



Caractérisation des interactions moléculaires entre la GTPase Rac1 et son régulateur HACE1 : perspectives en infectiologie et en cancérologie

Romain Lotte

► To cite this version:

Romain Lotte. Caractérisation des interactions moléculaires entre la GTPase Rac1 et son régulateur HACE1 : perspectives en infectiologie et en cancérologie. Sciences agricoles. COMUE Université Côte d'Azur (2015 - 2019), 2017. Français. NNT : 2017AZUR4087 . tel-01691548

HAL Id: tel-01691548

<https://theses.hal.science/tel-01691548>

Submitted on 24 Jan 2018

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

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

Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé

Unité de recherche : Inserm 1065-C3M

THESE DE DOCTORAT

Pour obtenir le titre de Docteur en Sciences

de l'Université Côte d'Azur - UFR Sciences

Mention : Interactions moléculaires et cellulaires

Défendue publiquement par

Romain LOTTE

Caractérisation des interactions moléculaires entre la GTPase Rac1 et son régulateur HACE1 : perspectives en infectiologie et en cancérologie

Soutenue le 24 Octobre 2017

Devant le Jury de soutenance composé de :

Pr Florence FENOLLAR	<i>Professeur des Universités-Praticien Hospitalier</i>	<i>Présidente du jury</i>
Dr Ivo GOMPERTS-BONECA	<i>Directeur de Recherche</i>	<i>Rapporteur</i>
Pr Éric OSWALD	<i>Professeur des Universités-Praticien Hospitalier</i>	<i>Rapporteur</i>
Dr Emmanuel LEMICHEZ	<i>Directeur de Recherche</i>	<i>Directeur de thèse</i>
Pr Raymond RUIMY	<i>Professeur des Universités-Praticien Hospitalier</i>	<i>Co-Directeur de thèse</i>

Travaux réalisés sous la direction
du Dr Emmanuel LEMICHEZ et du Pr Raymond RUIMY

Au sein du Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire (C3M)
Laboratoire Toxines Bactériennes dans la relation hôte-pathogènes,

UMR INSERM U1065/UNS, Bâtiment ARCHIMED

151 route Saint Antoine de Ginestière BP 2 3194 06204 NICE



Travaux financés par la Fondation pour la Recherche Médicale (FRM)



Poste de Thèse pour Internes et Assistants

FRM : FDM20150632804 (R. Lotte)

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury qui m'ont fait l'honneur de juger mon travail de thèse. Merci au Docteur Ivo Gomperts-Boneca et au Professeur Éric Oswald d'avoir accepté d'être mes rapporteurs et d'avoir consacré du temps à évaluer mon travail de thèse. Soyez assurés de ma sincère reconnaissance. Merci au Professeur Florence Fenollar qui m'a fait l'honneur de présider ce jury de thèse. Recevez ma respectueuse considération.

Je remercie le Dr Emmanuel Lemichez pour m'avoir accueilli dans son laboratoire. Merci d'avoir encadré et dirigé mon travail de thèse et de m'avoir transmis ta passion pour la microbiologie cellulaire tout au long de ces quatre années (master II et thèse).

Je remercie également le Professeur Raymond Ruimy. Merci d'avoir co-encadré ma thèse et de soutenir ma carrière hospitalo-universitaire à ses débuts. Je vous remercie également pour me transmettre votre curiosité scientifique, votre enthousiasme communicatif et votre persévérance au travail.

Un grand merci également à toute l'équipe 6 du C3M. Travailler à vos côtés a été une chance pour moi. Je vous remercie tous de m'avoir soutenu tout au long de ma thèse et de m'avoir supporté au quotidien. Anne : je te remercie sincèrement pour toute l'aide dans la réalisation de mes expériences, pour ta patience, ta rigueur et ta gentillesse. Orane : tu es dynamique, drôle, et tu as toujours été disponible pour répondre à mes questions. Merci., Je te souhaite beaucoup de bonheur et de réussite professionnelle. Amel : merci pour les longues discussions qui ont fait avancer nos projets. Laurent : je te remercie pour ta clairvoyance, ton humour et ta disponibilité au quotidien. Patrick : t'es le meilleur ! Rien à dire de plus si ce n'est : Merci ! Gregory je te remercie pour ta disponibilité et ton aide au cours de ma thèse. Je remercie également tous les étudiants qui m'ont accompagné durant ces quatre années. Daniel tu es devenu un ami, j'espère que nos chemins se croiseront à nouveau. Je te souhaite beaucoup de réussite. Maria bonne continuation et merci à ma voisine de bureau. Elsa, Aurélie, Océane.

Emilie, je te remercie sincèrement pour m'avoir formé à la paillasse pendant mon master. Cela m'a permis de poursuivre ce travail de thèse que nous avons initié ensemble.

Merci à l'ensemble du personnel du C3M pour nous permettre de réaliser nos travaux de recherche.

Je tiens à remercier également mes collègues du laboratoire de bactériologie : Alice, Estelle et Nicolas. Il me tarde de travailler de nouveau à vos côtés.

Je remercie ma famille qui me soutient depuis le début de mes études « à rallonge ». Merci à mes parents, sans vous je n'aurais pas pu en arriver là. Merci du fond du cœur de m'avoir donné les moyens de réaliser mes objectifs. Je vous aime. Merci à ma sœur Laurène pour sa présence et son aide. Merci à mon fils Antoine, tu es mon rayon de soleil ☺.

Résumé

La GTPase Rac1 est une protéine de signalisation intracellulaire qui régule l'organisation du cytosquelette d'actine et l'expression génique. Elle joue ainsi un rôle clé dans l'adhésion, la migration et la prolifération cellulaire. Rac1 est aussi impliquée dans la phagocytose, la production d'espèces réactives de l'oxygène et la réponse inflammatoire et participe ainsi au contrôle des défenses de l'hôte contre les agents pathogènes. Rac1 est une cible privilégiée de nombreuses toxines de bactéries pathogènes pour l'homme. Notre laboratoire s'intéresse notamment à la toxine CNF1, produite par les *Escherichia coli* pathogènes, qui catalyse l'activation de la GTPase Rac1. Nos études sur CNF1 ont permis de mettre en évidence une régulation par ubiquitylation de la forme active de Rac1. Nous avons également identifié le rôle crucial de la E3 ubiquitine-ligase HACE1, un suppresseur de tumeur avéré, dans l'ubiquitylation de Rac1 actif. Par ailleurs, de études récentes ont montré que certaines souches d'*E. coli* sont associées à des polypes coliques pré-cancéreux et que la diminution d'expression de *hace1* favorise la survenue de cancers colorectaux. S'il est prouvé que la forme activée de Rac1 est une cible majeure de HACE1, le mode d'interaction de ces deux protéines reste à définir ainsi que le rôle de ces interactions dans l'infection et le cancer. L'objectif de mon travail de thèse a été de caractériser les interactions moléculaires entre HACE1 et Rac1.

Dans un premier travail, nous avons testé l'hypothèse que des mutations ponctuelles d'HACE1 identifiées dans les cancers pourraient interférer avec son interaction avec Rac1 et sa capacité de contrôle de la croissance cellulaire. C'est ainsi que j'ai pu mettre en évidence que 13 mutations somatiques d'HACE1 issues de tumeurs séquencées altèrent sa fonction de contrôle de la croissance cellulaire. De plus, l'étude de ces mutations nous a permis d'identifier un groupe d'acides aminés, situés sur les ankyrin-repeats 5 à 7 d'HACE1, qui contrôle l'interaction d'HACE1 avec Rac1 et de ce fait son ubiquitylation. Enfin dans cette étude nous précisons le rôle du domaine intermédiaire d'HACE1 (MID) dans la spécificité d'interaction de la ligase avec la forme active de Rac1.

Nous poursuivons l'étude de l'interférence de HACE1 sur la croissance cellulaire médiée par des mutations ponctuelles de Rac1 associées au cancer et par le mutant Rac1 Q61E mimant l'effet de la toxine CNF1.

In fine, la caractérisation de mutants d'interaction entre HACE1 et Rac1 ainsi que l'effet de la toxine CNF1 sur cet axe de signalisation doit nous renseigner sur l'importance de cette voie de régulation non seulement dans le cancer mais aussi dans l'infection.

Préambule

Je suis médecin bactériologiste de formation et j'ai effectué mon travail de thèse au sein du laboratoire « toxines microbiennes dans la relation hôte-pathogènes » (équipe 6-INSERM U1065) sous la direction du Dr Emmanuel Lemichez. La thématique de recherche de ce laboratoire a pour but de comprendre les facteurs déterminants des relations entre les pathogènes et leur hôte. A l'heure de la médecine personnalisée, une meilleure connaissance de ces interactions à l'échelle moléculaire, nourrit l'espoir de réaliser des avancées médico-scientifiques en infectiologie avec des retombées en oncologie.

Les études menées préalablement à mon travail au sein du laboratoire, ont permis de découvrir que la toxine CNF1 (Cytotoxic Necrotizing Factor 1) produite par certaines souches d'*Escherichia coli* pathogènes entraînent l'activation de la Rho GTPase Rac1 suivi de sa dégradation par le protéasome 26S. Cette GTPase a une activité pro-oncogénique établie. Plus récemment, nous avons découvert un nouveau mode de régulation de Rac1 faisant intervenir la E3-ubiquitine ligase HACE1, un suppresseur de tumeur avéré. En effet, nous avons démontré qu'HACE1 est responsable de l'ubiquitylation *in vivo* et *in vitro* de Rac1 sous sa forme liée au GTP. Rac1 était alors la première cible identifiée de l'activité ubiquitine ligase d'HACE1. A ce stade, les interactions entre la protéine oncogénique Rac1 et le suppresseur de tumeur HACE1 étaient mal connues. L'objectif de mon travail de thèse a été de caractériser les interactions moléculaires entre HACE1 et Rac1.

Par souci de clarté et pour mieux comprendre les objectifs et débouchés potentiels de mon travail de thèse j'ai divisé mon introduction en quatre grand chapitres :

- 1) Le premier chapitre détaille les connaissances actuelles concernant la bactérie *E. coli* très étudiée au laboratoire. Cette partie s'attache à décrire dans quelle mesure les avancées technologiques récentes ont permis de mieux comprendre le rôle des « facteurs de virulence » de cette bactérie non seulement dans la pathologie infectieuse mais également en cancérologie.
- 2) Le second chapitre apporte les éléments nécessaires à la compréhension du rôle clé des GTPases Rho, notamment de Rac1 notre protéine d'intérêt, dans les processus fondamentaux de biologie cellulaire. Il explique également comment la dérégulation de Rac1, favorisée en outre par des toxines bactériennes, peut entraîner des perturbations biologiques variées favorisant le développement tumoral.
- 3) Le troisième chapitre décrit les connaissances acquises sur la toxine CNF1 produite par certaines souches d'*E. coli*, et notamment son rôle dans la régulation de la GTPase Rac1.
- 4) Enfin la dernière partie de l'introduction apporte les connaissances essentielles sur les E3 ubiquitine-ligases et en particulier HACE1, et sa fonction de suppresseur de tumeur.

Dans la suite du manuscrit, je présente les objectifs de mon travail de thèse, les résultats publiés (1^{er} article de recherche), et discute les résultats en cours et les perspectives qu'ils offrent

Tables des matières

Abréviations	4
Tables des figures	6
Introduction	9
I. <i>Escherichia coli</i>	9
I.1 Taxonomie et phylogénie.....	9
I.1.1 Caractères généraux de l'espèce <i>Escherichia coli</i>	9
I.1.2 Les groupes phylogénétiques de <i>Escherichia coli</i>	9
I.2. Les facteurs de virulence de <i>Escherichia coli</i>	12
I.2.1 Les facteurs de colonisation : adhésines et facteurs d'invasion.....	12
I.2.2 Molécules de surface endotoxiques : lipopolysaccharide (LPS) bactérien et flagelline	12
I.2.3 Les systèmes de transport du fer	13
I.2.4 Les exotoxines et leurs systèmes de transport/sécrétion	13
I.2.4.1 Les toxines et protéines effectrices	13
I.2.4.1.1 Les entérotoxines	13
I.2.4.1.2 Les cyclomodulines.....	14
I.2.4.1.3 Les génotoxines	16
I.2.4.2 Les systèmes de transport et de sécrétion.....	17
I.3. Implications des <i>Escherichia coli</i> en pathologie humaine	18
I.3.1 <i>Escherichia coli</i> et pathologies infectieuses	18
I.3.1.1 Les <i>Escherichia coli</i> pathogènes extra-intestinaux (ExPEC).....	19
I.3.1.1.1 Les <i>Escherichia coli</i> uropathogènes (UPEC)	19
I.3.1.1.2 Les <i>Escherichia coli</i> responsables de méningites néo-natales (NMEC)	20
I.3.1.1.3 Les <i>Escherichia coli</i> pathogènes aviaires (APEC)	21
I.3.1.2 Les <i>Escherichia coli</i> pathogènes intestinaux (IntEC).....	21
I.3.1.2.1 Les <i>Escherichia coli</i> entéropathogènes (EPEC)	21
I.3.1.2.2 Les <i>Escherichia coli</i> entéro-hémorragiques (EHEC)	22
I.3.1.2.3 Les <i>Escherichia coli</i> entéro-toxinogènes (ETEC).....	23
I.3.1.2.4 Les <i>Escherichia coli</i> entéro-invasifs (EIEC) et <i>Shigella spp</i>	25
I.3.1.2.5 Les <i>Escherichia coli</i> entéro-aggrégatifs (EAEC)	26
I.3.1.2.5 Les <i>Escherichia coli</i> à adhésion diffuse (DAEC)	27
I.3.2 Rôle émergent d' <i>Escherichia coli</i> en pathologie humaine	28
I.3.2.1 <i>E. coli</i> et Maladies Inflammatoires Coliques de l'Intestin (MICI)	28

I.3.2.2 <i>E. coli</i> , microbiote intestinal et cancer colo-rectal	29
I.3.2.2.1 Le cancer colorectal : épidémiologie et facteurs de risque.....	29
I.3.2.2.2 Le rôle du microbiote intestinal dans le développement du cancer colo-rectal	30
I.3.2.2.3 Le rôle d' <i>E.coli</i> dans le cancer colo-rectal.....	33
II. Les GTPases de la famille Rho.....	35
II.1 La superfamille Ras de GTPases	35
II.2 La famille des Rho GTPases.....	36
II.3 Régulation des Rho GTPases.....	36
II.3.1 Le Cycle GTP/GDP	36
II.3.2 Régulation spatiale et temporelle	37
II.4. Modifications post-traductionnelles des GTPases Rho induites par des toxines bactériennes...	39
II.4.1 Les toxines inhibitrices des RhoGTPases.....	39
II.4.2 Les toxines activatrices des RhoGTPases	40
II.5 Rac1 : une Rho GTPases essentielle.....	42
II.5.1 Rac1 a un rôle crucial dans la biologie de la cellule	42
II.5.1.1 Rac1 régule la polymérisation de l'actine et contrôle la migration cellulaire	42
II.5.1.2 Rac1 régule l'expression de cytokines inflammatoires et contrôle l'immunité	44
II.5.1.3 Rac1 contrôle l'expression de la cycline D1 et régule le cycle cellulaire	44
II.5.2 Rôle de Rac1 dans la tumorigénèse	46
III. La toxine CNF1 d'<i>Escherichia coli</i>	48
III.1 Découverte de CNF1 et homologues de CNF1	48
III.2 Support génétique et contrôle transcriptionnel du gène <i>cnf1</i>	48
III.3 Relation structure-fonction de CNF1 : toxine A/B-like.....	50
III.4 Effet de CNF1 sur la biologie cellulaire	52
III.4.1 CNF1 et inflammation.....	52
III.4.2 CNF1 entraîne l'inhibition de la cytodérèse et favorise la progression du cycle cellulaire	53
III.4.3 CNF1 et remodelage du cytosquelette d'actine	53
III.5 Régulation de la GTPase Rac1 par la toxine CNF1.....	54
III.5.1 Activation de Rac1 par déamidation	54
III.5.2 Contrôle de Rac1 par ubiquitylation et dégradation protéasomale	54
III.6 HACE1 contrôle l'activation de Rac1 induite par la toxine CNF1.....	54
IV. HECT Domain and Ankyrin repeat containing E3 ubiquitin protein ligase1:	
HACE1	56
IV.1 L'ubiquitylation	56

IV.1.1 La molécule d'ubiquitine	56
IV.1.2 La réaction d'ubiquitylation	58
IV.1.3 Les différents types d'ubiquitylation	59
IV.1.3.1 La mono-ubiquitylation et la multi-ubiquitylation	59
IV.1.3.1 La poly-ubiquitylation	59
IV.1.4 La voie-ubiquitine protéasome	61
IV.1.5 Les E3 ubiquitine-ligases	61
IV.1.4.1 Les E3 ubiquitine ligases d'origine eucaryote	62
IV.1.4.1.1 Les E3 ligases à domaine RING	62
IV.1.4.1.2 Les E3 ligases à domaine RBR	63
IV.1.4.1.3 Les E3 ligases à domaine HECT	64
IV.1.4.2 Les E3 ubiquitine ligases d'origine procaryote.....	66
IV.2 HACE1 et la régulation de la stabilité de Rac1	67
IV.2.1 HACE1 : une E3 ubiquitine ligase à domaine HECT	67
IV.2.2 HACE1 : un suppresseur de tumeur majeur	68
IV.2.2.1 Découverte de la fonction suppresseur de tumeur de la protéine HACE1	68
IV.2.2.2 Rac1, première cible identifiée de la E3 ubiquitine ligase HACE1	69
IV.2.2.3 Autres cibles identifiées de la E3 ubiquitine ligase HACE1	70
Objectifs de la thèse	73
Résultats et discussion.....	76
I. Article de recherche: « Identification of cancer associated mutations in <i>hace1</i> that impair cell growth control and Rac1 ubiquitylation »	76
II. Résultats et Discussion de l'article de recherche publié	77
II.1 HACE1 et le contrôle de la croissance cellulaire : impact de mutations ponctuelles d' <i>hace1</i> retrouvées dans le cancer sur la croissance cellulaire ?	77
II.2 Lien entre les mutations ponctuelles d' <i>hace1</i> du cancer et son activité E3 ubiquitine-ligase sur Rac1 dans la perte de contrôle de croissance cellulaire?	79
II.3 Analyse de l'interaction HACE1 et Rac1	81
II.4 Discussion générale	82
Conclusion et perspectives.....	85
Références bibliographiques.....	89
Annexes.....	109

Abréviations

AJ:	<u>A</u> dherens <u>J</u> unctions
CCR:	<u>C</u> ancer <u>C</u> olo- <u>R</u> ectal
Cdc42:	<u>C</u> ell <u>d</u> ivision <u>c</u> ontrol protein <u>42</u> homolog
Cdt:	<u>C</u> ytolethal <u>d</u> istending <u>t</u> oxin
Cif:	Cycle- <u>i</u> nhibiting <u>f</u> actor
CNF1:	<u>C</u> ytotoxic <u>N</u> ecrotizing <u>F</u> actor <u>1</u>
DUBs:	<u>D</u> e <u>U</u> biquitinating enzymes
EGF:	<u>E</u> pidermal <u>G</u> rowth <u>F</u> actor
ERO:	<u>E</u> spèces <u>R</u> éactives de l' <u>O</u> xygène
GAP:	<u>G</u> TPase <u>A</u> ctivating <u>P</u> rotein
GDF:	<u>G</u> DI <u>D</u> isplacement <u>F</u> actor
GDP:	<u>G</u> uanosine <u>D</u> i- <u>P</u> hosphate
GEF:	<u>G</u> uanine nucleotide <u>E</u> xchange <u>F</u> actor
GTP:	<u>G</u> uanosine <u>T</u> ri- <u>P</u> hosphate
HACE1:	<u>H</u> ECT-domain and <u>A</u> nkyrin-repeat <u>C</u> ontaining <u>E</u> 3 ubiquitin protein ligase <u>1</u>
HECT:	<u>H</u> omologous to <u>E</u> 6AP <u>C</u> arboxyl- <u>T</u> erminus
HGF:	<u>H</u> epatocyte <u>G</u> rowth <u>F</u> actor
IKK β :	<u>I</u> kappaB <u>K</u> inase <u>B</u> eta
JNK:	c- <u>J</u> un <u>N</u> -terminal <u>K</u> inase
LIMK:	<u>L</u> IM-motif containing <u>K</u> inase
MAPK:	<u>M</u> itogen- <u>A</u> ctivated <u>P</u> rotein <u>K</u> inase
MICI:	<u>M</u> aladies <u>I</u> nflammatoires <u>C</u> hroniques de l' <u>I</u> ntestin
NADPH:	<u>N</u> icotinamide <u>A</u> denine <u>D</u> inucleotide <u>P</u> Hosphate
Nedd8:	<u>N</u> eural precursor cell- <u>e</u> xpressed, <u>d</u> evelopmentally <u>d</u> ownregulated <u>8</u>
NEMO:	<u>N</u> F- κ B <u>E</u> ssential <u>M</u> Odulator
NF- κ B:	<u>N</u> uclear <u>F</u> actor <u>k</u> appa <u>B</u>
PAK:	<u>P</u> 21- <u>A</u> ctivated <u>K</u> inase
PKA:	<u>P</u> rotein <u>K</u> inase <u>A</u>
PTM:	<u>P</u> ost- <u>T</u> ranslational <u>M</u> odifications
Rac:	<u>R</u> as-related <u>C</u> 3 botulinum toxin substrate
RBR:	<u>R</u> ing <u>B</u> etween <u>R</u> ing
Rho:	<u>R</u> as <u>h</u> omolog
RhoGDI:	<u>R</u> ho <u>G</u> DP <u>D</u> issociation <u>I</u> nhibitor

RING:	<u>R</u> eally <u>I</u> nteresting <u>N</u> ew <u>G</u> ene
SGK1:	<u>S</u> erum and <u>G</u> lucocorticoid related <u>K</u> inase 1
Smurf:	<u>S</u> mad <u>u</u> biquitination- <u>r</u> elated <u>f</u> actor
βAR:	<u>β</u> - <u>A</u> dernergic <u>R</u> eceptor
Syn5:	<u>S</u> yntaxin <u>5</u>
TGFβ:	<u>T</u> ransforming <u>G</u> rowth <u>F</u> actor beta
TNF:	<u>T</u> umor <u>N</u> ecrosis <u>F</u> actor
TNFR1:	<u>T</u> NF <u>R</u> eceptor <u>1</u>
TRAF:	<u>T</u> NFR <u>A</u> ssociated <u>F</u> actor
UBD:	<u>U</u> biquitin <u>B</u> inding <u>D</u> omain
UPS:	<u>U</u> biquitin <u>P</u> roteasome <u>S</u> ystem
WASP:	<u>W</u> iskott- <u>A</u> ldrich <u>S</u> yndrome <u>P</u> rotein
WAVE:	<u>W</u> AVE-family <u>V</u> Erprolin homologous protein

Tables des figures

Figure 1 : Diversité phylogénétique des bactéries de l'espèce <i>Escherichia coli</i>	11
Figure 2 : Effet des quatre cyclomodulines produites par <i>E. coli</i> sur le cycle cellulaire.....	15
Figure 3 : Réponse cellulaire aux cassures double brin de l'ADN induites par la colibactine	17
Figure 4 : Les différents « pathovars » de <i>Escherichia coli</i>	18
Figure 5 : Mécanismes physiopathologiques de l'infection par les UPEC	20
Figure 6 : Mécanismes physiopathologiques de l'infection par les NMEC	21
Figure 7 : Mécanismes physiopathologiques de l'infection par les EPEC et les EHEC.....	23
Figure 8 : Mécanismes physiopathologiques de l'infection par les ETEC.....	24
Figure 9 : Mécanismes physiopathologiques de l'infection par les EIEC.....	25
Figure 10 : Mécanismes physiopathologiques de l'infection par les EAEC.....	26
Figure 11 : Mécanismes physiopathologiques de l'infection par les DAEC.....	27
Figure 12 : Développement du cancer colorectal : de la cellule épithéliale à l'adénocarcinome invasif...31	
Figure 13 : Interactions entre les facteurs de risques génétiques et environnementaux du CCR et l'axe « microbiote intestinal-inflammation chronique-cancer »	31
Figure 14 : Principales bactéries associées au cancer colorectal (CCR) et mécanismes moléculaires mis en jeu.....	32
Figure 15 : Dendrogramme de la superfamille Ras des GTPases.....	35
Figure 16 : Schéma représentant la régulation spatio-temporelle des RhoGTPases.....	38
Figure 17 : Toxines bactériennes ciblant les étapes clés du cycle d'activation des Rho GTPases	41
Figure 18 : Rôle clé de Rac1 dans la régulation du cytosquelette d'actine et du contrôle de la migration cellulaire	42
Figure 19 : Rac1 contrôle l'expression de la cycline D1 au niveau traductionnel.....	46
Figure 20 : L'implication de Rac1 dans les phases différentes phases de la tumorigénèse.....	47
Figure 21 : Organisation génétique de la région <i>hlyCABD-cnfl</i>	49

Figure 22 : Schéma représentant les trois domaines fonctionnels de la toxine CNF1.....	51
Figure 23 : Endocytose de la toxine CNF1 et translocation du domaine catalytique dans le cytosol de la cellule cible.....	51
Figure 24 : Représentation schématique de l'axe de régulation CNF1-Rac1-HACE1.....	55
Figure 25 : Représentation tridimensionnelle de l'ubiquitine avec ses 7 lysines et la méthionine M1...57	
Figure 26 : Représentation de la surface de l'ubiquitine et des site de reconnaissances.....	57
Figure 27 : Représentation schématique des trois étapes clés de la réaction d'ubiquitylation	58
Figure 28 : Devenir des substrats dans la cellule selon le type d'ubiquitylation	60
Figure 29 : Représentation de la structure tridimensionnelle du protéasome 26S.....	61
Figure 30 : Représentation de la réaction catalysée par les trois classes d'E3 ubiquitine-ligases.....	62
Figure 31 : Représentation du cycle catalytique des E3 ubiquitine-ligases à domaine HECT	65
Figure 32 : Les différents types de E3 ubiquitine-ligases à domaine HECT retrouvées chez l'homme	66
Figure 33 : Représentation schématique des trois domaines fonctionnels d'HACE1	68
Figure 34 : Modélisation tridimensionnelle du domaine ANK d'HACE1	79
Figure 35 : Modélisation tridimensionnelle des répétitions de type ankyrine 5, 6 et 7.....	81

INTRODUCTION

Introduction

I. *Escherichia coli*

I.1 Taxonomie et phylogénie

I.1.1 Caractères généraux de l'espèce *Escherichia coli*

Escherichia coli est un bacille Gram négatif, aéro-anaérobie facultatif appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae*. C'est l'entérobactérie la plus souvent isolée à l'état commensal dans le microbiote intestinal de l'homme et des animaux homéothermes. Cependant, certaines souches peuvent être pathogènes pour l'homme et sont le plus souvent responsables d'infections. Ces infections sont de deux types, soit des infections intestinales, soit des infections extra-intestinales (Croxen and Finlay, 2010; Kaper et al., 2004). L'implication de *E. coli* en pathologie infectieuse qui est largement étudiée, est détaillée dans le paragraphe I.3.1. Par ailleurs, le rôle émergent de certaines souches d'*E. coli* dans des pathologies humaines chroniques telles que les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) et certains types de cancer colorectaux (CCR) est discuté dans le paragraphe I.3.2.

I.1.2 Les groupes phylogénétiques de *Escherichia coli*

L'organisation chromosomique entre les bactéries proches est globalement conservée mais il existe une grande variabilité génomique entre des bactéries d'une même espèce. Toutes les bactéries peuvent évoluer par gain ou perte de matériel génétique et transmettre ces modifications verticalement aux générations suivantes. Quelques bactéries peuvent également acquérir des informations génétiques par trois mécanismes distincts : la transformation qui est un transfert de plasmide, la transduction impliquant un bactériophage, et la conjugaison grâce aux *pili* sexuels. Cette acquisition de gènes, provenant d'une autre bactérie ou de l'environnement, est appelée transfert horizontal de gènes. Ainsi, le chromosome des bactéries est constitué de deux groupes de gènes différents : le squelette génomique (« backbone » ou « core-genome ») et les gènes flexibles acquis. L'ensemble des deux constitue « le pangénome ».

Les bactéries appartenant à l'espèce *E. coli* se caractérisent par une organisation fortement clonale mais possèdent cependant une grande variabilité génétique entre les souches (Tenaillon et al., 2010; Touchon et al., 2009). A la fin des années 1980, le développement de l'analyse par électrophorèse enzymatique de plusieurs locus a permis d'identifier au sein d'une collection de souches représentatives de la diversité des souches de l'espèce « collection ECOR », 4 principaux groupes phylogénétiques bien distincts (A, B1, D et B2) et un groupe E ayant peu de représentants (Herzer et al., 1990; Selander et al., 1986a; 1986b). A la fin des années 1990, l'avènement des techniques de séquençage de l'ADN

appliquées à l'analyse par *Multilocus Sequence Typing* (MLST) ont permis de retrouver, en sus des 4 groupes, deux nouveaux groupes : les groupes C et F (Clermont et al., 2011; Jaureguy et al., 2008; Moissenet et al., 2010). Plus récemment, le séquençage complet de plusieurs génomes d'*E. coli* a confirmé l'existence du groupe E (incluant certaines souches du sérotype O157 : H7) (Tenaillon et al., 2010). L'analyse des génomes de plusieurs souches a également permis d'estimer que le core-genome d'*E. coli* est composé de moins de 2000 gènes alors que le pangénome est évalué à 17 838 gènes dont 11 432 gènes ont moins de 80% de similarité. Si les éléments de séquences d'insertion et de prophages sont exclus, le pangénome reste encore élevé et atteint 10 131 gènes (Tenaillon et al., 2010). Ces gènes sont impliqués dans des phénomènes d'adaptation à des niches écologiques très diverses. Actuellement, il est admis que l'espèce *E. coli sensu stricto* est constituée de 7 groupes phylogénétiques (A, B1, B2, C, D, E, F). Récemment, de nouvelles souches environnementales très divergentes par MLST mais phénotypiquement non distinguables d'*E. coli*, ont été regroupées dans 5 clades (Walk et al., 2009). Le clade I est à la racine de l'arbre phylogénétique des 7 groupes d'*E. coli* (Clermont et al., 2013) (Figure 1). De façon intéressante, l'analyse phylogénétique des souches d'*E. coli* a permis d'émettre l'hypothèse que le groupe B2 est le plus ancien suivi du groupe D et des groupes A et B1 qui sont très proches et plus récents (Escobar-Páramo et al., 2004a). En pratique, le groupage des souches d'*E. coli* en (A, B1, D, B2) a été facilité par une PCR triplex permettant la détection de 2 gènes essentiels *chuA* et *yjaA* et d'un fragment d'ADN appelé TspE4C2 (Clermont et al., 2000). Une mise au point récente d'une PCR quadruplex et de trois PCR monoplex permet de grouper de manière fiable les souches d'*E. coli* aux 7 groupes phylogénétiques et à la lignée cryptique *E. coli* clade I (Clermont et al., 2013). D'un point de vue clinique, les souches à l'origine d'infection extra-intestinales (ExPEC) font partie majoritairement du groupe B2 et parfois du groupe D. Elles portent le plus souvent des gènes de virulence. Les souches pathogènes intestinales appartiennent le plus souvent aux groupes A et B1. (Escobar-Páramo et al., 2004a; Picard et al., 1999).

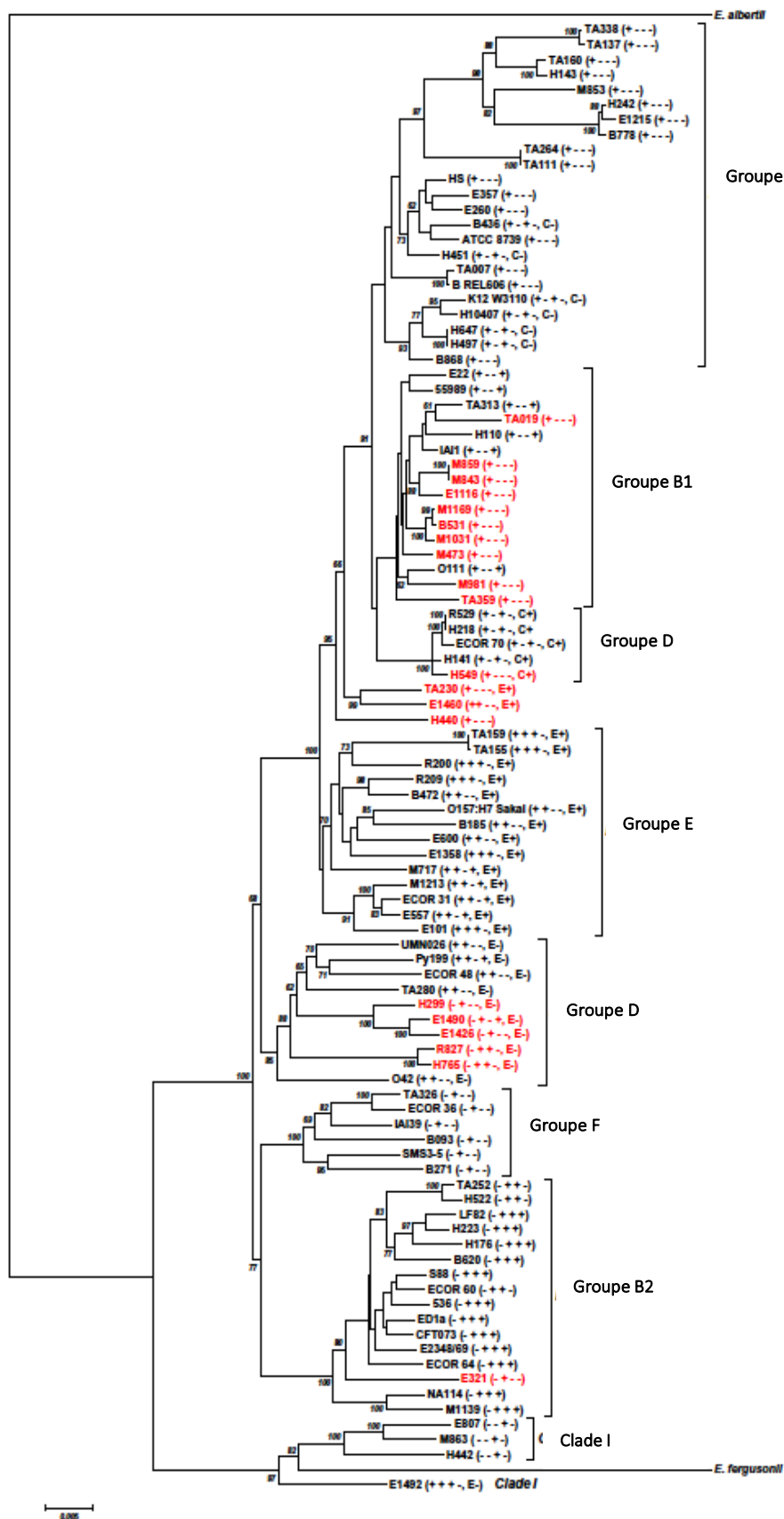


Figure 1 : Diversité phylogénétique des bactéries de l'espèce *Escherichia coli*.

Arbre phylogénétique représentant la diversité phylogénétique de *E. coli*. Les 7 groupes phylogénétiques de *E. coli* ainsi que la lignée cryptique *E. coli* clade I sont positionnés sur l'arbre. D'après Clermont *et al.*, 2013.

1.2. Les facteurs de virulence de *Escherichia coli*

Un facteur de virulence est une molécule produite par un agent infectieux et qui contribue au caractère pathogène - à la virulence - de cet agent vis-à-vis d'un hôte donné. Certaines souches d' *E. coli* sont capables de produire divers facteurs de virulence qui leur permettent de coloniser les tissus, capter le fer et d'échapper aux mécanismes de défenses de l'hôte, ou de les neutraliser, et ainsi, de favoriser l'infection et d'envahir les tissus (Kaper et al., 2004). Un rôle émergent de certains facteurs de virulence bactériens dans les pathologies inflammatoires coliques chroniques et les pathologies cancéreuses est également à prendre en considération.

1.2.1 Les facteurs de colonisation : adhésines et facteurs d'invasion

Certaines souches d'*E.coli* pathogènes possèdent à leur surface des facteurs d'adhésion ou « adhésines » qui leur permettent de coloniser des sites inhabituels dans lesquels la bactérie ne réside pas à l'état commensal, comme par exemple l'intestin grêle ou l'urètre. Les facteurs d'adhésion les plus fréquents forment des structures appendiculaires individualisées à la surface des bactéries appelées *fimbriae* (ou *pili*) ou *fibrillae*. Les *fimbriae* (5-10 nm de diamètre) et les *fibrillae* (2-4 nm de diamètre) permettent l'attachement à l'épithélium. Certaines adhésines ne forment pas ces structures et sont nommées Afa (afimbrial adhesins). D'autres molécules intra-membranaires induisent des signaux intracellulaires variés favorisant l'invasion de l'épithélium (Kaper et al., 2004). Par exemple la molécule IcsA (VirG) à la surface des *E. coli* entéro-invasifs (EIEC) et *Shigella spp.* induit la nucléation de l'actine G et la formation d'une comète d'actine à un pôle de la bactérie lui permettant de se déplacer dans le cytoplasme de la cellule hôte puis d'envahir les cellules adjacentes (Goldberg and Theriot, 1995).

1.2.2 Molécules de surface endotoxiques : lipopolysaccharide (LPS) bactérien et flagelline

De façon intéressante, des molécules de surface endotoxiques présentes sur les souches d' *E.coli* pathogènes ou commensales sont capables d'induire des signaux intracellulaires à l'origine d'une réponse de l'hôte inadaptée (Kaper et al., 2004). Par exemple, le lipopolysaccharide (LPS) en se fixant au Toll-like récepteur 4 (TLR4), *via* le co-récepteur MD2, entraîne une réponse cytokinique pouvant aboutir à des chocs septiques parfois mortels (Tapping et al., 2000). La flagelline, principal composant des flagelles, est reconnue par le TLR-5 ce qui induit une forte réponse inflammatoire orchestrée par l'interleukine (IL)-8 (Hayashi et al., 2001a).

I.2.3 Les systèmes de transport du fer

Le fer est indispensable au développement des organismes. Les sidérophores, molécules permettant la capture du fer, sont des composés sécrétés par les bactéries, les champignons et les plantes (Hider and Kong, 2010). Chez les vertébrés, le fer est en grande partie lié à des macromolécules. Lorsque les bactéries sont en contact avec leur hôte, les sidérophores sécrétés par les bactéries entrent en compétition avec les macromolécules eucaryotes pour la chélation du fer et les complexes fer/sidérophores sont ensuite absorbés à l'aide de récepteurs spécifiques par les bactéries (Fischbach et al., 2006; Neilands, 1995).

Toutes les souches d' *E. coli* produisent un sidérophore primaire, l'entérobactine. Les mammifères ont développé une parade pour bloquer l'acquisition du fer par ce sidérophore, dans le cadre de leur réponse immunitaire innée. La lipocaline 2, ou sidérocaltine, sécrétée par les macrophages et les hépatocytes lors d'une infection séquestre l'entérobactine, empêchant l'acquisition du fer par *E. coli*. (Flo et al., 2004).

Certaines souches pathogènes d'*E. coli* sécrètent des sidérophores secondaires, considérés comme des facteurs de virulence comme la yersiniabactine, l'aérobactine et la salmochéline. Cette dernière est une entérobactine glycosylée échappant à la séquestration par la lipocaline (Fischbach et al., 2006). L'aérobactine est un système de captation efficace du fer permettant aux bactéries qui le possèdent de survivre en présence de faibles concentrations en fer et même de se multiplier dans des milieux tels que le sang ou l'arbre urinaire (Johnson et al., 1988). Chez *E. coli*, la synthèse de ce sidérophore est régie par les gènes *iuc* (iron uptake chelate) A, B, C, D et E (Carbonetti et al., 1986). L'aérobactine fixe des ions Fe^{3+} qu'elle libère après fixation sur un récepteur de la membrane externe de la bactérie. Elle est ensuite recyclée et le fer gagne la membrane cytoplasmique par un système de transport actif encore mal connu (Carbonetti and Williams, 1984; Carbonetti et al., 1986).

I.2.4 Les exotoxines et leurs systèmes de transport/sécrétion

I.2.4.1 Les toxines et protéines effectrices

Un grand nombre d'exotoxines et d'autres protéines effectrices produites par les *E. coli* pathogènes ciblent et dérèglent différentes voies de signalisation clés de la cellule hôte, et contribuent ainsi à la virulence des souches (Kaper et al., 2004). Quelques exemples d'exotoxines d'*E. coli* sont développés et classés en fonction de leurs effets sur la biologie de l'hôte.

I.2.4.1.1 Les entérotoxines

De nombreuses souches d'*E. coli* pathogènes produisent des toxines capables de provoquer des diarrhées lors de leur diffusion dans le tube digestif. Ces toxines sont appelées entérotoxines (Kaper et al., 2004).

Certaines toxines de type A-B : Heat-labile enterotoxin (LT), Heat-stable enterotoxin a et b (STa et STb) sont synthétisées par les souches d'*E. coli* entero-toxinogènes (ETEC) et induisent une dérégulation des concentrations de messagers intracellulaires comme l'AMP cyclique ou le GMP. Il en résulte une sécrétion ionique responsable de diarrhées aqueuses chez les patients infectés par ces souches (Croxen and Finlay, 2010) (cf paragraphe I.3.1.2.3). La Shiga toxine (Stx) est le facteur de virulence clé des souches d'*E. coli* entéro-hémorragiques (EHEC). Cette toxine excise une adénine spécifique de l'ARN ribosomal 28S ce qui induit une dérégulation de la synthèse protéique et la mort des cellules épithéliales intoxiquées. Cette toxine peut diffuser dans l'organisme par voie sanguine et agir ainsi à distance du foyer infectieux notamment sur les cellules rénales et être responsable d'un syndrome hémolytique et urémique (SHU) (Kaper et al., 2004) (cf paragraphe I.3.1.2.2).

I.2.4.1.2 Les cyclomodulines

Une cyclomoduline est une toxine qui induit une modification du cycle cellulaire de la cellule cible. A ce jour on dénombre quatre principales cyclomodulines produites par *E. coli* : le facteur cytotoxique nécrosant ou toxine CNF1 (Cytotoxic Necrotizing Factor 1) qui est une toxine activatrice du cycle, le facteur Cif (Cycle-inhibiting factor), la toxine Cdt (Cytolethal distending toxin), et la colibactine qui sont des toxines inhibitrices du cycle cellulaire (Oswald et al., 2005) (Figure 2).

La toxine CNF1 produite par certaines souches d'*E. coli* uropathogènes (UPEC) entraîne la déamidation spécifique d'une glutamine présente sur les petites GTPases Rac1, RhoA et Cdc-42 (Flatau et al., 1997). Cette modification post-traductionnelle entraîne l'activation permanente de ces molécules clés de signalisation intracellulaire qui induit notamment un réarrangement du cytosquelette d'actine, une nécrose et une multinucléation cellulaire. Ce dernier phénomène est lié à une inhibition de la cytodierèse par CNF1 dans certaines lignées cellulaires. De plus CNF1 agit comme une cyclomoduline qui favorise la progression du cycle cellulaire. En effet, l'activation permanente de RhoA par CNF1, induit un passage de la phase G1 à la phase S dans les cellules intoxiquées, en induisant l'augmentation de l'expression de cycline D1 (Kaper et al., 2004; Oswald et al., 2005) (cf paragraphe III.4.2).

La cyclomoduline Cif produite par les EPEC et EHEC inhibe la division cellulaire. Cif est une déamidase capable de modifier spécifiquement la glutamine 40 de NEDD8. Cela entraîne une inhibition des Cullin-Ring E3 ubiquitine-ligases ce qui modifie la dégradation des certaines protéines du cycle cellulaire (Cui et al., 2010; Jubelin et al., 2010) (cf paragraphe IV.1.4.1.1). Cif permet la stabilisation des inhibiteurs des cyclines dépendant kinases p21^{WAF1} et p27^{Kip1} ce qui participe à maintenir la protéine Cdk1 (Cyclin dépendant kinase1) dans un état phosphorylé inactif et bloque le passage de la phase G2 à la phase M du cycle (Marchès et al., 2003).

La toxine Cdt est la première toxine bactérienne pour laquelle une activité de blocage du cycle cellulaire a été mise en évidence sur des cellules HeLa (Pérès et al., 1997). La toxine Cdt est une holotoxine

tripartite dont la sous-unité CdtB portant l'activité enzymatique est transloquée dans le noyau de la cellule hôte où elle entraîne des cassures double brin de l'ADN cellulaire. Ces cassures de l'ADN entraînent un signal intracellulaire en cascade qui inhibe la déphosphorylation de Cdk1 et maintien de façon durable les cellules en phase G2 (Comayras et al., 1997).

