



HAL
open science

Étude du rôle de l'Optineurine dans l'axe de signalisation HACE1/Rac1 et la transformation tumorale

Daniel Hamaoui

► **To cite this version:**

Daniel Hamaoui. Étude du rôle de l'Optineurine dans l'axe de signalisation HACE1/Rac1 et la transformation tumorale. Sciences agricoles. Université Côte d'Azur, 2016. Français. NNT: 2016AZUR4092 . tel-01916972

HAL Id: tel-01916972

<https://theses.hal.science/tel-01916972>

Submitted on 9 Nov 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.

Université Côte d'Azur - UFR Sciences

Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé

THESE

Pour obtenir le titre de Docteur en Sciences

Mention : Interactions moléculaire et cellulaires

Etude de l'axe OPTN/HACE1 dans la
signalisation cellulaire

Défendue publiquement par Daniel HAMAOUI

le 8 novembre 2016

Devant le jury de soutenance composé de :

Pr Thomas Lamonerie	Professeur	Président du Jury
Dr Anne Blangy	Directeur de Recherche	Rapporteur
Dr Serge Roche	Directeur de Recherche	Rapporteur
Dr Corinne Albiges-Rizo	Directeur de Recherche	Examinatrice
Dr Mario Pende	Directeur de Recherche	Examineur
Dr Emmanuel Lemichez	Directeur de Recherche	Directeur de thèse
Dr Amel Mettouchi	Chargé de Recherche	Co-Directrice de thèse

**Travaux réalisés sous la direction du Dr Emmanuel LEMICHEZ
et du Dr Amel METTOUCHI**

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

Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire,

UMR INSERM U1065/UNS, Bâtiment ARCHIMED

151 route Saint Antoine de Ginestière BP 2 3194 06204 NICE

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury qui m'ont fait l'honneur de juger mon travail. Merci au Dr Anne Blangy et au Dr Serge Roche d'avoir accepté d'être mes rapporteurs et d'avoir consacré du temps à l'évaluation de ma thèse. Je remercie également le Dr. Mario Pende, ainsi que le Dr. Corrinne-Albigès pour avoir accepté d'être les examinateurs de cette thèse. Merci au Pr Thomas Lamonerie qui m'a fait l'honneur de présider ce jury de thèse.

Je remercie le Dr Emmanuel Lemichez pour m'avoir accueilli dans son équipe de recherche et pour m'avoir soutenu tout au long de ces quatre années. Je te remercie aussi pour l'aide que tu m'as accordée pour trouver mon premier Post-Doc.

Je remercie également le Dr Amel Mettouchi d'avoir encadré et dirigé ma thèse.

Un grand merci à tous les autres membres de l'équipe. Votre soutien et votre aide quotidienne m'ont permis de finaliser ma thèse. Un grand merci à Anne, Patrick, Laurent, Romain, Orane, Maria, Elsa, Greg et Aurélie. Je vous souhaite une réussite personnelle et professionnelle. J'espère pour vous que mon bordelisme à la paillasse ne sera pas égalé par les futurs thésards.

Je voudrais aussi dédier cette thèse à mes parents, Tony et Fadia. Je n'aurais pas pu en arriver là sans leur soutien permanent et quotidien. Un grand merci à ma sœur Michelle, ainsi qu'à mes beaux parents Annie et Alain.

Emilie, ma chérie merci d'avoir supporté mon caractère excécrable durant les derniers mois de ma thèse. Et merci de me pousser à être le meilleur de moi-même et de m'avoir soutenu jusqu'à la fin. Giulia, je te dédie également cette thèse et j'espère que tu seras fière de ton papa.

Table des matières

INTRODUCTION	10
A) -La Rho GTPase Rac1	11
I. Les Rho GTPases	11
I.1 La superfamille Ras	11
I.2 La famille des Rho GTPases.....	11
I.3 La régulation de l'activité des Rho GTPases.....	11
a) Le Cycle GTP/GDP.....	11
b) La régulation spatio-temporelle des Rho GTPases.....	12
c) Aspects généraux sur l'émergence de la régulation des Rho GTPases par ubiquitylation	13
II. Rac1 : un gène essentiel	16
II.1 Rac1 et le contrôle des réponses immunitaires.....	16
a) Rac1 contrôle l'expression de cytokines inflammatoires.....	16
b) Le rôle général de Rac1 dans l'infection par les agents pathogènes	17
II.2 Rac1 et le contrôle du cycle cellulaire.....	18
a) Rac1 contrôle l'expression de la Cycline D1 pour l'entrée en Phase S.....	18
II.3 Rac1 et l'ostéogénèse.....	20
a) L'activation de la voie canonique de Wnt.....	20
b) Rac1 et le contrôle du remodelage osseux.....	22
II-4 Rac1 et le métabolisme cellulaire	23
a) Rac1 et l'activation de la voie mTOR.....	23
b) Rac1 est un régulateur de la glycolyse cellulaire	27
c) Rac1 est un régulateur du métabolisme de la Glutamine	29
II.5 Rac1 contrôle la polymérisation de l'actine.....	29
B) HECT Domain And Ankyrin Repeat Containing E3 Ubiquitin Protein Ligase 1 (HACE1).....	30
I. L'ubiquitination.....	31
I.1 L'ubiquitylation	31
I.2 Les différents types de chaînes d'ubiquitines.....	32
I.3 La voie Ubiquitine-Protéasome.....	32
I.4 Les E3 ubiquitine ligases	33
a) La famille RING : Monomériques et multimériques.....	34
b) La famille HECT.....	35
II. HACE1, la E3 ubiquitine ligase de Rac1, est un suppresseur de tumeur.....	35
III. <i>hace1</i> est un gène essentiel à la réponse cellulaire aux stress.....	37
III.1 HACE1 contrôle la production d'Espèces Actives de l'Oxygène.....	37
III.2 HACE1 contrôle la réponse cellulaire au stress oxydatif.....	38
C.La Mécano-transduction.....	40
I. L'adhérence cellulaire à la matrice extracellulaire	40
I.1 Les intégrines : structure et spécificité d'interaction aux ligands.....	40
I.2 Les composants cytosoliques de l'adhérence.....	42
a) Les composants de signalisation	42
b) Les composants cytosoliques liant les intégrines au cytosquelette d'actine.....	43
I.3 La maturation des structures d'adhérence : un rôle crucial des Rho GTPases.....	45
a) Les complexes focaux.....	45
b) Les adhérences focales	45
c) Les podosomes et invadopodes	46
I.5 Les mécanosenseurs	47
a) YAP/TAZ.....	47
b) p130Cas.....	49
c) Taline	50
d) La Filamine	50
II. La Matrice extracellulaire : Remaniement et Maladies.....	51
II.1 Les composants majeurs de la Matrice extracellulaire.....	51
II.2 Le remaniement de la Matrice extracellulaire.....	52

a) Le remaniement enzymatique	52
b) Le remaniement mécanique : Outside-in vs Inside-Out.....	53
II.3 Le remaniement de la Matrice extracellulaire dans les pathologies humaines.....	54
a) L'Arthrose et la cardiomyopathie.....	54
b) Fibrose.....	55
c) Progression tumorale :	55
D) Résultats préliminaires : Optineurine est le partenaire d'interaction majeur d'HACE1.	56
I. Fonctions cellulaires de l'OPTN.	57
I.1 Structure	57
I.2 OPTN dans le transport vésiculaire.	57
I.3 OPTN dans la transition G2/M du cycle cellulaire.....	58
I.4 OPTN et la réponse inflammatoire.	58
I.5 OPTN un récepteur sélectif d'autophagie.....	59
a) Mécanisme moléculaire de l'autophagie.....	59
b) OPTN est un récepteur sélectif de l'Autophagie.....	60
c)OPTN et les maladies humaines.....	61
OBJECTIFS DE LA THESE	64
RESULTATS	67
Article de recherche :	68
Optineurin links Rac1 ubiquitylation by HACE1 to integrin-mediated mechanotransduction.	68
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	127
Conclusions :	128
Discussion partie 1 : OPTN est-elle une cible régulatrice de l'activité ubiquitine ligase de HACE1 ?129	
Discussion partie 2 : OPTN est à l'interface entre l'anabolisme et le catabolisme :.....	131
Discussion partie3 : OPTN est importante pour la signalisation inside-out des intégrines.	134
Discussion partie 4 : L'expression génique de l'OPTN est modulée en fonction de la croissance cellulaire.	135
Travail collaboratif :	138
Références :	153

Résumé :

Rac1 est une Rho GTPase essentielle à la régulation de nombreux processus cellulaires, tels que l'adhérence, la prolifération, la dynamique du cytosquelette d'actine, l'expression génique et la défense contre les agents pathogènes. En étudiant la toxine CNF1 des *Escherichia coli* uropathènes, notre équipe a pu identifier un nouveau mécanisme de régulation des GTPases de type Rho et notamment de Rac1, correspondant à la dégradation protéasomale médiée par l'ubiquitine. Cette régulation touche les formes actives de ces GTPases. Nous avons identifié le suppresseur de tumeur HACE1 comme étant la principale E3 ubiquitine ligase catalysant l'ubiquitylation de Rac1. L'activité d'HACE1 apparaît ainsi essentielle au contrôle des processus cellulaires dépendant de Rac1, tels que l'état Redox, la migration et la prolifération des cellules.

Afin de mieux comprendre le rôle d'HACE1 dans le maintien de l'homéostasie cellulaire, nous avons cherché à identifier ses partenaires d'interaction. Nous avons effectué pour cela un crible double hybride en levure sur l'ensemble du génome humain et avons pu identifier l'Optineurine (OPTN) comme étant le partenaire majeur d'interaction d'HACE1. Nous avons par la suite étudié le rôle du complexe HACE1/OPTN dans le contrôle de l'homéostasie cellulaire.

Nous avons identifié OPTN comme étant un nouveau régulateur de l'activité ubiquitine ligase d'HACE1 sur Rac1. En effet, la déplétion d'OPTN entraîne une diminution de l'ubiquitylation de Rac1 et en conséquence une augmentation de l'activité Rac1 intracellulaire. Nous avons aussi identifié une modification post-traductionnelle d'OPTN qui fait suite à l'activation de Rac1 et qui renforce la formation du complexe OPTN/HACE1. Ce mécanisme semble constituer une boucle de rétrocontrôle positif de Rac1. Nous avons également pu observer qu'OPTN est localisée dans les adhérences focales et que son niveau protéique augmente avec la rigidité de la matrice extracellulaire (MEC). Ceci nous a conduit à démontrer qu'OPTN régule les niveaux d'ubiquitylation de Rac1 en réponse à l'augmentation de la rigidité de la MEC. En parallèle, nous avons établi qu'OPTN contrôle l'activité de mTORC1 et la traduction de la Cycline D1 en réponse à l'augmentation de la rigidité de la MEC pour ajuster l'entrée en phase S du cycle cellulaire. Enfin, nous avons montré qu'OPTN contrôle la taille et le nombre des structures d'adhérence et l'activation des voies de signalisation en aval des intégrines.

L'ensemble de ces données nous a permis d'identifier le rôle essentiel d' OPTN comme «mécanosenseur» capable d'adapter la prolifération des cellules à l'état de rigidité de la matrice extracellulaire.

Liste des abréviations :

4EBP-1 : Eukaryotic translation initiation factor 4E-Binding Protein 1
ADN : Acide Désoxyribonucléique
AP-2 : Assembly Protein-2
Arp2/3 : Actin related protein 2/3
ATF2 : Activating Transcription Factor 2
ATP : Adénosine triphosphate
Cdc42 : Cell Division Cycle 42
CNF1 : Cytotoxic Necrotizing Factor 1
DNT : Dermonecrotic toxin
FAK: Focal Adhesion Kinase
FN: Fibronectine
GAP : GTPase Activating Protein
GDF : GDI Displacement Factors
GDP : Guanosine Di-Phosphate
GEF : Guanine nucleotide Exchange Factor GTP : Guanosine Tri-Phosphate
HA : Hémagglutinine
ITG: Intégrine
kDa : kilo Dalton
MAP kinase ou MAPK : Mitogen Activated Protein Kinase
MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinases
mTOR: mechanistic Target Of Rapamycine
NF- κ B : Nuclear Factor kappa B
OPTN : Optineurine
p70S6K1 : Ribosomal protein S6 kinase beta-1
PAI : Pathogenicity islands
PAK : p21-activated kinase
PI3K : Phosphoinositide-3-Kinase
Rac : Ras-related C3 botulinum toxin substrate
Rho : Ras homologous
RhoGDI : Rho GDP Dissociation Inhibitor
ROCK : Rho kinase
S6 : Ribosomal protein s6
Smurf : Smad ubiquitination-related factor
SRC : Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src
Ub : Ubiquitine
UPEC : Uropathogenic *Escherichia coli*
UPS : Ubiquitin-Proteasome System
WAVE 1-3 : WASP-family verprolin- homologous proteins 1-3

Table des figures :

Figure 1: Régulation de l'activité spatio-temporelle des Rho GTPases. 12

Figure 2 Mode d'entrée de la toxine bactérienne CNF1 dans les cellules humaines 14

Figure 3 La détection de l'agent pathogène en réponse aux effecteurs microbiens 18

Figure 4 La régulation de la traduction de la Cycline D1 par Rac1 20

Figure 5 Les rôles de Rac1 dans l'ostéoblastogénèse..... 22

Figure 6 Composition et fonctions des complexes mTORC1 & mTORC2 24

Figure 7 Schéma représentant les différentes étapes de la glycolyse 27

Figure 8 Le rôle de Rac1 dans la Glycolyse 28

Figure 9 Les rôles de Rac1 dans la tumorigénèse..... 31

Figure 10 La voie ubiquitine-protéasome d'après (100). 33

Figure 11 HACE1 contrôle la production d'Espèces Actives de l'Oxygène (EAOs)..... 38

Figure 12 OPTN et HACE1 agissent en synergie pour limiter le stress oxydant dans les cellules
humaines 39

Figure 13 Représentation des structures inactives et actives des hétérodimères d'Intégrines $\alpha 2\beta 3$
..... 42

Figure 14 Les différents types de structures d'Adhérence.. 47

Figure 15 La régulation de la transcription YAP/TAZ dépendante.. 49

Figure 16 La réciprocité des échanges de forces entre les structures d'adhérence cellulaire et la MEC
..... 54

Figure 17 Structure de l'OPTN 57

Figure 18 Les étapes clés de la formation des autophagolysosomes..... 60

Figure 19 OPTN n'est pas une cible d'HACE1 dans les HUVECs. 131

Figure 20 Les cellules siOPTN ont une diminution du niveau d'ATP intracellulaire et une
augmentation de la phosphorylation de l'AMPK. 133

Figure 21 Les niveaux transcriptionnels de HACE1 et de OPTN sont modulés en fonction de la
quiescence et de l'abondance de nutriments. 137

INTRODUCTION

A) -La Rho GTPase Rac1

I. Les Rho GTPases

1.1 La superfamille Ras

Les protéines de la famille p21-Ras sont des protéines G, liant le guanine di-phosphate (GDP) et guanine triphosphate (GTP). Ces protéines possèdent une activité GTPase intrinsèque qui permet l'hydrolyse du GTP en GDP. La superfamille p21-Ras comprend 5 familles principales, la famille Ras, la famille des Rho GTPases, la famille Rab, la famille Ran et la famille Sar/Arf. Les protéines de la famille p21-Ras sont connues pour leur activité de transduction des signaux en aval de récepteurs tyrosine kinase. Les gènes K-Ras et Ha-Ras ont été parmi les premiers oncogènes majeurs décrits. Les Rab et Ran sont quant-à elles surtout impliquées dans le contrôle du trafic vésiculaire et du trafic entre le cytosol et le noyau respectivement (1) (Figure 1).

1.2 La famille des Rho GTPases

La famille des Rho GTPases comprend 22 gènes chez les mammifères. Ils sont homologues aux gènes Ras allant jusqu'à 30% d'identité (2). Les Rho GTPases sont caractérisées par une séquence d'acides aminés appelée région insert qui les différencie des autres protéines Ras. Bien que les gènes codant pour les Rho GTPases possèdent une haute homologie de séquence, les GTPases de type Rho ont des rôles cellulaires distincts. Ces gènes sont très conservés au cours de l'évolution. De ce fait, les Rho GTPases sont des protéines essentielles et leur délétion chez la souris provoque une létalité au stade embryonnaire.

Les Rho GTPases sont essentielles au contrôle de l'expression génique, à l'organisation du cytosquelette d'actine, à la prolifération des cellules ainsi qu'à la réponse cellulaire aux agents pathogènes. Ces aspects seront développés dans la suite de ce manuscrit (3) (4).

1.3 La régulation de l'activité des Rho GTPases

a) Le Cycle GTP/GDP

La diversité des processus cellulaires régulés par les Rho GTPases se fait à travers la grande variété d'effecteurs qu'ils lient, ainsi que par la localisation précise de leur activité sur différents compartiments cellulaires. L'interaction des Rho GTPases avec leurs effecteurs est dépendante de la liaison de ces dernières au GTP. En effet, les Rho GTPases oscillent entre une forme inactive liant le GDP et une forme active liant le GTP. La forme liant le GTP change de conformation tridimensionnelle au niveau des deux domaines Switch I et II. Cela confère une forte affinité des Rho GTPases à leurs effecteurs, permettant ainsi l'activation de cascades de signalisation en aval. Ce cycle GTP/GDP est étroitement régulé. L'activité GTPase intrinsèque des Rho GTPases est faible. Elle est accélérée par

les protéines de la famille GAP (GTPase activating proteins) favorisant l'arrêt de la signalisation. Les protéines de la famille GEFs (Guanine nucleotide exchange factors) permettent le relargage du GDP et le chargement du GTP sur les protéines grâce à sa forte concentration cytosolique qui est 100 fois plus importante dans le cytosol que le GDP (5) (6).

b) La régulation spatio-temporelle des Rho GTPases

La régulation des Rho GTPases dépend de l'ajout d'un groupement isoprényle de type géranyl-géranyl. Cette prénylation se fait au niveau d'une cystéine contenue dans un motif conservé dans la partie carboxy-terminale de la protéine, dite « boîte CAAX ». Suite à la fixation du groupement géranyl-géranyl, les acides aminés AAX sont clivés et le groupement carboxy-terminal est carboxy-méthylé. La prénylation est nécessaire à l'ancrage des Rho GTPases au niveau de la membrane pour leur interaction avec leurs effecteurs (7) (8).

Les Rho GTPases sont aussi régulées d'une manière spatio-temporelle, par les protéines de la famille Rho GDI (Rho GDP-Dissociation Inhibitor). En effet, Rho GDI masque la cystéine géranyl-géranylée séquestrant ainsi un pool de Rho GTPases dans le cytosol. D'une manière très intéressante, il existe des protéines, telles que l'Ezrine, la Radixine et la Moesine (Famille GDP), qui libèrent les Rho GTPases séquestrées par les RhoGDIs, permettant ainsi un enrichissement ponctuel des protéines Rho GTPases au niveau membranaire (9). Cela favorise donc une activation localisée des GTPases de type Rho (4).

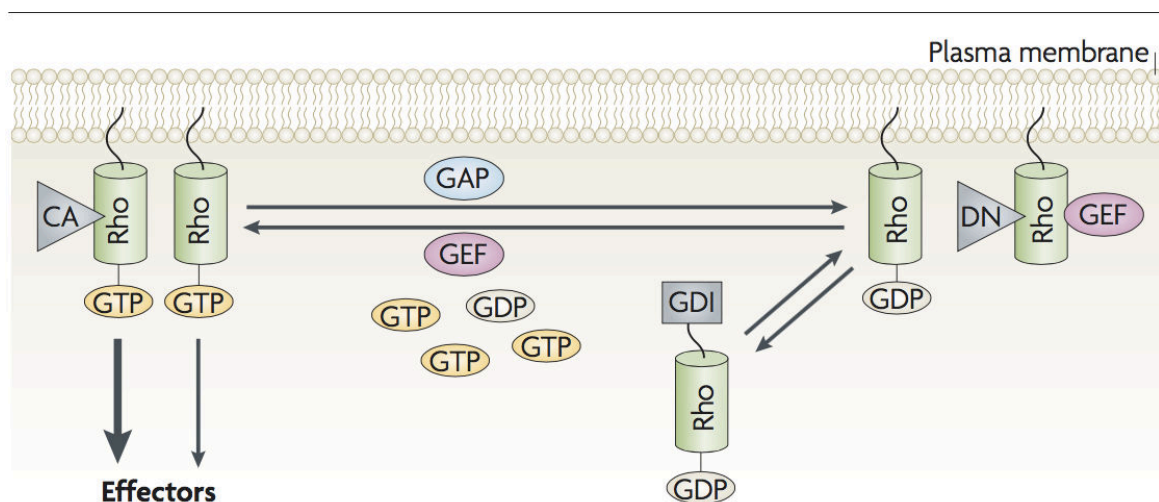


Figure 1: Régulation de l'activité spatio-temporelle des Rho GTPases d'après (2). Les GAPs (GTPase Activating Protein) catalysent l'activité GTPase intrinsèque des RhoGTPase et les GEFs (Guanine Exchange Factors) permettent l'échange du GDP en GTP. Les RhoGDIs permettent la séquestration cytosolique des RhoGTPases empêchant leur activation au niveau de la membrane.

c) Aspects généraux sur l'émergence de la régulation des Rho GTPases par ubiquitylation

Le premier lien entre les Rho GTPases et le protéasome fut établi dans l'équipe du Dr. Moses en 1998. En effet, cette équipe a pu démontrer qu'il existait une régulation de la stabilité de RhoB par le TGF- β et que cette régulation était dépendante de l'activation de la GTPase qui en retour inhibait cette voie de signalisation (10). Notre équipe a mis en évidence de façon directe grâce aux études effectuées sur la toxine bactérienne CNF1 (11) (Cytotoxic Necrotizing Factor 1), une nouvelle voie de régulation des Rho GTPases qui consiste en l'ubiquitylation des formes liant le GTP conduisant à leur dégradation par protéasome (12). Il existe un large spectre de toxines bactériennes qui ciblent directement les Rho GTPases, permettant leur inhibition ou leur activation (13) (8). Dans ce manuscrit, nous nous intéresserons à l'effet d'une toxine produite par les bactéries *Escherichia coli* uropathogènes (les UPECs), le CNF1.

La toxine CNF1 est une toxine de type A-B de 115kDa comportant 3 domaines fonctionnels. Le domaine amino-terminal de la toxine permet à celle-ci de se lier au domaine extracellulaire des récepteurs (formes 37 et 67 kDa) de la Laminine (les LRs). Ces récepteurs furent longtemps considérés comme les récepteurs principaux du CNF1. Cependant, un nouveau récepteur fut identifié récemment : la protéine d'adhérence Lu/BCAM (14) (15) (16). De ce fait, l'internalisation par endocytose de ces récepteurs entraîne l'internalisation du CNF1 dans des compartiments endosomaux (17). L'acidification des vésicules endosomales, entraîne l'insertion de la partie médiane de CNF1 dans la bicouche lipidique des vésicules. Le domaine carboxy-terminal de la toxine, constituant le domaine catalytique, est ensuite transloqué dans le cytosol (18). Ce domaine a une activité déamidase qui cible directement les Rho GTPases : la toxine catalyse la déamidation de la Glutamine 63 de RhoA ou la Glutamine 61 de Cdc42 et de Rac1 en acide glutamique (19, 20) (Figure 2). De ce fait, l'activité GTPase intrinsèque de ces protéines est presque complètement inhibée. Les Rho GTPases deviennent ainsi insensibles aux GAPs, ce qui provoque l'accumulation des formes actives liant le GTP dans les cellules. Les Rho GTPases activées sont alors ubiquitylées et ciblées au

protéasome pour être dégradées (11). Ces résultats sont en accord avec ceux de l'équipe du Dr. Aktories montrant une dégradation de Rac1 (21).

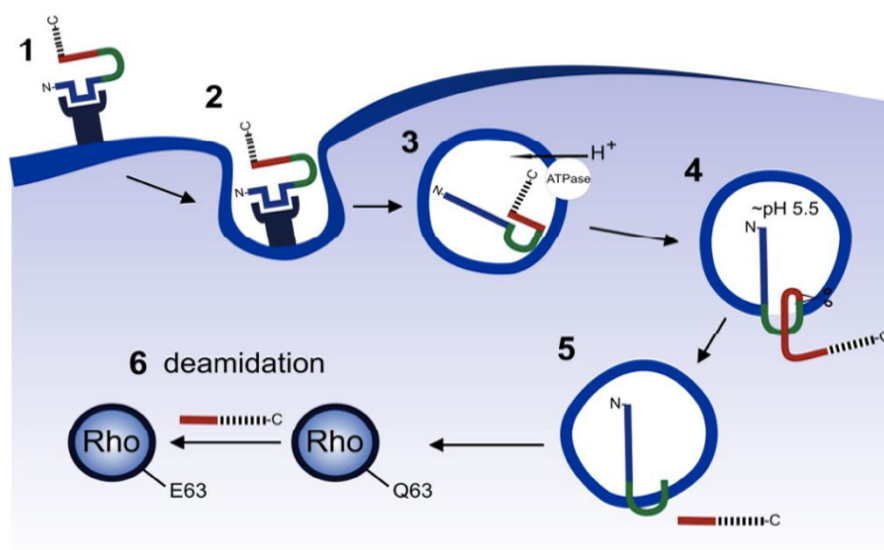


Figure 2 Mode d'entrée de la toxine bactérienne CNF1 dans les cellules humaines d'après (22). Le CNF1 se lie aux récepteurs membranaires (1). L'endocytose du récepteur membranaire entraîne l'internalisation du CNF1(2). L'acidification des vésicules endocytotiques (3) entraîne un changement conformationnel du CNF1 et l'ancrage du domaine médian du CNF1 dans la bicouche lipidique de la vésicule endosomale (4). Le domaine catalytique est ensuite relargué au niveau du cytosol (5) exerçant son activité déamidase sur les RhoGTPases (6).

1) Contrôle de Rac1 par ubiquitylation et dégradation par le protéasome

L'ubiquitylation de Rac1 a été initialement décrite en réponse au CNF1 et a été par la suite étendue à une réponse de l'activation de Rac1 par des GEFs (11) Rac1 est ubiquitylée au niveau de la lysine 147 (23). Bien que Rac1 interagisse avec plusieurs ubiquitine ligases, telles que POSH, Cbl ou le complexe SCF, aucune étude n'a montré que Rac1 est une cible de ces enzymes (12). Notre équipe a identifié en 2011 le suppresseur de tumeurs « HECT-domain and Ankyrin-repeats containing E3 ubiquitin protein ligase 1 » (HACE1) comme étant la E3 Ubiquitine ligase majeure de la forme active de Rac1 qui a depuis été confirmée indépendamment par trois laboratoires (24) (25). Cette régulation participe au contrôle par Rac1 de l'étalement cellulaire et de l'invasion des cellules par les bactéries. D'autres études ont montré l'importance de cette voie de régulation dans le contrôle de processus cellulaires majeurs en aval de Rac1. Ces processus englobent le contrôle de l'activation du macro-complexe NADPH oxydase pour la production d'Espèces Actives de l'Oxygène (EAOs) et le contrôle de l'entrée des cellules en phase S du cycle cellulaire(26) , ainsi que la migration des cellules (27) (28). Ces aspects font l'objet d'une description détaillée dans la partie B du manuscrit.

En 2012, l'équipe du Dr Krishnaraj a montré que les protéines XIAP et c-IAP (Protéines de la famille des IAPs) sont également des E3 ubiquitines ligases qui permettent l'ubiquitylation de Rac1 sur la lysine 147 et son ciblage au protéasome pour être dégradée. D'une manière intéressante, les IAPs ne semblent pas avoir une spécificité envers la forme Rac1-GTP et permettent de contrôler le niveau total de Rac1 dans les cellules, amenant ainsi une intégrité tissulaire lors du développement et le contrôle de la migration cellulaire promue par Rac1 (29). Par ailleurs, l'équipe du Dr Zhao a démontré que la SCF E3 ligase F-box protéine complexe SCF^{FBXL19} permet l'ubiquitylation de Rac1. D'une manière similaire aux IAPs le complexe SCF n'a pas de spécificité sur les formes GTP ou GDP de Rac1. Les complexes SCF^{FBXL19} contrôlent les niveaux totaux de Rac1 dans la cellule (30). HACE1 est pour l'instant la seule E3 ubiquitine ligase ciblant spécifiquement la forme active (Rac1-GTP) de Rac1.

2) Le contrôle de RhoA par ubiquitylation et dégradation par le protéasome

L'ubiquitylation et la dégradation de RhoA ont fait l'objet d'un plus grand nombre d'études que celles de Rac1. Elle a été observée dans de nombreux types cellulaires (804G, HEK293, cellules épithéliales et endothéliales, fibroblastes et macrophages primaires) (31). Il existe deux types d'E3 ubiquitine ligases bien décrites catalysant l'ubiquitylation de RhoA que sont Smurf1 et Cullin-3/BACURD. Smurf1, une ubiquitine ligase de la famille HECT, est un régulateur connu de la voie TGF- β , agissant directement sur la stabilité des SMADs. Depuis, il a été montré que la forme vide et/ou liée au GDP de RhoA est une cible de Smurf1 et que Smurf1 n'influe pas sur l'ubiquitylation de Rac1 et Cdc42 (32). La régulation de l'activité de RhoA par Smurf1 intervient dans différents processus, tels que la transition épithéliale - mésenchymateuse (TEM) médiée par le TGF- β et la mise en place d'une polarité cellulaire lors de la migration cellulaire. La migration directionnelle des cellules (en réponse à un chimio-attractant) nécessite une polarisation de l'activation des Rho GTPases. En effet, au niveau du front de migration cellulaire, il y a une activation élevée de Rac1, alors qu'au niveau postérieur de la cellule, il y a une prédominance de l'activité de RhoA qui favorise la contraction du réseau acto-myosine. Il a été montré que le système de polarité Cdc42-Par6 active PKC- ζ au niveau du front de migration (33). PKC- ζ active à son tour Smurf1 qui induit une dégradation de RhoA dépendante de l'ubiquitine (34). Il a été montré d'autre part que le TGF- β promeut l'interaction de Smurf1 avec la forme phosphorylée de PAR6. Par conséquent, Smurf1 est recrutée localement par le complexe de polarité pour permettre une dégradation de RhoA locale, avant son activation, ce qui aurait pour conséquence de bloquer l'EMT (35). L'idée globale avancée dans les travaux du groupe

du Dr Wrana est que le système ubiquitine / protéasome assure une spécificité locale d'activation des Rho GTPases par dégradation polarisée de la GTPase sous sa forme vide et/ou liée au GDP, avant qu'elle ne soit activée par une GEF.

La Culline-3 appartient à la famille des E3 CRLs (Cullin-RING Ligases). Culline-3, en association avec Rbx1 et la protéine F-box BACURD, forme un complexe qui va reconnaître et ubiquityler la forme de RhoA liée au GDP. Ce complexe contrôle les niveaux cellulaires totaux de RhoA et de ce fait le flux de forme activée capable de promouvoir la formation de fibres de stress. L'invalidation de l'expression de *cullin-3* altère la migration des cellules (36).

II. Rac1 : un gène essentiel

Rac1 est un gène essentiel. La délétion du gène codant Rac1 est létale au stade embryonnaire (environ E9.5) pour les souris (37). Rac1 contrôle un grand nombre de processus cellulaires fondamentaux, de ce fait des mutations et des dérégulations de son activité sont impliquées dans de nombreuses maladies humaines, telles que le cancer ou la maladie de Crohn. Cette partie vise à décrire le rôle de Rac1 dans la prolifération des cellules, dans le contrôle des réponses immunitaires, dans le métabolisme cellulaire ainsi que dans l'adhérence cellulaire.

II.1 Rac1 et le contrôle des réponses immunitaires.

a) Rac1 contrôle l'expression de cytokines inflammatoires

Les Rho GTPases, dont Rac1, contribuent à la régulation de l'expression génique en activant les MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinases) dont la Jun NH2-terminal kinase (JNK) et la p38. Ces dernières vont phosphoryler les sous-unités des facteurs de transcription dimériques AP-1, c-Jun et ATF2 favorisant leur translocation dans le noyau et la transcription de gènes cibles. Les Rho GTPases activent la transcription MAPK dépendante en réponse aux chocs thermiques, aux facteurs de croissance ou en réponse aux cytokines inflammatoires, dont le TNF- α . De plus en réponse au CNF1, Munro *et al.* ont montré que Rac1 et Cdc42 induisent l'expression de gènes pro-inflammatoires et anti-apoptotiques régulés par NF- κ B et les MAPK kinases (38). Ces résultats sont en accord avec l'effet inflammatoire associé à l'activité du CNF1 et des souches d'*Escherichia coli* uropathogènes exprimant le CNF1 (39); (40). D'autres études ont démontré que les Rho GTPases, dont Rac1, permettent l'activation de NF- κ B (41). Cependant, les mécanismes précis restent à être démontrés.

En particulier, le partenaire d'interaction de Rac1 POSH est impliqué dans le contrôle de l'activation de NF- κ B (42). Celle-ci est une protéine d'échafaudage qui va organiser et permettre la

formation d'un complexe Rac1, MLK2/3, MKK4/7 et JNK dans des cellules neuronales (43). Par ailleurs, Il a été démontré que Rac1 active son effecteur PAK qui phosphoryle et active NIK (NF- κ B inducing Kinase) (44). NIK va ensuite phosphoryler I κ B- α , conduisant à son ubiquitination et à sa dégradation au niveau du protéasome. NF- κ B va ensuite être libéré, puis transloqué au noyau pour activer la transcription de gènes inflammatoires importants dans la réponse immunitaire. Plus récemment, Boyer *et al.* ont démontré que Rac1, une fois activée par CNF1, va interagir avec RIP1 et RIP2. Cela va entraîner l'activation de NF- κ B et induire une réponse inflammatoire importante qui fait intervenir une seconde étape d'activation de l'inflammasome par Rac1 et la sécrétion d'IL1- β (45) (46). Cette inflammation induite par les facteurs de virulence ciblant Rac1 est retrouvée dans l'infection par les agents pathogènes *Salmonella*, *Chlamydia* et *Escherichia coli*.

b) Le rôle général de Rac1 dans l'infection par les agents pathogènes

Rac1, par son rôle dans la transcription de gènes inflammatoires et anti-apoptotiques, la production de EAOs par certaines NADPH oxydases, l'adhésion cellule-cellule, l'adhésion cellule-matrice extracellulaire et la phagocytose, se retrouve avoir un rôle central dans l'interaction entre hôte et agents pathogènes (47). L'activation de Rac1 promeut la formation de la macropinocytose et de membranes ondulantes dans des cellules non phagocytaires, favorisant ainsi l'entrée des bactéries et l'infection des cellules (48) (49). Cependant, Rac1, par le contrôle de Nf- κ B et l'activation des MAPK, promeut une réponse inflammatoire et une réponse immunitaire de l'hôte (38) (50). D'une manière similaire, le facteur SopE de Salmonelle agit comme une GEF de Rac1 et Cdc42 pour promouvoir leur activation et la formation de lamellipodes et l'invasion des cellules épithéliales par les bactéries. Par la suite, l'activation de Rac1 est détectée par NOD1. Cela va recruter Hsp90 et activer RIP2 conduisant à l'activation de Nf- κ B, ce qui induit une réponse immunitaire innée inflammatoire (Figure 3) (51). Il en ressort donc une dualité des effets de Rac1, qui va à la fois promouvoir l'entrée de bactéries dans les cellules, mais aussi agir à leur détriment par le déclenchement d'une réponse immunitaire de l'hôte.

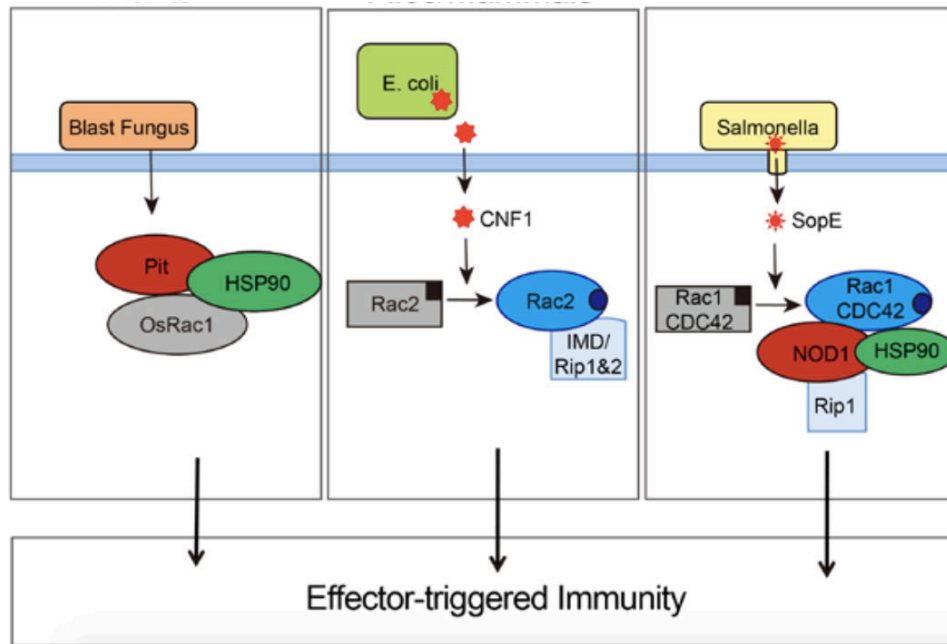


Figure 3 La détection de l'agent pathogène en réponse aux effecteurs microbiens (52). L'activation des RhoGTPases Rac1 par les effecteurs microbiens est conservée chez les plantes (OsRac1) et les mammifères (Rac1, Rac2 et Cdc42). L'activation de Rac1 entraîne une réponse inflammatoire et immunitaire.

II.2 Rac1 et le contrôle du cycle cellulaire

a) Rac1 contrôle l'expression de la Cycline D1 pour l'entrée en Phase S

Le contrôle du cycle cellulaire fait intervenir un très grand nombre de facteurs et sa dérégulation est associée à l'acquisition d'un phénotype néoplasique. L'activité de Rac1 est essentielle pour la transition du stade G1 en phase S, notamment en contrôlant l'expression de la Cycline D1. La Cycline D1 s'associe aux CDK4/CDK6 pour inactiver par phosphorylation la protéine Retinoblastoma (Rb). Cela conduit au relargage du facteur de transcription E2F1 qui va transcrire les Cyclines E et A, ainsi qu'une cascade d'évènements amenant à la progression des cellules en phase S et donc à la réplication de l'ADN (53). La Cycline D1 est essentielle pour la transformation oncogénique par Ras et ses niveaux d'expression sont élevés dans les cellules cancéreuses (54) (55). Le contrôle des niveaux protéiques de la Cycline D1 se fait au niveau transcriptionnel, traductionnel et post-traductionnel. Rac1 intervient dans la régulation de la transcription et de la traduction de la Cycline D1 (voir ci-dessous). La transcription de la Cycline D1 fait appel à de multiples facteurs de transcription et se fait en réponse à la stimulation de facteurs de croissance, tels que l'HGF et l'EGF, ainsi qu'en réponse à l'œstrogène. Il a été montré qu'en réponse à l'activation, par exemple, des Récepteurs Tyrosine Kinase, l'activation des MAPKs (Mitogen-Activated Protein Kinases) et la voie canonique Ras-Raf-MEK peuvent induire l'expression de Fos, Jun et ATF (Facteurs de transcriptions AP-1) (56) (57). La région promotrice de la Cycline D1 contient une zone de consensus AP-1 à -903

paire de bases (58). De plus, l'activation de Ras promeut la transcription de la Cycline D1 médiée par sp-1, p50 et p107. Le site consensus Sp1 peut aussi être reconnu par le facteur de transcription B-MYB. (59)

i) Contrôle transcriptionnel

Rac1 est un gène essentiel à l'entrée des cellules en phase S du cycle cellulaire. L'inhibition de Rac1 conduit à un arrêt en Phase G1 des cellules. Rac1, dans certains contextes cellulaires permet l'activation de NF- κ B et la transcription de la Cycline D1 *via* ATF2 (un facteur de transcription de la famille des ATF) (60). Cependant, les mécanismes précis par lesquels Rac1 active la transcription de la Cycline D1 par NF- κ B restent à élucider. Néanmoins, Rac1 contrôle l'activation de certaines isoformes de la NADPH oxydase et la production des EAOs. L'activité de NF- κ B est augmentée en réponse aux EAOs, ce qui peut contribuer à la transcription Rac1-dépendante de la Cycline D1 (61). Cependant, il a été aussi montré que Rac1 peut induire la transcription de la Cycline D1, indépendamment d'une activation de Nf- κ B, et cela en promouvant l'activation de la MAP kinase ERK (62).

ii) Contrôle traductionnel

En plus de son rôle sur la transcription de la Cycline D1, Rac1 est un régulateur de la traduction de la Cycline D1. En effet, Mettouchi *et al.* ont démontré que la stimulation des cellules endothéliales par la Fibronectine, activant les intégrines $\alpha 5\beta 1$, promeut l'activation de Rac1 par une voie de signalisation PI3K/SOS (SOS étant une protéine portant un domaine GEF de Ras et un domaine GEF 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 (Figure 4). 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, cependant aucune synthèse protéique de la Cycline D1 ne se produit et les cellules sont incapables de rentrer en phase S. Ce phénotype est reversé par l'expression de Rac1 actif, démontrant ainsi le rôle fondamental de celui-ci dans la traduction de la Cycline D1. Le mécanisme révélé par Mettouchi *et al.* apparaît important pour le bourgeonnement vasculaire durant l'angiogénèse (63)

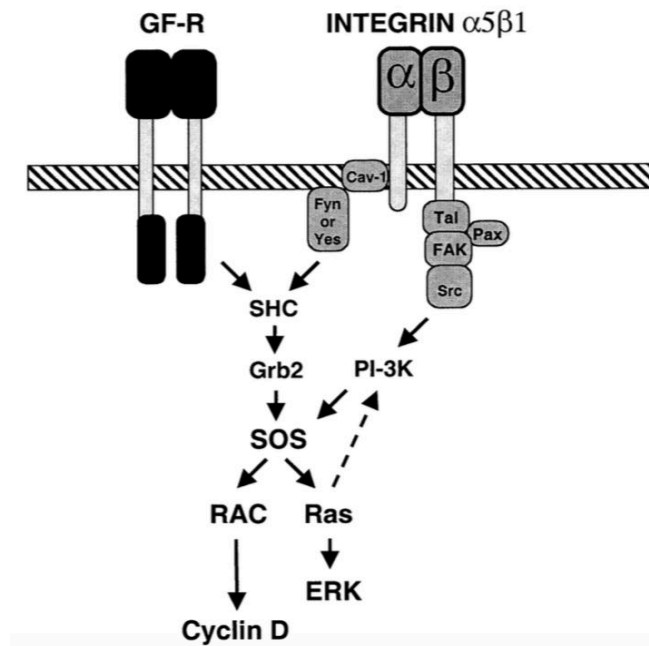


Figure 4 La régulation de la traduction de la Cycline D1 par Rac1 d'après (63). La liaison des intégrines $\alpha5\beta1$ à leur substrat la Fibronectine, entraîne l'activation de Rac1 par SOS (une protéine de la famille des GEFs). Rac1 en retour promeut la traduction de la Cycline D1 et l'entrée des cellules en phase S du cycle cellulaire. L'activation de ERK est indispensable à la transcription de la Cycline D1.

II.3 Rac1 et l'ostéogénèse.

a) L'activation de la voie canonique de Wnt.

Wnt est une protéine essentielle durant le développement embryonnaire. En effet, Wnt est une protéine sécrétée qui va activer diverses voies de signalisation dites morphogènes (c'est-à-dire nécessaires à la différenciation des tissus embryonnaires). La famille Wnt comprend 19 gènes, très conservés dans l'évolution. Les protéines Wnt subissent des modifications lipidiques indispensables pour l'interaction avec Wntless, une protéine chaperonne permettant la sécrétion de Wnt. Sécrétée, Wnt va se lier aux récepteurs Frizzled LRP5(5/6), cela va ensuite inhiber le complexe Axin-GSK3-APC. En effet, ce complexe permet l'ubiquitylation de la β -caténine et son ciblage au protéasome pour être dégradée. De ce fait l'inhibition du complexe Axin-GSK3-APC par Wnt, augmente la stabilité de la β -caténine et sa translocation dans le noyau. Dans le noyau, la β -caténine va se lier aux facteurs de transcription LEF/TCF et activer l'expression génique permettant la croissance et la différenciation tissulaire. Cette voie de signalisation est la voie dite canonique Wnt/ β -caténine. Wnt peut activer des voies de signalisation non canoniques (*via* PCP et les protéines PKC). Le récepteur majoritaire Frizzled est conservé dans les 2 voies canonique et non canonique. (64)

Des mutations des différents composants de la voie Wnt/ β -caténine sont impliquées dans le développement de nombreuses maladies humaines, dont les maladies osseuses telles que la maladie de Van Buchem et le Syndrome d'ostéoporose pseudogliome. Depuis, cette voie fut démontrée comme importante pour le remodelage osseux en régulant la chondrogénèse ainsi que la différenciation et la prolifération des ostéoblastes, ainsi que la synthèse de la matrice extracellulaire de l'os par les ostéoblastes (65) (66).

L'équipe du Dr Long a pu établir que Rac1 est important pour l'activation de la voie canonique de Wnt. Ils ont pu démontrer que Rac1 contrôle la translocation de β -caténine dans le noyau pour activer la transcription de gènes nécessaires à l'ostéoblastogenèse. En effet, dans les cellules ST2 (Cellules Stromales murines dérivées de la moelle osseuse) stimulées par Wnt, la $G\alpha_q/11\beta\gamma$ (Récepteurs couplés aux protéines G) promeut l'activation de Rac1 *via* l'activité de la PI3K. Rac1 par la suite permet la phosphorylation de JNK2 qui va phosphoryler la β -caténine au niveau des sérines 191 et 605. Cette phosphorylation est critique à la translocation de la β -caténine dans le noyau et la transcription des gènes *via* le facteur de transcription LEF/TCF (Figure 5). Cela permet la différenciation des cellules ST2 en ostéoblastes, se mesurant par l'expression du marqueur AP (Alcaline Phosphatase). D'une manière éloquente, ils ont pu ensuite démontrer qu'en excisant le gène Rac1 au niveau de la crête de l'ectoderme apicale des bourgeons des membres, le phénotype des embryons de souris mimait l'effet de déplétion de la β -caténine dans cette zone, abrogeant ainsi le bourgeonnement des membres. D'une manière similaire, ils ont pu montrer que l'excision de Rac1 diminuait l'expression des gènes induits par la β -caténine dans les bourgeons des membres, sans affecter la mise en place des jonctions adhérentes. Cela permet de discuter le rôle précis de Rac1 dans le contrôle de la génération des membres médiée par la voie Wnt / β -caténine dans un contexte de différenciation de précurseurs de la moelle osseuse. De plus, par des expériences d'épistasie, ils ont démontré le lien génétique entre Dkk1, Wnt/ β -caténine et Rac1 dans la formation des membres lors du développement embryonnaire (67).

