. *J Cell Sci.* 122:1852–62. doi:10.1242/jcs.046870.

10

## 1 **FIGURE LEGENDS**

### 2 **Figure 1: The PLS is required for modulating p190A invadosome localization**

3 (A) Schematic representation of WT and PLS-truncated p190A. Functional domains are indicated.  
4 GBD: GTP binding domain; pG1: pseudo GTPase domain 1, pG2: pseudo GTPase domain 2; p120BD:  
5 p120RasGAP binding domain; PBR: Poly-Basic Region; PLS; Protrusion-Localization Sequence; GAP:  
6 GTPase Activating Protein domain. (B) NIH-3T3-Src cells were transfected with indicated HA-tagged  
7 constructs, plated on glass coverslips, fixed and stained for F-actin (red), HA tag (green), and nuclei  
8 (blue). Boxed regions are shown as enlarged views. Bar: 10  $\mu$ m. Graphs on the right of each panel  
9 represent the quantification of the relative staining of F-actin (red), HA tag (green) and nuclei (blue)  
10 determined on the region of interest (ROI, white line). A representative graph is shown for each  
11 condition. (C) NIH-3T3-Src cells were transfected with siRNAs targeting Cortactin (si1/si2 Cortactin) or  
12 control siRNAs (siCtrl). Cells were plated on glass coverslips, fixed and stained for F-actin (red), p190A  
13 (green), and cortactin (blue). Bar: 2.5  $\mu$ m.

### 14 **Figure 2: PLS interacts with the Cter domain of p190A**

15 (A) Schematic representation of p190A showing the PLS, the two regions obtained from the two-  
16 hybrid screen, and positions of cancer-associated mutations. (B-D) Co-IP of different HA-tagged  
17 proteins and GFP-PLS from lysates of HEK293T cells expressing respective tagged proteins. Input and  
18 co-IP were analyzed by Western-blot with antibodies against HA and GFP tags, as indicated. Arrows  
19 indicated expected proteins ((C) Cter: 60kDa; p120BD: 15kDa; GAP: 33kDa; GBD: 30kDa; 2FF: 23kDa;  
20 4FF: 33kDa; (D) Nter: 60kDa; Nter2h (2H#1 region): 28kDa; Cter: 55kDa; Cter2h (2H#2 region): 25  
21 kDa), stars indicated signal of the IgG light chains. Note that HA-Cter2h signal (25 kDa) is fused with  
22 the IgG light chain signal resulting in a slightly larger band (D, lanes #4 and #9). For each condition, a  
23 representative experiment out of three is shown.

### 24 **Figure 3: PLS regulates p190A activity**

25 Huh7 cells were transfected with HA-tagged Cter and/or GFP-tagged PLS constructs as indicated on  
26 the figure. Cells were fixed and stained with phalloidin (white), HA (red) and GFP (green) antibodies,  
27 and DAPI (blue). (B) Quantification of three experiments performed as described in (A). For each  
28 condition, phenotype is evaluated by using an epifluorescence microscope as normal, intermediate  
29 or dendritic-like. Around 50 transfected cells were counted for each of the 3 experiments. Values are  
30 expressed as the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. Statistical significance was  
31 calculated between two conditions with \*\*,  $P < 0.01$  and \*\*\*\*,  $P < 0.0001$ .

### 32 **Figure 4: Cancer-associated mutations in PLS abolish PLS/Cter interaction and increase PLS/Nter** 33 **interaction.**

34 (A-D) HEK293T cells were co-transfected with indicated constructs and co-IP were performed using  
35 HA-coupled beads. Cell extracts were analyzed by Western-blot before (Input) or after co-IP ( $\alpha$ -HA IP)  
36 using anti-HA and anti-GFP antibodies. (B) Phosphorylation is not implicated in Cter/PLS interaction.  
37 Cells were co-transfected as indicated and treated with phosphatase with or without phosphatase  
38 inhibitor before co-IP. (D) Arrows indicated expected proteins (Nter: 60kDa; Nter2h: 28kDa), stars  
39 indicated signal of the IgG light chains. (A-D) A representative experiment out of three is shown.

1 **Figure 5: Model of p190A auto-inhibition.**

2 Representation of p190A protein exhibiting an intramolecular interaction involving the PLS domain.  
3 In the inactivated WT protein, PLS is interacting either with the Nter and the Cter or the Cter domain  
4 alone in a locked Cter conformation masking the GAP domain. In the mutated protein, the Cter is not  
5 interacting anymore with the PLS leading to unmasking the GAP domain and increasing the GAP  
6 activity. The Nter domain would interact with the PLS preventing the correct localization of the  
7 protein. A fully activated protein may require an open conformation to allow proper localization and  
8 GAP activity.

## SUPPORTING INFORMATION

1  
2  
3  
4

### 5 SUPPLEMENTARY TABLES

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

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

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

10  
11

### 12 SUPPLEMENTARY FIGURE LEGENDS

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

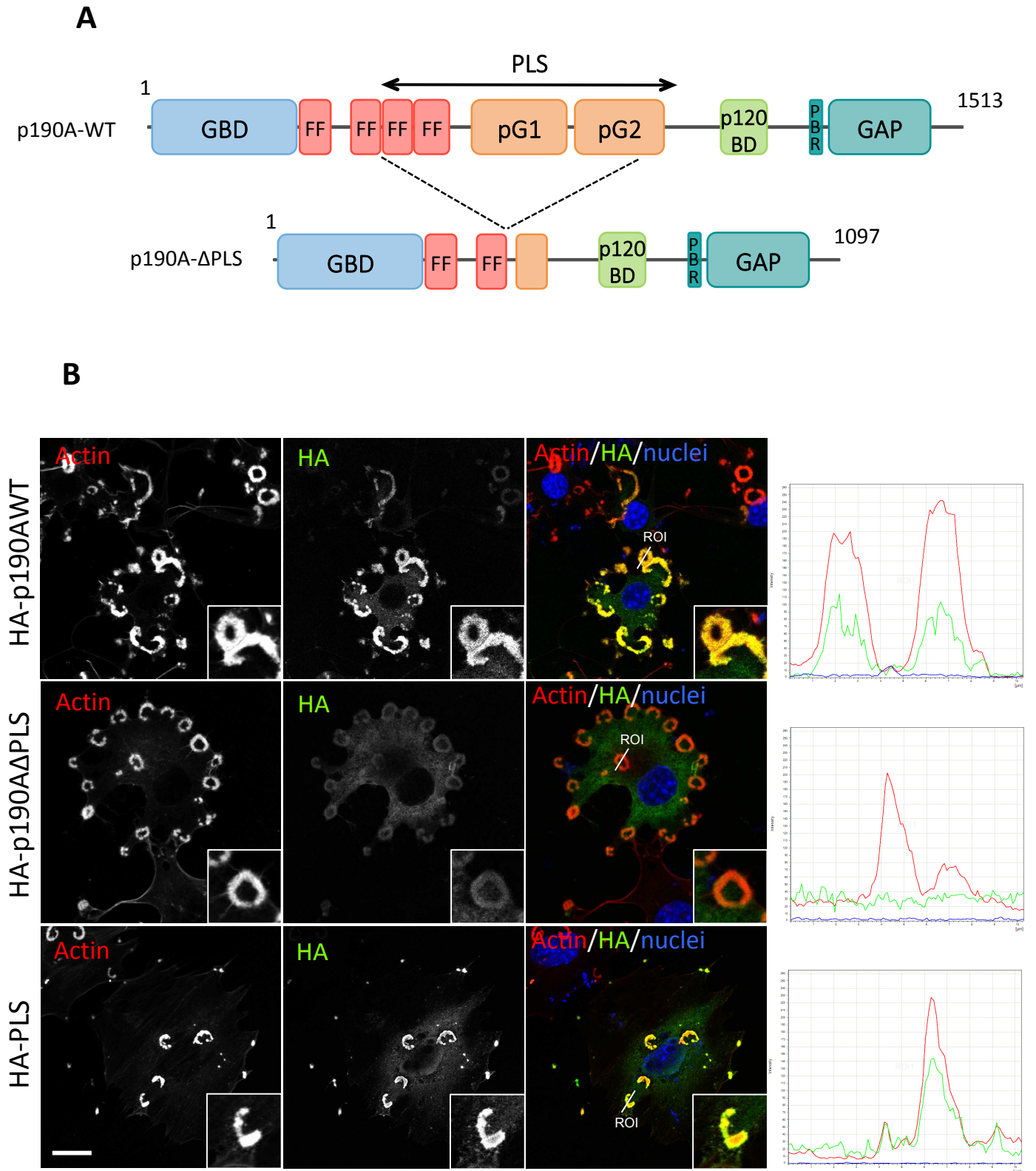
14 (A) NIH-3T3-Src cells were plated on glass coverslip (upper panel) and Huh6 cells were plated on  
15 coverslips treated (bottom panel) or not (middle panel) with type I collagen. All cells are stained for  
16 endogenous F-actin (red), p190A (green), and nuclei (blue). Merge images are represented. (B) Huh6  
17 cells transfected with indicated HA-tagged constructs were plated on type I collagen-coated  
18 coverslips to induced linear invadosomes. Cells were then fixed and stained for F-actin (red), HA tag  
19 (green), and nuclei (blue). (A-B) Boxed regions are shown as enlarged views. Bar: 10  $\mu$ m. (C) NIH-3T3-  
20 Src cells were transfected with siRNAs targeting Cortactin (si1/si2 Cortactin) or control siRNAs (siCtrl).  
21 Cell extracts were analyzed by Western-blot using mouse anti-Cortactin and rabbit anti-GAPDH  
22 antibodies. GAPDH was used as the loading control. Numbers indicate band intensity as evaluated  
23 using Chemidoc imaging analysis.