Enfin, La colibactine découverte récemment par le groupe du Pr Oswald, est la 4^{ème} cyclomoduline d'*E. coli* décrite à ce jour (Nougayrède et al., 2006). Ce composé hybride (cf structure paragraphe I.2.4.1.3) induit directement le cross-linking de l'ADN cellulaire double brin. Ce processus peut perturber la réplication/transcription, induire de multiples machineries de réparation de l'ADN et, en aval du cross-linking, des cassures double brin (Vizcaino and Crawford, 2015). Ces cassures entraînent une activation de la voie ATM-Chk2 qui se traduit par un blocage du cycle cellulaire en phase G2/M.

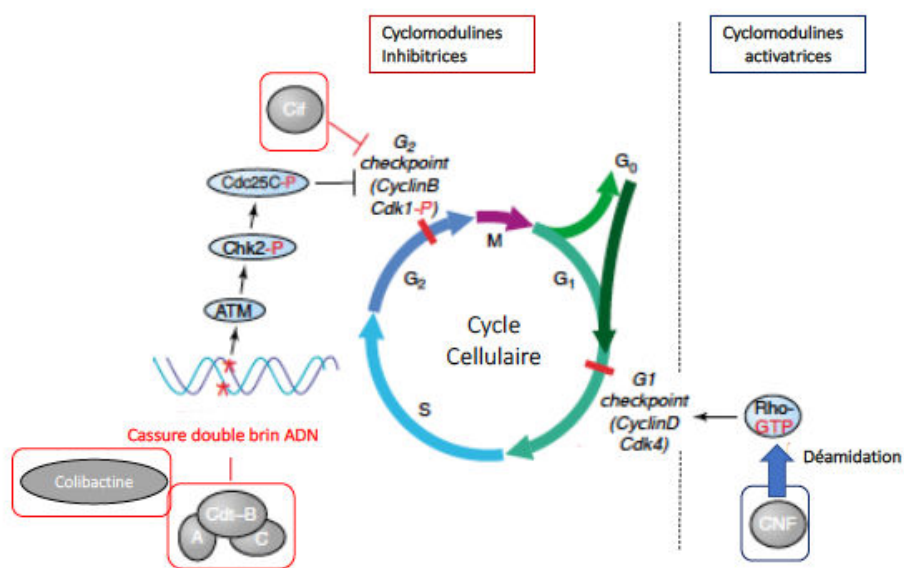


Figure 2 : Effet des quatre cyclomodulines produites par *E. coli* sur le cycle cellulaire.

Le cycle cellulaire se compose de quatre phases successives. La phase G₁ (2n chromosomes) précède la réplication de l'ADN, qui a lieu à la phase S. La phase S est suivie de la phase G₂ (4n chromosomes) qui précède la mitose. Certaines cellules non engagées dans le cycle peuvent entrer dans une phase de quiescence appelée G₀. L'exécution coordonnée de chaque phase est régulée par les couples Cyclines/Cdk (cyclin-dépendant kinase). Il existe des « checkpoint » qui servent de contrôle de sécurité pour empêcher la cellule de passer à la phase suivante en réponse aux lésions cellulaires. CyclinD/Cdk4 contrôle le checkpoint G₁ et CyclinB/Cdk1 le checkpoint G₂. Les cyclomodulines bactériennes sont une famille de facteurs qui désynchronisent la progression du cycle cellulaire. Certaines cyclomodulines de *E. coli* sont « activatrices » et favorisent la prolifération cellulaire tandis que d'autres « inhibitrices » bloquent le cycle. L'exotoxine Cdt transloque sa sous-unité CdtB dans le noyau et induit des dommages à l'ADN. Les dommages causés à l'ADN entraînent une activation de l'ATM, qui phosphoryle Chk2, conduisant à la phosphorylation de Cdc25C. Cela entraîne l'incapacité de Cdc25 d'activer le CyclinB/Cdk1 (Cdk1 reste phosphorylé), ce qui bloque le cycle en G₂. La colibactine induit indirectement des cassures double brin et conduit au blocage de la cellule en phase G₂/M. *E. coli* entéropathogène injecte Cif à l'intérieur de la cellule via un SST3, ce qui entraîne la phosphorylation soutenue de Cdk1 et l'arrêt du cycle en G₂. CNF1 induit la déamidation G63 de la RhoA, entraînant son activation. L'activation de Rho, via la régulation de l'expression des cyclines D, induit la sortie de G₀, passage de G₁ puis entrée en S. D'après Oswald et al., 2005.

I.2.4.1.3 Les génotoxines

Les génotoxines sont des molécules qui ciblent et modifient le matériel génétique de la cellule hôte. La colibactine et Cdt sont les deux génotoxines d'*E. coli* décrites (Kaper et al., 2004).

La Cytolethal distending toxin, de par son activité DNase1, induit des cassures double brin de l'ADN de la cellule hôte (Comayras et al., 1997).

En 2006, Nougayrède *et al.* ont montré qu'une grande variété de souches d' *E.coli* possèdent un îlot génomique *pks* (polyketide synthase) de 54kb qui porte les gènes « nonribosomal peptide synthetase (NRPS)-polyketide synthase (PKS) ». Cet îlot code des synthases de polycétides et de peptides non ribosomiaux permettant l'assemblage d'un composé hybride polyc tidepeptide non ribosomal (Nougayrède et al., 2006). Ce composé nommé colibactine possède une structure en ogive « warhead » qui induit le cross-linking de l'ADN cellulaire (Vizcaino and Crawford, 2015). Ce processus hautement toxique pour l'ADN entraine, lors de l'exposition chronique à la colibactine pendant l'infection à *E. coli pks+*, des anomalies de réplication/transcription, et l'activation du système de réparation de l'ADN et, en aval du cross-linking, des cassures double brin de l'ADN (Nougayrède et al., 2006; Vizcaino and Crawford, 2015). Ces cassures de l'ADN activent à leur tour la voie de réponse aux dommages de l'ADN, avec en premier le lieu recrutement d'ATM, aboutissant à l'arrêt du cycle cellulaire, la mise en place des systèmes de réparation et l'apoptose des cellules. La réparation est cruciale pour le maintien de l'intégrité du génome : incorrectement réparées, les lésions à l'ADN peuvent engendrer une instabilité chromosomique et l'accumulation de mutations géniques, moteurs fondamentaux dans la progression cancéreuse. De façon intéressante, des cellules épithéliales infectées par des souches d'*E.coli pks+* présentent une réponse de type dommages à l'ADN, puis reprennent leur division et développent dans un second temps après 3 semaines d'exposition, des signes de réparations incomplètes de l'ADN à l'origine d'une instabilité chromosomique et génomique. De plus ces cellules montrent une fréquence plus élevée de mutations et une augmentation de la formation de colonies en agar. Ces données suggèrent une activité mutagène et de transformation cellulaire induites par les *E. coli pks+* (Cuevas-Ramos et al., 2010). (Figure3). Le rôle potentiel des *E. coli* dans la carcinog nese est développé dans le paragraphe I.3.2.

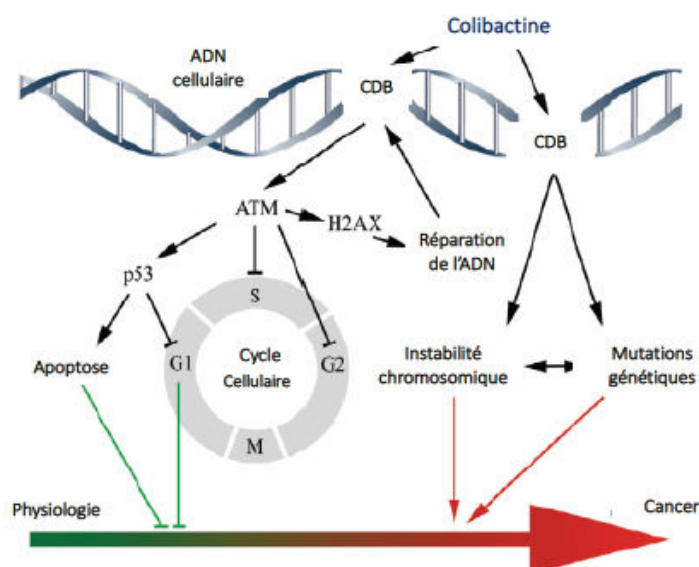


Figure 3 : Réponse cellulaire aux cassures double brin de l'ADN induites par la colibactine.

Les *E. coli* portant l'îlot *pks* de synthèse du polycétidepeptide non ribosomal colibactine induisent des cassures de l'ADN double brin (CDB) des cellules eucaryotes infectées. Les cellules activent la voie de réponse au dommage de l'ADN, avec en premier lieu le recrutement d'ATM (Ataxia telangiectasia mutated), aboutissant à l'arrêt du cycle cellulaire, la mise en place des systèmes de réparation et la mort par apoptose. La réparation cellulaire est importante pour le maintien de l'intégrité du génome. L'exposition persistante dans le temps à la colibactine engendre des lésions de l'ADN qui, imparfaitement réparées, peuvent entraîner (i) une instabilité chromosomique et (ii) des mutations géniques à l'origine d'une transformation cellulaire et de la progression cancéreuse. D'après Nougayrède *et al.*, 2013.

1.2.4.2 Les systèmes de transport et de sécrétion

Les toxines produites par les *E. coli* pathogènes sont transportées depuis le cytoplasme de la bactérie jusqu'à l'intérieur des cellules de l'hôte par différents mécanismes (Kaper *et al.*, 2004).

Sat, Pet et EspC sont aussi appelées auto-transporteurs car une partie de ces protéines, le domaine β forme un pore enchâssé dans la membrane externe, qui permet à l'autre partie protéique libre un accès extracellulaire (Henderson *et al.*, 1998). D'autres toxines peuvent être injectées dans la cellule cible par différents types de système de sécrétion (SST). L'hémolysine, produite par les UPEC, est l'exemple typique du système de sécrétion de type I (SSTI). En effet, pour permettre la sécrétion de HlyA par les bactéries directement dans le milieu extérieur sans passage intermédiaire par le périplasme, les protéines HlyB et D à la membrane interne recrutent un canal formé par des trimères de TolC, qui s'étend depuis la membrane externe au travers du périplasme (Zaitseva *et al.*, 2005). La LT entérotoxine produite par des souches d'ETEC est sécrétée dans le milieu extracellulaire grâce à un SSTII (Tauschek *et al.*, 2002). Le système de sécrétion de type III (SSTIII) est le plus répandu et le plus complexe, et est utilisé par les EPEC, les EHEC et les EIEC. Les SSTIII sont des complexes protéiques composés de plus de 20 sous-unités formant une structure en « seringue » capable d'injecter des protéines effectrices, comme Tir (EHEC) et IpaB (EIEC), dans le cytoplasme de la cellule cible.

I.3. Implications des *Escherichia coli* en pathologie humaine

I.3.1 *Escherichia coli* et pathologies infectieuses

E. coli est une espèce présente physiologiquement dans le tractus intestinal de l'homme et des animaux homéothermes avec lesquels il établit une relation mutualiste avec celui-ci. On parle alors de souches commensales. Cependant, certaines souches peuvent être associées à des pathologies infectieuses. Les *E. coli* pathogènes induisent différents types d'infections du fait de l'expression de facteurs de virulence spécifiques décrits précédemment (Kaper et al., 2004). Les *E. coli* pathogènes peuvent ainsi être séparés en deux grands groupes en fonction du type d'infection dont ils sont à l'origine. Le premier groupe, nommé ExPEC pour *E. coli* pathogènes extra-intestinaux, comprend des souches à l'origine d'infections du tractus urinaire (Uropathogenic *E. coli* ou UPEC), de méningites et de septicémies (neonatal meningitis *E. coli* ou NMEC) et le pathovar animal aviaire (avian pathogenic *E. coli* ou APEC). Le deuxième groupe *E. coli* pathogènes intestinaux (IntEC) est à l'origine de syndromes diarrhéiques et comprend six groupes pathogènes ou pathovars. Il s'agit des *E. coli* entéropathogènes (EPEC), des *E. coli* entéro-hémorragiques (EHEC), des *E. coli* entéro-toxinogènes (ETEC), des *E. coli* entéro-invasifs (EIEC), des *E. coli* entéro-agrégatifs (EAEC), des *E. coli* à adhésion diffuse (DAEC)) (Croxen and Finlay, 2010; Kaper et al., 2004) (Figure 4) .

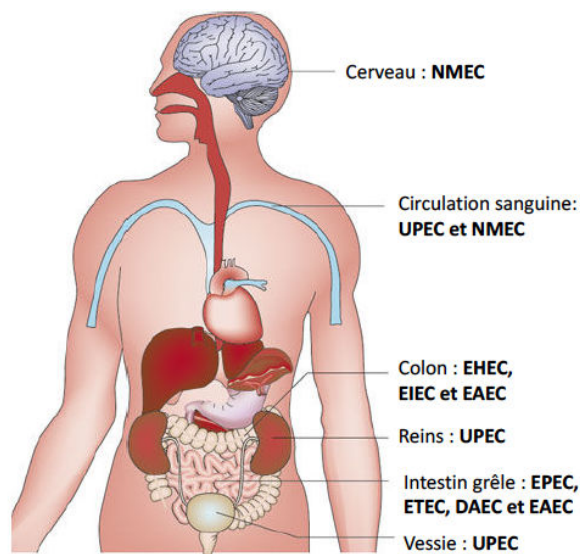


Figure 4 : Les différents « pathovars » de *Escherichia coli*.

E. coli entéropathogène (EPEC), *E. coli* entéro-toxinogène (ETEC) et *E. coli* à adhésion diffuse colonisent l'intestin grêle. *E. coli* entéro-hémorragique (EHEC), *E. coli* entéro-invasif (EIEC) colonisent quant à eux le colon de façon préférentielle. *E. coli* entéro-agrégatif peut coloniser l'intestin grêle ou le colon. Sous certaines conditions dépendantes de l'hôte et de la bactérie ces 6 pathovars sont à l'origine de diarrhées infectieuses. *E. coli* uropathogène (UPEC) peut coloniser la vessie et être à l'origine de cystites. En fonction de la virulence des souches, les UPEC peuvent remonter les voies urinaires et provoquer des pyélonéphrites. Enfin les UPEC comme les NMEC peuvent entraîner des septicémies et être à l'origine de méningites néonatales. D'après Croxen et Finlay, 2010.

1.3.1.1 Les Escherichia coli pathogènes extra-intestinaux (ExPEC)

1.3.1.1.1 Les Escherichia coli uropathogènes (UPEC)

Les UPEC sont responsables de la majorité (80-90 %) des infections du tractus urinaire (cystites, pyélonéphrites, prostatites). L'épithélium urinaire constitue une barrière imperméable et un environnement hostile aux bactéries qui ne le colonisent pas à l'état physiologique. Les souches d'UPEC, très étudiées au laboratoire, sont des pathogènes intracellulaires opportunistes qui ont acquis la capacité de coloniser cet épithélium. Cette propriété leur est conférée par leurs nombreux facteurs de virulence notamment des adhésines, des systèmes de captation du fer, des antigènes de capsules et des exotoxines dont CNF1. C'est l'ensemble de ces facteurs de virulence, codés par des gènes situés sur les îlots de pathogénicité (PAI), qui confère aux bactéries leur caractère pathogène et vont leur permettre d'envahir les cellules hôtes (Croxen and Finlay, 2010). La colonisation du tractus urinaire fait intervenir l'adhésion des bactéries aux cellules uro-épithéliales grâce à l'interaction des *pili* de type 1 portant l'adhésine FimH avec différents récepteurs comme les uroplakines I et IIIa ou les intégrines $\alpha 3$ et $\beta 1$. Ce même mécanisme permet ensuite aux bactéries ayant adhéré d'être internalisées dans la cellule urothéliale (Eto et al., 2007; Martinez et al., 2000). Des travaux menés aux laboratoires montrent que la toxine CNF1 produite par de nombreuses souches d'UPEC (plus de 30%), favorise l'internalisation Rac1-dépendante des bactéries dans les cellules hôtes (Doye et al., 2002; Visvikis et al., 2011). Dans la cellule elles peuvent former des colonies bactériennes intracellulaires. Les bactéries sont capables de remonter les voies urinaires jusqu'aux reins pour provoquer des pyélonéphrites. Cette ascension est permise grâce à une régulation fine entre l'expression des flagelles et des *pili* de type 1 (Lane et al., 2007) (Figure 5). Plusieurs génomes d'UPEC ont été séquencés, notamment les génomes des souches de référence 536, CFT073 et UTI89, de groupe phylogénétique B2, et on y retrouve les gènes codant pour plus de 10 types de *fimbriae* différents (Hochhut et al., 2006; Welch et al., 2002).

De façon intéressante, plusieurs études montrent que le gène *cnf1* qui code pour la toxine CNF1, outil moléculaire essentiel des études menées dans notre laboratoire, est associé au groupe phylogénétique B2 de façon majoritaire et plus particulièrement aux bactéries UPEC à l'origine d'infections chez l'homme et chez l'animal (Dubois et al., 2010; Moreno et al., 2005; Tramuta et al., 2011).

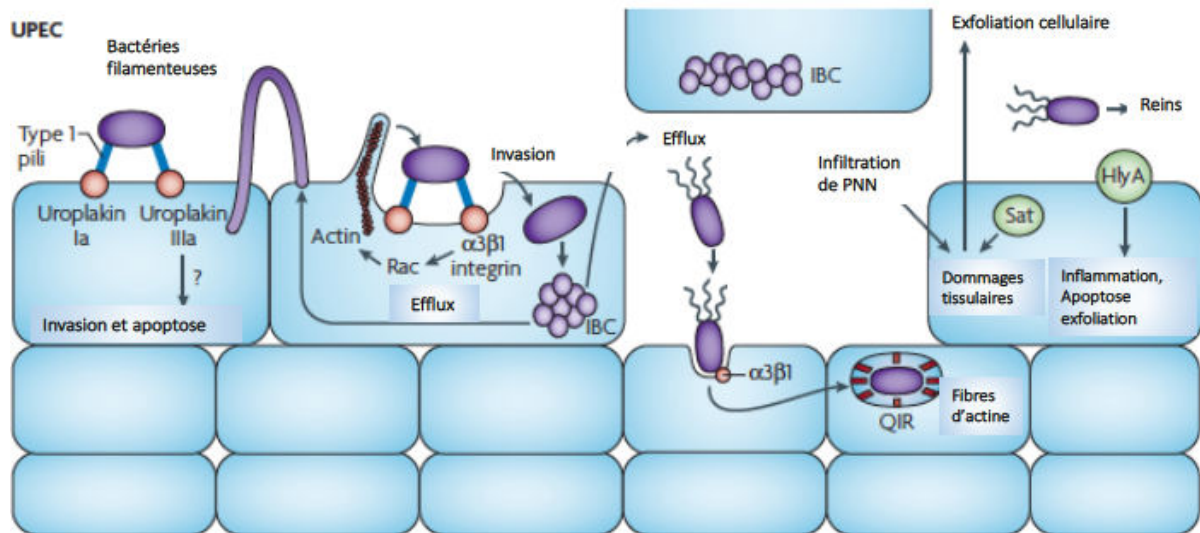


Figure 5 : Mécanismes physiopathologiques de l'infection par les UPEC.

Les UPEC adhèrent aux cellules épithéliales *via* les *pili* de type 1 reconnaissant les récepteurs uroplakine Ia et IIIa. Cette liaison active une voie de signalisation inconnue qui induit l'invasion et l'apoptose des cellules. La liaison des *pili* de type 1 aux intégrines $\alpha 3$ et $\beta 1$ permet l'invasion et la formation d'une communauté bactérienne intracellulaire (IBC). L'hémolysine A (HlyA) est une toxine qui peut inhiber l'activation de la protéine Akt et entraîne l'exfoliation des cellules ouvrant une nouvelle porte d'entrée aux UPEC. Sat (Secreted autotransporter toxin). PMN (Polymorphonuclear leukocytes). D'après Croxen et Finlay, 2010.

I.3.1.1.2 Les *Escherichia coli* responsables de méningites néo-natales (NMEC)

Les NMEC sont l'une des principales causes de méningites néonatales et leur mortalité peut atteindre jusque 40%. L'infection comprend plusieurs étapes : colonisation, invasion muqueuse, passage de la barrière hémato-encéphalique. Les NMEC possèdent un antigène capsulaire K1 qui les protège de la destruction par les macrophages. Les macrophages constituent ainsi une niche de réplication pour ces bactéries qui par la suite traverse la barrière hémato-méningée pour atteindre le système nerveux central. Les bactéries utilisent les *pili* de type 1 et les *fimbriae* S pour reconnaître le récepteur CD48 à la surface luminaire de l'endothélium cérébral. La protéine OmpA se lie ensuite à la glycoprotéine Gp96 pour permettre l'internalisation des bactéries (Croxen and Finlay, 2010; Huang et al., 2000) (Figure 6). Le génome de la souche de référence S88, de groupe phylogénétique B2, contient d'autres facteurs de virulence dont le rôle est moins bien connu (Touchon et al., 2009).

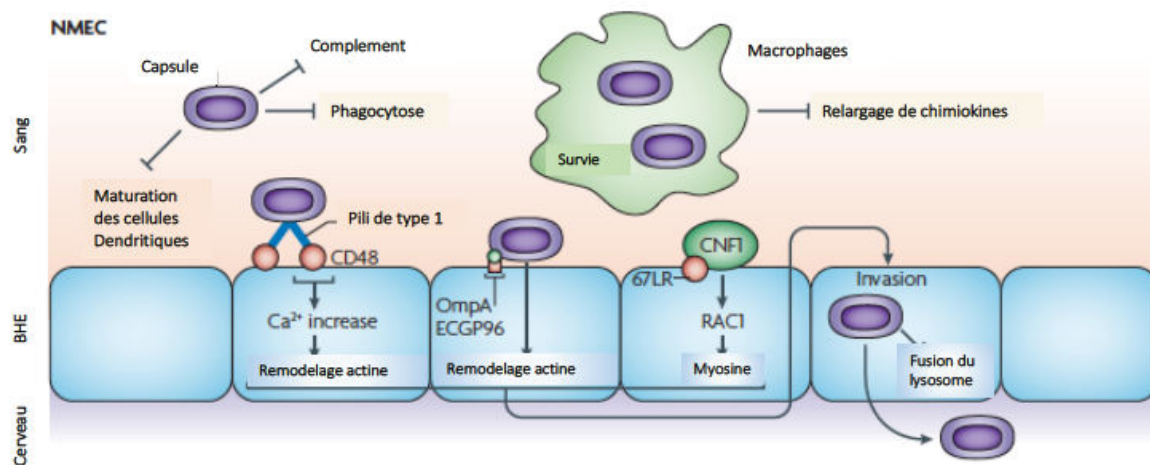


Figure 6 : Mécanismes physiopathologiques de l'infection par les NMEC.

Les NMEC sont protégés du système immunitaire et peuvent survivre dans les macrophages grâce à leur capsule de type K1. Les macrophages constituent ainsi une niche de réplication pour les bactéries qui par la suite traversent la barrière hémato-encéphalique pour atteindre le système nerveux central. L'adhésion et l'invasion des bactéries aux cellules fait intervenir les *pili* de type 1 et la protéine OmpA qui reconnaissent respectivement les récepteurs CD48 et Gp96. L'invasion met en jeu la toxine CNF1 (Cytotoxic Necrotizing Factor 1) qui lie le récepteur laminine à 67 kDa (67LR). D'après Croxen et Finlay, 2010.

1.3.1.1.3 Les *Escherichia coli* pathogènes aviaires (APEC)

Les APEC sont des pathogènes aviaires responsables d'infections graves dans les élevages de volailles avec des pertes économiques importantes. Après contamination des animaux par voie respiratoire, les bactéries provoquent une infection pulmonaire et peuvent passer dans la circulation sanguine pour atteindre les organes profonds de l'animal provoquant sa mort. De plus, il a également été montré que les APEC possèdent l'antigène capsulaire de type K1 comme les NMEC (Moulin-Schoule et al., 2007). Les APEC peuvent également être responsables chez l'homme, de méningites néonatales (Tivendale et al., 2010).

1.3.1.2 Les *Escherichia coli* pathogènes intestinaux (IntEC)

1.3.1.2.1 Les *Escherichia coli* entéropathogènes (EPEC)

EPEC, premier pathovar décrit, représente la principale cause de diarrhées fatales chez le nourrisson dans les pays en voie de développement (Kaper et al., 2004). Dans un premier temps les bactéries adhèrent aux cellules épithéliales de l'intestin grêle grâce aux BFP (Bundle-Forming *Pilus* ou *pili* de type IV) codés par des gènes portés par le plasmide EAF (EPEC adherence factor). Les BFP permettent aux bactéries d'adhérer aux entérocytes et entre elles pour former des microcolonies et une structure d'adhésion localisée (LA). Cela détruit l'architecture des microvillosités et induit des lésions d'attachement-effacement caractéristiques de l'infection à EPEC (Hyland et al., 2008). Après cette

phase d'adhésion précoce le système de sécrétion de type III permet d'injecter au sein du cytoplasme de la cellule hôte des effecteurs et notamment le récepteur Tir (translocated intimin receptor) qui induit une liaison étroite à la cellule *via* la protéine de membrane externe intimine (Kenny et al., 1997; Swimm and Kalman, 2008). Ce processus fait intervenir des protéines dont les gènes sont portés par un PAI de 35kB nommé LEE (locus of enterocyte effacement) (McDaniel et al., 1995), et entraîne des phosphorylations en cascade qui induisent un remodelage du cytosquelette d'actine et la formation d'un piédestal (Bommarius et al., 2007; Phillips et al., 2004; Swimm et al., 2004). Cela aboutit à une modulation complexe des réponses inflammatoires et métaboliques de l'hôte au niveau de la muqueuse intestinale et induit un syndrome diarrhéique (Croxen and Finlay, 2010) (Figure 7). Une étude récente montre que la virulence des EPEC au niveau de la cellule intestinale est le résultat d'une balance entre la production de molécules pro- et anti-inflammatoires par les bactéries (Sharma et al., 2006). Récemment, le génome de la souche de référence E2348/69, de groupe phylogénétique B2, a été séquencé (Iguchi et al., 2009).

1.3.1.2.2 Les *Escherichia coli* entéro-hémorragiques (EHEC)

Les EHEC sont responsables de symptômes pouvant aller de la diarrhée simple à une diarrhée sanglante et abondante. Ces souches d'*E. coli* peuvent induire un syndrome hémolytique et urémique (SHU) qui se manifeste entre autres par une anémie hémolytique, une thrombopénie et une insuffisance rénale aiguë et peut parfois être fatal. Le principal réservoir est le tube digestif des bovins. L'homme se contamine indirectement par l'intermédiaire d'eau, de lait cru et de viandes mal cuites contaminées. Les épidémies qui surviennent en Europe au Japon et en Amérique du nord sont le plus souvent dues au sérotype O157:H7 (Croxen and Finlay, 2010; Kaper et al., 2005). Les EHEC sont capables d'adhérer aux entérocytes de l'iléon distal ou du colon *via* deux types de *fimbriae* : les ECP (*E. coli* common *pilus*) et les HCP (hemorrhagic *coli pilus*) qui sont des *pili* de type IV (Erdem et al., 2007; Xicohtencatl-Cortes et al., 2009). Par la suite, le principal facteur de virulence produit par les EHEC : la toxine Stx pour Shiga-like toxine (vérotoxine) interagit avec le récepteur Gb3 (globotriaosylceramide) présent à la surface des cellules de Paneth de l'intestin ou des cellules épithéliales rénales (Schüller et al., 2009). La toxine Stx internalisée, bloque la synthèse protéique, ce qui induit l'apoptose des cellules épithéliales et inhibe la réponse immunitaire innée de l'hôte. Les bactéries se disséminent dans l'organisme *via* la circulation sanguine (Nataro and Kaper, 1998) (Figure 7). Certaines souches d'EHEC possèdent l'îlot de pathogénicité LEE et entraînent, comme les EPEC, la formation de lésions d'attachement-effacement. Il semble que les EPEC aient évolué en EHEC par l'acquisition d'un bactériophage contenant les gènes *stx* (Croxen and Finlay, 2010). Les génomes des souches de référence O157:H7 EDL933, O157:H7 str. Sakai, et O157:H7 str. EC4115, de groupe phylogénétique E, ont été séquencés (Hayashi et al., 2001b; Perna et al., 2001).

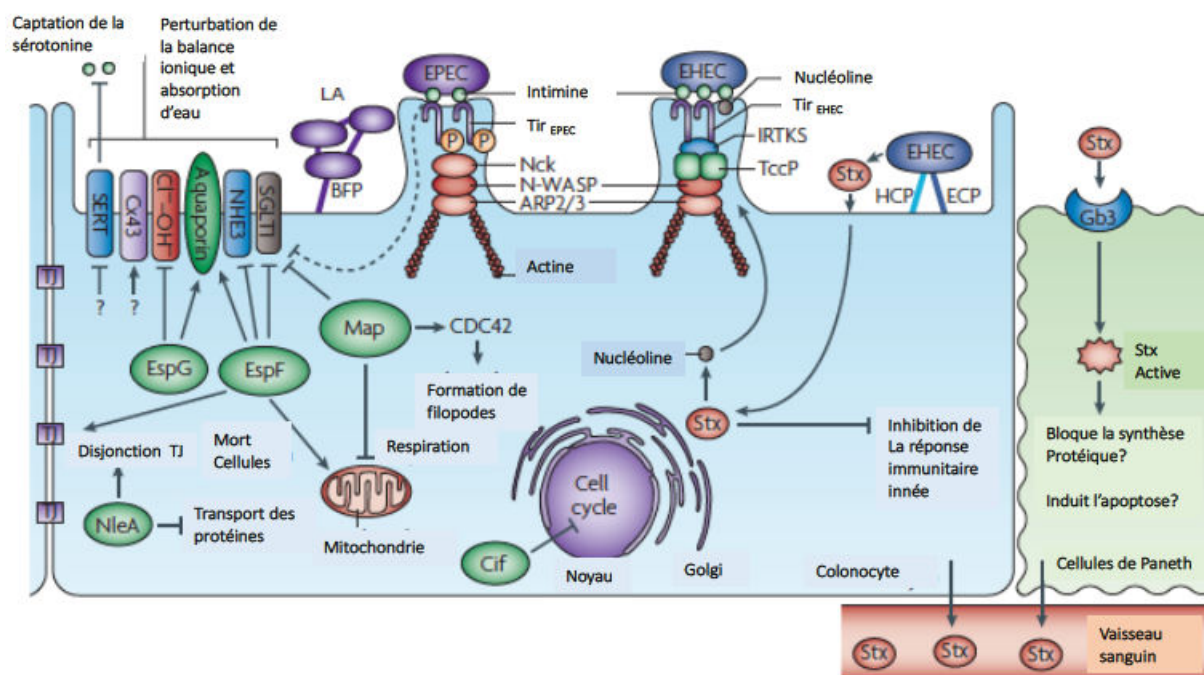


Figure 7 : Mécanismes physiopathologiques de l'infection par les EPEC et les EHEC.

EPEC et EHEC sont responsables de liaisons d'attachement-effacement à la surface des entérocytes et colonocytes entraînant la formation de piédestal. Il en résulte une perturbation de l'équilibre hydroélectrique entre la cellule épithéliale et la lumière intestinale à l'origine de diarrhées. En effet, des effecteurs sécrétés par le SST3 peuvent modifier l'activité des pompes Cl^-/OH^- et Na^+/H^+ , délocaliser des aquaporines et inhiber le co-transporteur du sodium-D-glucose 1 (SGLT1).

Les EPEC adhèrent aux entérocytes *via* les BFP (bundle-forming-pili) formant des microcolonies (adhésion localisée (LA)). Par la suite la liaison entre le récepteur Tir transloqué et l'intimine membranaire permet une adhésion plus « intime ». Une fois Tir phosphorylé par une thréonine kinase de l'hôte, il recrute Nck qui active N-WASP (neural Wiskott-Aldrich syndrom protein) et le complexe protéique associée à l'actine 2/3 (ARP2/3) afin de remodeler l'actine et former un piédestal.

Les EHEC adhèrent aux cellules épithéliales coliques *via* les ECP (*E. coli* common pilus) et les HCP (haemorrhagic coli pilus). La protéine Tir n'est pas phosphorylée chez les EHEC et il n'y a donc pas de recrutement de Nck. La formation du piédestal résulte d'un remodelage de l'actine induite par la protéine Tccp (Tir de couplage au cytosquelette ou EspFU) qui interagit avec Tir par l'intermédiaire d'une protéine de l'hôte (IRTKS : insulin receptor tyrosin kinase ou BAIAP2L1). Ce complexe se lie avec N-WASP pour activer ARP2/3. De plus les EHEC produisent des Shiga-like toxines (Stx) qui se lient aux récepteurs Gb3 des cellules de Paneth.

CDC42 : cell division control protein 42 ; Cx43 : connexin 43 ; MAP : mitochondrial associated protein ; NHE3 : Na^+/H^+ exchanger 3 ; EspI ou NleA : non-LEE-encoded effectorA ; SERT : Serotonin transporter ; TJ : tight junctions. D'après Croxen et Finlay, 2010.

1.3.1.2.3 Les *Escherichia coli* entéro-toxinogènes (ETEC)

Les ETEC représentent la première cause de diarrhées du voyageur. C'est également une cause de diarrhées aqueuses chez l'enfant de moins de 5 ans dans les pays en voie de développement et qui peuvent être parfois fatales (Croxen and Finlay, 2010; Turner et al., 2006). Les ETEC adhèrent dans un premier temps aux récepteurs présents sur les cellules épithéliales de l'intestin grêle grâce à différents

types de CFA (Colonization Factor Antigen), et une adhésine secrétée EtpA exposée de façon transitoire à l'extrémité des flagelles (Jansson et al., 2009; 2006; Roy et al., 2009). Les bactéries se lient ensuite de façon plus intime aux cellules épithéliales *via* des protéines de membrane externe Tia et TibA (Turner et al., 2006). De plus, les ETEC sécrètent deux toxines codées par des gènes plasmidiques et responsables d'un syndrome diarrhéique cholériforme. Les entérotoxines thermolabile (LT) et thermostable (ST). La toxine LT est très similaire à la toxine cholérique sur le plan structural et fonctionnel. Il existe deux variants : LT-I associé à des maladies humaines et LT-II à des maladies animales. La toxine LT possède une structure de type AB₅. Les cinq sous unités B, permettent l'adhésion des bactéries aux entérocytes *via* les gangliosides de surface GM1 et GD1b (Spangler, 1992). La sous-unité A possède l'activité adénylate cyclase ce qui induit indirectement l'activation du canal CFTR (Nataro and Kaper, 1998). Il en résulte une augmentation de la sécrétion d'ions chlorure dans la lumière intestinale et une diarrhée aqueuse. La toxine ST correspond à un peptide de petite taille avec deux variants : STa (humaine, 18 acides aminés) et STb (animale, 45 acides aminés). La liaison de STa sur un récepteur à activité guanylate cyclase stimule l'activité de ce dernier ce qui active le CFTR et augmente ainsi la sécrétion d'électrolytes au niveau intestinal (Croxen and Finlay, 2010; Turner et al., 2006) (Figure 8). Le génome de la souche de référence E24377A, de phylogroupe B1, a été séquencé (Rasko et al., 2008).

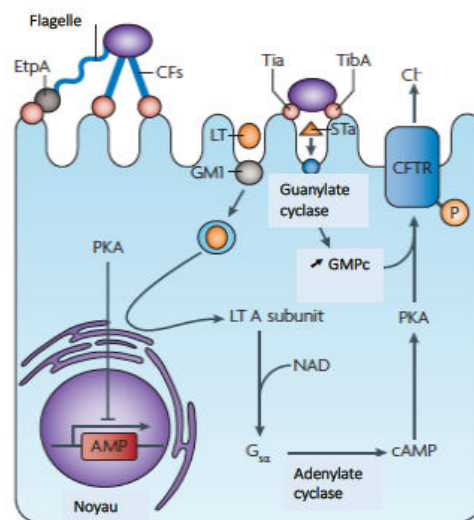


Figure 8 : Mécanismes physiopathologiques de l'infection par les ETEC.

Les ETEC adhèrent aux entérocytes *via* les facteurs de colonisation (CFA) et *via* une adhésine située à l'extrémité du flagelle : EtpA. Ensuite une adhésion plus étroite met en jeu les protéines Tia et TibA. Les ETEC sécrètent également deux toxines, une thermostable (ST) et une thermolabile (LT), qui entraînent des diarrhées par un mécanisme aboutissant à l'activation du transporteur CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator). Gs- α : stimulatory-nucleotide-binding (G) protein α -subunit; PKA : protein kinase A. D'après Croxen et Finlay, 2010.

1.3.1.2.4 Les *Escherichia coli* entéro-invasifs (EIEC) et *Shigella* spp

Les EIEC se différencient des souches de *Shigella* spp. par certaines de leurs caractéristiques biochimiques. Leur génome sont très proches et dérivent de l'évolution d'une souche ancestrale commune. De plus, la physiopathologie associée aux infections à EIEC est très similaire. Ainsi, les EIEC et les souches *Shigella* spp. forment un seul pathovar (Lan et al., 2004; Pupo et al., 2000). Ces souches sont responsables de syndromes dysentériques : fièvre, crampes abdominales, nausées et diarrhée afécale, glaireuse et muco-purulente, parfois sanglante (Kaper et al., 2004). Les bactéries atteignent initialement la sous-muqueuse colique, par un mécanisme de transcytose *via* les cellules M. D'abord phagocytées par les macrophages, les bactéries lysent la membrane de la vacuole, et se retrouvent libres dans le cytoplasme où elles se multiplient (Schroeder and Hilbi, 2008). La mort des macrophages entraîne le relargage de bactéries dans la sous-muqueuse. Elles sont internalisées dans l'épithélium colique par le pôle basolatéral. Les bactéries, une fois dans le cytoplasme du colonocyte, induisent la polymérisation de l'actine cellulaire à un de leur pôle, permettant ainsi leur dissémination aux cellules adjacentes (Mounier et al., 2009). Par la suite, elles utilisent des effecteurs sécrétés par leur SSTIII pour détourner les défenses de l'hôte et favoriser ainsi leur survie (Figure 9). La virulence des souches est largement due à un megaplasmide de 220kb qui code pour le système de sécrétion de type III (Croxen and Finlay, 2010; Schroeder and Hilbi, 2008).

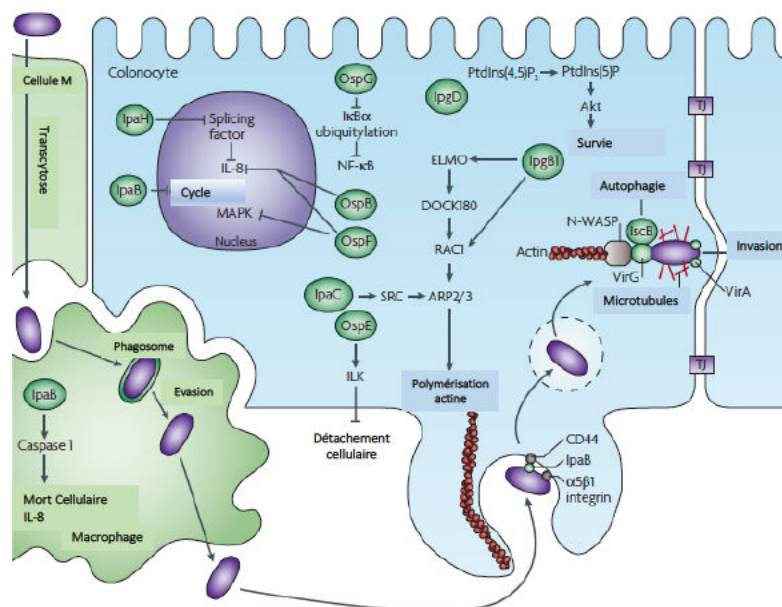


Figure 9 : Mécanismes physiopathologiques de l'infection par les EIEC.

EIEC accède à la sous-muqueuse *via* les cellules M, se multiplie dans les macrophages pour ensuite envahir l'épithélium par son pôle basal. Ce mécanisme est rendu possible grâce à des effecteurs sécrétés par le SST3. Une fois dans le cytoplasme de la cellule, d'autres effecteurs permettent à la bactérie d'échapper au système immunitaire, ce qui lui permet de survivre puis d'envahir les cellules adjacentes. Les bactéries disséminent ainsi dans l'épithélium et sont à l'origine d'une diarrhée dysentérique. ARP2/3: actin-related protein 2/3; DOCK180: dedicator of cytokinesis protein 1; ELMO: engulfment and cell motility; PtdIns(5)P: phosphatidylinositol-5-phosphate; PtdIns(4,5)P₂: phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate;. D'après Croxen et Finlay, 2010.

I.3.1.2.5 Les *Escherichia coli* entéro-aggrégatifs (EAEC)

Les EAEC représentent la seconde cause de diarrhées du voyageur après les ETEC à la fois dans les pays en voie de développement et dans les pays industrialisés. De plus ces bactéries sont responsables de nombreux foyers de diarrhées épidémiques dans le monde entier. Malgré cela, les connaissances concernant le mode de transmission, l'épidémiologie et la physiopathologie des infections liées au EAEC restent limitées et cette bactérie est actuellement considérée comme un « pathogène émergent » (Croxen and Finlay, 2010). Les souches d'EAEC ne sécrètent pas les entérotoxines LT ou ST. Elles ont la propriété d'adhérer entre elles et aux cellules intestinales (de l'intestin grêle ou du colon) grâce à des *fimbriae* appelés AAF (Aggregative adherence fimbriae) et forment des structures « en amas de briques », on parle alors d'adhésion agrégative (Boisen et al., 2008; Harrington et al., 2006). L'adhésion bactérie-bactérie et bactérie-cellule permise par les AAF induit la formation d'un biofilm à la surface des cellules épithéliales intestinales. Les AAFs induisent une forte production d'IL-8 (Harrington et al., 2005). Le plasmide pAA de 100kb code pour les AAF. Cependant, certaines souches d'EAEC ne produisent pas ce type de *fimbriae* et d'autres molécules comme la dispersine ou la flagelline permettent l'adhésion/agrégation des bactéries à l'épithélium intestinal (Croxen and Finlay, 2010; Velarde et al., 2007). Certaines souches d'EAEC produisent aussi des cytotoxines comme la toxine Pet (plasmid encoded toxin), qui contribue à la virulence des EAEC. Pet entre dans la cellule en utilisant les voies d'endocytose dépendante de la clathrine. Une fois internalisée, la toxine cible α -fodrin ce qui induit une désorganisation du cytosquelette d'actine à l'origine d'une exfoliation cellulaire et de lésions de la muqueuse intestinale qui peuvent entraîner l'aggravation de la diarrhée (Navarro-García et al., 2007a; 2007b) (Figure 10).

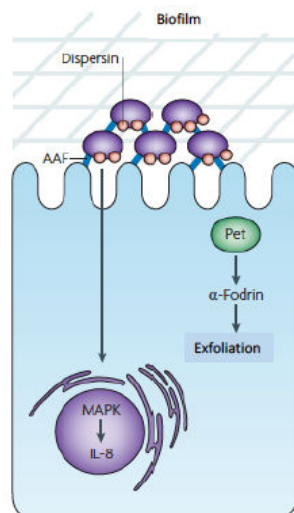


Figure 10 : Mécanismes physiopathologiques de l'infection par les EAEC.

Les EAEC adhèrent aux entérocytes *via* les AAF (Aggregative adherence fimbriae) ce qui forme un biofilm à la surface des cellules et stimule la production d'IL-8. De plus, certaines souches produisent la toxine Pet qui, une fois internalisée, cible l' α -fodrin qui entraîne un remodelage du cytosquelette d'actine à l'origine d'une exfoliation cellulaire. D'après Croxen et Finlay, 2010.