De plus, l'équipe du Dr Long a montré que l'activation de Rac1 en aval de Wnt3a, promeut l'activation de mTORC2, qui phosphoryle par la suite Akt sur la sérine 473. Il en résulte une augmentation de l'activité et de l'expression d'enzymes impliquées dans la glycolyse telles que les Hexokinases 1/2 et la lactate déshydrogénase. Cela conduit à une reprogrammation métabolique des cellules qui se manifeste par une augmentation de la Glycolyse en aérobie. Ils ont ainsi pu montrer que cette voie de signalisation et le changement du métabolisme complémente la voie canonique

Wnt/ β -caténine pour assurer la différenciation de ST2 (précurseurs de la moelle osseuse) en ostéoblastes.

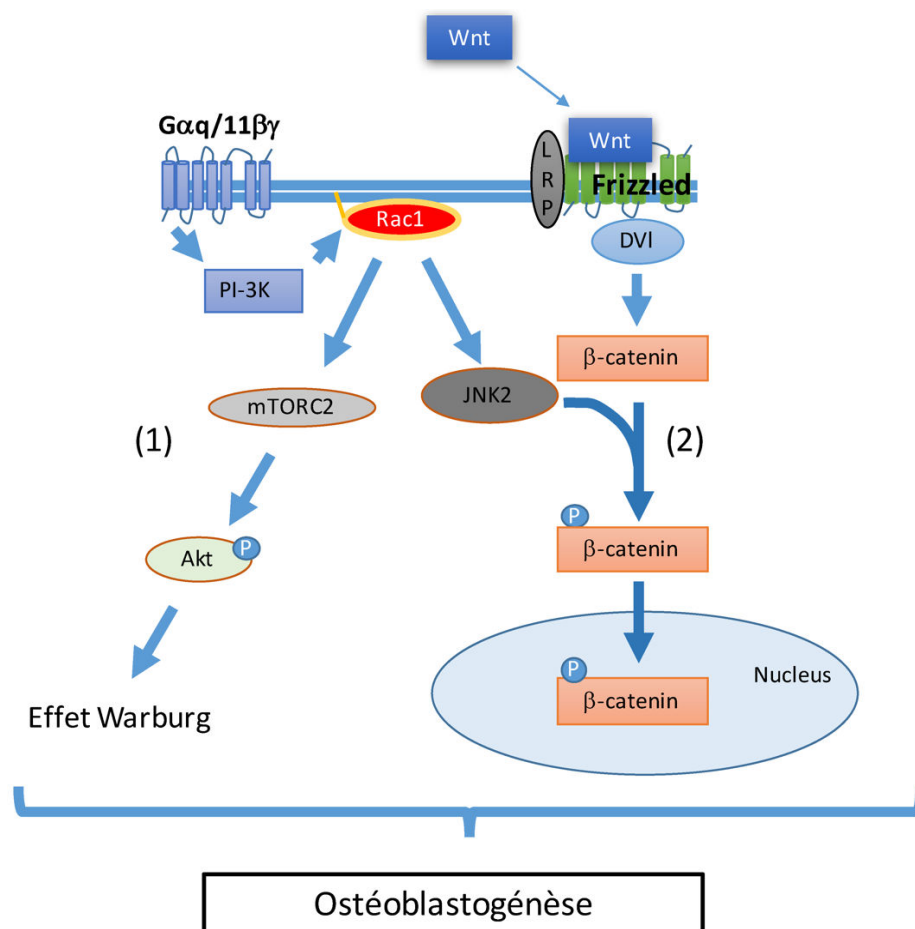


Figure 5 Les rôles de Rac1 dans l'ostéoblastogénèse. Le ligand Wnt extracellulaire se lie à son récepteur Frizzled-LRP, recrutant DVL (Dishevelled). Dvl promeut par la suite une stabilisation de la β -caténine au niveau cytosolique. Rac1 va recruter et activer la sérine/thréonine kinase JNK2, qui va phosphoryler la β -caténine. La forme phosphorylée de la β -caténine va transloquer dans le noyau et activer la transcription de gènes. Rac1 d'un autre côté active mTORC2 qui active par phosphorylation Akt. Akt va promouvoir ensuite la glycolyse en aérobie (effet Warburg) nécessaire à la la différenciation des cellules précurseurs en ostéoblastes.

b) Rac1 et le contrôle du remodelage osseux

Le tissu osseux subit un remodelage constant qui lui permet le maintien de sa structure et de sa solidité. Les ostéoblastes sont responsables de la formation de l'os, alors que les ostéoclastes (OCs) assurent une résorption du tissu osseux. Cette résorption se fait par l'intermédiaire de protéases et de pompes à protons qui se retrouvent au niveau de bordures en brosses, entourées d'un anneau d'actine. Cette zone est nommée la « sealing zone ». On retrouve dans celle-ci un enrichissement de podosomes, qui permettent l'adhérence et le contact des OCs à l'os, afin d'assurer leurs fonctions. De nombreuses études ont montré l'implication des RhoGTPases dont Rac1, dans le maintien et l'organisation des podosomes nécessaire au remaniement du tissu osseux par les ostéoclastes. Par exemple des souris KO pour les GEFs de Rac1 Vav3, présentent une perte de résorption osseuse qui

corrèle avec une dérégulation de l'activité de Rac et Src (68). De plus Takegahara et al ont montré que FARP2 (GEF contenant un domaine FERM) permet l'activation de Rac1 au niveau des podosomes ce qui est nécessaire à la résorption de l'Os par les Ostéoclastes (69). L'équipe du Dr Blangy a démontré que Rac1 a un rôle crucial dans l'activité ostéolytique des OCs. En effet, la GEF de Rac1, Dock5 est hautement exprimée dans les OCs. Les souris DOCK5 -/- ne présentent pas un phénotype très altéré, cependant elles possèdent une augmentation de la masse osseuse trabéculaire liée à une diminution de l'activité Rac1. Dock5 permet l'activation de Rac1 dans les OCs, cela conduit à un assemblage des podosomes et une augmentation de l'ostéolyse. De plus, l'équipe du Dr Blangy a montré que l'utilisation d'un inhibiteur pharmacologique de DOCK5, le C21, permet de diminuer l'ostéolyse, offrant ainsi des perspectives thérapeutiques pour le traitement de l'ostéoporose (70) (71).

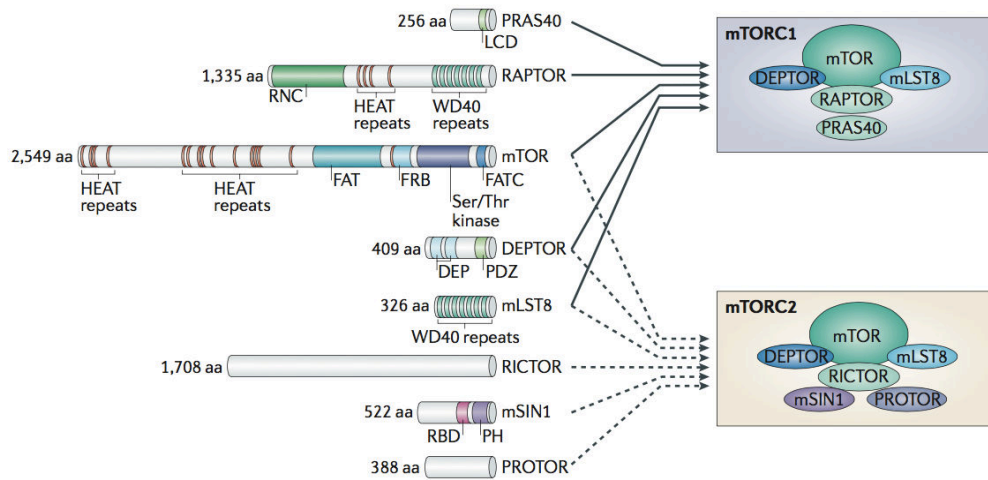
II-4 Rac1 et le métabolisme cellulaire

a) Rac1 et l'activation de la voie mTOR

i) mTOR : un régulateur majeur de l'anabolisme cellulaire

mTOR (pour mechanistic Target Of Rapamycin) est une protéine de la famille des PIKK (Phosphatidylinositol Kinase-related kinase) qui contrôle les voies d'anabolisme majeures. La découverte de TOR eu lieu dans la levure grâce à une toxine, la Rapamycine. La Rapamycine, est un antibiotique de *Streptomyces hygroscopicus*, ayant une activité antifongique puissante qui cible et inhibe l'activité des complexes TOR. Les complexes mTOR se retrouvent sous deux formes mTORC1 et mTORC2 qui possèdent certaines sous-unités en commun. En effet, les complexes mTORC1 et mTORC2 contiennent tous deux les protéines Deptor, mLST8, TTI1 et TTI2. Le complexe mTORC1 comprend en plus les protéines spécifiques RAPTOR et PRAS40, alors que mTORC2 comprend Rictor, mSIN1 et PROTOR (Figure 6A) (72).

A/



B/

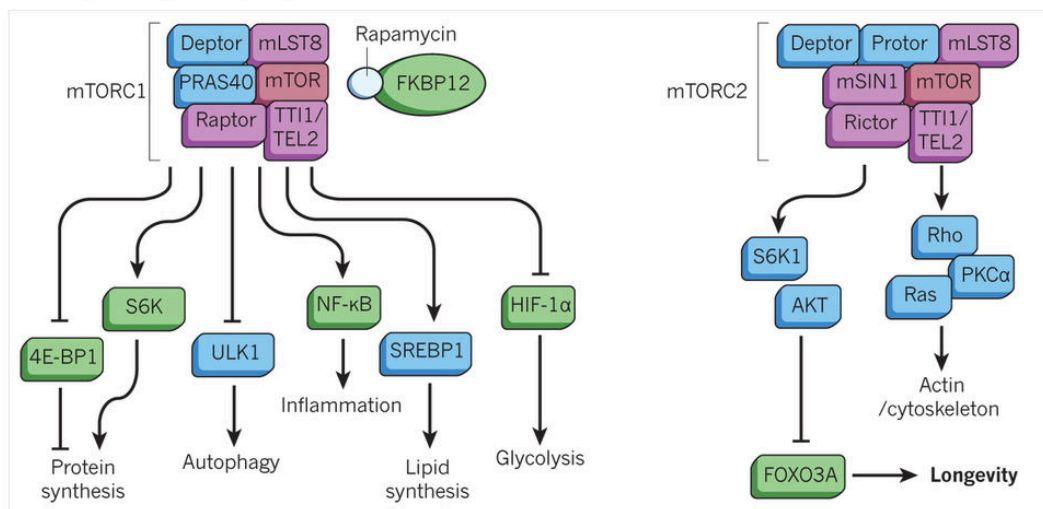


Figure 6 Composition (A) et fonctions (B) des complexes mTORC1 & mTORC2 d'après (Zoncu et al., 2011) et (73). (A) Le complexe mTORC1 est composé de mTOR, DEPTOR, mLST8, RAPTORM et PRAS40. Le complexe mTORC2 est composé de mTOR, DEPTOR, mLST8, RICTOR, mSIN1 et PROTORM. mTORC1 a un rôle central dans le contrôle de l'anabolisme cellulaire et l'inhibition du catabolisme. mTORC1 contrôle de plus l'inflammation, la néosynthèse de lipides et la glycolyse. mTORC2 contrôle le remaniement du cytosquelette d'actine et la transcription dépendante de FOXO3A.

TORC1 se présente comme un acteur central dans les processus d'anabolisme cellulaire et se retrouve en aval de nombreux promoteurs de la croissance cellulaire, tels que les facteurs de croissance et l'insuline. L'activation de mTORC1 est promue par les GTPases RheB (Ras homologue enriched in Brain). Les RheB sont des GTPases qui cyclent entre une forme liant GDP et une liant le GTP. La forme GTP est la forme activatrice de mTORC1. Le régulateur majeur décrit de ce cycle est le

complexe Tsc1/Tsc2, un complexe GAP qui stimule l'activité GTPase intrinsèque de Rheb et va de ce fait inactiver mTORC1 (74) (75) (76).

Les cibles décrites de mTORC1 permettent l'activation de la synthèse protéique, la synthèse de lipides, la biogénèse mitochondriale et la néo-synthèse de nucléotides (Figure 6B).

i-1) Le contrôle de la traduction :

mTORC1, par son activité sérine/thréonine kinase va phosphoryler les protéines 4EBP-1 et p70S6 kinases 1/2 afin de promouvoir la synthèse protéique. 4EBP-1 est un répresseur de la traduction cap-dépendante. La phosphorylation de 4EBP-1 entraîne une diminution de son affinité pour le facteur d'initiation eIF4E, qui va, une fois libéré, interagir avec eIF4G et activer l'assemblage des macro-complexes d'initiation de la traduction (77) (78). La p70S6K1 par contre, suite à sa phosphorylation par mTORC1, va entraîner la phosphorylation de plusieurs composants de la machinerie de traduction dont la protéine ribosomale S6, eIF4B, et eEF2K (eukaryotic Elongation Factor 2 kinase) (79) (80). mTORC1 promeut aussi la biogénèse des ribosomes pour augmenter la synthèse protéique globale. Ceci se fait *via* l'action de mTORC1 sur 4EBP-1/2. De plus, la p70S6K1 promeut la transcription de gènes impliqués dans la biogénèse des ribosomes, ce qu'on appelle le programme transcriptionnel RiBi. Cette famille comprend environ 80 ARNm codant des protéines ribosomales (81).

i-2) Le contrôle de la synthèse de lipides.

mTORC1 promeut l'activation de SREBP 1 et 2 (Sterols-Regulatory-Element-Binding Protein), des facteurs de transcription permettant l'expression d'enzymes responsables de la production d'acides gras et de stérols (82). Les SREBPs se retrouvent sous forme de protéines transmembranaires au niveau du réticulum endoplasmique. Suite à leur activation, les domaines amino-terminaux sont clivés, puis transloqués dans le noyau où ils vont permettre la transcription de gènes, tels que FASN (Fatty Acid Synthase), HMGCR (3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase) (83). mTORC1 inhibe aussi par phosphorylation la phosphatase Lipin1, un répresseur du clivage amino-terminal de SREBP (84) pour augmenter son activité.

i-3) La néo-synthèse de pyrimidines et purines.

Durant les stades de croissance cellulaire, les besoins en ARN et ADN ainsi qu'en ADP, ATP et GTP nécessitent une augmentation de la synthèse de purines et de pyrimidines. mTORC1 promeut,

via l'activation de SREBP1, l'expression de gènes impliqués dans la voie du pentose phosphate (PP). La voie du PP permet la synthèse du ribose-5-phosphate, le précurseur de la synthèse des purines et pyrimidines à partir du glucose-6-phosphate. Les équipes du Dr Manning et du Dr Hall furent des pionniers en démontrant de plus un rôle crucial de mTORC1 dans la néo-synthèse des purines et pyrimidines. En effet, Ben Sahra *et al.* ont pu identifier que la p70S6K1, en aval de mTORC1, phosphoryle la protéine CAD sur la sérine 1859 pour l'activer. La protéine CAD est une enzyme impliquée dans les 3 étapes initiales de la néo-synthèse de pyrimidine, permettant ainsi la synthèse de dihydroorotate (DHODH). Le DHODH est ensuite transformé en pyrimidine par des cascades enzymatiques (85, 86). mTORC1 promeut aussi la néo-synthèse de purines en induisant l'expression de ATF4. Par la suite ATF4 induit le métabolisme mitochondrial de sérine en formate (*via* le cycle du tetrahydrofolate) qui est ensuite métabolisé en purine (87).

ii) Rac1 un activateur de mTORC1 et mTORC2

L'équipe du Dr Cantley a pu montrer en 2011 que Rac1 est un activateur de mTORC1 et mTORC2. Ils constatèrent que la délétion de Rac1, et non pas de Rac2, induit une réduction de la taille de MEFs et lymphocytes primaires. L'équipe a démontré que Rac1 colocalise et interagit directement avec mTORC1 et mTORC2 *via* son domaine C-terminal et de façon indépendante de son état de liaison au GDP/GTP. De plus, Rac1 régulerait mTOR indépendamment de la voie classique PI3K/Akt. De ce fait, les niveaux protéiques de Rac1 influent sur les niveaux d'activation de mTORC1 et mTORC2 et le métabolisme cellulaire. Ceci est caractérisé par une augmentation de la phosphorylation de AKT, de la phosphorylation de la p70S6K1 ainsi que de celle de 4EBP-1 (88).

b) Rac1 est un régulateur de la glycolyse cellulaire

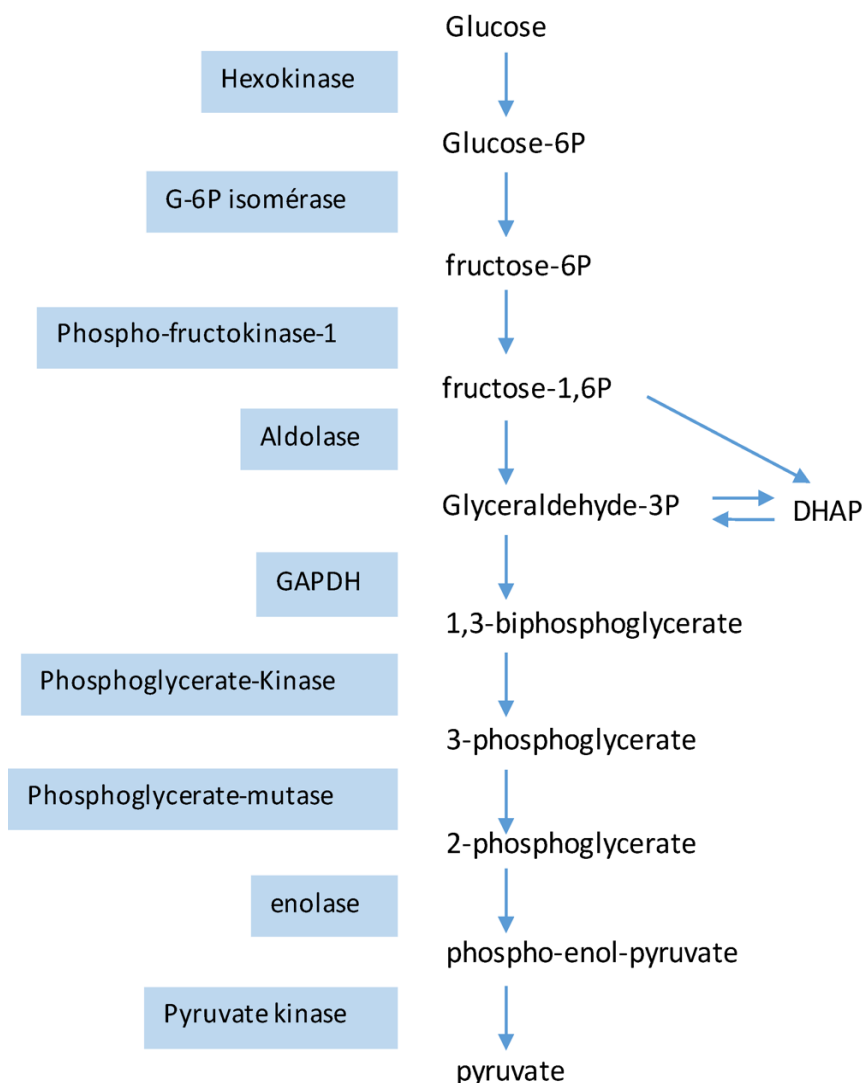


Figure 7 Schéma représentant les différentes étapes de la glycolyse qui permet la transformation du glucose en pyruvate.

La glycolyse consiste en la transformation du Glucose en pyruvate. Le pyruvate est soit transloqué dans la mitochondrie pour rentrer dans le cycle de l'acide citrique (phosphorylation oxydative), soit directement transformé en acide lactique par la voie de la glycolyse. Ces transformations se produisent grâce à des enzymes qui agissent d'une manière séquentielle. L'effet Warburg est une observation émise par le Dr Otto Warburg datant de 1956 qui stipule que les cellules cancéreuses ont une très forte glycolyse suivie de fermentation lactique, comparées aux cellules normales, avec très peu de pyruvate qui s'engage dans le cycle de Krebs même en abondance d'oxygène. Bien que cette glycolyse en aérobie soit désavantageuse quant-à la quantité d'ATP produite, elle apporte des avantages. En effet, lors de la glycolyse, des métabolites intermédiaires sont détournés pour la synthèse de ribose qui seront ensuite transformés en nucléotides, pour la

synthèse de glycérol pour la production de phospholipides et pour la synthèse d'acides aminés pour la production de protéines. La glycolyse en aérobie amène ainsi un support rapide pour l'hyperprolifération, une caractéristique des cellules cancéreuses (89).

Le groupe du Dr Wulf GM, a pu identifier un rôle de Rac1 dans le contrôle de la glycolyse. L'Aldolase A est une enzyme qui permet la transformation du Fructose-1,6 biphosphate en dihydroxyacétone phosphate (DHAP) et D-glycéraldéhyde 3-phosphate (DG3-P). Le DG3-P peut ensuite être transformé en pyruvate ou recruté dans la voie du pentose phosphate (la voie du pentose phosphate est une voie métabolique qui permet la synthèse de Ribose-5P un précurseur des nucléotides). Cette étape est défavorable énergétiquement, de ce fait les niveaux d'Aldolase A sont limitants pour la Glycolyse. Wulf *et al.* ont démontré que l'Aldolase A a une affinité pour l'actine filamenteuse. De ce fait le cytosquelette d'actine constitue un réservoir d'Aldolase A, insoluble dans le cytosol et limitant la glycolyse. Ils ont pu montrer que la PI3Ka promeut l'activation de Rac1 indépendamment de Akt. Rac1 *via* ses effecteurs Arp2/3 va ensuite promouvoir la formation d'actine branchée au détriment de l'actine filamenteuse, ainsi l'Aldolase A va être relarguée dans le cytosol. Celle-ci devient alors soluble et active, permettant ainsi une augmentation de la glycolyse (Figure8) (90).

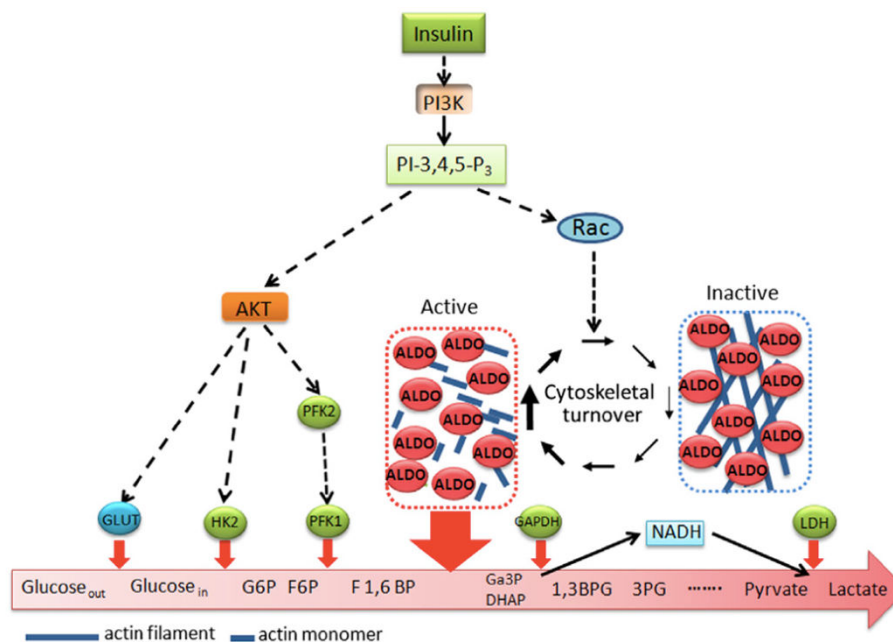


Figure 8 Le rôle de Rac1 dans la Glycolyse par le contrôle des niveaux solubles de l'Aldolase A d'après (90). L'aldolase (ALDO) permet la transformation du Fructose 1,6BP en Glycéraldéhyde-3P, une étape limitante de la glycolyse. L'aldolase se retrouve liée aux filaments d'actine. L'activation de Rac1 promeut le remaniement du cytosquelette d'actine ce qui rend l'Aldolase plus soluble et donc active, augmentant ainsi le flux Glycolytique.

c) Rac1 est un régulateur du métabolisme de la Glutamine

De nombreuses études ont montré les changements qu'existent dans le métabolisme des cellules cancéreuses. Il a été identifié que le métabolisme de la glutamine est particulièrement augmenté dans divers types de cellules cancéreuses et contribue hautement à la survie et la prolifération de celles-ci. Le métabolisme de la glutamine contribue de nombreuses façons à la survie et prolifération des cellules et converge avec le glucose dans le maintien et la disponibilité de divers métabolites intermédiaires à la synthèse de nucléotides et de protéines. De plus, la glutamine permet d'alimenter le Cycle de Krebs en α -cetoglutarate et permet le maintien de la balance Redox *via* l'enzyme malique (par la synthèse de pyruvate) et la synthèse du glutathion (un antioxydant cellulaire). L'équipe du Dr Cerione a pu établir le premier lien entre l'activité des Rho GTPases et le métabolisme de la glutamine. En effet, Wong *et al.* ont montré que l'activité de la glutaminase est accrue et est nécessaire à la transformation tumorale par Rac1, Cdc42 et RhoA. De plus, par l'utilisation d'un composant ciblant l'activité de la Glutaminase 1 dans ces cellules, ils purent limiter la croissance et la transformation tumorale. D'une manière intéressante, ils ont pu établir que Rac1, Cdc42 et RhoA semblent agir par un mécanisme similaire sur la Glutaminase 1, qui impliquerait l'activation de Nf- κ B. Cependant, les mécanismes moléculaires restent à préciser, néanmoins cette étude permet d'ouvrir des perspectives thérapeutiques pour le traitement de cancers humains.(91).

II.5 Rac1 contrôle la polymérisation de l'actine.

Le cytosquelette d'actine est un système dynamique qui permet une plasticité morphologique nécessaire à la cellule pour son adaptation à l'environnement et sa migration. Le cytosquelette d'actine est composé d'actine filamenteuse et de protéines associées.

Les Rho GTPases sont les régulateurs majeurs du cytosquelette d'actine. RhoA permet, *via* l'activation de ses effecteurs mDia et ROCK, la formation de fibres de stress et d'Adhérences Focales. En effet, RhoA permet la polymérisation de l'actine filamenteuse en activant mDia (l'orthologue de la protéine diaphanous de *Drosophila melanogaster*), un nucléateur d'actine. mDia possède un domaine qui interagit avec le domaine SH3 de la Profiline *via* son domaine FH1, permettant ainsi l'adjonction des monomères d'actine liés à l'ATP au niveau des filaments d'actine. D'un autre côté, mDia possède aussi un domaine FH2 qui a une activité de nucléation de l'actine, permettant ainsi l'élongation des filaments d'actine (92). RhoA active de plus ROCK, qui phosphoryle et inactive la MLC phosphatase. Il en résulte ainsi une augmentation de la MLC phosphorylée. La MLC phosphorylée s'associe à la

Myosine II pour augmenter la contraction du cytosquelette d'actine et la formation de fibres de stress. De plus, ROCK active la LIM kinase qui va inhiber la Cofiline pour stabiliser l'actine filamenteuse (93).

Rac1 promeut la polymérisation de l'actine corticale. Rac1 va activer la protéine WAVE/SCAR, qui va recruter les complexes de nucléation de l'actine ARP2/3 et va promouvoir la polymérisation de l'actine d'une manière branchée à partir des filaments existants et favoriser la formation de lamellipodes ou de membranes ondulantes (94, 95). Rac1 d'un autre côté promeut l'inactivation de la MLCK, diminuant ainsi la phosphorylation de la MLC et la contraction dépendante de la Myosine. Cela conduit à une diminution de l'assemblage des filaments d'actine en fibres de stress . De plus Rac1 par son effecteur PAK, active LIMK qui inhibe par phosphorylation la coffiline, promouvant ainsi la stabilisation des filaments d'actine (96). La polymérisation de l'actine corticale par Rac1 permet l'assemblage de structures d'adhérence naissantes en complexes Focaux dynamiques ainsi que la mise en place des jonctions intercellulaires. La polymérisation peut se faire d'une manière polarisée et permettre un front de migration en réponse à un chimio-attractant.

B) HECT Domain And Ankyrin Repeat Containing E3 Ubiquitin Protein Ligase 1 (HACE1).

Nous avons identifié HACE1 comme une E3 ubiquitine ligase de Rac1 capable de réguler les niveaux de Rac1-GTP dans les cellules. Etant donné que Rac1, par le contrôle des nombreux processus cellulaires décrits en **A**, est considérée comme une protéine pro-oncogénique contribuant à la croissance et à l'invasion des tumeurs (Figure 9), il est apparu important de bien comprendre le rôle de Rac1 dans la suppression de tumeurs médiée par HACE1.

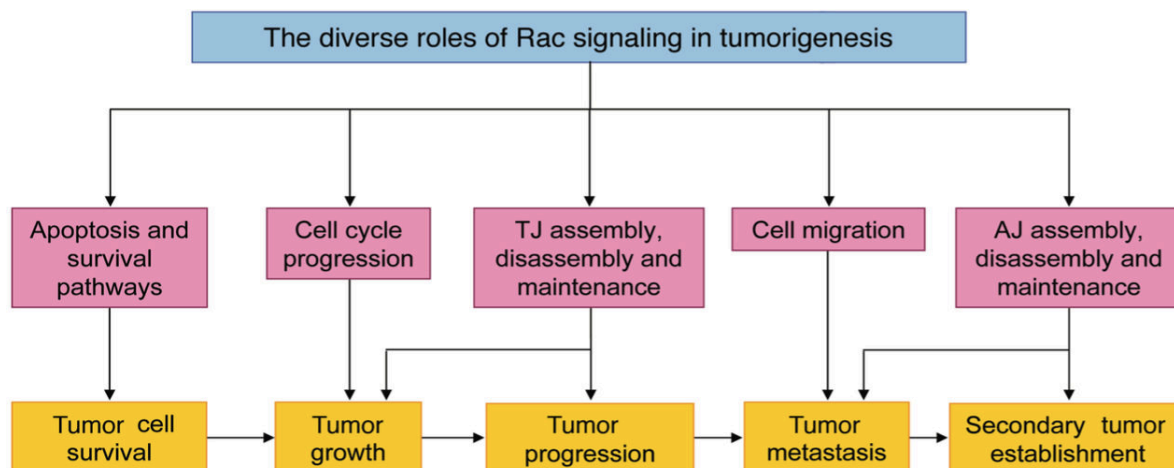


Figure 9 Les rôles de Rac1 dans la tumorigénèse d'après (97). Rac1 est un gène essentiel impliqué dans l'adhérence cellulaire, la migration, la prolifération et la survie cellulaire. La dérégulation de l'activité de Rac1 est impliquée dans la croissance tumorale, la progression tumorale, la métastase et l'établissement de tumeurs secondaires.

I. L'ubiquitination

I.1 L'ubiquitylation

L'ubiquitylation est une modification post-traductionnelle des protéines. Elle consiste en l'addition d'ubiquitine (mono-ubiquitine ou chaînes de poly-ubiquitines) par liaison covalente à une lysine de la protéine d'intérêt. L'ubiquitine est une protéine ubiquitaire chez les eucaryotes qui est constituée de 76 acides aminés. Elle comporte 7 lysines (K6, K11, K27, K29, K33, K48 et K63) pouvant former des chaînes poly-ubiquitines. Les chaînes poly-ubiquitines se forment par des liaisons covalentes entre les lysines de même position sur les ubiquitines (nommées chaînes K48, K63...). L'ajout aux protéines cibles de différentes chaînes d'ubiquitine a des conséquences diverses sur le devenir de ces protéines (cf paragraphe 1-2). De plus, la Leucine 8, l'Isoleucine 44 et la Valine 70 (L8-I44-V70) forment à la surface de l'Ubiquitine une zone hydrophobe qui permet l'interaction entre les ubiquitines et la liaison aux protéines portant des domaines de liaison à l'ubiquitine UBD (Ubiquitin Binding Domain) (98).

L'ubiquitination est une cascade de réactions impliquant une enzyme ubiquitine ligase de type E1, différentes enzymes de transfert de type E2 qui s'associent différemment à plusieurs types d'enzymes E3 pour un transfert direct ou indirect de l'ubiquitine sur la protéine cible. Ainsi, l'enzyme E1 va activer l'ubiquitine en présence d'ATP en catalysant l'adénylation de sa région C-terminale. L'adénylation de l'ubiquitine permet la mise en place d'une liaison thiol-ester entre la cystéine de la E1 et la glycine 76 de l'ubiquitine. La E1 transfère l'ubiquitine à la E2 par transthiolation. La E3 permet

ensuite la spécificité de substrat et le mécanisme de transfert de l'ubiquitine de la E2 au substrat peut se faire directement (dans le cas des E3 de type RING) ou indirectement (*via* les E3 ubiquitines ligases à domaine HECT). Les E3 ligases catalysent la formation d'une liaison amide entre le groupement COOH de la glycine C-terminale de l'ubiquitine et le groupement amine d'une lysine du substrat, formant ainsi une liaison iso-peptidique covalente (voir Figure 10). (99) (100, 101)

1.2 Les différents types de chaînes d'ubiquitines

Il existe différents types de chaînes d'ubiquitine, qui engendrent des conséquences différentes sur les substrats auxquelles elles sont liées.

Les protéines peuvent être monoubiquitylées, multi-ubiquitylées ou poly-ubiquitylées. La mono-ubiquitination contribue à l'endocytose des récepteurs membranaires, à la réparation de l'ADN et au contrôle de la transcription. La multi-ubiquitination contribue entre autre à l'endocytose de protéines membranaires, comme celle du récepteur à l'EGF par exemple. La poly-ubiquitylation de type K63 régulerait notamment la réparation de l'ADN, l'endocytose, la formation de macro-complexes protéiques et l'expression génique (102). Les chaînes d'ubiquitine de type K63 régulent par exemple l'activation de Nf- κ B dans la réponse inflammatoire. En effet, l'ubiquitylation K63 de NEMO par TRAF6 conduit à l'activation de TAK1 (TGFKinase 1), amenant à la phosphorylation d'IKK puis I κ -B α pour le relargage et translocation de Nf- κ B vers le noyau et finalement la transcription de cytokines et chimiokines. (103) (104) La poly-ubiquitylation de type K48 régule quant-à elle la dégradation spécifique des protéines.

1.3 La voie Ubiquitine-Protéasome

L'enchaînement d'ubiquitines de type K48 envoie les protéines au protéasome pour être dégradées d'une manière dépendante de l'ATP. Le protéasome 26S est un complexe multimérique formant une partie centrale cylindrique 20S nommée CP (« Core Particle ») qui est bordée par deux complexes 19S nommés RP (« Regulatory Particles »). Le complexe 20S est composé de 2 anneaux de 7 protéines alpha bordant 2 anneaux de 7 protéines beta. Le complexe 20S est le domaine protéolytique permettant la dégradation des protéines ubiquitylées. Le complexe 19S permet la reconnaissance des protéines ubiquitylées ainsi que la dénaturation de celles-ci. Le complexe 19S permet aussi l'ouverture de l'anneau α du complexe 20S, permettant aux chaînes polypeptidiques

de s'y insérer pour y être dégradées. Le complexe 19S permet également le maintien des niveaux cytosoliques d'ubiquitine, en permettant un recyclage des molécules d'ubiquitine à partir des chaînes d'ubiquitines.

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 (105–107)

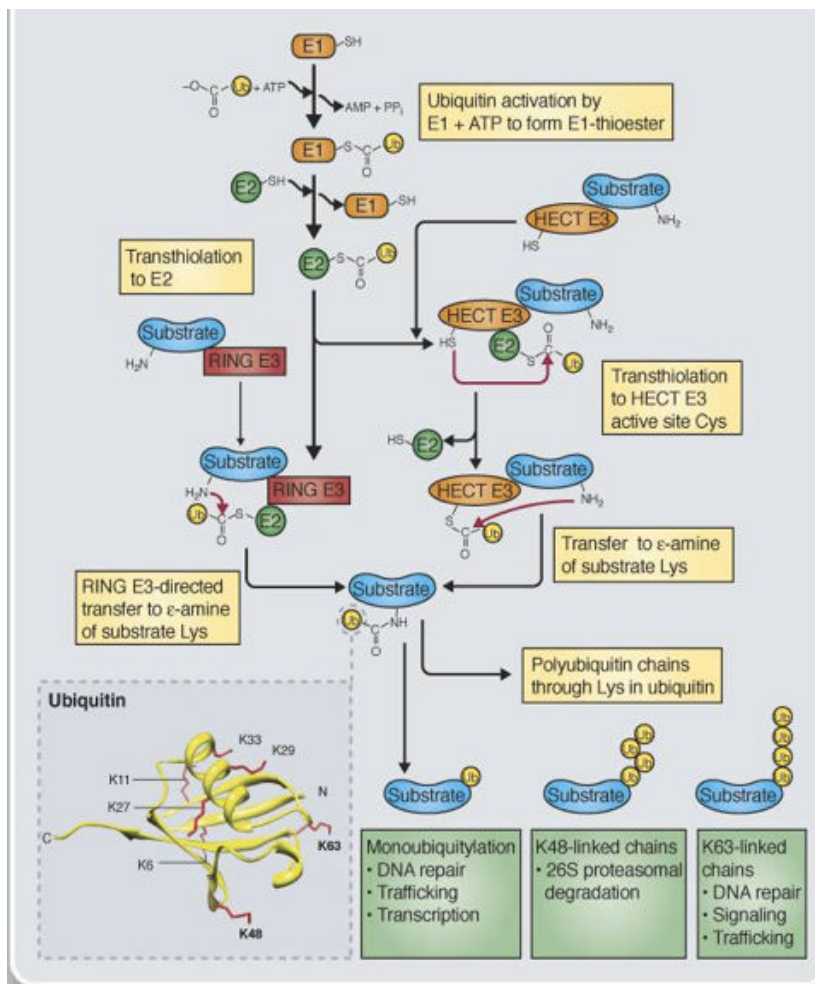


Figure 10 La voie ubiquitine-protéasome d'après (101). L'ubiquitylation est une cascade enzymatique impliquant 3 protéines les E1, E2 et E3. La E1 permet l'activation de l'ubiquitine et la formation d'une liaison thiol ester entre l'ubiquitine et la cystéine de la E1. L'ubiquitine est ensuite transférée à la E2 par une liaison thiol Ester avec la cystéine. Le transfert de l'ubiquitine de la E2 aux substrats se fait soit directement à travers les E3 ubiquitines Ring qui reconnaissent le substrat, soit par le transfert de l'ubiquitine à la E3 de la famille HECT qui transfère ensuite l'ubiquitine au substrat. L'ubiquitylation du substrat est une liaison covalente.

1.4 Les E3 ubiquitine ligases

Les E3 ubiquitine ligases confèrent la spécificité de l'ubiquitylation à un substrat particulier. Il existe deux grandes familles majeures de E3 ubiquitine Ligases : la famille HECT et la famille RING.

a) La famille RING : Monomériques et multimériques

Ring1 est la première E3 ubiquitine ligase de type RING identifiée (Really Interesting New Gene) (108). Le motif RING finger permet l'interaction entre protéines grâce à une conformation de type « cross-braced », qui est due à l'espacement entre les histidines et les cystéines. Le RING finger est composé en moyenne de 50 acides aminés. Ce dernier se distingue par un enchaînement de 8 histidines et 8 Cystéines (motif : C-X₂-C-X₉₋₃₉-C-X₁₋₃-H-X₍₂₋₃₎-C-X₂-C-X₄₋₄₈-C-X₂.C ; avec X pouvant être n'importe quel acide-aminé). Les E3 ubiquitine ligases de type RING finger agissent comme des protéines d'échafaudage. Elles interagissent avec des enzymes de type E2 et le substrat à modifier, permettant ainsi les transferts de l'ubiquitine directement de la E2 jusqu'aux substrats. La reconnaissance du substrat se fait *via* d'autres domaines d'interaction. Les E3 RING monomériques se fixent directement aux substrats alors que les E3 RING multimériques font intervenir d'autres protéines (109) (110).(voir figure 10).

Les E3 monomériques de type RING sont aussi appelées U-box. Mdm2 est une U-box monomérique très étudiée qui permet l'ubiquitylation du suppresseur de tumeur P53 et son ciblage au protéasome pour être dégradée. De ce fait, Mdm2 a des propriétés oncogéniques. D'une manière intéressante, l'expression de Mdm2 dépend de P53, se situant ainsi dans une boucle de rétrocontrôle de P53. C-Cbl est une E3 ubiquitine ligase monomérique de type RING qui est aussi très étudiée. En effet C-Cbl contrôle les niveaux de récepteurs tyrosine kinase, contrôlant ainsi la signalisation par les facteurs et hormones de croissance.

Les E3 RING multimériques font intervenir plusieurs sous-unités pour permettre le transfert des molécules d'ubiquitine aux substrats. Les 2 familles APC et CRL (Cullin-RING ubiquitin ligase) en sont des exemples. Ces complexes multimériques font intervenir un core ayant un domaine RING, tels que rbx1 Roc1 pour les CRLs et Apc11 pour les APC, nécessaire à leur activité ubiquitine ligase.

Il existe de nombreuses E3 multimériques impliquées dans le contrôle de la croissance et de la prolifération cellulaire. Par exemple, l'équipe du Dr. Diehl a démontré que le complexe multimérique SCF (FBX4- α B crystallin) contribue à l'ubiquitylation de la forme cytosolique et phosphorylée sur la thréonine 286 de la Cycline D1 pour contrôler l'entrée en phase S des cellules au cours du cycle cellulaire (111). D'un autre côté, le complexe SCF s'associe à la protéine F-box β -TRCP entraînant l'ubiquitylation de protéines telles que la β -caténine et I κ B (112) (113).

Les complexes multimériques APC/C sont constitués d'éléments invariants d'un complexe à l'autres tels que la protéine homologue aux cullines (Apc2) et une protéine de la famille RING (Apc11).

Les complexes APC/C interviennent dans le contrôle du cycle cellulaire en ubiquitylant et dégradant les protéines telles que les Cyclines, la Polo-like kinase1 et Cdk1. (114) (115) (116)

b) La famille HECT

HECT signifie « homologous to E6AP carboxy terminus ». En effet, la protéine E6AP est la première E3 ubiquitin ligase de la famille des HECT décrite. Elle fut identifiée en 1993 par l'équipe du Dr. Howley. Elle promeut l'ubiquitylation et dégradation de p53 en réponse à l'infection par le papillomavirus humain, conférant ainsi des propriétés oncogéniques. Les protéines de la famille HECT sont définies par la présence du domaine HECT homologue au domaine carboxy-terminal de la protéine E6AP (117).

Les E3-ubiquitine ligases à domaine HECT catalysent directement l'ubiquitylation de la protéine cible et cela en recevant de façon transitoire l'ubiquitine (toujours par liaison thiol-ester avec une cystéine dans le domaine HECT) avant de faciliter son transfert vers une lysine du substrat protéique (118). (Figure 10)

Le domaine protéique HECT est constitué de 300 acides aminés situés au niveau C-terminal de la E3 ubiquitine ligase. On peut distinguer deux sous-domaines structurels du domaine HECT, un lobe du côté N-terminal (N-lobe) de la protéine qui permet la liaison à la E2 ubiquitine ligase et le domaine nommé C-lobe du côté C-terminal de la protéine qui contient la cystéine réceptrice de l'ubiquitine. La liaison aux substrats se fait généralement sur d'autres domaines de la protéine. Il existe 28 protéines de la famille HECT parmi elles les protéines de la famille Nedd4 et de la famille HERC (119) (120).

II. HACE1, la E3 ubiquitine ligase de Rac1, est un suppresseur de tumeur

HACE1 est une E3 ubiquitine ligase de type HECT. Nos travaux indiquent que HACE1 est une protéine composée d'un domaine amino-terminal comprenant 7 répétitions ankyrines, suivies d'une zone centrale et d'un domaine HECT du côté C-terminal de la protéine. L'équipe du Dr. Sorensen a pu déterminer en 2004 que chez l'être humain l'extinction de l'expression du gène *hace1*, porté par le chromosome 6q21, est associée à des formes sporadiques de tumeurs de Wilm's (un cancer du rein chez l'enfant). Son équipe a déterminé que cette extinction est due à une hyperméthylation de la zone promotrice de *hace1*. Le Dr Sorensen a également identifié la E2 majeure permettant l'auto-ubiquitylation de HACE1, la E2 UbcH7. D'une manière intéressante, ils ont observé une accumulation

des protéines HACE1 aux niveaux du réticulum endoplasmique, spéculant ainsi sur un rôle éventuel de HACE1 dans le processus ERAD (ER-associated protein degradation) qui est un système permettant d'éliminer les protéines ayant un repliement défectueux (121).

L'équipe du Dr Sorensen, en collaboration avec l'équipe du Dr Penninger, a confirmé que les niveaux d'ARNm de HACE1 étaient réduits dans une multitude d'échantillons de tumeurs humaines rénales, mais aussi dans des cancers du sein, des tumeurs thyroïdiennes et hépatiques. De plus, la génération de souris génétiquement invalidées (Knock Out) dans le gène *hace1* a permis de démontrer que celles-ci développaient des tumeurs spontanées des tissus provenant des 3 feuillets 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 atteignent 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 Wt. 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. Ces équipes de recherche ont montré que 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. HACE1 contrôle la croissance des cellules en régulant les niveaux protéiques de la Cycline D1, sans que celle-ci ne soit une cible de son activité E3 ubiquitine ligase (122). Ces travaux montrent donc une activité avérée de suppresseur de tumeur, cependant, aucune cible directe de HACE1 ne fut identifiée. En 2011, notre équipe a pu identifier Rac1-GTP comme la première cible de l'activité E3 ubiquitine ligase de HACE1 (24). L'équipe du Dr Malliri a ensuite confirmé les résultats de notre équipe en démontrant que HACE1 régule la migration en réponse au HGF et cela au travers de l'ubiquitylation de Rac1 sur la Lysine K147 (25). De plus, Goka *et al.* ont aussi démontré que HACE1 est un suppresseur de tumeur limitant la progression de carcinomes mammaires ductaux en carcinome invasifs. Dans ce modèle, HACE1 régule les niveaux de Rac1-GTP dans des cellules épithéliales mammaires ayant une amplification du gène HER2/neu, codant pour le récepteur à l'EGF Erbb2 (123).