#### 24 **Supplementary Figure 2: Cancer-associated mutations in PLS abolish PLS/Cter interaction.**

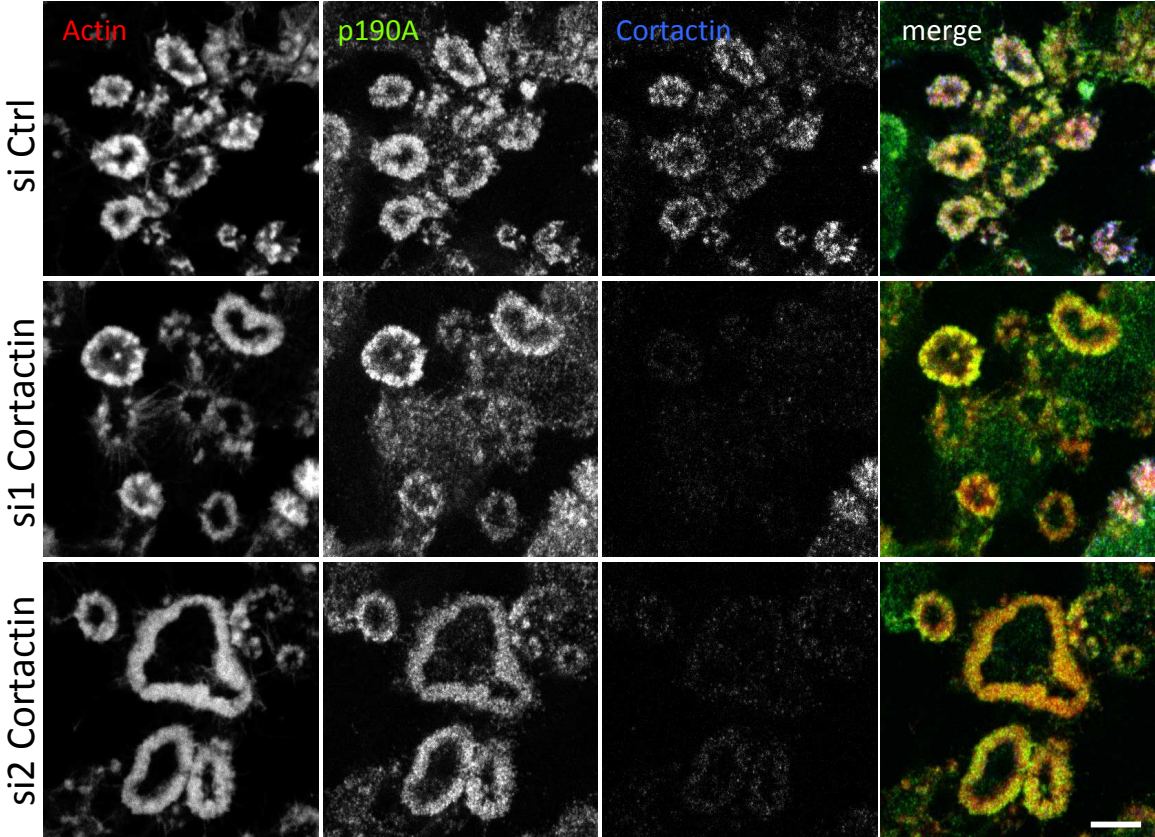
25 Quantification of the interaction between PLS and Cter domains. Quantification was performed on 3  
26 experiments as follows: band intensity of the GFP staining (IP condition normalized to the input  
27 condition) divided by band intensity of the HA staining (IP condition normalized to the input  
28 condition). Mutated values were reported to WT values. Statistical significance was calculated  
29 between mutant and WT conditions using *t*-test with \*\*\*,  $P < 0.001$ ; \*\*,  $P < 0.01$ .



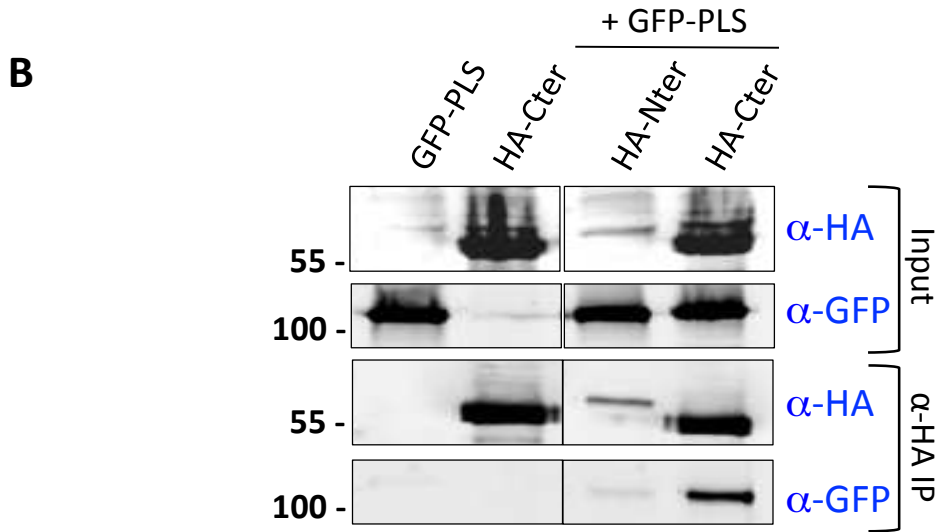
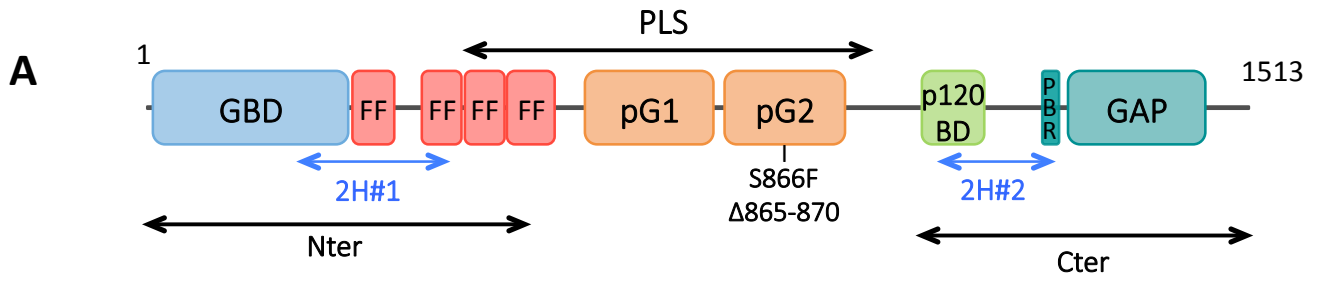
Héraud et al., Figure 1



