

Activation de la protéine p21 Rho par une toxine produite par certains *Escherichia coli* pathogènes

Les bactéries pathogènes qui se multiplient au contact des muqueuses sont très souvent capables de remanier considérablement le cytosquelette d'actine des cellules épithéliales constituant ces tissus. L'activité des pathogènes microbiens sur les mécanismes d'organisation du cytosquelette d'actine se fait, soit par contact entre la bactérie et la cellule, soit par l'intermédiaire de toxines. La modification de ce cytosquelette par les bactéries a pour but de favoriser leur multiplication par des mécanismes aussi divers que l'effacement des microvillosités des entérocytes, la modification de la perméabilité des jonctions intercellulaires serrées et la phagocytose des micro-organismes pathogènes par les cellules non phagocytaires, ou encore en accélérant leur dissémination dans les cellules épithéliales [1].

La plupart des toxines bactériennes connues jusqu'à présent pour affecter le cytosquelette d'actine, agissent en inactivant les GTPases de la famille Rho impliquées dans la régulation de ce cytosquelette [2]. Ainsi, l'exoenzyme C3 de *Clostridium botulinum* [3], les toxines A et B de *Clostridium difficile* [4] désorganisent les fibres d'actine en modifiant la protéine Rho dans une étape post-translationnelle. Un travail très récent de notre laboratoire et de celui d'une équipe allemande, démontre qu'à côté des toxines qui inactivent Rho, il existe une toxine activant cette petite protéine G par un mécanisme moléculaire totalement inédit. Certaines souches d'*Escherichia coli* (uropathogènes ou entéropathogènes) produisent une toxine protéique de 110kDa nommée facteur cytotoxique nécrosant de type 1

(CNF1). Cette toxine a la propriété d'assembler les fibres d'actine en faisceaux, de multiplier les points focaux d'adhérence, de permettre un étalement considérable des cellules et de provoquer leur multinucléation [5]. Le CNF1, ajouté à leur milieu de culture, induit un phénotype sur le cytosquelette d'actine identique à celui obtenu lorsque la forme dominante positive de la protéine Rho est microinjectée dans les cellules [6]. En outre, dans les cellules traitées par le CNF1, une diminution de la mobilité électrophorétique de Rho laissait supposer que CNF1 était capable de modifier directement la protéine [7].

En procédant à des expériences exclusivement *in vitro*, nous avons montré qu'il était possible de reproduire cette modification de mobilité électrophorétique de Rho par simple ajout de CNF1 à la GTPase recombinante purifiée. Cette réaction ne nécessite aucun co-facteur cellulaire. Notre équipe a ensuite démontré que le CNF1 agissait sur Rho en modifiant spécifiquement le résidu glutamine 63 en acide glutamique de la GTPase (RhoQ63E), par désamidation [8]. Un résultat similaire a été rapporté conjointement par une équipe allemande [9]. La glutamine 63 de Rho, qui correspond à la glutamine 61 dans la protéine Ras, est un résidu-clé de l'activation permanente des petites protéines G [10].

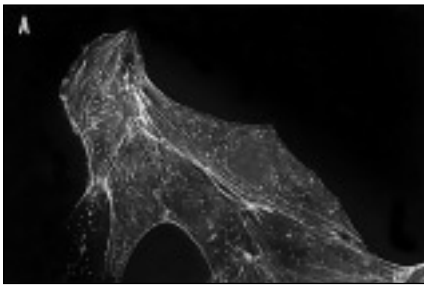
Bien que l'affinité de RhoQ63E pour le GTP soit quasiment identique à celle de la protéine normale, l'activité GTPasique de RhoQ63E intrinsèque ou stimulée par la protéine activant la GTPase (RhoGAP) est, en revanche, totalement abolie. Enfin, lorsqu'on micro-injecte la protéine

RhoQ63E dans des cellules, on observe la formation massive de fibres de tension d'actine et de points focaux d'adhérence. Rho modifiée par CNF1 se comporte donc comme une forme constitutivement active de Rho.

Les protéines de la famille de Rho jouent un rôle prépondérant dans le contrôle de l'organisation des fibres d'actine en réponse aux facteurs de croissance. Rho contrôle l'adhérence, la mobilité et la forme de la cellule mais aussi le cycle cellulaire et pourrait être impliquée dans des mécanismes d'oncogenèse [11]. Le fait que les GTPases Rho soient des éléments essentiels de la régulation cellulaire a été mis à profit par les bactéries pathogènes. En effet, la protéine Rho est modifiée par plusieurs toxines grâce à des réactions aussi différentes que l'ADP-ribosylation de l'arginine 41 par l'exoenzyme C3 [3], la glucosylation de la thréonine 37 par les toxines A et B de *C. difficile* [4] ou, comme démontré maintenant pour le CNF1, par la désamidation de la glutamine 63 de Rho.