III. *hace1* est un gène essentiel à la réponse cellulaire aux stress.

III.1 *HACE1* contrôle la production d'Espèces Actives de l'Oxygène

Depuis la découverte du rôle de HACE1 comme suppresseur de tumeurs, les mécanismes moléculaires précis par lesquels HACE1 intervient dans l'homéostasie cellulaire restent à élucider. Notre équipe a démontré en collaborant avec l'équipe du Docteur Sorensen un rôle de HACE1 dans le contrôle de la production d'Espèces Actives de l'Oxygène (EAOs) par la NADPH oxydase Rac1 dépendante (26). En effet, la perte d'expression d'*hace1* conduit à une augmentation drastique de la quantité d'EAOs dans le poisson zèbre ainsi que dans les cellules en culture de mammifères. La perte de *hace1* augmente les niveaux cellulaires de Rac1 et l'activation de la NADPH oxydase contenant la sous-unité Nox1. L'élévation des EAOs induit l'activation transcriptionnelle de la Cycline D1, augmentant ainsi l'entrée des cellules en phase S du cycle cellulaire. Cela conduit aussi à une réponse au stress génotoxique médiée par ATM et p53 (26).

La perte d'expression d'*hace1* provoque aussi une dépendance des cellules cancéreuses à la glutamine. La carence de Glutamine (Gln) produit une mortalité des cellules KO *hace1* et une augmentation du métabolisme de la Gln en vue de réduire les EAOs et d'éviter la mort cellulaire. La Gln contribue à la survie des cellules cancéreuses de plusieurs manières. Elle est déamidée dans les mitochondries en Glutamate qui est alors catabolisé dans le Cycle de Krebs pour la production d'ATP. De plus, une part importante de la Gln intégrée dans le Cycle de Krebs est séquestrée sous forme de Malate, qui *via* l'enzyme malique (« Malic Enzyme », ME-1) va permettre de produire du pyruvate et la resynthèse de NADPH pour assurer un équilibre Redox. Une partie du glutamate est aussi directement métabolisée en Gluthation (GSH), un antioxydant cellulaire (124). Ces études proposent que HACE1, par le contrôle des EAOs, agit sur deux mécanismes cellulaires pouvant amener à une transformation tumorale : 1) HACE1 réduit directement les dommages à l'ADN dû aux radicaux libres et 2) HACE1 contrôle la transcription de la Cycline D1 *via* son contrôle sur la production des EAOs. Ainsi, HACE1 limite l'hyper-prolifération cellulaire et l'apparition de mutations spontanées engendrée lors de la réplication de l'ADN (Figure 11). Ces travaux ont permis d'identifier le premier suppresseur de tumeurs qui contrôle directement la production d'EAOs.

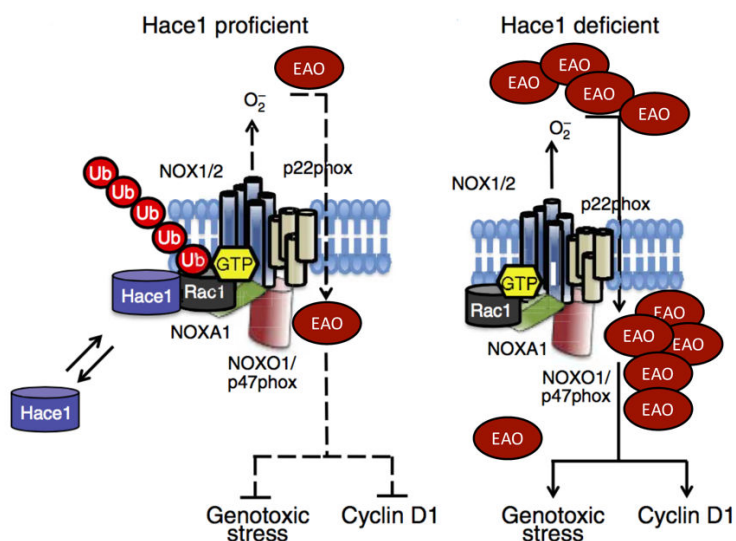


Figure 11 HACE1 contrôle la production d'Espèces Actives de l'Oxygène (EAOs) via Rac1 et la NADPH oxydase d'après (26). La forme active Rac1-GTP se lie aux sous-unités NOX1/2 du macro-complexe NADPH oxydase, promouvant la formation d'EAOs. Les EAOs vont agir comme messagers secondaires, promouvant l'expression de la Cycline D1 ainsi qu'un stress génotypique. HACE1 se lie aux macro-complexe NADPH oxydase, ubiquitylant Rac1-GTP et sa dégradation au niveau du proteasome limitant ainsi l'activation de la NADPH oxydase.

III.2 HACE1 contrôle la réponse cellulaire au stress oxydatif

Des études complémentaires effectuées par l'équipe du Dr Sorensen ont permis d'identifier un rôle de HACE1 dans la réponse cellulaire au stress dans un modèle de souris portant une mutation de la Huntingtine, et cela indépendamment du contrôle de Rac1 (125). Cette protéine d'échafaudage est impliquée, entre autres, dans l'élimination des protéines qui s'agrègent dans le cytosol. Elle est mutée dans des maladies neurodégénératives, telles que la maladie de Parkinson et Huntington. Les cellules présentant ces mutations ont un niveau de stress oxydant élevé et un niveau d'agrégats protéiques supérieur aux cellules contrôles. Dans cette étude, Rotblat *et al.* montrent aussi que l'expression de *hace1* est induite en réponse au stress oxydant, notamment en réponse à la mutation Q111 de la Huntingtine. Dans ce modèle de neurodégénération, HACE1 contrôle la traduction, la stabilité et la localisation nucléaire de NRF2 / KEAP1 (Nuclear factor erythroid 2-related factor 2), un régulateur essentiel de la réponse au stress qui contrôle la transcription de gènes de détoxication.

HACE1 joue aussi un rôle dans la réponse au stress cardiaque. Zhang *et al.* ont montré que HACE1 collabore avec le récepteur sélectif d'autophagie P62/SQSTM1 intervenant dans la dégradation de protéines ubiquitylées en réponse à une constriction de l'aorte cardiaque (TAC). En effet, les souris KO pour *hace1* présentent une accumulation de protéines ubiquitylées et une diminution du flux autophagique, lorsque les souris subissent une TAC. D'une manière intéressante,

ce processus semble être indépendant de son activité ubiquitine ligase, mais dépendant du domaine ANK (ankyrine) de HACE1 (126).

Enfin, une étude publiée par l'équipe du Dr Hu a établi un rôle de 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 de HACE1 et de façon remarquable, 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. Par la suite, la perte de l'axe HACE1/OPTN provoque une accumulation de protéines carbonylées conduisant à la transformation tumorale de cellules pulmonaires (Figure 12). Cette étude, démontre un nouveau rôle de l'Optineurine dans la suppression tumorale et ce en synergie avec HACE1 (127). Ces travaux, qui sont en lien direct avec mon sujet de thèse, sont discutés d'une manière détaillée dans la discussion de la partie Résultats de mon manuscrit.

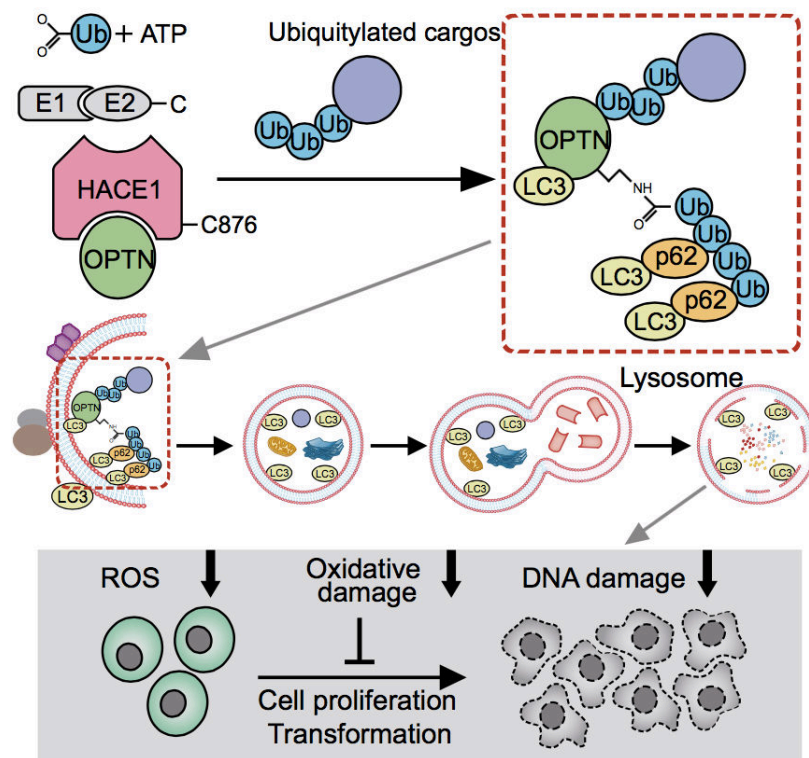


Figure 12 OPTN et HACE1 agissent en synergie pour limiter le stress oxydant dans les cellules humaines d'après (127). L'ubiquitylation d'OPTN par HACE1 renforce l'interaction d'OPTN avec SQSTM1, promouvant ainsi le ciblage de protéines carbonylées aux autophagolysosomes, pour limiter le stress oxydatif et la transformation tumorale.

C. La Mécano-transduction

La mécano-transduction est la conversion de paramètres mécaniques en cascades de signalisation intracellulaire, engendrant ainsi une réponse cellulaire. Ce phénomène est nécessaire à l'homéostasie cellulaire et tissulaire, en permettant d'adapter les réponses cellulaires aux modifications qui surviennent à la matrice extracellulaire (MEC).

La transduction des signaux se fait notamment au niveau des structures d'adhérences cellulaires des types cellule-cellule et cellule-matrice extracellulaire. Les structures d'adhérence sont composées de récepteurs transmembranaires, les intégrines, et de leurs partenaires cytosoliques. Les intégrines sont les principaux récepteurs dans la perception de la tension matricielle.

I. L'adhérence cellulaire à la matrice extracellulaire

I.1 Les intégrines : structure et spécificité d'interaction aux ligands

Les intégrines sont des récepteurs transmembranaires qui se présentent sous forme d'hétérodimères composés d'une sous-unité α et d'une sous-unité β . Les intégrines présentent un domaine extracellulaire du côté N-terminal, représentant la majorité de la molécule, un domaine transmembranaire et un domaine intracellulaire court en C-terminal (128). Ce sont des récepteurs des protéines composant la matrice extracellulaire, telles que le collagène, la fibronectine, la vitronectine et la laminine. La liaison des intégrines à leurs substrats active des voies de signalisation en aval, impliquées dans de nombreux processus cellulaires tels que la migration, la prolifération, la différenciation et l'inflammation. De par leur liaison au cytosquelette d'actine, les intégrines perçoivent et transduisent la perception de signaux de tension du tissu et de la matrice extracellulaire en contractilité acto-myosine pour équilibrer les forces. Ceci s'accompagne aussi de changements dans le recrutement de protéines vers les intégrines, notamment des protéines contrôlant l'activation et l'affinité des intégrines pour leurs ligands. C'est pour cela qu'une caractéristique de la signalisation médiée par les intégrines est son caractère bi-directionnel « outside-in » et « inside-out ». Il existe 18 sous-unités α décrites et 8 sous-unités β , qui peuvent former 24 hétérodimères différents. Certains de ces différents hétérodimères peuvent avoir plusieurs substrats et un même substrat peut être reconnu par plusieurs hétérodimères différents, ce qui peut générer dans les

cellules une diversité de réponse à un même substrat. Cependant, on peut classer le partenariat Intégrines-Ligands en 4 catégories distinctes en fonction des domaines conservés se retrouvant dans leurs ligands ou dans la structure du domaine extra-cellulaire des intégrines. On distingue les intégrines liant des molécules à domaines RGD (comme la Fibronectine et la vitronectine), comprenant les 5 intégrines αV , $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 8\beta 1$ et $\alpha II\beta 3$, des intégrines liant les motifs LDV (se retrouvant par exemple dans VCAM-1 et la fibronectine) comportent $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 4\beta 7$, $\alpha 9\beta 1$, les 4 membres de la familles $\beta 2$ et $\alpha E\beta 7$ et des intégrines contenant les domaines extracellulaires « A-domain » dans leur sous-unité alpha, comportant les intégrines $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 10$ et $\alpha 11$ en dimère avec la sous-unité $\beta 1$ et qui lient des collagènes et laminines. Enfin, on distingue les intégrines liant les laminines nommées les « Non- α A-domain-containing laminin binding intégrins » comprenant les $\alpha 3$ $\alpha 6$ $\alpha 7$ dimérisées à $\beta 1$ et $\alpha 6\beta 4$ (129).

Les intégrines ont plusieurs niveaux d'affinité pour leurs ligands grâce à leur capacité à changer de conformation tridimensionnelle. Les intégrines ayant une faible affinité au ligand, se retrouvent sous une forme pliée et étroitement liée par un pont salin entre leurs domaines extracellulaires. Les intégrines une fois activées, se retrouvent sous forme dépliées à forte affinité au ligand, avec un espacement qui se produit entre les domaines cytosoliques et transmembranaires de chaque sous-unités α et β , permettant ainsi le recrutement de protéines de signalisation et la liaison au cytosquelette d'actine (130) (131) (132) (Figure 13). Le dépliement des hétérodimères peut être promu par la liaison aux ligands ou par l'interaction du domaine cytosolique des intégrines aux protéines taline et kindline, provoquant la destruction du pont salin entre les domaines extracellulaires et le dépliement des intégrines (133) (134).

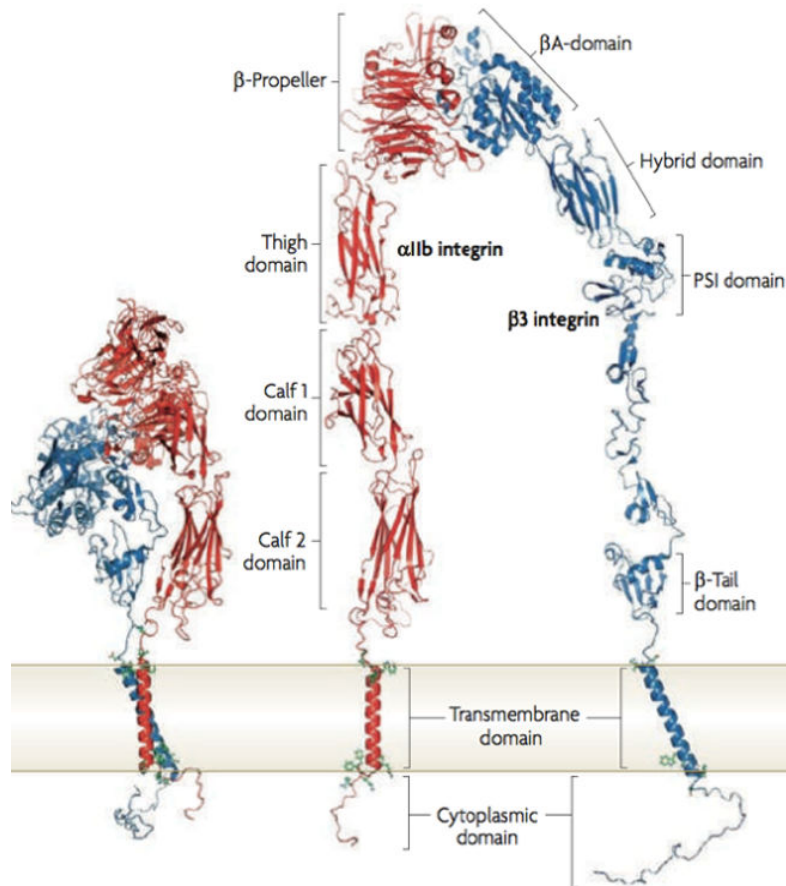


Figure 13 Représentation des structures inactives fermées (gauche) et ouvertes des hétérodimères d'Intégrines $\alpha 2 \beta 3$ d'après (132). Les Intégrines sont composées d'un domaine cytosolique court, d'un domaine transmembranaire et d'un large domaine extracellulaire. Les Intégrines, une fois en liaison avec le substrat, se retrouvent sous une forme ouverte, renforçant l'interaction avec leurs partenaires cytosoliques.

1.2 Les composants cytosoliques de l'adhérence.

a) Les composants de signalisation

Suite à la liaison des intégrines à leur ligand, un grand nombre de partenaires cytosoliques sont recrutés pour faire le lien avec le cytosquelette d'actine et déclencher diverses voies de signalisations en aval. La Kinase Focal Adhesion (FAK) fut parmi les premières molécules de signalisation identifiées dans les structures d'adhérence. FAK contient un domaine FERM, un domaine kinase central et un domaine C-terminal FAT (Focal Adhesion Targeting Domain). L'activation de FAK par les intégrines conduit à son auto-phosphorylation sur le site Y397, démasquant une zone d'interaction avec des protéines à domaine SH2 (Src homology domain). Il en résulte le recrutement des kinases de la famille Src (SFKs) et leur activation par ouverture conformationnelle. Les SFKs opèrent ensuite une auto-phosphorylation sur leur tyrosine 416. FAK,

en coopérant avec les kinases de la famille Src (SFKs), permet l'activation de nombreuses voies de signalisation en aval ainsi que le renforcement de sa propre activité kinase. Pour ceci, Src phosphoryle FAK sur les sites Y576 et Y577 et au niveau du domaine C-terminal (Y861 et Y925)(135). Il a été montré que l'axe FAK-Src phosphoryle p130Cas et la Paxilline afin de promouvoir plusieurs étapes de signalisation. En effet, P-p130Cas recrute *via* CRK un complexe composé de Dock180 et ELMO1, qui possède une activité GEF non conventionnelle sur Rac1 afin de promouvoir son activation (136). Par ailleurs, la phosphorylation de Paxilline sur Y118 permet le renforcement du recrutement de la Vinculine dans la structure d'adhérence (137). D'autre part Src va permettre durant les étapes précoces d'adhérence puis d'étalement cellulaire une inhibition de RhoA en recrutant par phosphorylation p190-RhoGAP (138) (139).

De plus, les SFKs peuvent interagir directement avec les intégrines pour réguler l'activité des Rho GTPases. Par exemple, il a été montré dans les cellules hématopoïétiques, que l'interaction de Src avec l'intégrine $\beta 3$ provoque la libération de Csk et l'activation de Src. Celle-ci va phosphoryler SYK, qui va à son tour phosphoryler VAV1, une GEF de Rac1 (140). Src peut activer TIAM1 et VAV2 pour promouvoir l'activation de Rac1 (141) (142) (143). Src peut aussi promouvoir l'activation des récepteurs tyrosine kinase (RTKs) aux facteurs de croissance lorsqu'ils sont recrutés dans l'adhérence focale. En effet, il a été observé que Src peut phosphoryler le récepteur à l'EGF (EGFR) indépendamment de la présence du ligand (144). Cela conduit par la suite à l'activation de la PI3K qui activera de nombreuses voies de signalisation mitogènes, dont l'activité GEF de VAV2 sur Rac1 (145). Une autre protéine de signalisation des adhérences focales est la ILK (pour Integrin Linked Kinase). La partie N-terminale d'ILK lie les protéines PINCH1 et PINCH2 *via* ses domaines Ankyrines. De son côté C-terminal, ILK lie les protéines Parvine α , β et σ . Bien que le(s) rôle(s) exact(s) de l'ILK, et notamment en rapport avec son activité kinase, restent à élucider dans l'adhérence cellulaire, cette protéine est conservée dans l'évolution (retrouvée chez les invertébrés) et semble nécessaire à la mise en place des différentes voies de signalisation en aval des intégrines. Elle y joue un rôle en tant que protéine d'échafaudage permettant, *via* la Parvine, une interface d'interaction avec les filaments d'actine. Par ailleurs, le complexe ILK-PINCH-PARVIN contrôle aussi les événements de recyclage des intégrines en fonction des propriétés mécaniques de la MEC (146) (147) (148).

b) Les composants cytosoliques liant les intégrines au cytosquelette d'actine

Les intégrines peuvent se lier au cytosquelette d'actine *via* de nombreuses protéines adaptatrices et notamment *via* la Taline. Cette liaison est nécessaire pour l'activation des intégrines et leur liaison aux molécules de la matrice extracellulaire (149) (134). En effet, la partie amino-terminale de la Taline contient un domaine FERM (150) qui permet de lier les intégrines, des phospholipides et FAK. Le domaine FERM est composé de 3 principaux domaines, les domaines F1, F2 et F3 formant une structure en trèfle. Le domaine F3 permet l'interaction avec la partie cytosolique de la sous-unité β des intégrines (151). La présence de phosphatidylinositol-(4,5) bisphosphate, *via* des interactions électrostatiques, renforce l'interaction de la Taline aux intégrines. Du côté carboxy-terminal, la Taline contient une zone riche en hélices α permettant sa dimérisation, l'interaction avec l'actine filamenteuse, ainsi qu'une zone d'interaction avec RIAM et la Vinculine. Un des modèles le plus étudié concerne la régulation des intégrines $\alpha 2\beta 3$ pour l'activation des plaquettes. Dans ce modèle la PKC active Rap1 qui recrute et permet l'interaction de RIAM avec la Taline pour relâcher sa conformation auto-inhibée et permettre de lier l'intégrine et induire une signalisation outside-in stimulant l'affinité des intégrines pour leur substrat (152). La Taline subit des régulations mécano-dépendantes qui seront évoquées dans le paragraphe 5-1.

La Vinculine est une protéine importante, qui n'interagit pas directement avec les intégrines, mais avec la Taline, la Paxilline, VASP et ARP2/3. La Vinculine est importante pour la maturation des structures d'adhérence en renforçant l'interaction avec l'actine (153). De ce fait la perte de la Vinculine altère le renouvellement des adhérences et une migration normale des cellules. La Vinculine se retrouve sous forme auto-inhibée cependant les mécanismes d'activation ne sont pas complètement décrits mais semblent faire intervenir Arp2/3 (154) et la Taline. En effet, suite à l'activation des intégrines par leurs ligands, la Taline subit un changement conformationnelle et se lie au cytosquelette d'actine. La Taline ensuite recrute et permet le changement conformationnelle de la vinculine pour l'activer (155) (156) (157).

L' α -Actinine est une protéine qui lie l'actine et qui appartient à la superfamille des spectrines. L' α -Actinine contient un domaine ABD liant l'actine et forme des dimères anti-parallèles connectant les filaments d'actine (158). Elle permet de stabiliser le regroupement des filaments d'actine en câbles. L' α -Actinine localise aux adhérences focales *via* son interaction avec la Vinculine et contribue au lien entre le cytosquelette et l'adhérence cellulaire, ce qui est nécessaire à la stabilisation des adhérences focales (159).

1.3 La maturation des structures d'adhérence : un rôle crucial des Rho GTPases.

L'adhérence cellulaire est un système dynamique qui met en jeu un constant assemblage et désassemblage des adhérences permettant non seulement aux cellules de migrer mais aussi de s'adapter à leur environnement. Ce système dynamique fait intervenir le cytosquelette d'actine, des protéines de transport intracellulaire, ainsi que les différentes protéines reliant le cytosquelette d'actine aux intégrines. Dans cette partie, nous allons décrire les différentes étapes de formation et de maturation des structures d'adhérence.

a) Les complexes focaux

Lors des étapes précoces d'adhérence, les cellules forment des lamellipodes suite à l'activation de Rac1. Dans ces lamellipodes, la polymérisation de l'actine branchée permet le rassemblement des intégrines en micro-complexes nommés adhérences naissantes. Ces structures sont dynamiques avec une demi-vie très courte et mûrent en complexes focaux (FC) grâce la formation des fibres de stress qui permettent de ralentir la dissociation des adhérences naissantes et constituent un substrat propice à la concentration des protéines cytosoliques décrites plus haut. La formation des FC est enrichie dans les lamellipodes situés dans le front de migration, permettant l'orientation de la migration cellulaire (160)(Figure 14).

b) Les adhérences focales

Les adhérences Focales (FA) sont des macro-complexes enrichis en intégrines complexées à leur partenaires cytosoliques, telles que les protéines de structure comme la Taline, la Vinculine l' α -Actinine ou la Zyxine, les protéines de signalisations FAK et les kinases de la famille Src ainsi que des régulateurs GEFs et GAPs des GTPases Rho. (161). La formation des FA nécessite la fasciculation et l'activité contractile de fibres de stress par l'intermédiaire de l'activation de RhoA et de ses effecteurs comme ROCK. Les FA sont beaucoup moins dynamiques que les FC et ont une affinité pour leurs ligands extracellulaires qui est augmentée. De ce fait, les FA permettent *via* le lien avec le cytosquelette d'actine, d'équilibrer la contractilité acto-myosique avec la tension matricielle du milieu extracellulaire (162). Les Adhérences focales peuvent aussi mûrir en structures d'adhérence fibrillaires, qui ont une demi-vie beaucoup plus longue et sont localisées dans les zones centrales des cellules. Les adhérences fibrillaires sont induites par la Fibronectine et sont caractérisées par un

enrichissement de protéines, telles que la Tensine et une diminution des niveaux de Vinculine et Paxilline ou α -Actinine (163) (Figure 14).

c) Les podosomes et invadopodes

Les podosomes et les invadopodes sont des protrusions cellulaires circulaires riches en actine avec une structure définie et perpendiculaire au substrat matriciel. Les podosomes et invadopodes rassemblent une haute concentration de protéases, telles que les Métalloprotéases, les Cathépsines et des Sérines protéases. La fonction des invadopodes et des podosomes serait de coordonner la mobilité cellulaire à la dégradation de la MEC, facilitant le mouvement cellulaire. Pour cela les podosomes se retrouvent souvent dans les cellules impliquées dans le remaniement cellulaire, telles que les cellules qui dérivent des monocytes, les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses, alors que les invadopodes se retrouvent plutôt dans les cellules cancéreuses (164).

Il existe une densification de l'actine dans la zone centrale du podosome et de l'invadopode et la présence d'ARP2/3, N-WASP et WIP sont communs aux podosomes et invadopodes. Cependant, les podosomes sont caractérisés par la présence d'une structure d'adhérence circulaire riche en Taline et Vinculine (165). Les invadopodes peuvent s'organiser en macro-structures appelées les rosettes, qui sont impliquées dans le remodelage enzymatique de la matrice extracellulaire (166) (164) (Figure 14).

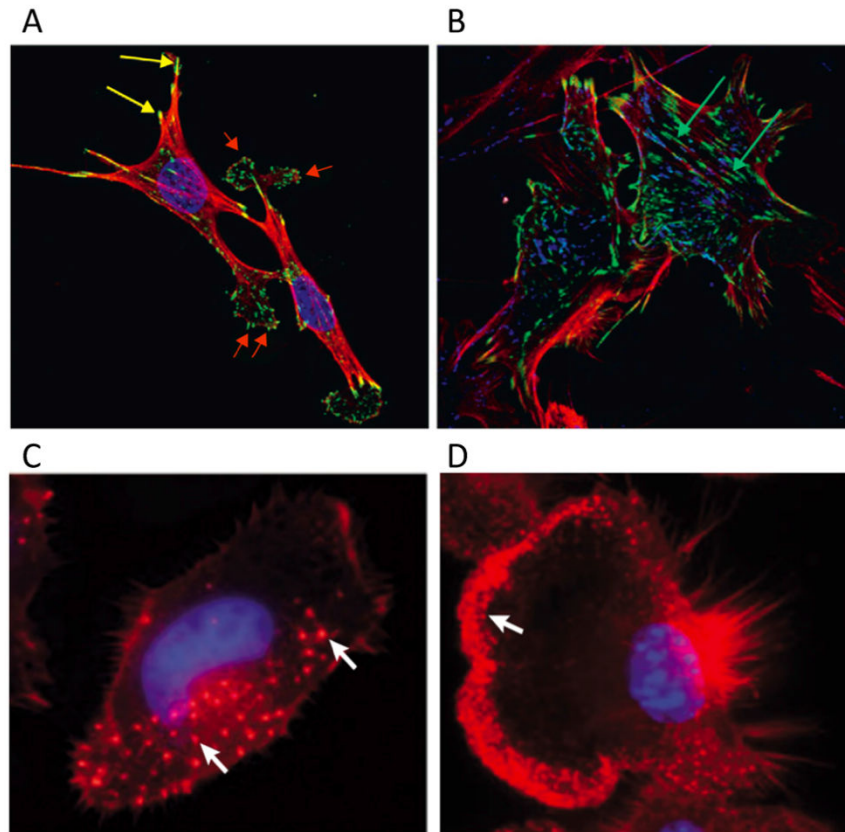


Figure 14 Les différents types de structures d'Adhérences. A) Les complexes focaux sont indiqués par des flèches rouges, les adhérences focales par des flèches jaunes. L'actine est marquée avec de la phalloïdine TRITC (rouge) et les phosphotyrosines avec un Anticorps couplé au FITC (vert) B) Les Adhérences fibrillaires sont marquées avec des flèches vertes. L'actine est marquée avec de la phalloïdine TRITC (rouge) et la tensine avec un Anticorps couplé au FITC (vert). C) Les podosomes sont indiqués par une flèche blanche. L'actine est marquée en rouge et l'ADN en bleu. D) Les invadopodes sont indiqués avec une flèche blanche. L'actine marquée par de la phalloïdine TRITC (rouge) et l'ADN avec du DAP (bleu).

1.5 Les mécanosenseurs

Les niveaux de maturation des structures d'adhérence sont régis par la tension exercée par la contraction acto-myosine intracellulaire (médiée par RhoA) et par la rigidité de la matrice extracellulaire. Il existe des protéines spécialisées dans la détection des niveaux de tension et de rigidité, permettant de moduler la maturation des adhérences et l'activation de voies de signalisation en aval des Intégrines.

a) YAP/TAZ

Le complexe protéique YAP/TAZ est considéré aussi comme un Mécanosenseur qui permet de coupler la prolifération cellulaire au changement de la rigidité matricielle. YAP/TAZ a un rôle

activateur de la transcription. En effet, YAP/TAZ transloque depuis le cytosol au noyau. Dans le noyau, YAP/TAZ interagit avec TEADs (orthologue de *sp* chez la drosophile) activant la transcription de gènes codant pour des protéines, telles que CTGF, AREG et le FGF, impliquées dans la prolifération et la morphogénèse cellulaires (167). Plusieurs voies de signalisation convergent dans la régulation de l'activité de YAP/TAZ dont la voie Hippo, et des voies de signalisations activées par les jonctions serrées et adhérentes.

De façon intéressante, la formation de fibres de stress contractiles dans des cellules adhérentes à la matrice extracellulaire provoque l'accumulation de YAP/TAZ dans le noyau, ce qui induit la prolifération des cellules et l'inhibition de leur différenciation amenant ainsi un rôle de YAP/TAZ dans la perception et l'adaptation aux changements de rigidité matricielle (168) (169). De plus, des études ont montré que YAP/TAZ est impliqué dans la signalisation inside-out et le remodelage du cytosquelette d'actine. Par exemple, la rigidité de la matrice extracellulaire promeut l'activation mécanique des CAFs (Cancer Associated Fibroblasts) et entretient leurs propriétés pro-tumorigènes. En réponse à un stimuli mécanique YAP/TAZ transloque dans le noyau et active l'expression de la Myosine IIa et IIb, promouvant la contractilité acto-myosine qui favorise la signalisation inside-out et l'activation mécanique des CAFs(170). Dans ce cas, l'activité de YAP/TAZ dépend de ROCK, de la Myosine et de l'activité de Src en aval des Intégrines. De plus, dans les cellules cancéreuses mammaires l'activation de YAP/TAZ promeut l'expression de la Laminine, ainsi la complexe protéique YAP/TAZ fait partie d'une boucle de régulation positive d'activation des Intégrines et la croissance des cellules cancéreuses (171). Cependant les mécanismes moléculaires précis conduisant à la translocation de YAP/TAZ dans le noyau, en réponse à l'activation des Intégrines et la contractilité acto-myosine restent à élucider. La voie de signalisation Hippo impliquant YAP/TAZ peut en effet être impliquée dans cette mécanotransduction. Elle fut initialement identifiée dans la drosophile comme étant un acteur majeur dans le contrôle de la croissance tissulaire. L'orthologue de Hippo chez les mammifères, Mst1/2, interagit *via* son domaine SARAH avec Sav. Ce complexe phosphoryle LATS1/2 (172, 173) qui inhibe la translocation dans le noyau de YAP/TAZ et la transcription de gènes. En effet, il a été montré que l'activation des Intégrines par leurs substrats, active ILK (Integrine Linked Kinase) qui inhibe Mst1/2, favorisant ainsi la translocation de YAP/TAZ dans le noyau et la prolifération cellulaire. (174)

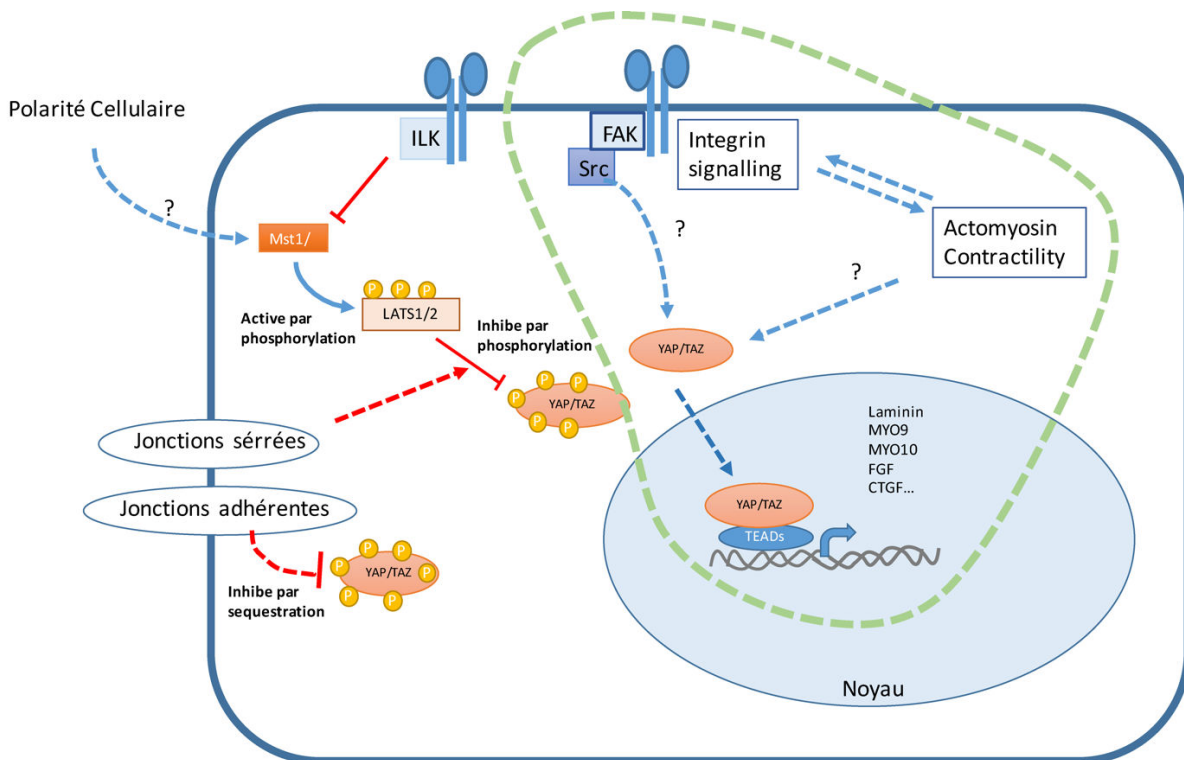


Figure 15 La régulation de la transcription YAP/TAZ dépendante. La voie Hippo, consiste à l'activation de Mst1/2 qui active par phosphorylation LATS1/2. LATS1/2 inhibe par phosphorylation la translocation de YAP/TAZ dans le noyau et la transcription de gènes. Il a été montré que l'activation des voies de signalisation en aval des jonctions serrées et adhérentes inhibe l'activation de la transcription dépendante de YAP/TAZ. En parallèle, YAP/TAZ est considéré comme un mécanosenseur; l'activation des Intégrines et la contraction acto-myosine aboutissent à la translocation de YAP/TAZ dans le noyau, qui en retour active la transcription de gènes impliqués dans la prolifération, la contraction acto-myosine et l'adhérence cellulaire.

b) p130Cas

La protéine p130Cas est considérée comme un mécano-senseur permettant de contrôler les réponses cellulaires en fonction de la rigidité de la matrice extracellulaire. La protéine p130Cas appartient à un groupe de protéines comprenant les protéines EfS/Sin, HEF1/NEDD9 et CASS4. p130CAS contient un domaine SH3 N-terminal qui lie FAK, PYK2 ou la Vinculine (175) (176). Ce domaine est suivi d'une zone riche en tyrosines (15 répétitions YxxP), d'une zone riche en sérines, d'un domaine de liaison à SRC du côté C-terminal (177) et d'un domaine CCH (Cas-family C-terminal homology domain)(178).

La phosphorylation de p130Cas est associée à l'adhérence des cellules et à la formation de fibres de stress contractiles. L'équipe du Dr. Sheetz MP a pu démontrer que p130Cas est un substrat répondant à la rigidité de la MEC et la contractilité acto-myosique. En effet, la tension matricielle et la contractilité acto-myosique provoquent un étirement de p130Cas, démasquant des sites de phosphorylation par les kinases de la famille Src (les sites Y165, Y410) (179). Par la suite phospho-p130Cas par son interaction avec l'axe FAK/Src régule les voies de signalisation en aval des intégrines

pour un contrôle de la migration et la survie cellulaire (180). De plus, l'équipe du Dr. Assoian a montré que p130Cas contrôle les niveaux d'expression de la Cycline D1 par Rac1 pour moduler l'entrée en phase S des cellules et en réponse à une augmentation de la rigidité cellulaire (181). Cette propriété de p130Cas d'être modifiée en fonction d'un stimulus mécanique, permet de définir p130Cas comme un mécano-senseur majeur.

c) Taline

La Taline est un acteur important dans la stabilisation des adhérences focales en fonction de la tension intracellulaire, en lien avec sa capacité de liaison des intégrines et du cytosquelette d'actine. Les Talines changent de conformation en réponse aux forces exercées. En effet les domaines N-terminal et C-terminal de la Taline sont séparés en réponse à une force mécanique, renforçant l'interaction de son domaine FERM aux intégrines et exposant le domaine de liaison à la Vinculine situé du côté carboxy-terminal de la protéine. Le domaine C-terminal de la Taline, riche en hélices α , liant Vinculine et directement le cytosquelette d'actine, est responsable de la mécanotransduction. En effet, la contraction acto-myosique provoque l'étirement de la Taline du côté C-terminal et induit un changement de conformation (182) lui permettant de recruter plus de Vinculine dans l'adhérence. Les forces exercées sur les Talines permettent de stabiliser la conformation ouverte des intégrines et augmentent leur affinité en retour aux molécules de la matrice extracellulaire (183) (184).

d) La Filamine

Les Filamines sont des protéines de haut poids moléculaire, qui connectent les intégrines et l'actine. Les Filamines constituent des homodimères qui se forment *via* leur domaine C-terminal. La Filamine permet de stabiliser l'actine filamenteuse au niveau de la membrane plasmique (185). Elle est composée, du côté N-terminal d'un domaine de liaison à l'actine comprenant deux domaines d'homologie à la Calponine, suivie de 25 répétitions de domaines homologues aux immunoglobulines. En réponse à un stress mécanique et à l'activation des intégrines par leurs ligands, la Filamine subit un changement de conformation qui renforce sa liaison à l'actine filamenteuse au niveau de la membrane plasmique. Cela contribue au maintien de l'intégrité de la cellule en réponse aux changements de la rigidité matricielle en modulant la contractilité acto-myosique (186) (187) (188) (189). En effet, il a été démontré que la Filamine, qui séquestre FILGAP1, est un régulateur de l'activité de Rac1. En réponse au stress mécanique, la Filamine relargue FILGAP1,

qui diminue les niveaux d'activation de Rac1 à la membrane pour promouvoir la formation des câbles d'actine (190) (191).

II. La Matrice extracellulaire : Remaniement et Maladies.

II.1 Les composants majeurs de la Matrice extracellulaire.

La Matrice extracellulaire (MEC) est une structure qui permet le maintien de l'intégrité des organes. Chez les mammifères, la matrice extracellulaire est composée d'environ 300 protéines et polymères différents. La matrice extracellulaire diffère d'un organe à un autre et est mise en place durant l'embryogénèse. Il existe 28 types de collagènes, composés chacun d'homotrimères et d'hétérotrimères de chaînes α . Il existe 40 types de chaînes α pouvant former les trimères. Les collagènes sont composés d'une triple hélice, caractérisée par la répétition des motifs Gly-X-X (192). Le collagène peut être assemblé en fibres, générant un collagène fibrillaire tendu et élastique faisant intervenir plusieurs étapes de maturation par glycosylation (193, 194). Les protéoglycanes sont des composants de la matrice extracellulaire qui se retrouvent en grande abondance dans les cartilages et la MEC neuronale. Les protéoglycanes sont composés d'un centre protéique liant les Glycosaminoglycans (GAGs). Les GAGs sont de longs polymères de disaccharides chargés négativement qui comprennent les protéoglycanes de sulfate d'héparine, les sulfates de chondroïtine, dermatane sulfates, hyaluronane sulfates et les sulfates de kératines (195). Les protéoglycanes et les collagènes sont les composants les plus fréquents dans la matrice extracellulaire. La fibronectine est une glycoprotéine qui est sécrétée et assemblée dans la MEC en forme fibrillaire. Elle est composée de sous-unités regroupant des répétitions d'unités structurales nommées unités de type I, type II et de types III (196, 197). La molécule de Fibronectine forme un dimère *via* un pont disulfure qui se met en place au niveau C-terminal de la protéine. La molécule de fibronectine repliée est ensuite déformée mécaniquement par la liaison avec les intégrines, dévoilant des zones d'interaction avec d'autres molécules de la matrice extracellulaire et des récepteurs cellulaires (198). Il existe enfin des molécules de structure de la MEC qui contribuent plus spécifiquement à la formation de la membrane basale. Parmi elles, les Laminines sont des glycoprotéines composées de chaînes α , β et σ , qui se combinent en une triple hélice coiled-coil pouvant avoir plusieurs formes tridimensionnelles. Il existe 5 chaînes α , 4 chaînes β et 3 chaînes σ décrites pouvant former 16 types de Laminines différentes.

II.2 Le remaniement de la Matrice extracellulaire.

a) Le remaniement enzymatique

i) Les Protéases

La dégradation de la matrice extracellulaire par des protéases est un aspect important pour réguler l'abondance de certaines molécules de la matrice extracellulaire, leur composition et leur structure. Elle permet aussi de rendre des facteurs de croissance solubles accessibles aux cellules. Il existe différentes familles de protéases qui ont une activité sur les molécules de la matrice extracellulaire comme les métalloprotéases (MMPs), les ADAM-lysines comprenant les ADAMs pour « A Disintegrin And Metallo proteases » (199) et les méprines (200). En particulier, les MMPs sont des enzymes majeures dans le remaniement enzymatique de la MEC. Il existe 23 MMPs décrites qui peuvent être soit secrétées sous forme d'enzymes solubles dans la matrice extracellulaire, soit être ancrées à la membrane des cellules. Généralement, elles sont exprimées et/ou secrétées sous forme de zymogènes (ou pro-enzymes) qui sont activés par clivage protéolytique par d'autres MMPs, par des sérine protéases ou par oxydation de groupements thiol. Les métalloprotéases ont rarement une spécificité réduite de substrat, par exemple les MMP1, MMP2, MMP3 MMP7, MMP8, MMP12 et 17 MMP19 reconnaissent toutes le collagène, la Fibronectine et la Laminine (201)

Les ADAM-lysines comprennent les ADAMs et ADAMTS (ADAMs with a thrombospondine motifs). Les ADAMs sont des protéases qui clivent les ecto-domaines de protéines transmembranaires localisées sur les cellules adjacentes, permettant le relargage des domaines extracellulaires de cytokines, de facteurs de croissances et de récepteurs membranaires. Les domaines disintegrin des ADAMs peuvent se lier aux intégrines et le domaine riche en Cystéines interagit avec des protéoglycans. Les ADAM 10, 12 et 15 permettent le clivage de molécules de la matrice extracellulaire, telles que le collagène et la Fibronectine. Les ADAMTS1,4,5,8,9 vont cliver les protéoglycans. Les ADAMTS 2,3 et 14 permettent le remaniement du collagène *via* leurs activités N-propeptidases sur le pro-collagène (199).

Les Méprines sont composées de 2 sous-unités α et β , qui peuvent former des hétérodimères ou homodimères par liaison par un pont disulfure. Les Méprines peuvent cliver des molécules de la matrice extracellulaire, telles que le collagène IV, le Nidogène et la Fibronectine. De plus, les

Méprines sont nécessaires à la maturation du collagène en clivant le pro-collagène I qui sera assemblé en fibres de collagène tendu. (200)

ii) Les protéines LOX.

La rigidité de la matrice extracellulaire dépend de la composition en fibres et de l'organisation de ces polymères. Par exemple, une augmentation de la rigidité matricielle pourra être liée à une augmentation du dépôt de collagène, mais dépend aussi de la réticulation des fibres de collagène. L'enzyme majeure qui permet la réticulation et l'organisation des fibres de collagènes (et d'élastine) est la Lysyl-oxydase (LOX) ainsi que les enzymes LOX-like. Les lysyl-oxydases sont des amine-oxydases dépendantes du cuivre qui permettent de réticuler le collagène en fibres tendues. Elles sont composées d'un domaine catalytique liant le cuivre du côté C-terminal et d'un domaine LTQ nécessaire à leur activité enzymatique. Leur expression est très régulée spatio-temporellement et une dérégulation de celle-ci est associée à de nombreuses maladies humaines (202) (voir paragraphe II-3).

b) Le remaniement mécanique : Outside-in vs Inside-Out.