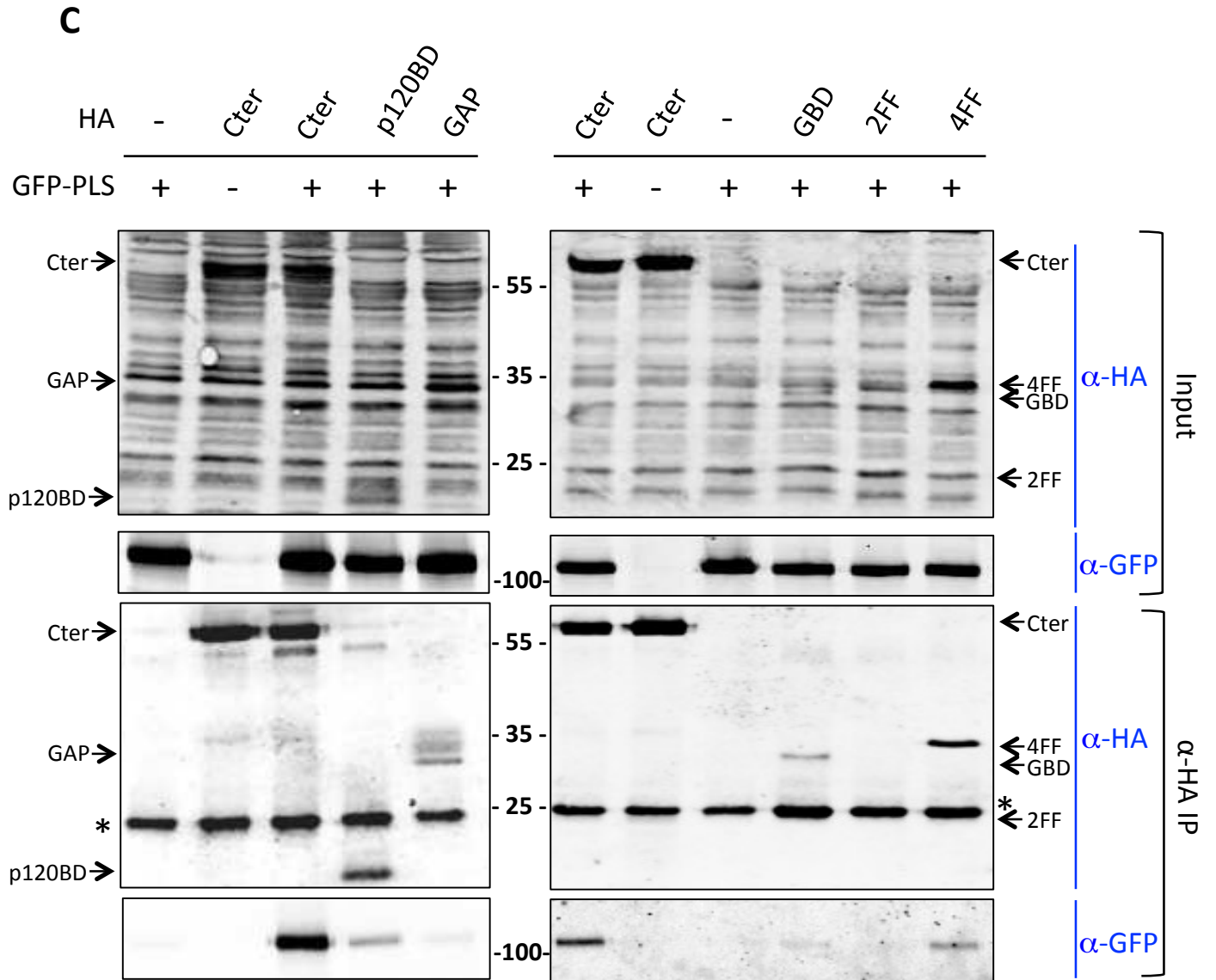
C



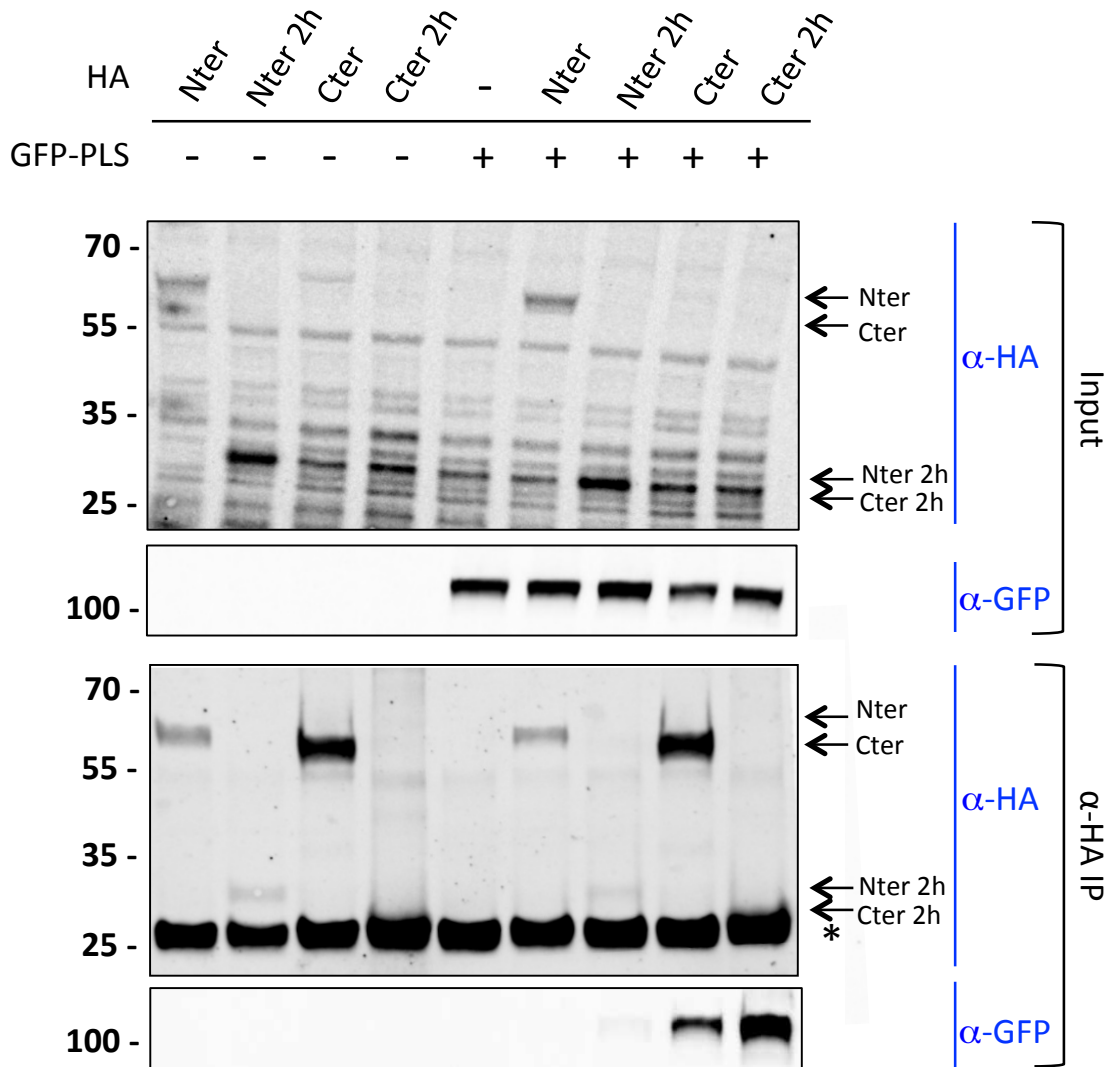
Héraud et al., Figure 2



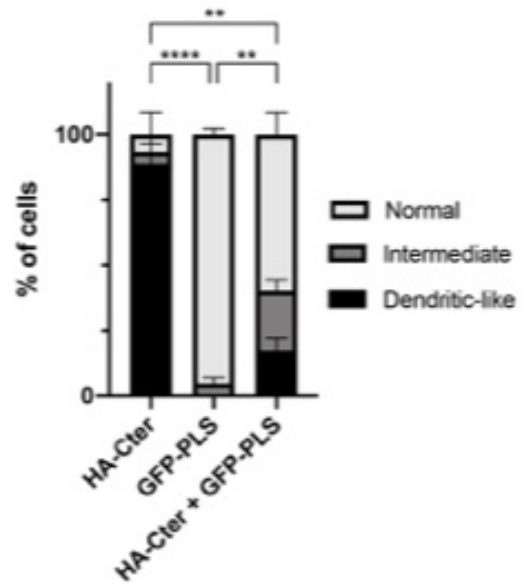
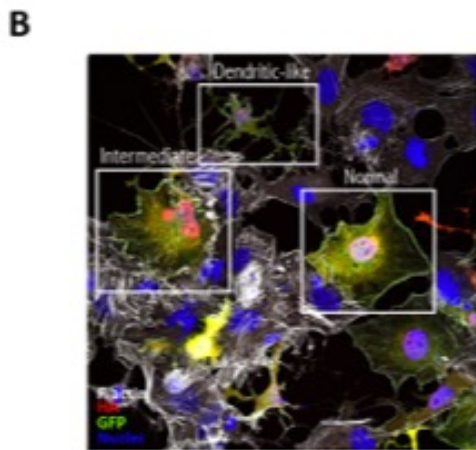