1.3.1.2.5 Les *Escherichia coli* à adhésion diffuse (DAEC)

Les DAEC colonisent l'intestin grêle et sont associées à des diarrhées aiguës et persistantes chez les enfants entre 18 mois et 5 ans, et à des infections urinaires (Servin, 2005). Sur le plan phylogénétique, les souches du pathovar DAEC forment un ensemble très hétérogène. Ces souches appartiennent aux quatre groupes majeurs : A, B1, B2 et D (Escobar-Páramo et al., 2004b). Les DAEC expriment des adhésines fimbriales (Dr et F1845) ou non-fimbriales (Afa) qui appartiennent à la famille Afa/Dr, codées par les opérons *afa/dra/daa*. Ces adhésines leur permettent d'adhérer aux cellules épithéliales HEP-2 et HeLa de façon uniforme (adhésion diffuse). La plupart des adhésines Afa/Dr se lient aux cellules épithéliales intestinales ou urinaires *via* les récepteurs DAF (decay-accelerating factor) qui s'accumulent sous les bactéries adhérentes (Croxen and Finlay, 2010; Servin, 2005). Cela entraîne aussi une modulation de la voie de signalisation dépendante du calcium qui modifie le cytosquelette et induit l'élongation ainsi que l'altération des microvillosités de la bordure en brosse. Par ailleurs les DAEC stimulent la production d'IL-8 de façon dépendante de la présence des flagelles (Arikawa et al., 2005). Cette augmentation d'IL-8 permet la transmigration des polynucléaires neutrophiles qui entraîne à son tour une augmentation de la synthèse d'IL-1 β par les cellules épithéliales. Il en résulte une surexpression des récepteurs DAF ce qui améliore ainsi l'adhérence bactérienne (Bétis et al., 2003). Une sous-classe d'adhésine Afa/Dr interagit avec les récepteurs de type CEACAM (carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule) qui s'accumulent alors sous les bactéries adhérentes. Cela induit l'effacement des microvillosités (Berger et al., 2004). Cette déstabilisation de la bordure en brosse et du matériel enzymatique impliqué dans l'absorption peut accroître le phénomène de diarrhées chez les patients (Servin, 2005). Outre le rôle majeur des adhésines Afa/Dr dans la pathogénicité des DAEC, la toxine Sat (Secreted autotransporter toxin) joue un rôle en détruisant les jonctions serrées, ce qui augmente la perméabilité de la barrière épithéliale intestinale (Guignot et al., 2007) (Figure 11).

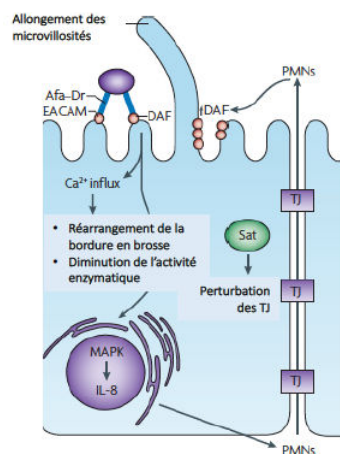


Figure 11 : Mécanismes physiopathologiques de l'infection par les DAEC.

Les DAEC adhèrent de façon diffuse aux entérocytes *via* des adhésines de type Afa/Dr. La plupart des adhésines Afa/Dr se lient au récepteur DAF et une minorité aux récepteurs de type CEACAM. La toxine Sat entraîne une perturbation des TJ ce qui augmente la perméabilité intestinale et la diarrhée. D'après Croxen et Finlay, 2010.

I.3.2 Rôle émergent d'*Escherichia coli* en pathologie humaine

Le rôle d'*E. coli* en pathologie infectieuse est largement documenté (cf paragraphe I.3.1.). En outre, il semble que *E. coli* soit associé à des pathologies intestinales chroniques telles que les Maladies inflammatoires Chroniques Intestinales (MICI), certains types de cancer du côlon et du rectum (CCR) d'origine familiale ou sporadique, ou la maladie coeliaque. Cet aspect émergent du rôle d'*E. coli* au long cours dans ces pathologies multifactorielles est abordé ci-dessous.

I.3.2.1 *E. coli* et Maladies Inflammatoires Coliques de l'Intestin (MICI)

Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI), dont les causes sont encore mal connues, résultent de l'inflammation chronique, intermittente ou continue, d'une partie du tube digestif. Elles comportent classiquement la rectocolite hémorragique (RCH), la maladie de Crohn (MC) et les MICI non classées. De façon intéressante, les patients atteints de MICI présentent une variation significative de la composition de leur microbiote intestinal caractérisée par une augmentation des souches de *E. coli* « associées aux muqueuses » (mucosa-associated *E. coli*) par rapport aux sujets contrôles, à la fois dans la maladie de Crohn (MC) et aussi dans la recto-colite hémorragique (RCH) (Kostic et al., 2014; Rolhion and Darfeuille-Michaud, 2007). Les principales notions concernant le lien entre *E. coli* et MC sont résumées ci-dessous.

La MC est une maladie inflammatoire chronique du tube digestif caractérisée par un état d'hyperactivation du système immunitaire intestinal et évoluant par des phases successives alternant poussées et périodes de rémissions. L'étiologie de cette maladie est encore mal connue et de ce fait, aucun traitement spécifique n'est disponible. La MC touche avec prédilection l'adulte jeune et représente un problème majeur de santé publique. Les données cliniques et expérimentales ont apporté la preuve d'une étiologie multifactorielle à composante génétique. Une des hypothèses étiologiques la plus communément adoptée est que la MC serait la conséquence d'une réponse immunitaire anormale dirigée contre un agent infectieux survenant chez un malade génétiquement prédisposé (Kostic et al., 2014). Parmi les agents infectieux incriminés, plusieurs arguments épidémiologiques, cliniques et expérimentaux sont en faveur d'un rôle possible d'*E. coli* dans l'étiologie de la MC. Le pathovar *E. coli* adhérent-invasif (AIEC) décrit pour la première fois par Boudeau *et al.* en 1999 est associé à la MC (Boudeau et al., 1999). Les souches d'*E. coli* appartenant à ce pathovar sont définies par leur capacité (i) à adhérer aux cellules épithéliales *in vitro*, (ii) à les envahir, puis à survivre et à se répliquer dans de larges vacuoles des macrophages muqueux sans induire la mort cellulaire, et enfin (iii) à induire la libération de taux élevés de TNF- α par les macrophages infectés (Conte et al., 2014; Darfeuille-Michaud et al., 2004; Simpson et al., 2006). Une étude de la prévalence des souches AIEC associées à la muqueuse intestinale des patients atteints de MC a indiqué que des souches AIEC sont retrouvées au niveau de la portion néo-terminale de l'iléon chez 36,4% des patients atteints de MC

contre seulement 6,2% chez les contrôles (Darfeuille-Michaud et al., 2004). D'autres études indépendantes confirment la présence de souches d'AIEC dans la muqueuse intestinale des patients atteints de MC (Baumgart et al., 2007; Conte et al., 2006; Martinez-Medina et al., 2009).

L'ensemble de ces éléments est en faveur d'un rôle inducteur et amplificateur des AIEC dans la MC.

1.3.2.2 E. coli, microbiote intestinal et cancer colo-rectal

1.3.2.2.1 Le cancer colorectal : épidémiologie et facteurs de risque génétiques et environnementaux

Le cancer colorectal (CCR) est un fléau qui représente la 2^{ème} cause de mortalité par cancer aux Etats-Unis et la 4^{ème} cause de décès par cancer au niveau mondial (Brennan and Garrett, 2016; Siegel et al., 2017). En France, le CCR arrive au second rang des causes de décès par cancer. Le CCR est une maladie multifactorielle sous la dépendance de facteurs environnementaux et génétiques. Il peut être classé par étiologie comme héréditaire (de type polypose adénomateuse familiale (AFP) due à une mutation initiatrice dans le gène *Adenomatous Polyposis Coli* (APC), ou de type Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer (HNPCC) du à des mutations dans les gènes du système de réparation de l'ADN (MMR)), inflammatoire (associée notamment à la maladie de Crohn et à la rectocolite hémorragique) ou le plus souvent sporadique, i.e. du à l'acquisition d'un panel hétérogène de mutations somatiques (dans plus de 80 % des cas). Le développement du cancer du côlon procède par étapes cliniques séquentielles, de la cellule épithéliale saine à l'adénome jusqu'au carcinome invasif (Brennan and Garrett, 2016; Sears and Garrett, 2014) (Figure 12). Ce phénomène au cours duquel les cellules accumulent des mutations génétiques motrices se déroule sur une durée moyenne de 19 ans. Dans ce modèle, le processus est initié par une mutation inactivant la voie APC/ β -caténine, puis des vagues d'expansion clonale successives sont rendues possibles par des mutations dans les voies KRAS/BRAF puis TGF- β , PIK3CA et p53 (Brennan and Garrett, 2016; Jones et al., 2008; Sears and Garrett, 2014). Ces altérations géniques sont sous-tendues par des mécanismes d'instabilité des microsatellites, épigénétiques et, dans plus de 80 % des cancers colorectaux sporadiques, d'instabilité chromosomique (Grady and Carethers, 2008). Des facteurs de risque du cancer colorectal ont été identifiés. Outre l'hérédité familiale et l'âge, la consommation d'alcool, le tabagisme, l'activité physique et l'index de masse corporelle sont impliqués (Brennan and Garrett, 2016). Le régime alimentaire représente le facteur de risque le plus significatif dans 80 % des cas (Bingham, 2000). De façon intéressante, certaines études menées dans les années 2000 ont montré que l'alimentation peut modifier la composition du microbiote intestinal et, réciproquement, l'activité métabolique des bactéries intestinales peut générer ou convertir des carcinogènes (Mai et al., 2009; McGarr et al., 2005; O'Keefe et al., 2009; Rowland, 2009). Ces études suggèrent donc une implication du microbiote dans l'étiologie du CCR (Figure 13).

I.3.2.2.2 Le rôle du microbiote intestinal dans le développement du cancer colo-rectal

L'augmentation de la densité bactérienne dans la lumière intestinale colique (environ 10^{12} bactéries/g de selle) par rapport à la lumière de l'intestin grêle (10^2 bactéries/g de selle) corrèle de façon remarquable avec l'augmentation du risque de cancer dans ces différentes zones anatomiques du tube digestif. De nombreuses études soulignent désormais le microbiote intestinal comme facteur de risque environnemental majeur dans le développement du CCR (Brennan and Garrett, 2016; Hope et al., 2005; Rowland, 2009). Par exemple, des études utilisant des modèles animaux murins ont confirmé le rôle du microbiote intestinal dans la genèse du CCR. Ainsi, on observe dans des modèles de CCR chez des souris génétiquement modifiées, ou chez des rongeurs traités avec des inducteurs chimiques, que ces animaux sont prédisposés au développement d'un cancer colorectal en présence d'une flore intestinale, mais pas quand ils sont élevés en conditions stériles (Chu et al., 2004; Kado et al., 2001; Kühn et al., 1993; Reddy et al., 1974; Vannucci et al., 2008). Cependant, les premières études épidémiologiques réalisées chez l'homme cherchant à corréliser la présence spécifique de certaines espèces bactériennes avec l'incidence du cancer du côlon dans des population de patients à risque ou ayant un CCR, n'ont pas montré de signature bactérienne claire (Finegold et al., 1975; Moore and Moore, 1995; Scanlan et al., 2008; Sobhani et al., 2011). En effet ces approches sont difficiles étant donné (i) la complexité du microbiote digestif humain et sa variabilité intra et interindividuel, (ii) les variations génomiques entre les souches de bactéries d'une même espèce et (iii) le temps de latence entre l'initiation de la tumeur et le cancer invasif (Eckburg et al., 2005).

A l'heure de la médecine personnalisée, Il est fondamental de comprendre le rôle du microbiote digestif, dans le développement du CCR en vue de proposer des nouvelles méthodes diagnostiques et thérapeutiques aux patients atteints ou « à risques » (Garrett, 2015). Les progrès réalisés dans la prise en charge des adénocarcinomes gastriques liés à *Helicobacter pylori* ou des cancers du col de l'utérus et anaux favorisés par l'exposition au *Papillomavirus* humain (HPV) sont prometteurs et incitent à continuer les travaux de recherche dans cette direction (Burd, 2003; Polk and Peek, 2010). De nombreuses études menées au cours années 2010 ont mis à profit les avancées technologiques récentes en matière de métagénomique, culturomique et également de microbiologie cellulaire mécanistique pour avancer une théorie expliquant le rôle du microbiote dans le CCR. Le microbiote en tant qu'entité globale « microbiote driver » ou certaines bactéries présentes dans la microflore intestinale « microbe as a protagonist » sont capables d'interagir entre eux et avec le système immunitaire de l'hôte et de moduler la réponse inflammatoire au sein de la muqueuse intestinale dans un micro-environnement tumoral particulier pour favoriser le développement du CCR au cours des différentes étapes de la carcinogénèse (Brennan and Garrett, 2016; Candela et al., 2014; Kipanyula et al., 2013; Sears and Garrett, 2014; Sears and Pardoll, 2011). En retour, l'inflammation chronique de la muqueuse intestinale entraîne la production de nitrates dans le tractus digestif, ce qui induit une

dysbiose et favorise la croissance de *E. coli* et donc potentiellement de souches génotoxigènes (Winter et al., 2013).

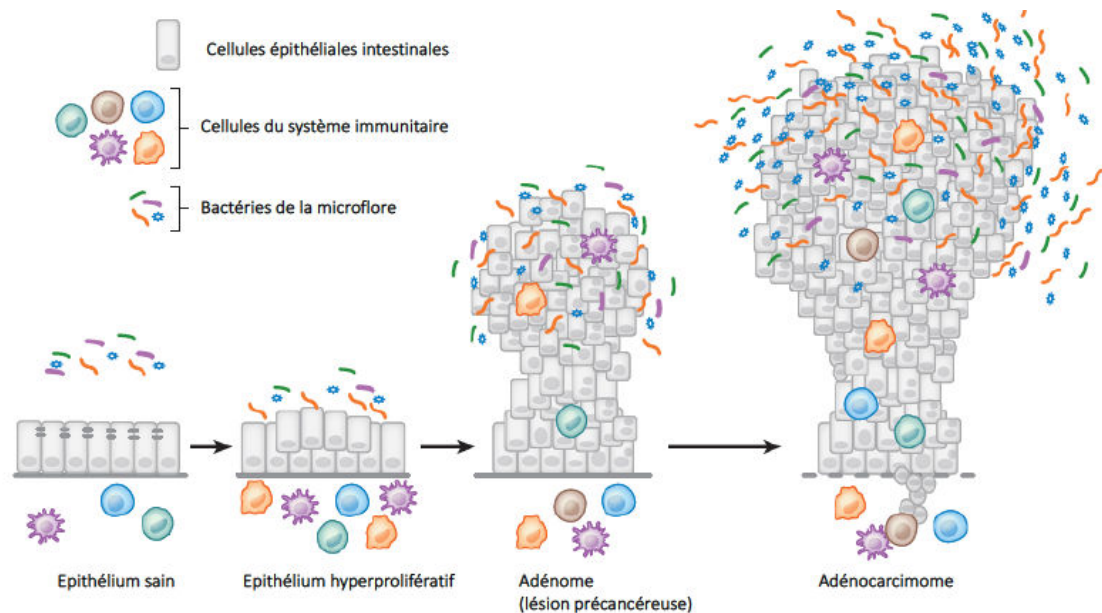


Figure 12 : Développement du cancer colorectal : de la cellule épithéliale saine à l'adénocarcinome invasif.

Les interactions étroites (« cross-talk ») entre les bactéries du microbiote intestinal et les cellules immunitaires de la muqueuse intestinale de l'hôte, contribuent au maintien de l'inflammation chronique au niveau de la zone tumorale et au développement des différentes étapes anatomocliniques de la carcinogénèse du CCR. D'après Brennan et Garrett, 2016.

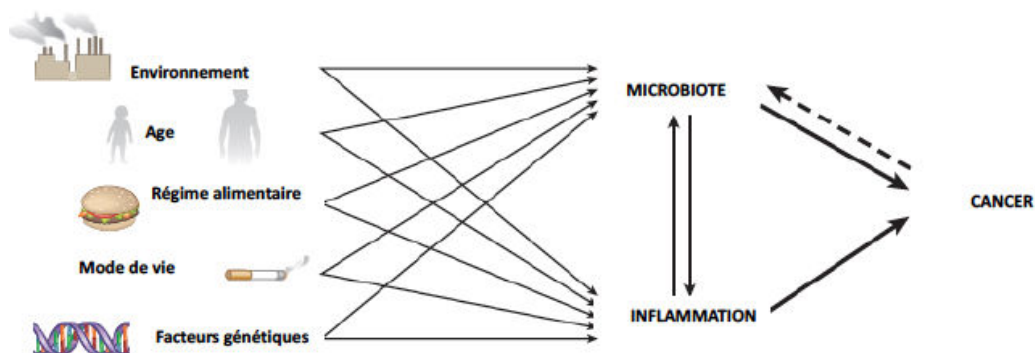


Figure 13 : Interactions entre les facteurs de risques génétiques et environnementaux du CCR et l'axe « microbiote intestinal-inflammation chronique-cancer ».

Rôle central du microbiote intestinal comme facteur de risque environnemental majeur du CCR. Le microbiote, sous l'influence de variations induites par des prédispositions génétiques et des expositions environnementales, maintient un état d'inflammation chronique et favorise la progression du cancer. D'après Brennan et Garrett, 2016.

De façon intéressante plusieurs études suggèrent dès à présent que certaines souches bactériennes toxigéniques ou colitogènes, dont certaines souches d' *E.coli*, pourraient jouer un rôle dans l'étiologie du CCR (Brennan and Garrett, 2016; Sears and Garrett, 2014). Les principales espèces bactériennes impliquées et leur rôle potentiel dans le développement du CCR sont expliqués sur la figure 14. Le rôle spécifique d'*E. coli* est discuté dans le paragraphe suivant (I.3.2.2.3)

Bactérie	Preuve de l'association avec le cancer colorectal			Mécanisme Impliqué	Effecteurs Mis en jeu	Références
	Epidémiologique	Enrichissement Microbien	Réponse Immune			
<i>Streptococcus gallolyticus</i>	+	-	+	Inconnus	Inconnus	(Boleij et al., 2011)
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	-	Cassures de l'ADN médiées par les EROs	Inconnus	(Wang et al., 2008; 2012)
<i>E.coli</i> colibactine +	+	+	-	Cassures de l'ADN induite par une toxine	Colibactine (îlots <i>pks</i>)	(Arthur et al., 2012; Nougayrède et al., 2006; Tomkovich et al., 2017)
<i>Bacteroides fragilis</i> BFT +	+	+	-	Inflammation Th17, Infiltration de cellules immunitaires	Toxine BFT	(Wu et al., 2009)
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	+	+	-	Inflammation, infiltration de cellules immunitaires, perte de l'immunité anti-tumorale	FadA, Fap2	(Gur et al., 2015; Kostic et al., 2013; Rubinstein et al., 2013)

Figure 14 : Principales bactéries associées au cancer colorectal (CCR) et mécanismes moléculaires mis en jeu

Les mécanismes par lesquels les bactéries sont susceptibles de promouvoir le développement du CCR sont divers et relativement spécifiques à chaque microorganisme. L'association épidémiologique entre la colonisation à *Streptococcus gallolyticus* et le CCR est connue de longue date mais les mécanismes impliqués encore non élucidés. *Enterococcus faecalis* produit des espèces réactives de l'oxygène provoquant dans les cellules épithéliales intestinales un stress oxydatif ainsi qu'une surexpression de la cyclooxygénase2 (COX-2), tous deux impliqués dans la tumorigénèse. Les souches d'*E. coli pks+* sont capables de produire la génotoxine colibactine qui induit indirectement des cassures double brin sur l'ADN à l'origine d'une instabilité chromosomique et de mutations géniques carcinogènes. Certaines souches de *Bacteroides fragilis* dites « entérotoxigéniques » (ETBF), produisent la toxine BFT qui induit une réponse immunitaire Th17 qui favorise l'inflammation et le CCR. Enfin *Fusobacterium nucleatum* possède des adhésines FadA et Fap2. FadA lie la E-cadhérine et favorise la croissance tumorale, et Fap2 peut déréguler la réponse immunitaire anti-tumorale. D'après Brennan et Garrett, 2016.

1.3.2.2.3 Le rôle d'*E.coli* dans le cancer colo-rectal

En 2006, l'équipe du Pr Éric Oswald a montré que les souches d' *E.coli pks +* produisent la génotoxine colibactine provoquant indirectement des cassures double brin sur l'ADN cellulaire (Nougayrède et al., 2006). Ces cassures de l'ADN sont des lésions particulièrement dangereuses pour les cellules, car elles peuvent générer des réarrangements génétiques et des aberrations chromosomiques, qui sont des causes fondamentales de la transformation néoplasique (Cuevas-Ramos et al., 2010).

Des études épidémiologiques publiées dans la fin des années 2000 montrent que l'îlot *pks* codant pour la colibactine est retrouvé non seulement dans des souches d'*E. coli* à l'origine d'infections extra-intestinales, mais aussi en grand nombre chez des souches commensales isolées des selles d'individus sains. En effet, dans ces études, 12 à 34% des isolats fécaux sont *pks+* (Dubois et al., 2010; Johnson et al., 2008; Nougayrède et al., 2006; Putze et al., 2009). L'îlot *pks* est quasi-exclusivement retrouvé dans des souches appartenant au groupe phylogénétique B2. De façon intéressante, la proportion dans le microbiote intestinal humain des souches de *E. coli* du groupe B2 est en constante augmentation depuis ces 20 dernières années dans nos régions tempérées. Ce groupe phylogénétique est maintenant prévalent en Europe, aux Etats Unis et au Japon (Clermont et al., 2008; Escobar-Páramo et al., 2004b). De plus les souches de *E. coli* du groupe B2 ont une capacité supérieure aux autres phylogroupes de *E. coli* à coloniser et persister durablement dans le colon. La prédominance du groupe B2 dans le microbiote existe même dès la naissance. En effet, au moins 50 % des souches de *E. coli* isolées à partir de *féces* d'enfants appartiennent au groupe B2 (Gordon et al., 2005; Nowrouzian et al., 2005). L'analyse des données issues d'une étude japonaise de métagénomique portant sur le microbiote de 13 individus sains , montre que les gènes codant pour la colibactine sont retrouvés dans 40% des selles des patients et en particulier chez les jeunes enfants et nourrissons (Kurokawa et al., 2007). Ainsi, il semble que les souches de *E. coli* du groupe B2 *pks+* qui produisent de la colibactine sont fortement prévalentes et ont la capacité de coloniser l'homme dès la naissance puis de se maintenir durablement dans le côlon. L'ensemble de ces données suggère que la présence dans la microflore intestinale de souches de *E. coli* génotoxiques pourrait constituer un facteur prédisposant au développement de certains cancers colorectaux. Ces « pathobiontes » pourraient induire des effets mutagènes et carcinogènes sur les cellules exposées de façon chronique et répétée, à la faveur de la colonisation au long terme peut-être même dès la naissance.

De récents travaux menées au cours des années 2010 viennent étayer l'hypothèse d'un rôle du microbiote, et en particulier d'*E. coli*, dans la carcinogénèse colique. Une dysbiose intestinale précoce chez le nouveau-né pourrait déclencher des signaux immunitaires aberrants favorisant le développement ultérieur d'inflammation et de cancer (Cario, 2013). Le rôle de l'inflammation dans le déclenchement d'une activité pro-cancérigène du microbiote se précise (Kipanyula et al., 2013). Ainsi, durant le processus inflammatoire, la production de nitrates dans le tractus digestif induit une dysbiose

qui favorise la croissance d'*E. coli*, et donc potentiellement des souches génotoxinogènes. (Winter et al., 2013). Une étude publiée en 2012 par l'équipe du Pr Oswald, utilisant un modèle animal de souris déficientes en cytokines anti-inflammatoire IL-10, renforce le rôle des souches d'*E.coli pks+* dans le développement d'une colite inflammatoire favorisant les CCR. En effet, chez ces souris déficientes en IL-10, l'inflammation entraîne un doublement de l'abondance des entérobactériacées dans le microbiote. Après induction à l'azoxyméthane chez ces mêmes souris, la monocolonisation par la souche de *E. coli* NC 101 produisant la colibactine favorise l'apparition de carcinomes invasifs. La fréquence de ce phénomène d'induction de cancer est, de plus, significativement réduite par la délétion de l'îlot *pks* responsable de la synthèse de colibactine (Arthur et al., 2012). Chez l'homme, il a été montré que la muqueuse colique de patients atteints de CCR était préférentiellement colonisée par des souches d'*E. coli* du groupe B2 possédant les gènes codant pour des cyclomodulines, en particulier exprimant la colibactine : 55 % (n= 38) contre 20 % chez des sujets souffrant de diverticulose bénigne (n=31) (Buc et al., 2013). Une seconde étude publiée par la même équipe en 2014, et menée sur des patients atteints de cancers (n= 48) ou de diverticulose (n=33) coliques, a montré en réalisant des « PCR multiplex cyclomoduline » sur les souches d'*E.coli* « associés aux muqueuses » (*mucosa-associated E. coli*), que 86% de l'ensemble des souches cyclomodulines + appartiennent au groupe B2, et la majorité d'entre elles sont *pks+* ou *cnf* +. Dans cette même étude, des expériences réalisées *in vivo* sur un modèle d'infection chronique de souris CEACAM +, montrent que la souche d'*E. coli* 115G isolée de CCR présente une capacité accrue de (i) persister dans le colon, (ii) provoquer une inflammation colique (iii) induire la prolifération des cellules épithéliales (Raisch et al., 2014). Enfin une dernière publiée en 2017 par Tomkovich *et al.*, montre que des souches d'*E.coli pks+* sont capables d'induire des CCR dans un modèle gnotobiotique de souris APC^{Min/+}, IL-10^{-/-}. Cette capacité à induire le CCR est directement « colibactine-dépendante » et renforce le rôle de cette génotoxine comme inducteur de la carcinogénèse colique (Tomkovich et al., 2017).

Au total, Il existe donc un faisceau de résultats concordants suggérant un rôle de toxines bactériennes produites par *E. coli* et en particulier de la colibactine dans l'induction de tumeurs colorectales. Toutefois, des propriétés protectrices ont également été mises en évidence : c'est ainsi que la souche probiotique de *E. coli* Nissle 1917, qui exprime la colibactine, exerce des propriétés anti-inflammatoires sur des colites induites par transfert de lymphocytes T CD4⁺ CD45RB^{high} à des souris immunodéficientes. Cette protection n'est observée que si Nissle 1917 possède un îlot *pks* fonctionnel et n'est pas actuellement séparable de son action génotoxique (Olier et al., 2012). Le rôle de la bactérie *E. coli* dans la maladie multifactorielle que constitue le CCR reste à préciser. Pour décrypter le lien entre *E. coli*, microbiote, CCR une approche scientifique utilisant des études épidémiologiques chez l'homme mais également des modèles animaux devra être utilisée.

II.2 La famille des Rho GTPases

Les GTPases Rho (Ras homologous) partagent 30% d'identité avec la famille Ras. Chez les mammifères, il existe 20 Rho GTPases réparties en 8 sous familles (Boureux et al., 2007; Heasman and Ridley, 2008). Ces protéines ont des régions caractéristiques permettant la fixation et l'hydrolyse du GTP. Elles possèdent deux régions flexibles qui opèrent un changement de conformation entre les formes liées au GTP ou GDP : switch 1 et switch 2. Ces régions interviennent dans l'interaction avec les régulateurs et les effecteurs. En particulier, le switch de la région 1, lors de la fixation au GTP, en une forme capable de lier des effecteurs assure un rôle majeur dans la transduction du signal. Les GTPases Rho possèdent un insert d'acides aminés qui les différencie des autres GTPases de la famille Ras. Les gènes codant pour les Rho GTPases sont très conservés au cours de l'évolution et sont des gènes essentiels (Heasman and Ridley, 2008). A ce jour les GTPases RhoA, Cdc42 et Rac1 sont les plus étudiées notamment pour leur rôle dans la régulation du cytosquelette d'actine. Les Rho GTPases jouent également un rôle dans la régulation de la transcription, la production de seconds messagers, la prolifération cellulaire ou la réponse aux agents pathogènes (Bustelo et al., 2007; Heasman and Ridley, 2008). Le rôle clé de la Rho GTPase Rac1 dans la régulation de la biologie de la cellule est développé ultérieurement dans le paragraphe II.5.

II.3 Régulation des Rho GTPases

Les Rho GTPases sont des protéines clés de la signalisation cellulaire hautement régulées au niveau de leur activité GTPasique et d'échange du GDP en GTP par différentes familles de régulateurs et par des modifications post-traductionnelles (Hodge and Ridley, 2016). Ces GTPases peuvent parfois être régulées au niveau transcriptionnel et par des miRNA (Liu et al., 2012).

II.3.1 Le Cycle GTP/GDP

Les Rho GTPases oscillent entre une forme active liée à la guanosine triphosphate (GTP) et une forme inactive liée à la guanosine diphosphate (GDP). Une majorité des petites protéines G hydrolysent le GTP en GDP. Les GTPases ont une activité intrinsèque faible de chargement et d'hydrolyse du GTP. L'activation des Rho GTPases est donc catalysée par les protéines de la famille GEF (Guanine nucleotide Exchange Factors) qui facilitent l'échange du GDP en GTP. Le retour à un état inactif est favorisé par des protéines comprenant des domaines GAPs (GTPases Activating Proteins) qui catalysent l'hydrolyse du GTP (Moon, 2003; Schmidt and Hall, 2002) (Figure 16). La forme active est localisée au niveau de la membrane plasmique où elle se lie aux effecteurs. La forme inactive est cytoplasmique.

II.3.2 Régulation spatiale et temporelle

La régulation spatiale et temporelle des GTPases Rho se fait également par des modifications post-traductionnelles variées de type prénylation, phosphorylation et ubiquitylation. Ces modifications post-traductionnelles sont soit nécessaires à la maturation de la GTPase en une forme active comme la prénylation de la cystéine carboxy-terminale, soit impliquées dans la modulation de l'activité des GTPases et de leur localisation (Hodge and Ridley, 2016).

Suite à la biosynthèse d'une GTPase Rho, il se produit une isoprénnylation par ajout d'un groupement géranyl-géranyl sur une cystéine appartenant à un motif conservé localisé dans la partie carboxy-terminale de la protéine : la « boîte CAAX ». La fixation du groupement géranyl-géranyl est suivie par un clivage des acides aminés AAX puis par la carboxyméthylation de la partie carboxy-terminale de la protéine. Ce type de modification lipidique est nécessaire pour permettre un ancrage des GTPases Rho à la membrane plasmique (Bustelo et al., 2007; Wennerberg and Der, 2004). Les GTPases Rho sont aussi régulées de façon spatio-temporelle par les protéines de la famille RhoGDI. Ces protéines interagissent avec la partie carboxy-terminale prénylée ce qui permet de séquestrer les Rho GTPases dans le cytosol. De façon ponctuelle, des protéines de type GDF (GDI Displacement Factors) dont font partie les protéines de la famille ERM (Ezrin, Radexin, Moesin) interagissent avec les Rho GDIs qui libèrent les Rho GTPases qui se relocalisent à la membrane plasmique et peuvent exercer leur activité biologique *via* leurs effecteurs (DerMardirossian and Bokoch, 2005).

Certaines GTPases Rho peuvent être régulées par phosphorylation. C'est le cas par exemple de la protéine RhoA. La PKA (cAMP dependent protein kinase) phosphoryle RhoA sur une sérine en position 188. Cette phosphorylation entraîne une relocalisation cytoplasmique de RhoA et une augmentation de l'interaction avec les Rho GDIs (Forget et al., 2002; Lang et al., 1996). Plus récemment, Chang *et al.* montrent que la phosphorylation de protéine Rac1 sur le résidu tyrosine 64 par les Src kinases inhibe la formation de lamellipodes et l'étalement cellulaire (Chang et al., 2011).

L'activité des Rho GTPases est également contrôlée par ubiquitylation et sumoylation (Figure 16). Le mode de régulation par ubiquitylation est détaillé dans les paragraphes III.4 et IV de l'introduction.

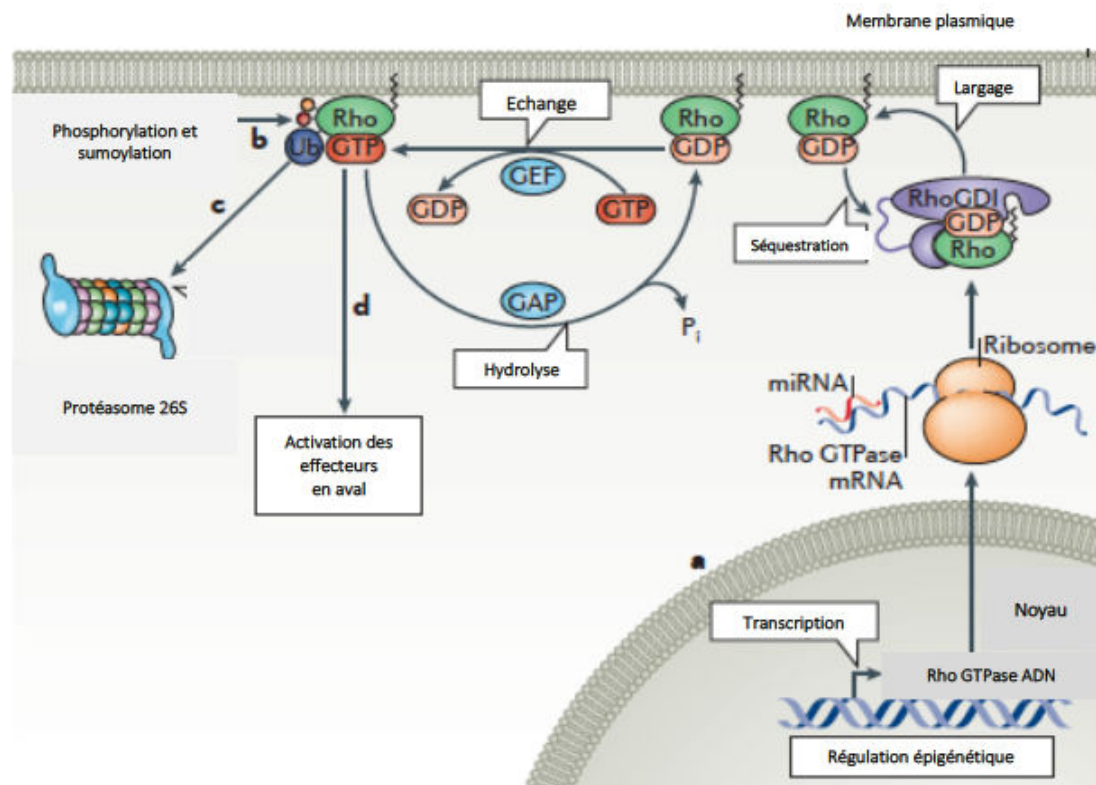


Figure 16 : Schéma représentant la régulation spatio-temporelle des Rho GTPases.

Les GTPases Rho sont des protéines clés de la signalisation cellulaire hautement régulées. Cette régulation fait intervenir d'une part des mécanismes « classiques » impliquant différentes familles de régulateurs qui modulent le cycle GTP/GDP des GTPases Rho (GEFs, GAP et Rho GDI) et des mécanismes dits « non-conventionnels ».

En ce qui concerne les mécanismes « classiques » : les GEFs activent les Rho GTPases en catalysant l'échange du GDP en GTP, alors que les GAPs stimulent l'activité intrinsèque GTPasique des Rho GTPases ce qui induit leur inactivation. Les Rho GDIs interagissent avec la partie prénylée des Rho GTPases ce qui permet de les séquestrer dans le cytosol. Des mécanismes de régulation « non conventionnels » ont également une importance dans la régulation spatio-temporelle des Rho GTPases. **(a)** L'expression des Rho GTPases peut être contrôlée au niveau transcriptionnel par des modifications épigénétiques, et au niveau traductionnel par ARN interférence (miRNA). **(b)** Des modifications covalentes post-traductionnelles, incluant la phosphorylation ou la sumoylation, entraînent l'activation ou l'inactivation des GTPases Rho en fonction du contexte cellulaire. Certaines de ces modifications peuvent être induites par des protéines bactériennes. **(c)** le niveau protéique intracellulaire des Rho GTPases est aussi régulé de manière efficace par le système ubiquitine protéasome. **(d)** La combinaison de mécanismes de « classiques » et « non conventionnels » garantit une régulation spatio-temporelle appropriée des Rho GTPases et l'activation de leurs récepteurs d'aval impliqués dans les divers processus cellulaires. D'après Hodge & Ridley, 2016.

De façon intéressante, certaines protéines bactériennes sont capables de modifier l'homéostasie cellulaire en catalysant la modification post-traductionnelle des GTPases Rho (Hodge and Ridley, 2016; Lemichez and Aktories, 2013).

II.4. Modifications post-traductionnelles des GTPases Rho induites par des toxines bactériennes

Les toxines bactériennes de type AB et les effecteurs directement injectés par les bactéries liées aux cellules ciblent de façon remarquable toutes les étapes clés du cycle d'activation et d'inactivation des Rho GTPases par différents mécanismes. Elles peuvent soit catalyser directement des modifications post-traductionnelles de ces protéines, soit mimer l'effet des GEF, GAP et GDI, ou encore cibler des régulateurs en amont des Rho GTPases (Lemichez and Aktories, 2013). Certains effecteurs semblent aussi pouvoir mimer l'activité des GTPases Rho comme IpgB2 pour RhoA et IpgB1 et MAP pour Rac1 et Cdc42 (Alto et al., 2006). Les bactéries pathogènes manipulent les GTPases Rho de façon bidirectionnelle pour les activer ou les inhiber. Quelques exemples de toxines inhibitrices et activatrices sont développés ci-après II.4.1 et II.4.2 (Lemichez and Aktories, 2013) (Figure 17). De façon remarquable, certaines bactéries comme *Salmonella* injectent conjointement des facteurs activateurs et inhibiteurs des GTPases Rho probablement pour assurer l'activation transitoire des GTPases Rho ou une localisation spatiale de leur activation.

II.4.1 Les toxines inhibitrices des RhoGTPases

Certaines bactéries pathogènes produisent des toxines qui modifient directement les RhoGTPases ce qui bloque leur interaction avec les effecteurs.

Une thréonine très conservée et située sur la région switch 1 des Rho (en position 37 pour RhoA et 35 pour Cdc42 et Rac1) est un site préférentiel de modification post-traductionnelle induite par des toxines bactériennes (Just et al., 1995; Visvikis et al., 2010). Les toxines LCTs (Large Clostridial Toxins) comprennent principalement les toxines A et B de *Clostridium difficile*, la toxine létale (LT) et la toxine hémorragique (HT) de *Clostridium sordelli* et la toxine alpha de *Clostridium novyi*. Les LCTs modifient les GTPases Rho par mono-glycosylation (Aktories et al., 2011). Par exemple, les toxines A et B de *C. difficile* catalysent la mono-glycosylation de la thréonine 37 de RhoA et l'alpha-toxine de *C. novyi* ou TpeL de *Clostridium perfringens* catalyse la mono-N-acetylglucosamination des GTPases Rho (Just et al., 1995). Les toxines A et B de *C. difficile* catalysent la mono-glycosylation de toutes les GTPases Rho, alors que la toxine létale de *C. sordelli* modifie Ras, Ral, Rap et Rac1 comme seules Rho GTPase (Aktories et al., 2011). Les GTPases Rho une fois qu'elles sont glycosylées ne peuvent plus être activées par les GEF et restent insensibles aux GAP. De plus, l'encombrement stérique induit par la glycosylation empêche la liaison de la GTPase aux effecteurs et inhibe les voies de signalisation médiées par ces protéines. La thréonine 37 est également ciblée par l'effecteur VopS produit par des souches pathogènes de *Vibrio parahaemolyticus*. VopS catalyse l'adénylation de cette thréonine ce qui inactive les GTPases Rho et inhibe l'assemblage de l'actine dans les cellules infectées (Yarbrough et al., 2009). En proximité de la

thréonine 37, la tyrosine 32 de Rac1 (34 chez RhoA) est aussi la cible d'AMPylation par le facteur LbpA d'*Histophilus somni* (Aktories et al., 2011).

Certaines bactéries appartenant au genre *Yersinia* inactivent les Rho GTPases par clivage protéolytique de la boîte « CAAX » qui assure l'ancrage de la GTPases à la membrane. Les GTPases Rho accumulées dans le cytoplasme n'agissent plus sur leurs effecteurs membranaires (Shao et al., 2003). C'est le cas des souches de *Yersinia enterocolitica* qui produisent le facteur de virulence YopT (*Yersinia* outer protein). YopT est une cystéine protéase qui clive la partie carboxy-terminale qui permet l'ancrage à la membrane des GTPases Rho1, Rac1 et Cdc42 (Shao et al., 2003). Il en résulte une inactivation des GTPases Rho entraînant un remodelage du cytosquelette d'actine de la cellule hôte infectée ce qui contribue à conférer à *Y. enterocolitica* des propriétés anti-phagocytaires.

II.4.2 Les toxines activatrices des RhoGTPases

Certaines bactéries pathogènes produisent des toxines AB et des effecteurs injectés qui induisent une activation des Rho GTPases.

Certains effecteurs ont un effet « GEF-like » sur les GTPases Rho. Par exemple, les bactéries *Salmonella enterica* sérovar *Typhimurium* injectent dans la cellule hôte les facteurs de virulence SopE, SopE2 et SopB. Ces effecteurs activent des Rho GTPases spécifiques par un processus de type GEF direct (SopE et SopE2) ou indirect (SopB) (Patel and Galán, 2006). SopE peut activer Rac, Cdc42 et RhoG directement alors que SopE2 active plus spécifiquement Cdc42 (Fu and Galán, 1999; Patel and Galán, 2006). D'un point de vue structural, la protéine SopE fixe et immobilise les régions switch I et switch II de Rac et Cdc42 dans une conformation qui induit la perte du GDP et favorise le chargement en GTP (Buchwald et al., 2002). L'effecteur SopB module le flux de phospholipides ce qui entraîne une activation de RhoG via un facteur d'échange cellulaire SGEF (SH3-containing Guanine nucleotide Exchange Factor) (Patel and Galán, 2006). L'activation des GTPases entraîne des réponses variées au niveau de la cellule infectée notamment le remodelage du cytosquelette d'actine permettant l'entrée des bactéries dans les cellules mais aussi la production de cytokines proinflammatoires comme l'IL-8 (Keestra et al., 2013; Munro et al., 2004). Ces mécanismes complexes d'activation des GTPases Rho par les *S. Typhimurium* constituent un exemple remarquable d'exploitation des mécanismes cellulaires de l'hôte par un agent pathogène. D'autres bactéries pathogènes produisent des toxines qui entraînent des modifications activatrices des GTPases Rho. La glutamine 63 de Rho (61 de Rac et Cdc42) située dans le domaine switch II joue un rôle clé dans la catalyse de l'hydrolyse du GTP intrinsèque et médiée par les GAPs (Rittinger et al., 1997; Scheffzek et al., 1997). Les toxines DNT (Dermonecrotic Toxin) de *Bordetella* et CNF1 d'*E. coli* catalysent la déamidation spécifique de la glutamine 63 de RhoA (61 de Rac1 et Cdc42) en acide glutamique. Cela entraîne l'activation permanente des Rho GTPases suivie de leur polyubiquitylation et ciblage à la

dégradation par le protéasome (Doye et al., 2002; Flatau et al., 1997; Lemichez and Aktories, 2013). Le paragraphe III.5 détaille les mécanismes impliqués dans l'activation de Rac1 en présence de CNF1 et de l'ubiquitylation de la forme active de Rac1 par le protéasome.

Enfin certaines toxines bactériennes activent de façon indirecte les GTPases Rho en ciblant des régulateurs amont de ces protéines. C'est l'exemple de la toxine PMT (*Pasteurella multocida* Toxin) produite par *Pasteurella multocida* qui active indirectement RhoA via la régulation de plusieurs familles de protéines G hétérotrimériques (Lemichez and Aktories, 2013; Preuss et al., 2009).

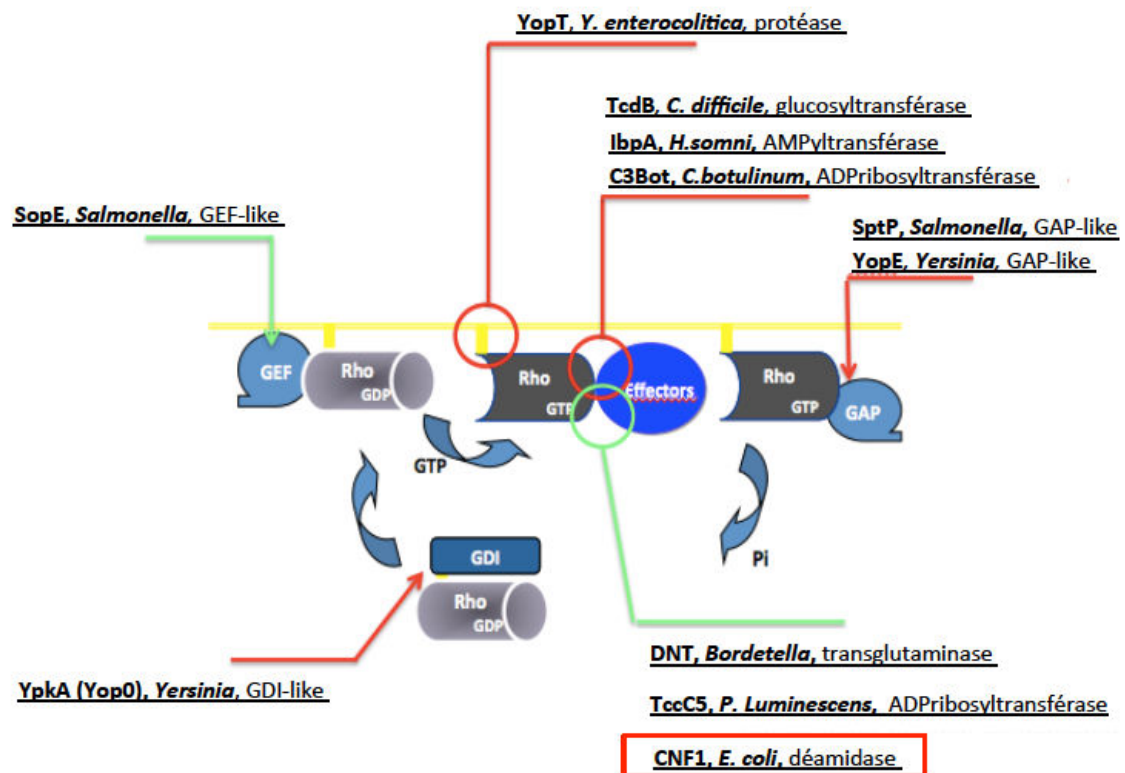


Figure 17 : Toxines bactériennes ciblant les étapes clés du cycle d'activation des Rho GTPases.