Les propriétés physiques de la matrice extracellulaire sont régies par la composition chimique, le remaniement enzymatique de la matrice et le remaniement mécanique effectué par les cellules. Le remaniement mécanique se fait à travers les intégrines et la contraction acto-myosique. En effet, la liaison des intégrines à leurs ligands provoque l'activation de RhoA qui à son tour active ROCK pour promouvoir la contractilité actin-myosin-II et la stabilisation des structures d'adhérences focales. La contractilité acto-myosique, à travers les intégrines, permet aux cellules d'exercer une traction pour remodeler mécaniquement la matrice extracellulaire. L'exemple le plus connu est celui de l'assemblage de la fibronectine en fibres, décrite dans la partie C-I-3. Réciproquement, une augmentation de la rigidité matricielle (enzymatiquement par les LOX, ou par dépôt accru de collagène) promeut la maturation des adhérences focales *via* les mécanosenseurs décrits en C-I-5 et l'activation de voies de signalisation en aval des intégrines et des facteurs de croissance.

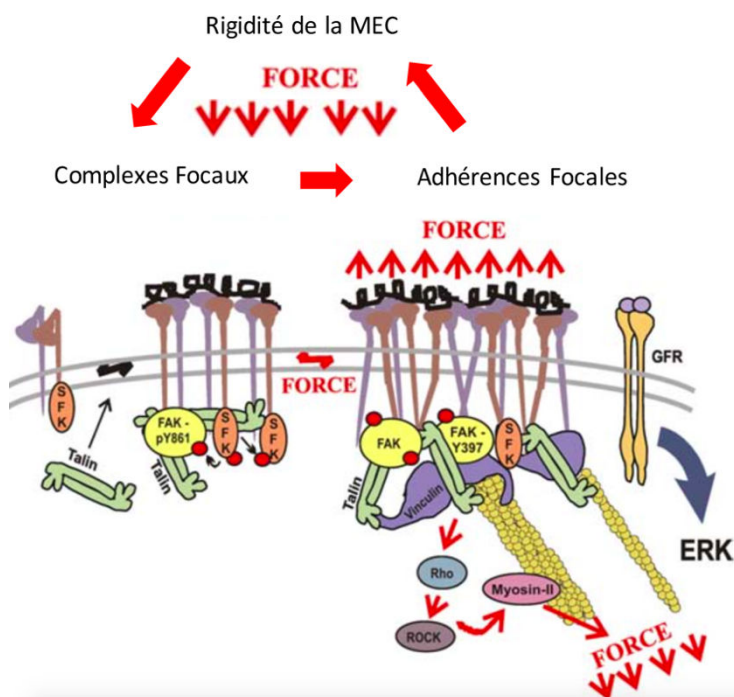


Figure 16 La réciprocité des échanges de forces entre les structures d'adhérence cellulaire et la MEC, figure adaptée de (203). L'assemblage des Complexes Focaux en adhérence focales dépend de la contraction acto-myosine interne. Les forces générées par le cytosquelette d'actine sont transmises *via* les Intégrines sur la MEC, permettant un remaniement mécanique de celle-ci. La rigidité de la MEC en retour favorise la maturation des Complexes Focaux en Adhérences Focales et la signalisation en aval des Intégrines.

II.3 Le remaniement de la Matrice extracellulaire dans les pathologies humaines.

Le remaniement enzymatique et le remaniement mécanique de la MEC permettent de maintenir une homéostasie cellulaire. Cependant, dans certaines pathologies, le tissu altéré diffère du tissu sain au niveau de son organisation, de sa composition et de la rigidité de la matrice extracellulaire. Ces changements dans la matrice extracellulaire contribuent à la progression de maladies.

a) L'Arthrose et la cardiomyopathie

L'Arthrose et la cardiomyopathie sont des pathologies qui se caractérisent par une destruction de la matrice extracellulaire. La MMP1 se retrouve hautement exprimée dans les tissus musculaires des personnes atteintes de cardiomyopathie, conduisant à une destruction de la matrice extracellulaire (204). L'arthrose est caractérisée par une expression et/ou activation des ADAMTS4 et ADAMTS5 (205). D'une manière intéressante, des mutations catalytiques inactives de MMP2 conduisent aussi à des défauts de lyse des ostéoclastes et à des syndromes arthritiques (206).

b) Fibrose

La fibrose est une pathologie qui consiste en l'accumulation de fibres de collagène dans la Matrice Extracellulaire. La fibrose promeut la transformation tumorale, comme dans le cas des cirrhoses hépatiques, une situation pathologique qui entraîne une augmentation de 20 à 30 % le risque de développement des hépato-cellulo-carcinomes (207). La fibrose est souvent médiée par les fibroblastes et fait intervenir le TGF- β . Le TGF- β va permettre l'activation et la translocation des SMADs 2-3 au noyau pour activer la transcription de gènes tels que le COL1A1 et COL3A1, augmentant le dépôt fibrillaire (208). L'expression de cytokines inflammatoires, telles que IL-33, promeut aussi le développement de fibrose en activant des cellules immunitaires et en stimulant l'expression du collagène tout en diminuant l'expression des MMPs (209). De plus l'IL-33 active les cellules lymphatiques, qui vont sécréter des interleukines, et notamment IL-13 qui induit la différenciation de fibroblastes en myo-fibroblastes et l'expression du TGF- β , contribuant ainsi au développement de la maladie. Les mécanismes déclencheurs de l'expression de cytokines inflammatoires ne sont pas encore connus à l'heure actuelle.

c) Progression tumorale :

i) Niche métastatique

La MEC tumorale est drastiquement remodelée par rapport à la MEC saine et diffère par sa composition et ses propriétés physiques. Il a été démontré que lors du développement tumoral, l'expression et le dépôt des collagènes I, II, III, IV est augmentée. Le développement tumoral et la métastase tumorale nécessitent la mise en place de niches permettant le développement et la croissance des cellules cancéreuses. Il a été démontré que les carcinomes mammaires exprimant CD44, le récepteur de l'acide hyaluronique, ont une meilleure survie et pouvoir métastatique. L'expression des LOXs au niveau des sites métastatiques est aussi augmentée ce qui favorise la formation de sites tumoraux secondaires (210). D'une manière intéressante, les cellules cancéreuses recrutent des cellules qui permettent le remaniement de la MEC pour établir des niches métastatiques distantes (211). Des cellules cancéreuses peuvent sécréter l'Ostéopontine pour activer des cellules progénitrices d'origine hématopoïétique (212). Celle-ci vont activer des fibroblastes et les cellules stromales qui vont créer des niches métastatiques. Les cellules cancéreuses pulmonaires peuvent sécréter la Fibronectine afin d'activer l'expression du récepteur 1 au VEGF et des intégrines

$\alpha 4\beta 1$ (pouvant lier la Fibronectine) des cellules progénitrices (213). Celles-ci vont migrer au poumon et sécréter MMP9, préparant une niche pré-métastatique pulmonaire (214).

ii) Rigidité de la MEC tumorale

L'augmentation de la rigidité et de la tension de la matrice extracellulaire est un facteur qui promeut la croissance cellulaire en renforçant la maturation des structures d'adhérence et la signalisation en aval des intégrines. L'équipe du Dr. Weaver a démontré l'importance des propriétés mécaniques de la MEC tumorale dans le développement de la maladie. Ils ont démontré que la rigidité tumorale est un facteur qui promeut la maturation des structures d'adhérences en adhésion focales pour promouvoir la signalisation par les intégrines et les facteurs de croissance. Ils ont montré que l'expression des LOXs par les cellules cancéreuses, promeut la réticulation des fibres de collagène augmentant ainsi la signalisation par les intégrines et l'activation de la voie PI3K/AKT par les facteurs de croissance. L'inhibition de LOX dans les tumeurs *in vivo* diminue les niveaux de phospho-FAK et la croissance tumorale (215) (216). De plus, Samuel S *et al.* ont démontré en complément que la contraction acto-myosique est un facteur qui favorise la progression tumorale en augmentant la rigidité matricielle. En effet, ils ont démontré que l'expression de ROCK *in vivo* augmente la contractilité intracellulaire et la croissance des cellules. Ils ont pu démontrer que la contraction acto-myosique promeut la translocation de la β -Caténine dans le noyau et l'expression de gènes en aval, tels que ceux codant pour la Cycline D1 et Lgr5 (217). La rigidité de la MEC tumorale ne dépend pas que d'un remaniement par les cellules cancéreuses, mais aussi des cellules stromales. En effet, des fibroblastes associés au cancer (CAFs) contribuent au remaniement de la MEC et à la progression tumorale. La Caveoline-1 par exemple, dans les CAFs, inhibe p190GAP pour induire une activation de RhoA, la phosphorylation de la chaîne régulatrice de la Myosine-II et la contractilité acto-myosique. De ce fait, les CAFs vont remanier mécaniquement les fibres de collagène et favoriser la dissémination des cellules cancéreuses. L'ensemble de ces études a ouvert la voie au développement d'agents thérapeutiques pouvant cibler des voies de signalisation impliquées dans le remaniement de la matrice extracellulaire afin de limiter la progression et la dissémination tumorale (218).

D) Résultats préliminaires : Optineurine est le partenaire d'interaction majeur d'HACE1.

Rac1 fut la première cible connue de HACE1 (219). Afin de mieux comprendre le rôle de HACE1 dans la suppression tumorale, notre équipe a effectué un crible double hybride pour identifier les partenaires d'interaction représentant potentiellement des régulateurs et de nouvelles cibles de HACE1. Deux cribles de double hybride indépendants ont permis d'identifier Optineurine (OPTN) comme un partenaire d'interaction parmi les plus forts de HACE1 dans des cellules embryonnaires humaines (Cf paragraphe C).

I. Fonctions cellulaires de l'OPTN.

I.1 Structure

OPTN est une protéine d'échafaudage de 68 kDa qui possède de nombreux domaines d'interaction (voir Figure 17). OPTN est constituée de deux domaines de structure en « Coiled-coil » et contient un domaine fonctionnel LIR (pour « LC3 interacting region », acides aminés 169 à 184) (220), un domaine UBAN (Ubiquitin Binding conserved in Abin and NEMO, acides aminés 445 à 502) (221) pouvant lier les chaînes de poly-ubiquitines, et un domaine en doigt de zinc (ZnF) (acides aminés 553 à 577) qui serait important pour moduler l'interaction du domaine UBAN avec les chaînes poly-ubiquitines (222). De plus, OPTN interagit avec les protéines de transport cellulaire Rab8 et la Myosine VI *via* ses zones localisées respectivement entre les acides aminés 58 et 209 et les acides aminés 412 et 520 (223, 224), avec la phosphatase MYPT1 (acides aminés 131 à 170) (225) et avec la Huntingtine (acides aminés 411 à 577). Les domaines minimaux d'interaction avec HACE1 ont été définis par recouplement des séquences communes des clones isolés.

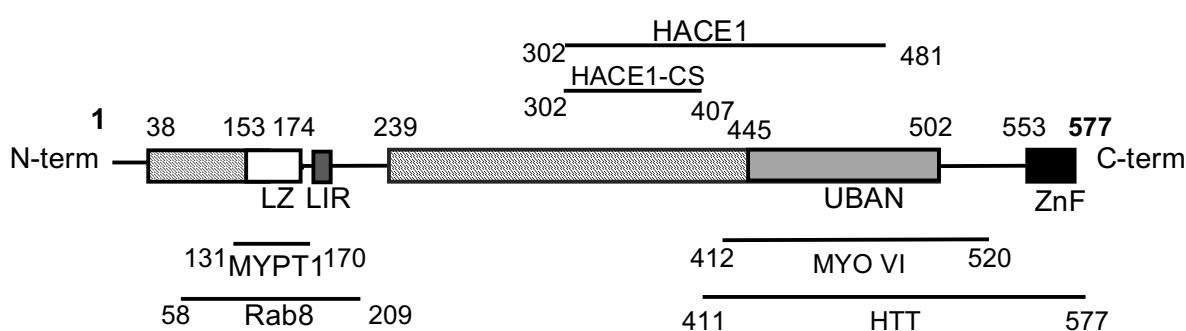


Figure 17 Structure de l'OPTN : OPTN contient un domaine Leucine Zipper (LZ), un domaine d'interaction avec la LC3 (LIR), un domaine d'interaction avec l'ubiquitine (UBAN) et un domaine en doigt de Zinc (ZnF). Les domaines Coiled-Coil sont hachurés. Les domaines d'interaction avec MYPT1, Rab8, Myosine 6 (MYOVI), Huntingtine (HTT), HACE1 et HACE1-C5785 (HACE1-CS) sont cartographiés.

I.2 OPTN dans le transport vésiculaire.

OPTN est une protéine impliquée de différentes manières dans le trafic vésiculaire. L'équipe du Dr Fulma Buss a identifié un rôle d'OPTN dans l'exocytose par son interaction avec la Myosine VI

(MYOVI). En effet, OPTN permet de localiser MYOVI dans l'appareil de Golgi et permet, *via* son interaction avec Rab8, d'assurer l'export de vésicules d'exocytose vers la membrane plasmique (226). Chibalina *et al.* ont notamment montré que l'axe MYOVI/OPTN est responsable du transport polarisé du récepteur de l'EGF (EGFR) vers la membrane plasmique dans la zone du lamellipode. Ce transport est important pour la formation d'un front de migration par chimiotactisme des cellules épithéliales A549. Cependant, ce mécanisme n'a pas d'impact sur le transport global du récepteur à l'EGF (227). D'une manière très intéressante, la Myosine VI peut se retrouver sous forme de chaînes protéiques longues et courtes par épissage alternatif. Le domaine CBD (Cargo Binding Domain) se trouvant dans la partie C-terminale de MYOVI permet la liaison avec OPTN. Wollscheid *et al.* ont démontré que dans des échantillons de tumeurs ovariennes la forme courte, caractérisée par l'excision des exons 29, 30 et 31, est la forme prédominante de la MYOVI. Cette forme possède un dépliement du CBD et une affinité augmentée pour l'OPTN qui contribue à la migration et la dissémination des cellules cancéreuses ovariennes. Dans ce contexte cellulaire, OPTN et la MYOVI courte contribuent à la progression tumorale (228).

1.3 OPTN dans la transition G2/M du cycle cellulaire.

L'équipe du Dr Weil a également identifié un rôle d'OPTN dans le contrôle de la transition entre la phase G2 et la mitose (G2/M). Dans cette étude, OPTN agit comme une navette pour réguler l'activation spatio-temporelle de la Polo-Like Kinase1 (PLK-1). La phosphorylation d'OPTN par la PLK-1 (dans le cytosol) conduit à la dissociation d'OPTN de Rab8 et de l'appareil de Golgi. OPTN permet ensuite la translocation du complexe phosphatase MYPT1 jusqu'au noyau. Dans le noyau, OPTN antagonise l'activité de la PLK-1 en induisant sa déphosphorylation par MYPT1. La perte d'OPTN conduit à une sur-activation de la PLK-1 et à l'apparition de cellules poly-nucléées (225).

1.4 OPTN et la réponse inflammatoire.

La protéine OPTN est impliquée dans le contrôle de la réponse inflammatoire en contrôlant la transduction des voies de signalisation en aval du TNF- α . En réponse au TNF- α , des plate-formes de signalisation se mettent en place par le biais d'interactions protéine-protéine, impliquant RIP1 en amont. RIP1 est poly-ubiquitylée par des chaînes de type K63 par TRAF2. NEMO, une sous-unité régulatrice du complexe IKK, interagit *via* son domaine UBAN avec RIP1 ubiquitylée pour promouvoir ensuite l'activation de Nf- κ B et l'expression de cytokines inflammatoires. Guozhi Zu *et al.* ont

démonstré qu'OPTN est un régulateur de l'activation de Nf- κ B en aval du TNF- α . En effet, OPTN compète avec NEMO pour l'interaction avec les chaînes K63 de RIP1 en réponse au TNF- α limitant ainsi l'expression de gènes inflammatoires, tels que le gène codant pour l'IL6 (229). OPTN interagit par son domaine UBAN avec les chaînes linéaires d'ubiquitines. Cette interaction est aussi nécessaire à la régulation de Nf- κ B et l'activation des caspases pro-apoptotique 8 et 3 en aval du récepteur 1 au TNF dans les cellules neuronales (230). De plus, OPTN contrôle l'activation de Nf- κ B dans les cellules hématopoïétiques. En effet, la différenciation de BMDMs en ostéoclastes est augmentée par la perte d'OPTN ou l'expression du mutant D474N d'OPTN (abrogeant la liaison d'OPTN aux chaînes poly-ubiquitines). Cela conduit à un remodelage accru du tissu osseux (231).

1.5 OPTN un récepteur sélectif d'autophagie.

a) Mécanisme moléculaire de l'autophagie.

En préambule, les mécanismes moléculaires de l'autophagie et les fonctions cellulaires de celles-ci vont être décrites brièvement. L'autophagie est une voie catabolique majeure cellulaire qui permet la destruction d'éléments cytosoliques, tels que des organelles et des agrégats protéiques en les ciblant aux lysosomes. Il existe différents types d'autophagie : on nomme Macro-autophagie le bourgeonnement de vésicules à double membranes appelées autophagosomes (l'origine des bourgeons est très controversée) qui englobe les protéines et composants cytosoliques; la Micro-autophagie concerne une invagination du lysosome ou d'un endosome pour englober des éléments les entourant; finalement la « chaperone-mediated autophagy » concerne des protéines chaperonnes (HSC70) qui vont cibler des protéines à domaines KFERQ et promouvoir leur entrée dans les lysosomes *via* LAMP2A. La formation des autophagosomes comprend 3 étapes clés : l'étape d'initiation, l'étape de nucléation et l'étape d'expansion. Les protéines ULK1/2, ATG13, FIP200 et ATG101 vont s'assembler pour permettre l'initiation de l'autophagosome. La phase de nucléation fait intervenir ULK1, qui va cibler et activer le complexe PI3Kinase de classe III Vps34-Beclin1. VPS34 va générer des Phosphatidylinositol (3)P au niveau des membranes de l'autophagosome qui est indispensable à la nucléation. La phase d'expansion fait intervenir un système homologue à l'ubiquitylation comprenant ATG5-ATG12-ATG16L qui vont permettre la lipidation de la microtubule-associated protein 1 light chain (LC3) avec la phosphatidyléthanolamine, pour donner une forme notée LC3II, et son ancrage dans la bicouche lipidique des autophagosomes. Cette étape est cruciale

au ciblage des cargos vers les autophagosomes et au ciblage des autophagosomes aux lysosomes (cf Figure 18).

L'autophagie est importante pour le maintien de la physiologie cellulaire en contrôlant le recyclage des mitochondries (Mitophagie), l'élimination des protéines carbonylées et les agrégats protéiques (Agrégagie), ainsi que l'élimination des bactéries et d'agents pathogènes intracellulaires (Xénophagie) (232). De plus, l'autophagie permet un support métabolique à l'anabolisme cellulaire en permettant la dégradation de gouttelettes lipidiques en acides gras **oxydables en Acétyl-CoA dans les mitochondries** (Lipophagie), la dégradation du glycogène en glucose ainsi que le relargage d'acides aminés dans les cellules après hydrolyse des chaînes polypeptidiques. Par ces fonctions, l'autophagie a des rôles très divers dans le développement et la progression de maladies. La perte d'une autophagie normale peut entraîner une neuro-dégénérescence et le développement de maladies, telles que la maladie de Parkinson, la Sclérose amyotrophique latérale et la maladie de Huntington. L'augmentation du flux autophagique permet aux cellules cancéreuses de résister aux chimiothérapies.

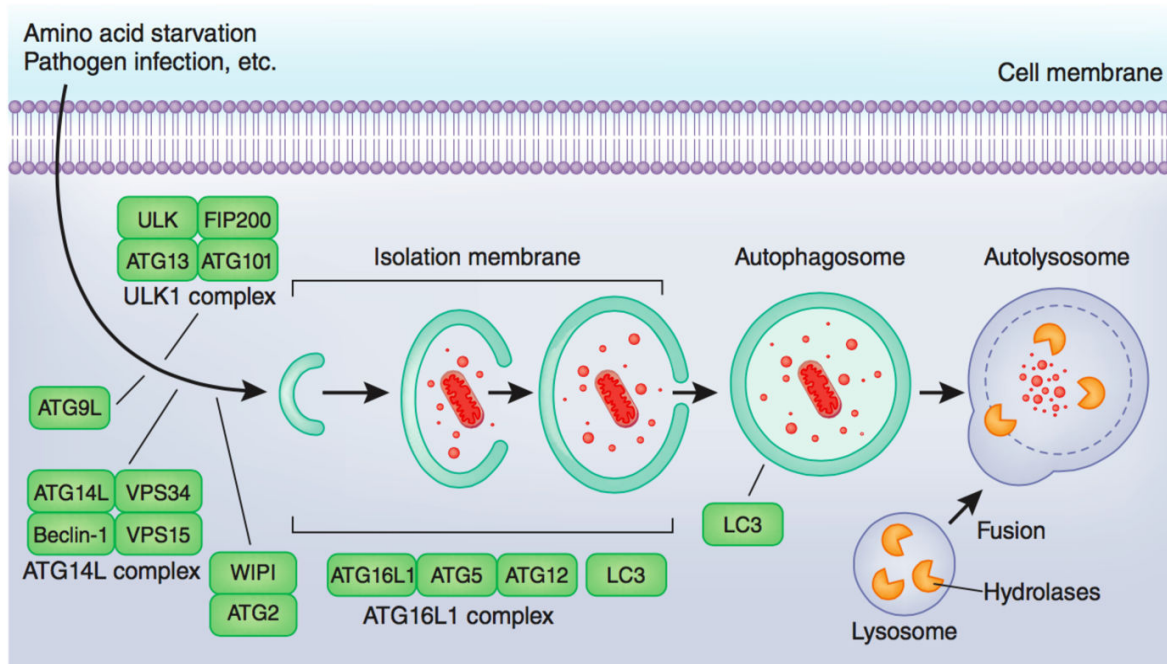


Figure 18 Les étapes clés de la formation des autophagolysosomes d'après (233). En réponse à un stimulus, tel que la déprivation en nutriments, l'infection par un agent pathogène, la formation d'autophagosomes est promue. La première étape d'initiation et de nucléation des autophagosomes fait intervenir le complexe ULK1, FIP200, ATG13, ATG101 et le complexe VPS34 ATG14L Beclin-1 VPS15 qui permet l'ajout de PI(3)P à la double membrane des autophagosomes. La phase d'expansion fait intervenir une cascade impliquant les protéines ATG16L, ATG5 et ATG12, qui vont permettre l'ajout d'un groupement phosphatidyléthanolamine aux LC3. La phase finale concerne la fusion des autophagosomes aux lysosomes pour la destruction de la cargaison.

b) OPTN est un récepteur sélectif de l'Autophagie.

Le laboratoire du Dr Dikic a démontré en 2011 que l'OPTN est un nouveau récepteur sélectif d'autophagie, en identifiant un domaine LIR d'interaction avec la LC3 (figure 17). De plus, cette interaction est modulée par la TBK1 (Tank Binding Kinase) pour réguler le ciblage de cargos intracellulaires aux auto-phago/lysosomes. Wild *et al.* ont démontré que l'OPTN lie les chaînes d'ubiquitines se retrouvant sur les salmonelles intracytosoliques *via* son domaine UBAN. Suite à la phosphorylation d'OPTN par TBK1, l'interaction entre OPTN et LC3 est renforcée pour délocaliser les salmonelles intracellulaires vers les autophagolysosomes (220). OPTN apparaît ainsi être un acteur important dans l'immunité innée. L'équipe du Dr Irazoqui a démontré que son expression est induite par le facteur de transcription TFEB dans les cellules immunitaires murines RAW en réponse à l'infection par *Staphylococcus aureus* (234).

L'OPTN est aussi une protéine impliquée dans les processus de mitophagie permettant ainsi le ciblage des mitochondries défectueuses aux lysosomes. PARKIN est une ubiquitine ligase qui va induire une ubiquitylation régulée des mitochondries. Lazarou *et al.* ont démontré que PINK1 phosphoryle l'ubiquitine lorsqu'elle est conjuguée sur les mitochondries. Cette phosphorylation recrute les 2 récepteurs sélectifs d'autophagie NDP52 et OPTN qui vont permettre le ciblage de mitochondries vers les autophagolysosomes (235). Le rôle d'OPTN dans la mitophagie a été aussi mis à jour par l'équipe du Dr Dikic qui montre que TBK1 phosphoryle OPTN sur les sérines 473 et 513 dans le domaine UBAN, augmentant ainsi son affinité pour les chaînes d'ubiquitines. Cette phosphorylation par TBK1 se situe dans un contexte d'initiation de la Mitophagie par PARKIN, permettant le ciblage d'OPTN sur les mitochondries pour les envoyer ensuite vers les autophagolysosomes (236).

c)OPTN et les maladies humaines.

OPTN est impliquée dans de nombreuses maladies neurodégénératives humaines. Des mutations d'OPTN furent initialement identifiées dans des échantillons de patients atteints d'une forme rare du glaucome appelée « primary open angle glaucoma ». Les mutations de E50K et M98K sont associées à une perte de la fonction de contrôle du trafic vésiculaire *via* Rab8 (237), pouvant engendrer de la mort cellulaire, ainsi qu'un dysfonctionnement autophagique (238). La sclérose amyotrophique latérale (ALS), aussi appelée maladie de Charcot, est une maladie humaine grave qui se caractérise par une dégénérescence des motoneurones chez des jeunes adultes, conduisant à une

paralyse complète et à une insuffisance respiratoire suivie d'une mort précoce des patients (2 ans en moyenne après le diagnostic de la pathologie). Cependant, les prédispositions génétiques et les mécanismes provoquant la pathologie sont pour l'instant très peu décrites. Depuis 2010, OPTN est identifié comme un facteur de risque de développement de l'ALS (239) (240). De ce fait, de nombreuses études ont essayé d'identifier les mécanismes moléculaires responsables du développement de l'ALS et impliquant l'OPTN. Deux fonctions cellulaires majeures d'OPTN furent identifiées comme importantes dans le développement de cette pathologie. OPTN par sa régulation de l'activité de Nf- κ B permet de limiter la mort cellulaire médiée par la voie du TNF- α . En effet, les mutations d'OPTN Q398X (Troncation) et E478G (Domaine UBAN) seraient à l'origine d'une sur-activation des voies pro- apoptotiques et nécrotiques en aval du récepteur 1 au TNF- α dans les moelles épinières des personnes atteintes de l'ALS (241) (230) (242). D'un autre côté, il a été démontré qu'OPTN par la régulation de la Mitophagie permet de maintenir la survie des motoneurones. En effet, parmi les gènes identifiés par Cirulli *et al.*, TBK1 fut aussi décrit comme étant un nouveau gène se trouvant régulièrement muté chez les patients atteints d'ALS. De ce fait, l'axe génétique TBK1/OPTN fut établi dans l'ALS (240). L'axe TBK1/OPTN serait responsable du ciblage d'agrégats et de mitochondries vers les autophagolysosomes pour limiter le stress cellulaire responsable de la mort des axones (243) (244) (236).

OPTN est impliqué aussi dans la maladie de Paget, une maladie osseuse associée à un dysfonctionnement de l'organisation et le remodelage du tissu osseux. 10% des patients atteints de cette maladie disposent d'une variabilité génétique ou d'une mutation dans le gène de P62/SQSTM1. Une analyse génétique sur une cohorte de 750 patients atteints de la maladie de Paget a montré qu'OPTN est un gène de susceptibilité pour cette maladie, et cela indépendamment de p62/SQSTM1(245). Obaid *et al* ont par la suite démontré mécaniquement un rôle d'OPTN dans le remaniement du tissu osseux par les ostéoclastes. En effet des mutations perte de fonctions dans le domaine UBAN d'OPTN augmentent le remodelage osseux et l'activité des ostéoclastes en réponse à RANKL (RANKL étant une cytokine régulant la différenciation et l'activation des ostéoclastes) (231).

L'équipe du Dr Hu a montré que OPTN possède une fonction suppresseur de tumeurs par son interaction avec HACE1. En effet, Lui *et al.* ont montré que l'ubiquitylation de OPTN par HACE1, permet son interaction avec la protéine p62/SQSTM1. Cela va permettre l'activation de la Macroautophagie et de limiter les dégâts cellulaires liés au stress oxydatif pouvant engendrer une

transformation tumorale (cf Figure 12). Ils ont de plus montré une diminution de l'expression d'OPTN dans des tissus tumoraux humains comparés aux tissus sains adjacents (127) .

OBJECTIFS DE LA THESE

La GTPase Rac1 est au cœur 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 liée au GTP.

Il est clair au vu de la littérature récente que les mutations activatrices de Rac1 ont un effet « driver » de la croissance tumorale. Il est donc intéressant de noter 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 l'activité des GTPases par dégradation protéasomale induite par l'ubiquitine. Cette régulation met en jeu l'activité de l'E3 ubiquitine ligase de HACE1 qui agit comme un facteur limitant dans la réaction de poly-ubiquitylation de Rac1. En effet, HACE1 catalyse l'ubiquitylation de la forme liant le GTP de Rac1 en réponse à l'intoxication par le CNF1 et l'activation de Rac1 par des GEF. HACE1 est un suppresseur de tumeurs dont l'expression est perdue dans la moitié des cancers humains. **Il est donc important de définir sa régulation et sa fonction dans la signalisation cellulaire.**

Le rôle d'HACE1 dans le contrôle de l'homéostasie cellulaire dépendant de Rac1 n'est pas complètement élucidé. Nous avons démontré que HACE1 est localisé dans les lamellipodes pour réguler l'activité de Rac1 impactant ainsi l'entrée des bactéries *E. coli* uropathogènes. En collaboration avec l'équipe du Dr. Sorensen, nous avons également montré que HACE1 contrôle la production d'EAOs et la transcription de la Cycline D1 stimulés par Rac1. **Cependant, la question se pose de savoir si HACE1 permet l'ubiquitylation de Rac1-GTP dans certains contextes cellulaires spatiotemporels précis ou si HACE1 régule globalement les niveaux de Rac1-GTP dans les cellules quel que soit le stimulus biologique. De plus, les mécanismes moléculaires de régulation de son activité ubiquitine ligase et la spécificité aux substrats de HACE1 sont aussi inconnus. Ces mécanismes sont importants pour déterminer où et quand HACE1 intervient dans sa fonction de suppresseur de tumeurs et par l'intermédiaire de quels effecteurs.**

Parmi les stratégies pour répondre à ces questions, nous avons décidé durant ma thèse de définir la fonction de facteurs associés à HACE1. Pour cela au début de ma thèse nous avons effectué un crible double hybride en levure pour identifier de nouvelles cibles, des régulateurs ou des

partenaires d'interaction de HACE1. Deux cribles double hybride indépendants, utilisant HACE1 comme apât ont montré que la protéine d'échafaudage et récepteur sélectif de l'autophagie OPTN était l'interactant le plus fort dans le génome humain. A cette époque, le groupe de Dikic montrait que l'OPTN était requis dans la destruction ciblée de Salmonella par autophagie. Ceci faisait d'OPTN un partenaire intéressant de HACE1.

Les objectifs de ma thèse furent donc de confirmer l'interaction *in cellulo* et de caractériser la relation possible entre OPTN, HACE1 et Rac1 afin de mieux comprendre le rôle de HACE1 dans la suppression tumorale et le maintien de la physiologie cellulaire. Pour cela :

1) Nous avons étudié si OPTN est une nouvelle cible de l'activité E3 ubiquitine ligase de HACE1.

2) Nous avons analysé l'implication d'OPTN dans la régulation par ubiquitylation de Rac1 effectuée par HACE1.

3) Nous avons enfin examiné l'implication d'OPTN dans la régulation en aval ou en amont de processus cellulaires dépendants de Rac1, tels que la migration, l'adhérence, la prolifération cellulaires ainsi que dans l'inflammation.

L'ensemble de nos résultats ouvre de toutes nouvelles perspectives sur la compréhension du mode de fonctionnement et de régulation de HACE1. Ces résultats nous permettent de proposer qu'OPTN intègre des signaux de tension aux structures d'adhésion cellule-matrice extracellulaire pour réguler la voie Rac1.

RESULTATS

Article de recherche :

Optineurin links Rac1 ubiquitylation by HACE1 to integrin-mediated mechanotransduction.

OPTINEURIN LINKS RAC UBIQUITYLATION BY HACE1 TO INTEGRIN-MEDIATED MECHANOTRANSDUCTION TO TUNE CELL DIVISION

Daniel Hamaoui^{1,2}, Anne Doye^{1,2}, Atef Asnacios⁴, Orane Visvikis^{1,2}, Patrick Munro^{1,2}, Elisa Vitiello⁵, Martial Balland⁵, Mukund Gupta⁶, Benoit Ladoux^{6,7}, Jérôme Gilleron⁸, Petra Tafelmeyer⁹, Laurent Gagnoux-Palacios¹⁰, Mads Daugaard^{11,12}, Poul H. Sorensen¹³, Emmanuel Lemichez^{1,2} * and Amel Mettouchi^{1,2,3} *#

1) INSERM, U1065, Université Côte d'Azur, Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire (C3M), Microbial toxins in host-pathogen interactions, Nice, France

2) Equipe labellisée La Ligue contre le Cancer

3) Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS)

4) Laboratoire Matière et Systèmes Complexes, Unité Mixte de Recherche 7057, Centre National de la Recherche Scientifique and Université Paris–Diderot, Sorbonne Paris Cité, 75205 Paris, France

5) Univ. Grenoble Alpes, CNRS, LiPhy, F-38000 Grenoble, France

6) Mechanobiology Institute (MBI), National University of Singapore, Singapore 117411

7) Institut Jacques Monod (IJM), CNRS UMR 7592 & Université Paris Diderot, Paris, France

8) INSERM, U1065, Université Côte d'Azur, Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire (C3M), Cellular and Molecular Physiopathology of Obesity and Diabetes, Nice, France

9) Hybrigenics Services, Paris, France.

10) Institut de Biologie Valrose (iBV), Université Côte d'Azur, CNRS UMR 7277, INSERM UMR 1091, Nice, France

11) Vancouver Prostate Centre, Vancouver, BC, V6H 3Z6, Canada.

12) Department of Urologic Sciences, University of British Columbia, Vancouver, BC, Canada.

13) Department of Molecular Oncology, BC Cancer Research Center, University of British Columbia, Vancouver, BC V5Z1L3, Canada.

Running title: OPTN is a mechanotransducer

Keywords : Rac1 GTPase, mechanotransduction, Integrin signaling, Tumor Suppressor, E3 ubiquitin ligase.

*For correspondence:

Dr. Amel Mettouchi or Dr Emmanuel Lemichez

INSERM U1065, C3M

151 route Saint Antoine de Ginestière, BP 2 3194

06204 NICE CEDEX 3

Tel: + 33 (0)4 89 06 42 61

Fax: + 33 (0)4 89 06 42 60

email: amel.mettouchi@unice.fr or lemichez@unice.fr

Lead Contact

SUMMARY

Extracellular matrix (ECM) elasticity is perceived by cells via focal adhesion structures, which transduce mechanical cues into chemical signaling to adapt cell behavior. Here, we ascribe to Optineurin (OPTN) a function of mechanosensor that integrates ECM compliance cues to control cell contractility, metabolic activity and proliferation. We link these properties of OPTN to its modulatory role on HACE1-mediated regulation of Rac1 by the ubiquitin and proteasome degradation machineries. Mechanistically, we report that ECM stiffening leads to OPTN expression and C-terminal processing in a form that binds to HACE1 and activates its E3 ubiquitin ligase activity toward GTP-bound Rac1. We show that OPTN knocked-down cells display strong adhesion signaling, mTORC1 activity, cyclin D1 translation and cell proliferation, independently of ECM stiffening. Altogether our data provide evidence that OPTN and HACE1 tumor suppressors work in concert to control Rac1 signaling to adapt cell growth with ECM stiffness cues and halt abnormal proliferative behavior.

INTRODUCTION

Rac1 is an essential protein that belongs to the Rho family of small GTPases. It plays crucial roles in a variety of cellular processes encompassing actin cytoskeleton regulation, cell-extracellular matrix (ECM) adhesion, transcriptional responses and cell division (Heasman and Ridley, 2008; Mack et al., 2011; Sit and Manser, 2011). These aspects are fundamental during embryonic development and innate immune response, and are frequently deregulated in cancer.

Rac1 is a classical switch GTPase that undergoes a Guanine-nucleotide based spatio-temporal cycle. Rac1 alternates between a GDP-bound, “OFF”, and a GTP-bound “ON” state that interacts with effectors to trigger downstream signaling (Hodge and Ridley, 2016; Cherfils and Zeghouf, 2013). Emerging studies now point for the crucial role of a degradative pathway, via ubiquitin and proteasome systems (UPS), in the control of Rac1 activity (Doye et al., 2002; Torrino et al., 2011; Mettouchi and Lemichez, 2012). This pathway implicates the HECT-domain and Ankyrin-repeats Containing E3 ubiquitin ligase (HACE1), which associates selectively with active Rac1 to catalyze its poly-ubiquitylation and UPS-mediated degradation (Torrino et al., 2011; Castillo-Lluva et al., 2013). Control of Rac1 activity via UPS is crucial for balanced reactive oxygen species (ROS) production by the Rac1-dependent NADPH-oxydases and cell proliferation (Daugaard et al., 2013). HACE1-controlled degradation of Rac1 via UPS is also a critical player in the signaling downstream several tyrosine-kinase growth factor receptors, including Met and HER2, with major consequences for cell motility, anchorage-independent growth and tumorigenicity (Castillo-Lluva et al., 2013; Goka and Lippman, 2015). Loss-of-HACE1 is reported in multiple human tumors (Anglesio et al., 2004; Diskin et al., 2012; Huang et al., 2016; Hibi et al., 2008; Sakata et al., 2009; Sakata et al., 2013; Goka and Lippman, 2015) and has been linked to cancer onset in multiple organs during aging, as well as chronic intestinal inflammation in animal models (Zhang et al., 2007; Tortola et al., 2016), **defining HACE1 as a potent tumor suppressor**. Looking forward, challenging molecular studies are required to elucidate HACE1 tumor suppressor activity in the context of Rac1 and apprehend its regulation.

Rac1 is a mediator of several growth factors, cytokines and adhesion receptor signaling circuits. The discovery that Rac1 activity is influenced by the stiffness of the ECM or mechanical tension and stretch (Bae et al., 2014; Zhang et al., 2011; Gould et al., 2016) has opened major questions concerning signaling pathways connecting Rac1 to mechanotransduction, especially for the control of cell division.

While application of force has been shown to activate GEFH1 and LARG, two GEFs for RhoA (Guilluy et al., 2011; Lessey-Morillon et al., 2014), **no such situation** has been described so far for the Rac GTPase. Rac1 clearly regulates cell proliferative behavior in link with ECM compliance (Klein et al., 2009), and while downstream signaling has been pretty well characterized, how Rac1 senses and adapts its level of activity to ECM compliance remains to be elucidated.

One major cellular component in cell mechanosensing and adaptation is the actin cytoskeleton, as it is the source of internally generated force (Burrige and Wittchen, 2013). This force is further transmitted through adhesion receptors to generate traction on the ECM, and reciprocally adhesion receptors will strengthen their binding to ECM and reinforce composition of the adhesion structures to resist forces. Rho family GTPases have been established decades ago as critical regulators of actin cytoskeleton dynamics and fate (Etienne-Manneville and Hall, 2002). Indeed, RhoA promotes the polymerization of actin into linear filaments, orthogonal to the cell membrane, via interaction with its effectors mDia (Paul and Pollard, 2009). In addition, by interacting with the ROCK effector, RhoA triggers phosphorylation and inactivation of the myosin light chain phosphatase to promote activation of Myosin II. This way, RhoA leads to the assembly of contractile acto-myosin filaments. Also, Rac1 promotes the assembly of a cortical actin meshwork, leading to membrane protrusions. Rac1 interacts with the WAVE complex to release its conformation and trigger activation of the actin polymerizing complex Arp2/3 (Chen et al., 2010). The Arp2/3 complex induces formation of branched actin networks, where new actin filaments are assembled with a 70° angle from pre-existing actin filaments, in zones of cellular protrusions. Focal adhesion formation and actin cytoskeleton polymerization and remodeling are tightly coupled. Indeed, by activating dendritic actin polymerization, Rac1 triggers the recruitment of integrins and actin-binding proteins into nascent adhesions that are formed in the lamellipodium zone. Hence Arp2/3 has affinity for FAK and Talin (Vicente-Manzanares et al., 2009). The pushing force generated by actin polymerization on the membrane creates an actin retrograde flow in the cell body-proximal part of the protrusion, the lamella zone, associated with actin depolymerization and nascent adhesions dispersal. In the presence of myosin- and alpha-actinin-mediated actin-crosslinking, a fraction of nascent adhesions can be strengthened at the lamellipodia-lamella boundary (Choi et al., 2008; Oakes et al., 2012), to generate focal complexes and then mature further into focal adhesions (FA) with the generation of RhoA-dependent actomyosin contractile stress fibers. FA will experience tension-induced changes in their composition and signaling activity. This way, mechanical cues originating from the ECM are converted into biochemical signaling, that will control

cellular responses like migration or proliferation. It is therefore indisputable that Rac1 influences mechanical response/adaptation of cells via the functions aforementioned. It is now important to define how to position Rac-mediated control of cell proliferation in the context of mechanosensing, given that ECM stiffening and abnormal responses to mechanical cues of the ECM are associated with a large spectrum of human diseases, comprising cancer (Paszek et al., 2005; Levental et al., 2009; Goetz et al., 2011; Paszek et al., 2014) and that Rac1 plays a critical role in the control of cell proliferation and tumor growth (Mack et al., 2011).

In an unbiased screen for HACE1 interaction partners, we have identified Optineurin (OPTN). We found that OPTN acts as a proximal upstream regulator of HACE1 activity, adapting its activity to ECM compliance, thereby controlling activated Rac1 levels in cells. Interestingly, interaction of OPTN with HACE1 is regulated by Rac1 activity, linking Rac1 activation levels to HACE1 tumor suppression. Indeed, active Rac1 triggers a post-translational processing of OPTN, promoting association to HACE1 to stimulate its ubiquitylation activity on Rac1. Moreover, we show that OPTN expression and processing is geared by ECM compliance. Silencing of OPTN leads to enhanced Rac1 activation, ECM stiffness-independent cell cycle progression, acquisition of enhanced adhesive properties and integrin-mediated signaling engendered by focal adhesions atypically uncoupled from traction forces. On the basis of these findings, we propose that OPTN operates together with the tumor suppressor HACE1 to regulate cell tensional integrity and halt abnormal proliferative behavior.

RESULTS

Active Rac1 promotes the association of the E3 ubiquitin ligase tumor suppressor HACE1 with OPTN.

We conducted an unbiased determination of HACE1 interacting proteins through whole genome screening by yeast two hybrid. OPTN was represented in a high number of clones (close to 20% of processed clones) and was among the highest confidence prey binding score, indicating that OPTN is a major HACE1 partner (Sup Figure 1A). OPTN is a ubiquitous protein containing two leucine zipper motifs, an LC3-interacting region, an ubiquitin-binding motif homologous to ABIN and NEMO, and a C-terminal zinc finger motif (Figure 1A). We monitored the interaction of HACE1 with OPTN in primary human cells by co-immunoprecipitation. Immunoprecipitation of N-terminal Flag-tagged OPTN followed by anti-HA immunoblot established the association of HACE1 with OPTN in cells, thereby confirming yeast two hybrid data (Figure 1B). Moreover, expression of the constitutively active Rac1 mutant (Rac1Q61L) increased HACE1 binding to OPTN (Figure 1B), while the dominant inactive form of Rac1 (Rac1T17N) interfered with the association (Figure 1D). These data indicate that the binding of OPTN to the E3 ubiquitin ligase HACE1 is regulated by Rac1 activity. We noticed that expression of the constitutively active Rac1 mutant (Rac1Q61L) also triggered the appearance of a faster-migrating form of OPTN, here referred to as OPTN^{*}, that is faintly or not detected in the control condition or in the presence of the dominant inactive form of Rac1 (Figure 1B, Sup Figure 1B). The faster-migrating form of OPTN is still detectable in condition of HACE1 knockdown (Sup Figure 1C) or when the HACE1 dominant catalytic-inactive mutant is co-expressed (not shown). This indicates that the faster-migrating form of OPTN generated upon active Rac1 expression originates independently of the E3 ligase HACE1.

As the faster-migrating OPTN^{*} is recognized by the Flag antibody, we focused on potential C-terminal cleavage. We conducted an immuno-mapping using three available antibodies developed against different regions of the protein (Figure 1A) to discriminate the Flag-tagged OPTN doublet. Antibodies raised against the C-terminal Zn finger domain (ZnF) or the 528-577 residues spanning the extreme C-terminal part of the protein discriminated OPTN from OPTN^{*} while both forms of OPTN were recognized by antibodies raised against an internal region of the molecule (Figure 1C). These data suggest that OPTN could be cleaved in its C-terminal extremity. No obvious difference of

phosphorylation, acetylation and ubiquitylation could be detected by mass spectrometry between the faster and slower migrating forms of OPTN (data not shown). Proteomics approaches failed to determine a precise cleavage site, but we could define upon mass spectrometry analysis of trypsin-digested OPTN, that peptides covering the N-terminal and central region of the protein were equally represented in the faster and slower migrating bands until residue 537. The 538-577 part of the molecule was covered by one peptide representing residues 564-573 that could only be detected in good amounts in the slower migrating form of OPTN (not shown). This suggests that a cleavage of the protein occurs in the faster migrating form after the amino acid in position 537, rather than a post-translational modification precluding recognition of this region by antibodies (Figure 1C). This body of results strongly suggests that the Zinc Finger domain of OPTN is cleaved off the molecule upon active Rac1 expression, an event correlated with enhanced interaction of OPTN with HACE1. Little is known on the OPTN Zinc finger function. Its sequence is conserved in NEMO and can functionally replace NEMO's Zinc finger, which supports its functionality in the OPTN molecule (Schwamborn et al., 2000; Laplantine et al., 2009). In NEMO, the Zinc finger domain contributes, together with the UBAN domain, to the binding of Lys-63-linked and linear ubiquitin chains (Laplantine et al., 2009). The current literature suggests that the UBAN domain is the main ubiquitin binding region since a point mutation in this domain is sufficient to abrogate this function even if the ZnF domain is unaffected (Zhu et al., 2007; Wu et al., 2006). In order to destabilize the ZnF structure in OPTN, we mutated the cysteine 575, involved in zinc chelation, into alanine. The OPTNC575A mutant was impaired in its capacity to interact with HACE1, regardless of Rac1 activity, and displayed markedly reduced shift of migration in presence of Rac1Q61L (Figure 1D). This suggests that the ZnF motif in OPTN could be one site of interaction with HACE1. To confirm or oppose this hypothesis, we generated a mutant deleted from the ZnF domain (OPTN Δ ZnF) and tested its ability to bind HACE1. Strikingly, OPTN Δ ZnF displayed a high affinity for HACE1 (Figure 1E). Moreover, its binding to HACE1 was maximal regardless of Rac1Q61L expression (Figure 1E). This suggests that the deletion of the ZnF domain conferred to OPTN the ability to bypass the requirement of Rac1 signaling for association with HACE1. These data imply that the OPTN ZnF domain is not the site of interaction with HACE1 but rather precludes the binding of OPTN to HACE1 unless it is cleaved off. We further analyzed the contribution of ubiquitin chain binding for the cleavage on the C-terminal part of OPTN and for OPTN association with HACE1. As shown in figure 1F, the OPTND474N mutant, that no longer interacts with poly-ubiquitin chains (Zhu et al., 2007), displays a loss of Rac1-stimulated association with

HACE1. Moreover, the OPTND474N mutant does not harbor a migration shift (Figure 1F). Altogether, these experiments indicate that the cleavage of the C-terminal part of OPTN requires functional ZnF and UBAN domains, both involved in poly-ubiquitin chains binding; and that the cleavage triggers an enhanced association of OPTN with HACE1. Interestingly, a point mutation in the OPTN LIR domain abrogating interaction with LC3 (Wild et al., 2011) had no effect on Rac1-induced OPTN cleavage and interaction with HACE1 (Sup Figure 1D). This data dismisses a role of OPTN as an autophagy receptor for its binding to HACE1 in our model.