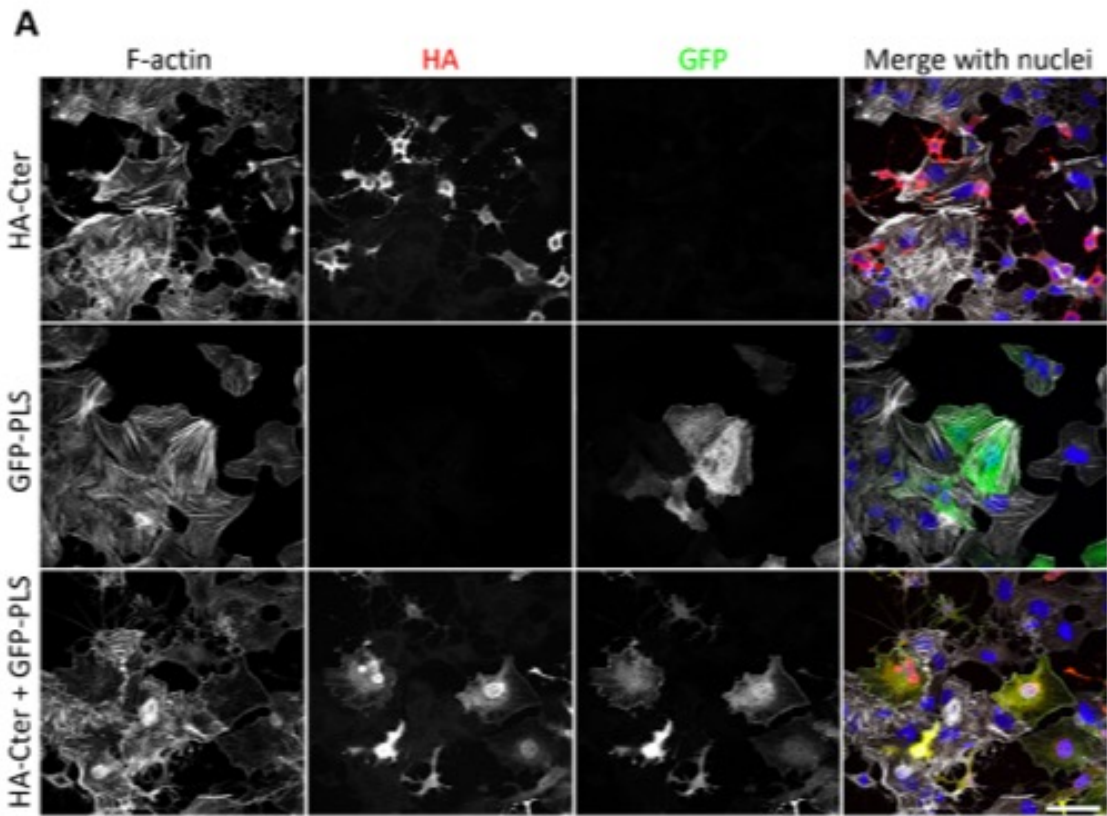
Héraud et al., Figure 2



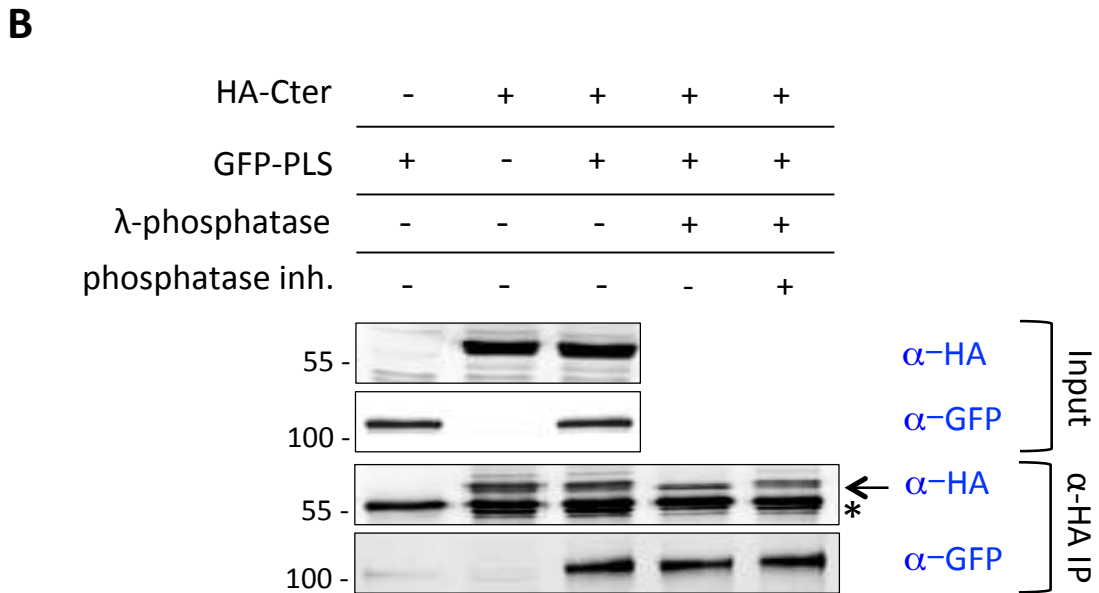
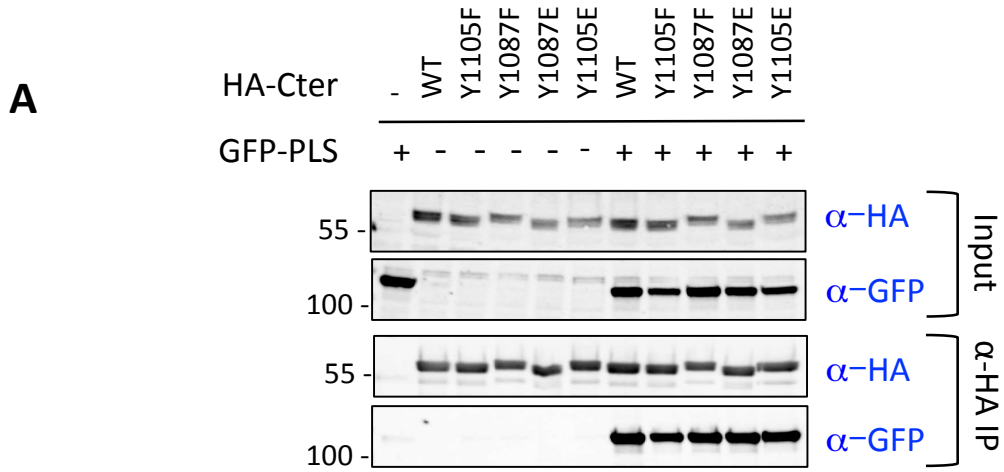
**D**