Exemples de facteurs de virulence de différentes bactéries ciblant les étapes du cycle des Rho GTPases. Ces toxines agissent soit directement sur les GTPases Rho, soit en mimant l'activité des facteurs de régulation GEFs et GAPs. La toxine CNF1 produite par certaines souches d'*E. coli* uropathogènes entraîne une déamidation des Rho GTPases qui conduit à l'activation permanente de celles-ci. D'après Lemichez & Aktories, 2013.

II.5 Rac1 : une Rho GTPases essentielle

Les GTPases Rho sont des protéines qui contrôlent des processus essentiels de la cellule. Les GTPases RhoA, Rac1 et Cdc42 sont les plus étudiées du fait de leur rôle dans la régulation du cytosquelette d'actine. Elles sont également impliquées dans la production de seconds messagers, la transduction de signaux de croissance et d'ancrage cellulaire, le trafic des vésicules, la régulation de la transcription et le cycle cellulaire (Heasman and Ridley, 2008). Au cours de ma thèse je me suis intéressé à la protéine Rac1 qui est la cible privilégiée de la E3 ubiquitine-ligase HACE1 (Torrino et al., 2011). Les fonctions cellulaires et physiologiques de Rac1 ainsi que l'implication de la dérégulation de cette protéine dans la tumorigénèse sont développées et discutées dans les paragraphes II.5.1 et II.5.2.

II.5.1 Rac1 a un rôle crucial dans la biologie de la cellule

De par leur homologie de séquence, les protéines Rac1, Rac2, Rac3 et RhoG forment une sous-famille au sein des GTPases Rho (Boureux et al., 2007). La protéine Rac1, la plus étudiée, est exprimée de façon ubiquitaire dans les tissus humains, Rac2 est exprimée essentiellement par les cellules d'origine hématopoïétiques et Rac3 majoritairement dans le cerveau (Heasman and Ridley, 2008). La délétion du gène codant Rac1 est létale pour la souris et ce à un stade précoce de l'embryogénèse. Cela souligne le rôle fondamental de cette protéine en biologie cellulaire et du développement (Sugihara et al., 1998; Tan et al., 2008). Rac1 contrôle un grand nombre de processus cellulaires dont les principaux sont détaillés ci-dessous.

II.5.1.1 Rac1 régule la polymérisation de l'actine et contrôle la migration cellulaire

Le cytosquelette d'actine est un système dynamique qui confère une plasticité morphologique à la cellule. Cette plasticité est nécessaire pour l'adaptation de la cellule à son environnement et pour sa migration. Le cytosquelette d'actine est composé d'actine filamenteuse (actine F), formant un réseau de filaments droits ou branchés, générée par assemblage/désassemblage dynamique de monomères d'actine globulaire (actine G), et de protéines associées (Carlier and Shekhar, 2017). Les filaments d'actine peuvent s'assembler en structures plus complexes de type réseau ou câble du fait de l'action de protéines liant l'actine.

Les Rho GTPases sont les régulateurs majeurs du cytosquelette d'actine (Heasman and Ridley, 2008). L'activation des effecteurs de Rac1 et de Cdc42 contribue au réarrangement du cytosquelette d'actine. Une fois activé Rac1 induit, *via* WAVE (Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP)-family verprolin homologous protein) et PAK, la polymérisation de l'actine corticale pour former des protrusions membranaires de type lamellipodes. L'activation de Cdc42 régule *via* N-WASP la formation de protrusions membranaires de type filopodes (Jaffe and Hall, 2005). Plusieurs mécanismes sont mis en jeu à l'échelle moléculaire. Rac1-GTP régule la formation de filaments d'actine branchés. Cela comprend

l'induction de l'assemblage des filaments en agissant sur la synthèse du phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphate (PIP2). D'autre part, Rac1-GTP active la sérine/thréonine Kinase PAK qui active à son tour la LIM kinase responsable de la phosphorylation et de l'inhibition de la cofiline, ce qui stabilise l'actine filamenteuse. Enfin, Rac1 active par l'intermédiaire d'IRSp53 les protéines WAVE qui recrutent le complexe de nucléation ARP-2/3 (actin-related protein-2/3) permettant la formation de nouveaux polymères d'actine branchée à partir de filaments déjà existants (Amann and Pollard, 2001). Cette arborisation des filaments d'actine est importante pour la formation des lamellipodes. Ces projections membranaires permettent à la cellule de se déformer et facilitent la migration et la phagocytose. La polymérisation de l'actine corticale par Rac1 permet l'assemblage de structures d'adhérence naissantes en points focaux qui servent de point d'ancrage à la matrice extracellulaire pour faciliter la migration et régulent la croissance cellulaire (Figure 18).

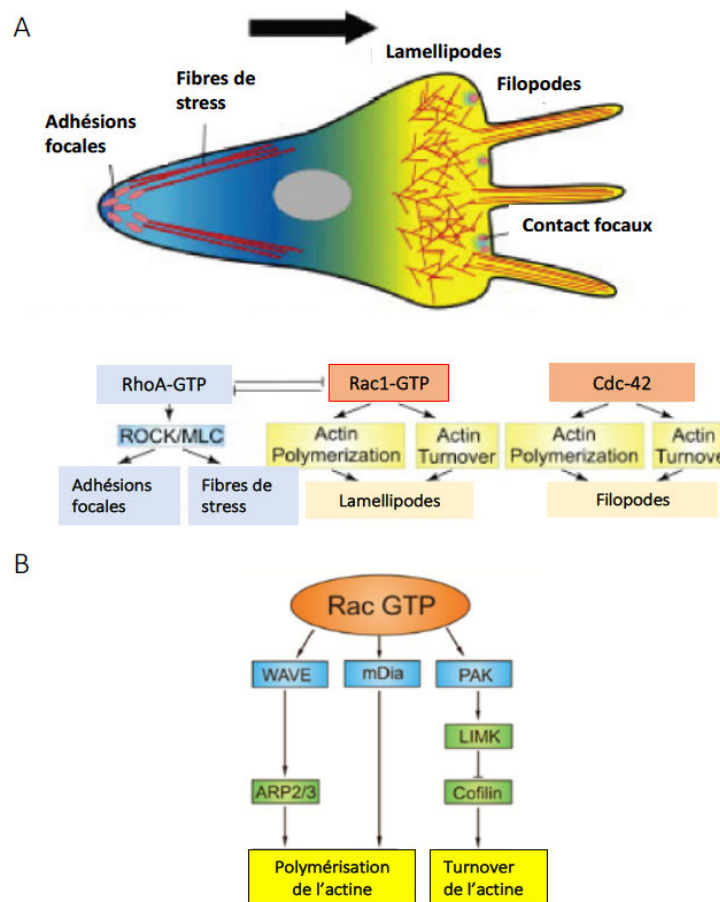


Figure 18 : Rôle clé de Rac1 dans la régulation du cytosquelette d'actine et du contrôle de la migration cellulaire.

A. RhoA, Rac1 et Cdc42 sont capables de réguler le cytosquelette pour contrôler la forme, la polarité, l'attachement et la mobilité cellulaire. La protéine RhoA est surtout impliquée dans la formation de fibres de stress et d'adhésions focales. Rac1 favorise la formation de lamellipodes et Cdc42 induit la formation de filopodes. B. La forme activée de Rac1 liée au GTP active des effecteurs d'aval qui permettent de contrôler le remodelage de l'actine. D'après Mayor & Carmona-fontaine, 2010 et Draber *et al.*, 2012.

II.5.1.2 Rac1 régule l'expression de cytokines inflammatoires et contrôle l'immunité

Les GTPases Rac participent, au même titre que les autres familles de Rho GTPases, à la régulation de l'expression génique (Etienne-Manneville and Hall, 2002). Rac1 régule notamment l'expression de gènes impliqués dans la réponse inflammatoire, croissance et résistance à l'apoptose. En réponse à des stimuli extérieur variés (choc thermique, facteurs de croissance, cytokines pro-inflammatoires) l'activation de Rac1 induit en aval, celle de certaines MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) dont la Jun NH2-terminal kinase (JNK) et la kinase MAP p38 (Boyer et al., 2004; Liu et al., 2007; Munro et al., 2004). Ces protéines kinases activées phosphorylent à leur tour dans le noyau les sous unités des facteurs de transcription AP1 (activator protein 1) notamment JUN et ATF2 (activation transcription factor 2) et induisent l'expression de nombreux gènes impliqués dans le contrôle de l'inflammation, de la survie et de la croissance cellulaire.

L'activation des GTPases Rho, notamment Rac1 et cdc42 par la toxine CNF1 d'*E. coli* induit l'activation de NF- κ B *via* la dégradation I κ B- α (Munro et al., 2004). Par ailleurs, Rac active les kinases de la famille RIP pour contribuer à l'activation de NF- κ B dépendante de NOD1 permettant la transcription de gènes inflammatoires important pour la réponse immunitaire (Boyer et al., 2011; Keestra et al., 2013). De plus, l'activation par Rac2 (homologue de Rac1) de la caspase 1 pour déclencher la maturation et la sécrétion d'IL1- β est un phénomène qui semble nécessaire à l'élimination des *E. coli* au cours de la bactériémie (Diabate et al., 2015). Cette inflammation induite par les facteurs de virulence activateurs de Rac est retrouvée dans l'infection par certains agents pathogènes à Gram-négatif, notamment *E. coli*, *Salmonella spp*, *Chlamydia spp*. (Diabate et al., 2015; Keestra et al., 2013; Rippere-Lampe et al., 2001).

II.5.1.3 Rac1 contrôle l'expression de la cycline D1 et régule le cycle cellulaire

Un grand nombre de facteurs sont impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire et leur dérégulation peut entraîner l'acquisition d'un phénotype néoplasique par prolifération cellulaire incontrôlée. L'activité de Rac1 est essentielle dans le contrôle de la transition du stade G1 en phase S, notamment *via* la régulation du niveau d'expression de la cycline D1. L'inhibition de Rac1 entraîne un arrêt du cycle cellulaire en phase G1.

A l'état physiologique, la cycline D1 active les « cyclin-dépendant kinases » 4 et 6 (CDK 4 et 6) qui phosphorylent notamment la protéine Rétinoblastome (Rb), un suppresseur de tumeur, et d'autres membres de la famille Rb (p107 et p130). Ce mécanisme induit le relargage du facteur de transcription E2F1. Ce facteur favorise la transcription de gènes essentiels à la réplication de l'ADN et donc à l'entrée en phase S et notamment les gènes codant pour les cyclines A et E (Mack et al., 2011a; Musgrove et al., 2011). La cycline D1 est aussi essentielle pour la transformation oncogénique médiée par Ras et ses niveaux d'expression sont élevés dans les cellules cancéreuses (Kim and Diehl, 2009).

La régulation des niveaux protéiques de cycline D1 se fait au niveau transcriptionnel, traductionnel et post-traductionnel. Rac1, notre protéine d'intérêt, est impliquée dans ces mécanismes de régulation à différents niveaux (transcriptionnel et traductionnel) et participe ainsi au contrôle du cycle cellulaire (Ridley, 2001a).

II.5.1.3.1 Rac1 contrôle l'expression de la cycline D1 au niveau transcriptionnel

Initialement, Joyce *et al.* ont montré que l'activation de Rac1 entraîne la stabilisation et la liaison de NF- κ B sur des sites ATF-2 et NF- κ B situés sur le promoteur du gène de la cycline D1, et induit ainsi une activation de la transcription de la cycline D1 (Joyce et al., 1999; Ridley, 2001a). D'autre part Rac1 contrôle l'activation de certaines isoformes de la NADPH oxydase et ainsi la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO). L'activité de NF- κ B étant augmentée par les ERO, cela peut contribuer à la transcription Rac1-dépendante de la cycline D1 et induire ainsi la prolifération cellulaire (Joneson and Bar-Sagi, 1998). Plus récemment, une étude a montré que Rac1 contrôle également la transcription de la cycline D1 de façon NF- κ B-indépendante, et cela en activant la MAP-kinase ERK dans des cellules MEF (Mouse embryonic fibroblast) (Klein et al., 2007).

II.5.1.3.1 Rac1 contrôle l'expression de la cycline D1 au niveau traductionnel

Rac1 régule également la traduction de la cycline D1. Une étude de Mettouchi *et al.* montre que la stimulation de cellules endothéliales HUVEC's par de la fibronectine, active les intégrines $\alpha 5 \beta 1$ et une voie de signalisation en aval impliquant PI3K/SOS (SOS est une protéine qui comprend un domaine GEF de Ras et un domaine GEF de Rac1). Ce signal induit l'activation de Rac1 puis la traduction de la cycline D1. D'une manière intéressante, la régulation traductionnelle de la cycline D1 par Rac1 est parallèle à la voie ERK. En effet l'activation de l'intégrine $\alpha 2 \beta 1$ par la laminine induit une activation de ERK sans une activation de Rac1. Dans ce contexte, l'activation de ERK promeut la transcription de la cycline D1, mais est insuffisante pour induire sa synthèse protéique, et les cellules sont incapables de rentrer en phase S. Ce phénotype est reversé par l'expression de Rac1 actif, ce qui démontre le rôle fondamental de l'activation de Rac1 dans la traduction de la cycline D1. Le mécanisme découvert par Mettouchi *et al.* semble important pour le bourgeonnement vasculaire durant l'angiogenèse (Mettouchi et al., 2001; Ridley, 2001a) (Figure 19).

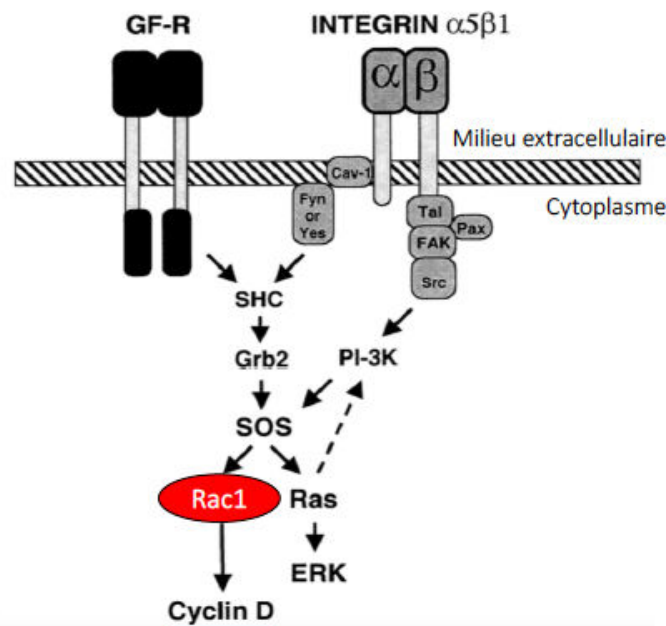


Figure 19 : Rac1 contrôle l'expression de la cycline D1 au niveau traductionnel.

La stimulation des cellules HUVECs par de la fibronectine active les intégrines $\alpha 5 \beta 1$ et stimule une voie de signalisation en aval qui implique PI3 kinase et SOS. Ce signal induit l'activation de Rac1 puis la traduction de la cycline D1. D'après Mettouchi *et al.*, 2001.

II.5.2 Rôle de Rac1 dans la tumorigénèse

Rac1 participe à la régulation de nombreux processus biologiques impliqués dans l'homéostasie cellulaire et tissulaire, dont certains ont été détaillés précédemment (paragraphe II.5.1). La dérégulation de Rac1 peut notamment favoriser la transformation cancéreuse, la survie cellulaire et la résistance à l'apoptose, la progression du cycle cellulaire, la migration cellulaire métastatique, la néo-angiogenèse tumorale, l'inflammation et la résistance aux supprimeurs de tumeurs (Mack *et al.*, 2011b; Orgaz *et al.*, 2014) (Figure 20). Sous l'influence de facteurs génétiques et environnementaux, la dérégulation de la GTPases Rac1 peut donc entraîner une modification des voies de signalisation en aval de Rac1 et favoriser les processus de tumorigénèse.

Depuis l'avènement des techniques de séquençage à haut débit, le séquençage de différents types de tumeurs humaines a permis de montrer que Rac1 et ses activateurs GEFs sont surexprimés dans les cancers du sein, du testicule, de la prostate et dans différents types de leucémies (Engers *et al.*, 2007; Fritz *et al.*, 1999; Kamai *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2009); Rac1b variant constitutivement activé de Rac1, par épissage alternatif, est surexprimé dans les adénocarcinomes du colon, les cancers du seins (Jordan *et al.*, 1999; Schnelzer *et al.*, 2000). Zhou *et al.* ont montré en séquençant des tumeurs pulmonaires que Rac1b est surexprimé dans les cancers pulmonaires non à petites cellules. Dans cette même étude, les auteurs suggèrent une l'implication de Rac1b dans la transformation cellulaire induite par K-Ras dans un modèle de cancer pulmonaire chez la souris (Zhou *et al.*, 2013).

Récemment des données issues de séquençage de mélanomes montrent que 5% à 9% des tumeurs séquencées possèdent des mutations ponctuelles sur le gène *rac1*, et notamment la mutation P29S qui porte la signature d'une mutation UV (Hodis et al., 2012). De façon intéressante, la mutation ponctuelle P29S, qui confère à Rac1 un gain de fonction, est la plus fréquemment retrouvée dans ce type de mélanome (« hotspot »). Elle est aussi la plus fréquente des mutations d'une petite Rho GTPase. Cette mutation est aussi retrouvée dans des cancers cutanés types SCC et dans des cancers du sein (Kawazu et al., 2013; Stransky et al., 2011). D'autres mutations activatrices de Rac1 ont pu être mises en évidence dans des lignées cancéreuses (N92I et C157Y) (Kawazu et al., 2013).

De plus, des études *in-vivo* réalisées sur différents modèles murins confirment le rôle pro-oncogénique de Rac1 (Mack et al., 2011a). Par exemple, Kissil *et al.* ont montré que Rac1 est essentiel au développement tumoral dans un modèle d'adénocarcinome pulmonaire murin induit par K-Ras. En effet, dans ce modèle, les cellules KO de *rac1* entraînent une réduction de la croissance tumorale et les souris ont une survie prolongée par rapport aux souris contrôles. Ce dernier point renforce l'aspect essentiel de Rac1 dans le développement de la tumorigénèse induite par K-Ras (Kissil et al., 2007). Rac1 est aussi un élément important en aval de la voie de signalisation WNT/ β -caténine (Wu et al., 2008). Dans les cancers du côlon, la perte fréquente de fonctionnalité d'APC entraîne une sur-activation de la voie WNT ce qui stabilise la β -caténine et induit l'augmentation des niveaux de β -caténine nucléaire. Ce phénomène est à l'origine de l'initiation du cancer. Rac1 est un élément clé, en aval de la perte d'expression d'APC, pour l'induction d'une hyperprolifération de cellules souches intestinales de type LGR5 positive. Ceci met en jeu l'augmentation de la production d'EAO et l'activation de NF- κ B médiées par Rac1 (Myant et al., 2013).

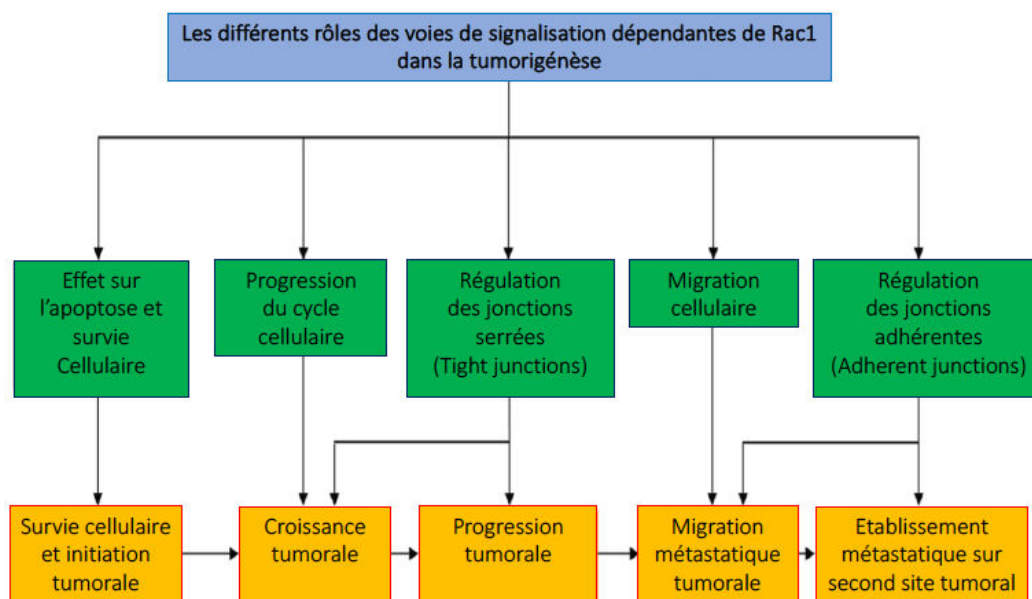


Figure 20 : L'implication de Rac1 dans les différentes phases de la tumorigénèse. D'après Mack *et al.*, 2011.

III. La toxine CNF1 d'*Escherichia coli*

III.1 Découverte de CNF1 et homologues de CNF1

CNF1 a été découverte en 1983 par Caprioli *et al.* qui ont purifié cette toxine et identifié son gène à partir d'une souche d'*E. coli* pathogène extra intestinale (ExPEC) isolée d'un enfant présentant une diarrhée aiguë sévère. Cette toxine est également appelée facteur cytotoxique nécrosant 1 car elle induit une nécrose de la peau de lapin après injection sous-cutanée et elle provoque la mort des souris après injection intra-péritonéale (Caprioli *et al.*, 1983).

Il existe trois isoformes connues du facteur cytotoxique nécrosant produites par différentes souches d'*Escherichia coli* : CNF1, CNF2 et CNF3. Chez l'homme, CNF1 est majoritairement produit par des souches d'*E. coli* isolées à partir d'infections extra-intestinales en particulier urinaires, mais également par des souches d'*E. coli* responsables de diarrhées aiguës de l'enfant (De Rycke *et al.*, 1990). La toxine CNF2 est produite par des souches d'*E. coli* isolées chez des animaux et en particulier des porcelets ou des veaux présentant des diarrhées ou des septicémies (De Rycke *et al.*, 1990; Oswald *et al.*, 1989). CNF2 présente une homologie de séquence protéique de 85% avec CNF1 (Oswald *et al.*, 1994). La toxine CNF3, qui présente 70% d'homologie de séquence protéique avec CNF1, est principalement produite par des souches nécrotoxigéniques d'*E. coli* d'origine animale (serpents et moutons) (Knust and Schmidt, 2010; Orden *et al.*, 2007). Des homologues de CNF1 existent également chez d'autres espèces bactériennes. Par exemple, CNF_Y produite par *Yersinia pseudotuberculosis* est un homologue protéique à 61% de CNF1 (Knust and Schmidt, 2010; Lockman *et al.*, 2002). Certaines souches bactériennes appartenant au genre *Vibrio* produisent un effecteur de virulence VopC homologue au domaine catalytique de CNF1, injecté dans les cellules cibles par le système de sécrétion de type III (Okada *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2012).

III.2 Support génétique et contrôle transcriptionnel du gène *cnf1*

Le gène *cnf1* comme le gène *cnf3* est localisé sur le chromosome bactérien. Le gène *cnfy* de *Yersinia pseudotuberculosis* a également un support chromosomique. Le gène *cnf2* est quant à lui codé par le plasmide *vir* (Knust and Schmidt, 2010; Oswald *et al.*, 1994).

Le gène qui code pour la toxine CNF1 est localisé au sein d'un « îlot de pathogénicité » (PAI). Un îlot de pathogénicité est une région d'ADN de la bactérie qui est bordée par des séquences répétées. Cette région contient un pourcentage de GC différent du reste du génome de la bactérie ce qui signe l'acquisition de matériel génétique étranger. L'îlot de pathogénicité contient au moins un gène de virulence qui confère à la bactérie son caractère « pathogène » (Hacker *et al.*, 1997). Par exemple le gène *cnf1* est situé dans le PAI-II_{J96} qui code aussi pour l'alpha-hémolysine et le P-fimbriae et confère à la souche J96 d'*E. coli* son caractère uropathogène (Blum *et al.*, 1995; Landraud *et al.*, 2003). Des études

épidémiologiques montrent que plus de 90% des souches d' *E. coli* possédant le gène *cnf1* ont également l'opéron codant pour la production, activation et sécrétion de l'hémolysine-alpha (Yamamoto et al., 1995). De façon intéressante les gènes de l'opéron *hlyCABD* et *cnf1* sont soumis à une co-régulation transcriptionnelle sous le contrôle du facteur RfaH (Landraud et al., 2003). En effet, le facteur RfaH permet la transcription d'un ARN long comprenant *hlyCABD* et le gène *cnf1*. CNF1 est produit exclusivement à partir de l'ARNm long comprenant *hlyCABD* et non à partir d'un transcrit initié à partir de son propre promoteur (Landraud et al., 2003). RfaH se fixe au niveau de l'*ops*/JumpSart (« operon polarity suppressor, just upstream of many polysaccharide associated gene starts ») situé en aval du promoteur de *hlyCABD*. Son effet anti-terminateur lui permet de passer les structures « Rho terminateur » situées entre les gènes *hlyA* et *hlyB* et ainsi de poursuivre la co-transcription des gènes situés en aval de *hlyB*, notamment *cnf1*. L'inactivation du gène *rfaH1* induit une diminution de la production de la toxine CNF1 (Landraud et al., 2003) (Figure 21). Ce mécanisme de co-régulation transcriptionnelle/traductionnelle suggère la possibilité d'un lien fonctionnel entre les toxine CNF1 et l'α-hémolysine. Une étude récente menée au laboratoire confirme le rôle clé de la co-expression d'α-hémolysine lors des bactériémies à UPEC pour bloquer la réponse inflammatoire de l'hôte induite par CNF1 et permettre une stabilisation bactérienne dans le sang qui aboutit à une mortalité accrue (Diabate et al., 2015).

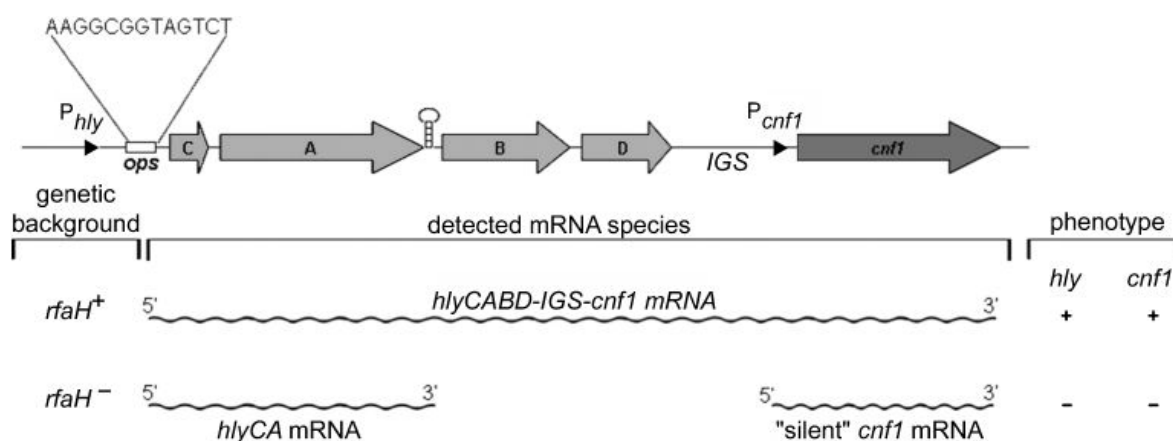


Figure 21 : Organisation génétique de la région *hlyCABD-cnf1*.

L'opéron *hlyCABD* est représenté par les flèches en gris clair et le gène *cnf1* par la flèche en gris foncé. L'épingle à cheveux indique la structure de type Rho terminateur. D'après Lemmonier *et al.*, 2007.

III.3 Relation structure-fonction de CNF1 : toxine A/B-like

Un grand nombre de bactéries pathogènes produisent des toxines de type « A-B ». Ces toxines comportent une partie « A » qui possède l'activité catalytique et une partie « B » (binding) de liaison au récepteur sur la cellule hôte et qui assure la translocation de la partie A dans le cytosol.

CNF1 est une toxine de type « A-B like » de 114kDa produite sous forme d'une chaîne polypeptidique (Falbo et al., 1993). Un site de clivage protéolytique situé entre les acides aminés 532 et 544 est capable de libérer la partie A de la partie B à la surface des cellules (Knust et al., 2009). Cette toxine possède une organisation tout d'abord décrite en trois domaines fonctionnels nécessaires au processus d'intoxication : un domaine N-terminal de liaison au récepteur, un domaine possédant l'activité catalytique en position C-terminale et une partie médiane qui relie ces deux domaines (Lemichez et al., 1997). La forme précurseur du récepteur de la laminine p37/LRP (forme 37-kDA) et la forme mature p67/LR ont d'abord été décrites comme récepteurs du CNF1. CNF1 peut se lier à ces récepteurs grâce à deux sites d'interactions : l'un qui est situé sur la partie N-terminale (acides aminés 135-164) et l'autre qui jouxte et chevauche la partie C-terminale de la toxine (acides aminés 683-730) (Chung et al., 2003; McNichol et al., 2007). Plus récemment il a été suggéré que la toxine peut également se lier *via* son domaine carboxy-terminal à un autre récepteur membranaire : la protéine d'adhérence Lu/BCAM (Piteau et al., 2014) (Figure 22). L'association de CNF1 à deux récepteurs chacun localisé à une extrémité de la toxine, permettrait d'assurer une cohésion des domaines A et B après clivage à la surface cellulaire sans que ces derniers soient retenus par un pont disulfure comme dans le cas des toxines diphtériques ou tétaniques. L'association aux récepteurs entraîne l'internalisation de la toxine dans la cellule par une voie d'endocytose indépendante de la clathrine et de la cavéoline (Contamin et al., 2000). Par la suite, l'acidification du compartiment endosomal tardif entraîne l'insertion des deux hélices hydrophobes H1 (acides aminés 350-372) et H2 (acides aminés 387-412) de la partie médiane de la toxine dans la bicouche lipidique de l'endosome. On pense que ce mécanisme induit la translocation de la partie C-terminale de la protéine dans le cytosol de la cellule, à l'image du processus de translocation de la toxine diphtérique (Pei et al., 2001). L'extrémité carboxy-terminale contient l'activité catalytique de CNF1 (Lemichez et al., 1997). Cette région catalyse la déamidation de la glutamine 63 de RhoA ou de la glutamine 61 de Rac1 et Cdc42 en acide glutamique (Buetow et al., 2001; Flatau et al., 1997; Schmidt et al., 1997). Cette modification post-traductionnelle entraîne l'activation permanente des Rho GTPases (Figure 23).

III.4 Effet de CNF1 sur la biologie cellulaire

La toxine CNF1, de par son effet sur l'activité des GTPases de la famille Rho, entraîne des changements biologiques des cellules intoxiquées. Ces effets cytotoxiques comprennent principalement l'induction d'une réponse génétique pro-inflammatoire et anti-apoptotique, la production d'espèces réactives de l'oxygène, l'activation du cycle cellulaire, la macro-pinocytose ainsi que la réorganisation du cytosquelette d'actine associée à la cohésion des cellules épithéliales et à l'induction de la migration cellulaire.

III.4.1 CNF1 et inflammation

La toxine CNF1 régule la production de molécules pro-inflammatoires. En effet, une étude systématique menée dans notre laboratoire par analyse de la réponse génétique sur puces à ADN montre que CNF1, en activant les GTPases Rac1 et Cdc42, stimule la réponse inflammatoire et en particulier la production des régulateurs MIP-3 α , MCP-1, IL-8 et E-selectine (Munro et al., 2004). Les GTPases RhoA, Rac1 et Cdc42 sont capables d'activer le facteur de transcription NF- κ B qui permet la transcription de médiateurs de l'inflammation (Perona et al., 1997). De façon intéressante, l'activation des GTPases Rho par CNF1 conduit à l'activation des kinases p38 et JNK mais également à l'activation de la voie NF- κ B *via* la dégradation d'I κ B- α (Boyer et al., 2004; Miraglia et al., 2007; Munro et al., 2004). Des études plus récentes montrent que l'état d'activation des GTPases Rho contrôle l'activité d'un complexe de maturation de l'IL-1 β et IL-18 de type inflammasome, i.e. comprenant ASC et caspase 1 (Aubert et al., 2016; Xu et al., 2014). L'inactivation de RhoA conduit à une activation du complexe pyrine-inflammasome alors que l'activation de Rac1 par CNF1 conduit probablement à l'activation d'un complexe encore mal défini comprenant ASC/caspase-1 (Diabate et al., 2015; Eitel et al., 2012).

De par leurs propriétés d'induction de la voie NF- κ B, les GTPases Rho contrôlent la transcription de cytokines proinflammatoires, de chimiokines et de molécules d'adhésion qui favorisent la migration des leucocytes vers les sites de l'infection.

L'ensemble de ces travaux montre que la toxine CNF1 produite par certaines bactéries pathogènes est capable de moduler le niveau de la réponse immunitaire innée de l'hôte en contrôlant étroitement l'équilibre entre activation et dégradation protéasomale des Rho GTPases. En outre, cette capacité de régulation des GTPases et de la réponse immunitaire confère à CNF1 des propriétés d'immuno-adjuvant offrant des possibilités d'application en vaccinologie et d'immunothérapie antimicrobienne (Diabate et al., 2015; Michel et al., 2016; Munro et al., 2007; 2005).

III.4.2 CNF1 entraine l'inhibition de la cytodierèse et favorise la progression du cycle cellulaire

La cytodierèse est la division de la cellule lors de la télophase de la mitose. Elle permet d'obtenir, à partir d'une cellule mère, deux cellules filles identiques. Au cours de ce processus, la membrane plasmique s'invagine progressivement autour de la cellule dans le plan équatorial. Un anneau contractile constitué d'actine et de myosine se forme alors et entraine la scission en deux cellules filles. Les premiers travaux réalisés sur le facteur CNF1 montrent que cette toxine peut être capable d'inhiber la cytodierèse de cellules HEp-2 et HeLa et ainsi d'induire une multinucléation de ces cellules en culture (Caprioli et al., 1984; Falbo et al., 1993). Ce test classique de multinucléation est utilisé pour évaluer l'activité spécifique après purification de CNF1 (Doye et al., 2006). De façon surprenante l'inhibition des GTPases Rho et Cdc42 bloque la cytodierèse des cellules de mammifères et l'expression de mutants actifs de ces GTPases inhibe également ce processus. Cela suggère probablement que ces GTPases doivent cycler entre leur état actif lié au GTP et leur état inactif lié au GDP pour permettre un processus normal de division cellulaire (Etienne-Manneville and Hall, 2002).

Par ailleurs, CNF1 agit comme une cyclomoduline qui favorise la progression du cycle cellulaire par des mécanismes encore mal connus faisant intervenir une l'expression de la cycline D1 (Daugaard et al., 2013; Giamboi-Miraglia et al., 2007; Oswald et al., 2005) (cf paragraphe I.2.4.1).

III.4.3 CNF1 et remodelage du cytosquelette d'actine

Le cytosquelette d'actine est finement régulé par les GTPases Rho, ce qui permet aux cellules de moduler leur forme, leur polarité, leur attachement en fonction de leur environnement pour leur conférer des capacités de migration et de phagocytose (Heasman and Ridley, 2008). Comme évoqué précédemment, Rac1 induit la formation de lamellipodes et Cdc42 de filopodes. La protéine RhoA induit la formation de câbles d'actine, appelés fibres de stress et de points d'adhésion focaux responsables de l'ancrage des cellules à la matrice extracellulaire (Jaffe and Hall, 2005; Ridley, 2001b).

Les remaniements du cytosquelette d'actine induits par CNF1 sont eux dépendant du type cellulaire. CNF1 induit des filopodes dans les cellules HEK293, lamellipodes dans les cellules HEp-2 et câbles d'actine dans les cellules Vero (Lemonnier et al., 2007). Suite à la découverte de la dégradation des formes activées des GTPases Rho du fait de leur activation par CNF1, nous avons réussi à corrélérer ces différents phénotypes du cytosquelette d'actine à des résistance à la dégradation de ces différents types cellulaires pour l'une ou l'autre des Rho GTPases. En effet les cellules HEK293, HEp-2 et Vero ne dégradent pas spécifiquement les GTPases Cdc42, Rac1 et RhoA (Boyer et al., 2006). Ceci nous a permis de postuler un lien éventuel entre le cancer et la perte du système de dégradation des GTPases Rho. Cette question est pertinente vis-à-vis de la régulation de Rac1 par HACE1 qui est un suppresseur de tumeur avéré.

III.5 Régulation de la GTPase Rac1 par la toxine CNF1

Dans mon travail de thèse, je me suis intéressé en particulier à l'effet de CNF1 sur la GTPase Rac1 de la famille Rho en vue de mieux caractériser son interaction avec HACE1.

III.5.1 Activation de Rac1 par déamidation

La toxine CNF1 catalyse directement la déamidation en acide glutamique de la glutamine 61 de Rac1, située dans le domaine switch2 (Flatau et al., 1997; Schmidt et al., 1997). Cette modification entraîne l'inhibition quasi-complète de l'activité GTPasique intrinsèque de Rac1. Rac1 devient ainsi insensible à l'action des GAPs ce qui provoque une accumulation dans la cellule de sa forme active liée au GTP (Figure 24). Cela confère à la protéine des caractéristiques de mutant dominant positif, capable d'agir de façon soutenue au niveau des effecteurs. L'activation de Rac1 est néanmoins transitoire (Doye et al., 2002).

III.5.2 Contrôle de Rac1 par ubiquitylation et dégradation protéasomale

L'activation de Rac1 induite par CNF1 est transitoire. En effet, l'activation de Rac1 entraîne une sensibilisation à une régulation cellulaire par polyubiquitylation pour un ciblage vers la dégradation par le protéasome 26S (Doye et al., 2002).

III.6 HACE1 contrôle l'activation de Rac1 induite par la toxine CNF1

Au laboratoire, une approche de déplétion de l'ensemble des E3 ubiquitine-ligases à domaine de type HECT a permis de démontrer que HACE1 est responsable de l'ubiquitylation *in vivo* et *in vitro* de Rac1 sous sa forme liée au GTP. Rac1 était alors la première cible identifiée de l'activité ubiquitine-ligase d'HACE1 (Torrino et al., 2011) (Figure 24). Le chapitre IV de l'introduction décrit les mécanismes de régulation par ubiquitylation, et résume les principales découvertes qui attribuent à HACE1 la fonction de protéine suppresseur de tumeurs.

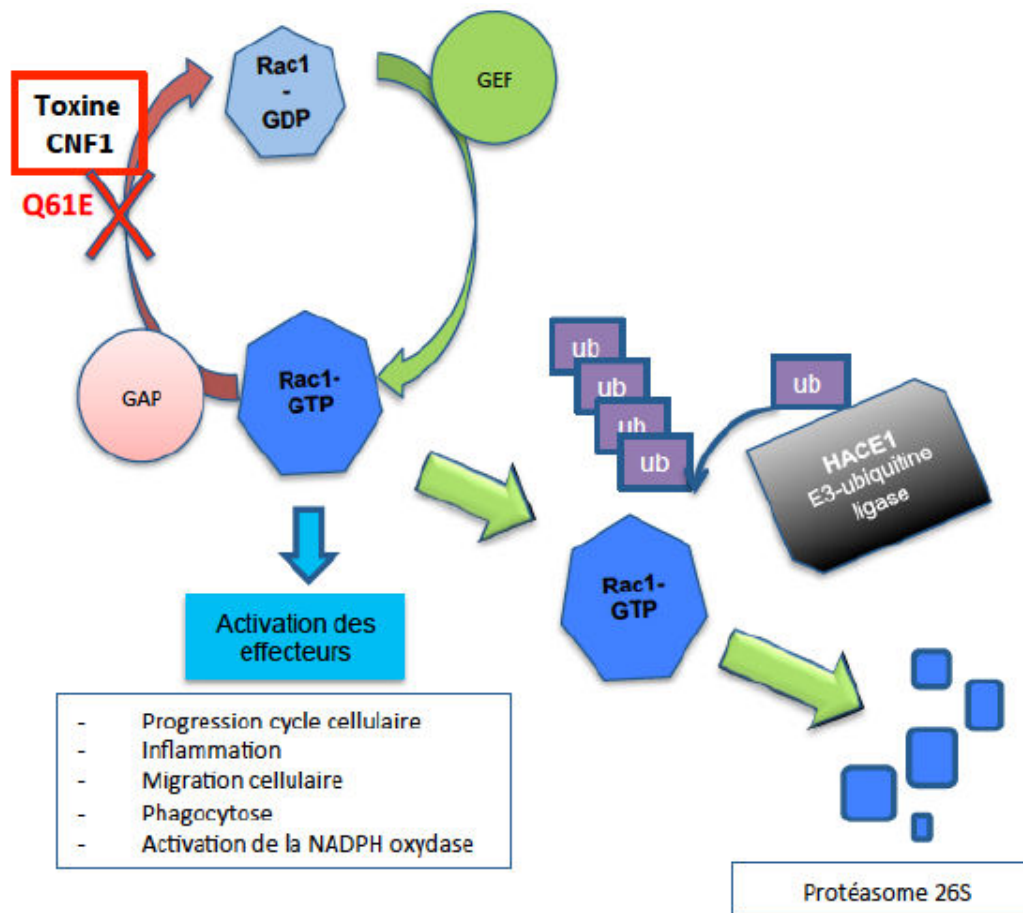


Figure 24 : Représentation schématique de l'axe de régulation CNF1-Rac1-HACE1.

La toxine CNF1 d'*E. coli* entraîne une déamidation spécifique de la glutamine 61 de Rac1 bloquant l'hydrolyse de GTP. Cela entraîne l'activation permanente de la GTPase Rac1 qui devient insensible à l'action des GAP (GTPase activating protein). L'accumulation de la forme active de Rac1 (Rac1-GTP) entraîne une activation des effecteurs favorisant la progression du cycle cellulaire, l'inflammation, la migration cellulaire, la phagocytose et l'activation de la NADPH oxydase. La E3 ubiquitine-ligase HACE1 catalyse l'ubiquitylation de Rac1-GTP induisant sa dégradation par le protéasome 26S.

IV. HECT Domain and Ankyrin repeat containing E3 ubiquitin-protein ligase1: HACE1

Nous avons identifié HACE1 comme une E3 ubiquitine-ligase de Rac1 capable de réguler les niveaux de Rac1-GTP dans les cellules. Rac1, par le contrôle des nombreux processus cellulaires décrits en II.5, est considérée comme une protéine pro-oncogénique contribuant à la croissance et à l'invasion des tumeurs. Il est donc apparu intéressant d'exploiter le lien fonctionnel probable dans le cancer entre Rac1 et HACE1 pour établir leur mode d'interaction. En retour, cela doit permettre de mieux comprendre l'importance de Rac1 comme cible de HACE1 dans son activité de suppression de tumorale.

IV.1 L'ubiquitylation

L'ubiquitylation est une modification post-traductionnelle de protéines. Elle consiste en l'association d'une ou plusieurs molécules d'ubiquitine (mono-ubiquitylation, mono-multiubiquitylation ou poly-ubiquitylation cf paragraphe IV.1.3) par liaison covalente à une lysine ou plusieurs lysines de la protéine substrat.