In conclusion, we uncover that Rac1 drives the posttranslational modification of OPTN to promote its interaction with the tumor suppressor HACE1.

OPTN regulates HACE1 E3 ubiquitin ligase activity towards Rac1

We conducted ubiquitylation measures on OPTN to assess if OPTN was a target of HACE1 E3 ubiquitin ligase activity. Although OPTN presented a ubiquitylation profile, the latter was not modified by the presence of HACE1 nor Rac1Q61L active mutant (Sup Figure 2A). This indicates that OPTN is not ubiquitylated by HACE1 in our experimental setting. We then tested if OPTN regulates HACE1 E3 ubiquitin ligase activity. To this end, we measured ubiquitylation of active Rac1Q61L in control or OPTN-knocked-down cells (Figure 2A). We could measure that OPTN knockdown leads to the reduction of Rac1Q61L ubiquitylation, in conditions of endogenous or overexpressed levels of HACE1 (Figure 2A). Overexpression of OPTN did not enhance HACE1-mediated ubiquitylation of Rac1, suggesting that endogenous levels of OPTN are not limiting in this setting (Sup Figure 2B). Remarkably, this set of experiments establishes a novel regulatory function of OPTN in the control of Rac1 ubiquitylation. We next assessed the importance of OPTN in the capacity of HACE1 to interact with its target Rac1. As shown in Figure 2B, when OPTN is knocked-down, HACE1 is dramatically impaired in its ability to bind to active Rac1Q61L. Together, these data establish that OPTN is required for a correct binding of HACE1 to its target Rac1 for ubiquitylation. We then analyzed the impact of OPTN on the level of Rac1 activity in cells. This was assessed by GST-PAK-RBD affinity column on lysate of control or OPTN knocked-down cells cultured on fibronectin-coated surface (Figure 2C, Sup Figure 2C). These experiments revealed an increase of endogenous Rac1 activity in OPTN-depleted cells compared to control. This is in accordance with our ubiquitylation experiments showing less ubiquitylation of active Rac1 when cells are depleted from OPTN. Integrin-mediated activation of

Rac1 by fibronectin is associated with enhanced anchoring of the GTPase in detergent resistant domains of the plasma membrane (del Pozo et al., 2004; del Pozo et al., 2005; Del Pozo and Schwartz, 2007). Therefore, we analyzed Rac1 distribution in isopycnic sucrose gradients. In OPTN knocked-down cells, we measured a higher amount of Rac that segregates in flotillin-positive fractions compared to control cells (Figure 2D, Sup Fig 2D). This indicates a critical role of OPTN in controlling Rac1 activity downstream Integrin-fibronectin signaling. Rac1 can also be directly activated by the CNF1 deamidase toxin from uropathogenic *Escherichia coli*, leading to its sensitization to HACE1-dependent ubiquitin-mediated proteasomal degradation (Flatau et al., 1997; Doye et al., 2002; Torrino et al., 2011) (Figure 2E, 2F). As expected, 3 hours of CNF1 treatment stimulated by 5-fold endogenous Rac1 activity in control cells versus 12-fold in HACE1 knocked-down cells. Activation of Rac1 by CNF1 was enhanced by 8-fold in OPTN knocked-down cells, indicating that OPTN also controls CNF1-stimulated Rac1 activity.

In conclusion, OPTN controls positively HACE1 E3 ubiquitin ligase activity towards Rac1, thereby limiting Rac1 activity in cells.

OPTN adapts HACE1 E3 ubiquitin ligase activity to extracellular matrix stiffness

Our data established the role of OPTN in the control of the HACE1-Rac1 signaling axis. Considering the implication of Rac in the control of cell division by extracellular matrix (ECM) elasticity (Klein et al., 2009), we monitored the expression and post-translational processing of OPTN as a function of ECM compliance. To address this, fibronectin was coated on hydrogels of increasing stiffness, spanning elastic modulus values from 0.2 to 12 kPa, and OPTN levels were monitored by western-blot following 8 hours adhesion (Figure 3A). OPTN levels increase gradually with the stiffness, reaching a maximum of 6-fold increment on 8 kPa ECM compared to levels in cells cultured on 0.2 kPa ECM (Figure 3A and 3B). In contrast, the expression of HACE1 was constant at the different ECM compliances (Figure 3A, Sup Figure 3A). Given that OPTN expression can be transcriptionally induced by TNF- α and Interferon- γ (Schwamborn et al., 2000), we checked whether stiffness induction of OPTN is transcriptional. OPTN (Sup figure 3B) and HACE1 (Sup figure 3C) mRNA levels are constant in cells cultured on substrates of increasing stiffness. These data imply that ECM stiffness controls OPTN amounts at the protein level. Interestingly, we also observed an increase of the post-translational

processing of OPTN in response to matrix stiffening (Figure 3C). Together, this prompted us to monitor whether OPTN is involved in the tuning of the E3 ubiquitin ligase activity of HACE1 with ECM stiffness. We conducted ubiquitylation measures in cells expressing active Rac1Q61L cultured on fibronectin matrix of different compliance (Figure 3D). Remarkably, this revealed an increase of the ubiquitylation of Rac1Q61L as a function of ECM stiffening, suggesting an OPTN-dependent control of Rac1 ubiquitylation driven by ECM compliance. We then challenged our hypothesis by over-expressing OPTN in cells plated on low stiffness ECM (1-kPa), where endogenous OPTN expression is low (Figure 3E, 3A). While expression of OPTN in cells plated on plastic had no effect (Sup Figure 2B), we measured an OPTN-induced increase of Rac1 poly-ubiquitylation in cells plated on low stiffness ECM (Figure 3E).

Altogether, these data establish that Rac1 ubiquitylation by HACE1 is tuned by ECM stiffness via modulation of OPTN levels.

OPTN regulates Cell-Extracellular Matrix adhesion

The formation of cell-ECM adhesive structures depends on Rac1 activation (Vicente-Manzanares and Horwitz, 2011; Choi et al., 2008). To investigate if OPTN has a role in cellular adhesion, we performed a loss-of function approach and monitored cell-ECM adhesion structures by immunolocalization of alpha-5 beta-1 integrin, the receptor for fibronectin in our cells (Cailleateau et al., 2010), Paxillin and Zyxin. OPTN knockdown was verified (Sup. Figure 4A). Interestingly, cells knocked-down for OPTN displayed numerous centripetal focal adhesions (FA), as visualized by immunostainings of paxillin, alpha5 beta1 integrin (Figure 4A), Zyxin (Sup Figure 4B) and Vinculin (not shown). Interestingly, these cells also displayed a high number of large actin bundles extending across cells compared to controls (Figure 4A). Quantitative multi-parametric image analysis of FA staining revealed a higher number of adhesion structures in OPTN knocked-down cells, as well as an increase of FA mean area of 30% compared to control cells (Figure 4B). Accordingly, we measured a gain of cell adhesion on fibronectin, when cells are knocked-down for OPTN (Figure 4C). Collectively, our data suggest that OPTN restrains the formation or maturation of cell-ECM adhesions. As complementary approach, we expressed OPTN in cells and monitored cell-ECM adhesion structures by immunolocalization of alpha-5 beta-1 integrin and Paxillin and performed adhesion measurements on fibronectin (Figure 4D and 4E, Sup Figure 4C). Mirroring our loss-of-function approach, we observed the appearance of

peripheral dot-like adhesion structures resembling focal complexes in OPTN expressing cells (Vicente-Manzanares and Horwitz, 2011). OPTN expression also decreased centripetal FA (Figure 4D) and was associated with a 50% loss of cell adhesion on fibronectin (Figure 4E).

Altogether, our data show that OPTN limits the formation of mature cell-ECM adhesion structures.

OPTN controls the cell tensile forces exerted on the extracellular matrix

Adhesion structures are complex platforms of proteins, with a nanoscale stratified architecture, linking the acto-myosin cytoskeleton to the extracellular matrix (ECM). Thus adhesion structures transmit traction forces from actin stress fibers to the ECM and enable cells to sense the mechanical properties of the ECM (Discher et al., 2005; Vogel and Sheetz, 2006). Moreover, traction force generation on adhesion structures contributes to their growth and maturation by reinforcing protein clustering, allowing protein recruitment, integrin conformational activation and the stretching & unfolding of components to expose cryptic sites and enhance adhesion-mediated signaling (Grashoff et al., 2010; Vogel and Sheetz, 2006; Hytönen and Wehrle-Haller, 2016; Fouchard et al., 2014). Since OPTN is regulated by ECM compliance and modulates adhesion, we sought to determine if OPTN could regulate cell traction forces. We first used the parallel microplates technique, which allows one to measure in real time the force generated by a single cell on fibronectin-coated plates (Mitrossilis et al., 2009). In this setup, a single cell is caught between two parallel plates, on rigid and the other flexible with a calibrated stiffness k . The traction force F is measured through the deflection d of the flexible plate: $F = k d$. Giving the fact that cell traction forces increase with the rigidity of the substrate, we decided to test whether OPTN influences the maximum traction force the cells can generate, *i.e.* in infinite stiffness conditions (Mitrossilis et al., 2010). Individual traction force curves (Figure 5A) illustrate the difference in behavior between cells transfected with siRNA control (siCtrl) or targeting OPTN (siOPTN). The rate of force build-up (slope of the force curve, dF/dt) as well as the maximum traction force F_{max} (plateau after ~ 20 min) are lower in OPTN knocked-down cells. These observations were statistically confirmed with $F_{max} = 120 \pm 13$ nN and $dF/dt = 0.17 \pm 0.02$ nN/s in control conditions (19 cells), versus $F_{max} = 64 \pm 11$ nN and $dF/dt = 0.09 \pm 0.01$ nN/s (17 cells) in OPTN depleted cells (Figure 5B and 5C). Altogether, these data indicate that OPTN knocked-down cells build up half of the force that are exerted by control cells when they adhere to fibronectin, a situation that strikingly contrasts with their ability to generate numerous and large focal adhesions.

We then sought to determine if the decrease in contractile activity of OPTN knocked-down cells could also be observed in a more usual geometry of 2D-culture substrates, *i.e.* using traction force microscopy.

To this end, control and OPTN knocked-down cells were plated for 2 hours on 5 kPa fibronectin-coated hydrogels with embedded fluorescent nanobeads. Traction forces exerted by spread cells cause deformation of the hydrogel, which is monitored by the displacement of the beads. Bead displacements are measured using a combination of particle imaging velocimetry and single particle tracking onto bead images of the same fields with and without cells on top (Mandal et al., 2014). Traction forces are then calculated using Fast Fourier Transform Traction Cytometry (Sabass et al., 2008) from the measured displacement fields. Maps of traction force magnitude are shown in figure 5D for representative cells from OPTN and control knocked-down conditions. The traction stress is similarly distributed at peripheral zones of the cell in both control and OPTN knocked-down cells, without major differences in areas of location. Interestingly, OPTN knocked-down cells display reduced traction magnitude compared to control cells (Figure 5D). We could measure that OPTN knocked-down cells generate 3.5-fold less traction than control counterparts, with a mean force value of 72.46 ± 6.86 nN for OPTN depleted cells (n=41 cells) and 249.50 ± 24.32 nN for control cells (n=40 cells) (Figure 5E). We also calculated the total contractile energy generated by cells, which is obtained by integrating the scalar product of the force and displacement vectors across the entire cell. In accordance with total force measures, the contractile energy produced by OPTN knocked-down cells is lower than control cells (Figure 5F). This decrease in traction force measured for OPTN knocked-down cells plated on hydrogels could be replicated in an alternative setup, using micro-fabricated pillars of $9\text{nN}/\mu\text{m}$ stiffness (equivalent to 6 kPa gels) coated with fibronectin (Sup Figure 5) (Gupta et al., 2015b). Control and OPTN knocked-down cells adhered similarly on pillars and typical traction maps obtained after 3h for each cell population show that OPTN depleted cells have a reduced capacity to pull on pillars while control cells induce substantial centripetal deflection of pillars located at the cell periphery (Sup Figure 5A). The control cells reached a mean total force per cell of 305.50 ± 23.86 nN and expended 47.92 ± 5.93 fJ contractile energy (n=32 cells) (Sup Figure 5B, Sup Figure 5C) while OPTN knocked-down cells exerted a mean of 180.40 ± 15.28 nN total force per cell with a 13.79 ± 2.06 fJ mean contractile energy per cell (n=33 cells) (Sup Figure 5B, Sup Figure 5C). Altogether, we could assess by three independent approaches that loss of OPTN expression is associated with a decrease of cellular contractility. Thus, while OPTN knocked-down cells generate reduced traction

forces, they nevertheless form numerous FA when adhered on fibronectin, display higher Rac1 activity and an increased capacity to adhere on fibronectin. Collectively these data point toward a role of OPTN in coupling cell-ECM adhesion structures with intracellular traction forces.

OPTN couples Extracellular Matrix stiffness sensing with cell proliferative behavior and cyclin D1 expression

Rac1 activity is crucial for translating ECM stiffness into mechanosensitive cell cycling (Mack et al., 2011; Bae et al., 2014). Since OPTN tunes HACE1 E3 activity towards Rac1 with ECM stiffness and transmits forces through adhesion structures, we analyzed the role of OPTN in cell proliferative behavior. Compliance of the extracellular matrix has profound effects on proliferation. Tumor and fibrotic tissue microenvironments are often stiffer, a physical parameter that contributes to aberrant proliferation and pathological outcomes (Paszek et al., 2005; Levental et al., 2009; Gould et al., 2016). Conversely, cells cultured on low stiffness ECM have decreased cell cycle entry and cyclin D1 expression; and the softening of tissues inhibits tumor development (Klein et al., 2009; Levental et al., 2009). We monitored cellular proliferation on fibronectin-coated low (1 kPa) and High (8 kPa) stiffness hydrogels. The proportion of control cells that entered S and G2/M phases of the cell cycle doubled on high stiffness in comparison to low stiffness (Figure 6A and Sup Figure 6A), indicating that ECM stiffening stimulates cell proliferation in our experimental setup. Interestingly, OPTN knocked-down cells reached a maximal proliferation when plated on compliant ECM. This suggests that OPTN knocked-down cells gained the capacity to proliferate independently of ECM stiffening (Figure 6A and Sup Figure 6A). The analysis of cyclin D1 level shows a stiffness-dependent increase in control cells (Figure 6B and Sup Figure 6B). Interestingly, OPTN knocked-down cells present higher cyclin D1 levels, its amount in cells cultured on low stiffness (1 kPa) being stronger than in control cells cultured on high stiffness (8 kPa) ECM (Figure 6B and Sup Figure 6B). It is to be noticed that although OPTN depleted cells harbor higher amounts of cyclin D1 than control cells when cultured on high stiffness ECM, they do not gain further proliferative capacity. Since OPTN depleted cells generate low traction forces (Figure 5 and Sup Figure 5), this observation could be indicative that intracellular tension buildup is limiting to generate stronger proliferation.

Rac1 controls cyclin D1 transcription (Klein and Assoian, 2008) and HACE1 knocked-down cells display enhanced Rac1-dependant cyclinD1 transcription and proliferation (Daugaard et al., 2013).

Interestingly, we could measure that the increase of cyclin D1 level in OPTN knocked-down cells is not due to enhanced transcription of the gene nor stabilization of the mRNA (Figure 6C). Indeed both control and OPTN silenced cells display a similar 4- to 5-fold induction of their mRNA levels in response to mitogen stimulation, while HACE1 knocked-down cells display a 9-fold induction of cyclin D1 mRNA level in response to mitogens. Nevertheless, OPTN knocked-down cells display increased cyclin D1 protein level compared to controls, that involves Rac1 signaling (Sup Figure 6C). OPTN has been shown to regulate NF- κ B signaling (Zhu et al., 2007; Obaid et al., 2015) and NF- κ B controls cyclin D1 transcription downstream of Rac1 (Joyce et al., 1999; Perona et al., 1997; Klein et al., 2002; Mack et al., 2011).

Therefore we tested if OPTN acts as an effector of Rac1 in the induction of a transcriptional program, which would explain the lack of cyclin D1 transcriptional enhancement in OPTN silenced cells. To this aim, we measured cyclin D1 mRNA induction upon over-expression of the active Rac1Q61L mutant, in the context of OPTN silencing (Figure 6D). OPTN depletion had no impact on Rac1-mediated cyclin D1 transcription, ruling out the involvement of OPTN as an effector of Rac1 transcriptional signaling. We therefore sought to analyze cyclin D1 protein stability. The half-life of cyclin D1 was measured by treating proliferating control or OPTN silenced cells with cycloheximide (CHX), to inhibit synthesis of proteins, and the time course for the disappearance of cyclin D1 was determined (Figure 6E and 6F). Cyclin D1 is known to turnover rapidly. We measured a half life of cyclin D1 in control cells of about 12 minutes, in concordance with published half lives (Kim and Diehl, 2009; Diehl, 2002). The knock-down of OPTN had no impact on cyclin D1 stability, as indicated by the comparison of the decay curves (Figure 6F). Nevertheless a noticeable difference in cyclin D1 amount is seen at time 0, when CHX is added, suggesting a regulation of cyclin D1 protein synthesis (Figure 6E and 6F). Increased cyclin D1 neosynthesis could be confirmed by metabolic labelling of proteins over a one hour pulse with L-azidohomoalanine (AHA), followed by purification of labeled proteins from control or OPTN knocked-down cell lysates (Figure 6G). The enhanced rate of D1 translation could be verified in an alternative approach, where CHX was thoroughly washed and cells were incubated in chase medium without CHX to reverse translation inhibition. Cyclin D1 re-synthesis was markedly enhanced in OPTN silenced cells compared to controls (Sup Figure 6D and Sup Figure 6E). Altogether, these data demonstrate that silencing OPTN triggers an increase in cyclin D1 translation rate, without affecting cyclin D1 degradation, leading to higher accumulation of the protein. Interestingly, the global rate of protein

synthesis was similar in dividing control and OPTN knocked-down cells, suggesting the selectivity of enhanced protein synthesis from some mRNA, including cyclin D1 mRNA (Figure 6G).

One well-defined mechanism involved in the control of translation is the mTOR pathway. The mTOR kinase complex responds to nutrients availability, cellular energy and mitogens to regulate protein synthesis by controlling translation initiation and elongation (Ma and Blenis, 2009; Zoncu et al., 2011; Shimobayashi and Hall, 2014). This is achieved via phosphorylation of S6 kinase1 and eIF4E-Binding Protein 1 (4E-BP1) substrates. Unphosphorylated 4E-BP1 suppresses mRNA translation by interacting with the translation initiation factor-4E (eIF4E). Once phosphorylated by mTORC1, eIF4E is released and recruits the translation initiation factor-4G (eIF4G) to 5' oligopyrimidine-tract containing mRNA, allowing cap-dependent initiation of translation. When phosphorylated by mTORC1, S6 kinase1 phosphorylates several proteins, including ribosomal protein S6, to increase ribosome biogenesis, thereby promoting translation elongation. We monitored the phosphorylation level of these mTOR substrates in control and OPTN silenced cells (Figure 6H, Sup Figure 6F and Sup Figure 6G). The phosphorylation of the ribosomal S6 protein and 4E-BP1 gradually increase as a function of ECM stiffening in control cells, indicating that the mTORC1 kinase activity is controlled by ECM compliance. The silencing of OPTN was associated with increased phosphorylation of mTOR substrates, an event required for enhanced cyclin D1 translation (Sup Figure 6H). We could also establish that mTORC1 activation by ECM stiffness involves Rac1 activity, since pharmacological inhibition using EHT1864 dampens stiffness-induced ribosomal S6 phosphorylation in control but also in OPTN knocked-down cells (Sup Figure 6I). Interestingly, mTORC1 and mTORC2 activation by growth factors requires association with Rac1 for proper mTOR membrane localization, an event that occurs independently of Rac1 nucleotide-bound state (Saci et al., 2011). In our system, OPTN impacts Rac1 cellular level by controlling HACE1-mediated proteasomal degradation of the Rac1 active form. Therefore, such regulation of the mTORC1 complex membrane anchoring could take place in OPTN depleted cells. In conclusion, our data indicate that OPTN controls the ECM-mediated stimulation of the mTOR pathway, thereby adapting cyclin D1 translation rate and the capacity of cells to proliferate as a function of ECM stiffness.

OPTN tunes adhesion-mediated signaling to ECM stiffness

Integrins belong to a key family of mechanoreceptors that convert mechanical cues into chemical signaling. Since OPTN regulates integrin-mediated cell-ECM adhesion (Figure 4), we analyzed if OPTN more generally impacts integrin-mediated signaling. Key aspects of tensional sensing and tension-induced signaling within FA involves the FAK-Src tyrosine-kinase module, that phosphorylates substrates in the FA upon stretch-dependent unfolding and unmasking of sites (Pasapera et al., 2015; Sawada et al., 2006). We analyzed the activity of these kinases in control and OPTN silenced cells by monitoring their auto-phosphorylation and the phosphorylation of paxillin and p130CAS critical targets (Figure 7). FAK phosphorylation on tyrosine 397 was induced by ECM stiffening in control cells. The silencing of OPTN was associated with a lack of stiffness-dependent induction of tyrosine 397 phosphorylation of FAK, the level of phosphorylation being moderate and constant from low to high stiffness (Figure 7A and 7B). Interestingly, Src family kinases activity was strongly induced in OPTN knocked-down cells, and showed equal strength of activation in cells plated at low and high stiffness ECM (Figure 7A and 7C). The phosphorylation of paxillin on tyrosine 118, which depends on the FAK-Src kinase module, was gradually induced in control cells but displayed stronger levels in OPTN silenced cells, with almost no difference between low and high stiffness (Figure 7A and 7D). Similarly, p130cas phosphorylation on tyrosine 410, which is regulated by stiffness-induced unfolding of the protein (Sawada et al., 2006), is gradually induced by ECM stiffening in control cells while it is strongly stimulated even at low stiffness in OPTN silenced cells (Figure 7A and 7E). In conclusion, we observe that OPTN knockdown leads to high and stiffness-independent activation of Src family kinases, despite low FAK activity, leading to enhanced adhesion-mediated signaling regardless of ECM stiffening.

DISCUSSION :

Our work ascribes to OPTN a role in mechanotransduction through modulation of HACE1 E3 ubiquitin ligase activity on Rac1 in response to Extra-Cellular Matrix (ECM) stiffness, in order to insure proper tensional integrity and accurate cell cycle progression. We link OPTN-driven regulation of Rac1 to the organization of mature focal adhesion (FA) structures connected to tensile actin cables, that will equilibrate cell and ECM traction forces. Subsequently, OPTN tunes the strength and nature of signaling that emanates from FA to control the mTOR pathway and adapt cyclin D1 translation rate with ECM mechanical properties. Mechanistically, we show that in response to matrix stiffening and Rac1 signaling, OPTN is processed to generate a form devoid of ZnF domain. The ZnF-depleted form of OPTN associates with the HACE1 E3 ubiquitin ligase, thereby inducing ubiquitylation of active Rac1. We determine that OPTN is processed in response to Rac1Q61L expression to gain HACE1 binding capacity. This cleavage necessitates a native folded ZnF domain, and a functional UBAN domain, since point mutations in these domains alter OPTN processing. ZnF and UBAN domains are known to be involved in the recognition of K63 linkage or linear ubiquitin chains, suggesting the involvement of a poly-ubiquitylated protein that is either the protease itself or a protein that localizes OPTN at a specific zone of cleavage. Since OPTN processing is mechanoresponsive, one possibility is that it takes place at FA where OPTN or the protease might be recruited via a binding to poly-ubiquitin chains. For example, Paxillin recruitment at the adhesion site was reported to be regulated by RNF5 E3 ligase mediated K63-ubiquitylation (Didier et al., 2003), informing us that some proteins of the FA are subjected to such modification and could drive OPTN recruitment and processing at the site of FA. Although HACE1 was shown to regulate K63-type ubiquitylation of TRAF2 *in vitro* (Tortola et al., 2016), we could exclude its contribution in OPTN processing since HACE1 knockdown (Sup Figure 1C) or the expression of a dominant catalytic-inactive C876S mutant of HACE1 (not shown) do not interfere with OPTN cleavage. We also ruled out contribution of the autophagy pathway in the processing of OPTN, since 1) a mutation abrogating OPTN association to LC3 and 2) the deletion of a zone of OPTN that has been suggested to mediate its ubiquitylation by HACE1 for p62/SQSTM1 interaction had no impact on Rac1-induced interaction of OPTN with HACE1 in our system (Sup Figure 1D) (Wild et al., 2011; Liu et al., 2014). OPTN was recently identified as a calpain substrate in neurodegenerative diseases models as ionomycin-treated rat dopaminergic neuron cultures and ischemia- or neurotoxin-damaged rat brains (Kim et al., 2013). Therefore, we can hypothesize that a specific calpain processes OPTN C-terminus at

cell-ECM adhesion sites. In link with this hypothesis, Calpains I and II do cleave proteins of the FA, including Paxillin, FAK and Talin (Franco and Huttenlocher, 2005; Huang et al., 2009), a function involved in the turnover of adhesion structures during migration and integrin inside-out activation. Thus, calpain involvement in Rac1-mediated proteolysis of OPTN is an appealing hypothesis to be tested in the future.

It is firmly established that regulation of Rac1 by ubiquitylation is function of its strength of activation. This holds true for activation via the action of GEF regulatory proteins, point mutations and bacterial toxin-mediated Q61 deamidation of Rac1 (Mettouchi and Lemichez, 2012). Here we report the first regulator of HACE1 tumor suppressor E3 ubiquitin ligase activity, Optineurin, the activity of which is modulated by the rigidity of the extracellular matrix. Indeed, OPTN expression and processing increase as a function of the ECM stiffness. Moreover OPTN expression in cells plated on matrix of low compliance increases levels of Rac1 ubiquitylation. Thus, OPTN restrains the threshold of Rac1 activation in response to increase of matrix stiffness by controlling the extent of degradation of Rac1 active form. Interestingly, a parallel can be drawn with the filamin /FilGAP system, which has been shown to regulate Rac1 activation in response to mechanical stretch during embryonic remodeling of the mitral valve (Gould et al., 2016). Indeed, when the actin-binding protein Filamin A is mechanically deformed, its rod2 region is spatially separated, thereby regulating FilGap accessibility and Rac1 inactivation (Ehrlicher et al., 2011). Interestingly, during the mitral valve remodeling, FilGAP activity is also under the control of RhoA, which stimulates the GAP activity via ROCK-mediated phosphorylation to operate a transition from RhoA- to Rac1-governed signaling for correct embryonic development (Gould et al., 2016). In our system, we did not measure any difference of RhoA activation in control and OPTN silenced cells (not shown). Accordingly, our proteomics analysis of OPTN posttranslational modifications in response to Rac1Q61L expression revealed no difference in OPTN phosphorylations, thereby minimizing a contribution of the RhoA-ROCK pathway in the control of the OPTN-HACE1 axis. So, the OPTN-HACE1 system that we describe represents a second example of negative regulation of Rac, induced by mechanical stain of the actin cytoskeleton.

We show that OPTN operates a control of Rac1 activity and FA number and size. Nascent adhesions mature into focal complexes and then larger and elongated FA through myosin II-mediated actomyosin contraction. FA respond to tension by changing composition and activation status of some proteins and triggering enhanced signaling (Zaidel-Bar and Geiger, 2010; Schiller et al., 2011; Kuo et al., 2011). Interestingly, it has to be noted that tension-induced FA maturation involves

downregulation of Rac1 activity through dissociation of activating proteins, like β -PIX, and effectors (Kuo et al., 2011). Our data showing that OPTN is regulated by ECM stiffness and is a negative regulator of Rac1 activity through induction of its degradation by HACE1 is in complete agreement with the notion that Rac1 has to be restrained for FA maturation, while FA turnover involves Rac1 activity. Interestingly, we found that OPTN silenced cells exhibit paradoxical impaired traction force buildup when adhered on fibronectin, although they display numerous and larger FA than control cells and have increased fibronectin attachment capacity. Probing critical components downstream integrin signaling indicated that hallmarks of contraction-dependent FA signaling are fulfilled in OPTN silenced cells. For example, high levels of FAK-Src-dependent phosphorylation of paxillin on Y118 (Pasapera et al., 2015) and p130CAS substrate domain on Y410 (Sawada et al., 2006), which are both exposed upon tension-induced stretching of the protein, are achieved upon adhesion of OPTN knocked-down cells. Furthermore, Zyxin, a protein enriched in FA in response to tension (Hirata et al., 2008; Schiller et al., 2011), is reinforced at FA of OPTN knocked-down cells. Interestingly, Zyxin is also important for the repair and remodeling of stress fibers after an increased tension (Yoshigi et al., 2005; Smith et al., 2014). In this situation, zyxin experiences a relocation from FA to strain sites on the actin fiber (Hirata et al., 2008), where it recruits an actin cross-linking and polymerization machinery to repair the strain zone. OPTN silenced cells harbor reinforced zyxin immunolabelling at FA, but also a marked decoration of stress fibers (Sup Figure 4B). This may be indicative of constant actin remodeling processes or mechanical stress due to failure to assemble, reinforce and/or stabilize stress fibers when OPTN is missing. Such situation could contribute to the reduction in cell-ECM pulling force that we measure and speaks for a critical function of OPTN as a mechanotransducer molecule. The phenotype we describe appears paradoxical in the current view of FA formation and maturation, since OPTN silenced cells seem to form mature FA that are uncoupled from tension. This apparent paradox can be discussed in the context of Rac1 increase in activity measured in OPTN silenced cells. It is established now that there is a pushing force originating from the actin polymerization activity at early adhesion sites (Roca-Cusachs et al., 2012) that might be involved in the stretching of mechano-responsive proteins. In line with this, p130cas substrate domain phosphorylation, induced by stretching of the cytoskeleton (Sawada et al., 2006), was shown to be also stimulated upon N-WASP-Arp2/3 driven actin polymerization (Zhang et al., 2014). Accumulation of active Rac1 in OPTN silenced cells could intensify this response. Moreover, recent reports evidence a role of stress fibers assembly at the adhesion site as a structural template that facilitates maturation, with the demonstration that 20% only of myosin-

dependent cellular tension is enough for compositional maturation of FA (Oakes et al., 2012). In our cells, knocking down OPTN leads to a decrease of 40% to 70% in traction forces, depending on the experimental setup, which indicates that we are in a range of tension compatible with an actin template-driven maturation mechanism. Pertinent studies also show that deformation of the cell cortex, a situation experienced by cells upon Rac-driven branched actin polymerization, induces a rapid increase in cytoplasmic G-actin, that induces mDIA1 processive activity and subsequent increase in F-actin amounts. This mechanosensitivity of mDIA1 and FRL1 formins requires actin turnover, but RhoA activity is dispensable (Higashida et al., 2013). Thus, in accordance with these studies, an actin-template-mediated mechanism, that would take over an actin-contraction-mediated process, may contribute to FA growth in OPTN depleted cells.

Altogether, our transdisciplinary study establishes the critical requirement of OPTN to the coupling between cells internal tension and maturation of FA, to adaption of FA signaling to the ECM stiffness, and finally to the control of a proper mechanosensitive cell cycle progression via regulation of HACE1 E3 ubiquitin ligase activity on Rac1. Indeed, silencing of OPTN leads to acquisition of enhanced integrin-mediated adhesion and ECM stiffness-independent signaling and proliferation, attributes that may contribute to HACE1 and OPTN recognized tumor suppressor function (Zhang et al., 2007; Liu et al., 2014).

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Cell culture and transfection

Primary human vein endothelial cells (HUVECs) were cultured in human endothelial SFM medium (Invitrogen) containing 20% fetal bovine serum, 20 ng/ml FGF-2, 10 ng/ml EGF, 1 µg/ml heparin referred to as 'complete SFM'. Experiments on fibronectin (BD-Biosciences) were carried out with G0-synchronized cells, that were plated unless otherwise specified in a serum-free human endothelial SFM medium containing 20 ng/ml FGF-2, 10 ng/ml EGF, 1 g/ml heparin and ITS+1 supplement (Sigma), referred to as 'defined SFM'. G0-synchronization was achieved upon 15h serum and growth factors starvation of confluent cultures. Cells were electroporated at 300 V, 450 µF with 10 µg plasmids of : HA-HACE1, Myc-Rac1Q61L, Myc-Rac1N17T, HA-Rac1Q61L, Myc-HACE1, Flag-OPTN and Flag-OPTN mutants D474N, Δ ZnF, C575A, Δ HIR and F178A. OPTN mutants were obtained by mutagenesis (QuickChange Lighting, Agilent) using listed primers (see Table 1). Constructs were verified by DNA sequencing.

For RNAi experiments, the ON-TARGETplus siRNA J-016269-05 (Dharmacon) targeting human OPTN and SR-CL000 (Eurogentec) as a control were used at 100 nM with the magnetofection technology (OZ Biosciences) following the manufacturer's instructions. Cells were used 48h post-magnetofection. Hydrogels of different stiffness were purchased from Matrigen. The CNF1 toxin was prepared as in (Flatau et al., 1997) and used at 10^{-9} M. Pharmacological inhibitors used are EHT1864 (10µM, Merck-Millipore), Torin (1µM, 2µM and 10µM, Tocris), Cycloheximide (10nM, Sigma-Aldrich). For pulse chase experiments, cells were treated for 90min with 10nM Cycloheximide (CHX) before being washed twice and pulsed with complete medium for 15min and 30min. Cells were lysed with RIPA buffer at each time point before analysis by western blot.

Cell-biology techniques

Immunofluorescence was performed on paraformaldehyde-fixed cells, permeabilized in 0.5% Triton X-100. FITC-phalloidin 1 µg/ml (Sigma) was used to stain actin and DAPI (LifeTechnologies) for nuclei. The adhesive structures were stained with antibodies against Paxillin (BD-Transduction Laboratories), Zyxin (ZZ001 invitrogen), integrin alpha 5 (AB1928, Chemicon). Images were acquired on a Nikon A1R confocal laser microscope using 60x oil objective. Quantitative multiparametric image analysis (QMPIA) of immunofluorescence images was done in two sequential rounds of calculations by the automated image analysis software, Motion Tracking (<http://motiontracking.mpi-cbg.de>), described

in (Gilleron et al., 2013). Briefly, in the first round, nuclei were found by a maximum entropy-based local thresholding and cells by a region-growing algorithm based on the watershed transform. Additionally, aiming at the identification of fluorescent structures, image intensity was fitted by a sum of powered Lorentzian functions. The coefficients of those functions were then used to describe the features of individual objects (e.g. intensity, and area). In the second round, a set of statistics was extracted from the distributions of the fluorescent structures parameters measured in the first round. From this automated pipeline of analysis the numbers and areas of each fluorescent structures were extracted per cells and a mean values per images were obtained. The mean of the control cells for each parameter was normalized to 1 allowing a fold representation of the variations of knocked-down cells vs control cells. Graphs represent the normalized mean +/- standard error to the mean.

DNA content was determined upon staining ethanol-fixed cells with 40 µg/ml propidium iodide in 0.1% NP-40 and analysis on a BD FACS Aria flow cytometer.

For adhesion assays, cells were detached and re-plated in triplicate in 96-well microtiter plates coated with fibronectin for periods of 7 to 15 minutes. Non-adhering cells were removed by inverting plates and attached cells were fixed and stained with Crystal Violet. The extent of adhesion to the substrate was determined as a function of absorbance upon elution of the dye and reading of the optical density (540 nm). The blank value corresponding to BSA-coated wells was systematically subtracted.

Biochemical techniques

For co-immunoprecipitation experiments, HUVECs (10^7 cells) were transfected using either 40µg of pCMV2-Flag-OPTN WT or mutants, 40µg of pKH3-HA₃-Hace1, with or without 30µg of pRK5-myc-Rac1Q61L or pRK5-myc-Rac1N17T as indicated in the figure legends. Cells were lysed in 1ml of RIPA buffer (25mM Tris-HCl pH 7.6, 150mM NaCl, 1% NP-40, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS). Cleared lysates were incubated 2 hours at 4°C with 30µl of pre-cleared slurry EZ view Red Anti-FLAG M2 Affinity Gel beads (Sigma). Beads were washed three times with RIPA and resuspended in 50 µl of Laemmli buffer. Proteins were resolved on 4-12% SDS-PAGE. 0.05% of the total lysate was mixed with Laemmli buffer and loaded (INPUT) to check expression levels. For metabolic labeling, cells were pulsed with L-azidohomoalanine (AHA, 50 µM, 1h). Cell lysates were subjected to a Click-iT reaction (Molecular Probes) with biotin alkyne followed by streptavidin pull-down following manufacturer instructions, and newly synthesized proteins were detected by Western blot.

For Western blot, primary antibodies used were mouse anti-HA (HA.11 clone 16B12, Covance), anti-c-myc (9E10 clone, Roche), anti-Flag (M2, SIGMA), anti-Rac (BD Transduction Laboratories), anti-Flotilin (BD Transduction Laboratories), anti-Transferrin Receptor (H68.4, Zymed), anti-Src (Cell Signaling Technologies, CST 2108) and anti-FAK (BD-Transduction 610088) or anti-OPTN (Abcam 23666; Santa Cruz sc-271549; Sigma SAB2101684), cyclin D1 (Santa Cruz sc-718), p-S6-s235/236 (CST 2211), S6 (CST 2317), p-4E-BP1 (CST 9451, 4E-BP1 (CST 9644), p-FAK-Y397 (BD Transduction 611807), p-Src-Y416 (CST 2101), anti-Paxillin (BD Transduction 610052) p-Paxillin-Y118 (Invitrogen 447722G), p-P130CAS-Y410 (CST 410) anti-GAPDH (Santa Cruz). Secondary antibodies used were HRP-conjugated anti-mouse or anti-rabbit (DAKO). Signals were imaged using the Fujifilm LAS-3000 system and quantified with Image J software.

For *in vivo* ubiquitylation measurements, HUVECs (5×10^6) were transfected with 5 μ g of His-tagged ubiquitin expression vector together with 5 μ g of HA-tagged Rac1 Q61L and Myc-tagged HACE1 WT constructs. Ubiquitylated proteins were purified by His-tag affinity purification on cobalt resin in denaturing conditions, as described in (Doye et al., 2002).

Isopycnic density-gradient centrifugation was performed upon lysis for 30 minutes at 4°C of 7.10^6 cells in 150 μ l of lysis buffer 1% Triton X100, NaCl 150mM, Tris 25mM pH 7,4. For each gradient, we used 120 μ l of cell lysate mixed with 240 μ l of 60% OptiPrep™ (Sigma) prepared in Tris 25mM pH 7,4 and NaCl 150mM to yield 40% sucrose. Then, 300 μ l of the prepared mixture was sequentially overlaid with 600 μ l of 30% sucrose in Tris 25mM and pH 7,4 NaCl 150mM followed by 300 μ l of Tris 25mM pH 7,4 NaCl 150mM buffer. The tubes were centrifuged at 100,000g for 2 hours at 4°C (S55S rotor, Sorvall-RC-M120GX). 8 Fractions of 150 μ l were collected from the top of the tube and resolved on SDS-PAGE. All steps were done at 4°C.

Rac-GTP affinity pull down were done as described in (Doye et al., 2002).

For qRT-PCR, RNA was extracted from cultured HUVECs using RNeasy kit (Qiagen). Reverse transcription was performed on 1 μ g total RNA using the high capacity c-DNA Reverse transcription kit (Applied Biosystems) according to manufacturer's instructions. The following primers were used for amplification on a StepOne Real Time PCR system (Applied Biosystems) (OPTN : forward CAAGCCATGAAAGGGAGATTTGA, reverse GCCATTAGACGCTCTTTTGCTTC ; HACE1 : forward CATTCCACCCTCCCTCATACA, reverse ATCCAATCACTCACATCAATTTCTG ; cyclin D1 : forward TGTTTGCAAGCAGGACTTTG, reverse TCATCCTGGCAATGTGAGAA ; 36B4 : forward TGCATCAGTACCCCATCTATCAT, reverse AAGGTGTAATCCGTCTCCACAGA).

Biophysical techniques

Traction Force Measurements using the parallel microplates setup

Traction force measurements with the parallel plates setup are similar in their principle to AFM force measurements, which are based on the deflection of a cantilever of known stiffness. The difference here is that the mechanical setup is coupled with a bright-field monitoring of cell shape evolution during force generation (Desprat et al., 2006). In brief, a single cell is caught between two parallel plates, one rigid and the other flexible with a calibrated stiffness k . The traction force F is measured through the deflection d of the flexible plate: $F = k d$ (Mitrossilis et al., 2009). Moreover, we developed an original real-time stiffness-control feedback loop, allowing us to set the apparent stiffness felt by the cell from 0 to an infinite value (Mitrossilis et al., 2010). All experiments presented here were done in these infinite stiffness conditions to ensure that we were really measuring the maximum traction force that a single cell could generate in the parallel plates geometry.

Before experiments, glass plates are pulled using a micropipette puller (PB-7; Narishige) and shaped with a microforge (MF-900; Narishige). Then, the stiffness k of the flexible plates is calibrated (Desprat et al., 2006). During the experiments, the flexible glass plate is illuminated through bright light and its deflection d is optically detected in real time by a position sensitive detector (Hamamatsu) used in inverted-contrast mode (Desprat et al., 2006). Technically, Glass microplates were cleaned 10 min in "piranha" mixture (67% sulfuric acid + 33% hydrogenperoxyde), rinsed in water, dipped in a (90% ethanol + 8% water + 2% 3-aminopropyltriethoxysilane) bath for 2 h, then rinsed in ethanol and water. Finally, microplates were coated with 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ fibronectin (Sigma). Cells were trypsinized and suspended in defined SFM. First, the rigid and flexible microplates were placed near the bottom of the manipulation chamber. Then, the chamber was filled with suspended cells, and we waited until deposition of cells on the chamber's bottom. The microplates were then lowered toward the chamber's bottom and placed in contact with a cell. After a few seconds, the two microplates were simultaneously and smoothly lifted to 60 μm from the chamber's bottom to get the desired configuration of one cell adherent between two parallel plates. Cells spreading between the microplates were visualized under bright light illumination with a Plan Fluotar L 63x/0.70 objective and a Micromax digital CCD camera (Princeton Instruments, Roper Scientific). The setup, enclosed in a Plexiglas box, was maintained at 37 ± 0.2 °C by an Air-Therm heater controller (World Precision Instruments). Vibration isolation was achieved by a TS-150 active anti-vibration table (HWL Scientific Instruments GmbH).

Traction force measurements on polyacrylamide hydrogels

Carboxylate-modified polystyrene fluorescent beads (dark red 200nm, Invitrogen F-8807) were sonicated for 3 minutes and then mixed to a 5kPa polyacrylamide solution prior to adding ammonium persulfate (APS) and N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine (TEMED). The gel was poured and let polymerize in between 25mm glass coverslips, one is previously silanized and the other is coated with fibronectin (Sigma) and Alexa546-conjugated fibrinogen (Invitrogen), as described in (Tse and Engler, 2010). During polymerization, the hydrogel adheres to the silanized coverslip and fibronectin proteins are trapped on top of the acrylamide mesh. Coverslips are gently separated in deionized water, the 5kPa fibronectin-coated gel is retrieved with the silanized coverslip and used after couple of washes in PBS. Cells were seeded at low density in defined medium and imaged after 2 hours adhesion. Beads and cells were then imaged using a 63X oil objective lens (numerical aperture 1.4) combined with a 1.5 optical multiplier on a Nikon Ti-E microscope with a CCD camera (CoolSnap, Roper Scientific) and driven with Manager. While imaging, cells are kept at 37°C. Cells were then gently trypsinized and a second set of beads images was done at the same coordinates. Force calculations were performed as described in (Mandal et al., 2014) : bead displacement is measured through a 2 step cross-correlation between bead images of substrate with and without adherent cells on top. Pictures corrected for experimental drift, are divided into 6.72 μm^2 square windows to yield the average displacement, then processed with a regular grid of 0.84 μm spacing using linear interpolation, to achieve high spatial resolution. Force reconstruction was conducted with the assumption that the substrate is a linear elastic half space, using Fourier Transform Traction Cytometry with zero-order regularization (Sabass et al., 2008). All calculations and image processing are performed using the Matlab software.