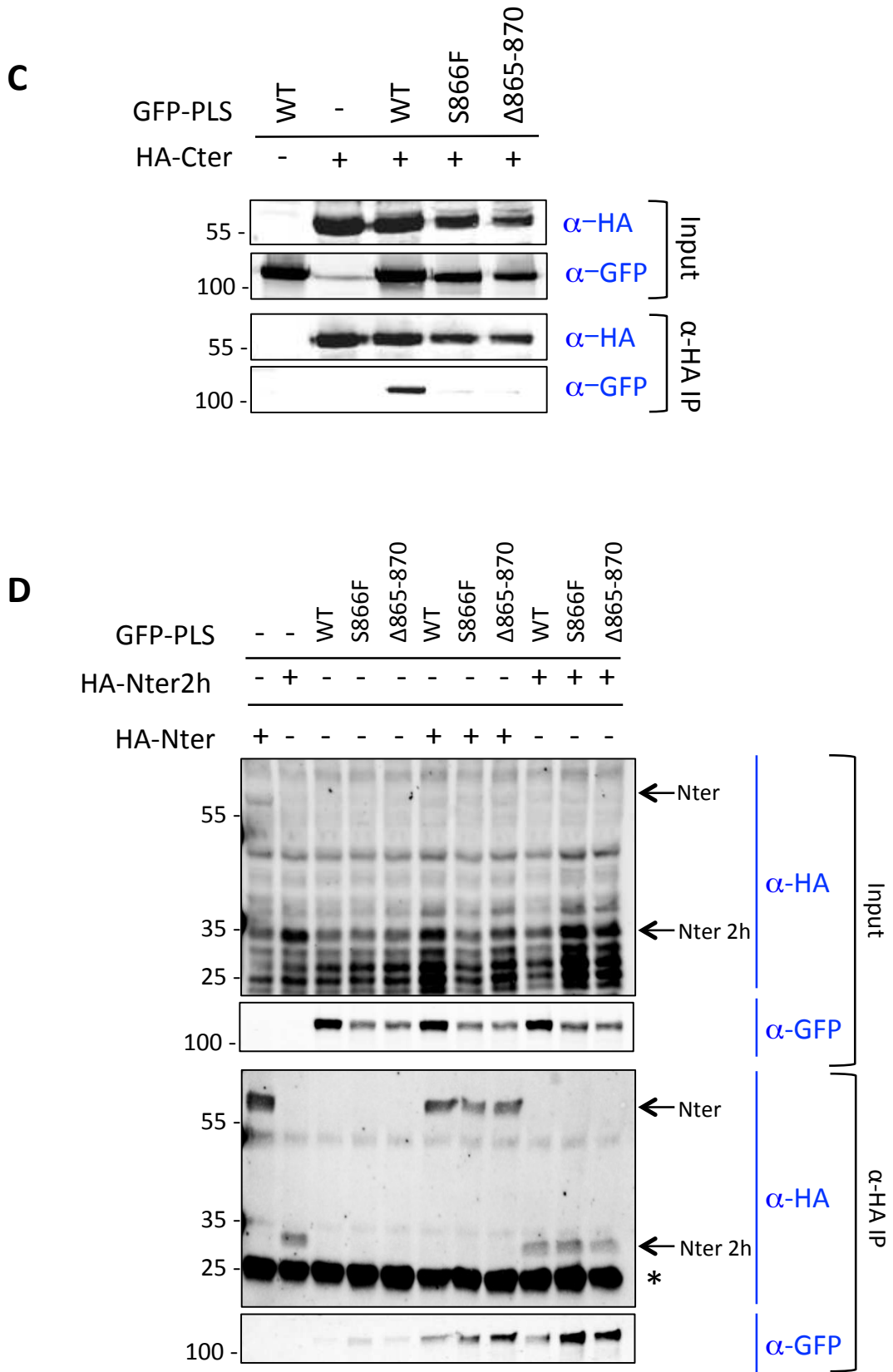
Héraud et al., Figure 3



Héraud et al., Figure 4

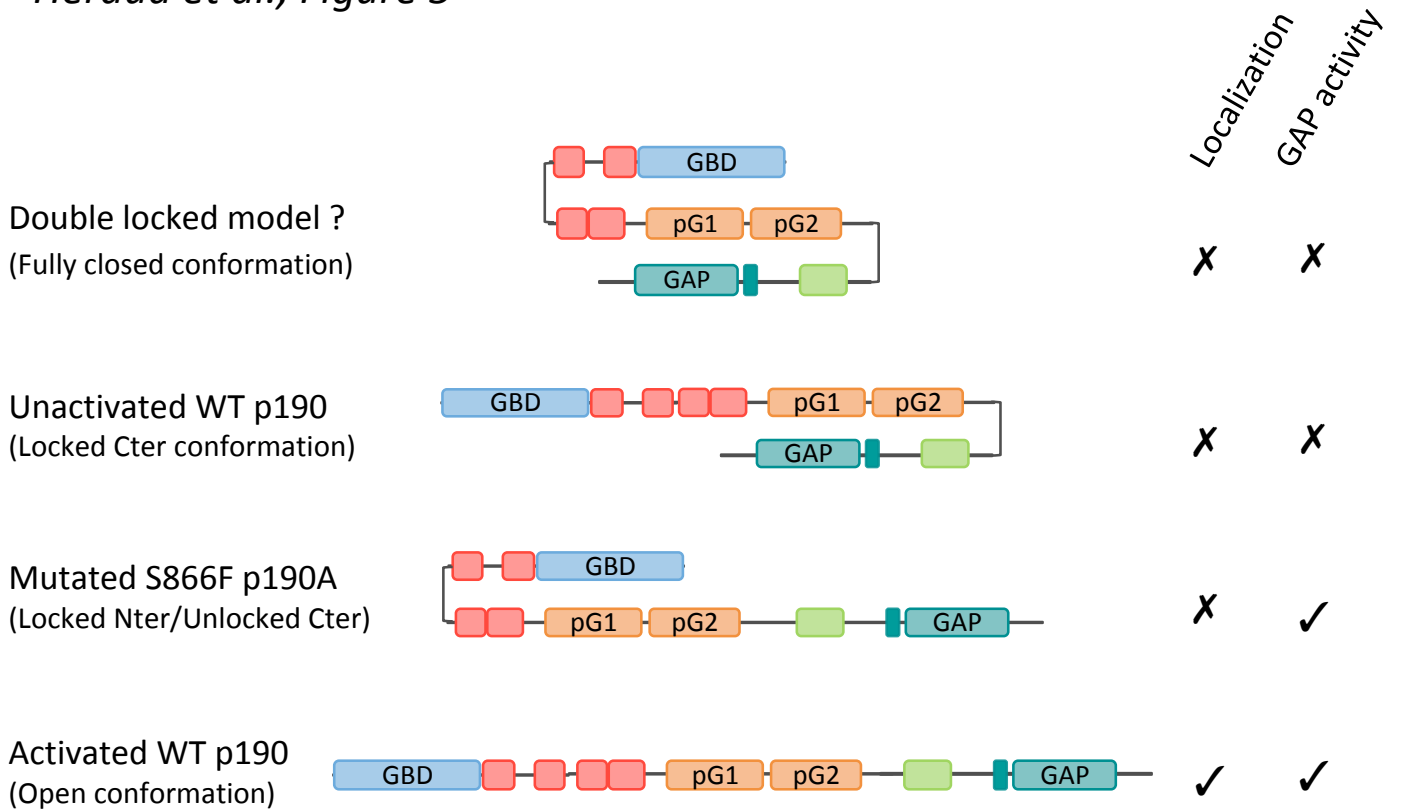


Héraud et al., Figure 4



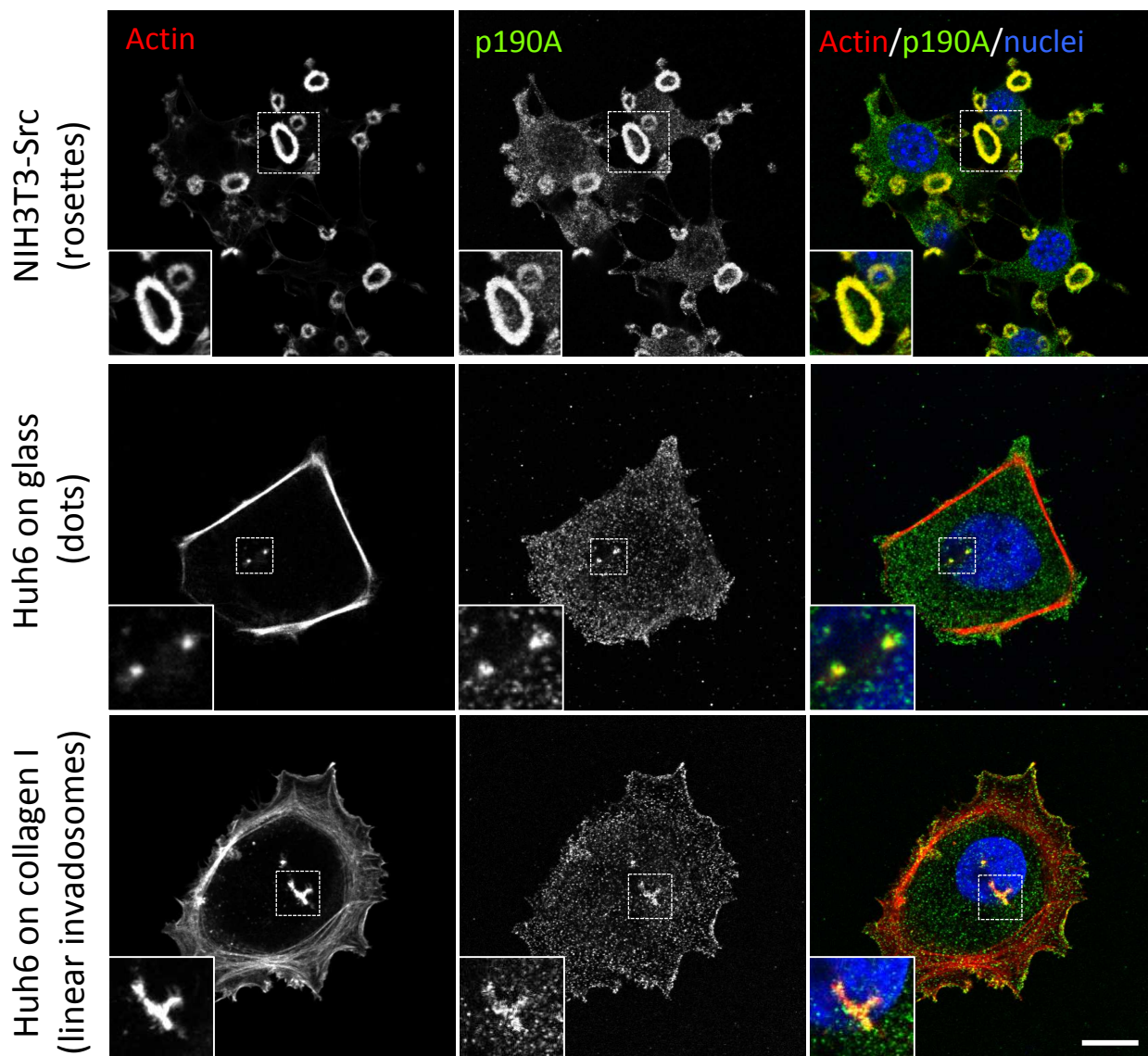


*Héraud et al., Figure 5*



Supplementary Figure 1

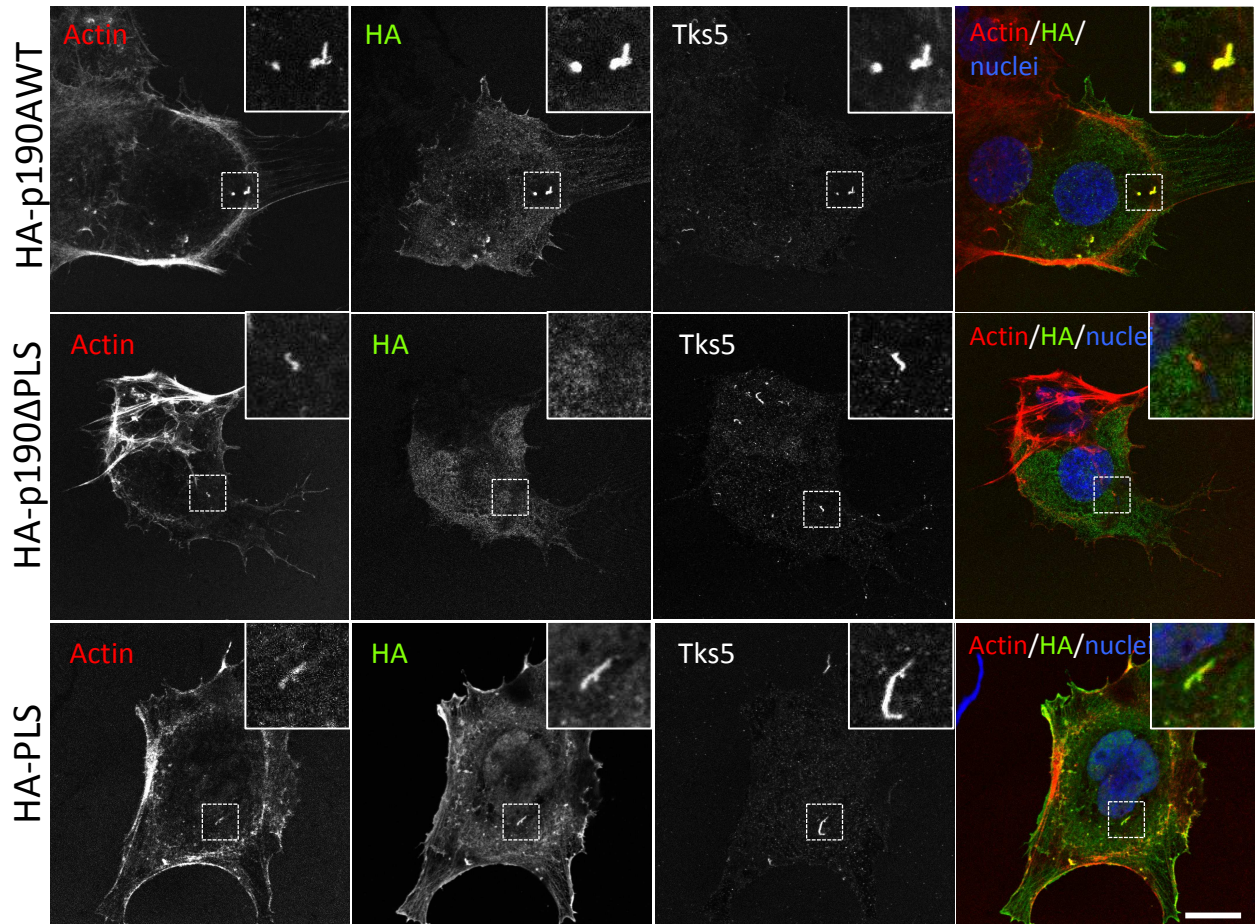
A



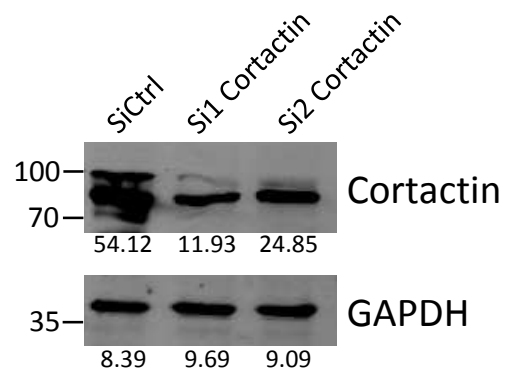
# Supplementary Figure 1

## B

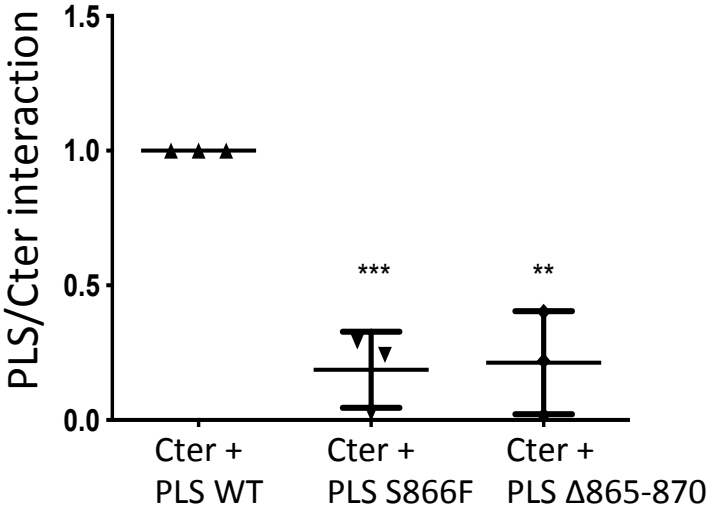
Huh6 cells on type I collagen



## C



Supplementary Figure 2



**Table SI: ARHGAP35/GRLF1 clones obtained in the 2Hybrid screen**

<b>Clone Name</b>	<b>Gene Name (Best Match)</b>	<b>Global PBS</b>	<b>Start</b>
PLA_RP6_hgx4519v1_pB27_A-174	Homo sapiens - GRLF1	A	621
PLA_RP6_hgx4519v1_pB27_A-41	Homo sapiens - GRLF1	A	621
PLA_RP6_hgx4519v1_pB27_A-319	Homo sapiens - GRLF1	A	2683
PLA_RP6_hgx4519v1_pB27_A-209	Homo sapiens - GRLF1	A	2685
PLA_RP6_hgx4519v1_pB27_A-330	Homo sapiens - GRLF1	A	2685
PLA_RP6_hgx4519v1_pB27_A-346	Homo sapiens - GRLF1	A	2685
PLA_RP6_hgx4519v1_pB27_A-337	Homo sapiens - GRLF1	A	2820
PLA_RP6_hgx4519v1_pB27_A-264	Homo sapiens - GRLF1	A	2886
PLA_RP6_hgx4519v1_pB27_A-323	Homo sapiens - GRLF1	A	2886
PLA_RP6_hgx4519v1_pB27_A-279	Homo sapiens - GRLF1	A	2907
PLA_RP6_hgx4519v1_pB27_A-289	Homo sapiens - GRLF1	A	2907
PLA_RP6_hgx4519v1_pB27_A-117	Homo sapiens - GRLF1	A	2907
PLA_RP6_hgx4519v1_pB27_A-204	Homo sapiens - GRLF1	A	2907
PLA_RP6_hgx4519v1_pB27_A-205	Homo sapiens - GRLF1	A	2907
PLA_RP6_hgx4519v1_pB27_A-363	Homo sapiens - GRLF1	A	2907
PLA_RP6_hgx4519v1_pB27_A-360	Homo sapiens - GRLF1	A	2907
PLA_RP6_hgx4519v1_pB27_A-287	Homo sapiens - GRLF1	A	2931
PLA_RP6_hgx4519v1_pB27_A-300	Homo sapiens - GRLF1	A	2934
PLA_RP6_hgx4519v1_pB27_A-255	Homo sapiens - GRLF1	A	2934
PLA_RP6_hgx4519v1_pB27_A-268	Homo sapiens - GRLF1	A	2970