L'ensemble de ces résultats montre donc que le CNF1 est un nouveau type de toxine agissant dans le cytoplasme par une activité catalytique jusqu'alors insoupçonnée pour un facteur de virulence bactérien : la désamidation. En modifiant spécifiquement la glutamine 63 de Rho en acide glutamique, le CNF1 est, en outre, la première toxine connue qui provoque une mutation « post-translationnelle », au niveau protéique, d'une petite protéine G impliquée dans la régulation cellulaire.

Il reste à souligner que d'autres toxines ou mécanismes bactériens



THÉÂTRE DES RHO

Figure 1. **Induction de fibres d'actine de tension et de points focaux d'adhérence par le CNF1.** En A cellules Vero témoins. En B cellules Vero traitées par le CNF1 pendant 4h. On note l'abondance et la taille des fibres d'actine de tension. Les flèches en B montrent les points focaux d'adhérence produits par activation de Rho sous l'effet de CNF1.

impliqués dans la relation bactérie-cellule à l'origine de maladies infectieuses pourraient utiliser une activité catalytique identique à celle du CNF1. On peut également imaginer que la désamidation puisse être une voie de modification post-traductionnelle jouant un rôle dans la régulation des cellules eucaryotes. La découverte du mode d'action du CNF1 sur Rho ouvre donc un nouveau champ d'investigation tant en pathologie infectieuse qu'en biologie cellulaire.

**G.F.
M.G.
P.B.**

1. Finlay BB, Cossart P. Exploitation of mammalian host cell functions by bacterial pathogens. *Science* 1997; 276: 718-25.
2. von Eichel-Streiber C, Boquet P, Sauerborn M, Thelestam M. Large clostridial cytotoxins - a family of glycosyltransferases modifying small GTP-binding proteins. *Trends Microbiol* 1996; 4: 375-82.
3. Chardin P, Boquet P, Madaule P, Popoff MR, Rubin EJ, Gill DM. The mammalian G protein RhoC is ADP-ribosylated by *Clostridium botulinum*

exoenzyme C3 and affects actin microfilaments in Vero cells. *EMBO J* 1989; 8: 1087-92.

4. Just I, Selzer J, Wilm M, von Eichel-Streiber C, Mann M, Aktories K. Glucosylation of Rho proteins by *Clostridium difficile* toxin B. *Nature* 1995; 375: 500-3.

5. Fiorentini C, Arancia G, Caprioli A, Falbo V, Ruggeri FM, Donelli G. Cytoskeletal changes induced in Hep2 cells by the cytotoxic necrotizing factor of *Escherichia coli*. *Toxicon* 1988; 26: 1047-56.

6. Fiorentini C, Donelli G, Matarrese P, Fabbri A, Paradisi S, Boquet P. Cytotoxic necrotizing factor 1: evidence for induction of actin assembly by constitutive activation of the p21 Rho GTPase. *Infect Immun* 1995; 63: 3936-44.

7. Oswald E, Sugai M, Labigne A, Wu HC, Fiorentini C, Boquet P, O'Brien AD. Cytotoxic factor type 2 produced by a virulent *Escherichia coli* modifies the small GTPase-binding Rho involved in assembly of actin stress fibers. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 3814-8.

8. Flatau G, Lemichez E, Gauthier M, Chardin P, Paris S, Fiorentini C, Boquet P. Toxin-induced activation of the G protein p21 Rho by deamidation of glutamine. *Nature* 1997; 387: 729-33.

9. Schaidt G, Sear P, Wilm M, Selzer J, Mann M, Aktories K. Gln63 of Rho is deamidated by *Escherichia coli* cytotoxic necrotizing factor-1. *Nature* 1997; 387: 725-9.

10. De Gunzburg J. Les petites protéines G. *Med Sci* 1992; 8: 322-3.

11. Zalzman G, Closson V, Honoré N, Olofsson B, Tavittian A. Participation de la cascade des gènes *Rho* à la régulation du cytosquelette: rôle possible dans les mécanismes d'oncogenèse. *Med Sci* 1995; 11: 1551-6.