Traction force measurements on micropillar substrates

Micropillar substrates were prepared using previously published methods (Gupta et al., 2015a). Briefly, the elastomer polydimethylsiloxane (PDMS, Sylgard®184 Silicone Elastomer Kit, Dow Corning), was cast using patterned silicon wafers as molds. The uncured PDMS (with a base-polymer-to-cross-linker ratio of 10:1) was cast by pouring it on the silicon wafers and then baking them at 80°C for 2 hours to cure the PDMS. The cured PDMS had a Young's modulus of ~ 2 MPa. The micropillars had a diameter of 2 μm and a height of 9 μm , resulting in stiffness 9 nN/ μm . The stiffness was calculated using Finite Element Method. After de-casting the PDMS micropillar substrates from the silicon wafers, micro-contact printing was used to selectively deposit fibronectin (conjugated with

the fluorescent far-red dye ATTO647N) on micropillar tops. In order to prevent cell adhesion and migration in between micropillars, the substrates were immersed in Pluronic®F-127 solution for 1 hour. The substrates were then rinsed with PBS and used for cell culture. Cells were allowed to adhere for 3-4 hours before imaging. Force (F) on a micropillar was calculated as $F = k x$, where k is the micropillar stiffness and x is the micropillar displacement. Strain Energy (E) stored in a micropillar was calculated as $E = 0.5 k x^2$

Statistical analysis

Data were expressed as the mean \pm SD. Statistical analysis was determined with the GraphPad-Prism 5.0 software using unequal sample sizes and equal variance Student t -test, with $*p \leq 0.05$, $**p \leq 0.01$, $***p \leq 0.001$ considered statistically significant. The two-tailed P values are indicated in the figure legends.

AUTHOR CONTRIBUTIONS:

Conceptualization : A.M., E.L.; Methodology : A.M., E.L., A.A., D.H., L.G. ; Investigation : D.H., A.D., A.M., A.A., E.V., M.G., O.V., P.M. ; Resources : M.D., P.H.S., J.G., A.A., M.B., B.L., P.T., Data validation and analysis : D.H., A.M., E.L., A.A., M.B, B.L. ; Visualization: D.H., A.D., A.M.; Writing : E.L. and A.M.; Supervision : E.L. and A.M.; Funding Acquisition : E.L. and A.M.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by institutional INSERM funding, "Investments for the Future" Labex SIGNALIFE ANR-11-LABX-0028-01 and grants from the Ligue Nationale contre le Cancer (LNCC), FRM-Piraud prize to E.L., LNCC PhD fellowship to D.H., ARC post-doctoral fellowship to O.V., the Vancouver Prostate Centre to M.D., and Team Finn and The Ride to Concur Cancer to P.H.S., Fundings from Agence Nationale de la Recherche to A.A. ("ImmunoMeca" ANR-12-BSV5-0007-01, "Initiatives d'excellence" Idex ANR-11-IDEX-0005-02, and "Labex Who Am I?" ANR-11-LABX-0071). B.L. acknowledges financial supports from the Mechanobiology Institute, the European Research Council under the European Union's 7th Framework Programme (FP7/2007-2013) / ERC n° 617233, NUS-USPC collaborative program and the LABEX "Who am I?". Microscopy was performed on the C3M Imaging Core Facility (part of Microscopy and Imaging platform Côte d'Azur, MICA). The Nikon A1R-FLIM microscope was funded by Conseil Général Alpes-Maritimes and Région PACA. The authors would like to thank Yannis Kalaidzidis from the laboratory of Marino Zerial (MPI-CBG, Dresden, Germany) for the free access to Motion tracking software, the production and bioinformatics teams at Hybrigenics Services, and A. Loubat at the iBV-Cell sorting Facility for their technical support.

The authors declare no conflict of interest.

Table 1 : List of mutagenesis primers

Mutant	5' Oligonucleotide	3' Oligonucleotide
C575A	gactggtaccctaaatgatggcatccatcacgtgaatctgta	tacagattcacgtgatggatgcatcatttaggtaccagtc
△ZnF	cttggggcaggactaaatcggaatattccgctgttgcc	ggcaacagcggaaatattccgatttagtcctgcccgaag
D474N	ctgctctttcagcatgaaaattagaacagtaaacttccatctg	cagatggaagtttactgttctaattttcatgctgaaagagcag
F178A	agccatcctaatttcaacagcggaaatcttctgaggagccg	cggctcctcagaagattccgctgttgaaattaggatggct
△HIR	ataataatgcattgaaaacaattgaggaactagacctggaaac catgac	gtcatggttccaggtctagttcctcaattgttttcaatgcattattat

REFERENCES

- Anglesio, M. S., Evdokimova, V., Melnyk, N., Zhang, L., Fernandez, C. V., Grundy, P. E., Leach, S., Marra, M. A., Brooks-Wilson, A. R., Penninger, J., and Sorensen, P. H. (2004). Differential expression of a novel ankyrin containing E3 ubiquitin-protein ligase, Hace1, in sporadic Wilms' tumor versus normal kidney. *Hum Mol Genet* *13*, 2061-2074.
- Bae, Y. H., Mui, K. L., Hsu, B. Y., Liu, S. L., Cretu, A., Razinia, Z., Xu, T., Puré, E., and Assoian, R. K. (2014). A FAK-Cas-Rac-lamellipodin signaling module transduces extracellular matrix stiffness into mechanosensitive cell cycling. *Sci Signal* *7*, ra57.
- Burridge, K., and Wittchen, E. S. (2013). The tension mounts: stress fibers as force-generating mechanotransducers. *J Cell Biol* *200*, 9-19.
- Cailleteau, L., Estrach, S., Thyss, R., Boyer, L., Doye, A., Domange, B., Johnsson, N., Rubinstein, E., Boucheix, C., Ebrahimian, T., Silvestre, J. S., Lemichez, E., Meneguzzi, G., and Mettouchi, A. (2010). alpha2beta1 integrin controls association of Rac with the membrane and triggers quiescence of endothelial cells. *J Cell Sci* *123*, 2491-2501.
- Castillo-Lluva, S., Tan, C. T., Daugaard, M., Sorensen, P. H., and Malliri, A. (2013). The tumour suppressor HACE1 controls cell migration by regulating Rac1 degradation. *Oncogene* *32*, 1735-1742.
- Chen, Z., Borek, D., Padrick, S. B., Gomez, T. S., Metlagel, Z., Ismail, A. M., Umetani, J., Billadeau, D. D., Otwinowski, Z., and Rosen, M. K. (2010). Structure and control of the actin regulatory WAVE complex. *Nature* *468*, 533-538.
- Cherfils, J., and Zeghouf, M. (2013). Regulation of small GTPases by GEFs, GAPs, and GDIs. *Physiol Rev* *93*, 269-309.
- Choi, C. K., Vicente-Manzanares, M., Zareno, J., Whitmore, L. A., Mogilner, A., and Horwitz, A. R. (2008). Actin and alpha-actinin orchestrate the assembly and maturation of nascent adhesions in a myosin II motor-independent manner. *Nat Cell Biol* *10*, 1039-1050.
- Daugaard, M., Nitsch, R., Razaghi, B., McDonald, L., Jarrar, A., Torrino, S., Castillo-Lluva, S., Rotblat, B., Li, L., Malliri, A., Lemichez, E., Mettouchi, A., Berman, J. N., Penninger, J. M., and Sorensen, P. H. (2013). Hace1 controls ROS generation of vertebrate Rac1-dependent NADPH oxidase complexes. *Nat Commun* *4*, 2180.
- del Pozo, M. A., Alderson, N. B., Kiosses, W. B., Chiang, H. H., Anderson, R. G., and Schwartz, M. A. (2004). Integrins regulate Rac targeting by internalization of membrane domains. *Science* *303*, 839-842.

del Pozo, M. A., Balasubramanian, N., Alderson, N. B., Kiosses, W. B., Grande-García, A., Anderson, R. G., and Schwartz, M. A. (2005). Phospho-caveolin-1 mediates integrin-regulated membrane domain internalization. *Nat Cell Biol* 7, 901-908.

Del Pozo, M. A., and Schwartz, M. A. (2007). Rac, membrane heterogeneity, caveolin and regulation of growth by integrins. *Trends Cell Biol* 17, 246-250.

Desprat, N., Guiroy, A., and Asnacios, A. (2006). Microplates-based rheometer for a single living cell. *Review of scientific instruments* 77, 055111-055119.

Didier, C., Broday, L., Bhoumik, A., Israeli, S., Takahashi, S., Nakayama, K., Thomas, S. M., Turner, C. E., Henderson, S., Sabe, H., and Ronai, Z. (2003). RNF5, a RING finger protein that regulates cell motility by targeting paxillin ubiquitination and altered localization. *Mol Cell Biol* 23, 5331-5345.

Diehl, J. A. (2002). Cycling to cancer with cyclin D1. *Cancer Biol Ther* 1, 226-231.

Discher, D. E., Janmey, P., and Wang, Y. L. (2005). Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate. *Science* 310, 1139-1143.

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., Jagannathan, J., Latorre, V., Iolascon, A., Hakonarson, H., Devoto, M., and Maris, J. M. (2012). Common variation at 6q16 within HACE1 and LIN28B influences susceptibility to neuroblastoma. *Nat Genet* 44, 1126-1130.

Doye, A., Mettouchi, A., Bossis, G., Clement, 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.

Ehrlicher, A. J., Nakamura, F., Hartwig, J. H., Weitz, D. A., and Stossel, T. P. (2011). Mechanical strain in actin networks regulates FilGAP and integrin binding to filamin A. *Nature* 478, 260-263.

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

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.

Fouchard, J., Bimbard, C., Bufi, N., Durand-Smet, P., Proag, A., Richert, A., Cardoso, O., and Asnacios, A. (2014). Three-dimensional cell body shape dictates the onset of traction force generation and growth of focal adhesions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, 13075-13080.

Franco, S. J., and Huttenlocher, A. (2005). Regulating cell migration: calpains make the cut. *J Cell Sci* 118, 3829-3838.

- Gilleron, J., Querbes, W., Zeigerer, A., Borodovsky, A., Marsico, G., Schubert, U., Manygoats, K., Seifert, S., Andree, C., Stöter, M., Epstein-Barash, H., Zhang, L., Koteliansky, V., Fitzgerald, K., Fava, E., Bickle, M., Kalaidzidis, Y., Akinc, A., Maier, M., and Zerial, M. (2013). Image-based analysis of lipid nanoparticle-mediated siRNA delivery, intracellular trafficking and endosomal escape. *Nat Biotechnol* *31*, 638-646.
- Goetz, J. G., Minguet, S., Navarro-Lérida, I., Lazcano, J. J., Samaniego, R., Calvo, E., Tello, M., Osteso-Ibáñez, T., Pellinen, T., Echarri, A., Cerezo, A., Klein-Szanto, A. J., Garcia, R., Keely, P. J., Sánchez-Mateos, P., Cukierman, E., and Del Pozo, M. A. (2011). Biomechanical remodeling of the microenvironment by stromal caveolin-1 favors tumor invasion and metastasis. *Cell* *146*, 148-163.
- 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.
- Gould, R. A., Yalcin, H. C., MacKay, J. L., Sauls, K., Norris, R., Kumar, S., and Butcher, J. T. (2016). Cyclic Mechanical Loading Is Essential for Rac1-Mediated Elongation and Remodeling of the Embryonic Mitral Valve. *Curr Biol* *26*, 27-37.
- Grashoff, C., Hoffman, B. D., Brenner, M. D., Zhou, R., Parsons, M., Yang, M. T., McLean, M. A., Slihar, S. G., Chen, C. S., Ha, T., and Schwartz, M. A. (2010). Measuring mechanical tension across vinculin reveals regulation of focal adhesion dynamics. *Nature* *466*, 263-266.
- Guilluy, C., Swaminathan, V., Garcia-Mata, R., O'Brien, E. T., Superfine, R., and Burridge, K. (2011). The Rho GEFs LARG and GEF-H1 regulate the mechanical response to force on integrins. *Nat Cell Biol* *13*, 722-727.
- Gupta, M., Kocgozlu, L., Sarangi, B. R., Margadant, F., Ashraf, M., and Ladoux, B. (2015a). Micropillar substrates: a tool for studying cell mechanobiology. *Methods Cell Biol* *125*, 289-308.
- Gupta, M., Sarangi, B. R., Deschamps, J., Nematbakhsh, Y., Callan-Jones, A., Margadant, F., Mège, R. M., Lim, C. T., Voituriez, R., and Ladoux, B. (2015b). Adaptive rheology and ordering of cell cytoskeleton govern matrix rigidity sensing. *Nat Commun* *6*, 7525.
- 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.
- Hibi, K., Sakata, M., Sakuraba, K., Shirahata, A., Goto, T., Mizukami, H., Saito, M., Ishibashi, K., Kigawa, G., Nemoto, H., and Sanada, Y. (2008). Aberrant methylation of the HACE1 gene is frequently detected in advanced colorectal cancer. *Anticancer Res* *28*, 1581-1584.

Higashida, C., Kiuchi, T., Akiba, Y., Mizuno, H., Maruoka, M., Narumiya, S., Mizuno, K., and Watanabe, N. (2013). F- and G-actin homeostasis regulates mechanosensitive actin nucleation by formins. *Nat Cell Biol* 15, 395-405.

Hirata, H., Tatsumi, H., and Sokabe, M. (2008). Mechanical forces facilitate actin polymerization at focal adhesions in a zyxin-dependent manner. *J Cell Sci* 121, 2795-2804.

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

Huang, C., Rajfur, Z., Yousefi, N., Chen, Z., Jacobson, K., and Ginsberg, M. H. (2009). Talin phosphorylation by Cdk5 regulates Smurf1-mediated talin head ubiquitylation and cell migration. *Nat Cell Biol* 11, 624-630.

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.

Hytönen, V. P., and Wehrle-Haller, B. (2016). Mechanosensing in cell-matrix adhesions - Converting tension into chemical signals. *Exp Cell Res* 343, 35-41.

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., Der, C. J., and Pestell, R. G. (1999). Integration of Rac-dependent regulation of cyclin D1 transcription through a nuclear factor-kappaB-dependent pathway. *J Biol Chem* 274, 25245-25249.

Kim, C., Yun, N., Lee, Y. M., Jeong, J. Y., Baek, J. Y., Song, H. Y., Ju, C., Youdim, M. B., Jin, B. K., Kim, W. K., and Oh, Y. J. (2013). Gel-based protease proteomics for identifying the novel calpain substrates in dopaminergic neuronal cell. *J Biol Chem* 288, 36717-36732.

Kim, J. K., and Diehl, J. A. (2009). Nuclear cyclin D1: an oncogenic driver in human cancer. *J Cell Physiol* 220, 292-296.

Klein, E. A., and Assoian, R. K. (2008). Transcriptional regulation of the cyclin D1 gene at a glance. *J Cell Sci* 121, 3853-3857.

Klein, E. A., Yin, L., Kothapalli, D., Castagnino, P., Byfield, F. J., Xu, T., Levental, I., Hawthorne, E., Janmey, P. A., and Assoian, R. K. (2009). Cell-cycle control by physiological matrix elasticity and in vivo tissue stiffening. *Curr Biol* 19, 1511-1518.

Klein, S., de Fougères, A. R., Blaikie, P., Khan, L., Pepe, A., Green, C. D., Kotliansky, V., and Giancotti, F. G. (2002). Alpha 5 beta 1 integrin activates an NF-kappa B-dependent program of gene expression important for angiogenesis and inflammation. *Mol Cell Biol* 22, 5912-5922.

Kuo, J. C., Han, X., Hsiao, C. T., Yates, J. R., and Waterman, C. M. (2011). Analysis of the myosin-II-responsive focal adhesion proteome reveals a role for β -Pix in negative regulation of focal adhesion maturation. *Nat Cell Biol* 13, 383-393.

Laplantine, E., Fontan, E., Chiaravalli, J., Lopez, T., Lakisic, G., Veron, M., Agou, F., and Israel, A. (2009). NEMO specifically recognizes K63-linked poly-ubiquitin chains through a new bipartite ubiquitin-binding domain. *EMBO J* 28, 2885-2895.

Lessey-Morillon, E. C., Osborne, L. D., Monaghan-Benson, E., Guilluy, C., O'Brien, E. T., Superfine, R., and Burridge, K. (2014). The RhoA guanine nucleotide exchange factor, LARG, mediates ICAM-1-dependent mechanotransduction in endothelial cells to stimulate transendothelial migration. *J Immunol* 192, 3390-3398.

Levental, K. R., Yu, H., Kass, L., Lakins, J. N., Egeblad, M., Erler, J. T., Fong, S. F., Csiszar, K., Giaccia, A., Weninger, W., Yamauchi, M., Gasser, D. L., and Weaver, V. M. (2009). Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signaling. *Cell* 139, 891-906.

Liu, Z., Chen, P., Gao, H., Gu, Y., Yang, J., Peng, H., Xu, X., Wang, H., Yang, M., Liu, X., Fan, L., Chen, S., Zhou, J., Sun, Y., Ruan, K., Cheng, S., Komatsu, M., White, E., Li, L., Ji, H., Finley, D., and Hu, R. (2014). Ubiquitylation of autophagy receptor Optineurin by HACE1 activates selective autophagy for tumor suppression. *Cancer Cell* 26, 106-120.

Ma, X. M., and Blenis, J. (2009). Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 307-318.

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

Mandal, K., Wang, I., Vitiello, E., Orellana, L. A., and Balland, M. (2014). Cell dipole behaviour revealed by ECM sub-cellular geometry. *Nat Commun* 5, 5749.

Mettouchi, A., and Lemichez, E. (2012). Ubiquitylation of active Rac1 by the E3 Ubiquitin-Ligase HACE1. *Small GTPases* 3, 102-106.

Mitrossilis, D., Fouchard, J., Guiroy, A., Desprat, N., Rodriguez, N., Fabry, B., and Asnacios, A. (2009). Single-cell response to stiffness exhibits muscle-like behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 18243-18248.

Mitrossilis, D., Fouchard, J., Pereira, D., Postic, F., Richert, A., Saint-Jean, M., and Asnacios, A. (2010). Real-time single-cell response to stiffness. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 16518-16523.

Oakes, P. W., Beckham, Y., Stricker, J., and Gardel, M. L. (2012). Tension is required but not sufficient for focal adhesion maturation without a stress fiber template. *J Cell Biol* 196, 363-374.

Obaid, R., Wani, S. E., Azfer, A., Hurd, T., Jones, R., Cohen, P., Ralston, S. H., and Albagha, O. M. (2015). Optineurin Negatively Regulates Osteoclast Differentiation by Modulating NF- κ B and Interferon Signaling: Implications for Paget's Disease. *Cell Rep* 13, 1096-1102.

Pasapera, A. M., Plotnikov, S. V., Fischer, R. S., Case, L. B., Egelhoff, T. T., and Waterman, C. M. (2015). Rac1-dependent phosphorylation and focal adhesion recruitment of myosin IIA regulates migration and mechanosensing. *Curr Biol* 25, 175-186.

Paszek, M. J., DuFort, C. C., Rossier, O., Bainer, R., Mouw, J. K., Godula, K., Hudak, J. E., Lakins, J. N., Wijekoon, A. C., Cassereau, L., Rubashkin, M. G., Magbanua, M. J., Thorn, K. S., Davidson, M. W., Rugo, H. S., Park, J. W., Hammer, D. A., Giannone, G., Bertozzi, C. R., and Weaver, V. M. (2014). The cancer glycocalyx mechanically primes integrin-mediated growth and survival. *Nature* 511, 319-325.

Paszek, M. J., Zahir, N., Johnson, K. R., Lakins, J. N., Rozenberg, G. I., Gefen, A., Reinhart-King, C. A., Margulies, S. S., Dembo, M., Boettiger, D., Hammer, D. A., and Weaver, V. M. (2005). Tensional homeostasis and the malignant phenotype. *Cancer Cell* 8, 241-254.

Paul, A. S., and Pollard, T. D. (2009). Review of the mechanism of processive actin filament elongation by formins. *Cell Motil Cytoskeleton* 66, 606-617.

Perona, R., Montaner, S., Saniger, L., Sanchez-Perez, I., Bravo, R., and Lacal, J. C. (1997). Activation of the nuclear factor-kappaB by Rho, CDC42, and Rac-1 proteins. *Genes Dev* 11, 463-475.

Roca-Cusachs, P., Iskratsch, T., and Sheetz, M. P. (2012). Finding the weakest link: exploring integrin-mediated mechanical molecular pathways. *J Cell Sci* 125, 3025-3038.

Sabass, B., Gardel, M. L., Waterman, C. M., and Schwarz, U. S. (2008). High resolution traction force microscopy based on experimental and computational advances. *Biophys J* 94, 207-220.

Saci, A., Cantley, L. C., and Carpenter, C. L. (2011). Rac1 regulates the activity of mTORC1 and mTORC2 and controls cellular size. *Mol Cell* 42, 50-61.

Sakata, M., Kitamura, Y. H., Sakuraba, K., Goto, T., Mizukami, H., Saito, M., Ishibashi, K., Kigawa, G., Nemoto, H., Sanada, Y., and Hibi, K. (2009). Methylation of HACE1 in gastric carcinoma. *Anticancer Res* 29, 2231-2233.

Sakata, M., Yokomizo, K., Kitamura, Y., Sakuraba, K., Shirahata, A., Goto, T., Mizukami, H., Saito, M., Ishibashi, K., Kigawa, G., Nemoto, H., and Hibi, K. (2013). Methylation of the HACE1 gene is frequently detected in hepatocellular carcinoma. *Hepatogastroenterology* 60, 781-783.

Sawada, Y., Tamada, M., Dubin-Thaler, B. J., Cherniavskaya, O., Sakai, R., Tanaka, S., and Sheetz, M. P. (2006). Force sensing by mechanical extension of the Src family kinase substrate p130Cas. *Cell* *127*, 1015-1026.

Schiller, H. B., Friedel, C. C., Boulegue, C., and Fässler, R. (2011). Quantitative proteomics of the integrin adhesome show a myosin II-dependent recruitment of LIM domain proteins. *EMBO Rep* *12*, 259-266.

Schwamborn, K., Weil, R., Courtois, G., Whiteside, S. T., and Israel, A. (2000). Phorbol esters and cytokines regulate the expression of the NEMO-related protein, a molecule involved in a NF-kappa B-independent pathway. *J Biol Chem* *275*, 22780-22789.

Shimobayashi, M., and Hall, M. N. (2014). Making new contacts: the mTOR network in metabolism and signalling crosstalk. *Nat Rev Mol Cell Biol* *15*, 155-162.

Sit, S. T., and Manser, E. (2011). Rho GTPases and their role in organizing the actin cytoskeleton. *J Cell Sci* *124*, 679-683.

Smith, M. A., Hoffman, L. M., and Beckerle, M. C. (2014). LIM proteins in actin cytoskeleton mechanoresponse. *Trends Cell Biol* *24*, 575-583.

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., Kogler, M., Redouane, Y., Koziaradzki, I., Uribesalgo, I., Fennell, L. M., Daugaard, M., Klug, H., Wirnsberger, G., Wimmer, R., Perlot, T., Sarao, R., Rao, S., Hanada, T., Takahashi, N., Kernbauer, E., Demiröz, D., Superti-Furga, G., Decker, T., Pichler, A., Ikeda, F., Kroemer, G., Vandenabeele, P., Sorensen, P. H., and Penninger, J. M. (2016). The Tumor Suppressor Hace1 Is a Critical Regulator of TNFR1-Mediated Cell Fate. *Cell Rep* *15*, 1481-1492.

Tse, J. R., and Engler, A. J. (2010). Preparation of hydrogel substrates with tunable mechanical properties. *Curr Protoc Cell Biol* *Chapter 10*, Unit 10.16.

Vicente-Manzanares, M., Choi, C. K., and Horwitz, A. R. (2009). Integrins in cell migration--the actin connection. *J Cell Sci* *122*, 199-206.

Vicente-Manzanares, M., and Horwitz, A. R. (2011). Adhesion dynamics at a glance. *J Cell Sci* *124*, 3923-3927.

Vogel, V., and Sheetz, M. (2006). Local force and geometry sensing regulate cell functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* *7*, 265-275.

Wild, P., Farhan, H., McEwan, D. G., Wagner, S., Rogov, V. V., Brady, N. R., Richter, B., Korac, J., Waidmann, O., Choudhary, C., Dotsch, V., Bumann, D., and Dikic, I. (2011). Phosphorylation of the autophagy receptor optineurin restricts Salmonella growth. *Science* 333, 228-233.

Wu, C. J., Conze, D. B., Li, T., Srinivasula, S. M., and Ashwell, J. D. (2006). Sensing of Lys 63-linked polyubiquitination by NEMO is a key event in NF-kappaB activation [corrected]. *Nat Cell Biol* 8, 398-406.

Yoshigi, M., Hoffman, L. M., Jensen, C. C., Yost, H. J., and Beckerle, M. C. (2005). Mechanical force mobilizes zyxin from focal adhesions to actin filaments and regulates cytoskeletal reinforcement. *J Cell Biol* 171, 209-215.

Zaidel-Bar, R., and Geiger, B. (2010). The switchable integrin adhesome. *J Cell Sci* 123, 1385-1388.

Zhang, H., Landmann, F., Zahreddine, H., Rodriguez, D., Koch, M., and Labouesse, M. (2011). A tension-induced mechanotransduction pathway promotes epithelial morphogenesis. *Nature* 471, 99-103.

Zhang, L., Anglesio, M. S., O'Sullivan, M., Zhang, F., Yang, G., Sarao, R., Mai, P. N., Cronin, S., Hara, H., Melnyk, N., Li, L., Wada, T., Liu, P. P., Farrar, J., Arceci, R. J., Sorensen, P. H., and Penninger, J. M. (2007). The E3 ligase HACE1 is a critical chromosome 6q21 tumor suppressor involved in multiple cancers. *Nat Med* 13, 1060-1069.

Zhang, X., Moore, S. W., Iskratsch, T., and Sheetz, M. P. (2014). N-WASP-directed actin polymerization activates Cas phosphorylation and lamellipodium spreading. *J Cell Sci* 127, 1394-1405.

Zhu, G., Wu, C. J., Zhao, Y., and Ashwell, J. D. (2007). Optineurin negatively regulates TNFalpha-induced NF-kappaB activation by competing with NEMO for ubiquitinated RIP. *Curr Biol* 17, 1438-1443.

Zoncu, R., Efeyan, A., and Sabatini, D. M. (2011). mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12, 21-35.

FIGURE LEGENDS

FIGURE 1: Rac1 activity promotes the interaction of HACE1 with OPTN

- A)** Schematic representation of Optineurin domain architecture comprising : leucine zipper (LZ 141-161) ; LC3-interacting region (LIR 169-184) ; Ubiquitin-Binding domain like in ABIN and NEMO (UBAN 405-504), Zinc finger domain (ZnF 553-577) and coiled-coil regions (hatched box 38-170 and 239-508). Regions recognized by antibodies sc-271549 (Ab1), SAB2101684 (Ab2) and abcam 23666 (Ab3) are depicted below. **B)** Coimmunoprecipitation of Flag-OPTN with HA-HACE1 in presence or absence of Myc-Rac1Q61L (IP FLAG). Input corresponds to immunoblots on 0.5% total lysate to control protein expression levels.
- C)** Immunoblots anti-FLAG and anti-Ab1 reveals a fast-migrating form of FLAG-OPTN, noted OPTN*, opposite to anti-Ab2 and anti-Ab3 antibodies that recognize the extreme C-ter part on the protein.
- D - F)** Coimmunoprecipitation of FLAG-OPTN, FLAG-OPTNC575A (D), FLAG-OPTN Δ ZNF (E) or FLAG-OPTND474N (F) with HA-HACE1 (IP FLAG) in presence or absence of Myc-Rac1Q61L, Myc-Rac1T17N. Input corresponds to immunoblots on 0.5% total lysate to control protein expression levels.

FIGURE 2: OPTN controls the HACE1-dependent ubiquitylation of Rac1

- A)** Immunoblot showing Rac1 ubiquitylation profile. HUVECs were transfected with siCtrl or siOPTN for 24 h prior to cotransfection with expression vectors for Histidine-tagged ubiquitin, HA-Rac1Q61L and Myc-HACE1, and cultured for a further 24 h. His-Ub covalently bound to Rac1Q61L were purified (His-P) and the ubiquitylation profile of Rac1Q61L was revealed by anti-HA immunoblotting (HA). Input corresponds to immunoblots on 0.5% total lysate to control protein expression or knock-down.
- B)** Co-immunoprecipitation of HA-HACE1 with Myc-Rac1Q61L (IP Myc) in siCtrl or siOPTN transfected cells. Input corresponds to immunoblots on 0.5% total lysate, to control protein expression or knockdown.
- C)** Quantification of Rac1-GTP levels in HUVEC transfected with siCtrl or siOPTN and stimulated by adhesion on fibronectin. Cells were G0 synchronized and active Rac1 level was assessed by GST-PAK pull-down on lysates from non-stimulated cells (NS) or cells plated on 15 μ g/ml fibronectin for 1h

Results are expressed as fold change to non-stimulated siCtrl condition, set to 1. Mean \pm SD, n = 3 independent experiments, $p^* < 0.01$.

D) Accumulation of Rac1 in Flotilin (FLOT1) enriched fractions. HUVECs were transfected with siCtrl or siOPTN and G0 synchronized before plating at low confluence on fibronectin 15 μ g/ml for 1 h. Cell lysates were fractionated on a sucrose gradient (40, 30, 0 %). The 8 fractions recovered were analyzed by SDS-PAGE and immunoblotting anti-Rac, anti-Flotilin 1 (FLOT1) and anti-Transferrin Receptor (Tfr). Immunoblots anti-Tfr show detergent-soluble fractions (6 to 8) and anti-FLOT1 show detergent-resistant Fractions (2-3).

E) Rac1 activation in HUVEC either untreated (UT) or treated 3 h with 10⁻⁹M CNF1 (CNF1). Immunoblots show levels of affinity purified active GTP-bound Rac1 (Rac1-GTP) and total Rac1 (Rac1) in lysates. Immunoblot anti-GAPDH and anti-OPTN show control of protein loading and OPTN knockdown.

F) Quantification of Rac1-GTP levels in HUVEC transfected with siCtrl or siOPTN and treated with 10⁻⁹M CNF1. Results are expressed as fold change to untreated siCtrl condition, set to 1. Mean \pm SD, n = 3 independent experiments, $p^* < 0.01$.

FIGURE 3: Extracellular matrix stiffness controls OPTN expression and Rac1 ubiquitylation

A) Immunoblots anti-OPTN and anti-HACE1 showing endogenous protein levels in HUVECs plated 8 hours on fibronectin-coated hydrogels of the indicated stiffness (kPa) in defined medium. Immunoblot anti-GAPDH shows control of protein loading.

B) Quantification of OPTN protein level in cells treated as in A. Densitometry was normalized to 0.2kPa ECM. Mean \pm SD, n = 3 independent experiments, $p^{**} < 0.01$, $p^{***} < 0.001$.

C) Immunoprecipitation of endogenous OPTN from cells cultured on fibronectin-coated hydrogels of the indicated stiffness (kPa) followed by immunoblot using OPTN specific antibody Ab1 shows the appearance of a fast-migrating form of OPTN, marked with an asterisk. This form is not detected upon immunoblotting using OPTN c-terminus specific antibody Ab3.

D) Immunoblots showing Rac1 ubiquitylation profile. Cells were transfected with expression vectors for Histidine-tagged ubiquitin and HA-Rac1Q61L and plated overnight on fibronectin-coated hydrogels of indicated stiffness (kPa). Covalently bound His-Ubiquitinated proteins were purified (HIS-P) and resolved on 12% SDS-PAGE before anti-HA immunoblotting. Input corresponds to immunoblots on 1% total lysate to control protein expression.

E) Immunoblots showing Rac1 ubiquitylation profile. Cells were transfected with expression vectors for Histidine-tagged ubiquitin and HA-Rac1Q61L, with or without FLAG-OPTN and plated overnight on 1 kPa fibronectin-coated hydrogels. Covalently bound His-Ubiquitinated proteins were purified (HIS-P) and resolved on 12% SDS-PAGE before anti-HA immunoblotting. Input corresponds to immunoblots on 1% total lysate to control protein expression.

FIGURE 4: OPTN downregulates cell adhesion to the Extracellular matrix

A) Confocal sections showing enhanced formation of integrin alpha-5-positive (ITGA5) and paxillin-positive focal adhesions (FA) in siOPTN transfected HUVEC plated 2 hours on fibronectin in defined medium. Actin was labeled with FITC-phalloidin. Bar = 10 μ m.

B) The number and mean area of FA structures positive for ITGA5 or paxillin in siCtrl or siOPTN transfected HUVEC were quantified. Results are expressed as fold change to siCtrl condition, set to 1. n = 30 SiCtrl cells and 27 SiOPTN cells, $p^* \leq 0.01$, $p^{**} \leq 0.001$.

C) Adhesion of siCtrl or siOPTN transfected HUVEC on 1.25, 2.5 and 5 μ g/ml of fibronectin was assessed upon short-term plating of cells in triplicate in 96 well plates. Graphs represent the extent of adhesion to fibronectin as function of absorbance upon elution of the crystal violet dye. Mean \pm SD, n=3 independent experiments, $p^* \leq 0.01$, $p^{***} \leq 0.0001$.

D) Confocal sections showing reduced formation of integrin alpha-5-positive (ITGA5) and paxillin-positive FA in control or Flag-OPTN expressing HUVEC. Bar = 10 μ m.

E) Adhesion of control or Flag-OPTN expressing HUVECs on 1.25, 2.5 and 5 μ g/ml of fibronectin was assessed upon short-term plating of cells in triplicate in 96 well plates. Graphs represent the extent of adhesion to fibronectin as function of absorbance upon elution of the crystal violet dye. Mean \pm SD, n=3 independent experiments, $p^{**} \leq 0.001$, $p^{***} \leq 0.0001$.

FIGURE 5: OPTN controls cell contractility

A) Individual traction force curves for control (siCtrl, black) and OPTN knocked-down (siOPTN, red) single cells. Note that the rate of force increase dF/dt (slope of the curve at short times), as well as the maximum force at saturation are lower for the OPTN-knocked down cell.

B) Maximum traction force values for siControl and siOPTN cells. Forces are significantly lower for OPTN knocked-down cells (n=19 siCtrl and 17 SiOPTN cells, $p^{***} = 0.001$).

C) The rate of force generation dF/dt is also significantly lower for OPTN knocked down cells than for control cells (n=19 siCtrl and 17 SiOPTN cells, $p^{**}= 0.0067$). Force build-up is thus slower in siOPTN cells.

D) Traction force microscopy was applied to control (siCtrl) and OPTN knocked-down (siOPTN) cells on fibronectin-coated 5kPa polyacrylamide gel. The displacements of beads embedded in the gel are used to reconstruct the stress map (color coded), which can also be represented as a vector field.

E) Total traction force values for siCtrl and siOPTN cells. Forces are significantly lower for OPTN knocked-down cells (n=40 siCtrl and 41 SiOPTN cells, $p^{***}\leq 0.0001$).

F) The contractile energy, which measures the scalar product of the traction by the displacement integrated over the cell surface to give the total energy transferred by the cellular adhesive surface to the elastic substratum, is significantly decreased upon loss of OPTN expression. (n=40 siCtrl and 41 SiOPTN cells, $p^{***}\leq 0.0001$).

FIGURE 6: OPTN regulates adhesion-mediated cell cycle progression and translation of cyclin D1

A) Graph representing the percentage of proliferating cells (S and G2/M phases). HUVEC transfected with siCtrl or siOPTN were G0 Synchronized and plated at low confluence on fibronectin-coated hydrogels of indicated stiffness (kPa) for 18 hours before cell cycle analysis by FACS. Mean \pm SD, n=4 $p^{***}<0,001$.

B) Immunoblots showing cyclin D1 expression in cells treated as in **(A)**.

C) Level of cyclin D1 mRNA and protein expression in siCtrl or siOPTN transfected cells. HUVECs were G0 synchronized (sync) and then plated on 15 μ g/ml fibronectin-coated plates and 20% serum for 18 hours (Stim). Cyclin D1 mRNA levels were assessed by RT-qPCR and normalized to siCtrl synchronized cells condition, set to 1. Mean \pm SD, n=3 $p^{**}<0.01$ and ns: non significant. In parallel, cyclin D1 protein levels were determined by immunoblots, GAPDH was used as a loading control.

D) Level of cyclin D1 mRNA expression in siCtrl or siOPTN transfected cells expressing HA-Rac1Q61L. Cyclin D1 mRNA levels were assessed by RT-qPCR and normalized to siCtrl condition, set to 1. Mean \pm SD, n=3, ns: non significant.

E) HUVEC transfected with siCtrl or siOPTN were G0 Synchronized (sync) and then plated on 15 μ g/ml fibronectin-coated plates and 20% serum for 18 hours (Stim), together with Cycloheximide (CHX) at 10nM. Cells were harvested after 15, 30, 60 min treatment and processed for anti-cyclin D1

immunoblotting. Immunoblots anti-OPTN and anti-GAPDH were performed to control OPTN knockdown and protein loading, respectively.

F) Quantification of cyclin D1 half-life measured in (E). Values are expressed as fold compared to level in untreated condition (time 0), set to 1. Mean \pm SD, n=3. Dashed lines show similar cyclin D1 half-life in siCtrl and siOPTN cells.

G) Immunoblots showing neo synthesized cyclin D1. HUVEC transfected with siCtrl or siOPTN were G0 Synchronized and then plated on 15 μ g/ml fibronectin-coated plates in defined medium for 18 hours. Cells were pulsed with AHA during the last hour. Cell lysates were subjected to Click-iT reaction with Biotin Alkyne followed by streptavidin pulldown. Cyclin D1 and GAPDH neosynthesis was then assessed upon immunoblotting the resolved streptavidin-pulled-down reaction product. Total neo synthesis of proteins was assessed upon immunoblotting the resolved total Click-iT reaction product with streptavidin-HRP.

H) Analysis of mTORC1 complex activity in siCtrl or siOPTN transfected cells. HUVEC transfected with siCtrl or siOPTN were G0 Synchronized and then plated at low confluence in defined medium on fibronectin-coated hydrogels of indicated stiffness (kPa) for 1 hour. Immunoblots anti-phospho-S6-ser235/236 and anti-phospho-4EBP1-ser65 show increased mTORC1 activity in OPTN knocked down cells. Anti-S6, 4EBP1, cyclin D1 and GAPDH were performed as control.

FIGURE 7: OPTN regulates Integrin-mediated Cell signaling

A) HUVEC transfected with siCtrl or siOPTN were G0 Synchronized and then plated at low confluence in defined medium on fibronectin-coated hydrogels of indicated stiffness (kPa) for 1 hour. Immunoblots anti-phospho-FAK-tyr397, anti-phospho-Src-tyr416, anti-phospho-Paxillin-tyr118 and anti-phospho-p130CAS-tyr410 show that OPTN knocked-down cells harbor enhanced Src activity and downstream signaling upon ECM stiffening but a low level of FAK activation. Anti-FAK, Src, Paxillin and GAPDH were blotted as control. Quantification of phospho-FAK tyr-397 (**B**), phospho-Src tyr-416 (**C**), phospho-Paxillin tyr-118 (**D**) and phospho-p130CAS tyr-410 (**E**) signals in cells treated as in A. Densitometry was normalized to value on 0.2kPa ECM, set to 1. Mean \pm SD, n = 2 independent experiments.

LEGENDS TO SUPPLEMENTAL FIGURES

SUPPLEMENTAL FIGURE 1

A) Graphical representation of the selected interacting domain (SID) of OPTN, identified in the yeast two hybrid screens with HACE1. Full-length OPTN (aa 1-577) is represented as blue rectangle. Predicted functional domains (Pfam, Smart) are shown in green, coiled coil domains in purple and the SIDs identified in the screens with wild-type (SID: aa 302-481) and C876Smutant HACE1 (SID: aa 302-407) in yellow. The table summarizes recurrence of OPTN-encoding clones isolated in the yeast two hybrid screens performed using full-length WT or catalytic inactive mutant (C876S) HACE1 as baits. The Prey Binding confidence Score (PBS) is divided into four categories, from A (highest confidence) to D (lowest confidence).

B) Immunoblots anti-Flag and anti-Myc showing the induction of a fast migrating form of OPTN in cells expressing activated-Rac1. HUVECs were transfected overnight with a Flag-OPTN expression plasmid together with empty vector or Myc-Rac1Q61L or Myc-Rac1T17N expression vectors.

C) Immunoblot anti-Flag showing the appearance of a fast migrating form of OPTN in SDS-PAGE both in cells transfected with siCtrl or siHACE1 and expressing active Rac1Q61L. HUVECs were transfected with plasmids expressing Flag-OPTN and Myc-Rac1Q61L, as indicated. Control immunoblots anti-Rac and anti-HACE1 show Myc-tagged Rac1Q61L expression and endogenous HACE1 depletion. Anti-GAPDH immunoblot shows equal protein loading.

D) Co-immunoprecipitation of Flag-OPTN wild-type, Δ HIR and F178A mutants, with HA-HACE1 in presence or absence of Myc-Rac1Q61L (IP FLAG). Input corresponds to immunoblots on 0.5% total lysate to control protein expression levels. Note the presence of a fast migrating form of OPTN-WT and OPTN-F178A when Myc-Rac1Q61L is expressed.

SUPPLEMENTAL FIGURE 2

A) Immunoblots showing OPTN ubiquitylation profile. Cells were transfected with expression vectors for Histidine-tagged ubiquitin, HA-OPTN and Flag-HACE1 when indicated, with or without Myc-Rac1Q61L. Covalently bound His-ubiquitylated proteins were purified (HIS-P) and resolved on 12%

SDS-PAGE before anti-HA immunoblotting to reveal ubiquitylated OPTN. Input corresponds to immunoblots on 0.5% total lysate to control protein expression levels

B) Immunoblots showing Rac1 ubiquitylation profile in condition of HACE1 and/or OPTN over-expression. Cells were transfected with expression vectors for Histidine-tagged ubiquitin and HA-Rac1Q61L with or without expression vectors of Myc-HACE1 and Flag-OPTN. Covalently bound His-ubiquitylated proteins were purified (HIS-P) and resolved on 12% SDS-PAGE before anti-HA immunoblotting to reveal ubiquitylated Rac1Q61L. Input corresponds to immunoblots on 0.5% total lysate to control protein expression levels

C) Immunoblot showing levels of active Rac1 (Rac1-GTP) in HUVEC transfected with siCtrl or siOPTN and stimulated by 1h adhesion on fibronectin at different concentrations (Fn, 2.5, 7.5 and 15 $\mu\text{g/ml}$) in defined medium. Levels of Rac1, OPTN and GAPDH for loading control are assessed on 2% total lysates.

D) Quantification of Rac1 levels in detergent resistant membrane fractions 1, 2 and 3 as in figure 2D. Rac1 signal was first normalized to total lysate 2% (Tot). Data show fold changes compared to fraction 1 in siCtrl condition. Mean \pm SD, n=3, $p^*=0.01$.

SUPPLEMENTAL FIGURE 3

A) Quantification of HACE1 protein level in cells treated as in Fig3A. Densitometry was normalized to 0.2kPa ECM. Mean \pm SD, n = 2 independent experiments.

B) OPTN mRNA level in cells treated as in Fig3A. mRNA levels were assessed by RT-qPCR, and normalized to level in cells cultured on 0.2kPa ECM. Mean \pm SD, n = 2 independent experiments done in triplicates.

C) HACE1 mRNA level in cells treated as in Fig3A. mRNA levels were assessed by RT-qPCR and normalized to level in cells cultured on 0.2kPa ECM.

SUPPLEMENTAL FIGURE 4

A) Immunoblots showing OPTN depletion in transfected cells shown in Figure 4A and Supplemental figure 4B. GAPDH was used as a loading control.

B) Confocal sections showing enhanced formation of Zyxin-positive positive FA in siOPTN transfected HUVECs plated 2 hours on fibronectin in defined medium.

C) Immunoblots showing Flag-OPTN expression in transfected cells shown in Figure 4D. GAPDH was used as a loading control.

SUPPLEMENTAL FIGURE 5

A) Representative spatial distribution of traction force vectors (yellow arrows) in HUVEC transfected with siCtrl or siOPTN (outlined in white) and adhered 3h to micropillar substrates coated with fluorescent fibronectin (red). White scale bar, 10 μ m. Yellow scale bar = 10 nN.

B) Total traction force exerted by each siControl and siOPTN cell. Total force was calculated by adding the magnitude of all the force vectors in each cell. Forces are significantly lower for OPTN knocked down cells (n=32 siCtrl and 33 SiOPTN cells, $p^{***}<0.0001$).

C) Total contractile energy stored by a cell in the substrate. The total contractile energy was obtained by adding the strain energy of all the micropillars in each cell (n=32 siCtrl and 33 SiOPTN cells, $p^{***}<0.0001$).

SUPPLEMENTAL FIGURE 6

A) Typical cell cycle profiles from cells treated as in figure 6A. The table lists the percentage of cells gated in each phase of the cell cycle.

B) Quantification of cyclin D1 protein level in cells treated as in Figure 6B. Densitometry was normalized to value in SiCtrl cells plated on 0.2kPa ECM, set to 1. Mean \pm SD, n = 3 independent experiments, $p^{**}<0.01$.

C) Immunoblots showing inhibition of cyclin D1 expression in cells treated 6 hours with the Rac1 inhibitor EHT1864 in siCtrl and siOPTN HUVECs. Immunoblots anti-OPTN and GAPDH show controls of OPTN knockdown and protein loading, respectively.

D) Immunoblots showing the rate of cyclin D1 expression after 15 and 30 minutes of release from protein synthesis blockage with 10 nM Cycloheximide (CHX). Immunoblots anti-OPTN and GAPDH show controls of OPTN knockdown and protein loading, respectively.

E) Quantification of cyclin D1 neo synthesis in cells treated as in Supplemental Figure 6D. Data show mean \pm SD, n=3 independent experiments, $p^* < 0.05$.

F) Quantification of phospho-4E-BP1 ser-65 signal in cells treated as in Figure 6H. Densitometry was normalized to value on 0.2kPa ECM, set to 1. Mean \pm SD, n = 3 independent experiments, $p^* < 0.1$; $p^{**} < 0.01$.

G) Quantification of phospho-S6 ser-235/236 signal in cells treated as in Figure 6H. Densitometry was normalized to value on 0.2kPa ECM, set to 1. Mean \pm SD, n = 3 independent experiments, $p^* < 0.05$.

H) Immunoblots showing inhibition of cyclin D1 expression in cells treated for the last 6 hours with the mTOR inhibitor TORin in siCtrl and siOPTN HUVECs. Immunoblots anti-OPTN and GAPDH show controls of OPTN knockdown and protein loading, respectively.