PLA_RP6_hgx4519v1_pB27_A-354	Homo sapiens - GRLF1	A	2970
PLA_RP6_hgx4519v1_pB27_A-353	Homo sapiens - GRLF1	A	2970
PLA_RP6_hgx4519v1_pB27_A-366	Homo sapiens - GRLF1	A	2970
PLA_RP6_hgx4519v1_pB27_A-296	Homo sapiens - GRLF1	A	3000
PLA_RP6_hgx4519v1_pB27_A-327	Homo sapiens - GRLF1	A	3000
PLA_RP6_hgx4519v1_pB27_A-45	Homo sapiens - GRLF1	A	3000
PLA_RP6_hgx4519v1_pB27_A-150	Homo sapiens - GRLF1	A	3000
PLA_RP6_hgx4519v1_pB27_A-184	Homo sapiens - GRLF1	A	3000
PLA_RP6_hgx4519v1_pB27_A-158	Homo sapiens - GRLF1	A	3003
PLA_RP6_hgx4519v1_pB27_A-178	Homo sapiens - GRLF1	A	3003
PLA_RP6_hgx4519v1_pB27_A-348	Homo sapiens - GRLF1	A	3051
PLA_RP6_hgx4519v1_pB27_A-347	Homo sapiens - GRLF1	A	3051
PLA_RP6_hgx4519v1_pB27_A-172	Homo sapiens - GRLF1	A	3051
PLA_RP6_hgx4519v1_pB27_A-1	Homo sapiens - GRLF1	A	3204
PLA_RP6_hgx4519v1_pB27_A-223	Homo sapiens - GRLF1	A	3204

**Table SII: ARHGAP35 constructs used in this study. Numbering correspond**

<b>Protein name</b>	<b>Vector name</b>	<b>Tag</b>
HA-p190A WT	pKH3-p190A WT	HA
HA-p190AΔPLS	pKH3-p190AΔPLS	HA
HA-PLS	pKH3-p190A-PLS WT	HA
GFP-PLS	pEGFPC1-p190A-PLS WT	GFP
GFP-PLS S866F	pEGFPC1-p190A-PLS S866F	GFP
GFP-PLSΔ865-870	pEGFPC1-p190A-PLS Δ865-870	GFP
HA-Nter	pKH3-p190A-Nter	HA
HA-Nter2h	pKH3-p190A-Nter2h	HA
HA-GBD	pKH3-p190A-GBD	HA
HA-2FF	pKH3-p190A-2FF	HA
HA-4FF	pKH3-p190A-4FF	HA
HA-Cter	pKH3-p190A-Cter	HA
HA-Cter2h	pKH3-p190A-Cter2h	HA
HA-p120BD	pKH3-p190A-p120DB	HA
HA-GAP	pKH3-p190A-GAP	HA
HA-Cter Y1087F	pKH3-p190A-Cter Y1087F	HA
HA-Cter Y1087E	pKH3-p190A-Cter Y1087E	HA
HA-Cter Y1105F	pKH3-p190A-Cter Y1105F	HA
HA-Cter Y 1105E	pKH3-p190A-Cter Y1105E	HA

is to the rat ARHGAP35 cDNA (GenBank under accession no. M94721) that was used.

<b>Start &amp; Stop amino-acids</b>	<b>Observed MW (kDa)</b>
1-1513	190
1- 379 & 800-1513	135
380-971	70
380-971	110
380-971	110