IV.1.1 La molécule d'ubiquitine

L'ubiquitine est une molécule exprimée de façon ubiquitaire chez les eucaryotes. Cette protéine de 8,5 kDa est constituée d'une séquence polypeptidique de 76 acides aminés remarquablement conservée dans les cellules eucaryotes (Goldstein et al., 1975). La glycine 76 au niveau de l'extrémité C-terminale de l'ubiquitine permet la liaison covalente avec généralement une lysine d'une autre protéine. L'ajout d'une molécule d'ubiquitine sur un ou plusieurs résidus lysine de la protéine substrat entraîne une mono-ubiquitylation ou une multi-ubiquitylation. L'ubiquitine possède également 7 résidus lysines (K6, K11, K27, K29, K33, K48, K63) et une méthionine sur lesquels peuvent se fixer d'autres molécules d'ubiquitine afin de former une chaîne de polyubiquitine de longueur et de conformation variables (Pickart and Eddins, 2004) (Figure 25). Le types d'ubiquitylation (mono-, multi-, poly-ubiquitylation), de même que la position de la lysine portant la chaîne de polyubiquitine sur la protéine substrat constituent des signaux fonctionnels qui déterminent le devenir de cette protéine dans la cellule eucaryote. (cf détails paragraphe IV.1.3) (Komander et al., 2009; Pickart and Eddins, 2004). Il est important de préciser que la molécule d'ubiquitine peut être également retirée d'une protéine ubiquitylée par l'action d'enzymes de déubiquitylation appelées DUBs (deubiquitinating enzymes). Les DUBs clivent spécifiquement l'ubiquitine conjuguée sur la glycine 76 et retirent ainsi les ubiquitines liées au substrat. Cela permet un recyclage des molécules d'ubiquitine et le maintien du pool d'ubiquitine libre dans la cellule (Amerik and Hochstrasser, 2004).

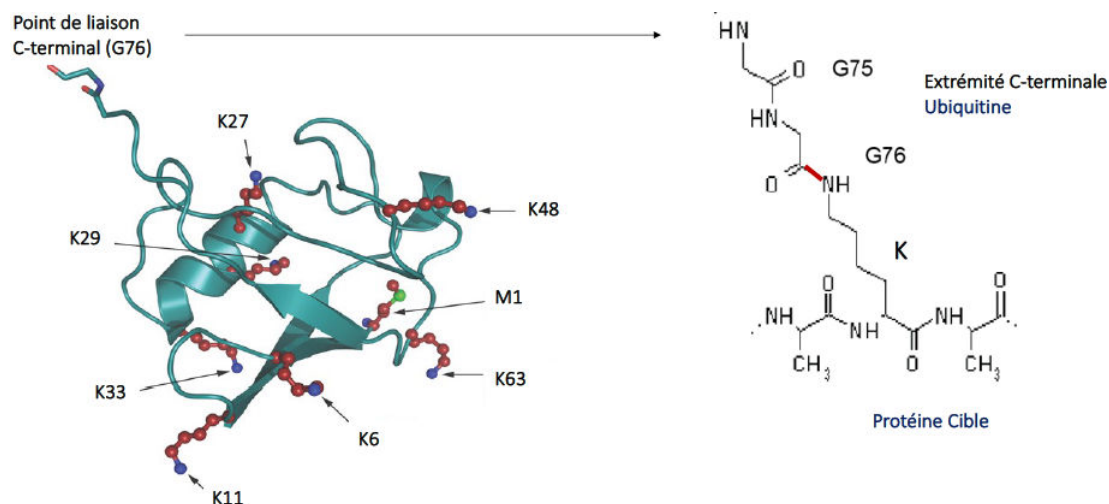


Figure 25 : Représentation tridimensionnelle de l'ubiquitine avec ses 7 lysines et la méthionine M1.

A Gauche. Position des 7 résidus lysines (en rouge avec la fonction amine en bleu) et du résidu méthionine (rouge avec son groupement thiol en vert) en surface de la molécule d'ubiquitine. Les lysines sont réparties sur différents sites de la surface de l'ubiquitine. La méthionine M1 qui constitue le point d'attachement des chaînes linéaires d'ubiquitine, est proche de la lysine 63. L'extrémité C-terminale G75-G76 qui permet la liaison covalente avec la protéine substrat est indiquée (atomes d'oxygène en rouge et fonction amine en bleu). D'après Kommander, 2009. A droite. Représentation de la liaison covalente entre la glycine 76 de l'ubiquitine et la lysine de la cible (en rouge)

Par ailleurs, l'ubiquitine présente à sa surface des acides aminés qui forment des « motifs de reconnaissances » permettant l'interaction non covalente avec des protéines portant des domaines de liaison à l'ubiquitine UBD (Ubiquitin Binding Domain) comme les E3 ubiquitine-ligases et l'ensemble des UBPs (Ubiquitin Binding Proteins) (Dikic et al., 2009; Komander and Rape, 2012; Pickart and Eddins, 2004) (Figure 26).

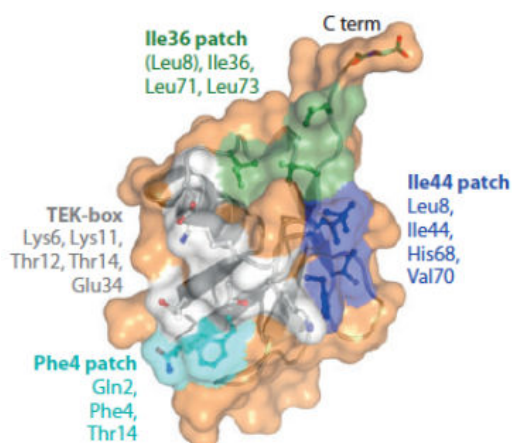


Figure 26 : Représentation de la surface de l'ubiquitine et des motifs de reconnaissance.

Les 4 « motifs de reconnaissance » des UBD situés en surface de la molécule sont indiqués par des couleurs différentes (Ile36 patch, Phe4 patch, Ile44 patch, Tek-box). Les acides aminés qui les composent sont aussi indiqués. D'après Kommander et Rape, 2012.

IV.1.2 La réaction d'ubiquitylation

L'ubiquitylation se fait par une cascade de réactions faisant intervenir des enzymes E1, E2, et E3 ubiquitine-ligases et qui aboutit au transfert direct ou indirect d'ubiquitine sur la protéine cible. Lors de la première phase d'activation, l'enzyme E1 en présence d'ATP, catalyse la formation d'une liaison thioester entre la glycine carboxy-terminale de l'ubiquitine et une cystéine conservée de l'enzyme E1. L'ubiquitine est ensuite transférée de l'enzyme E1 vers l'enzyme E2 par transthiolation (Haas et al., 1983; 1982; Schäfer et al., 2014). La E3 permet le transfert direct (E3 à domaine RING) ou indirect (E3 à domaine HECT) de l'ubiquitine de la E2 sur une lysine de la protéine cible et assure la spécificité vis-à-vis du substrat. Les enzymes E3 ubiquitine-ligases catalysent la formation d'une liaison amide entre le groupement carboxyl de la glycine 76 de l'ubiquitine et le groupement amine de la lysine du substrat (Buetow and Huang, 2016; Deshaies and Joazeiro, 2009; Metzger et al., 2012) (Figure26).

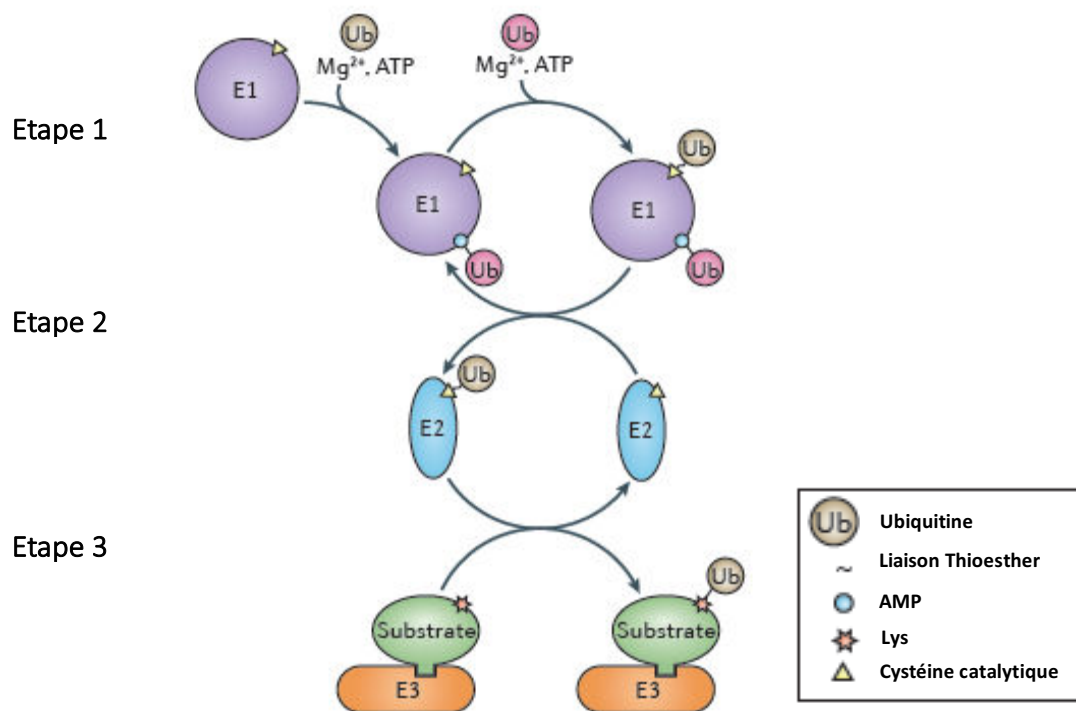


Figure 27 : Représentation schématique des trois étapes clés de la réaction d'ubiquitylation.

Etape1 : Une enzyme activatrice de l'ubiquitine (E1) catalyse deux cycles d'adénylation de l'ubiquitine en présence de Mg^{2+} et d'ATP pour lier deux molécules d'ubiquitine : une ubiquitine (en beige) forme une liaison thioester avec la cystéine catalytique de l'E1 et l'autre ubiquitine (en rose) est liée de façon non covalente au domaine d'adénylation de l'E1 *via* son extrémité C-terminale chargée en AMP.

Etape2 : La E1 se lie ensuite à l'enzyme de conjugaison de l'ubiquitine E2 et catalyse le transfert de l'ubiquitine de la cystéine catalytique de l'E1 vers la cystéine de l'E2 par transthiolation. E1 se dissocie de l'E2 et entre de nouveau en cycle.

Etape 3 : La E3 ubiquitine ligase recrute la E2 et un substrat pour catalyser le transfert de l'ubiquitine sur une lysine de ce substrat. La E2 se désengage de la E3 qui lie une autre E2 chargée en ubiquitine pour le prochain cycle. D'après Buetow et Huang, 2016.

IV.1.3 Les différents types d'ubiquitylation

Le type d'ubiquitylation détermine le devenir du substrat dans la cellule (Metzger et al., 2012) (Figure 28). En effet la conformation des chaînes d'ubiquitine et leur site de liaison particulier sur le substrat (position de la lysine) peut exposer ou au contraire restreindre l'accès des protéines de liaison de l'ubiquitine (UBPs) aux « motifs de reconnaissance » situés en surface de l'ubiquitine. Cela détermine le type d'UBPs qui peuvent être spécifiquement recrutées et affecte ainsi le devenir du substrat ubiquitylé dans la cellule (Komander and Rape, 2012).

IV.1.3.1 La mono-ubiquitylation et la multi-ubiquitylation

La mono-ubiquitylation résulte de l'ajout d'une seule molécule d'ubiquitine sur une lysine du substrat. C'est la plus fréquente des modifications post-traductionnelles par ubiquitylation (60%) (Clague et al., 2015). La mono-ubiquitylation est très impliquée dans la régulation des histones, mais aussi dans la réparation de l'ADN (Mattioli et al., 2012; Natarajan and Takeda, 2017; Segala et al., 2016; Stewart et al., 2009). La multi-mono-ubiquitylation ou multi-ubiquitylation consiste en la fixation d'un monomère d'ubiquitine sur différentes lysines du substrat. La multi-ubiquitylation est impliquée dans l'endocytose. Il a été montré par exemple que la multi-ubiquitylation du récepteur membranaire du facteur de croissance épidermique (EGFR) est suffisante pour entraîner son internalisation (Acconcia et al., 2009; Foot et al., 2017; Haglund et al., 2003).

IV.1.3.1 La poly-ubiquitylation

La poly-ubiquitylation correspond à l'attachement de plusieurs molécules d'ubiquitine de façon consécutive au niveau d'une lysine du substrat ce qui forme une chaîne de polyubiquitine.

La chaîne de polyubiquitine peut-être « homotypique », chaque molécule d'ubiquitine étant reliée à la suivante par le même type de liaison isopeptidique. Les différentes chaînes sont alors nommées selon la lysine qui relie les monomères. Les chaînes de polyubiquitine en K63 et K48 sont les plus abondantes dans la cellule eucaryote (Clague et al., 2015). La poly-ubiquitylation en K63 est impliquée principalement dans la transduction de signaux inflammatoires, mais aussi dans l'endocytose et la réparation de l'ADN. Par exemple, les chaînes d'ubiquitine de type K63 régulent l'activation de NF- κ B dans la réponse inflammatoire. En effet, l'auto-ubiquitylation K63 de TRAF6 (TNF-receptor associated factors 6) conduit à l'activation de TAK1 (TGF β activated Kinase 1). Cela permet la phosphorylation d'IKK β , puis d'I κ B- α qui est alors dégradé pour permettre le relargage et la translocation nucléaire de NF- κ B. Une fois dans le noyau NF- κ B active la transcription de cytokines pro-inflammatoires (Ashida et al., 2014; Malynn and Ma, 2010). La poly-ubiquitylation de type K48 est principalement impliquée dans la dégradation spécifique des protéines (cf paragraphe IV.1.4) (Haglund et al., 2003; Metzger et al., 2012). Des analyses protéomiques récentes montrent que les chaînes K6, K11, K27, K29 et K33 ainsi que les chaînes M1 (dites linéaires), existent également dans les cellules eucaryotes mais en proportion

moins abondantes. Ces chaînes sont appelées chaînes « atypiques ». Les chaînes K11 peuvent être impliquées dans la régulation du cycle cellulaire et les chaînes M1 dans la réponse inflammatoire (Yau and Rape, 2016). Les connaissances acquises récemment concernant le rôle des 4 autres types de chaînes K6, K27, K29 et K33 soulignent la « complexité croissante » de la régulation par ubiquitylation (Swatek and Komander, 2016; Yau and Rape, 2016).

La chaîne de polyubiquitine peut aussi être « hétérotypique » soit mixte, soit branchée. Les chaînes mixtes sont constituées par ajout d'un seul monomère d'ubiquitine à la fois mais sur des résidus lysines (ou M1) différents. Les chaînes branchées se forment par ajout de monomères d'ubiquitine sur plusieurs résidus lysines (ou M1) à la fois. Ces chaînes de complexité variable d'un point de vue structural offrent un grand répertoire d'interaction avec les UBPs et sont à l'origine de signaux fonctionnels intracellulaires variés (Buetow and Huang, 2016; Swatek and Komander, 2016).

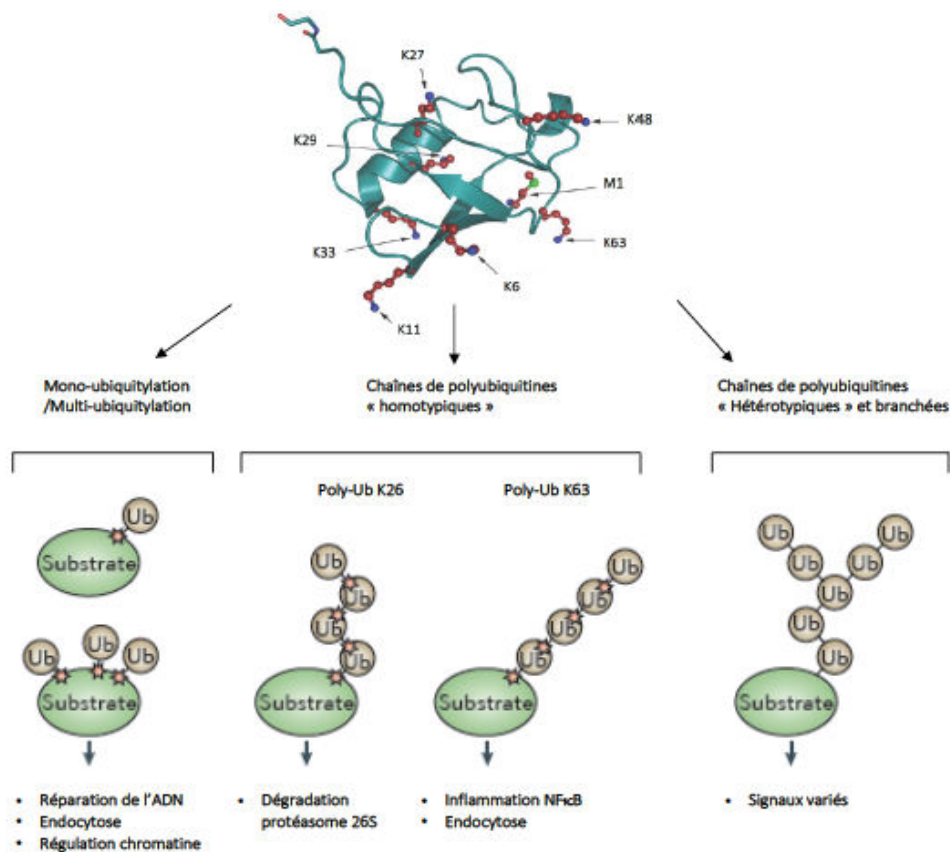


Figure 28 : Devenir des protéines ciblées dans la cellule selon le type d'ubiquitylation.

Le type d'ubiquitylation détermine le devenir des substrats ubiquitylés dans la cellule. L'ajout d'une molécule d'ubiquitine sur un (mono-ubiquitylation) ou plusieurs (multi-ubiquitylation) résidu(s) lysine du substrat est impliqué dans la réparation de l'ADN, l'endocytose ou la régulation des histones. L'ajout de plusieurs ubiquitines sur une lysine du substrat est appelé poly-ubiquitylation. La poly-ubiquitylation K48 est surtout impliquée dans la dégradation protéasomale des protéines. La poly-ubiquitylation K63 est essentiellement responsable de l'activation de voies pro-inflammatoires régulées par NFκB. La poly-ubiquitylation hétérotypique par ajout de chaînes branchées est responsable de la transmission de signaux variés. D'après Kommander et Rape, 2012.

IV.1.4 La voie-ubiquitine protéasome

L'ajout des chaînes d'ubiquitine K48 adresse le substrat vers le protéasome 26S qui est une voie majeure de dégradation des protéines intracellulaires dans les cellules eucaryotes. Ce complexe multimérique protéolytique ATP-dépendant est retrouvé dans le noyau ou le cytoplasme des cellules. Il est composé d'une sous-unité centrale cylindrique 20S nommée CP (« core particle ») qui est bordée par deux sous-unités 19S nommée RP (« regulatory particle ») (Adams, 2004). Le complexe 20S est composé de 2 anneaux de 7 protéines α bordant 2 anneaux de 7 protéines β . C'est ce complexe protéolytique qui permet la dégradation des protéines ubiquitylées. Le complexe 19S assure la reconnaissance et la dénaturation des protéines ubiquitylées et entraîne aussi l'ouverture de l'anneau α du complexe 20S, permettant ainsi aux chaînes polypeptidiques de s'y insérer pour y être dégradées. Le complexe 19S a également un rôle de régulation des niveaux cytosoliques d'ubiquitine, en recyclant des molécules d'ubiquitine à partir des chaînes dégradées (Adams, 2004) (Figure 29).

Il est à noter que, bien que l'enchaînement d'ubiquitines de type K48 cible les protéines au protéasome, le ciblage au protéasome n'est pas exclusif à ce type d'ubiquitylation (Adams, 2004; Lander et al., 2012).

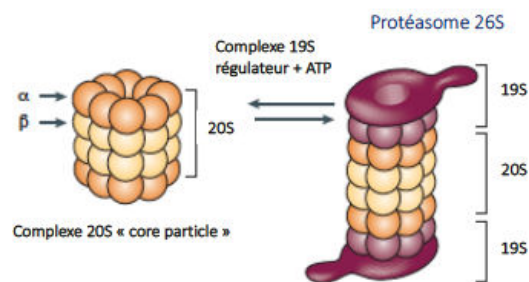


Figure 29 : Représentation schématique de la structure tridimensionnelle du protéasome 26S.

La sous-unité centrale « 20S » cylindrique, formée de protéines α et β , est le support de l'activité protéolytique qui permet la dégradation des protéines ubiquitylées. En présence d'ATP, cette sous-unité « 20S » s'associe aux deux sous-unités « 19S » régulatrices pour former le protéasome 26S. D'après Adams, 2004.

IV.1.5 Les E3 ubiquitine-ligases

Les E3 ubiquitine-ligases confèrent la spécificité de l'ubiquitylation à un substrat particulier. Il existe plus de 640 E3 ubiquitine-ligases codées par le génome humain qui se répartissent en trois grandes familles : la famille RING, la famille HECT et la famille RBR (Buetow and Huang, 2016) (Figure 30). Les modifications post-traductionnelles par ubiquitylation sont spécifiquement trouvées chez les organismes eucaryotes. Cependant il a récemment été montré que les organismes procaryotes sont capables de synthétiser différents effecteurs de type E3 ubiquitine-ligases leur permettant de détourner les systèmes d'ubiquitylation de différents hôtes chez les plantes et les animaux (Huibregtse and Rohde, 2014).

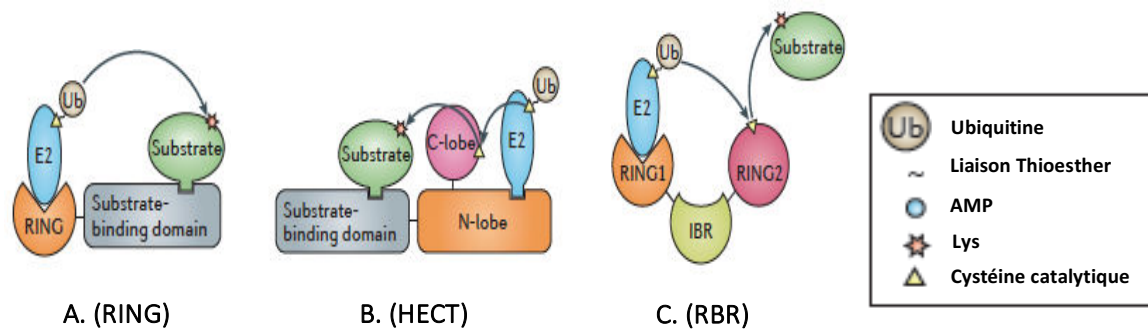


Figure 30 : Représentation de la réaction catalysée par les trois classes d'E3 ubiquitine-ligases.

A. Schéma de la réaction catalysée par les E3 ubiquitine-ligases de type RING (Really interesting new gene). Le domaine RING se lie à la E2 via une liaison thioester et un domaine de liaison au substrat (« substrat binding domain ») recrute le substrat. Le substrat est ensuite directement transféré depuis la cystéine catalytique de l'E2 vers le substrat. B. Schéma de la réaction enzymatique médiée par les E3L à domaine HECT (Homologous to EA6P carboxyl terminus). Le domaine en position N-terminale (N-lobe) permet l'interaction d'une part avec la E2 liée à l'ubiquitine d'autre part avec le substrat. L'ubiquitine est ensuite transférée sur la cystéine catalytique de la partie C-terminale du domaine HECT (C-lobe), puis dans un second temps sur la lysine du substrat. C. Schéma de la réaction catalysée par les E3L de type RBR (Ring between ring). Le domaine RING1 se lie au « complexe » E2 ~ ubiquitine, et l'ubiquitine est transférée depuis la E2 vers la cystéine catalytique de RING2 puis vers une lysine du substrat. D'après Buetow et Huang, 2016.

IV.1.4.1 Les E3 ubiquitine ligases d'origine eucaryote

IV.1.4.1.1 Les E3 ligases à domaine RING

La famille des E3 ubiquitine-ligases à domaine RING comprend environ 600 protéines exprimées chez l'homme (Buetow and Huang, 2016; Deshaies and Joazeiro, 2009). D'un point de vue structural, toutes les E3 ubiquitine ligases de la famille RING comprennent au moins un domaine RING qui est l'élément indispensable pour le recrutement de la E2 et le transfert de l'ubiquitine sur la protéine cible. Le domaine RING a été initialement identifié dans une protéine codée par le gène *ring1* (Freemont et al., 1991). Ce domaine est composé en moyenne de 50 acides aminés. Il se caractérise par un enchaînement de 8 histidines et 8 cystéines permettant de coordonner deux atomes de Zinc (motif : C-X₂-C-X₉₋₃₉-C-X₁₋₃-H-X₂₋₃-C-X₂-C-X₄₋₄₈-C-X₂-C ; X peut être remplacé par n'importe quel acide-aminé). C'est l'espacement entre ces 8 résidus qui est conservé et qui permet au domaine RING d'adopter une conformation de type « cross-braced » (entrecroisée) (Deshaies and Joazeiro, 2009). Les E3 ubiquitine-ligases de type RING finger agissent comme des protéines d'échafaudage. Elles sont capables d'interagir avec des enzymes de conjugaison E2 et le substrat à modifier. Elles assurent ainsi un transfert direct de l'ubiquitine de la E2 vers le substrat. La reconnaissance du substrat se fait *via* d'autres domaines d'interaction. La famille des E3 ubiquitine-ligases à domaine RING est très diversifiée. Les E3 RING monomériques ou dimériques se fixent directement aux substrats alors que les E3 RING multimériques font intervenir d'autres protéines intermédiaires (Buetow and Huang, 2016).

Une des E3 ubiquitine ligases monomériques les plus étudiées est la protéine oncogénique c-Cbl. La protéine c-Cbl est notamment responsable de l'ubiquitylation de récepteurs tyrosine kinase (Lupher et

al., 1998). L'étude de la structure cristallographique de c-Cbl avec l'enzyme E2 UbcH7 a permis de révéler les interactions entre le domaine « RING finger » et l'enzyme E2 et de montrer le rôle d'échafaudage du «RING finger» dans la réaction d'ubiquitylation. En effet, les résidus Ile383 et Trp408 de la protéine c-Cbl permettent l'interaction avec l'enzyme E2 (Deshaies and Joazeiro, 2009). De façon intéressante, les E3 monomériques IAPs (inhibitor of apoptosis proteins) sont capables d'ubiquityler les petites GTPases Rac1 et Cdc42 et ainsi de modifier leur capacité de régulation de la migration cellulaire (Oberoi et al., 2012; Oberoi-Khanuja and Rajalingam, 2012). En effet, il a d'abord été montré que XIAP (X-linked IAP) et cIAP1 (cellular IAP1) entraînent la polyubiquitylation de Rac1 en K147 suivie de sa dégradation protéasomale, ce qui permettrait de modifier la morphologie cellulaire et de limiter la migration cellulaire. Plus récemment, la même équipe a montré que XIAP est capable d'entraîner la polyubiquitylation de Cdc42 en K166 et ainsi sa dégradation protéasomale. Ce mécanisme de régulation inhibe alors la formation de filopodes et peut avoir un impact sur la migration cellulaire (Murali et al., 2017).

D'autres E3 ubiquitine-ligases nécessitent pour leur activation une dimérisation sous forme d'homo/hétérodimères. C'est le cas par exemple de TRAF6 impliqué dans la transduction intracellulaire de signaux médiés par différentes familles de récepteurs membranaires telles que les récepteurs au TNF ou les récepteurs à l'IL-1 β . L'équipe du Dr Wu a montré par cristallographie que la formation d'un homodimère RING Zinc finger TRAF6 est nécessaire lors de l'interaction avec l'enzyme E2 Ubc13 pour induire une polyubiquitylation K63 entraînant la stimulation de la voie inflammatoire NF- κ B (Yin et al., 2009).

Les E3 multimériques de type RING font intervenir des sous unités protéiques différentes pour le recrutement de la E2 et pour la reconnaissance du substrat. Par exemple, les complexes multimériques APC/C (anaphase promoting complex/cyclosome) sont constitués d'un core de 14 sous-unités incluant des éléments invariants d'un complexe à l'autres tels qu'une protéine de la famille RING (Apc11), la protéine « d'échafaudage » homologue aux cullines (Apc2), et deux types de protéines adaptatrices CDC20 (Cell division cycle 20) ou CDH1 (cdc20 homolog1) qui recrutent le substrat (Buetow and Huang, 2016). Les complexes APC/C jouent un rôle dans la régulation de la prolifération cellulaire. Ils interviennent dans le contrôle du cycle cellulaire en ubiquitylant et dégradant les protéines telles que les cyclines, la Polo-like kinase1 et Cdk1 (Acquaviva and Pines, 2006; Peters, 2006; Pickart and Eddins, 2004).

IV.1.4.1.2 Les E3 ligases à domaine RBR

Les E3 ubiquitine-ligases à domaine RBR (Ring-Between-Ring) sont considérées comme des « hybrides » entre les RING et les HECT. La famille des E3 ligases à domaine RBR a été récemment décrite (Wenzel et al., 2011). Les protéines de cette famille sont caractérisées par un domaine catalytique composé de

deux doigts RING (RING1 et RING2) et un domaine central in-between RING (IBR) de liaison au zinc. Le motif Ring1-IBR-Ring2 est essentiel à l'activité E3-ubiquitine-ligase des protéines de cette famille. Le domaine RING1 se lie à L'E2 chargée et le domaine RING2 contient un résidu cystéine actif capable de former un intermédiaire thioester réversible avec l'ubiquitine (Buetow and Huang, 2016). Le motif RING1-IBR-RING2, est très conservé mais les E3L à domaine RBR possèdent également d'autres domaines, ce qui donne une diversité à cette famille de E3L (Smit et al., 2012; Spratt et al., 2014; Stieglitz et al., 2012; Wenzel et al., 2011).

Il existe 14 RBR dans le génome humain, et les mieux caractérisées sont : PARKIN, fréquemment mutée dans la maladie de Parkinson; HOIP (HOIL-1L interacting protein), la sous-unité centrale catalytique de la E3 ubiquitine ligase LUBAC (Linear ubiquitin chain assembly complex) qui est impliquée dans les voies apoptotiques médiées par NF- κ B et qui permet de limiter l'invasion intra-cytoplasmique de *Salmonella Typhimurium* pendant l'infection ; et HHARI (human homolog of Ariadne) (Ikeda et al., 2011; Kirisako et al., 2006; Kitada et al., 1998; Noad et al., 2017).

IV.1.4.1.3 Les E3 ligases à domaine HECT

Les protéines E3 ligases de la famille HECT sont définies par la présence du domaine HECT « homologue au domaine carboxy-terminal de la protéine E6-AP » (Huibregtse et al., 1995). La protéine E6-AP est la première E3 ligase à domaine HECT décrite par le l'équipe du Dr Howley en 1993. E6-AP interagit avec la protéine E6 du Papillomavirus Humain (HPV 16 et 18). Le complexe E6/E6-AP cible le suppresseur de tumeur p53 et entraîne son ubiquitylation et son adressage vers le protéasome. Ce mécanisme confère des propriétés oncogéniques au virus HPV. (Scheffner et al., 1993).

En règle générale, les E3 ligases à domaine HECT comprennent un domaine N-terminal qui lie un ou plusieurs substrats connus et un domaine HECT d'environ 350 AA à l'extrémité C-terminale qui contient l'activité catalytique permettant la réaction d'ubiquitylation (Rotin and Kumar, 2009). Le domaine HECT est composé de deux sous domaines. Un sous-domaine en position N-terminale (N-lobe) qui permet l'interaction avec l'enzyme E2 et un en position C-terminale (C-lobe) qui contient la cystéine catalytique qui forme un intermédiaire de réaction transitoire avec la glycine terminale de l'ubiquitine. Ces deux lobes sont reliés par une zone charnière flexible qui permet le transfert indirect de l'ubiquitine de la E2 vers le substrat (Buetow and Huang, 2016) (Figure 31).

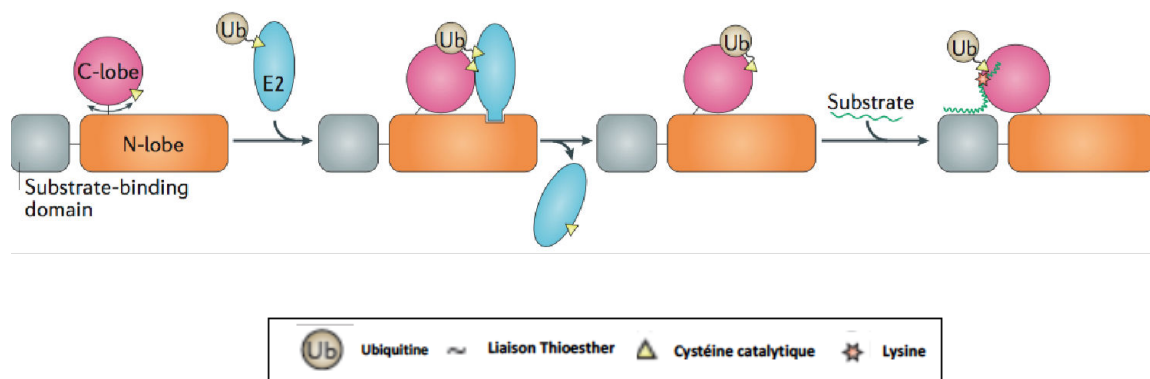


Figure 31 : Représentation schématique du cycle catalytique des E3 ubiquitine-ligases à domaine HECT.

La partie en position C-terminale (C-lobe) du domaine HECT est capable de tourner par rapport à la partie N-terminale (N-lobe), grâce à une zone « charnière ». Ainsi lorsque le N-lobe se lie à la E2 couplée à l'ubiquitine, le lobe C tourne pour se lier à l'ubiquitine, ce qui permet de juxtaposer les résidus catalytiques de cystéine de la E2 et de la E3. Lors du transfert de l'ubiquitine sur la cystéine catalytique du C-lobe, la E2 est relâchée. La E3 peut alors se lier au substrat grâce à son domaine de liaison au substrat puis le C-lobe subit une rotation permettant de juxtaposer la cystéine catalytique de la E3 à une lysine du substrat pour assurer la liaison covalente. D'après Buetow et Huang, 2016.

On dénombre 28 E3 à domaine HECT chez l'homme. Elles se répartissent en 3 grandes sous familles en fonction de l'architecture de leur domaine N-terminal: (i) la famille Nedd4, la première décrite et la mieux caractérisée, la famille HERC, et la famille des E3 à domaine HECT ayant d'autres domaines d'interaction protéine-protéine (Buetow and Huang, 2016; Rotin and Kumar, 2009). La famille Nedd4 comprend 9 membres chez l'homme et se caractérise par les domaines C2 et WW qui permettent à la E3 de se lier aux phospholipides et motifs PY du substrat. La famille HERC regroupe également 9 membres chez l'homme qui contiennent dans leur structure un ou plusieurs domaines RLDs (Regulator of chromosome condensation 1 (RCC1)-Like Domains). On distingue deux sous-groupes : les « small HERCs » (environ 100kDa) qui contiennent un seul domaine RLD et les « large HERCs » (500kDa) qui possèdent plus d'un domaine RLD. Enfin la 3^{ème} famille d'E3 à domaine HECT comprend 13 membres chez l'homme. Les E3 de cette famille sont constitués de domaines d'interaction protéine-protéine différents de ceux cités précédemment (Rotin and Kumar, 2009) (Figure 32). HACE1, notre protéine d'intérêt, appartient à cette famille.

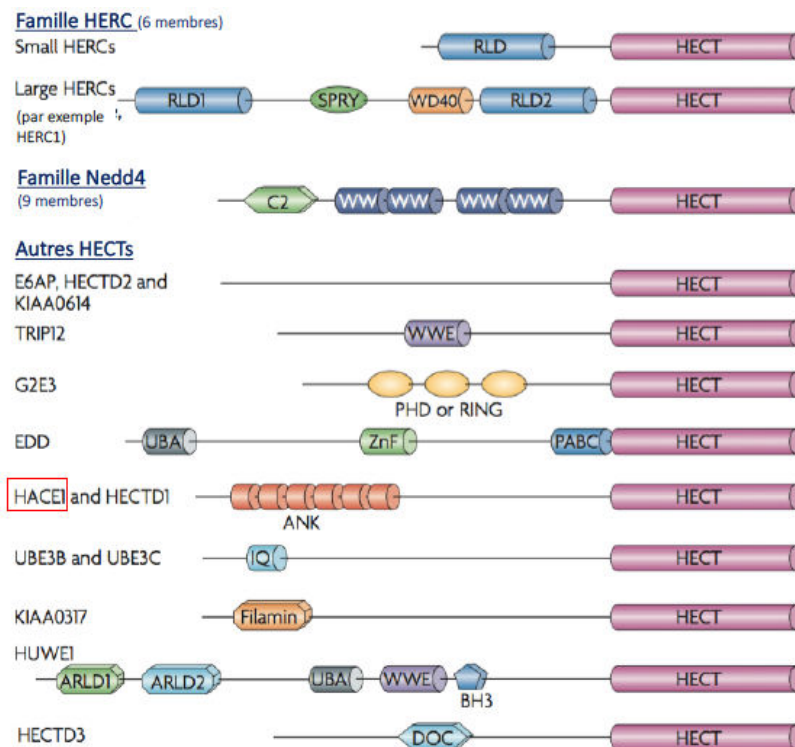


Figure 32 : Les différents types de E3 ubiquitine-ligases à domaine HECT retrouvées chez l'homme.

Les 28 ligases E3 ubiquitine-ligases à domaine HECT humaines se répartissent en trois grandes familles. Deux d'entre elles, la famille Nedd4 et la famille HERC, se distinguent clairement par l'architecture de leur domaine N-terminal. Les membres de la famille HERC, qui contiennent un ou plusieurs domaines RLD (Regulator of chromosome condensation 1 (RCC1)-like domains) se divisent en deux sous-groupes : les « small HERCs » qui contiennent un seul domaine RLD et les « large HERCs » qui contiennent plus d'un domaine RLD et des domaines supplémentaires tels que SPRY et WD40. Les membres de la famille Nedd4 se caractérisent par une architecture commune du domaine N-terminal : tous les membres contiennent un domaine C2 et deux ou quatre domaines WW. La famille des E3L ligases à domaine HECT, dont fait partie HACE1, comprend 13 membres qui comportent une variété de domaines importante dans leur partie N-terminale. D'après Rotin et Kumar, 2009.

IV.1.4.2 Les E3 ubiquitine ligases d'origine procaryote

Les E3 ubiquitine-ligases d'origine procaryotes sont des enzymes synthétisées par les bactéries leur permettant de détourner les systèmes d'ubiquitylation de leurs hôtes eucaryotes afin d'augmenter leur pouvoir pathogène (Ashida et al., 2014; Huibregtse and Rohde, 2014; Maculins et al., 2016). Il existe plusieurs classes de E3 ubiquitine-ligases bactériennes. Certaines sont de type U-box, que l'on trouve en particulier chez *Legionella pneumophila* et chez *Pseudomonas syringae* pv. Tomato qui produit la ligase AvrPtoB qui mime une ligase de type U-box et Ring-finger (Abramovitch et al., 2006; Janjusevic et al., 2006). On dénombre des ligases de type HECT-like domain et RING-like domain E3 ligases. Elles possèdent des similitudes, mais également certaines différences fonctionnelles et structurales, avec leur homologues d'origine eucaryote (Maculins et al., 2016). Chez des pathogènes de plantes on trouve aussi des composants de type F-box de ligases multimériques comme les facteurs GALAs de *Ralstonia*

solanacearum. Enfin parmi les effecteurs de type ligase on compte une famille d'E3 ubiquitine-ligase spécifique aux bactéries : les NELs (Novel E3 ligases) structurellement différentes des HECT et RING E3. Les NELs constituent une famille de 15 enzymes retrouvées parmi 6 genres de bactéries pathogènes pour l'homme dont *Salmonella* spp. et *Shigella* spp. Elles possèdent en position N-terminale un domaine LRR riche en leucine (Leucine Rich Repeat) qui assure la liaison au substrat et un domaine C-terminal support de l'activité E3 ligase (Ashida et al., 2014).

Les premières NELs décrites sont les protéines de la famille IpaH produites par des souches de *Shigella flexneri* (Rohde et al., 2007; Singer et al., 2008). Ces protéines sont injectées *via* des Systèmes de Sécrétion de Type 3 (SST3) et sont donc potentiellement impliquées dans la pathogénicité de cette espèce bactérienne (Ashida et al., 2014; 2007; Maculins et al., 2016; Singer et al., 2008). Par exemple le facteur IpaH9.8 de la famille NEL sécrétée par *S. flexneri* interagit avec ABIN-1 (A20-binding inhibitor of NF- κ B) et NEMO (NF- κ B essential modulator) pour entraîner l'ubiquitylation dégradative de NEMO, ce qui inhibe la réponse inflammatoire NF- κ B dépendante de l'hôte (Ashida et al., 2010). L'homologue de IpaH9.8, SspH1 de *Salmonella enterica* fixe *via* son domaine LRR la kinase PKN1, ce qui relâche une interaction inhibitrice entre le domaine LRR et le domaine HECT permettant ainsi l'ubiquitylation de PKN1 (Rohde et al., 2007).

IV.2 HACE1 et la régulation de la stabilité de Rac1

IV.2.1 HACE1 : une E3 ubiquitine ligase à domaine HECT

HACE1 est une E3 ubiquitine-ligase à domaine HECT initialement découverte par l'équipe du Dr Sorensen en 2004 (Anglesio et al., 2004). Chez l'homme, le gène *hace1* est situé sur le bras long du chromosome 6 et code pour une protéine de 909 acides aminés (103 kDa). Ce gène est exprimé dans un large éventail de tissus humains (Anglesio et al., 2004). La protéine HACE1 n'a pas encore été cristallisée. Les premiers modèles structuraux prédictifs indiquent que la protéine HACE1 comprend trois domaines distincts. Un domaine amino-terminal contenant 6 répétitions de type ankyrine (domaine ANK), qui est responsable d'interaction protéine-protéine, un domaine HECT du côté carboxy-terminal qui est le support de l'activité E3 ubiquitine-ligase (Anglesio et al., 2004). Elle possède aussi un domaine dit « intermédiaire » (MID pour middle) reliant le domaine ANK au domaine HECT. (Figure 33). Les résultats obtenus au cours de ma thèse permettent de mieux apprécier la structure du domaine ANK ainsi que le nombre de répétitions de type ankyrine, i.e 7 au lieu de 6 (Andrio et al., 2017) (cf chapitre résultats).

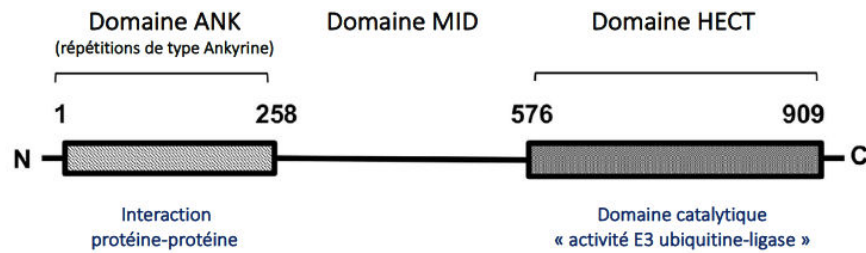


Figure 33 : Représentation schématique des trois domaines fonctionnels d'HACE1.

La protéine HACE1 comprend 3 domaines fonctionnels. Un domaine ANK (acides aminés 1 à 258) qui est composé de 7 répétitions de type ankyrine et qui est responsable de l'interaction protéine-protéine. Un domaine HECT (acides aminés 576 à 909) qui est le domaine catalytique support de l'activité E3 ubiquitine-ligase d'HACE1. Un domaine dit « intermédiaire » (MID pour middle) reliant le domaine ANK au domaine HECT. D'après Anglesio *et al.*, 2004 et Andrio & Lotte *et al.*, 2017.