I) Immunoblots showing inhibition of mTOR-dependent phosphorylation of ribosomal S6 protein in cells treated 1 hour with the Rac1 inhibitor EHT1864. siCtrl and siOPTN transfected HUVECs were plated on hydrogels of indicated stiffness for 1 hour. Immunoblots anti-OPTN and GAPDH show controls of OPTN knockdown and protein loading, respectively.

FIGURE 1

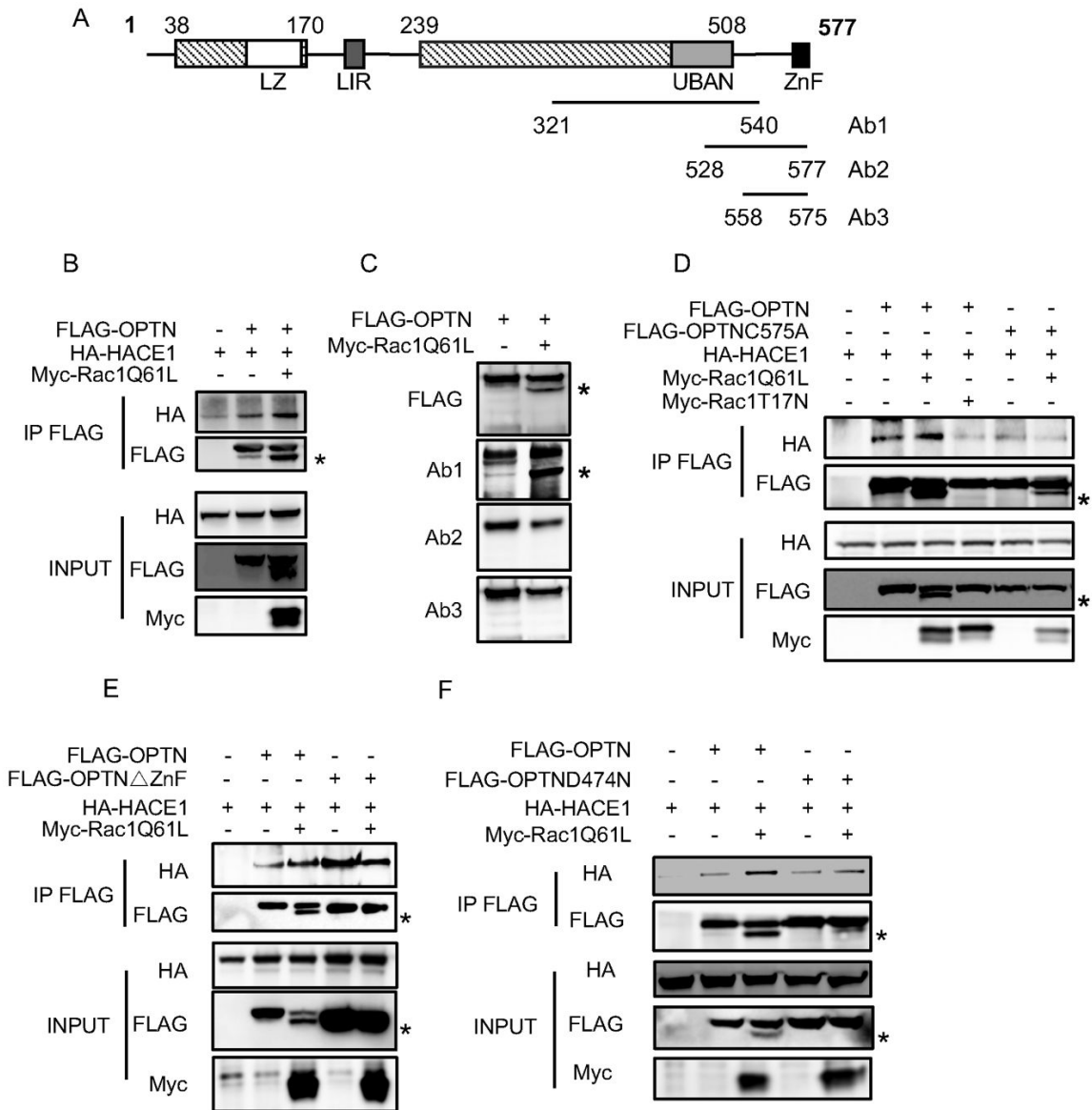


FIGURE 2

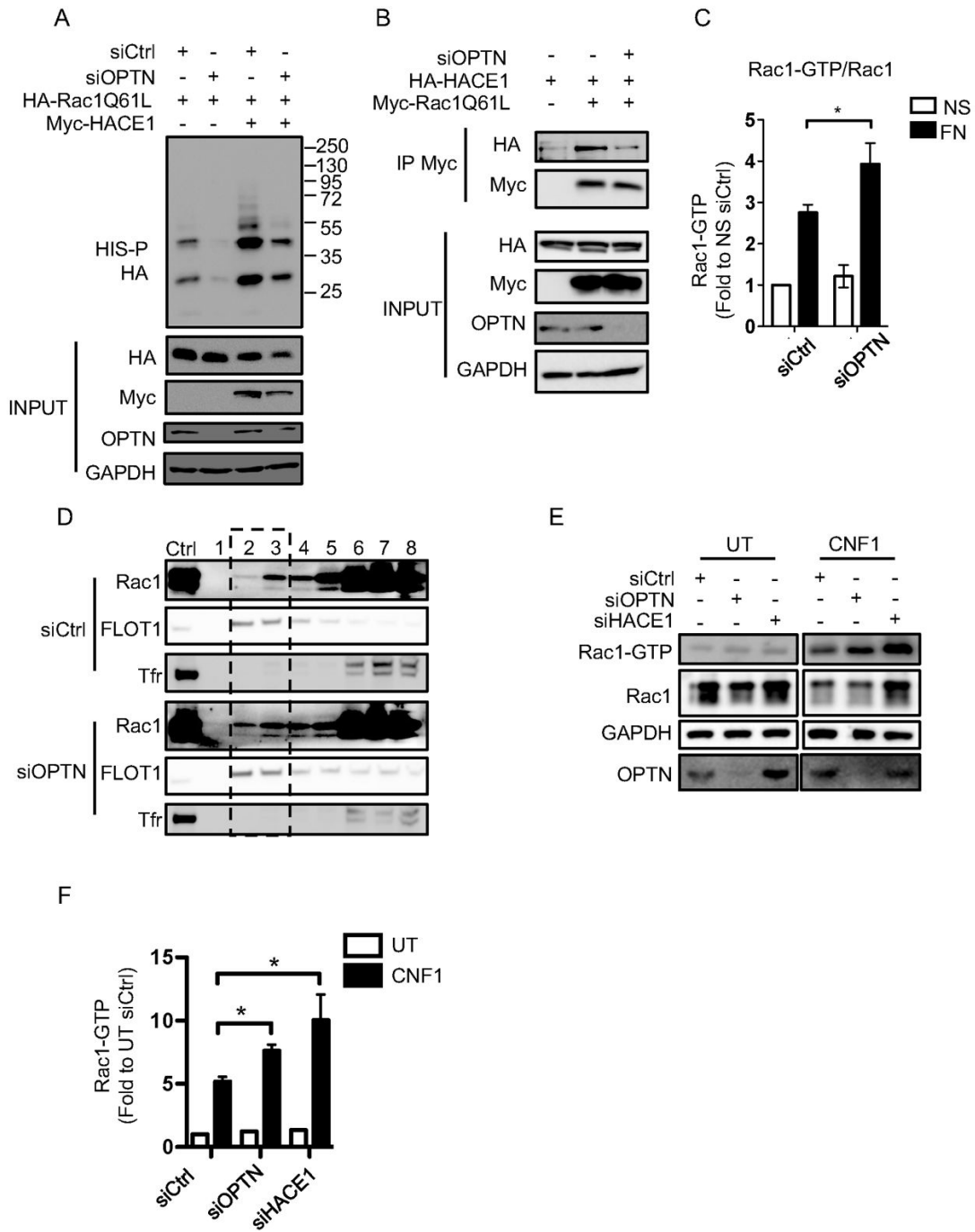


FIGURE 3

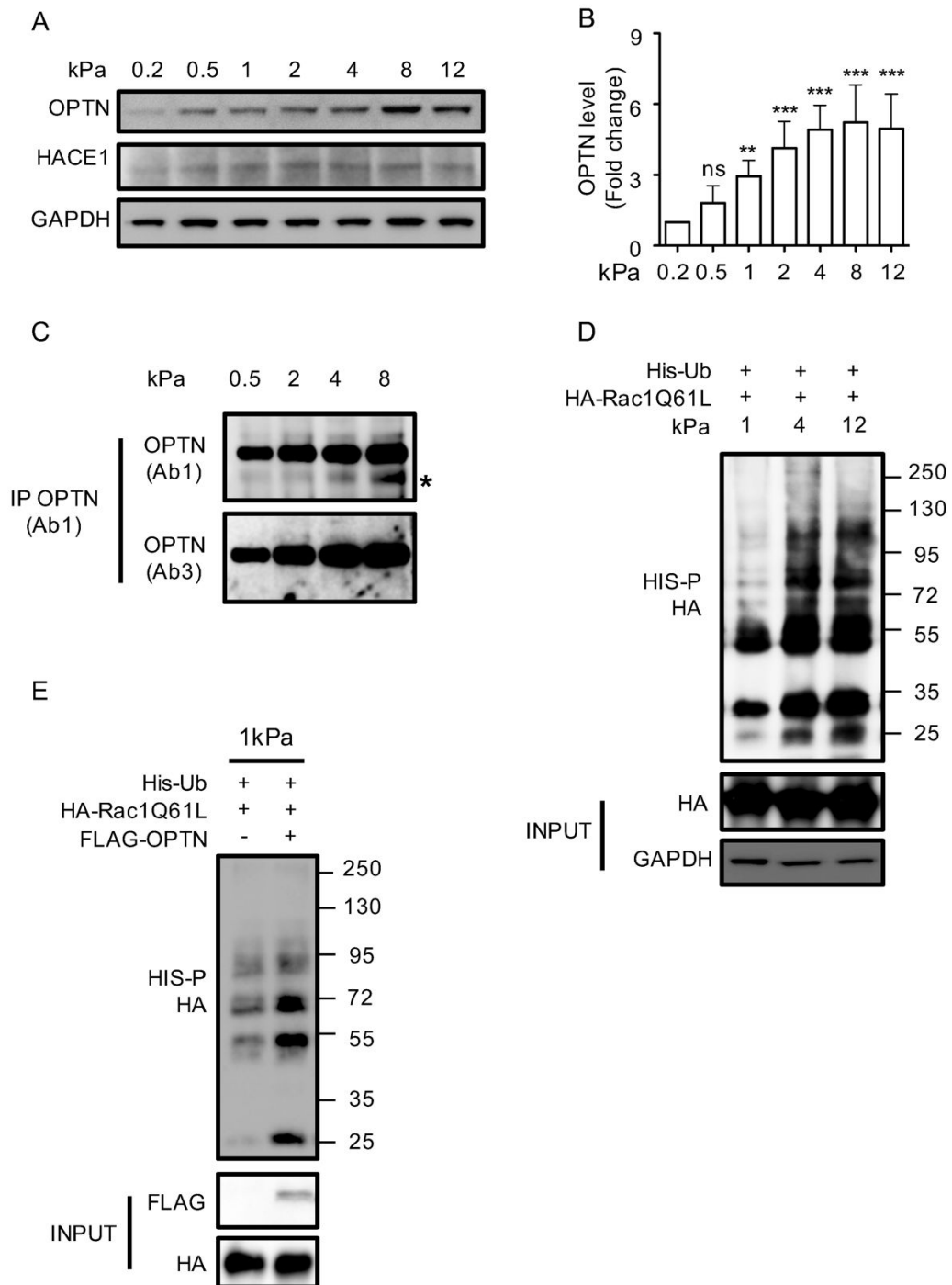


FIGURE 4

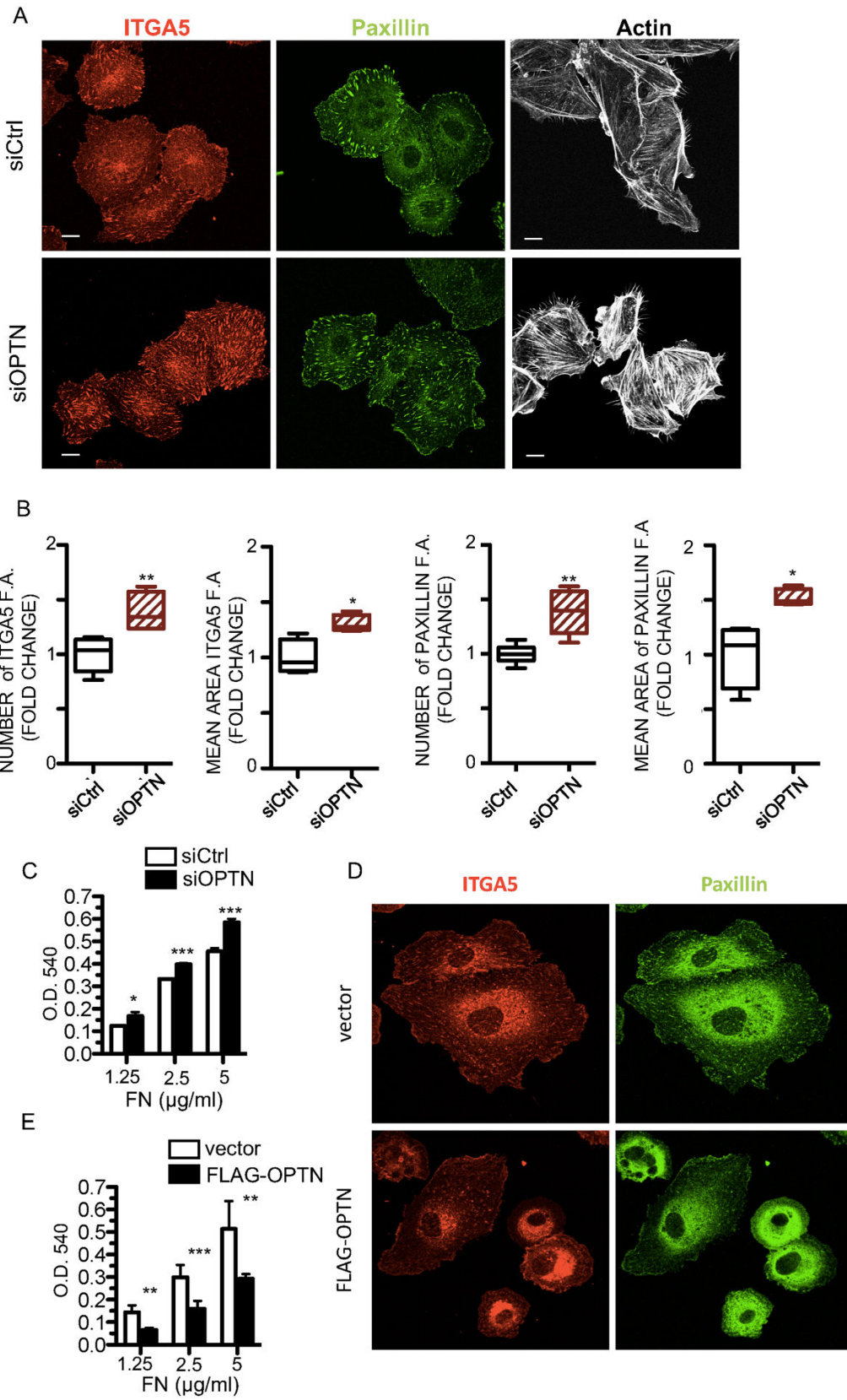


FIGURE 5

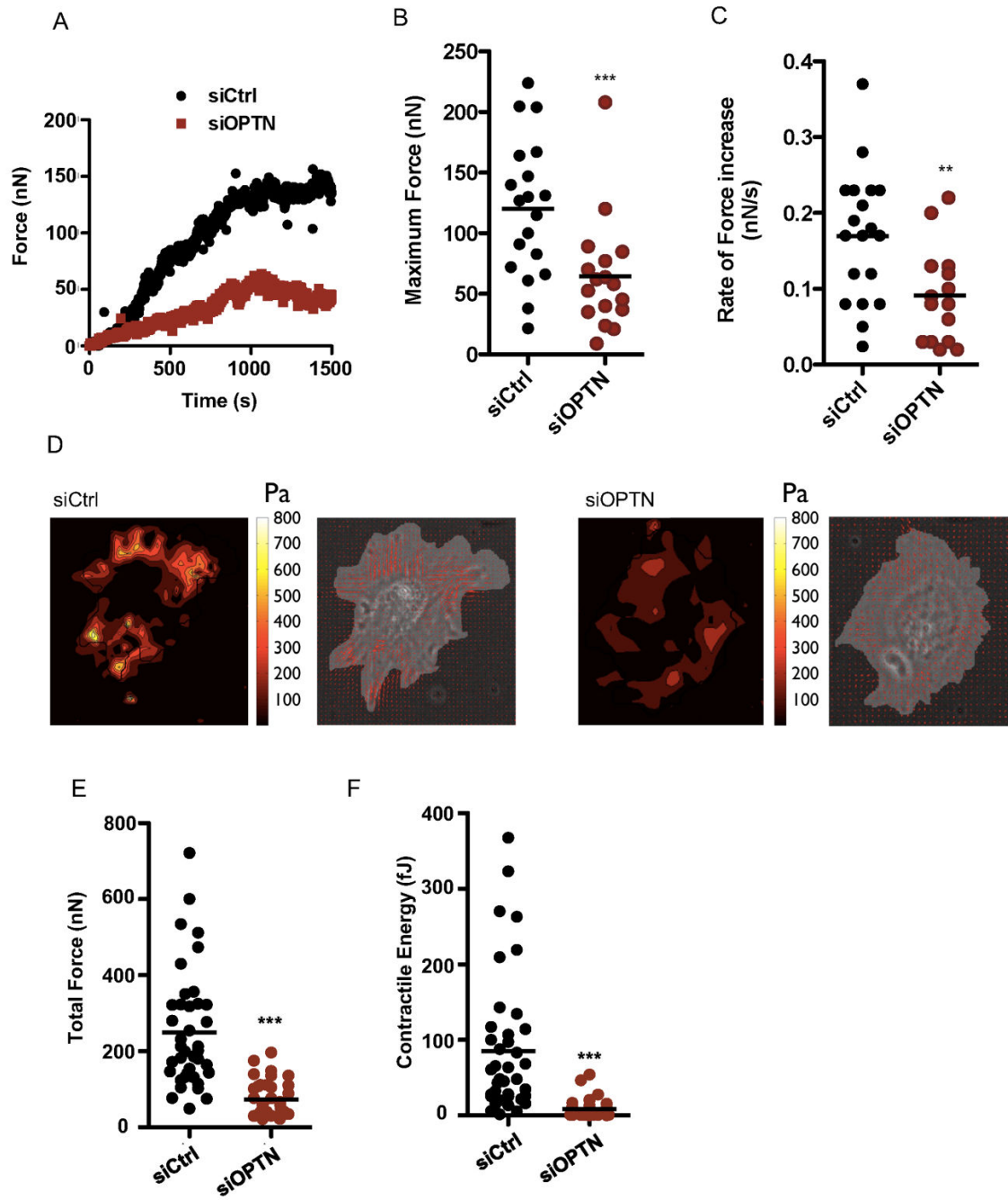


FIGURE 6

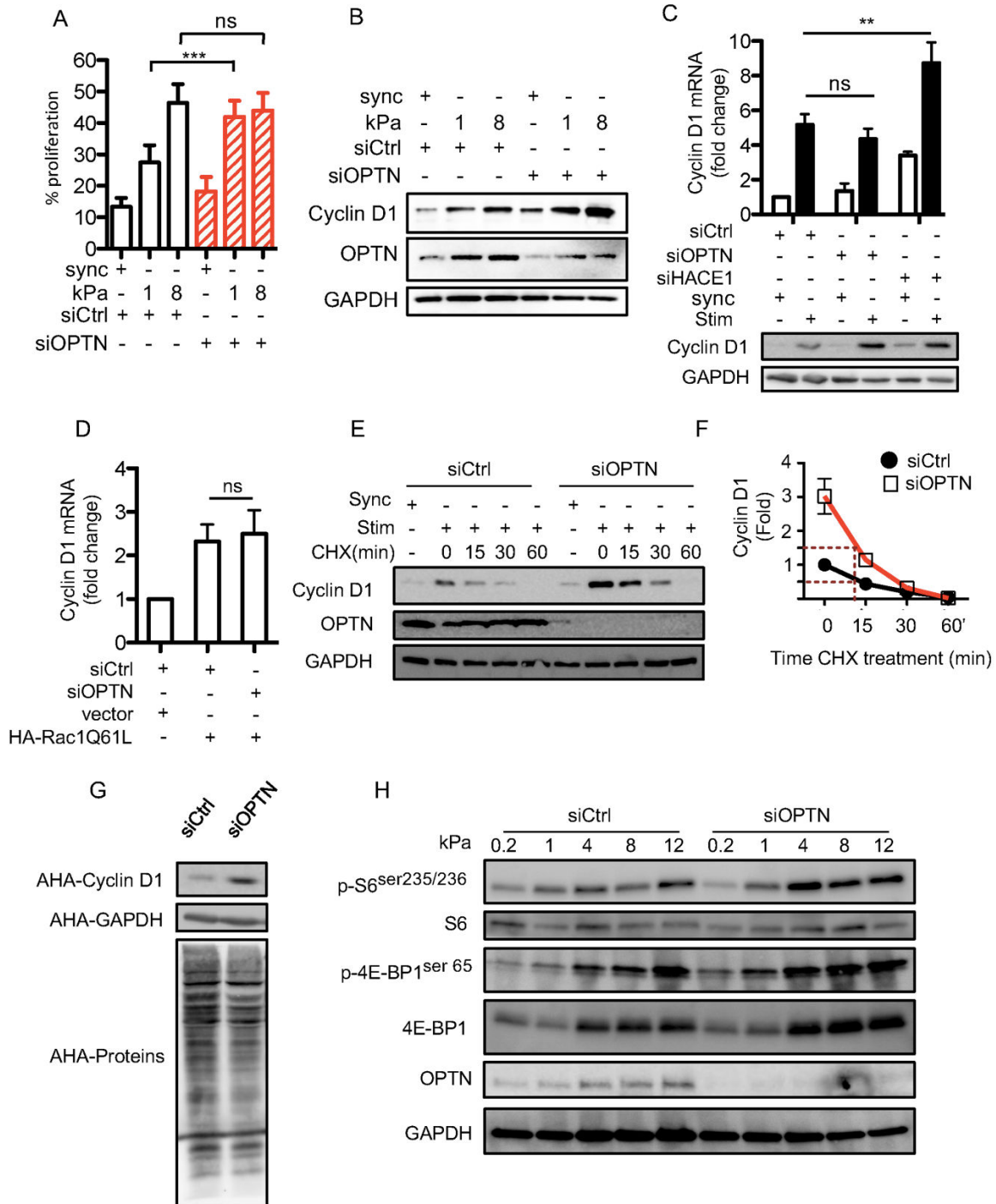
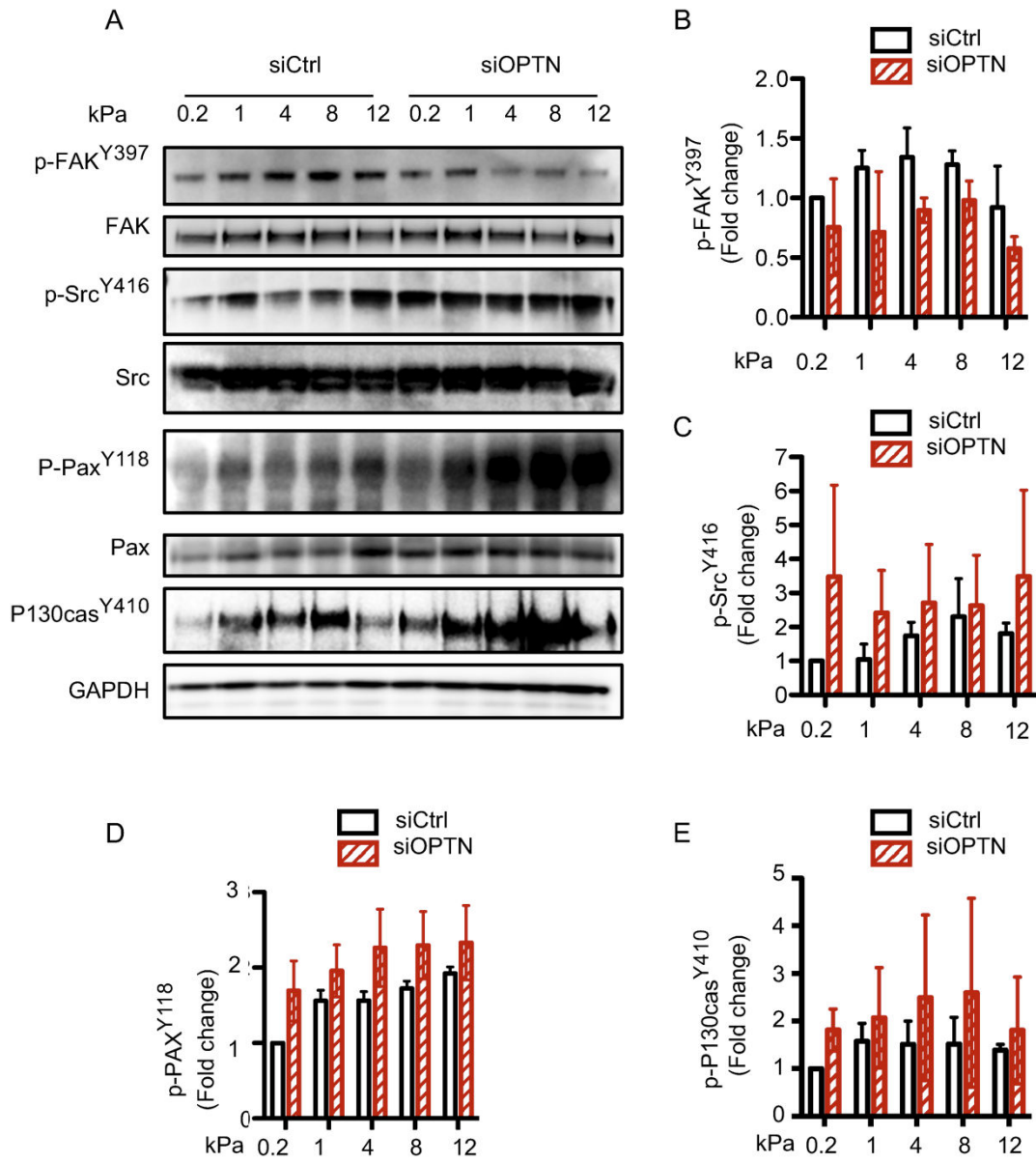
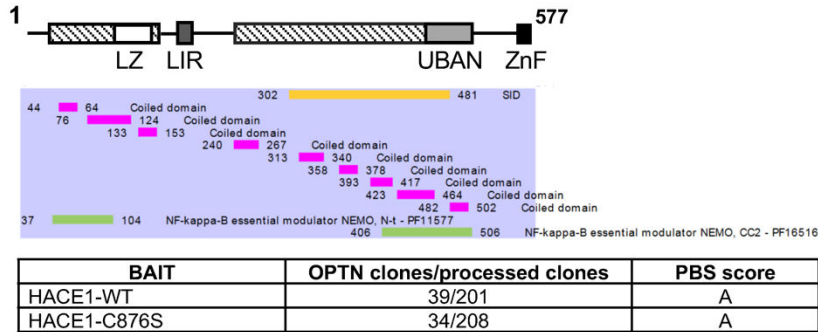


FIGURE 7

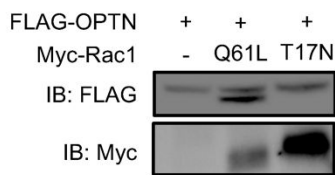


Supplemental FIGURE 1

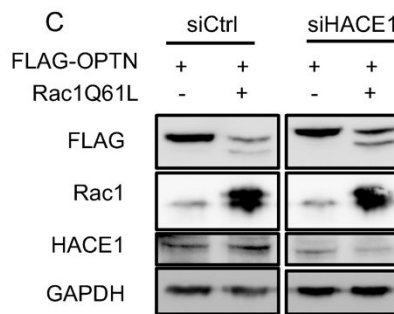
A



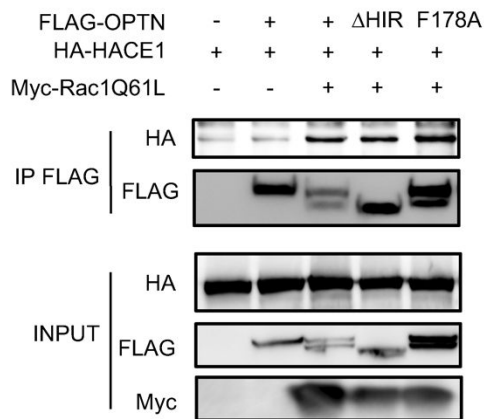
B



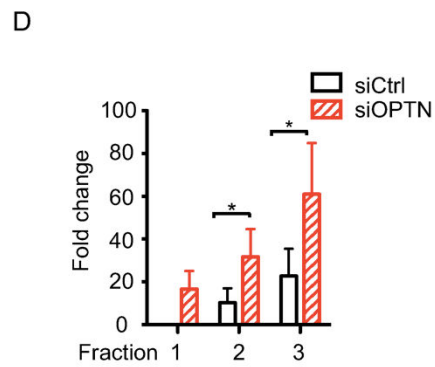
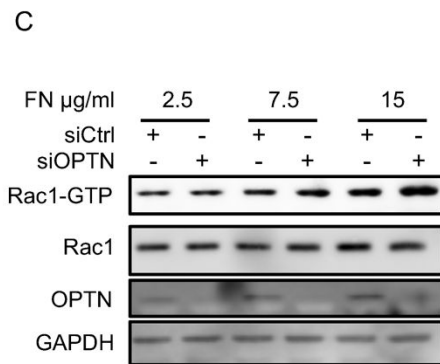
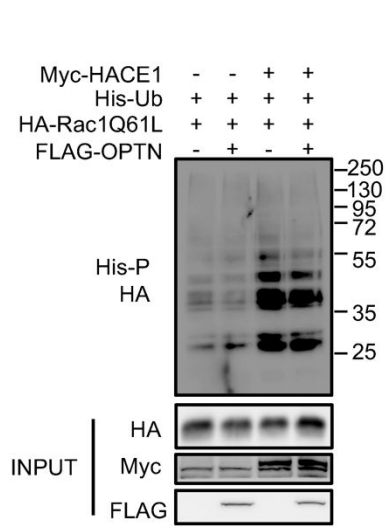
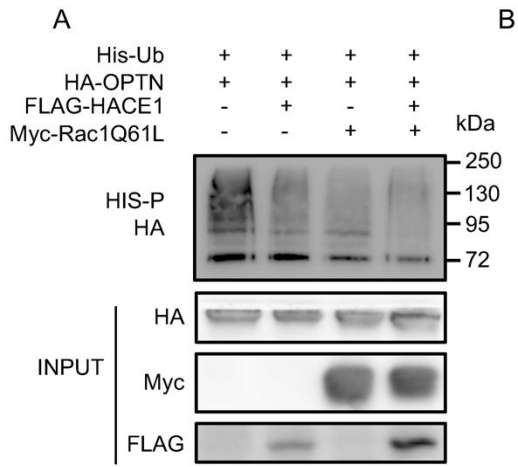
C



D

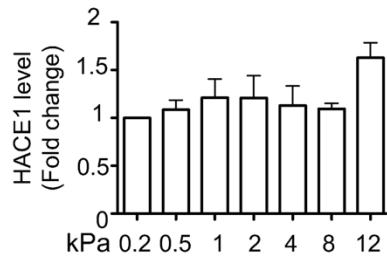


Supplemental FIGURE 2

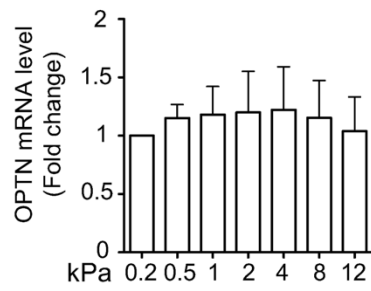


Supplemental FIGURE3

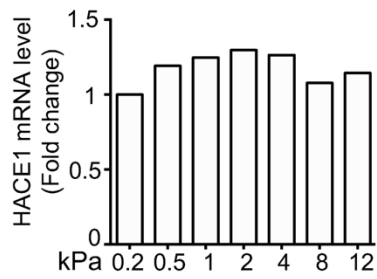
A



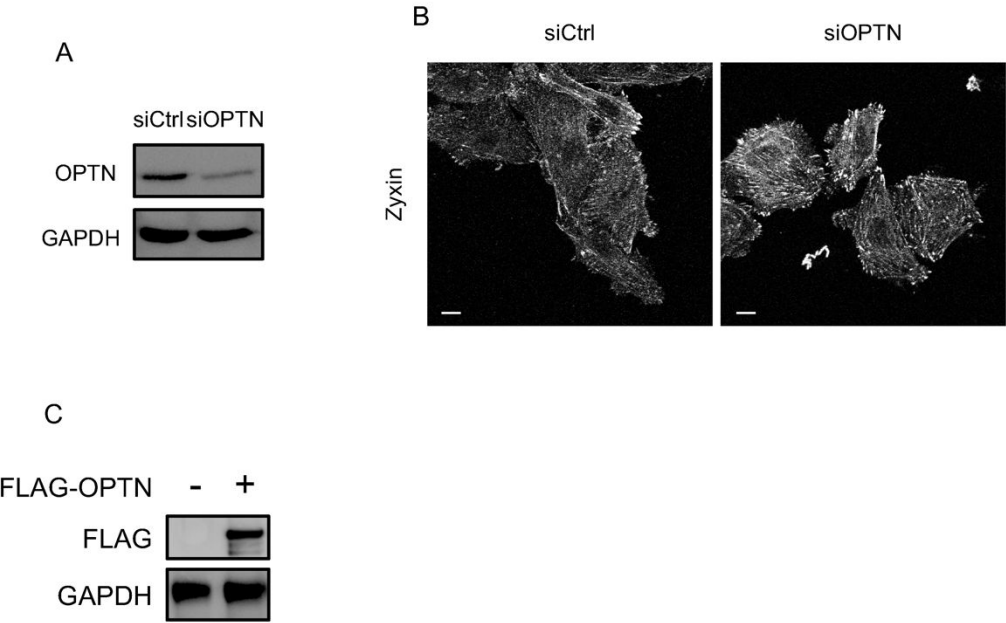
B



C

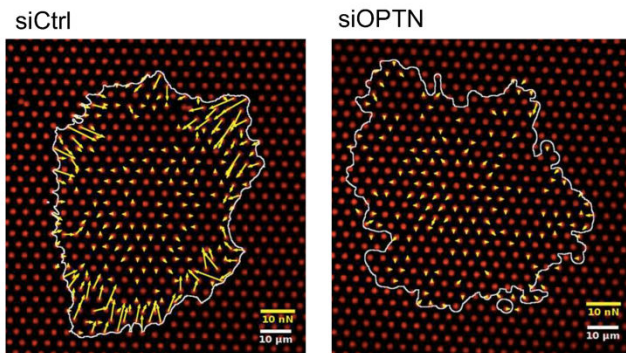


Supplemental FIGURE 4

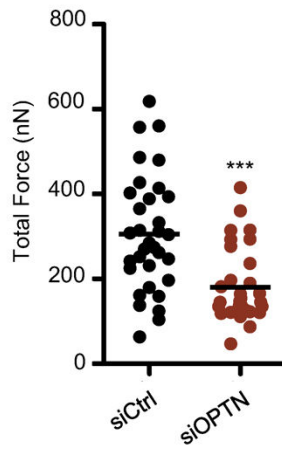


Supplemental FIGURE 5

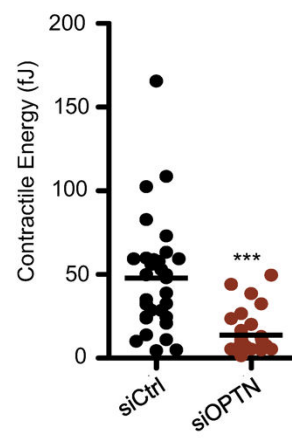
A



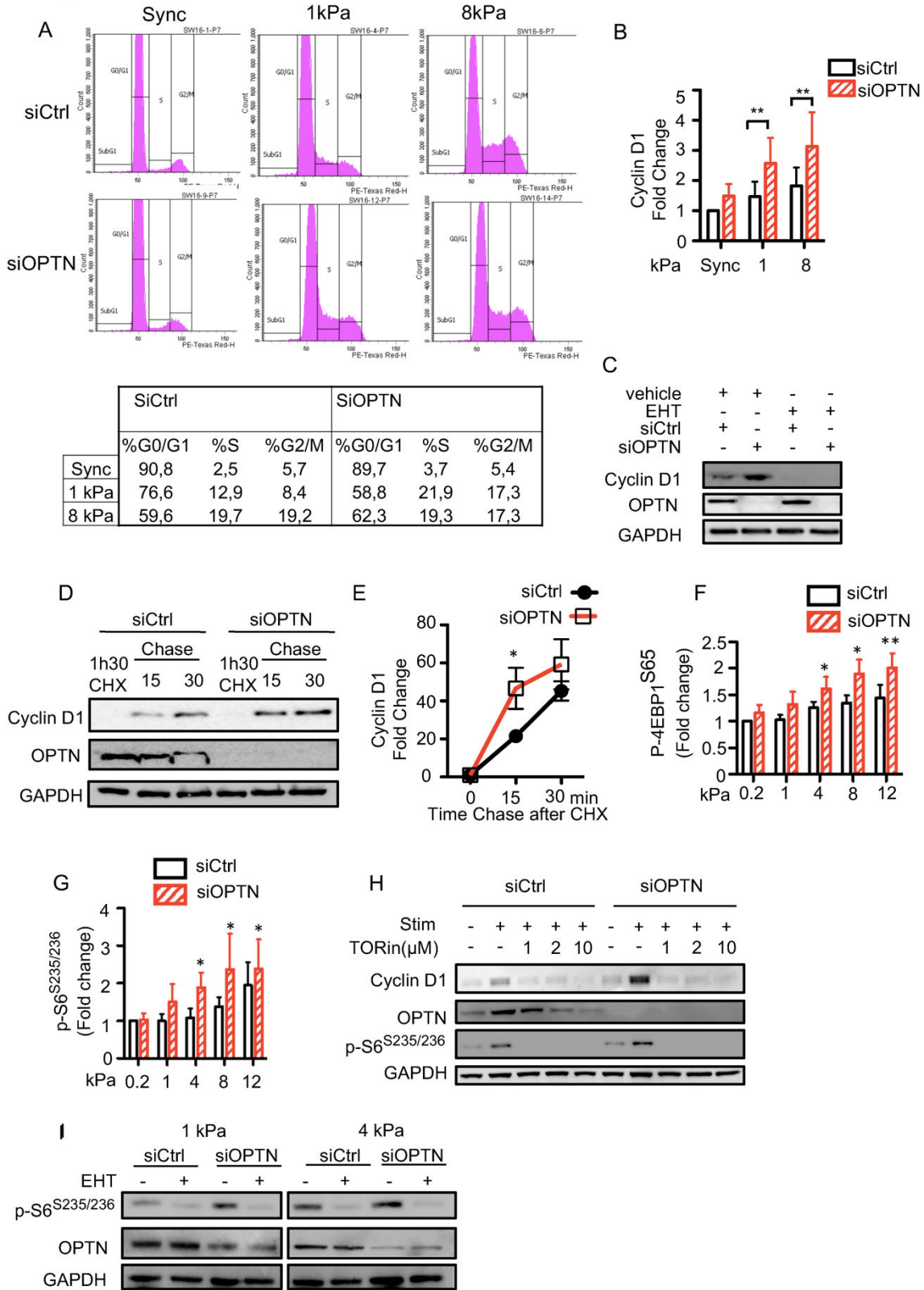
B



C



Supplemental FIGURE 6



CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Conclusions :

Le laboratoire a démontré en 2011 que le suppresseur de tumeurs HACE1 est la E3 ubiquitine ligase majeure de la forme active liée au GTP de Rac1 (219). Depuis, en collaborant avec l'équipe du Dr Sorensen nous avons déterminé que HACE1 contrôle la production d'EAOs par les isoformes Rac1-dépendantes de la NADPH oxydase et la transcription de la Cycline D1 (26). Il a par ailleurs été montré qu'HACE1 contrôle la migration et l'invasion Rac1-dépendante de carcinomes épithéliaux mammaires (123) (25). Les mécanismes moléculaires qui régulent spatio-temporellement l'activité de HACE1 restaient inconnus à ce jour.

Notre étude a permis d'identifier une activité régulatrice d'OPTN sur l'activité E3 ubiquitine ligase de HACE1. En effet, l'ensemble de nos résultats montre que l'augmentation de la rigidité matricielle engendre un clivage du motif en doigt de zinc d'OPTN, ce qui permet la formation d'un complexe HACE1/OPTN et la stimulation de l'activité HACE1 sur Rac1.

En conséquence, nous avons montré que l'OPTN régule les niveaux de Rac1-GTP en aval des intégrines, pour contrôler l'activation de la voie mTORC1 et la traduction de la Cycline D1.

Nous avons de plus montré que l'OPTN entraîne une atténuation de l'adhérence cellulaire qui se manifeste par une augmentation du nombre et de la taille des structures d'adhérence dans les cellules déplétées en OPTN par ARN interférence. D'une manière intéressante, l'augmentation de l'adhérence en absence d'OPTN ne s'accompagne pas d'une augmentation de la contraction acto-myosine, contraction que nous avons mesurée par différentes techniques biophysiques. Cependant, nous avons pu mesurer une augmentation de la signalisation en aval des intégrines qui se manifeste par des niveaux de phosphorylation élevés des protéines Src, Paxilline et p130cas. Les niveaux de phosphorylation Y397 de FAK sont apparus par contre diminués suite à la perte d'OPTN. Cette baisse de l'activation de FAK est en accord avec la baisse de contractilité que nous avons mesurée par les techniques biophysiques, mais en désaccord avec la signalisation augmentée des intégrines.

La perte d'OPTN engendre de ce fait une sensibilité cellulaire accrue à l'augmentation de la rigidité matricielle qui se manifeste par une augmentation d'entrée en phase S des cellules sur des matrices molles (1kPa). L'ensemble de nos résultats établit le premier lien entre le contrôle de Rac1 par la voie Ubiquitine - protéasome et la transduction des signaux exogènes mécaniques, et cela par le complexe OPTN/HACE1.

Discussion partie 1 : OPTN est-elle une cible régulatrice de l'activité ubiquitine ligase de HACE1 ?

L'équipe du Dr Hu, a montré que OPTN est un suppresseur de tumeurs et une cible de l'activité ubiquitine ligase de HACE1. Le modèle mécanistique proposé est le suivant :

HACE1 ubiquityle OPTN sur plusieurs lysines dont majoritairement la lysine 193 (K193), avec des chaînes poly-ubiquitines de type K48 et K27. L'ubiquitylation sur la K193 conduit à une complexation d'OPTN avec P62/SQSTM1 provoquant l'activation du flux autophagique et le ciblage de protéines carbonylées aux phagolysosomes pour être dégradées. D'une manière intéressante, cette équipe observe aussi une augmentation du stress oxydatif suite à la perte de HACE1 et/ou OPTN sans émettre un lien avec la régulation du complexe Rac1/NADPH oxydase par HACE1 (26). Des Xénogreffes sur souris nude et des expériences de croissance en agar ont montré que l'OPTN est un suppresseur de tumeurs qui réduit la transformation tumorale en diminuant le stress cellulaire et en activant l'autophagie (127).

Nos résultats fonctionnels vont dans le sens d'un contrôle de la croissance cellulaire par l'OPTN et cela par une régulation de la traduction de la Cycline D1. Néanmoins, nos données proposent une régulation mécanistique tout à fait différente. Ainsi, nous n'avons pas observé d'augmentation de l'ubiquitylation de l'OPTN en fonction des niveaux d'HACE1 et ce malgré l'utilisation de deux formes étiquetées d'OPTN, au niveau du C-terminal et N-terminal de la protéine. De plus, dans les cellules primaires HUVECs (Human Umbilical Vein Endothelial Cells), l'excision de la zone HIR (411-456) d'OPTN, définie par l'équipe du Dr Hu comme étant la zone d'interaction avec HACE1, conserve l'interaction Rac1-GTP dépendante d'OPTN avec HACE1 (Fig18 B). Ces différences de résultats peuvent s'expliquer par le modèle cellulaire utilisé. L'interaction entre HACE1/OPTN, présentée par l'équipe du Dr Hu semble intervenir dans un contexte de cellules transformées où les niveaux de stress oxydant et la prolifération cellulaire sont élevés. On peut imaginer que l'affinité entre OPTN et HACE1 serait différente de celle existant dans un contexte cellulaire normal.

De plus, la caractérisation de l'interaction HACE1 / OPTN diverge aussi entre notre étude et celle du Dr Hu. En effet, il a déterminé que l'interaction entre OPTN et HACE1 a lieu à travers le domaine Ankyrine et le domaine HIR d'OPTN (acide aminés 411 à 456). Cette interaction se fait sans une régulation post-traductionnelle d'OPTN. De notre côté, nous avons établi par une analyse double hybride en levure, qu'OPTN interagit avec HACE1 par une zone recouvrant les acides aminés 302 à

481, donc bien plus large que la zone d'interaction établit par l'équipe du Dr Hu. De plus, cette interaction est favorisée par l'excision du domaine en doigt de Zinc au niveau C-terminal d'OPTN, d'une manière dépendante de l'activation de Rac1.

Les techniques biochimiques utilisées pour mesurer l'ubiquitylation dans l'article de Liu *et al.* et dans mon travail de thèse sont également différentes, ce qui pourrait expliquer le désaccord entre nos résultats. En effet, pour mesurer l'ubiquitylation *in cellulo*, l'équipe du Dr Hu a utilisé des techniques consistant en l'immunoprécipitation des formes étiquetées ou endogènes d'OPTN en conditions non dénaturantes, suivies d'immunoblot contre l'ubiquitine. Cette technique présente des limites car elle permet de co-immunoprécipiter toutes les protéines ubiquitylées interagissant avec la protéine cible. OPTN possède un domaine d'interaction avec les chaînes poly-ubiquitylées (le domaine UBAN) et interagit avec p62/SQSTM1 qui possède aussi un domaine d'interaction avec l'ubiquitine, augmentant ainsi la probabilité de purifier non spécifiquement des protéines ubiquitylées. Au laboratoire, nous exprimons dans les cellules l'ubiquitine couplée à 6 histidines. Cela nous permet de purifier en conditions hautement dénaturantes (7M Urée) toutes les protéines ubiquitylées (l'ubiquitylation est une liaison covalente) par affinité en utilisant une résine de Cobalt, puis de mesurer l'ubiquitylation spécifique d'une protéine d'intérêt par immunoblot (Fig18 A).