380-971	110
1-533	60
207-418	28
1-257	30
380-531	23
251-533	33
1055-1513	55
1069-1231	25
1055-1180	15
1259-1513	33
1055-1513	55
1055-1513	55
1055-1513	55
1055-1513	55

**Table SII: *ARHGAP35* primers used in this study.**

<b>Construct generated</b>	<b>Vector matrix</b>	<b>Forward primer 5' → 3'</b>
pKH3-p190A-Cter2h	HA-p190A	CGGGATCCCGAGATCTTTCTTACTTAGACC
pKH3-p190A-Nter2h	HA-p190A	CGGGATCCCGGTACATTAGAGATGCACATACT
pKH3-p190A Cter Y1087F	HA-p190A	GGATTTGATCCTTCTGACTTCGCAGAGCCCATGGATGCTGTGG
pKH3-p190A Cter Y1087E	HA-p190A	GGATTTGATCCTTCTGACGAAGCAGAGCCCATGGATGCTGTGG
pKH3-p190A Cter Y1105E	HA-p190A	GAGGAAGAAAACATAGAGTCAGTGCCCCACGAC
pKH3-p190A Cter Y1105F	HA-p190A	GAGGAAGAAAACATATTCTCAGTGCCCCACGAC
pEGFP-PLS S866F	GFP-PLS	GCCAAACGTAAGGCCTTCTGGCAATGTTA CGT
pEGFP-PLS Δ865-870	GFP-PLS	TATTCAGCCAACGTAAGGTACGTGCCTTTCTTTGTGAA

**Reverse primer 5' → 3'**

GGAATTCAGGGTTTGGGCTTTGGTTTCTTG  
GGAATTCAGGTCTCATACAACGCTCAGC  
CCACAGCATCCATGGGCTCTGCGAAGTCAGAAGGATCAAATCC  
CCACAGCATCCATGGGCTCTGCTTCGTCAGAAGGATCAAATCC  
GTCGTGGGGCACTGACTCTATGTTTTCTTCCTC  
GTCGTGGGGCACTGAGAATATGTTTTCTTCCTC  
ACGTAACATTGCCAAGAAGGCCTTACGTTTGCC  
TTCACAAAGAAAGGCACGTACCTTACGTTTGGCTGAATA

## Annexe 2 – Liste des protéines identifiées en BioID

Le tableau ci-après représente la liste des protéines identifiées comme interagissant significativement avec p190A/*ARHGAP35* et p190B/*ARHGAP5* grâce au BioID. *AvgSpec* correspond à l'abondance moyenne retrouvée pour chaque protéine entre les expériences de BioID. Le BFDR (*Bayesian false discovery rate*) est le contrôle d'erreur. Les protéines présentant un BFDR  $\leq 0.05$  ont été considérées comme des interactants significatifs.

Tableau 7 : Liste des protéines identifiées en BioID comme partenaires de p190A/*ARHGAP35* (gauche) et p190B/*ARHGAP5* (droite).