IV.2.2 HACE1 : un suppresseur de tumeur majeur

IV.2.2.1 Découverte de la fonction suppresseur de tumeur de la protéine HACE1

L'équipe du Dr Sorensen a initialement démontré en 2004 qu'une diminution d'expression de *hace1* est associée à certaines formes sporadiques de cancer du rein retrouvées chez l'enfant et regroupées sous le terme de tumeurs de Wilms'. Cette étude vise à définir les éléments génétiques affectés dans certaines formes de tumeurs impliquant des remaniements génétiques en 6q21 sur une petite cohorte pédiatrique d'enfant présentant des tumeurs de Wilms'. Dans plus de 80% des cas le gène *hace1* se trouve à 50 kb en aval de la translocation t(6 ;15) en 6q21. Ces tumeurs présentent une altération d'expression d'*hace1* alors que pour les patients contrôles avec tissu rénal sain l'expression d'*hace1* est normale. Cette diminution d'expression est confirmée dans des lignées cellulaires SK-NEP-1 de tumeurs de Wilms'. L'équipe montre que cette extinction de *hace1* est due à une hyperméthylation des îlots CpG de la zone promotrice du gène. Le Dr Sorensen a également démontré qu'HACE1 est une E3 ubiquitine-ligase et identifié la E2 majeure permettant l'auto-ubiquitylation de HACE1, la protéine E2 UbcH7 (Anglesio *et al.*, 2004). Cette étude princeps réalisée sur un petit nombre d'échantillons et suggérant le rôle suppresseur de tumeur d'HACE1 est par la suite renforcée par une seconde étude publiée en 2007 (Zhang *et al.*, 2007). Des délétions de la région 6q21 sont fréquemment retrouvées dans un grand nombre de tumeurs humaines incluant des adénocarcinomes mammaires, ovariens et prostatiques ainsi que leucémies et lymphomes. L'équipe du Dr Penninger, en collaboration avec celle du Dr Sorensen confirme que les niveaux d'ARNm d'HACE1 sont réduits dans un grand nombre d'échantillons testés de tumeurs humaines rénales, mais aussi dans des cancers du sein, des cancers de la thyroïde et des hépatocarcinomes. De plus, la génération de souris génétiquement invalidées (Knock Out) dans le gène *hace1* démontre que celles-ci développent des tumeurs spontanées des tissus provenant des 3 feuilletts embryonnaires. En effet, ces souris présentent des mélanomes, différents types de carcinomes

(hépatiques, pulmonaires et mammaires), des lymphomes et des angiosarcomes. D'une manière intéressante, ces tumeurs commencent à apparaître à partir de 20 semaines et affectent 12% des souris à l'âge de 2 ans (comparé à 1-2% chez les souris contrôles). De plus, l'exposition ponctuelle des souris KO *hace1* à l'uréthane (un composant carcinogène) induit une forte apparition de tumeurs pulmonaires dans celles-ci, contrairement aux souris sauvages. Le croisement des souris KO pour *hace1* avec des souris KO *p21cip1* n'a pas d'effet sur l'incidence d'apparition des cancers. Au contraire, le croisement des souris KO pour *hace1* avec des souris KO pour *p53* montrent une incidence accrue des cancers chez les souris jeunes et la formation de tumeurs plus grosses. Alors que les souris KO *p53* ont principalement des cancers de type lymphomes thymiques, les souris double KO montrent une grande diversité d'origine des cancers. De façon intéressante, ces équipes de recherche ont montré qu'HACE1 a une activité de suppression de la croissance cellulaire et de la formation de colonies cellulaires en agar mou lorsqu'elle est exprimée dans des cellules tumorales humaines SK-NEP-1 issues de tumeurs de Wilms', des cellules IRM32 issues de neuroblastomes, et également dans des cellules humaines HEK293 (Human Embryonic Kidney 293). A l'inverse, les lignées cellulaires HEK293 exprimant de façon stable un Sh ARNm (Short hairpin ARN messenger) dirigé contre HACE1 présentent une augmentation de la formation de clones en agar mou par rapport aux cellules exprimant HACE1. Dans cette même étude Zhang *et al.* montrent qu'HACE1 contrôle la croissance des cellules et réduit les niveaux cellulaires de la cycline D1, sans que celle-ci ne soit une cible directe de son activité E3 ubiquitine-ligase (Zhang et al., 2007). Ces premiers travaux montrent que la protéine HACE1 a une activité avérée de suppresseur de tumeur. Cependant ils n'identifient pas de cible directe de HACE1.

IV.2.2.2 *Rac1, première cible identifiée de la E3 ubiquitine ligase HACE1*

Une approche de déplétion de l'ensemble des E3 ubiquitine-ligases à domaine HECT en cellules primaires humaines nous a permis de démontrer qu'HACE1 est responsable de l'ubiquitylation *in vivo* et *in vitro* de Rac1 sous sa forme liée au GTP. En effet, HACE1 fixe la forme activée de Rac1 avec une forte spécificité et ubiquityle très spécifiquement *in vitro* la forme de Rac1 liée au GTP. De plus, la déplétion d'HACE1 bloque l'ubiquitylation de Rac1 et induit une augmentation des niveaux cellulaires de Rac1 et du niveau d'activité de cette GTPase (Torrino et al., 2011). D'un point de vue fonctionnel, les expériences réalisées préalablement au laboratoire ont prouvé que l'activation de Rac1 par CNF1, suivie sa dégradation protéasomale, sont deux éléments essentiels pour l'invasion de monocouches cellulaires par les *E. coli* pathogènes (Doye et al., 2002). Nous avons ensuite montré, en réalisant des infections par des souches d'UPEC de cellules endothéliales HUVEC intoxiquées par CNF1, que la déplétion en HACE1 et celle de Rac1 entraîne une diminution majeure de l'internalisation des UPEC dans la monocouche endothéliale. L'ensemble de ces résultats soulignent le rôle majeur d'HACE1 dans la

régulation de l'ubiquitylation de Rac1 et dans le contrôle de son activité. Rac1 était alors la première cible identifiée de l'activité ubiquitine ligase d'HACE1 (Torrino et al., 2011).

L'équipe du Dr Malliri a ensuite confirmé Rac1 comme cible d'HACE1. Cette équipe a montré qu'HACE1 peut limiter la migration de cellules MEFs en réponse aux HGF, en induisant l'ubiquitylation de Rac1 sur la Lysine K147 et ainsi sa dégradation protéasomale. En effet, des cellules MEFs KO *hace1* migrent plus rapidement que des cellules contrôles exprimant HACE1 WT, et ces cellules présentent une augmentation des niveaux cellulaires de Rac1 et une accumulation de Rac1 dans les « membranes ruffles ». De façon intéressante, les auteurs montrent que ce phénotype de mobilité cellulaire accrue est lié à l'augmentation du niveau cellulaire de Rac1, car il est annulé lorsque les cellules KO *hace1* sont aussi dépletées en Rac1. L'ensemble de ces résultats attribue une fonction de contrôle de la migration cellulaire à HACE1 liée à sa capacité à ubiquityler et dégrader la forme active de Rac1 (Castillo-Lluva et al., 2013). De plus, Goka *et al.* ont démontré qu'HACE1 limite la progression de carcinomes mammaires ductaux en carcinome invasifs. Dans ce modèle, HACE1 régule les niveaux de Rac1-GTP dans des cellules épithéliales mammaires MCF12A ayant une amplification du gène HER2/neu, codant pour le récepteur ErbB2 à l'EGF (Goka and Lippman, 2015). Encore plus récemment, une étude portant sur le développement de sondes Ubv (Ubiquitin variant probes) capables de limiter l'activité ubiquitine-ligase de E3L à domaine HECT, montre que parmi 13 E3 testées, le blocage d'HACE1 a l'effet le plus important sur la promotion de la migration cellulaire (Zhang et al., 2016).

L'ensemble de ces résultats établit qu'HACE1 limite la migration cellulaire de façon Rac1-dépendante.

IV.2.2.3 Autres cibles identifiées de la E3 ubiquitine ligase HACE1

Des études récentes montrent que Rac1 n'est pas la seule cible d'HACE1. HACE1 exerce son activité suppresseur de tumeur en ciblant un certain nombre de molécules impliquées non seulement dans le contrôle de la croissance et de la migration cellulaire mais également dans l'autophagie, le trafic membranaire, et le contrôle de la mort cellulaire. Certains exemples sont développés ci-dessous.

Une étude publiée par l'équipe du Dr. Ronggui Hu établit un rôle d'HACE1 dans l'élimination de protéines carbonylées et la suppression tumorale. Cette étude montre que le récepteur d'autophagie Optineurine (OPTN) est une cible de l'activité ubiquitine ligase d'HACE1 et établit pour la première fois la fonction de suppresseur de tumeur d'OPTN. HACE1 permet l'ubiquitylation K48 et K27 d'OPTN, faisant un lien entre OPTN et le flux autophagique pour l'élimination des protéines carbonylées que génèrent les radicaux oxygénés (Liu et al., 2014).

Plus récemment, Palicharla *et al.* ont montré qu'HACE1 est la E3 ubiquitine-ligase responsable de la polyubiquitylation K27 de la protéine oncogénique YB-1 (Y-box Binding protein 1) nécessaire pour sa sécrétion extracellulaire. La fraction extracellulaire de YB-1 inhibe la transition épithélio-mésenchymateuse induite par le TGF- β (Palicharla and Maddika, 2015).

En 2011, Tang *et al.* ont montré qu'HACE1 est capable de se lier aux formes actives des GTPases Rab1, Rab4 et Rab11 (Tang et al., 2011). Ces protéines sont connues pour être impliquées dans l'organisation de la membrane et le trafic vésiculaire (Zerial and McBride, 2001). Cette étude montre que l'activité catalytique d'HACE1 est nécessaire au réassemblage membranaire de l'appareil de Golgi après la mitose. Récemment, l'équipe du Dr Wang a prouvé que ce processus est rendu possible par la monoubiquitylation de la Syntaxine 5 sur la lysine 270 catalysée par HACE1 lors des phases précoces de la mitose (Huang et al., 2016).

Enfin, une étude publiée en 2016 par Tortola *et al.* a établi qu'HACE1 est responsable de l'ubiquitylation *in-vivo* et *in vitro* de TRAF2. TRAF2 est un régulateur aval des récepteurs au TNF. Il permet, en réponse à la stimulation du TNFR1 (Tumor necrosis factor Receptor 1) par le TNF, l'activation de p38/JNK et NF- κ B et l'inhibition de la nécroptose. Les auteurs montrent que l'ubiquitylation de TRAF2 induite par HACE1 promeut la formation d'un complexe pro-apoptotique comprenant la caspase-8. La délétion d'HACE1 ne bloque pas la nécroptose induite par TNF. De ce fait, les auteurs proposent que HACE1 joue un rôle clé dans la balance entre apoptose et nécroptose en aval du TNFR1 (Tortola et al., 2016a).

OBJECTIFS DE LA THESE

Objectifs de la thèse

La GTPase Rac1 est au centre des relations hôte – agents pathogènes. Notre laboratoire étudie la toxine bactérienne CNF1 (Cytotoxic Necrotizing Factor 1) produite par les bactéries *Escherichia coli* uropathogènes. Cette toxine cible les petites GTPases de la famille Rho et notamment Rac1 pour induire leur activation. CNF1 catalyse la déamidation de la Glutamine 61 de Rac1 en acide glutamique ce qui produit un effet de blocage de l'activité GTPasique intrinsèque et de l'activité régulée par les GAPs. La GTPase reste donc sous une forme active liée au GTP. Les données récentes de la littérature montrent clairement que les mutations activatrices de Rac1 ont un effet inducteur (« driver ») de la croissance tumorale (cf paragraphe II.5.2). De ce fait, il est logique de penser que CNF1 induit sur la GTPase Rac1 une mutation de type oncogénique. Notre laboratoire a montré par la suite que les cellules possèdent un système de contrôle de la stabilité des GTPases Rho par dégradation protéasomale médiée par l'ubiquitine. Cette régulation met en jeu l'activité de l'E3 ubiquitine-ligase d'HACE1 qui agit comme facteur limitant dans la réaction de poly-ubiquitylation de la forme active de Rac1. L'ubiquitylation dégradative de Rac1 est fonction de son niveau d'activation (Doye et al., 2002; Torrino et al., 2011). HACE1 est un suppresseur de tumeurs dont l'expression est altérée dans de multiples cancers humains (Zhang et al., 2007). Par ailleurs, une étude récente précise le rôle d'HACE1 dans la résistance à l'infection par *Listeria monocytogenes* (Tortola et al., 2016a). L'ensemble de ces données indique un rôle important de l'axe de signalisation HACE1/Rac1 dans les processus fondamentaux infectieux et cancéreux.

Cependant, le rôle d'HACE1 dans la signalisation cellulaire, et notamment celle médiée par Rac1, n'est pas complètement élucidé. En effet, s'il est prouvé que la forme activée de Rac1 est une cible majeure de HACE1, le lien de subordination entre Rac1 et HACE1 pour le contrôle du cycle et de la croissance cellulaire est encore peu défini. De plus, le mode de régulation de l'activité d'HACE1 est à ce jour non connu, et ce malgré les données de protéomique indiquant de multiples modifications post-traductionnelles de type Ser/Thr- et Tyr-phosphorylation (PhosphositePlus.org). Enfin, les interactions moléculaires entre ces deux protéines, ainsi que le rôle de ces interactions dans le cancer et l'infection à *E. coli*, restent à définir.

L'objectif de mon travail de thèse a été de caractériser les interactions moléculaires entre HACE1 et Rac1 afin de mieux comprendre leur rôle dans le cancer et l'infection.

S'il est prouvé que l'expression d'*hace1* est réprimée dans de multiples cancers humains, l'effet de mutations ponctuelles d'*hace1* sur l'activité suppresseur de tumeur d'HACE1 et leur impact dans le cancer étaient inconnus. Les deux objectifs principaux de mon travail de thèse étaient donc :

- 1) D'évaluer l'impact de mutations ponctuelles somatiques d'*hace1* identifiées dans des cellules cancéreuses sur l'activité d'HACE1 en particulier sa capacité à « contrôler » la croissance cellulaire.
- 2) De préciser l'impact de ces mutations sur les mécanismes moléculaires impliqués dans l'interaction entre HACE1 et Rac1.

Mon travail principal publié et dont les résultats sont présentés et discutés dans la suite du manuscrit, a permis de préciser le mode d'interaction entre HACE1 et Rac1, i.e. (1) les régions de HACE1 impliquées dans l'interaction avec Rac1, (2) la discrimination de la forme activée de Rac1 et (3) d'établir pour la première fois que certaines mutations d'HACE1 retrouvées dans le cancer altèrent sa fonction de contrôle de la croissance cellulaire. Ce travail ouvre des perspectives intéressantes pour une meilleure caractérisation du rôle de HACE1 et Rac1 dans le cancer et l'infection.

RESULTATS ET DISCUSSION

Résultats et discussion

I. Article de recherche: « Identification of cancer associated mutations in *hace1* that impair cell growth control and Rac1 ubiquitylation »

Emilie Andrio*, Romain Lotte*, Daniel Hamaoui, Jacqueline Cherfils, Anne Doye, Mads Daugaard, Poul H. Sorensen, Frédéric Bost, Raymond Ruimy, Amel Mettouchi, Emmanuel Lemichez

* contribution équivalente au travail de recherche publié

Comme nous l'avons détaillé en introduction de ce manuscrit, la E3 ubiquitine-ligase HACE1 est un puissant suppresseur de tumeur qui contrôle la prolifération cellulaire et catalyse la poly-ubiquitylation dégradative de la forme active de la petite GTPase Rac1. Ce mécanisme participe au contrôle des niveaux cellulaires de Rac1-GTP et ainsi à la régulation du niveau d'activation des effecteurs de Rac1. Cependant les modalités de régulation de l'activité E3 ubiquitine-ligase de HACE1 par le domaine N-terminal composé de répétitions de type ankyrine (ANK) et par le domaine intermédiaire (MID), ainsi que le rôle de ces domaines dans l'interaction avec Rac1 sont mal définis.

Dans cette étude, nous avons testé l'hypothèse que des mutations ponctuelles d'HACE1 identifiées dans les cancers pourraient interférer avec son interaction avec Rac1 et sa capacité à contrôler la croissance cellulaire. Pour cela, nous avons identifié dans la version 64 de la base de données COSMIC (« Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer) 13 mutations somatiques faux-sens d'*hace1* situées en dehors du domaine HECT directement impliqué dans l'ubiquitylation de Rac1.

C'est ainsi que nous avons **(i)** tout d'abord mis en évidence que les 13 mutations somatiques (13/13, soit 100%) d'HACE1 issues de tumeurs séquencées altèrent sa fonction de « contrôle » de la croissance cellulaire. **(ii)** De plus, l'analyse fonctionnelle de ces mutations, couplée à la modélisation de la structure tridimensionnelle des 7 répétitions de type ankyrine, nous a permis d'identifier un groupe d'acides aminés situés sur les « ankyrin-repeats » 5 à 7 d'HACE1, qui contrôle l'interaction d'HACE1 avec Rac1, et de ce fait son ubiquitylation. **(iii)** Enfin, dans cette étude nous précisons le rôle du domaine intermédiaire d'HACE1 (MID) dans la spécificité d'interaction de la ligase avec la forme active de Rac1.

Notre étude de l'interaction fonctionnelle entre HACE1 et Rac1 dans le cancer, a permis de préciser les mécanismes moléculaires impliqués dans l'ubiquitylation de Rac1 par HACE1 et de montrer l'impact sur la prolifération cellulaire de mutations d'HACE1 associées au cancer.

II. Résultats et Discussion de l'article de recherche publié

II.1 HACE1 et le contrôle de la croissance cellulaire : impact de mutations ponctuelles d'*hace1* retrouvées dans le cancer sur la croissance cellulaire ? Nouveau mode de régulation ?

Des études antérieures ont déjà impliqué l'activité E3 ubiquitine-ligase de HACE1 dans le contrôle de la prolifération cellulaire faisant pour certaines de ces études un parallèle avec la régulation des niveaux de Rac1 actif (Daugaard et al., 2013; Goka and Lippman, 2015; Zhang et al., 2007). En effet, Zhang *et al.* ont d'abord observé qu'HACE1 limite la prolifération de lignées cellulaires cancéreuses (SK-NEP-1 issues de tumeurs de Wilms', des cellules IRM32 issues de neuroblastomes). De plus dans cette étude, les auteurs montrent qu'HACE1 limite la croissance cellulaire en réduisant les niveaux cellulaires de la cycline D1, contrairement aux cyclines A, B et E, et sans que la cycline D1 soit une cible de son activité E3 ubiquitine-ligase (Zhang et al., 2007). Rac1 est un régulateur majeur de l'expression et stabilité et de la cycline D1 (Joyce et al., 1999; Musgrove et al., 2011; Ridley, 2001a). Par la suite, l'équipe du Dr Sorensen en collaboration avec notre équipe, a pu expliquer le lien entre HACE1 et la régulation de la cycline D1. L'activité E3 ubiquitine-ligase d'HACE1 en régulant les niveaux de Rac1 actif, entraîne l'inhibition de l'activité de la NADPH oxydase qui est normalement requise par le facteur de transcription AP1 pour induire l'expression du gène de la cycline D1. De plus, la perte d'HACE1 dans les cellules entraîne l'hyperactivation de la NADPH oxydase liée à l'accumulation de la forme active de Rac1. Cela est à l'origine d'une hyperproduction chronique des EAO et d'une augmentation du niveau de cycline D1 en réponse au stress oxydatif, entraînant une hyper prolifération cellulaire (Daugaard et al., 2013). Une dernière étude publiée par Goka *et al.* en 2015 conforte le rôle de l'activité E3 ubiquitine-ligase d'HACE1 dans sa capacité de contrôle de la prolifération des cellules cancéreuses. Les auteurs montrent qu'HACE1 est capable de limiter la croissance cellulaire en agar de cellules MCF-7 (lignées issues de cancer du sein) en lien avec son activité de poly-ubiquitylation dégradative de Rac1 et de régulation du niveau de Rac1 actif dans ces cellules (Goka and Lippman, 2015).

L'activité de Rac1 est un élément essentiel à la croissance cellulaire. Les expériences visant à inhiber Rac1 en condition de déplétion de HACE1 pour montrer un effet de blocage du cycle ne permettent pas de démontrer formellement qu'HACE1 régule la croissance *via* sa capacité à contrôler Rac1. Pour aller plus en avant dans ces questions, nous avons analysé l'effet sur la croissance cellulaire de mutations ponctuelles de type « faux-sens » d'HACE1. Ceci devait nous renseigner sur le lien entre HACE1 et Rac1 dans la croissance et permettre de définir des positions essentielles d'HACE1 impliquées dans son association à Rac1. De plus, s'il est établi un lien génétique précis entre la modulation de l'expression de certaines E3 ubiquitine-ligases à domaine HECT et le cancer, la présence de mutations ponctuelles « délétères » de ce type d'E3L dans la cellule cancéreuse est peu documentée à ce jour (Chen and Matesic, 2007).

Nous avons donc émis l'hypothèse que des mutations ponctuelles d'HACE1 - situées en dehors du domaine catalytique - retrouvées dans le cancer peuvent avoir un impact sur sa capacité de contrôle de la prolifération cellulaire et la régulation de Rac1. L'approche originale que nous avons utilisée consistait à utiliser les informations d'une base de données de séquençage des tumeurs *versus* tissu sain, et notamment en recensant les mutations somatiques et « faux-sens » d'HACE1 associées à différents types de cancer. L'analyse de la base de données COSMIC version 64 nous a permis dans un premier temps d'identifier 13 mutations somatiques faux sens, hors domaine HECT, c'est-à-dire dans les domaines ANK (9 mutations) et MID (4 mutations) de la protéine (acides aminés 1-545). Parmi ces 13 mutations : 7 (54%) étaient issues d'adénocarcinomes coliques, 3 (23%) d'adénocarcinomes ovariens, 2 (15%) de cancers épidermoïdes cutanés et 1 (8%) d'un adénocarcinome pancréatique.

Nous avons établi des lignées cellulaires exprimant chacune des formes mutées d'HACE1 pour déterminer leur impact sur la croissance par comparaison à la forme sauvage de HACE1. Une étude précédente menée par Goka *et al.* avait montré qu'une perte d'expression d'HACE1 dans des cellules épithéliales mammaires de type MCF12A entraîne une augmentation de Rac1 actif entraînant une hyperprolifération cellulaire (Goka and Lippman, 2015). Nous avons donc initialement utilisé des lignées cellulaires MCF12A pour réaliser nos expériences. De façon remarquable, 100% des mutations testées (13/13) suppriment la capacité d'HACE1 à freiner la croissance cellulaire. En effet, en utilisant le test colorimétrique XTT pour la mesure de la prolifération cellulaire, nous avons observé que des cellules MCF12A exprimant stablement HACE1 mutée prolifèrent significativement plus vite que les cellules contrôles surexprimant la forme sauvage d'HACE1. Cette perte de fonction « suppresseur de croissance » d'HACE1 induite par les mutations ponctuelles du cancer a été confirmée pour 100% des mutations altérant l'activité E3L d'HACE1 envers Rac1 (4/4) (cf paragraphe II.2) : (i) en XTT en utilisant deux autres types de lignées cellulaires : MCF7 - lignée cellulaire tumorale d'adénocarcinome mammaire - et NIH/3T3 - lignée de cellules embryologiques fibroblastiques et (ii) en réalisant des tests de prolifération en « soft agar » (agar mou) sur des lignées MCF7.

L'ensemble de ces résultats suggère que des mutations d'HACE1 identifiées dans les cancers ont un rôle promoteur « driver » sur la croissance des cellules plutôt qu'un rôle passif « passager ». Ce rôle était jusqu'alors inconnu. Etant donné que Rac1 promeut la croissance cellulaire, cela soulevait la question de l'impact fonctionnel de ces mutations sur l'activité E3 ubiquitine-ligase de HACE1 envers sa cible Rac1.

II.2 Lien entre les mutations ponctuelles d'*hace1* du cancer et son activité E3 ubiquitine-ligase sur Rac1 dans la perte de contrôle de croissance cellulaire ? Analyse fonctionnelle et structurale.

Les tests d'ubiquitylation réalisés sur des cellules CHO (Chinese Hamster Ovary) surexprimant les différents mutants d'HACE1, montrent qu'environ 30% des mutations (4/13) altèrent son activité ubiquitine-ligase envers Rac1. De façon intéressante parmi ces 4 mutations, 3 d'entre elles (G175C, G175S et A204T) entraînent une diminution significative de la capacité d'HACE1 à ubiquityler une forme activée de Rac1 (Rac1 Q61L).

Nous avons poursuivi notre analyse par un positionnement de ces mutations sur un modèle de structure des répétitions de type ankyrine. Pour ce faire, nous avons collaboré avec le Dr Jacqueline Cherfils (Laboratoire d'enzymologie, ENS Cachan) qui a établi une structure prédictive de la partie N-terminale de la protéine HACE1, incluant les acides aminés 1 à 296, en utilisant le serveur Robetta. Cette modélisation avancée a permis de définir que le domaine ANK d'HACE1 comporte 7 répétitions ankyrine complètes, suivies d'une structure hélicoïdale qui coiffe une 8^{ème} répétition partielle. Ce modèle récent évoque une structure différente de celui précédemment proposé par l'équipe du Dr Sorensen (6 répétitions) (Anglesio et al., 2004). Nous avons alors pu placer les différents acides aminés mutés identifiés dans le cancer sur le domaine ANK sur le modèle de la structure (Figure 34).

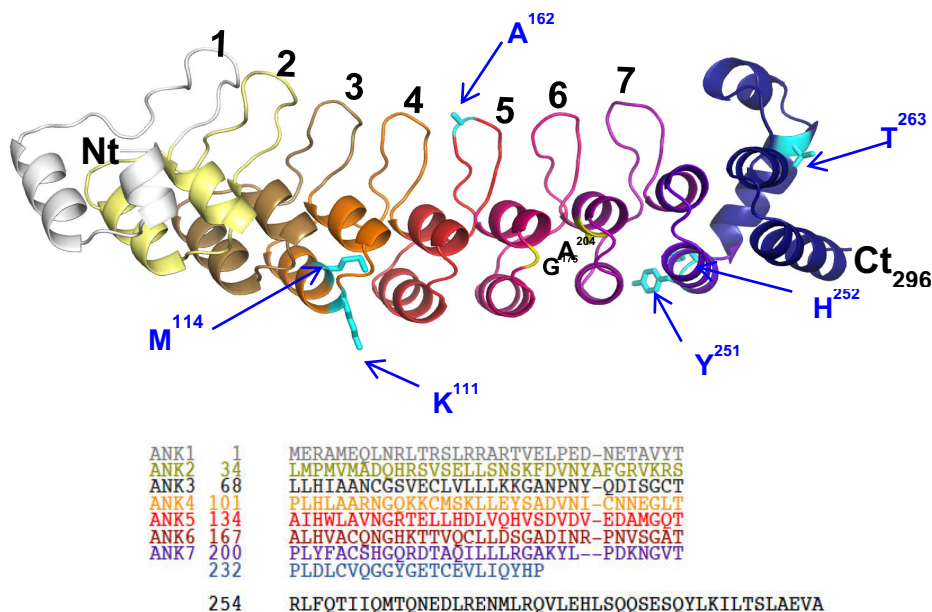


Figure 34 : Modélisation tridimensionnelle du domaine ANK d'HACE1.

En haut. Modélisation tridimensionnelle de la structure du domaine ANK de HACE1 calculé avec le serveur Robetta. Le modèle représente les 7 répétitions de type ankyrine de HACE1 (acides aminés 1 à 234, codés par couleur et numérotés de 1 à 7) suivies d'un motif ankyrine incomplet (acides aminés 235 à 253, violet foncé) coiffé d'une région en α -hélices (acides aminés 254 à 296, bleu foncé). En bas. Séquence primaire des répétitions de type ankyrine de la protéine HACE1 (acides-aminoés a 1 à 296). Les 7 répétitions et la 8^{ème} répétition incomplète sont alignées en fonction du modèle structural. Les résidus 254 à 263 sont censés former une structure hélicoïdale qui recouvre la dernière répétition de type ankyrine. D'après Andrio & Lotte, *et al.*, 2017.

Notre analyse nous montre que les acides aminés positions G175 et A204, localisés respectivement sur les répétitions de type ankyrines 6 et 7, se font face l'un à l'autre (Figure 35). De plus, ce modèle structural nous a permis de localiser la position G175 à la surface du domaine ANK. Nous avons fait l'hypothèse que cette position en surface une fois mutée ne devait pas avoir un effet majeur sur la structure du domaine ANK. La position 175 est hautement conservée dans les domaines ANK d'autres protéines déjà cristallisées, présentant soit une glycine, soit une asparagine. Les glycines et les asparagines sont les seuls acides aminés à conférer un coude serré dans la structure 3D des protéines. Ici ces acides aminés permettent de garder un coude entre deux hélices constituant un motif ankyrine. En testant l'impact de la mutation G175N sur l'ubiquitylation de Rac1, nous avons observé une diminution de sa capacité à ubiquityler Rac1 actif équivalente à celle observée avec la mutation G175S. Cela conforte l'hypothèse que la chaîne latérale de la glycine en position 175 est un élément essentiel de régulation de la capacité d'HACE1 à se fixer à Rac1. La position 175 n'a pas d'impact essentiel sur la structure globale des répétitions ankyrines. Ainsi, l'analyse intégrée de la fonction des mutants et de leur position sur la structure nous a amené à postuler l'existence à la surface des répétitions ankyrine d'un domaine d'interaction avec Rac1 dont G175 est un élément central.

Pour définir un éventuel épitope d'interaction avec Rac1, nous avons évalué l'impact de mutations ponctuelles d'acides aminés localisés en surface des répétitions ankyrine 5 et 6 et proche de la glycine 175 dans l'espace. Nous avons sélectionné, grâce à notre modélisation, les acides aminés V140, Q173 et N174. Toutes les mutations réalisées par « alanine scanning » (V140A, Q173A et N174A) altèrent la capacité d'HACE1 à ubiquityler Rac1. De façon intéressante, la substitution de la valine en position 140 par une alanine entraîne une augmentation de la forme active de Rac1, alors que la mutation ponctuelle V140L diminue significativement la capacité d'HACE1 à ubiquityler Rac1Q61L. Cela suggère que la taille de la chaîne latérale de l'acide aminé aurait un impact sur l'ubiquitylation de Rac1. Les mutations Q173A et N174A entraînent elles une diminution de l'ubiquitylation de Rac1Q61L. D'autres part, les expériences de co-immunoprécipitation réalisées en cellules HEK 293T entre ces différents mutants d'HACE1 et la forme active de Rac1 (Rac1 Q61L), nous ont permis de montrer qu'il y a une corrélation directe entre la capacité d'HACE1 à ubiquityler Rac1 et sa capacité à interagir avec sa cible.

L'ensemble de ces résultats confirment notre découverte qu'un groupe d'acides aminés situé en surface du domaine ANK d'HACE1 (répétitions ANK 5 et 6) est important pour sa fonction d'ubiquitylation de Rac1 (Figure 35).

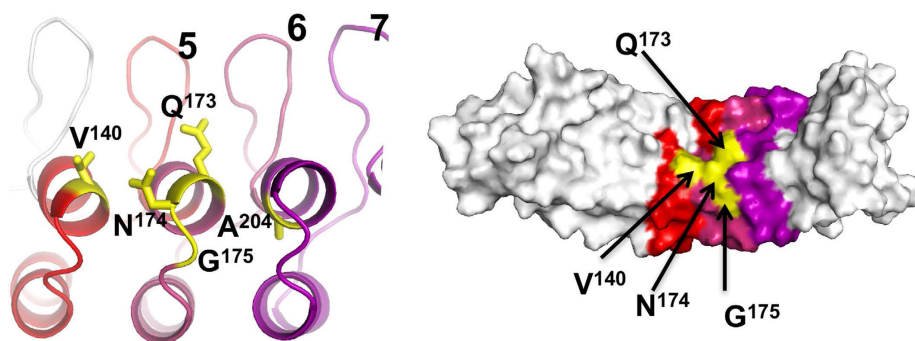


Figure 35 : Modélisation tridimensionnelle des répétitions de type ankyrine 5, 6 et 7.

A Gauche. Positionnement des acides aminés V140, Q173, N174, G175 en surface des répétitions ankyrines 5 et 6. L'alanine 204, fait face à la glycine 175 et est située sur la face interne de l'hélice. A Droite. Représentation des répétitions de type ankyrine 5, 6 et 7 et du groupe d'acides aminés de surface qui contrôle l'ubiquitylation de Rac1 (jaune). D'après Andrio & Lotte, *et al.*, 2017.

II.3 Analyse de l'interaction HACE1 et Rac1 : rôle du MID domain dans l'interaction d'HACE1 avec la forme active de Rac1 ?

Notre analyse des 13 mutations d'HACE1 associées au cancer a souligné le rôle clé du domaine ANK dans la coordination de l'association d'HACE1 à la forme active de Rac1. De façon intéressante, aucune des 4 mutations situées dans le domaine MID n'altère la capacité d'HACE1 à ubiquityler Rac1. Cependant, la position du domaine MID entre les domaines ANK et HECT soulève la question de sa contribution possible à la reconnaissance de Rac1 par HACE1.

Pour répondre à cette question, nous avons réalisé une série de co-immunoprécipitations entre la forme active de Rac1 et les différents domaines d'HACE1. Nos résultats montrent que Rac1 actif se lie aux domaines ANK et HECT d'HACE1. Ce résultat laisse penser qu'il est possible qu'HACE1 puisse former des oligomères.

Bien que le domaine MID seul n'interagisse pas avec Rac1 actif (non représenté), nous avons constaté qu'il modulait la capacité des domaines ANK et HECT à interagir avec Rac1. En effet, nous avons mesuré que MID + HECT avait une capacité inférieure à se lier à Rac1 actif par rapport au domaine HECT seul, alors que ANK + MID a montré une association accrue par rapport au domaine ANK seul. Nous avons ensuite analysé la spécificité de liaison des domaines ANK + MID à la forme active de Rac1, en comparant leur capacité d'association à un mutant actif (Rac1 Q61L) ou inactif (Rac1 Q17N) de Rac. Nous avons observé que les domaines ANK + MID s'associent spécifiquement à la forme active de Rac1, alors que les domaines ANK, HECT et MID + HECT ne sont pas sensibles à l'état d'activation de Rac1.

L'ensemble de ces résultats dévoile la coopération entre les domaines ANK et MID pour se lier à Rac1. De plus, ces expériences suggèrent un nouveau rôle jusqu'alors inconnu du domaine MID pour limiter la spécificité d'association d'HACE1 à la forme active de Rac1.

II.4 Discussion générale

Mon travail de thèse a permis, grâce à une approche originale d'étude de mutants issus de séquençage systématique de tumeurs, de préciser le mode d'interaction entre HACE1 et Rac1, *i.e.* les régions d'HACE1 impliquées dans le contrôle de son interaction avec Rac1. Ce travail a également permis de montrer pour la première fois que certaines mutations d'HACE1 retrouvées dans le cancer altèrent sa fonction de contrôle de la croissance cellulaire.

A l'heure du développement exponentiel et de la diffusion des techniques de séquençage « à haut débit », le nombre de séquences issues de tumeurs humaines et disponibles dans les banques, est en constante augmentation. L'analyse *in silico* réalisée en utilisant la version 79 de la base de données COSMIC mise en ligne à la fin de notre étude, a montré qu'il existe désormais 55 (*versus* 13 dans version 64) mutations somatiques « faux-sens » dans la partie d'HACE1 que nous avons étudiée (acides aminés 1 à 545). De façon surprenante, les mutations G175C et A204T n'apparaissent plus dans cette version de COSMIC, mais sont maintenant répertoriées dans le site cBioPortal, une autre base de données génomique du cancer (Cerami et al., 2012; Gao et al., 2013). Par ailleurs, en allant plus loin dans l'analyse des données de la v79, nous avons remarqué qu'il n'existe pas de « position privilégiée » (hotspot) sur la séquence d'*hace1* de mutations ponctuelles somatiques faux sens. Seule la mutation R332Q apparaît à 3 reprises. De plus, nous avons remarqué que 50% de tous les mutants dans le domaine ANK (9 sur 18, version COSMIC 79) sont localisés dans les répétitions de type ankyrine 5 et 6. Cette distribution focale remarquable des mutations d'HACE1 associées au cancer dans les répétitions 5 et 6, mise en parallèle aux résultats obtenus dans notre étude, suggère que cette région est d'une importance cruciale dans le mécanisme qui lie HACE1 et sa fonction d'ubiquitylation de Rac1 à son contrôle de la prolifération cellulaire. Enfin la présence d'une mutation associée au cancer en position Q173 dans la dernière version de COSMIC, qui correspond à une position que nous avons identifiée dans notre analyse prédictive comme étant essentielle dans l'ubiquitylation de la forme active de Rac1, renforce encore un peu plus la valeur de notre modèle.

L'activité de Rac1 est essentielle à la prolifération cellulaire. Certaines études ont suggéré un lien entre la perte d'expression de l'activité E3 ubiquitine-ligase d'HACE1, l'augmentation des niveaux cellulaires de Rac1 actif et l'augmentation de la prolifération cellulaire en MCF12A (Goka and Lippman, 2015). Dans notre étude, nous n'avons pas pu évaluer le niveau de Rac1 actif (non détecté en pull-down GST-Pak) dans les cellules MCF12A exprimant les mutants ponctuels « perte de fonction d'ubiquitylation d'HACE1 » (G175S, G175C et A204T) et qui présentent une croissance cellulaire accrue en comparaison aux cellules contrôles exprimant HACE1 non mutée. A la différence de la forme sauvage d'HACE1 qui entraîne une diminution des niveaux cellulaires endogène de Rac1, nous avons montré que l'expression de ces mutants est associée à une absence d'effet sur les niveaux cellulaires de Rac1. S'il n'est pas possible d'exclure que les effets observés sur la croissance cellulaire soient liés en partie à

l'impact des mutations ponctuelles d'HACE1 sur d'autres cibles d'HACE1 impliquées dans la signalisation de la croissance cellulaire, l'impact de ces mutations sur l'ubiquitylation de Rac1 et la régulation des niveaux de Rac1 actif dans la cellule joue probablement un rôle dans ce phénotype. D'autres expériences seront nécessaires pour répondre à ces questions.

Notre étude originale suggère un nouveau rôle de mutations ponctuelles d'HACE1 identifiées dans des cellules cancéreuses, qui est d'altérer la capacité de contrôler la croissance cellulaire. L'analyse *in silico* des données issues de la base COSMIC v64 montre que 34 mutations ponctuelles somatiques et faux-sens sont retrouvées sur la protéine HACE1 (acides aminés 1 à 909) parmi lesquelles 13 mutations se situent dans notre zone d'étude (acides aminés étudiés 1 à 545). Parmi ces 13 mutations qui altèrent toutes la capacité d'HACE1 à freiner la croissance cellulaire : 7 (54%) sont issues d'adénocarcinomes coliques, 3 (23%) d'adénocarcinomes ovariens, 2 (15%) de cancers épidermoïdes cutanés et 1 (8%) d'un adénocarcinome pancréatique. Dans la version v79, 100 mutations somatiques et « faux sens » sont identifiées sur la protéine HACE1 entière et 55 dans la zone d'étude. Ces 100 mutations sont issues du séquençage de plus de 28500 échantillons de tumeurs de patients, ce qui correspond à une fréquence de mutation d'HACE1 de l'ordre de 1/300 échantillons analysés en moyenne. Les mutations sont issues de séquences d'adénocarcinomes coliques pour plus de 30% d'entre elles et de cancers cutanés pour environ 20% d'entre elles, les 50% restantes se répartissent au sein de différents types de cancers d'origine épithéliale, mésenchymateuse ou hématopoïétique. L'ensemble de ces données suggère que les découvertes réalisées à l'échelle moléculaire sur les modalités d'interaction entre HACE1 et Rac1 et l'effet des mutations d'HACE1 sur la croissance cellulaire pourraient nous permettre de mieux comprendre certains facteurs impliqués dans la carcinogénèse notamment la carcinogénèse colique. En effet, le cancer du côlon sporadique progresse notamment par l'accumulation au cours du temps de mutations somatiques cellulaires. Tout indique que la perte d'expression ou des mutations ponctuelles d'HACE1 pourrait favoriser la progression de ce type de cancer.

Enfin notre étude indique que le domaine MID de la protéine HACE1 contribue à discriminer la forme active de Rac1. Cela soulève une question intéressante : notamment pour comprendre comment le domaine MID assure une spécificité de reconnaissance de la forme activée de Rac1 et des autres formes de Rac comme cible d'HACE1. Pour répondre à cette question, il est important de pouvoir réaliser la cristallographie de la protéine HACE1 pour connaître la structure entière de la protéine. Cette perspective est en cours de réalisation en collaboration avec le laboratoire du Dr Jacqueline Cherfils (ENS Cachan). Cela devrait permettre aussi de mieux définir l'étendue et la fonction de l'épitope qui régule l'association HACE1-Rac1 et de déterminer s'il est impliqué dans la liaison directe à Rac1 ou s'il s'agit d'un effet allostérique sur la E3 ou d'une combinaison des deux phénomènes.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Conclusion et perspectives

Il est désormais admis qu'HACE1 est un suppresseur de tumeur majeur dont l'expression est diminuée dans un grand nombre de cancer humains (Zhang et al., 2007). De plus, des niveaux bas d'expression d'HACE1 sont corrélées avec un mauvais pronostic de certains cancers comme les neuroblastomes (Diskin et al., 2012). S'il est prouvé que la forme activée de l'oncogène Rac1 est une cible majeure de l'activité E3 ubiquitine-ligase d'HACE1 (Torrino et al., 2011), le lien de subordination entre Rac1 et HACE1 et le rôle de l'interaction entre ces deux protéines dans le cancer ne sont pas complètement élucidés.

Les résultats obtenus au cours de mon travail de thèse ont mis en lumière le rôle jusqu'alors inconnu connu, de mutations ponctuelles somatiques présentes dans le cancer et altérant la capacité d'HACE1 à contrôler la croissance cellulaire. De plus, mes expériences ont permis de montrer l'existence d'un groupe d'acides aminés présents sur les répétitions de type ankyrine 5, 6 et 7 qui contrôle l'ubiquitylation de Rac1 par HACE1, et de préciser le rôle du domaine MID d'HACE1 dans la spécificité d'interaction avec la forme active de Rac1 (Andrio et al., 2017). Ces découvertes réalisées à l'échelle moléculaire et cellulaire, constituent une première étape dans la compréhension de l'implication de l'axe de signalisation toxine CNF1 d'*E. coli*/Rac1/HACE1 dans le cancer et dans la pathologie infectieuse. A l'issue de ce travail de thèse, des perspectives de recherche intéressantes s'offrent à nous.

Perspectives en cancérologie

Les découvertes concernant l'axe de signalisation toxine CNF1 d'*E. coli*/HACE1/Rac1 pourraient être importantes dans la compréhension des mécanismes impliqués dans la tumorigénèse et notamment la tumorigénèse des cancers du côlon de type sporadique comme évoqué précédemment. Pour rappel, des études épidémiologiques chez l'homme montrent une forte prévalence de 70 à 90% de la colonisation bactérienne mucoale des polypes adénomateux (lésion pré-cancéreuses) et carcinomes coliques avec une prédominance de l'espèce *E. coli* (mucosa-associated *E. coli*) (Bronowski et al., 2008; Swidsinski et al., 1998). Les *E. coli* associés aux cancers colorectaux ont principalement des caractéristiques génétiques d'UPEC, ce qui n'est pas le cas de ceux associés aux muqueuses de patients souffrant de maladie de Crohn (Bronowski et al., 2008). Chez l'homme, il a été montré que la muqueuse colique de patients atteints de CCR était préférentiellement colonisée par des souches d'*E. coli* du groupe B2, (plus faible colonisation par les souches des groupes A et D). Ce groupe d'*E. coli* possède les

gènes codant pour des cyclomodulines et génotoxines. Génotoxines et cyclomodulines montrent une différence de répartition entre les *E. coli* associés aux muqueuses des CCR (55% *pks* et 39% *cnf1*) en comparaison aux souches associées aux muqueuses des diverticules coliques bénins (19% *pks* et 13% *cnf1*) (Buc et al., 2013). Les avancées considérables réalisées ces dernières années tendent à attribuer un rôle pro-tumoral à la colibactine produite par les souches d'*E. coli pks+* dans l'étiologie des cancers colorectaux (cf introduction paragraphe I.3.2.2.3). La question d'un rôle pro-oncogénique de la toxine CNF1 dans les CCR est quant à elle non élucidée. Le gène *cnf1* est pourtant fortement associé aux *E. coli* muqueux colonisant les cancers colorectaux et diverticules coliques (39.5% et 12.9%). Cela pose la question de l'impact de l'activité de la toxine CNF1 sur sa cible Rac1 dans les cancers colorectaux et le rôle potentiellement protecteur d'HACE1. Pour tenter de répondre à cette question nous pourrions tirer parti des expériences sur les lignées cellulaires réalisées au cours de ma thèse. Dans un premier temps nous pourrions étudier l'impact de la cyclomoduline CNF1 sur la croissance cellulaire en agar mou de lignées cellulaires exprimant stablement la forme sauvage de Rac1 ou vecteur vide. Le résultat de ces expériences sera à comparer avec celui d'expériences identiques réalisées en condition de déplétion d'HACE1, ce qui nous permettra d'évaluer le rôle protecteur d'HACE1 dans la croissance cellulaire induite par CNF1 sur ce modèle. En fonction de nos résultats, des expériences sur modèle murin pourront être envisagées pour tester l'impact de CNF1 sur la capacité à former des tumeurs et tester ainsi nos hypothèses.