Appât	Interactants	AvgSpec	BFDR	Appât	Interactants	AvgSpec	BFDR
ARHGAP35	CSNK2A3	19	0	ARHGAP5	DYNLL2	4	0
ARHGAP35	EFHD1	8	0	ARHGAP5	MRTFB	48.5	0
ARHGAP35	BSG	6.5	0	ARHGAP5	ACTBL2	16	0
ARHGAP35	WVOX	8.5	0	ARHGAP5	RAB3A	6.5	0
ARHGAP35	TRIP13	5	0	ARHGAP5	EFHD1	6	0
ARHGAP35	GNB1	5.5	0	ARHGAP5	WVOX	8.5	0
ARHGAP35	DHPS	5	0	ARHGAP5	ATG2B	37	0
ARHGAP35	PDLIM7	6.5	0	ARHGAP5	PUS1	6	0
ARHGAP35	DEPDC1B	6.5	0	ARHGAP5	RUFY1	7	0
ARHGAP35	PUS1	5.5	0	ARHGAP5	FAM193A	14.5	0
ARHGAP35	CXADR	4.5	0	ARHGAP5	SASS6	7	0
ARHGAP35	PLEKHA1	5	0	ARHGAP5	SYNJ1	15	0
ARHGAP35	UNC5B	7.5	0	ARHGAP5	KNOP1	4.5	0
ARHGAP35	RNF10	9	0	ARHGAP5	SIN3B	11	0
ARHGAP35	MCAM	6.5	0	ARHGAP5	EEF2K	7	0
ARHGAP35	NEXN	6	0	ARHGAP5	TNIP1	5.5	0
ARHGAP35	RUFY1	5.5	0	ARHGAP5	SYNJ2	11	0
ARHGAP35	CCDC22	5	0	ARHGAP5	URI1	4	0
ARHGAP35	ATP2B4	8	0	ARHGAP5	NEK1	10.5	0
ARHGAP35	DHX57	8.5	0	ARHGAP5	CAMSAP1	13	0
ARHGAP35	RTN1	4.5	0	ARHGAP5	MRTFA	7	0
ARHGAP35	FAM193A	7	0	ARHGAP5	STXBP4	4	0
ARHGAP35	PARD3	5	0	ARHGAP5	KIAA1211	8	0
ARHGAP35	HEATR5A	5.5	0	ARHGAP5	DNMBP	9	0
ARHGAP35	SVIL	4.5	0	ARHGAP5	ITSN2	9.5	0
ARHGAP35	ORMDL2	4	0	ARHGAP5	TTC12	4	0
ARHGAP35	ATF3	4	0	ARHGAP5	DLGAP3	5.5	0
ARHGAP35	ATP6V1E1	4	0	ARHGAP5	ANKRD52	6	0
ARHGAP35	DCXR	3.5	0	ARHGAP5	DHX57	7	0
ARHGAP35	DIMT1	4.5	0	ARHGAP5	FKBP15	6.5	0
ARHGAP35	ZC3HAV1L	4	0	ARHGAP5	FCHO2	4	0
ARHGAP35	CCS	3.5	0	ARHGAP5	KIAA1217	6.5	0



ARHGAP35	FNBP1L	3.5	0	ARHGAP5	SIPA1L1	9	0
ARHGAP35	SASS6	4	0	ARHGAP5	CAMSAP2	7	0
ARHGAP35	SECISBP2	4	0	ARHGAP5	IBTK	5.5	0
ARHGAP35	PEAK1	3.5	0	ARHGAP5	PEAK1	7	0
ARHGAP35	BIRC6	4	0	ARHGAP5	KNTC1	8.5	0
ARHGAP35	ITSN2	3	0	ARHGAP5	APC	10.5	0
ARHGAP35	VANGL1	13.5	0	ARHGAP5	SIPA1L3	5.5	0
ARHGAP35	NECTIN3	5.5	0.01	ARHGAP5	PCNT	7	0
ARHGAP35	KANK2	3	0.01	ARHGAP5	HTT	5	0
ARHGAP35	CAMSAP2	5	0.01	ARHGAP5	ALMS1	6	0
ARHGAP35	SYNJ2	4	0.01	ARHGAP5	BIRC6	6.5	0
ARHGAP35	SIPA1L1	3	0.01	ARHGAP5	ATP6V1E1	3.5	0
ARHGAP35	HECTD1	8.5	0.01	ARHGAP5	ERC1	16	0
ARHGAP35	STK38	13	0.03	ARHGAP5	PDLIM7	4	0
ARHGAP35	NECTIN2	6	0.04	ARHGAP5	RUFY3	4	0
ARHGAP35	INPPL1	6.5	0.04	ARHGAP5	KANK2	4.5	0
ARHGAP35	SLITRK5	6	0.05	ARHGAP5	LARS2	4.5	0
ARHGAP35	GTSE1	5.5	0.05	ARHGAP5	SECISBP2	3.5	0
				ARHGAP5	PDZD8	4	0
				ARHGAP5	NAV1	4.5	0
				ARHGAP5	KNL1	4.5	0
				ARHGAP5	PLXNA1	3.5	0
				ARHGAP5	WDR92	3	0
				ARHGAP5	ANAPC1	17.5	0
				ARHGAP5	PCGF5	3	0.01
				ARHGAP5	ASCC1	3.5	0.01
				ARHGAP5	DIS3L	9	0
				ARHGAP5	ITPRID2	9.5	0.01
				ARHGAP5	FNBP1	3.5	0.01
				ARHGAP5	CCP110	5	0.01
				ARHGAP5	EPS8	3	0.01
				ARHGAP5	OTUD4	3	0.01
				ARHGAP5	CEP192	4	0.01
				ARHGAP5	ZDBF2	3	0.01
				ARHGAP5	AKAP13	3.5	0.01
				ARHGAP5	DIAPH3	14	0.01
				ARHGAP5	PRKD3	2.5	0.01
				ARHGAP5	NUMB	18.5	0.01
				ARHGAP5	COMMD4	2	0.02
				ARHGAP5	RPAP1	2	0.02
				ARHGAP5	ELP6	14	0.02
				ARHGAP5	EPS15	16	0.02
				ARHGAP5	IFT74	19	0.02
				ARHGAP5	KEAP1	13	0.02
				ARHGAP5	LRBA	29	0.02
				ARHGAP5	ANKRD28	12	0.02
				ARHGAP5	VANGL1	9	0.03
				ARHGAP5	CDC23	14	0.03

ARHGAP5	DNAJC13	15.5	0.03
ARHGAP5	HAUS5	8.5	0.04
ARHGAP5	BCR	9.5	0.04
ARHGAP5	HECTD1	9.5	0.03
ARHGAP5	YTHDC2	13	0.04
ARHGAP5	EIF4E	8	0.05
ARHGAP5	TXLNA	10	0.05
ARHGAP5	TARBP2	5.5	0.05
ARHGAP5	INPPL1	5.5	0.05

---

## Annexe 3 – Publications, communications scientifiques et formations

---

### Liste des publications

**Pinault M**, Héraud C, Neaud V, Valesco V, Prouzet-Mauleon V, Turcq B, Raymond AA, Croce S, Lagree V, Moreau V. *p190A/ARHGAP35 and p190B/ARHGAP5 proteins in endometrial cancer, a novel cancer-relevant paralog interaction*. En préparation.

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*. En cours de publication.

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

### Participations à des congrès

- Workshop Petites GTPases et Cancer, **Communication orale : Study of the impact of ARHGAP35 mutations in endometrial cancer** Mars 2022  
Toulouse
- Journée de l'Ecole Doctorale, **Présentation d'un Poster : Identifying the involvement of p190RhoGAP proteins in cancer** Mai 2021  
Bordeaux
- Journée du Département des Sciences Biologiques et Médicales, **Présentation d'un Poster : Strategies using CRISPR/Cas9 to study the impact of p190RhoGAP mutations on cancer cell migration** Décembre 2020  
Congrès en ligne
- Congrès Cancéropole Grand Sud Ouest Novembre 2020  
Congrès en ligne
- Séminaire CRISPR/Cas9 organisé par la société IDT™, **Communication Orale : CRISPR/Cas9 Strategies to generate cancer mutations in ARHGAP35 gene** Décembre 2019  
Bordeaux
- Congrès Cancéropole Grand Sud Ouest Novembre 2019  
Arcachon
- Journée Recherche en cancérologie organisée par La Ligue contre le Cancer, **Communication Orale : Etude des mutations d'ARHGAP35 dans le cancer de l'endomètre** Novembre 2019  
Limoges

### **Bourse de recherche**

- Bourse de Recherche Mitacs obtenue en Mars 2020  
Pour un séjour de Recherche effectué dans le laboratoire du Pr. Jean-François Côté à Montréal de Novembre 2021 à Février 2022

### **Formations suivies au cours la thèse**

- Les clés du management Mars 2022
- Traitement et analyse d'images sous Image Mars 2021
- Intégrité scientifique dans les métiers de la recherche Avril 2020
- Microscopie à épi-fluorescence et microscopie confocale Octobre 2020
- Ethique de la recherche Juin 2020

### **Encadrement de stagiaire**

- Léa Alexandre, étudiante en Licence 3 à Le Man Université Juin 2022