En outre, la poursuite des études autour de l'axe CNF1/Rac1/HACE1 pourrait apporter des éléments nouveaux dans la compréhension d'autres processus cancéreux, notamment dans le cancer de la prostate dont les facteurs favorisants ne sont pas tous connus à ce jour. Une étude récente publiée par Guo. *et al.* suggère que la toxine CNF1 produite par les UPEC colonisant l'arbre urinaire, pourrait favoriser la progression cancéreuse en stimulant la croissance et la migration cellulaire *via* l'activation d'une voie de signalisation impliquant Cdc42/PAK1 et l'augmentation de l'expression de MMP-9 (Guo et al., 2017). Rac1 et Cdc42 partagent un grand nombre d'effecteurs comme la kinase Pak1 qui est impliquée dans le cancer. Il est probable que l'implication de Rac1 et Cdc42 dans les effets cellulaires induits par CNF1, et notamment dans le cancer, soient en lien direct avec la sensibilité de chacune de ces GTPases à la dégradation protéasomale. Une absence de dégradation de l'une ou l'autre de ces GTPases aurait donc un effet dominant. L'ensemble de ces travaux montre donc l'intérêt de déterminer plus précisément une implication possible de CNF1 dans le cancer en lien avec la régulation de Rac1 par HACE1.

En dehors d'avancées possibles dans le cancer du côlon ou de la prostate, la meilleure compréhension de l'interaction moléculaire entre HACE1 et Rac1 permettrait possiblement de préciser des processus moléculaires fondamentaux de la cancérogénèse. De façon intéressante la mutation

ponctuelle Rac1 P29S qui est une mutation « gain de fonction », est retrouvée très fréquemment dans les mélanomes mais également dans des carcinomes épidermoïdes cutanés et dans le cancer du sein. Il serait intéressant d'évaluer si cette mutation fréquemment associée au cancer échappe à la régulation par HACE1. Nous pourrions dans un premier temps, en utilisant des techniques maîtrisées au laboratoire, évaluer la capacité d'HACE1 à interagir et à ubiquityler le mutant P29S de Rac1. D'un point de vue fonctionnel, il serait également intéressant de comparer la capacité de croissance en agar mou de cellules surexprimant Rac1 P29S en comparaison des cellules contrôles surexprimant Rac1 sauvage et vecteur vide, et d'autre part la capacité de croissance de ces mêmes cellules en condition de surexpression d'HACE1. Ces résultats nous permettraient d'évaluer si le mutant P29S est capable d'échapper au contrôle d'HACE1 qui limite la prolifération cellulaire. Les capacités transformantes du mutant Rac1 P29S pourront être également évaluées sur modèle de souris immunodéficientes, en injectant aux souris des cellules surexprimant ce mutant en condition contrôle ou d'expression d'HACE1.

Perspectives en microbiologie infectieuse

Enfin il est important de préciser que l'étude de l'interaction moléculaire entre HACE1 et Rac1, ainsi que la meilleure compréhension de l'axe de signalisation CNF1/HACE1/Rac1 offre des perspectives intéressantes également dans la compréhension des mécanismes infectieux. Une étude récente a montré qu'HACE1 joue un rôle important dans la réponse intracellulaire aux agents pathogènes de type *Listeria monocytogenes* (Tortola et al., 2016b). NF- κ B et TNFR1 sont essentiels à la réponse immunitaire et l'élimination des bactéries *in-vivo* lors de l'infection à *L. monocytogenes* (Pfeffer et al., 1993; Sha et al., 1995). Dans leur étude, Tortola *et al.* ont montré que l'inactivation génétique d'*hace1* inhibe l'activation d'NF- κ B que stimule le TNF, et *in vivo* la réponse immunitaire anti-infectieuse lors de l'infection de souris KO *hace1* par *L. monocytogenes* (Tortola et al., 2016b). Si cette première étude établit un premier lien entre HACE1 et la réponse immunitaire cellulaire dirigée contre *L. monocytogenes*, nos résultats obtenus au laboratoire ouvrent des perspectives intéressantes sur un éventuel rôle protecteur d'HACE1 dans l'infection par des souches d'*E. coli* produisant CNF1 responsables d'infections fréquentes, graves et parfois mortelles chez l'homme (pyélonéphrites, prostatites et bactériémies). Nous avons prouvé, que l'activation de Rac1 par CNF1, suivie de sa dégradation protéasomale, sont essentielles pour l'invasion de monocouches cellulaires par les *E. coli* pathogènes (Doye et al., 2002). Nous avons ensuite montré, en réalisant des infections *in cellulo* par des souches d'UPEC de cellules endothéliales HUVEC intoxiquées par CNF1, que la déplétion d'HACE1 entraîne une diminution majeure de l'internalisation des bactéries dans des monocouches de cellules endothéliales (Torrino et al., 2011). Il serait donc intéressant d'établir le rôle d'HACE1 *in vivo* dans la réponse à l'infection par des souches d'*E. coli* produisant le CNF1. Pour ce faire, nous pourrions utiliser

un modèle murin de bactériémie par injection I.V bien maîtrisé au laboratoire, et comparer la survie de souris KO *hace1* recevant des doses croissantes d'*E. coli* produisant CNF1, avec celles de souris sauvages recevant les mêmes doses de bactéries. En utilisant le même modèle de souris KO *hace1* et en réalisant une injection transurétrale des bactéries, nous pourrions évaluer le rôle éventuel d'HACE1 dans les infections urinaires à *E. coli* CNF1+.

Références bibliographiques

- Abramovitch, R.B., Janjusevic, R., Stebbins, C.E., and Martin, G.B. (2006). Type III effector AvrPtoB requires intrinsic E3 ubiquitin ligase activity to suppress plant cell death and immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *103*, 2851–2856.
- Acconcia, F., Sigismund, S., and Polo, S. (2009). Ubiquitin in trafficking: The network at work. *Experimental Cell Research* *315*, 1610–1618.
- Acquaviva, C., and Pines, J. (2006). The anaphase-promoting complex/cyclosome: APC/C. *J. Cell. Sci.* *119*, 2401–2404.
- Adams, J. (2004). The proteasome: a suitable antineoplastic target. *Nature Reviews Cancer* *4*, 349–360.
- Aktories, K., Lang, A.E., Schwan, C., and Mannherz, H.G. (2011). Actin as target for modification by bacterial protein toxins. *Febs J.* *278*, 4526–4543.
- Alto, N.M., Shao, F., Lazar, C.S., Brost, R.L., Chua, G., Mattoo, S., McMahon, S.A., Ghosh, P., Hughes, T.R., Boone, C., et al. (2006). Identification of a bacterial type III effector family with G protein mimicry functions. *Cell* *124*, 133–145.
- Amann, K.J., and Pollard, T.D. (2001). The Arp2/3 complex nucleates actin filament branches from the sides of pre-existing filaments. *Nat. Cell Biol.* *3*, 306–310.
- Amerik, A.Y., and Hochstrasser, M. (2004). Mechanism and function of deubiquitinating enzymes. *Biochim. Biophys. Acta* *1695*, 189–207.
- Andrio, E., Lotte, R., Hamaoui, D., Cherfils, J., Doye, A., Daugaard, M., Sorensen, P.H., Bost, F., Ruimy, R., Mettouchi, A., et al. (2017). Identification of cancer-associated missense mutations in hace1 that impair cell growth control and Rac1 ubiquitylation. *Nature Publishing Group* 1–11.
- Anglesio, M.S., Evdokimova, V., and Melnyk, N. (2004). Differential expression of a novel ankyrin containing E3 ubiquitin-protein ligase, Hace1, in sporadic Wilms' tumor versus normal kidney. *Human Molecular.*
- Arikawa, K., Meraz, I.M., Nishikawa, Y., Ogasawara, J., and Hase, A. (2005). Interleukin-8 secretion by epithelial cells infected with diffusely adherent *Escherichia coli* possessing Afa adhesin-coding genes. *Microbiol. Immunol.* *49*, 493–503.
- Arthur, J.C., Perez-Chanona, E., Mühlbauer, M., Tomkovich, S., Uronis, J.M., Fan, T.-J., Campbell, B.J., Abujamel, T., Dogan, B., Rogers, A.B., et al. (2012). Intestinal inflammation targets cancer-inducing activity of the microbiota. *Science* *338*, 120–123.
- Ashida, H., Kim, M., and Sasakawa, C. (2014). Exploitation of the host ubiquitin system by human bacterial pathogens. *Nat. Rev. Microbiol.* *12*, 399–413.
- Ashida, H., Kim, M., Schmidt-Supprian, M., Ma, A., Ogawa, M., and Sasakawa, C. (2010). A bacterial E3 ubiquitin ligase IpaH9.8 targets NEMO/IKKgamma to dampen the host NF-kappaB-mediated inflammatory response. *Nat. Cell Biol.* *12*, 66–73–suppp1–9.
- Ashida, H., Toyotome, T., Nagai, T., and Sasakawa, C. (2007). Shigella chromosomal IpaH proteins are secreted via the type III secretion system and act as effectors. *Mol. Microbiol.* *63*, 680–693.
- Aubert, D.F., Xu, H., Yang, J., Shi, X., Gao, W., Li, L., Bisaro, F., Chen, S., Valvano, M.A., and Shao, F. (2016). A Burkholderia Type VI Effector Deamidates Rho GTPases to Activate the Pyrin Inflammasome and Trigger Inflammation. *Cell Host Microbe* *19*, 664–674.
- Baumgart, M., Dogan, B., Rishniw, M., Weitzman, G., Bosworth, B., Yantiss, R., Orsi, R.H., Wiedmann, M.,

McDonough, P., Kim, S.G., et al. (2007). Culture independent analysis of ileal mucosa reveals a selective increase in invasive *Escherichia coli* of novel phylogeny relative to depletion of Clostridiales in Crohn's disease involving the ileum. *Isme J* 1, 403–418.

Berger, C.N., Billker, O., Meyer, T.F., Servin, A.L., and Kansau, I. (2004). Differential recognition of members of the carcinoembryonic antigen family by Afa/Dr adhesins of diffusely adhering *Escherichia coli* (Afa/Dr DAEC). *Mol. Microbiol.* 52, 963–983.

Bétis, F., Brest, P., Hofman, V., Guignot, J., Kansau, I., Rossi, B., Servin, A., and Hofman, P. (2003). Afa/Dr diffusely adhering *Escherichia coli* infection in T84 cell monolayers induces increased neutrophil transepithelial migration, which in turn promotes cytokine-dependent upregulation of decay-accelerating factor (CD55), the receptor for Afa/Dr adhesins. *Infect. Immun.* 71, 1774–1783.

Bingham, S.A. (2000). Diet and colorectal cancer prevention. *Biochem. Soc. Trans.* 28, 12–16.

Blum, G., Falbo, V., Caprioli, A., and Hacker, J. (1995). Gene clusters encoding the cytotoxic necrotizing factor type 1, Prs-fimbriae and alpha-hemolysin form the pathogenicity island II of the uropathogenic *Escherichia coli* strain J96. *FEMS Microbiol. Lett.* 126, 189–195.

Boisen, N., Struve, C., Scheutz, F., Krogfelt, K.A., and Nataro, J.P. (2008). New adhesin of enteroaggregative *Escherichia coli* related to the Afa/Dr/AAF family. *Infect. Immun.* 76, 3281–3292.

Boleij, A., van Gelder, M.M.H.J., Swinkels, D.W., and Tjalsma, H. (2011). Clinical Importance of *Streptococcus gallolyticus* infection among colorectal cancer patients: systematic review and meta-analysis. *Clin. Infect. Dis.* 53, 870–878.

Bommarius, B., Maxwell, D., Swimm, A., Leung, S., Corbett, A., Bornmann, W., and Kalman, D. (2007). Enteropathogenic *Escherichia coli* Tir is an SH2/3 ligand that recruits and activates tyrosine kinases required for pedestal formation. *Mol. Microbiol.* 63, 1748–1768.

Boudeau, J., Glasser, A.L., Masseret, E., Joly, B., and Darfeuille-Michaud, A. (1999). Invasive ability of an *Escherichia coli* strain isolated from the ileal mucosa of a patient with Crohn's disease. *Infect. Immun.* 67, 4499–4509.

Boureux, A., Vignal, E., Faure, S., and Fort, P. (2007). Evolution of the Rho family of ras-like GTPases in eukaryotes. *Mol. Biol. Evol.* 24, 203–216.

Boyer, L., Doye, A., Rolando, M., Flatau, G., Munro, P., Gounon, P., Clément, R., Pulcini, C., Popoff, M.R., Mettouchi, A., et al. (2006). Induction of transient macroapertures in endothelial cells through RhoA inhibition by *Staphylococcus aureus* factors. *J. Cell Biol.* 173, 809–819.

Boyer, L., Magoc, L., Dejardin, S., Cappillino, M., Paquette, N., Hinault, C., Charriere, G.M., Ip, W.K.E., Fracchia, S., Hennessy, E., et al. (2011). Pathogen-derived effectors trigger protective immunity via activation of the Rac2 enzyme and the IMD or Rip kinase signaling pathway. *Immunity* 35, 536–549.

Boyer, L., Travaglione, S., Falzano, L., Gauthier, N.C., Popoff, M.R., Lemichez, E., Fiorentini, C., and Fabbri, A. (2004). Rac GTPase instructs nuclear factor-kappaB activation by conveying the SCF complex and Ikbalpha to the ruffling membranes. *Mol. Biol. Cell* 15, 1124–1133.

Brennan, C.A., and Garrett, W.S. (2016). Gut Microbiota, Inflammation, and Colorectal Cancer. *Annu. Rev. Microbiol.* 70, 395–411.

Bronowski, C., Smith, S.L., Yokota, K., Corkill, J.E., Martin, H.M., Campbell, B.J., Rhodes, J.M., Hart, C.A., and Winstanley, C. (2008). A subset of mucosa-associated *Escherichia coli* isolates from patients with colon cancer, but not Crohn's disease, share pathogenicity islands with urinary pathogenic *E. coli*. *Microbiology (Reading, Engl.)* 154, 571–583.

Buc, E., Dubois, D., Sauvanet, P., Raisch, J., Delmas, J., Darfeuille-Michaud, A., Pezet, D., and Bonnet, R. (2013).

High prevalence of mucosa-associated *E. coli* producing cyclomodulin and genotoxin in colon cancer. *PLoS ONE* 8, e56964.

Buchwald, G., Friebel, A., Galán, J.E., Hardt, W.-D., Wittinghofer, A., and Scheffzek, K. (2002). Structural basis for the reversible activation of a Rho protein by the bacterial toxin SopE. *Embo J.* 21, 3286–3295.

Buetow, L., Flatau, G., Chiu, K., Boquet, P., and Ghosh, P. (2001). Structure of the Rho-activating domain of *Escherichia coli* cytotoxic necrotizing factor 1. *Nat. Struct. Biol.* 8, 584–588.

Buetow, L., and Huang, D.T. (2016). Structural insights into the catalysis and regulation of E3 ubiquitin ligases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 17, 626–642.

Burd, E.M. (2003). Human papillomavirus and cervical cancer. *Clin. Microbiol. Rev.* 16, 1–17.

Bustelo, X.R., Sauzeau, V., and Berenjeno, I.M. (2007). GTP-binding proteins of the Rho/Rac family: regulation, effectors and functions in vivo. *BioEssays* 29, 356–370.

Candela, M., Turrone, S., Biagi, E., Carbonero, F., Rampelli, S., Fiorentini, C., and Brigidi, P. (2014). Inflammation and colorectal cancer, when microbiota-host mutualism breaks. *World J. Gastroenterol.* 20, 908–922.

Caprioli, A., Donelli, G., Falbo, V., Possenti, R., Roda, L.G., Roscetti, G., and Ruggeri, F.M. (1984). A cell division-active protein from *E. coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 118, 587–593.

Caprioli, A., Falbo, V., Roda, L.G., Ruggeri, F.M., and Zona, C. (1983). Partial purification and characterization of an *Escherichia coli* toxic factor that induces morphological cell alterations. *Infect. Immun.* 39, 1300–1306.

Carbonetti, N.H., and Williams, P.H. (1984). A cluster of five genes specifying the aerobactin iron uptake system of plasmid ColV-K30. *Infect. Immun.* 46, 7–12.

Carbonetti, N.H., Boonchai, S., Parry, S.H., Väisänen-Rhen, V., Korhonen, T.K., and Williams, P.H. (1986). Aerobactin-mediated iron uptake by *Escherichia coli* isolates from human extraintestinal infections. *Infect. Immun.* 51, 966–968.

Cario, E. (2013). Microbiota and innate immunity in intestinal inflammation and neoplasia. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 29, 85–91.

Carrier, M.-F., and Shekhar, S. (2017). Global treadmilling coordinates actin turnover and controls the size of actin networks. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 18, 389–401.

Castillo-Lluya, S., Tan, C.T., Dugaard, M., Sorensen, P.H.B., and Malliri, A. (2013). The tumour suppressor HACE1 controls cell migration by regulating Rac1 degradation. *Oncogene* 32, 1735–1742.

Cerami, E., Gao, J., Dogrusoz, U., Gross, B.E., Sumer, S.O., Aksoy, B.A., Jacobsen, A., Byrne, C.J., Heuer, M.L., Larsson, E., et al. (2012). The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discov* 2, 401–404.

Chang, F., Lemmon, C., Lietha, D., Eck, M., and Romer, L. (2011). Tyrosine phosphorylation of Rac1: a role in regulation of cell spreading. *PLoS ONE* 6, e28587.

Chen, C., and Matesic, L.E. (2007). The Nedd4-like family of E3 ubiquitin ligases and cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 26, 587–604.

Chu, F.-F., Esworthy, R.S., Chu, P.G., Longmate, J.A., Huycke, M.M., Wilczynski, S., and Doroshow, J.H. (2004). Bacteria-induced intestinal cancer in mice with disrupted Gpx1 and Gpx2 genes. *Cancer Res.* 64, 962–968.

Chung, J.W., Hong, S.J., Kim, K.J., Goti, D., Stins, M.F., Shin, S., Dawson, V.L., Dawson, T.M., and Kim, K.S. (2003). 37-kDa laminin receptor precursor modulates cytotoxic necrotizing factor 1-mediated RhoA activation and

bacterial uptake. *J. Biol. Chem.* 278, 16857–16862.

Clague, M.J., Heride, C., and Urbé, S. (2015). The demographics of the ubiquitin system. *Trends in Cell Biology* 25, 417–426.

Clermont, O., Bonacorsi, S., and Bingen, E. (2000). Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 4555–4558.

Clermont, O., Christenson, J.K., Denamur, E., and Gordon, D.M. (2013). The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environ Microbiol Rep* 5, 58–65.

Clermont, O., Lescat, M., O'Brien, C.L., Gordon, D.M., Tenaillon, O., and Denamur, E. (2008). Evidence for a human-specific *Escherichia coli* clone. *Environ. Microbiol.* 10, 1000–1006.

Clermont, O., Olier, M., Hoede, C., Diancourt, L., Brisse, S., Keroudean, M., Glodt, J., Picard, B., Oswald, E., and Denamur, E. (2011). Animal and human pathogenic *Escherichia coli* strains share common genetic backgrounds. *Infect. Genet. Evol.* 11, 654–662.

Comayras, C., Tasca, C., Pérès, S.Y., Ducommun, B., Oswald, E., and De Rycke, J. (1997). *Escherichia coli* cytolethal distending toxin blocks the HeLa cell cycle at the G2/M transition by preventing cdc2 protein kinase dephosphorylation and activation. *Infect. Immun.* 65, 5088–5095.

Contamin, S., Galmiche, A., Doye, A., Flatau, G., Benmerah, A., and Boquet, P. (2000). The p21 Rho-activating toxin cytotoxic necrotizing factor 1 is endocytosed by a clathrin-independent mechanism and enters the cytosol by an acidic-dependent membrane translocation step. *Mol. Biol. Cell* 11, 1775–1787.

Conte, M.P., Schippa, S., Zamboni, I., Penta, M., Chiarini, F., Seganti, L., Osborn, J., Falconieri, P., Borrelli, O., and Cucchiara, S. (2006). Gut-associated bacterial microbiota in paediatric patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 55, 1760–1767.

Conte, M.P., Longhi, C., Marazzato, M., Conte, A.L., Aleandri, M., Lepanto, M.S., Zagaglia, C., Nicoletti, M., Aloï, M., Totino, V., et al. (2014). Adherent-invasive *Escherichia coli* (AIEC) in pediatric Crohn's disease patients: phenotypic and genetic pathogenic features. *BMC Res Notes* 7, 748.

Crohen, M.A., and Finlay, B.B. (2010). Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 26–38.

Cuevas-Ramos, G., Petit, C.R., Marcq, I., Boury, M., Oswald, E., and Nougayrède, J.-P. (2010). *Escherichia coli* induces DNA damage in vivo and triggers genomic instability in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 11537–11542.

Cui, J., Yao, Q., Li, S., Ding, X., Lu, Q., Mao, H., Liu, L., Zheng, N., Chen, S., and Shao, F. (2010). Glutamine deamidation and dysfunction of ubiquitin/NEDD8 induced by a bacterial effector family. *Science* 329, 1215–1218.

Darfeuille-Michaud, A., Boudeau, J., Bulois, P., Neut, C., Glasser, A.-L., Barnich, N., Bringer, M.-A., Swidsinski, A., Beaugerie, L., and Colombel, J.-F. (2004). High prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in Crohn's disease. *Gastroenterology* 127, 412–421.

Daugaard, M., Nitsch, R., Razaghi, B., McDonald, L., Jarrar, A., Torino, S., Castillo-Lluva, S., Rotblat, B., Li, L., Malliri, A., et al. (2013). Hace1 controls ROS generation of vertebrate Rac1-dependent NADPH oxidase complexes. *Nat Commun* 4, 2180.

De Rycke, J., González, E.A., Blanco, J., Oswald, E., Blanco, M., and Boivin, R. (1990). Evidence for two types of cytotoxic necrotizing factor in human and animal clinical isolates of *Escherichia coli*. *Journal of Clinical Microbiology* 28, 694–699.

Der, C.J., Krontiris, T.G., and 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.

DerMardirossian, C.L., and Bokoch, G.M. (2005). GDIs: central regulatory molecules in Rho GTPase activation. *Trends in Cell Biology* **15**, 356–363.

Deshaies, R.J., and Joazeiro, C.A.P. (2009). RING Domain E3 Ubiquitin Ligases. *Annu. Rev. Biochem.* **78**, 399–434.

Diabate, M., Munro, P., Garcia, E., Jacquelin, A., Michel, G., Obba, S., Goncalves, D., Luci, C., Marchetti, S., Demon, D., et al. (2015). *Escherichia coli* α -hemolysin counteracts the anti-virulence innate immune response triggered by the Rho GTPase activating toxin CNF1 during bacteremia. *PLoS Pathog.* **11**, e1004732.

Dikic, I., Wakatsuki, S., and Walters, K.J. (2009). Ubiquitin-binding domains - from structures to functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**, 659–671.

Diskin, S.J., Capasso, M., Schnepf, R.W., Cole, K.A., Attiyeh, E.F., Hou, C., Diamond, M., Carpenter, E.L., Winter, C., Lee, H., et al. (2012). Common variation at 6q16 within HACE1 and LIN28B influences susceptibility to neuroblastoma. *Nat. Genet.* **44**, 1126–1130.

Doye, A., Boyer, L., Mettouchi, A., and Lemichez, E. (2006). Ubiquitin-mediated proteasomal degradation of Rho proteins by the CNF1 toxin. *Meth. Enzymol.* **406**, 447–456.

Doye, A., Mettouchi, A., Bossis, G., Clément, R., Buisson-Touati, C., Flatau, G., Gagnoux, L., Piechaczyk, M., Boquet, P., and Lemichez, E. (2002). CNF1 exploits the ubiquitin-proteasome machinery to restrict Rho GTPase activation for bacterial host cell invasion. *Cell* **111**, 553–564.

Dubois, D., Delmas, J., Cady, A., Robin, F., Sivignon, A., Oswald, E., and Bonnet, R. (2010). Cyclomodulins in urosepsis strains of *Escherichia coli*. *Journal of Clinical Microbiology* **48**, 2122–2129.

Eckburg, P.B., Bik, E.M., Bernstein, C.N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., Gill, S.R., Nelson, K.E., and Relman, D.A. (2005). Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* **308**, 1635–1638.

Eitel, J., Meixenberger, K., van Laak, C., Orlovski, C., Hocke, A., Schmeck, B., Hippenstiel, S., N'Guessan, P.D., Suttorp, N., and Opitz, B. (2012). Rac1 regulates the NLRP3 inflammasome which mediates IL-1 β production in *Chlamydomonas pneumoniae* infected human mononuclear cells. *PLoS ONE* **7**, e30379.

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

Erdem, A.L., Avelino, F., Xicohtencatl-Cortes, J., and Girón, J.A. (2007). Host protein binding and adhesive properties of H6 and H7 flagella of attaching and effacing *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **189**, 7426–7435.

Escobar-Páramo, P., Clermont, O., Blanc-Potard, A.-B., Bui, H., Le Bouguénec, C., and Denamur, E. (2004a). A Specific Genetic Background Is Required for Acquisition and Expression of Virulence Factors in *Escherichia coli*. *Mol. Biol. Evol.* **21**, 1085–1094.

Escobar-Páramo, P., Grenet, K., Le Menac'h, A., Rode, L., Salgado, E., Amorin, C., Gouriou, S., Picard, B., Rahimy, M.C., Andremont, A., et al. (2004b). Large-Scale Population Structure of Human Commensal *Escherichia coli* Isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 5698–5700.

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

Eto, D.S., Jones, T.A., Sundsbak, J.L., and Mulvey, M.A. (2007). Integrin-mediated host cell invasion by type 1-piliated uropathogenic *Escherichia coli*. *PLoS Pathog.* **3**, e100.

Falbo, V., Pace, T., Picci, L., Pizzi, E., and Caprioli, A. (1993). Isolation and nucleotide sequence of the gene encoding cytotoxic necrotizing factor 1 of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **61**, 4909–4914.

- Finegold, S.M., Flora, D.J., Attebery, H.R., and Sutter, V.L. (1975). Fecal bacteriology of colonic polyp patients and control patients. *Cancer Res.* 35, 3407–3417.
- Fischbach, M.A., Lin, H., Liu, D.R., and Walsh, C.T. (2006). How pathogenic bacteria evade mammalian sabotage in the battle for iron. *Nat. Chem. Biol.* 2, 132–138.
- Flatau, G., Lemichez, E., Gauthier, M., Chardin, P., Paris, S., Fiorentini, C., and Boquet, P. (1997). Toxin-induced activation of the G protein p21 Rho by deamidation of glutamine. *Nature* 387, 729–733.
- Flo, T.H., Smith, K.D., Sato, S., Rodriguez, D.J., Holmes, M.A., Strong, R.K., Akira, S., and Aderem, A. (2004). Lipocalin 2 mediates an innate immune response to bacterial infection by sequestering iron. *Nature* 432, 917–921.
- Foot, N., Henshall, T., and Kumar, S. (2017). Ubiquitination and the Regulation of Membrane Proteins. *Physiol. Rev.* 97, 253–281.
- Forget, M.-A., Desrosiers, R.R., Gingras, D., and Béliveau, R. (2002). Phosphorylation states of Cdc42 and RhoA regulate their interactions with Rho GDP dissociation inhibitor and their extraction from biological membranes. *Biochem. J.* 361, 243–254.
- Freemont, P.S., Hanson, I.M., and Trowsdale, J. (1991). A novel cysteine-rich sequence motif. *Cell* 64, 483–484.
- Fritz, G., Just, I., and Kaina, B. (1999). Rho GTPases are over-expressed in human tumors. *Int. J. Cancer* 81, 682–687.
- Fu, Y., and Galán, J.E. (1999). A salmonella protein antagonizes Rac-1 and Cdc42 to mediate host-cell recovery after bacterial invasion. *Nature* 401, 293–297.
- Gao, J., Aksoy, B.A., Dogrusoz, U., Dresdner, G., Gross, B., Sumer, S.O., Sun, Y., Jacobsen, A., Sinha, R., Larsson, E., et al. (2013). Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Science Signaling* 6, pl1–pl1.
- Garrett, W.S. (2015). Cancer and the microbiota. *Science* 348, 80–86.
- Giamboi-Miraglia, A., Travaglione, S., Filippini, P., Fabbri, A., Fiorentini, C., and Falzano, L. (2007). A multinucleating *Escherichia coli* cytotoxin perturbs cell cycle in cultured epithelial cells. *Toxicol in Vitro* 21, 235–239.
- Goka, E.T., and Lippman, M.E. (2015). Loss of the E3 ubiquitin ligase HACE1 results in enhanced Rac1 signaling contributing to breast cancer progression. *Oncogene* 34, 5395–5405.
- Goldberg, M.B., and Theriot, J.A. (1995). *Shigella flexneri* surface protein IcsA is sufficient to direct actin-based motility. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 6572–6576.
- Goldstein, G., Scheid, M., Hammerling, U., Schlesinger, D.H., Niall, H.D., and Boyse, E.A. (1975). Isolation of a polypeptide that has lymphocyte-differentiating properties and is probably represented universally in living cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 72, 11–15.
- Gordon, D.M., Stern, S.E., and Collignon, P.J. (2005). Influence of the age and sex of human hosts on the distribution of *Escherichia coli* ECOR groups and virulence traits. *Microbiology (Reading, Engl.)* 151, 15–23.
- Grady, W.M., and Carethers, J.M. (2008). Genomic and epigenetic instability in colorectal cancer pathogenesis. *Gastroenterology* 135, 1079–1099.
- Guignot, J., Chaplais, C., Coconnier-Polter, M.-H., and Servin, A.L. (2007). The secreted autotransporter toxin, Sat, functions as a virulence factor in Afa/Dr diffusely adhering *Escherichia coli* by promoting lesions in tight junction of polarized epithelial cells. *Cell. Microbiol.* 9, 204–221.
- Guo, Y., Zhang, Z., Wei, H., Wang, J., Lv, J., Zhang, K., Keller, E.T., Yao, Z., and Wang, Q. (2017). Cytotoxic necrotizing

factor 1 promotes prostate cancer progression through activating the Cdc42-PAK1 axis. *J. Pathol.* 21, 26.

Gur, C., Ibrahim, Y., Isaacson, B., Yamin, R., Abed, J., Gamliel, M., Enk, J., Bar-On, Y., Stanietzky-Kaynan, N., Copenhagen-Glazer, S., et al. (2015). Binding of the Fap2 protein of *Fusobacterium nucleatum* to human inhibitory receptor TIGIT protects tumors from immune cell attack. *Immunity* 42, 344–355.

Haas, A.L., Warms, J.V., and Rose, I.A. (1983). Ubiquitin adenylate: structure and role in ubiquitin activation. *Biochemistry* 22, 4388–4394.

Haas, A.L., Warms, J.V., Hershko, A., and Rose, I.A. (1982). Ubiquitin-activating enzyme. Mechanism and role in protein-ubiquitin conjugation. *J. Biol. Chem.* 257, 2543–2548.

Hacker, J., Blum-Oehler, G., Mühldorfer, I., and Tschäpe, H. (1997). Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. *Mol. Microbiol.* 23, 1089–1097.

Haglund, K., Sigismund, S., Polo, S., Szymkiewicz, I., Di Fiore, P.P., and Dikic, I. (2003). Multiple monoubiquitination of RTKs is sufficient for their endocytosis and degradation. *Nat. Cell Biol.* 5, 461–466.

Harrington, S.M., Dudley, E.G., and Nataro, J.P. (2006). Pathogenesis of enteroaggregative *Escherichia coli* infection. *FEMS Microbiol. Lett.* 254, 12–18.

Harrington, S.M., Strauman, M.C., Abe, C.M., and Nataro, J.P. (2005). Aggregative adherence fimbriae contribute to the inflammatory response of epithelial cells infected with enteroaggregative *Escherichia coli*. *Cell. Microbiol.* 7, 1565–1578.

Hayashi, F., Smith, K.D., Ozinsky, A., Hawn, T.R., Yi, E.C., Goodlett, D.R., Eng, J.K., Akira, S., Underhill, D.M., and Aderem, A. (2001a). The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 410, 1099–1103.

Hayashi, T., Makino, K., Ohnishi, M., Kurokawa, K., Ishii, K., Yokoyama, K., Han, C.G., Ohtsubo, E., Nakayama, K., Murata, T., et al. (2001b). Complete genome sequence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and genomic comparison with a laboratory strain K-12. *DNA Res.* 8, 11–22.

Heasman, S.J., and Ridley, A.J. (2008). Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 690–701.

Henderson, I.R., Navarro-Garcia, F., and Nataro, J.P. (1998). The great escape: structure and function of the autotransporter proteins. *Trends Microbiol.* 6, 370–378.

Herzer, P.J., Inouye, S., Inouye, M., and Whittam, T.S. (1990). Phylogenetic distribution of branched RNA-linked multicopy single-stranded DNA among natural isolates of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 172, 6175–6181.

Hider, R.C., and Kong, X. (2010). Chemistry and biology of siderophores. *Nat Prod Rep* 27, 637–657.

Hochhut, B., Wilde, C., Balling, G., Middendorf, B., Dobrindt, U., Brzuszkiewicz, E., Gottschalk, G., Carniel, E., and Hacker, J. (2006). Role of pathogenicity island-associated integrases in the genome plasticity of uropathogenic *Escherichia coli* strain 536. *Mol. Microbiol.* 61, 584–595.

Hodge, R.G., and Ridley, A.J. (2016). Regulating Rho GTPases and their regulators. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 17, 496–510.

Hodis, E., Watson, I.R., Kryukov, G.V., Arold, S.T., Imielinski, M., Theurillat, J.-P., Nickerson, E., Auclair, D., Li, L., Place, C., et al. (2012). A landscape of driver mutations in melanoma. *Cell* 150, 251–263.

Hope, M.E., Hold, G.L., Kain, R., and El-Omar, E.M. (2005). Sporadic colorectal cancer--role of the commensal microbiota. *FEMS Microbiol. Lett.* 244, 1–7.

- Huang, S.H., Stins, M.F., and Kim, K.S. (2000). Bacterial penetration across the blood-brain barrier during the development of neonatal meningitis. *Microbes Infect.* 2, 1237–1244.
- Huang, S., Tang, D., and Wang, Y. (2016). Monoubiquitination of Syntaxin 5 Regulates Golgi Membrane Dynamics during the Cell Cycle. *Dev. Cell* 38, 73–85.
- Huibregtse, J.M., Scheffner, M., Beaudenon, S., and Howley, P.M. (1995). A family of proteins structurally and functionally related to the E6-AP ubiquitin-protein ligase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 2563–2567.
- Huibregtse, J., and Rohde, J.R. (2014). Hell's BELs: bacterial E3 ligases that exploit the eukaryotic ubiquitin machinery. *PLoS Pathog.* 10, e1004255.
- Hyland, R.M., Sun, J., Griener, T.P., Mulvey, G.L., Klassen, J.S., Donnenberg, M.S., and Armstrong, G.D. (2008). The bundlin pilin protein of enteropathogenic *Escherichia coli* is an N-acetylglucosamine-specific lectin. *Cell. Microbiol.* 10, 177–187.
- Iguchi, A., Thomson, N.R., Ogura, Y., Saunders, D., Ooka, T., Henderson, I.R., Harris, D., Asadulghani, M., Kurokawa, K., Dean, P., et al. (2009). Complete genome sequence and comparative genome analysis of enteropathogenic *Escherichia coli* O127:H6 strain E2348/69. *J. Bacteriol.* 191, 347–354.
- Ikeda, F., Deribe, Y.L., Skånland, S.S., Stieglitz, B., Grabbe, C., Franz-Wachtel, M., van Wijk, S.J.L., Goswami, P., Nagy, V., Terzic, J., et al. (2011). SHARPIN forms a linear ubiquitin ligase complex regulating NF- κ B activity and apoptosis. *Nature* 471, 637–641.
- Jaffe, A.B., and Hall, A. (2005). Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 21, 247–269.
- Janjusevic, R., Abramovitch, R.B., Martin, G.B., and Stebbins, C.E. (2006). A bacterial inhibitor of host programmed cell death defenses is an E3 ubiquitin ligase. *Science* 311, 222–226.
- Jansson, L., Tobias, J., Jarefjäll, C., Lebens, M., Svennerholm, A.-M., and Teneberg, S. (2009). Sulfatide Recognition by Colonization Factor Antigen CS6 from Enterotoxigenic *Escherichia coli*. *PLoS ONE* 4, e4487EP–.
- Jansson, L., Tobias, J., Lebens, M., Svennerholm, A.-M., and Teneberg, S. (2006). The major subunit, CfaB, of colonization factor antigen i from enterotoxigenic *Escherichia coli* is a glycosphingolipid binding protein. *Infect. Immun.* 74, 3488–3497.
- Jauregui, F., Landraud, L., Passet, V., Diancourt, L., Frapy, E., Guigon, G., Carbonnelle, E., Lortholary, O., Clermont, O., Denamur, E., et al. (2008). Phylogenetic and genomic diversity of human bacteremic *Escherichia coli* strains. *BMC Genomics* 9, 560.
- Johnson, J.R., Moseley, S.L., Roberts, P.L., and Stamm, W.E. (1988). Aerobactin and other virulence factor genes among strains of *Escherichia coli* causing urosepsis: association with patient characteristics. *Infect. Immun.* 56, 405–412.
- Johnson, J.R., Johnston, B., Kuskowski, M.A., Nougayrède, J.-P., and Oswald, E. (2008). Molecular epidemiology and phylogenetic distribution of the *Escherichia coli* pks genomic island. *Journal of Clinical Microbiology* 46, 3906–3911.
- Jones, S., Chen, W.-D., Parmigiani, G., Diehl, F., Beerenwinkel, N., Antal, T., Traulsen, A., Nowak, M.A., Siegel, C., Velculescu, V.E., et al. (2008). Comparative lesion sequencing provides insights into tumor evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 4283–4288.
- Joneson, T., and Bar-Sagi, D. (1998). A Rac1 effector site controlling mitogenesis through superoxide production. *J. Biol. Chem.* 273, 17991–17994.
- Jordan, P., Brazão, R., Boavida, M.G., Gespach, C., and Chastre, E. (1999). Cloning of a novel human Rac1b splice variant with increased expression in colorectal tumors. *Oncogene* 18, 6835–6839.

- Joyce, D., Bouzahzah, B., Fu, M., Albanese, C., D'Amico, M., Steer, J., Klein, J.U., Lee, R.J., Segall, J.E., Westwick, J.K., et al. (1999). Integration of Rac-dependent regulation of cyclin D1 transcription through a nuclear factor-kappaB-dependent pathway. *J. Biol. Chem.* 274, 25245–25249.
- Jubelin, G., Taieb, F., Duda, D.M., Hsu, Y., Samba-Louaka, A., Nobe, R., Pénary, M., Watrin, C., Nougayrède, J.-P., Schulman, B.A., et al. (2010). Pathogenic bacteria target NEDD8-conjugated cullins to hijack host-cell signaling pathways. *PLoS Pathog.* 6, e1001128.
- Just, I., Selzer, J., Wilm, M., Eichel-Streiber, von, C., Mann, M., and Aktories, K. (1995). Glucosylation of Rho proteins by *Clostridium difficile* toxin B. *Nature* 375, 500–503.
- Kado, S., Uchida, K., Funabashi, H., Iwata, S., Nagata, Y., Ando, M., Onoue, M., Matsuoka, Y., Ohwaki, M., and Morotomi, M. (2001). Intestinal microflora are necessary for development of spontaneous adenocarcinoma of the large intestine in T-cell receptor beta chain and p53 double-knockout mice. *Cancer Res.* 61, 2395–2398.
- Kamai, T., Yamanishi, T., Shirataki, H., Takagi, K., Asami, H., Ito, Y., and Yoshida, K.-I. (2004). Overexpression of RhoA, Rac1, and Cdc42 GTPases is associated with progression in testicular cancer. *Clin. Cancer Res.* 10, 4799–4805.
- Kaper, J.B., Nataro, J.P., and Mobley, H.L. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 123–140.
- Kaper, T., Talik, B., Ettema, T.J., Bos, H., van der Maarel, M.J.E.C., and Dijkhuizen, L. (2005). Amylomaltase of *Pyrobaculum aerophilum* IM2 produces thermoreversible starch gels. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 5098–5106.
- Kawazu, M., Ueno, T., Kontani, K., Ogita, Y., Ando, M., Fukumura, K., Yamato, A., Soda, M., Takeuchi, K., Miki, Y., et al. (2013). Transforming mutations of RAC guanosine triphosphatases in human cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, 3029–3034.
- Keestra, A.M., Winter, M.G., Auburger, J.J., Frässle, S.P., Xavier, M.N., Winter, S.E., Kim, A., Poon, V., Ravesloot, M.M., Waldenmaier, J.F.T., et al. (2013). Manipulation of small Rho GTPases is a pathogen-induced process detected by NOD1. *Nature* 496, 233–237.
- Kenny, B., DeVinney, R., Stein, M., Reinscheid, D.J., Frey, E.A., and Finlay, B.B. (1997). Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells. *Cell* 91, 511–520.
- Kim, J.K., and Diehl, J.A. (2009). Nuclear cyclin D1: an oncogenic driver in human cancer. *J. Cell. Physiol.* 220, 292–296.
- Kipanyula, M.J., Seke Etet, P.F., Vecchio, L., Farahna, M., Nukenine, E.N., and Nwabo Kamdje, A.H. (2013). Signaling pathways bridging microbial-triggered inflammation and cancer. *Cell. Signal.* 25, 403–416.
- Kirisako, T., Kamei, K., Murata, S., Kato, M., Fukumoto, H., Kanie, M., Sano, S., Tokunaga, F., Tanaka, K., and Iwai, K. (2006). A ubiquitin ligase complex assembles linear polyubiquitin chains. *Embo J.* 25, 4877–4887.
- Kissil, J.L., Walmsley, M.J., Hanlon, L., Haigis, K.M., Bender Kim, C.F., Sweet-Cordero, A., Eckman, M.S., Tuveson, D.A., Capobianco, A.J., Tybulewicz, V.L.J., et al. (2007). Requirement for Rac1 in a K-ras induced lung cancer in the mouse. *Cancer Res.* 67, 8089–8094.
- Kitada, T., Asakawa, S., Hattori, N., Matsumine, H., Yamamura, Y., Minoshima, S., Yokochi, M., Mizuno, Y., and Shimizu, N. (1998). Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature* 392, 605–608.
- Klein, E.A., Yang, C., Kazanietz, M.G., and Assoian, R.K. (2007). NFkappaB-independent signaling to the cyclin D1 gene by Rac. *Cell Cycle* 6, 1115–1121.
- Knust, Z., and Schmidt, G. (2010). Cytotoxic Necrotizing Factors (CNFs)-A Growing Toxin Family. *Toxins (Basel)* 2, 116–127.

- Knust, Z., Blumenthal, B., Aktories, K., and Schmidt, G. (2009). Cleavage of *Escherichia coli* cytotoxic necrotizing factor 1 is required for full biologic activity. *Infect. Immun.* 77, 1835–1841.
- Komander, D., and Rape, M. (2012). The ubiquitin code. *Annu. Rev. Biochem.* 81, 203–229.
- Komander, D., Clague, M.J., and Urbé, S. (2009). Breaking the chains: structure and function of the deubiquitinases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 550–563.
- Kostic, A.D., Chun, E., Robertson, L., Glickman, J.N., Gallini, C.A., Michaud, M., Clancy, T.E., Chung, D.C., Lochhead, P., Hold, G.L., et al. (2013). *Fusobacterium nucleatum* potentiates intestinal tumorigenesis and modulates the tumor-immune microenvironment. *Cell Host Microbe* 14, 207–215.
- Kostic, A.D., Xavier, R.J., and Gevers, D. (2014). The microbiome in inflammatory bowel disease: current status and the future ahead. *Gastroenterology* 146, 1489–1499.
- Kurokawa, K., Itoh, T., Kuwahara, T., Oshima, K., Toh, H., Toyoda, A., Takami, H., Morita, H., Sharma, V.K., Srivastava, T.P., et al. (2007). Comparative metagenomics revealed commonly enriched gene sets in human gut microbiomes. *DNA Res.* 14, 169–181.
- Kühn, R., Löhler, J., Rennick, D., Rajewsky, K., and Müller, W. (1993). Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* 75, 263–274.
- Lan, R., Alles, M.C., Donohoe, K., Martinez, M.B., and Reeves, P.R. (2004). Molecular evolutionary relationships of enteroinvasive *Escherichia coli* and *Shigella* spp. *Infect. Immun.* 72, 5080–5088.
- Lander, G.C., Estrin, E., Matyskiela, M.E., Bashore, C., Nogales, E., and Martin, A. (2012). Complete subunit architecture of the proteasome regulatory particle. *Nature* 482, 186–191.
- Landraud, L., Gibert, M., Popoff, M.R., Boquet, P., and Gauthier, M. (2003). Expression of *cnf1* by *Escherichia coli* J96 involves a large upstream DNA region including the *hlyCABD* operon, and is regulated by the RfaH protein. *Mol. Microbiol.* 47, 1653–1667.
- Lane, M.C., Alteri, C.J., Smith, S.N., and Mobley, H.L.T. (2007). Expression of flagella is coincident with uropathogenic *Escherichia coli* ascension to the upper urinary tract. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 16669–16674.
- Lang, P., Gesbert, F., Delespine-Carmagnat, M., Stancou, R., Pouchelet, M., and Bertoglio, J. (1996). Protein kinase A phosphorylation of RhoA mediates the morphological and functional effects of cyclic AMP in cytotoxic lymphocytes. *Embo J.* 15, 510–519.
- Lemichez, E., Flatau, G., Bruzzone, M., Boquet, P., and Gauthier, M. (1997). Molecular localization of the *Escherichia coli* cytotoxic necrotizing factor CNF1 cell-binding and catalytic domains. *Mol. Microbiol.* 24, 1061–1070.
- Lemichez, E., and Aktories, K. (2013). Hijacking of Rho GTPases during bacterial infection. *Experimental Cell Research* 319, 2329–2336.
- Lemonnier, M., Landraud, L., and Lemichez, E. (2007). Rho GTPase-activating bacterial toxins: from bacterial virulence regulation to eukaryotic cell biology. *FEMS Microbiol. Rev.* 31, 515–534.
- Liu, M., Bi, F., Zhou, X., and Zheng, Y. (2012). Rho GTPase regulation by miRNAs and covalent modifications. *Trends in Cell Biology* 22, 365–373.
- Liu, Y., Shepherd, E.G., and Nelin, L.D. (2007). MAPK phosphatases—regulating the immune response. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 202–212.
- Liu, Z., Chen, P., Gao, H., Gu, Y., Yang, J., Peng, H., Xu, X., Wang, H., Yang, M., Liu, X., et al. (2014). Ubiquitylation of autophagy receptor Optineurin by HACE1 activates selective autophagy for tumor suppression. *Cancer Cell* 26,

106–120.

Lockman, H.A., Gillespie, R.A., Baker, B.D., and Shakhnovich, E. (2002). *Yersinia pseudotuberculosis* produces a cytotoxic necrotizing factor. *Infect. Immun.* 70, 2708–2714.

Lotte, L., Lotte, R., Durand, M., Degand, N., Ambrosetti, D., Michiels, J.F., Amiel, J., Cattoir, V., and Ruimy, R. (2016a). Infections related to *Actinotignum schaalii* (formerly *Actinobaculum schaalii*): a 3-year prospective observational study on 50 cases. *Clinical Microbiology and Infection* 22, 388–390.

Lotte, R., Lotte, L., and Ruimy, R. (2016b). *Actinotignum schaalii* (formerly *Actinobaculum schaalii*): a newly recognized pathogen-review of the literature. *Clinical Microbiology and Infection* 22, 28–36.

Lotte, R., Hérissé, A.-L., Berrouane, Y., Lotte, L., Casagrande, F., Landraud, L., Herbin, S., Ramarao, N., Boyer, L., and Ruimy, R. (2017). Virulence Analysis of *Bacillus cereus* Isolated after Death of Preterm Neonates, Nice, France, 2013. *Emerging Infect. Dis.* 23, 845–848.

Lupher, M.L., Rao, N., Lill, N.L., Andoniou, C.E., Miyake, S., Clark, E.A., Druker, B., and Band, H. (1998). Cbl-mediated negative regulation of the Syk tyrosine kinase. A critical role for Cbl phosphotyrosine-binding domain binding to Syk phosphotyrosine 323. *J. Biol. Chem.* 273, 35273–35281.

Mack, N.A., Whalley, H.J., Castillo-Lluva, S., and Malliri, A. (2011a). The diverse roles of Rac signaling in tumorigenesis. *Cell Cycle* 10, 1571–1581.

Mack, N.A., Whalley, H.J., Castillo-Lluva, S., and Malliri, A. (2011b). The diverse roles of Rac signaling in tumorigenesis. *Cell Cycle* 10, 1571–1581.

Maculins, T., Fiskin, E., Bhogaraju, S., and Dikic, I. (2016). Bacteria-host relationship: ubiquitin ligases as weapons of invasion. *Cell Res.* 26, 499–510.

Mai, V., McCrary, Q.M., Sinha, R., and Glej, M. (2009). Associations between dietary habits and body mass index with gut microbiota composition and fecal water genotoxicity: an observational study in African American and Caucasian American volunteers. *Nutr J* 8, 49.

Malynn, B.A., and Ma, A. (2010). Ubiquitin makes its mark on immune regulation. *Immunity* 33, 843–852.

Marchès, O., Ledger, T.N., Boury, M., Ohara, M., Tu, X., Goffaux, F., Mainil, J., Rosenshine, I., Sugai, M., De Rycke, J., et al. (2003). Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli* deliver a novel effector called Cif, which blocks cell cycle G2/M transition. *Mol. Microbiol.* 50, 1553–1567.

Martinez, J.J., Mulvey, M.A., Schilling, J.D., Pinkner, J.S., and Hultgren, S.J. (2000). Type 1 pilus-mediated bacterial invasion of bladder epithelial cells. *Embo J.* 19, 2803–2812.

Martinez-Medina, M., Aldeguez, X., Lopez-Siles, M., González-Huix, F., López-Oliu, C., Dahbi, G., Blanco, J.E., Blanco, J., Garcia-Gil, L.J., and Darfeuille-Michaud, A. (2009). Molecular diversity of *Escherichia coli* in the human gut: new ecological evidence supporting the role of adherent-invasive *E. coli* (AIEC) in Crohn's disease. *Inflamm. Bowel Dis.* 15, 872–882.

Mattiroli, F., Vissers, J.H.A., van Dijk, W.J., Ikpa, P., Citterio, E., Vermeulen, W., Marteiijn, J.A., and Sixma, T.K. (2012). RNF168 ubiquitinates K13-15 on H2A/H2AX to drive DNA damage signaling. *Cell* 150, 1182–1195.

McDaniel, T.K., Jarvis, K.G., Donnenberg, M.S., and Kaper, J.B. (1995). A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 1664–1668.

McGarr, S.E., Ridlon, J.M., and Hylemon, P.B. (2005). Diet, anaerobic bacterial metabolism, and colon cancer: a review of the literature. *J. Clin. Gastroenterol.* 39, 98–109.

McNichol, B.A., Rasmussen, S.B., Carvalho, H.M., Meysick, K.C., and O'Brien, A.D. (2007). Two domains of cytotoxic

necrotizing factor type 1 bind the cellular receptor, laminin receptor precursor protein. *Infect. Immun.* 75, 5095–5104.

Mettouchi, A., Klein, S., Guo, W., Lopez-Lago, M., Lemichez, E., Westwick, J.K., and Giancotti, F.G. (2001). Integrin-specific activation of Rac controls progression through the G(1) phase of the cell cycle. *Mol. Cell* 8, 115–127.

Metzger, M.B., Hristova, V.A., and Weissman, A.M. (2012). HECT and RING finger families of E3 ubiquitin ligases at a glance. *J. Cell. Sci.* 125, 531–537.

Michel, G., Ferrua, B., Munro, P., Boyer, L., Mathal, N., Gillet, D., Marty, P., and Lemichez, E. (2016). Immunoadjuvant Properties of the Rho Activating Factor CNF1 in Prophylactic and Curative Vaccination against *Leishmania infantum*. *PLoS ONE* 11, e0156363.

Miraglia, A.G., Travaglione, S., Meschini, S., Falzano, L., Matarrese, P., Quaranta, M.G., Viora, M., Fiorentini, C., and Fabbri, A. (2007). Cytotoxic necrotizing factor 1 prevents apoptosis via the Akt/IkappaB kinase pathway: role of nuclear factor-kappaB and Bcl-2. *Mol. Biol. Cell* 18, 2735–2744.

Moissenet, D., Salauze, B., Clermont, O., Bingen, E., Arlet, G., Denamur, E., Mérens, A., Mitanchez, D., and Vu-Thien, H. (2010). Meningitis caused by *Escherichia coli* producing TEM-52 extended-spectrum beta-lactamase within an extensive outbreak in a neonatal ward: epidemiological investigation and characterization of the strain. *Journal of Clinical Microbiology* 48, 2459–2463.

Moon, S. (2003). Rho GTPase-activating proteins in cell regulation. *Trends in Cell Biology* 13, 13–22.

Moore, W.E., and Moore, L.H. (1995). Intestinal floras of populations that have a high risk of colon cancer. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 3202–3207.

Moreno, E., Planells, I., Prats, G., Planes, A.M., Moreno, G., and Andreu, A. (2005). Comparative study of *Escherichia coli* virulence determinants in strains causing urinary tract bacteremia versus strains causing pyelonephritis and other sources of bacteremia. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 53, 93–99.

Moulin-Schouleur, M., Répérant, M., Laurent, S., Brée, A., Mignon-Grasteau, S., Germon, P., Rasschaert, D., and Schouler, C. (2007). Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains of avian and human origin: link between phylogenetic relationships and common virulence patterns. *Journal of Clinical Microbiology* 45, 3366–3376.

Mounier, J., Popoff, M.R., Enninga, J., Frame, M.C., Sansonetti, P.J., and Van Nhieu, G.T. (2009). The IpaC carboxyterminal effector domain mediates Src-dependent actin polymerization during *Shigella* invasion of epithelial cells. *PLoS Pathog.* 5, e1000271.

Munro, P., Flatau, G., and Lemichez, E. (2007). Intranasal immunization with tetanus toxoid and CNF1 as a new mucosal adjuvant protects BALB/c mice against lethal challenge. *Vaccine* 25, 8702–8706.

Munro, P., Flatau, G., Anjuère, F., Hofman, V., Czerkinsky, C., and Lemichez, E. (2005). The Rho GTPase activators CNF1 and DNT bacterial toxins have mucosal adjuvant properties. *Vaccine* 23, 2551–2556.

Munro, P., Flatau, G., Doye, A., Boyer, L., Oregioni, O., Mege, J.-L., Landraud, L., and Lemichez, E. (2004). Activation and proteasomal degradation of rho GTPases by cytotoxic necrotizing factor-1 elicit a controlled inflammatory response. *J. Biol. Chem.* 279, 35849–35857.

Murali, A., Shin, J., Yurugi, H., Krishnan, A., Akutsu, M., Carpy, A., Macek, B., and Rajalingam, K. (2017). Ubiquitin-dependent regulation of Cdc42 by XIAP. *Cell Death Dis* 8, e2900.

Musgrove, E.A., Caldon, C.E., Barraclough, J., Stone, A., and Sutherland, R.L. (2011). Cyclin D as a therapeutic target in cancer. *Nature Reviews Cancer* 11, 558–572.

Myant, K.B., Cammareri, P., McGhee, E.J., Ridgway, R.A., Huels, D.J., Cordero, J.B., Schwitalla, S., Kalna, G., Ogg, E.-L., Athineos, D., et al. (2013). ROS production and NF-κB activation triggered by RAC1 facilitate WNT-driven

intestinal stem cell proliferation and colorectal cancer initiation. *Cell Stem Cell* 12, 761–773.

Natarajan, C., and Takeda, K. (2017). Regulation of various DNA repair pathways by E3 ubiquitin ligases. *J Cancer Res Ther* 13, 157–169.

Nataro, J.P., and Kaper, J.B. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* 11, 142–201.

Navarro-García, F., Canizalez-Roman, A., Burlingame, K.E., Teter, K., and Vidal, J.E. (2007a). Pet, a non-AB toxin, is transported and translocated into epithelial cells by a retrograde trafficking pathway. *Infect. Immun.* 75, 2101–2109.

Navarro-García, F., Canizalez-Roman, A., Vidal, J.E., and Salazar, M.I. (2007b). Intoxication of epithelial cells by plasmid-encoded toxin requires clathrin-mediated endocytosis. *Microbiology (Reading, Engl.)* 153, 2828–2838.

Neilands, J.B. (1995). Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. *J. Biol. Chem.* 270, 26723–26726.

Noad, J., Malsburg, von der, A., Pathe, C., Michel, M.A., Komander, D., and Randow, F. (2017). LUBAC-synthesized linear ubiquitin chains restrict cytosol-invading bacteria by activating autophagy and NF- κ B. *Nat Microbiol* 2, 17063.

Nougayrède, J.-P., Homburg, S., Taieb, F., Boury, M., Brzuszkiewicz, E., Gottschalk, G., Buchrieser, C., Hacker, J., Dobrindt, U., and Oswald, E. (2006). *Escherichia coli* induces DNA double-strand breaks in eukaryotic cells. *Science* 313, 848–851.

Nowrouzian, F.L., Wold, A.E., and Adlerberth, I. (2005). *Escherichia coli* strains belonging to phylogenetic group B2 have superior capacity to persist in the intestinal microflora of infants. *J. Infect. Dis.* 191, 1078–1083.

O'Keefe, S.J.D., Ou, J., Aufreiter, S., O'Connor, D., Sharma, S., Sepulveda, J., Fukuwatari, T., Shibata, K., and Mawhinney, T. (2009). Products of the colonic microbiota mediate the effects of diet on colon cancer risk. *J. Nutr.* 139, 2044–2048.

Oberoi, T.K., Dogan, T., Hocking, J.C., Scholz, R.-P., Mooz, J., Anderson, C.L., Karreman, C., Meyer zu Heringdorf, D., Schmidt, G., Ruonala, M., et al. (2012). IAPs regulate the plasticity of cell migration by directly targeting Rac1 for degradation. *Embo J.* 31, 14–28.

Oberoi-Khanuja, T.K., and Rajalingam, K. (2012). IAPs as E3 ligases of Rac1: shaping the move. *Small GTPases* 3, 131–136.

Okada, R., Zhou, X., Hiyoshi, H., Matsuda, S., Chen, X., Akeda, Y., Kashimoto, T., Davis, B.M., Iida, T., Waldor, M.K., et al. (2014). The *Vibrio parahaemolyticus* effector VopC mediates Cdc42-dependent invasion of cultured cells but is not required for pathogenicity in an animal model of infection. *Cell. Microbiol.* 16, 938–947.

Olier, M., Marcq, I., Salvador-Cartier, C., Secher, T., Dobrindt, U., Boury, M., Bacquié, V., Pénary, M., Gaultier, E., Nougayrède, J.-P., et al. (2012). Genotoxicity of *Escherichia coli* Nissle 1917 strain cannot be dissociated from its probiotic activity. *Gut Microbes* 3, 501–509.

Orden, J.A., Domínguez-Bernal, G., Martínez-Pulgarín, S., Blanco, M., Blanco, J.E., Mora, A., Blanco, J., and la Fuente, de, R. (2007). Necrotoxicogenic *Escherichia coli* from sheep and goats produce a new type of cytotoxic necrotizing factor (CNF3) associated with the *eae* and *ehxA* genes. *Int. Microbiol.* 10, 47–55.

Orgaz, J.L., Herraiz, C., and Sanz-Moreno, V. (2014). Rho GTPases modulate malignant transformation of tumor cells. *Small GTPases* 5, e29019.

Oswald, E., De Rycke, J., Guillot, J.F., and Boivin, R. (1989). Cytotoxic effect of multinucleation in HeLa cell cultures associated with the presence of Vir plasmid in *Escherichia coli* strains. *FEMS Microbiol. Lett.* 49, 95–99.

- Oswald, E., Sugai, M., Labigne, A., Wu, H.C., Fiorentini, C., Boquet, P., and O'Brien, A.D. (1994). Cytotoxic necrotizing factor type 2 produced by virulent *Escherichia coli* modifies the small GTP-binding proteins Rho involved in assembly of actin stress fibers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *91*, 3814–3818.
- Oswald, E., Nougayrède, J.-P., Taieb, F., and Sugai, M. (2005). Bacterial toxins that modulate host cell-cycle progression. *Curr. Opin. Microbiol.* *8*, 83–91.
- Palicharla, V.R., and Maddika, S. (2015). HACE1 mediated K27 ubiquitin linkage leads to YB-1 protein secretion. *Cell. Signal.* *27*, 2355–2362.
- Patel, J.C., and Galán, J.E. (2006). Differential activation and function of Rho GTPases during *Salmonella*-host cell interactions. *J. Cell Biol.* *175*, 453–463.
- Pei, S., Doye, A., and Boquet, P. (2001). Mutation of specific acidic residues of the CNF1 T domain into lysine alters cell membrane translocation of the toxin. *Mol. Microbiol.* *41*, 1237–1247.
- Perna, N.T., Plunkett, G., Burland, V., Mau, B., Glasner, J.D., Rose, D.J., Mayhew, G.F., Evans, P.S., Gregor, J., Kirkpatrick, H.A., et al. (2001). Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Nature* *409*, 529–533.
- Perona, R., Montaner, S., Saniger, L., Sánchez-Pérez, I., Bravo, R., and Lacal, J.C. (1997). Activation of the nuclear factor-kappaB by Rho, CDC42, and Rac-1 proteins. *Genes & Development* *11*, 463–475.
- Peters, J.-M. (2006). The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *7*, 644–656.
- Pérès, S.Y., Marchès, O., Daigle, F., Nougayrède, J.P., Herault, F., Tasca, C., De Rycke, J., and Oswald, E. (1997). A new cytolethal distending toxin (CDT) from *Escherichia coli* producing CNF2 blocks HeLa cell division in G2/M phase. *Mol. Microbiol.* *24*, 1095–1107.
- Pfeffer, K., Matsuyama, T., Kündig, T.M., Wakeham, A., Kishihara, K., Shahinian, A., Wiegmann, K., Ohashi, P.S., Krönke, M., and Mak, T.W. (1993). Mice deficient for the 55 kd tumor necrosis factor receptor are resistant to endotoxic shock, yet succumb to *L. monocytogenes* infection. *Cell* *73*, 457–467.
- Phillips, N., Hayward, R.D., and Koronakis, V. (2004). Phosphorylation of the enteropathogenic *E. coli* receptor by the Src-family kinase c-Fyn triggers actin pedestal formation. *Nat. Cell Biol.* *6*, 618–625.
- Picard, B., Garcia, J.S., Gouriou, S., Duriez, P., Brahimi, N., Bingen, E., Elion, J., and Denamur, E. (1999). The link between phylogeny and virulence in *Escherichia coli* extraintestinal infection. *Infect. Immun.* *67*, 546–553.
- Pickart, C.M., and Eddins, M.J. (2004). Ubiquitin: structures, functions, mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta* *1695*, 55–72.
- Piteau, M., Papatheodorou, P., Schwan, C., Schlosser, A., Aktories, K., and Schmidt, G. (2014). Lu/BCAM adhesion glycoprotein is a receptor for *Escherichia coli* Cytotoxic Necrotizing Factor 1 (CNF1). *PLoS Pathog.* *10*, e1003884.
- Polk, D.B., and Peek, R.M. (2010). *Helicobacter pylori*: gastric cancer and beyond. *Nature Reviews Cancer* *10*, 403–414.
- Preuss, I., Kurig, B., Nürnberg, B., Orth, J.H.C., and Aktories, K. (2009). *Pasteurella multocida* toxin activates Gbetagamma dimers of heterotrimeric G proteins. *Cell. Signal.* *21*, 551–558.
- Pupo, G.M., Lan, R., and Reeves, P.R. (2000). Multiple independent origins of *Shigella* clones of *Escherichia coli* and convergent evolution of many of their characteristics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *97*, 10567–10572.
- Putze, J., Hennequin, C., Nougayrède, J.-P., Zhang, W., Homburg, S., Karch, H., Bringer, M.-A., Fayolle, C., Carniel, E., Rabsch, W., et al. (2009). Genetic structure and distribution of the colibactin genomic island among members

of the family Enterobacteriaceae. *Infect. Immun.* 77, 4696–4703.

Raisch, J., Buc, E., Bonnet, M., Sauvanet, P., Vazeille, E., de Vallée, A., Déchelotte, P., Darcha, C., Pezet, D., Bonnet, R., et al. (2014). Colon cancer-associated B2 *Escherichia coli* colonize gut mucosa and promote cell proliferation. *World J. Gastroenterol.* 20, 6560–6572.

Rasko, D.A., Rosovitz, M.J., Myers, G.S.A., Mongodin, E.F., Fricke, W.F., Gajer, P., Crabtree, J., Sebaihia, M., Thomson, N.R., Chaudhuri, R., et al. (2008). The pangenome structure of *Escherichia coli*: comparative genomic analysis of *E. coli* commensal and pathogenic isolates. *J. Bacteriol.* 190, 6881–6893.

Reddy, B.S., Weisburger, J.H., Narisawa, T., and Wynder, E.L. (1974). Colon carcinogenesis in germ-free rats with 1,2-dimethylhydrazine and N-methyl-n'-nitro-N-nitrosoguanidine. *Cancer Res.* 34, 2368–2372.

Ridley, A.J. (2001a). Cyclin' round the cell with Rac. *Dev. Cell* 1, 160–161.

Ridley, A.J. (2001b). Rho GTPases and cell migration. *J. Cell. Sci.* 114, 2713–2722.

Rippere-Lampe, K.E., Lang, M., Ceri, H., Olson, M., Lockman, H.A., and O'Brien, A.D. (2001). Cytotoxic necrotizing factor type 1-positive *Escherichia coli* causes increased inflammation and tissue damage to the prostate in a rat prostatitis model. *Infect. Immun.* 69, 6515–6519.

Rittinger, K., Walker, P.A., Eccleston, J.F., Nurmahomed, K., Owen, D., Laue, E., Gamblin, S.J., and Smerdon, S.J. (1997). Crystal structure of a small G protein in complex with the GTPase-activating protein rhoGAP. *Nature* 388, 693–697.

Rohde, J.R., Breikreutz, A., Chenal, A., Sansonetti, P.J., and Parsot, C. (2007). Type III secretion effectors of the IpaH family are E3 ubiquitin ligases. *Cell Host Microbe* 1, 77–83.

Rolhion, N., and Darfeuille-Michaud, A. (2007). Adherent-invasive *Escherichia coli* in inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel Dis.* 13, 1277–1283.

Rotin, D., and Kumar, S. (2009). Physiological functions of the HECT family of ubiquitin ligases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 398–409.

Rowland, I.R. (2009). The role of the gastrointestinal microbiota in colorectal cancer. *Curr. Pharm. Des.* 15, 1524–1527.

Roy, K., Hilliard, G.M., Hamilton, D.J., Luo, J., Ostmann, M.M., and Fleckenstein, J.M. (2009). Enterotoxigenic *Escherichia coli* EtpA mediates adhesion between flagella and host cells. *Nature* 457, 594–598.

Rubinstein, M.R., Wang, X., Liu, W., Hao, Y., Cai, G., and Han, Y.W. (2013). *Fusobacterium nucleatum* promotes colorectal carcinogenesis by modulating E-cadherin/ β -catenin signaling via its FadA adhesin. *Cell Host Microbe* 14, 195–206.

Scanlan, P.D., Shanahan, F., Clune, Y., Collins, J.K., O'Sullivan, G.C., O'Riordan, M., Holmes, E., Wang, Y., and Marchesi, J.R. (2008). Culture-independent analysis of the gut microbiota in colorectal cancer and polyposis. *Environ. Microbiol.* 10, 789–798.

Schäfer, A., Kuhn, M., and Schindelin, H. (2014). Structure of the ubiquitin-activating enzyme loaded with two ubiquitin molecules. *70*, 1311–1320.

Scheffner, M., Huibregtse, J.M., Vierstra, R.D., and Howley, P.M. (1993). The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell* 75, 495–505.

Scheffzek, K., Ahmadian, M.R., Kabsch, W., Wiesmüller, L., Lautwein, A., Schmitz, F., and Wittinghofer, A. (1997). The Ras-RasGAP complex: structural basis for GTPase activation and its loss in oncogenic Ras mutants. *Science* 277, 333–338.

- Schmidt, A., and Hall, A. (2002). Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch. *Genes & Development* *16*, 1587–1609.
- Schmidt, G., Sehr, P., Wilm, M., Selzer, J., Mann, M., and Aktories, K. (1997). Gln 63 of Rho is deamidated by *Escherichia coli* cytotoxic necrotizing factor-1. *Nature* *387*, 725–729.
- Schnelzer, A., Prechtel, D., Knaus, U., Dehne, K., Gerhard, M., Graeff, H., Harbeck, N., Schmitt, M., and Lengyel, E. (2000). Rac1 in human breast cancer: overexpression, mutation analysis, and characterization of a new isoform, Rac1b. *Oncogene* *19*, 3013–3020.
- Schroeder, G.N., and Hilbi, H. (2008). Molecular pathogenesis of *Shigella* spp.: controlling host cell signaling, invasion, and death by type III secretion. *Clin. Microbiol. Rev.* *21*, 134–156.
- Schüller, S., Lucas, M., Kaper, J.B., Girón, J.A., and Phillips, A.D. (2009). The ex vivo response of human intestinal mucosa to enteropathogenic *Escherichia coli* infection. *Cell. Microbiol.* *11*, 521–530.
- Sears, C.L., and Garrett, W.S. (2014). Microbes, microbiota, and colon cancer. *Cell Host Microbe* *15*, 317–328.
- Sears, C.L., and Pardoll, D.M. (2011). Perspective: alpha-bugs, their microbial partners, and the link to colon cancer. *J. Infect. Dis.* *203*, 306–311.
- Segala, G., Benesch, M.A., Pandey, D.P., Hulo, N., and Picard, D. (2016). Monoubiquitination of Histone H2B Blocks Eviction of Histone Variant H2A.Z from Inducible Enhancers. *Mol. Cell* *64*, 334–346.
- Selander, R.K., Caugant, D.A., Ochman, H., Musser, J.M., Gilmour, M.N., and Whittam, T.S. (1986a). Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. *Appl. Environ. Microbiol.* *51*, 873–884.
- Selander, R.K., Korhonen, T.K., Väisänen-Rhen, V., Williams, P.H., Pattison, P.E., and Caugant, D.A. (1986b). Genetic relationships and clonal structure of strains of *Escherichia coli* causing neonatal septicemia and meningitis. *Infect. Immun.* *52*, 213–222.
- Servin, A.L. (2005). Pathogenesis of Afa/Dr diffusely adhering *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* *18*, 264–292.
- Sha, W.C., Liou, H.C., Tuomanen, E.I., and Baltimore, D. (1995). Targeted disruption of the p50 subunit of NF-kappa B leads to multifocal defects in immune responses. *Cell* *80*, 321–330.
- Shao, F., Vacratsis, P.O., Bao, Z., Bowers, K.E., Fierke, C.A., and Dixon, J.E. (2003). Biochemical characterization of the *Yersinia* YopT protease: cleavage site and recognition elements in Rho GTPases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *100*, 904–909.
- Sharma, R., Tesfay, S., Tomson, F.L., Kanteti, R.P., Viswanathan, V.K., and Hecht, G. (2006). Balance of bacterial pro- and anti-inflammatory mediators dictates net effect of enteropathogenic *Escherichia coli* on intestinal epithelial cells. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* *290*, G685–G694.
- Siegel, R.L., Miller, K.D., and Jemal, A. (2017). Cancer Statistics, 2017. *CA Cancer J Clin* *67*, 7–30.
- Simpson, K.W., Dogan, B., Rishniw, M., Goldstein, R.E., Klaessig, S., McDonough, P.L., German, A.J., Yates, R.M., Russell, D.G., Johnson, S.E., et al. (2006). Adherent and invasive *Escherichia coli* is associated with granulomatous colitis in boxer dogs. *Infect. Immun.* *74*, 4778–4792.
- Singer, A.U., Rohde, J.R., Lam, R., Skarina, T., Kagan, O., Dileo, R., Chirgadze, N.Y., Cuff, M.E., Joachimiak, A., Tyers, M., et al. (2008). Structure of the *Shigella* T3SS effector IpaH defines a new class of E3 ubiquitin ligases. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *15*, 1293–1301.
- Smit, J.J., Monteferrario, D., Noordermeer, S.M., van Dijk, W.J., van der Reijden, B.A., and Sixma, T.K. (2012). The E3 ligase HOIP specifies linear ubiquitin chain assembly through its RING-IBR-RING domain and the unique LDD

extension. *Embo J.* **31**, 3833–3844.

Sobhani, I., Tap, J., Roudot-Thoraval, F., Roperch, J.P., Letulle, S., Langella, P., Corthier, G., Tran Van Nhieu, J., and Furet, J.P. (2011). Microbial dysbiosis in colorectal cancer (CRC) patients. *PLoS ONE* **6**, e16393.

Spangler, B.D. (1992). Structure and function of cholera toxin and the related *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *Microbiol. Rev.* **56**, 622–647.

Spratt, D.E., Walden, H., and Shaw, G.S. (2014). RBR E3 ubiquitin ligases: new structures, new insights, new questions. *Biochem. J.* **458**, 421–437.

Stewart, G.S., Panier, S., Townsend, K., Al-Hakim, A.K., Kolas, N.K., Miller, E.S., Nakada, S., Ylanko, J., Olivarius, S., Mendez, M., et al. (2009). The RIDDLE syndrome protein mediates a ubiquitin-dependent signaling cascade at sites of DNA damage. *Cell* **136**, 420–434.

Stieglitz, B., Morris-Davies, A.C., Koliopoulos, M.G., Christodoulou, E., and Rittinger, K. (2012). LUBAC synthesizes linear ubiquitin chains via a thioester intermediate. *EMBO Rep.* **13**, 840–846.

Stransky, N., Egloff, A.M., Tward, A.D., Kostic, A.D., Cibulskis, K., Sivachenko, A., Kryukov, G.V., Lawrence, M.S., Sougnez, C., McKenna, A., et al. (2011). The mutational landscape of head and neck squamous cell carcinoma. *Science* **333**, 1157–1160.

Sugihara, K., Nakatsuji, N., Nakamura, K., Nakao, K., Hashimoto, R., Otani, H., Sakagami, H., Kondo, H., Nozawa, S., Aiba, A., et al. (1998). Rac1 is required for the formation of three germ layers during gastrulation. *Oncogene* **17**, 3427–3433.

Swatek, K.N., and Komander, D. (2016). Ubiquitin modifications. *Cell Res.* **26**, 399–422.

Swidsinski, A., Khilkin, M., Kerjaschki, D., Schreiber, S., Ortner, M., Weber, J., and Lochs, H. (1998). Association between intraepithelial *Escherichia coli* and colorectal cancer. *Gastroenterology* **115**, 281–286.

Swimm, A.I., and Kalman, D. (2008). Cytosolic extract induces Tir translocation and pedestals in EPEC-infected red blood cells. *PLoS Pathog.* **4**, e4.

Swimm, A., Bommarius, B., Li, Y., Cheng, D., Reeves, P., Sherman, M., Veach, D., Bornmann, W., and Kalman, D. (2004). Enteropathogenic *Escherichia coli* use redundant tyrosine kinases to form actin pedestals. *Mol. Biol. Cell* **15**, 3520–3529.

Takai, Y., Sasaki, T., and Matozaki, T. (2001). Small GTP-binding proteins. *Physiol. Rev.* **81**, 153–208.

Tan, W., Palmby, T.R., Gavard, J., Amornphimoltham, P., Zheng, Y., and Gutkind, J.S. (2008). An essential role for Rac1 in endothelial cell function and vascular development. *Faseb J.* **22**, 1829–1838.

Tang, D., Xiang, Y., De Renzis, S., Rink, J., Zheng, G., Zerial, M., and Wang, Y. (2011). The ubiquitin ligase HACE1 regulates Golgi membrane dynamics during the cell cycle. *Nat Commun* **2**, 501.

Tapping, R.I., Akashi, S., Miyake, K., Godowski, P.J., and Tobias, P.S. (2000). Toll-like receptor 4, but not toll-like receptor 2, is a signaling receptor for *Escherichia* and *Salmonella* lipopolysaccharides. *J. Immunol.* **165**, 5780–5787.

Tauschek, M., Gorrell, R.J., Strugnell, R.A., and Robins-Browne, R.M. (2002). Identification of a protein secretory pathway for the secretion of heat-labile enterotoxin by an enterotoxigenic strain of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 7066–7071.

Tenaillon, O., Skurnik, D., Picard, B., and Denamur, E. (2010). The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**, 207–217.

Tivendale, K.A., Logue, C.M., Kariyawasam, S., Jordan, D., Hussein, A., Li, G., Wannemuehler, Y., and Nolan, L.K.

(2010). Avian-pathogenic *Escherichia coli* strains are similar to neonatal meningitis *E. coli* strains and are able to cause meningitis in the rat model of human disease. *Infect. Immun.* 78, 3412–3419.

Tomkovich, S., Yang, Y., Winglee, K., Gauthier, J., Mühlbauer, M., Sun, X., Mohamadzaheh, M., Liu, X., Martin, P., Wang, G.P., et al. (2017). Locoregional Effects of Microbiota in a Preclinical Model of Colon Carcinogenesis. *Cancer Res.* 77, 2620–2632.

Torrino, S., Visvikis, O., Doye, A., Boyer, L., Stefani, C., Munro, P., Bertoglio, J., Gacon, G., Mettouchi, A., and Lemichez, E. (2011). The E3 ubiquitin-ligase HACE1 catalyzes the ubiquitylation of active Rac1. *Dev. Cell* 21, 959–965.

Tortola, L., Nitsch, R., Bertrand, M.J.M., Kogler, M., Redouane, Y., Kozieradzki, I., Uribesalga, I., Fennell, L.M., Daugaard, M., Klug, H., et al. (2016a). The Tumor Suppressor Hace1 Is a Critical Regulator of TNFR1-Mediated Cell Fate. *Cell Rep* 16, 3414.

Tortola, L., Nitsch, R., Bertrand, M.J.M., Kogler, M., Redouane, Y., Kozieradzki, I., Uribesalga, I., Fennell, L.M., Daugaard, M., Klug, H., et al. (2016b). The Tumor Suppressor Hace1 Is a Critical Regulator of TNFR1-Mediated Cell Fate. *Cell Rep* 15, 1481–1492.

Touchon, M., Hoede, C., Tenaillon, O., Barbe, V., Baeriswyl, S., Bidet, P., Bingen, E., Bonacorsi, S., Bouchier, C., Bouvet, O., et al. (2009). Organised genome dynamics in the *Escherichia coli* species results in highly diverse adaptive paths. *PLoS Genet.* 5, e1000344.

Tramuta, C., Nucera, D., Robino, P., Salvarani, S., and Nebbia, P. (2011). Virulence factors and genetic variability of uropathogenic *Escherichia coli* isolated from dogs and cats in Italy. *J. Vet. Sci.* 12, 49–55.

Turner, S.M., Scott-Tucker, A., Cooper, L.M., and Henderson, I.R. (2006). Weapons of mass destruction: virulence factors of the global killer enterotoxigenic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 263, 10–20.

Vannucci, L., Stepankova, R., Kozakova, H., Fiserova, A., Rossmann, P., and Tlaskalova-Hogenova, H. (2008). Colorectal carcinogenesis in germ-free and conventionally reared rats: different intestinal environments affect the systemic immunity. *Int. J. Oncol.* 32, 609–617.

Velarde, J.J., Varney, K.M., Inman, K.G., Farfan, M., Dudley, E., Fletcher, J., Weber, D.J., and Nataro, J.P. (2007). Solution structure of the novel dispersin protein of enteroaggregative *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 66, 1123–1135.

Visvikis, O., Boyer, L., Torrino, S., Doye, A., Lemonnier, M., Lorès, P., Rolando, M., Flatau, G., Mettouchi, A., Bouvard, D., et al. (2011). *Escherichia coli* producing CNF1 toxin hijacks Tollip to trigger Rac1-dependent cell invasion. *Traffic* 12, 579–590.

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

Vizcaino, M.I., and Crawford, J.M. (2015). The colibactin warhead crosslinks DNA. *Nat Chem* 7, 411–417.

Walk, S.T., Alm, E.W., Gordon, D.M., Ram, J.L., Toranzos, G.A., Tiedje, J.M., and Whittam, T.S. (2009). Cryptic lineages of the genus *Escherichia*. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 6534–6544.

Wang, J., Rao, Q., Wang, M., Wei, H., Xing, H., Liu, H., Wang, Y., Tang, K., Peng, L., Tian, Z., et al. (2009). Overexpression of Rac1 in leukemia patients and its role in leukemia cell migration and growth. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 386, 769–774.

Wang, X., Allen, T.D., May, R.J., Lightfoot, S., Houchen, C.W., and Huycke, M.M. (2008). *Enterococcus faecalis* induces aneuploidy and tetraploidy in colonic epithelial cells through a bystander effect. *Cancer Res.* 68, 9909–9917.

- Wang, X., Yang, Y., Moore, D.R., Nimmo, S.L., Lightfoot, S.A., and Huycke, M.M. (2012). 4-hydroxy-2-nonenal mediates genotoxicity and bystander effects caused by *Enterococcus faecalis*-infected macrophages. *Gastroenterology* 142, 543–551.e547.
- Welch, R.A., Burland, V., Plunkett, G., Redford, P., Roesch, P., Rasko, D., Buckles, E.L., Liou, S.-R., Boutin, A., Hackett, J., et al. (2002). Extensive mosaic structure revealed by the complete genome sequence of uropathogenic *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 17020–17024.
- Wennerberg, K., and Der, C.J. (2004). Rho-family GTPases: it9s not only Rac and Rho (and I like it). *J. Cell. Sci.* 117, 1301–1312.
- Wenzel, D.M., Lissounov, A., Brzovic, P.S., and Klevit, R.E. (2011). UBC7 reactivity profile reveals parkin and HHARI to be RING/HECT hybrids. *Nature* 474, 105–108.
- Winter, S.E., Winter, M.G., Xavier, M.N., Thiennimitr, P., Poon, V., Keestra, A.M., Laughlin, R.C., Gomez, G., Wu, J., Lawhon, S.D., et al. (2013). Host-derived nitrate boosts growth of *E. coli* in the inflamed gut. *Science* 339, 708–711.
- Wu, S., Rhee, K.-J., Albesiano, E., Rabizadeh, S., Wu, X., Yen, H.-R., Huso, D.L., Brancati, F.L., Wick, E., McAllister, F., et al. (2009). A human colonic commensal promotes colon tumorigenesis via activation of T helper type 17 T cell responses. *Nat Med* 15, 1016–1022.
- Wu, X., Tu, X., Joeng, K.S., Hilton, M.J., Williams, D.A., and Long, F. (2008). Rac1 activation controls nuclear localization of beta-catenin during canonical Wnt signaling. *Cell* 133, 340–353.
- Xicohtencatl-Cortes, J., Monteiro-Neto, V., Saldaña, Z., Ledesma, M.A., Puente, J.L., and Girón, J.A. (2009). The type 4 pili of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 are multipurpose structures with pathogenic attributes. *J. Bacteriol.* 191, 411–421.
- Xu, H., Yang, J., Gao, W., Li, L., Li, P., Zhang, L., Gong, Y.-N., Peng, X., Xi, J.J., Chen, S., et al. (2014). Innate immune sensing of bacterial modifications of Rho GTPases by the Pyrin inflammasome. *Nature* 513, 237–241.
- Yamamoto, S., Tsukamoto, T., Terai, A., Kurazono, H., Takeda, Y., and Yoshida, O. (1995). Distribution of virulence factors in *Escherichia coli* isolated from urine of cystitis patients. *Microbiol. Immunol.* 39, 401–404.
- Yarbrough, M.L., Li, Y., Kinch, L.N., Grishin, N.V., Ball, H.L., and Orth, K. (2009). AMPylation of Rho GTPases by *Vibrio* VopS disrupts effector binding and downstream signaling. *Science* 323, 269–272.
- Yau, R., and Rape, M. (2016). The increasing complexity of the ubiquitin code. *Nat. Cell Biol.* 18, 579–586.
- Yin, Q., Lin, S.-C., Lamothe, B., Lu, M., Lo, Y.-C., Hura, G., Zheng, L., Rich, R.L., Campos, A.D., Myszka, D.G., et al. (2009). E2 interaction and dimerization in the crystal structure of TRAF6. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16, 658–666.
- Zaitseva, J., Jenewein, S., Oswald, C., Jumpertz, T., Holland, I.B., and Schmitt, L. (2005). A molecular understanding of the catalytic cycle of the nucleotide-binding domain of the ABC transporter HlyB. *Biochem. Soc. Trans.* 33, 990–995.
- Zerial, M., and McBride, H. (2001). Rab proteins as membrane organizers. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 107–117.
- Zhang, L., Krachler, A.M., Broberg, C.A., Li, Y., Mirzaei, H., Gilpin, C.J., and Orth, K. (2012). Type III effector VopC mediates invasion for *Vibrio* species. *Cell Rep* 1, 453–460.
- Zhang, L., Anglesio, M.S., O'Sullivan, M., Zhang, F., Yang, G., Sarao, R., Nghiem, M.P., Cronin, S., Hara, H., Melnyk, N., et al. (2007). The E3 ligase HACE1 is a critical chromosome 6q21 tumor suppressor involved in multiple cancers. *Nat Med* 13, 1060–1069.
- Zhang, W., Wu, K.-P., Sartori, M.A., Kamadurai, H.B., Ordureau, A., Jiang, C., Mercedi, P.Y., Murchie, R., Hu, J.,

Persaud, A., et al. (2016). System-Wide Modulation of HECT E3 Ligases with Selective Ubiquitin Variant Probes. *Mol. Cell* 62, 121–136.

Zhou, C., Licciulli, S., Avila, J.L., Cho, M., Troutman, S., Jiang, P., Kossenkov, A.V., Showe, L.C., Liu, Q., Vachani, A., et al. (2013). The Rac1 splice form Rac1b promotes K-ras-induced lung tumorigenesis. *Oncogene* 32, 903–909.

Annexes

En parallèle de mon travail de thèse principal, j'ai initié d'autres études qui ont toutes pour point commun de s'intéresser aux interactions entre « l'hôte » et « les agents pathogènes » qui est l'axe de recherche principal développé au laboratoire dans lequel j'ai effectué ma thèse. Je me suis en particulier intéressé aux agents pathogènes dit « émergents ». En effet, les avancées technologiques récentes dans le domaine de la microbiologie moléculaire ont permis de mettre en évidence des nouveaux aspects dans les infections bactériennes et également de découvrir de nouvelles espèces bactériennes.

Article Annexe 1 :

Virulence Analysis of *Bacillus cereus* Isolated after Death of Preterm Neonates, Nice, France, 2013.
Lotte R, Hérissé AL, Berrouane Y, Lotte L, Casagrande F, Landraud L, Herbin S, Ramarao N, Boyer L, Ruimy Emerg Infect Dis. 2017 May;23(5):845-848. doi: 10.3201/eid2305.161788.

Au cours de ma thèse, en collaboration étroite avec le laboratoire de bactériologie du CHU de Nice (Pr Raymond Ruimy) nous avons réalisé une étude de recherche translationnelle qui nous a amené à nous intéresser à la virulence de *Bacillus cereus*, un pathogène opportuniste chez l'homme, retrouvé de façon ubiquitaire dans l'environnement. Après la mort de 2 nouveau-nés prématurés hospitalisés dans la même unité de soins intensifs suite à une infection systémique à *B. cereus*, nous avons étudié le potentiel pathogène de cette bactérie. L'analyse de la génétique et de la virulence des souches indique que les nouveau-nés ont été infectés par 2 souches différentes avec un potentiel de virulence similaire aux souches environnementales. Ces résultats suggèrent une insuffisance de la réponse immunitaire chez le patient (Lotte et al., 2017) (Annexe 1).

Article Annexe 2 :

Infections related to *Actinotignum schaalii* (formerly *Actinobaculum schaalii*): a 3-year prospective observational study on 50 cases.

Lotte L*, Lotte R*, Durand M, Degand N, Ambrosetti D, Michiels JF, Amiel J, Cattoir V, Ruimy R. Clin Microbiol Infect. 2016 Apr;22(4):388-90. doi: 10.1016/j.cmi.2015.10.030. Epub 2015 Nov 10.

Revue Annexe 3 :

***Actinotignum schaalii* (formerly *Actinobaculum schaalii*): a newly recognized pathogen-review of the literature.**

Lotte R, Lotte L, Ruimy R. Clin Microbiol Infect. 2016 Jan;22(1):28-36. doi: 10.1016/j.cmi.2015.10.038. Epub 2015 Nov 11. Review.

Dans la continuité de mon activité hospitalière, en collaboration étroite avec le laboratoire de bactériologie du CHU, je me suis intéressé à la bactérie *Actinotignum schaalii* qui est un bacille Gram positif anaérobie facultatif, commensal de la flore périnéale. Cette bactérie est considérée comme un pathogène urinaire émergent car son implication dans les infections urinaires a longtemps été sous-estimée. En effet, son isolement en culture est difficile du fait de sa croissance lente sur milieux usuels en aérobose, et des difficultés d'identification par les méthodes biochimiques phénotypiques. Les données existantes dans la littérature étant rares, nous avons mené une étude prospective descriptive au CHU de Nice pour préciser la significativité clinique d'*A. schaalii* dans les prélèvements humains. Nos résultats confirment que cette bactérie est essentiellement impliquée dans des infections urinaires et notamment dans des conditions particulières de susceptibilité de l'hôte *i.e* patients présentant un terrain urologique sous-jacent ou une immunodépression. Dans certains cas *A. schaalii* est retrouvé dans des infections invasives comme des bactériémies, endocardites et des abcès pelviens (Lotte et al., 2016a) (Annexe 2). L'intérêt porté à la meilleure connaissance de la significativité clinique de ce pathogène « émergent » m'a également permis de publier une revue de la littérature avec invitation (Lotte et al., 2016b) (Annexe 3).