Cependant, il est important de noter que Liu *et al.* ont montré *in vitro* que HACE1 ubiquityle OPTN, renforçant l'idée que *in cellulo* OPTN peut être une cible de HACE1. Toutefois, malgré les différences dans la description mécanistique, nos résultats sont en accord concernant la fonctionnalité du complexe HACE1/OPTN dans la suppression tumorale et la croissance cellulaire (Fig18 C).

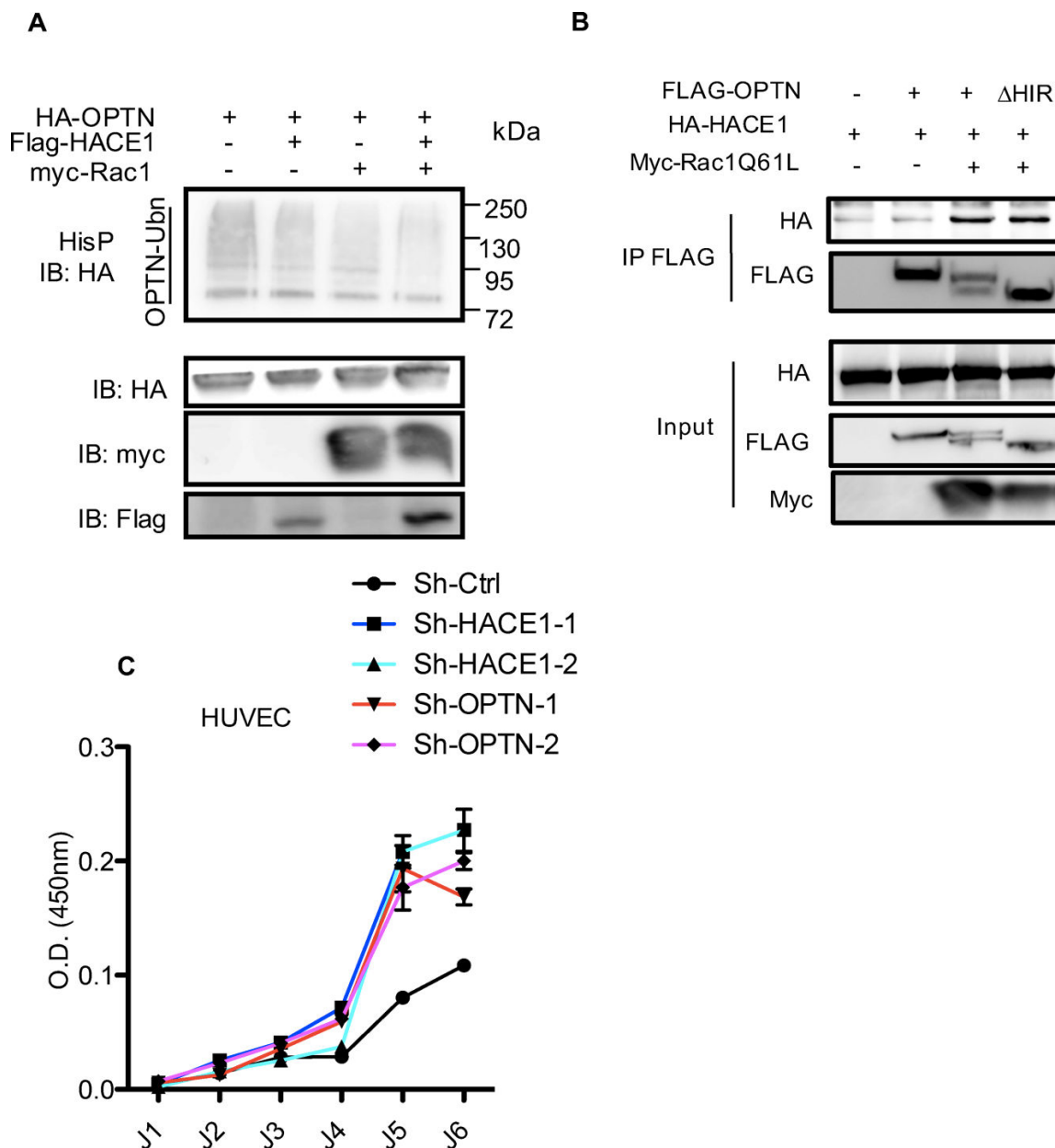


Figure 19 OPTN n'est pas une cible d'HACE1 dans les cellules HUVECs. A) Précipitation Histidine montrant l'ubiquitylation de OPTN en conditions d'expression de HACE1 et/ou Rac1Q61L. B) Co-immuno précipitations révélant l'interaction entre OPTN et HACE1 d'une manière dépendante de Rac1Q61L. Le mutant d'OPTN, ayant une délétion de la zone HIR (Hace1 interacting Region définie par (127)), conserve l'interaction avec HACE1. C) OPTN et HACE1 contrôlent la croissance cellulaire.

Discussion partie 2 : OPTN est à l'interface entre l'anabolisme et le catabolisme :

Nous avons identifié durant ma thèse un rôle d'OPTN dans le contrôle d'un axe de signalisation couplant la mécanotransduction à la traduction de la Cycline D1 par l'axe Rac1/mTORC1. En parallèle d'une sur-activation de mTORC1, nous avons observé une altération de différents

paramètres métaboliques dans les cellules KD-OPTN. Nous observons que les cellules siOPTN et siHACE1 ont une diminution des niveaux intracellulaires d'ATP qui se manifeste aussi par une augmentation des niveaux de phosphorylation de l'AMPK (l'AMPK est un senseur des niveaux cellulaires d'ATP) (Figure 20 A et B). Cette baisse des niveaux d'ATP dans les cellules KD OPTN et HACE1 est réversée lorsque l'on traite les cellules avec un inhibiteur de la voie mTOR (la Torin1).

Cette baisse des niveaux d'ATP peut s'expliquer de plusieurs manières : 1) La sur-activation de la voie mTORC1 promeut une augmentation de la glycolyse en aérobie par le contrôle de l'expression de Glut1 et les enzymes telles que les Hexokinases, l'Aldolase A, la Phospho-fructokinase, la Phosphoglycérate kinase et la Phosphoglycérate mutase ainsi que l'expression de la Lactate déshydrogénase 1 (246). L'ensemble de ces enzymes contribue ainsi « au Warburg effect » (247) lors de la prolifération cellulaire et de la différenciation cellulaire (248). Cela signifie que OPTN pourrait contrôler la glycolyse et la fermentation lactique au travers de la modulation de l'activité de mTORC1. 2) Ces données peuvent aussi indiquer une sur-consommation de l'ATP lorsque les cellules sont déplétées en OPTN. En effet, bien que nous n'observions pas une augmentation de la traduction globale, nous observons une augmentation très nette de la traduction de la Cycline D1 (accompagnée de l'augmentation de la traduction d'autres protéines qui ne sont pas citées dans le manuscrit) dans les cellules KD-OPTN qui s'accompagne de la chute du niveau d'ATP intracellulaire. L'inhibition de mTOR réprime la traduction de la Cycline D1 et restaure les niveaux d'ATP au même niveau que les cellules contrôles. Cette diminution de l'ATP intracellulaire pourrait également être causée par sa sur-consommation par les voies anaboliques contrôlées par mTOR dans les cellules KD-OPTN.

D'une manière surprenante, nous avons pu mesurer en parallèle de la baisse des niveaux d'ATP intracellulaires, une augmentation de 20% à 30% de la masse mitochondriale dans les cellules déplétées en OPTN ou en HACE1, respectivement (Figure 20 C et D). Ces résultats sont inattendus car nous savons par ailleurs que la production d'ATP par phosphorylation oxydative (i.e. au travers de la chaîne respiratoire) au niveau des mitochondries génère 36 ATP pour 1 molécule de glucose, contrairement à la glycolyse qui n'en génère que 2 (247). OPTN étant impliquée dans la Mitophagie de mitochondries défectueuses (235) (249) (243) (220), nous nous sommes demandés si cette augmentation de la masse mitochondriale était accompagnée d'une accumulation de mitochondries « défectueuses » en conséquence à une perturbation du flux autophagique. Nous avons pour cela étudié le potentiel de membrane des mitochondries, qui est un bon indicateur de l'état mitochondrial. Le potentiel membranaire mitochondrial est apparu identique dans les cellules Ctrl et

KD pour OPTN ou HACE1 (Figure 20E). En accord avec ces observations j'ai pu observer que le Flux Autophagique est identique dans les cellules Ctrl et KD-OPTN (Figure 20F). L'équipe du Dr Sonenberg ayant précédemment établi que mTORC1 promeut la biogénèse mitochondriale (250), nous avons émis l'hypothèse que cette biogénèse mitochondriale est augmentée dans les cellules KD-OPTN. L'ensemble de ces observations suggère qu'OPTN se retrouve à l'interface entre l'anabolisme et le catabolisme cellulaires et cela soit par son rôle décrit dans l'autophagie, soit par son influence sur les différents aspects du métabolisme cellulaire que nous avons pu identifier.

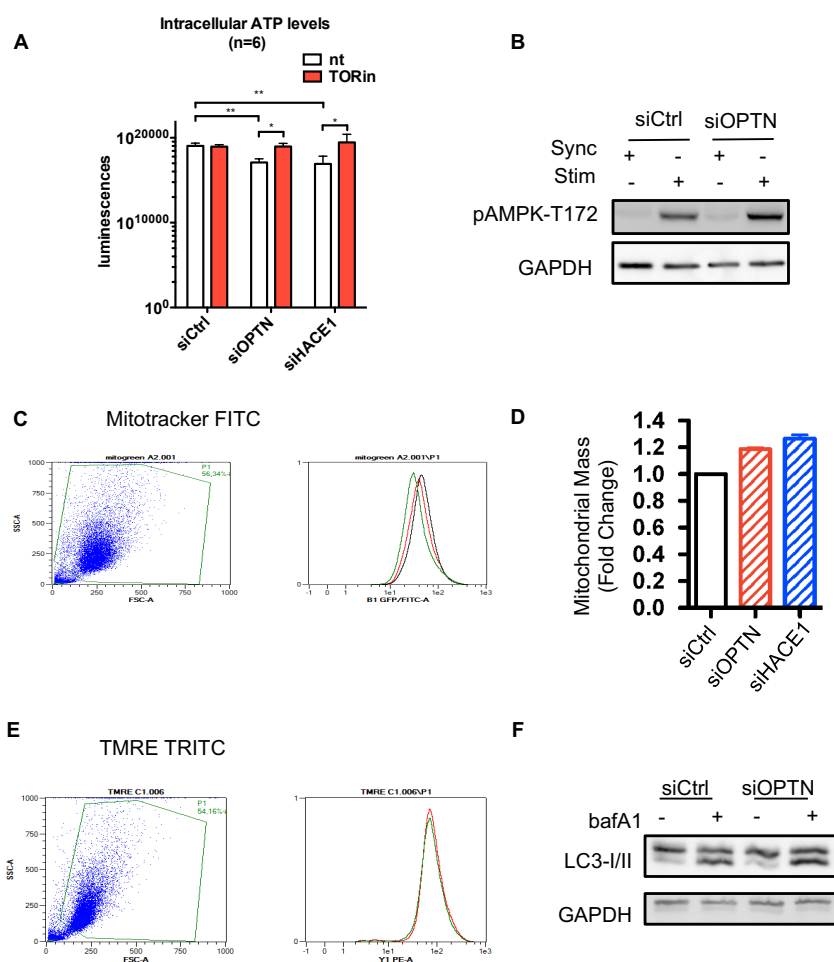


Figure 20 Les cellules siOPTN ont une diminution du niveau d'ATP intracellulaire et une augmentation de la phosphorylation de l'AMPK. A) Mesures d'activité luciférase reflétant les niveaux d'ATP dans des lysats cellulaires d'HUVECs siCtrl, siOPTN ou siHACE1. Les cellules ont été traitées avec du DMSO (nt) ou de la Torin1 à 1µM pendant 18h avant lyse et incubation avec la luciférase. B) Immunoblot de la forme phosphorylée de l'AMPK-T172 dans des cellules siCtrl et siOPTN en quiescence (Sync) ou en croissance (Stim). C & D) Moyennes de Fluorescence du Mitotracker mesurées par cytométrie de flux, indiquant la masse mitochondriale de cellules siCtrl, siOPTN et siHACE1. E) Fluorescences représentant le potentiel membranaire des mitochondries des cellules siCtrl, siOPTN et siHACE1. F) Immunoblot représentant le flux autophagique basal des cellules siCtrl et siOPTN. Les cellules sont traitées avec de la Bafilomycine à 10nM pendant 3h avant lyse et analyse par Westernblot de la lipidation de LC3.

Discussion partie3 : OPTN est importante pour la signalisation inside-out des intégrines.

Nous avons pu observer durant notre étude que l'inactivation par siRNA d'OPTN (siOPTN) conduit à une augmentation significative du nombre d'Adhérences focales dans les cellules et, de manière intéressante, à une augmentation très nette de la quantité de fibres de stress (détectée par immunofluorescence). Cependant, les mesures biophysiques montrent une diminution très claire des forces exercées par les cellules sur la matrice extracellulaire. Ces résultats sont inhabituels car le consensus dans la littérature décrit que l'initiation et la maturation des adhérences naissantes en complexes focaux dépend de l'activité de Rac1. La maturation des complexes focaux en adhérences focales dépend d'une contractilité acto-myosine médiée par RhoA et ROCK. Les forces générées par la contractilité intracellulaire sont transmises *via* les intégrines à l'environnement extracellulaire. Cette divergence entre nos observations et la littérature peut s'expliquer de plusieurs manières. OPTN peut en effet avoir un rôle de liaison entre le cytosquelette d'actine et les intégrines d'une manière similaire à la Taline et la Filamine. Et la perte d'OPTN dissocie, du moins partiellement, les structures d'adhérence du cytosquelette d'actine et donc de la contraction acto-myosine. Dans le sens de cette hypothèse, nous observons une diminution des forces exercées sur la matrice extracellulaire. Une autre hypothèse pouvant expliquer ces observations réside dans les modifications du métabolisme cellulaire. La contraction actomyosine est un processus ATP-dépendant. Le relâchement de la chaîne lourde de la myosine des fibres d'actine nécessite l'hydrolyse de l'ATP. Nous avons mesuré une chute de l'ATP suite à la perte de l'expression d'OPTN. L'ATP en devenant limitant pourrait provoquer une situation de tétanie des fibres de stress, qui ne pourraient alors pas exercer de force de traction.

Par ailleurs, nous avons pu mesurer une augmentation des niveaux de Rac1-GTP en aval des intégrines lorsque les cellules sont déplétées en OPTN. Or Rac1 promeut l'activation de ARP2/3 et la polymérisation de l'actine branchée, de ce fait l'augmentation de Rac1-GTP dans les cellules siOPTN peut provoquer une polymérisation continue aux niveaux des bordures de cellule. *Cela diminuerait la stabilisation des fibres de stress au niveau des adhérences focales* et la transduction de forces mécaniques par celles-ci. Oakes et al. ont montré aussi que 20% de la contraction acto-myosine sont suffisants pour assurer la maturation des complexes focaux en adhérences focales (251) et nous perdons au maximum 70% des forces de tractions mesurées par les techniques physiques, donc cette diminution de contractilité ne devrait pas a priori empêcher la maturation des complexes focaux en adhérences focales. En augmentant la polymérisation d'actine branchée, il est possible de penser

que l'on augmente la formation des adhérences naissantes et des complexes focaux, qui pourraient ensuite mûrir malgré le peu de contractilité acto-myosine existante.

Un aspect que nous n'avons pas examiné et qui pourrait expliquer l'augmentation du nombre d'adhérences focales indépendamment d'une contractilité acto-myosique résiderait dans le rôle d'OPTN dans le trafic vésiculaire. OPTN est impliqué dans l'exocytose par l'intermédiaire de Rab8 et de la Myosine VI et donc pourrait être impliquée dans l'endocytose *via* l'interaction avec d'autres protéines. En effet, les intégrines sont régulées par endocytose d'une manière dépendante et indépendante de la Clathrine. Ce recyclage est important pour une signalisation normale par les intégrines et implique de nombreuses Rabs, telles que Rab4, Rab11 et Arf6. Le recyclage des intégrines permet de réguler spatio-temporellement l'interaction des intégrines avec les ligands et les processus cellulaires qui en dépendent, tels que la croissance et la migration cellulaires. En effet, le temps de demi-vie des intégrines membranaires est d'environ 15 minutes. Donc, nous pouvons émettre l'hypothèse que la perte d'OPTN, provoque une dérégulation des phénomènes d'endocytose, prolongeant les temps de demi-vie des intégrines au niveau de la membrane et l'adhérence cellulaire. Cependant, cette hypothèse n'explique pas les diminutions en énergie contractile et forces totales observées dans les cellules siOPTN.

L'autophagie a été aussi impliquée très récemment dans la régulation de l'adhérence cellulaire. En effet, Kenific *et al.* ont démontré que le récepteur d'autophagie NBR1 permet de cibler des éléments des adhérences focales aux autophagolysosomes, promouvant la dissociation des adhérences focales et le recyclage de celles-ci (252) Cependant, Sharifi *et al.* ont démontré que la Paxilline peut se lier directement à la LC3 sans nécessairement l'intervention d'un récepteur sélectif d'autophagie. Cette liaison est régulée par SRC et permet le désassemblage des AF promouvant ainsi le recyclage des intégrines et la dissémination de cellules cancéreuses (253). Nous pouvons imaginer en effet qu'OPTN, par son rôle dans l'autophagie, peut contribuer au recyclage et à l'internalisation des intégrines. Et de ce fait la perte d'OPTN peut modifier le temps de demi-vie des AF expliquant l'augmentation de l'adhérence que nous avons observé.

Discussion partie 4 : L'expression génique de l'OPTN est modulée en fonction de la croissance cellulaire.

Nous avons pu observer durant ma thèse que l'expression d'OPTN, d'une manière similaire à celle de HACE1, est diminuée lorsque les cellules rentrent en phase S du cycle cellulaire. En effet, la

synchronisation par haute confluence cellulaire et la déprivation en nutriments des cellules conduit à l'augmentation des niveaux d'ARNm de HACE1 et d'OPTN, alors que à faible confluence cellulaire et en présence d'un milieu complet, les niveaux de transcription d'OPTN et HACE1 sont diminués. Cela implique que l'expression d'OPTN et d'HACE1 est inhibée au niveau transcriptionnel pour permettre la prolifération des cellules. Cela est en accord avec nos résultats que le complexe HACE1/OPTN est suppresseur de la rentrée en phase S des cellules.

Dans les tumeurs humaines, l'expression de HACE1 est perdue suite à l'hyper-méthylation de la zone promotrice de HACE1. La question se pose si cette régulation épigénétique de HACE1 se produit aussi dans un contexte cellulaire normal et si elle peut être dérégulée dans les tumeurs humaines. Il serait également pertinent de vérifier si la transcription de OPTN est régulée de la même façon. Les facteurs de transcription régulant la transcription d'OPTN et HACE1 ne sont pas complètement décrit, cependant nous savons que TFEB contrôle la transcription d'OPTN et d'autres gènes de l'autophagie dans un contexte de réponse inflammatoire et de déprivation en nutriments(234). Il serait donc important d'identifier si TFEB est responsable de la régulation transcriptionnelle d'OPTN et HACE1 dans le contrôle du cycle cellulaire, puisque l'expression de OPTN et de HACE1 à haute confluence sont augmentées dans des conditions de carence en nutriments.

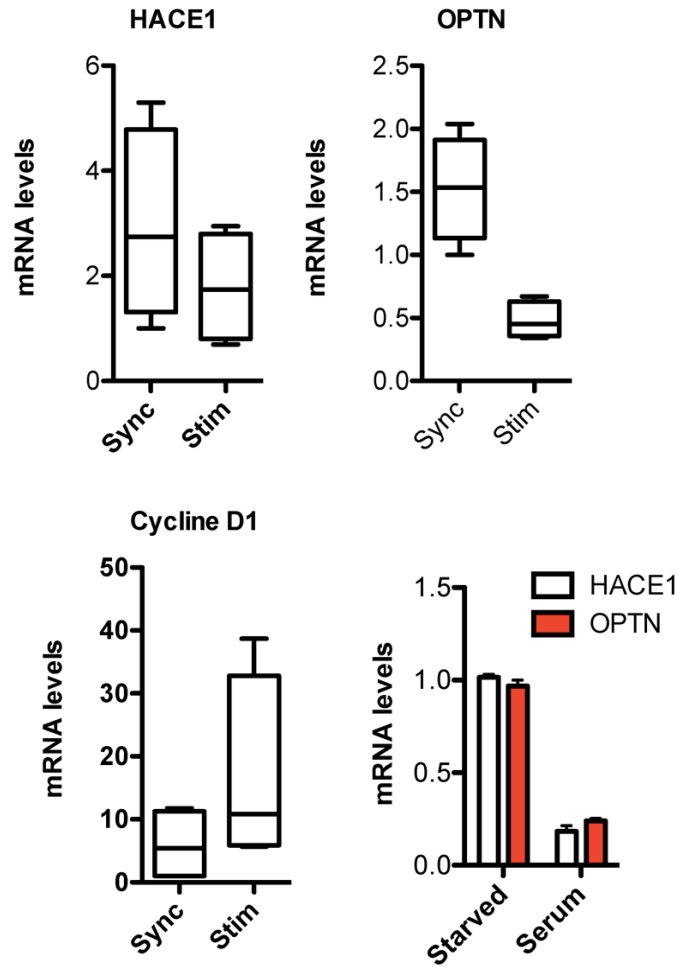


Figure 21 Les niveaux transcriptionnels de HACE1 et de OPTN sont modulés en fonction de la quiescence et de l'abondance de nutriments. Les niveaux d'ARNm de HACE1, OPTN et/ou la Cycline D1 sont mesurés par RT-qPCR dans des les cellules HUVECs en quiescence et confluentes (Sync), en prolifération (Stim), en déprivation de sérum (Starved) ou en milieu complet (Serum). Les graphes représentent la moyenne et les écart-types de 4 réplicats biologiques indépendants. Les données indiquent la variabilité entre chaque réplicat ainsi que l'effet lié au traitement cellulaire.

Travail collaboratif :

En parallèle de mon travail principal de thèse, j'ai participé à d'autres études en lien avec les techniques et tests que j'ai pu mettre au point ou utiliser dans mon travail principal de thèse. Ces travaux sont présentés en annexes. C'est notamment le cas pour les mesures de flux autophagique qui nous ont permis de montrer en collaboration avec l'équipe du Dr Eric Ghigo (Université de Marseille) l'importance de Morn2 dans le flux induit par l'interféron γ , le lipopolysaccharides (LPS) et la carence nutritionnelle (254). De même au laboratoire, j'ai contribué à un travail visant à caractériser le mode d'interaction de HACE1 avec Rac1 en étudiant des mutants de Rac1 existant dans les cancers. Ce travail a permis de localiser sur HACE1 un site de régulation de l'interaction avec Rac1 centré sur la Glycine-175 de la protéine et d'établir qu'une majorité des mutants perdent leur capacité à réguler la croissance cellulaire.



Screening in Planarians Identifies MORN2 as a Key Component in LC3-Associated Phagocytosis and Resistance to Bacterial Infection

Prasad Abnave,^{1,7,9} Giovanna Mottola,^{1,2,8,9} Gregory Gimenez,³ Nicolas Boucherit,¹ Virginie Trouplin,¹ Cedric Torre,¹ Filippo Conti,^{1,7} Amira Ben Amara,¹ Catherine Lepolard,¹ Benjamin Djan,¹ Daniel Hamaoui,⁷ Amel Mettouchi,⁷ Atul Kumar,^{1,7} Sophie Pagnotta,⁴ Stefano Bonatti,² Hubert Lepidi,¹ Alessandra Salvetti,⁵ Laurent Abi-Rached,⁶ Emmanuel Lemichez,⁷ Jean-Louis Mege,¹ and Eric Ghigo^{1,*}

¹CNRS UMR 7278, IRD198, INSERM U1095, Aix-Marseille Université, 27 Bd Jean Moulin 13385 Marseille Cedex 05, France

²Department of Molecular Medicine and Medical Biotechnology, University of Naples "Federico II," Via S. Pansini 5, 80131 Naples, Italy

³Otago Genomics & Bioinformatics Facility, Department of Biochemistry, University of Otago, PO Box 56, 710 Cumberland Street, Dunedin 9054, New Zealand

⁴Centre Commun de Microscopie Appliquée (CCMA) Université de Nice Sophia Antipolis, Faculté des Sciences, Parc Valrose, 06108 Nice Cedex 2, France

⁵Department of Clinical and Experimental Medicine, Unity of Experimental Biology and Genetics, University of Pisa, Via Volta 4, 56126 Pisa, Italy

⁶Centre National de la Recherche Scientifique, Laboratoire d'Analyse, Topologie, Probabilités - Unité Mixte de Recherche 7353, Equipe ATIP, Aix-Marseille Université, 13331 Marseille, France

⁷INSERM, U1065, C3M, Université de Nice Sophia-Antipolis, Equipe labellisée ligue contre le cancer, 06204 Nice Cedex 3, France

⁸Present address: UMR MD2, Aix-Marseille University and IRBA, Bd P Dramard, 13015 Marseille, Marseille, France

⁹Co-first author

*Correspondence: eric.ghigo@univ-amu.fr

<http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2014.08.002>

SUMMARY

Dugesia japonica planarian flatworms are naturally exposed to various microbes but typically survive this challenge. We show that planarians eliminate bacteria pathogenic to *Homo sapiens*, *Caenorhabditis elegans*, and/or *Drosophila melanogaster* and thus represent a model to identify innate resistance mechanisms. Whole-transcriptome analysis coupled with RNAi screening of worms infected with *Staphylococcus aureus* or *Legionella pneumophila* identified 18 resistance genes with nine human orthologs, of which we examined the function of *MORN2*. Human *MORN2* facilitates phagocytosis-mediated restriction of *Mycobacterium tuberculosis*, *L. pneumophila*, and *S. aureus* in macrophages. *MORN2* promotes the recruitment of LC3, an autophagy protein also involved in phagocytosis, to *M. tuberculosis*-containing phagosomes and subsequent maturation to degradative phagolysosomes. *MORN2*-driven trafficking of *M. tuberculosis* to single-membrane, LC3-positive compartments requires autophagy-related proteins Atg5 and Beclin-1, but not Ulk-1 and Atg13, highlighting the importance of *MORN2* in LC3-associated phagocytosis. These findings underscore the value of studying planarian defenses to identify immune factors.

INTRODUCTION

The study of host-pathogen interactions in model organisms offers a means to characterize new critical innate immune genes

that are conserved in higher eukaryotes. Phagocytosis and the ensuing intracellular destruction of pathogens represent essential processes in immunity that might be conserved in planarians (Morita, 1991). Here, we undertook a study to determine, at the molecular level, how the planarian *Dugesia japonica* copes with bacterial infections to pinpoint components of innate immunity that are conserved in humans.

The ease of handling planarians and the application of loss-of-function genetic approaches in these organisms makes them a valuable model system. Freshwater planarians have attracted tremendous interest due to their remarkable capacity to regenerate an entire organism from a tissue fragment (Elliott and Sanchez Alvarado, 2013). Planarians are found on four continents in a wide range of natural habitats (Sluys et al., 1998). Although planarians are primarily zoophages, or flesh-eating animals, they also feed on detritus, fungi, and bacteria (González-Estévez, 2009). Due to their diet, planarians are exposed to a wide range of microbes and are able to survive this exposure. While the regeneration of planarians has been an object of intensive investigation, the immunity of these species to bacterial pathogens remains largely unexamined. Nevertheless, pioneering works have shown that the antimicrobial capacity of planarians involves phagocytosis (Morita, 1991). We speculated that the study of planarians might shed light on conserved mechanisms of immunity, notably related to bacterial phagocytosis.

Phagocytosis consists of the uptake and digestion of particulate materials, including microbes (Underhill and Ozinsky, 2002). Microbes are internalized in phagosomes, which then mature and fuse with lysosomes to form degradative phagolysosomes (Kinchen and Ravichandran, 2008). Autophagy is the selective engulfment of cytoplasm (Levine et al., 2011), which also contributes to antibacterial immunity (Huang and Brumell, 2014). Indeed, bacteria that escape or damage phagosomal





Cell Host & Microbe

Screening in Planarians Reveals Antibacterial MORN2

membranes can be recaptured by the autophagic system, which consists of double-membrane compartments that fuse with lysosomes (Jo et al., 2013). Bacterial recognition by macrophages links components of the autophagy pathway to phagocytosis, notably through a mechanism called LC3-associated phagocytosis (LAP) (Martinez et al., 2011, 2013; Sanjuan et al., 2007). Autophagy-related protein 8/microtubule-associated protein 1 light chain 3 (Atg8 or LC3) is a 17-kDa protein that is conjugated to phosphatidylethanolamine (PE) to form an LC3-II conjugate at the membrane of autophagosomes and phagosomes in LAP (Sanjuan et al., 2007). It is thought that conjugation of LC3 to the phagosomal membrane in macrophages challenged by danger signals promotes phagosome fusion with lysosomes to eliminate dead cells (Martinez et al., 2011), degrade photoreceptors (Kim et al., 2013), or kill bacteria (Gong et al., 2011; Huang et al., 2009; Sanjuan et al., 2007). LAP is genetically defined by its independence from components of the autophagy preinitiation complex (ULK1, Atg13, and FIP200), but it requires Beclin1, Atg5, and Atg7 and is structurally defined by the presence of single-membrane compartments (Huang and Brummel, 2014).

A number of bacteria have evolved different systems to interfere with the maturation of phagolysosomal compartments (Baxt et al., 2013; Huang and Brummel, 2014). For example, *Legionella pneumophila* injects the effector RavZ to irreversibly delipidate LC3-II, thereby dampening the autophagy processes (Choy et al., 2012). Once it is phagocytosed by macrophages, *Mycobacterium tuberculosis* (strain H37Rv) inhibits phagosome maturation and escapes destruction within phagolysosomes (Russell, 2001). *M. tuberculosis* is one example of a bacterium for which this block in vesicular trafficking can be alleviated through physiological or pharmacological stimulation of autophagy (Gutierrez et al., 2004; Sundaramurthy et al., 2013). Therefore, decrypting the regulatory components of autophagy and phagocytosis is essential to increase our understanding of the molecular determinants that link autophagy machinery to phagosome maturation and thus decipher how cells promote the intracellular restriction of pathogen growth.

In this work, we establish planarians as a suitable model organism for the identification of antibacterial immune factors.

RESULTS

Planarians Are Resistant to Infection by a Wide Range of Bacterial Strains

We began by investigating the resistance of planarians to bacteria. Worms were fed a series of bacterial strains that are pathogenic to humans, *C. elegans* and/or *D. melanogaster* (Table 1). We visualized the ingestion of *L. pneumophila*, *S. aureus* or *M. tuberculosis* (Figures 1A) and other bacterial strains (Figures S1A available online). By direct measurement of colony-forming units (CFUs), we then evaluated bacterial clearance at 3, 6, and 9 days postfeeding of three doses of bacteria (Figures 1B and S1B). With the exception of *M. tuberculosis*, *M. avium*, and *M. marinum*, which persisted for up to 9 days before clearance (Figures 1B and S1B), all other strains of pathogenic bacteria tested were eliminated within 6 days postfeeding (Figures 1B and S1B). The nonpathogenic DH5 α laboratory strain of *Escher-*

ichia coli was already completely cleared 3 days after feeding (Figure 1C). Using immunohistochemistry and electron microscopy (EM), we visualized bacteria in phagosomes of intestinal cells (Figures 1D and 1E). Consistent with the kinetics of bacterial clearance measured by CFU counting, we observed a net decrease in bacterial labeling in intestinal tissues at day 6 (*L. pneumophila* and *S. aureus*) and at day 9 (*M. tuberculosis*) postfeeding (Figure 1D). Collectively, these data point to phagocytosis as one of the bacterial elimination processes in planarians. Direct injection of *S. aureus* into the animals at various sites (head, trunk, and tail) also resulted in microbial elimination (Figure S1C). The infections had no impact on the viability, photosensitivity, feeding, or mobility of *D. japonica* individuals (Figure S1D). Study of another flatworm species, *Schmidtea mediterranea*, also revealed the strong capacity of these worms to cope with ingestion of any of the 16 bacterial strains tested (Figure S1E). Taken together, these data underscore the remarkable ability of planarians to resolve infections triggered by a broad range of bacterial strains.

Upregulated Genes Involved in the Elimination of *L. pneumophila* and *S. aureus*

To characterize the molecular mechanisms employed by planarians to control bacterial infection, we conducted a high-throughput mRNA sequencing (RNaseq) analysis of worms challenged with either *S. aureus* or *L. pneumophila* (see Supporting Information for details of the bioinformatics analysis). Gene expression analysis (Figure S2A) highlighted 1,456 common sequences that were upregulated (Figure 2A; Table S1A). Among these sequences, 291 were grouped according to their clusters of orthologous groups (COGs) functions (Figure S2B; Table S1B; Supplemental Information). Bioinformatic analysis of COG functions revealed a major adaptation of the host to bacterial challenge through the expression of factors primarily related to protein synthesis and degradation, as well as posttranslational modifications (Figure S2B; Supplemental Information section "Gene expression and functional categories"). To design dsRNA for RNA interference screening, sequences belonging to the same COG identifier were grouped, and the longest sequence was selected to define the targeting primers (Elbashir et al., 2001; Yang et al., 2000). Sequences shorter than 300 bp were excluded (Elbashir et al., 2001; Yang et al., 2000); in total, 145 sequences were selected (Figure S2C; Table S1C; Supplemental Information). We confirmed the expression of these 145 gene sequences during planarian infection with *L. pneumophila* and *S. aureus* (Jaccard index <1 between the data obtained through RNA sequencing and that obtained through qRT-PCR, indicating a correlation) (Figures S2D and S2E).

We next investigated the contribution of the identified genes to bacterial clearance using RNAi-mediated knockdown (Reddien et al., 2005; Sánchez Alvarado and Newmark, 1999). We succeeded in generating dsRNA-encoding plasmids for 93% of these genes (Table S1D). We first tested their capacity to reduce *L. pneumophila* elimination by *D. japonica* at 6 days postinfection through a PCR-based pre-screening approach. This resulted in the identification of 18 sequences (Table S1E). Next, via direct measurement of CFUs, we confirmed a major impact of these 18 identified RNAi on the elimination of

Table 1. Selected Bacterial Pathogens

Class of Organism	Species	Pathogen for <i>H. sapiens</i>	Pathogen for <i>C. elegans</i>	Pathogen for <i>D. melanogaster</i>
Gram negative				
	<i>B. cepacia</i>	pneumonia and septicemia (Pujol et al., 1992)	(Köthe et al., 2003)	(Castonguay-Vanier et al., 2010)
	<i>B. multivorans</i>	fulminant pneumonia (Carvalho et al., 2007)	(O'Quinn et al., 2001)	(Castonguay-Vanier et al., 2010)
	<i>B. melitensis</i>	brucellosis (Franco et al., 2007)	ND	ND
	<i>L. pneumophila</i>	pneumonia (Steinert et al., 2007)	(Komura et al., 2010)	ND
	<i>S. marcescens</i>	bacteremia, pneumonia (Chiang et al., 2013)	(Kurz and Ewbank, 2000)	(Nehme et al., 2007)
	<i>S. typhimurium</i>	salmonellosis (Fàbrega and Via, 2013)	(Labrousse et al., 2000)	(Schneider et al., 2007)
Gram positive				
	<i>B. thuringiensis</i>	soft-tissue infection, necrosis (Hernandez et al., 1998)	(Marroquin et al., 2000)	(Khyami-Horani, 2002)
	<i>C. jeikeium</i>	sepsis, endocarditis (Belmares et al., 2007; Olson et al., 2009)	ND	ND
	<i>E. faecalis</i>	various wound infection; bacteremia (Murray, 1990)	(Sifri et al., 2002)	(Schneider et al., 2007)
	<i>L. monocytogenes</i>	listeriosis (Vázquez-Boland et al., 2001)	(Thomsen et al., 2006)	(Schneider et al., 2007)
	<i>S. aureus</i>	pneumonia, abscess, sepsis, toxic shock syndrome (Peres and Madrenas, 2013)	(Garsin et al., 2001)	(Schneider et al., 2007)
	<i>S. pneumoniae</i>	pneumonia, septicemia, and meningitis (Muzzi and Donati, 2011)	(Garsin et al., 2001)	(Schneider et al., 2007)
Mycobacteria	<i>M. avium</i>	pulmonary infection (Weiss and Glassroth, 2012)	ND	ND
	BCG	opportunistic infection (Azzopardi et al., 2009)	ND	ND
	<i>M. marinum</i>	cutaneous ulcers, nodules, or nodular lymphangitis (Jernigan and Farr, 2000)	ND	(Dionne et al., 2003)
	<i>M. tuberculosis</i>	tuberculosis (Gagneux et al., 2006)	ND	ND

List of the 16 bacterial species selected, representing three main classes of pathogens responsible for human diseases and pathogens of other model organisms, such as *C. elegans* or *D. melanogaster*. ND, not described.

L. pneumophila (2- to 35-fold CFU increase, day 9) (Figure 2B) and *S. aureus* (2- to 25-fold CFU increase, day 9) (Figure 2C) at days 6 and 9 postfeeding. Whole-mount in situ hybridization (WISH) revealed that these 18 genes were primarily expressed in intestinal tissues in response to infection by *S. aureus* or *L. pneumophila* (Figure 2D). Quantitative RT-PCR analysis further confirmed the transient expression of all 18 genes over the 9-day period in response to challenge with *L. pneumophila* (Figure S2F) and *S. aureus* (Figure S2G). Thus, we have identified 18 genes expressed in the intestine of infected planarians that actively contribute to the elimination of *L. pneumophila* and *S. aureus*.

MORN2 Broad Spectrum of Action during Infection and Conservation in Mammals

Next, we performed a functional analysis to determine among the 18 resistance genes those with the broadest spectrum of action on a series of bacterial strains, described in Table 1. This analysis identified eight genes that were active against at

least all bacterial strains from one class (i.e., Gram-negative [*B. melitensis*, *B. cepacia*, *B. multivorans*, *L. pneumophila*, *S. marcescens*, and *S. typhimurium*], Gram-positive [*B. thuringiensis*, *C. jeikeium*, *E. faecalis*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, and *S. pneumoniae*], or mycobacteria [*M. avium*, BCG, *M. tuberculosis*, and *M. marinum*]) (Figure 3A; Table S1F). Other bacterial resistance genes had an impact on six to ten bacterial strains, irrespective of whether they belonged to a specific class (Table S1F). Interestingly, our functional analysis also revealed that gene #12 was critical for the efficient clearance of all tested microbes (Figure 3A). Phylogenetic analysis of these eight genes indicated that they were split into three evolutionary classes: genes conserved in several metazoans (genes #4, #10, and #12) (Figures 3B, 3C, and S4A), genes conserved in platyhelminthes only (genes #7, #8, and #17) (Figures 3B and S4B), and genes with no clear ortholog in other species (genes #2 and #6) (Figure 3B; Supplemental Information section "Gene-by-gene summary of the sequence analysis"). Gene #12, which was ascribed the broadest resistance

Cell Host & Microbe

Screening in Planarians Reveals Antibacterial MORN2

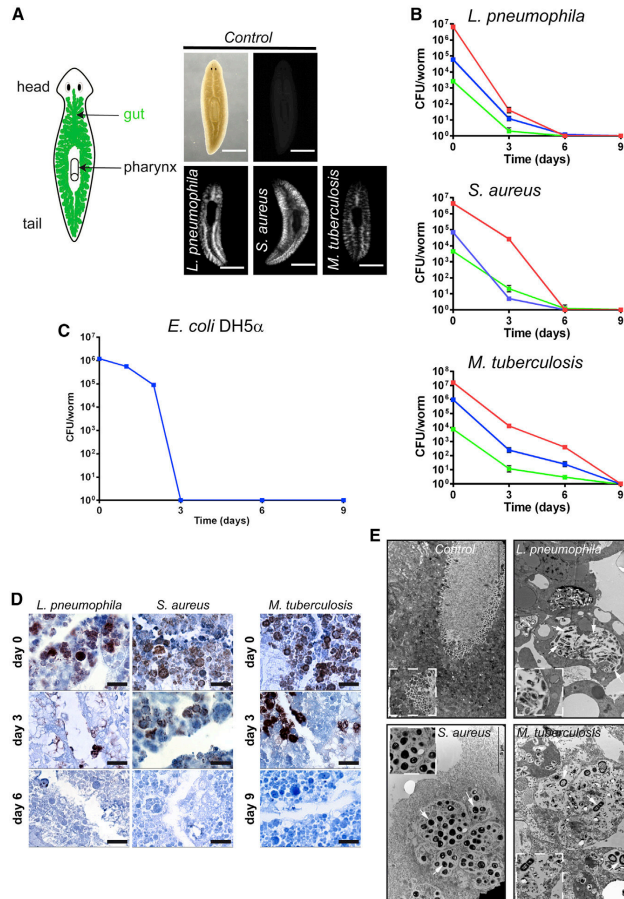


Figure 1. Planarians Are Resistant to Infection by a Wide Range of Bacterial Strains

(A) *D. japonica* worms were fed FITC-labeled bacteria (see also Figure S1A). The bacteria localized to the intestines of the planarians. Representative micrographs of three experiments (five worms per experiment) are shown. Scale bars, 2.5 mm.

(B) Individuals of *D. japonica* were fed three different concentrations (red line: 1×10^{12} ; blue line: 1×10^7 ; green line: 1×10^5 bacteria) of Gram-negative and Gram-positive bacteria and mycobacteria, and the CFUs per worm were counted over time (see also Figure S1B). The results are expressed as means \pm SD (ten worms per time point, $n = 3$).

(C) Worms were fed with *Escherichia coli* (10^9 bacteria per feeding). Bacterial viability was determined by CFU counting. The results are expressed as means \pm SD (five worms per experimental condition; $n = 2$).

(D) Immunohistochemistry showing the presence of bacteria (brown) in intestinal cells (counterstained in blue). Representative micrographs of two experiments (three worms per experimental condition) are shown. Magnification, 63 \times ; scale bars, 100 μ m.

(E) EM demonstrating the presence of bacteria in cells. Representative micrographs from two experiments are shown. White arrows indicate bacteria within phagosomes. The insert shows bacteria inside phagosomes in cells. Scale bars, 5 μ m.

function, encodes a protein consisting of 143 amino acids (Figure S4C). This protein has no identified function but is orthologous (48% identity at the amino acid level) to the human Membrane Occupation and Recognition Nexus (MORN) repeat-containing-2 (MORN2) gene (Figure S4C). Although MORN2 is conserved in humans, it has been lost from the ecdysozoan taxonomic group, which includes *C. elegans* and *D. melanogaster* (Figure 3C). Immunohistochemical analysis revealed the persistence of *L. pneumophila*, *S. aureus*, and *M. tuberculosis* in MORN2-silenced planarians (Figure 3D). Moreover, expression of MORN2 was also critical for the clearance of all bacteria tested in *S. mediterranea* planarian species (Table S1G). Here, we identify a set of bacterial resistance genes in planarians comprising human orthologs such as MORN2.

gated the functional implication of Hs-MORN2 in the macrophage-mediated restriction of proliferation of *L. pneumophila*, *S. aureus*, and *M. tuberculosis*. We measured the induction of Hs-MORN2 mRNA in macrophages challenged with *L. pneumophila* or *S. aureus* compared to *M. tuberculosis* challenge (Figures S5A and S5C). Our functional analysis next revealed that the silencing of Hs-MORN2 slightly reduced the phagocytosis of all three bacteria by 20% and markedly increased their intracellular growth by at least 2-fold (Figures 4A and 4B). As a complementary strategy, we investigated whether forced expression of Hs-MORN2 promoted the resistance of macrophages to bacterial infection. Whereas Hs-MORN2 expression showed little (*L. pneumophila*) or no effect (*S. aureus* and *M. tuberculosis*) on bacterial internalization (Figure 4C), it reduced their proliferation in macrophages by

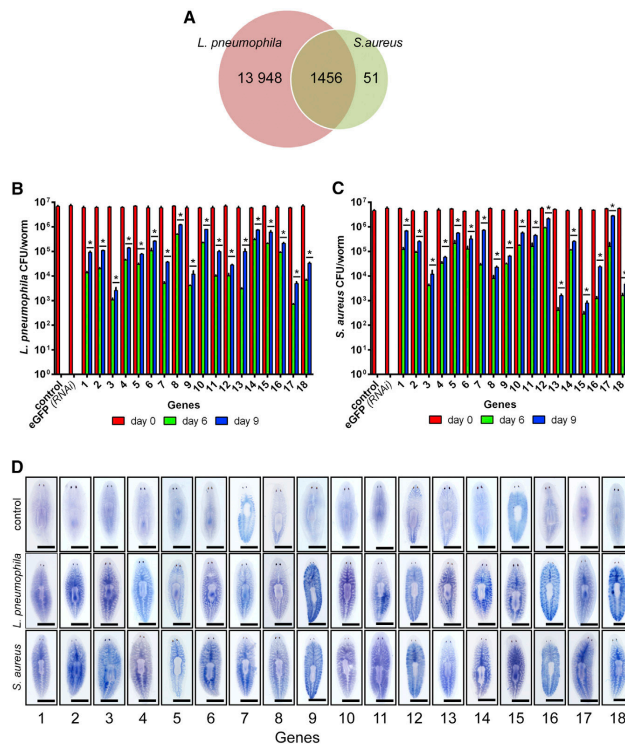


Figure 2. Upregulated Genes Involved in the Elimination of *L. pneumophila* and *S. aureus*
(A) Venn diagram showing that 1,456 planarian genes were commonly upregulated following challenge with *L. pneumophila* or *S. aureus* (see Supplemental Information).

(B and C) RNAi-treated *D. japonica* individuals were fed with *L. pneumophila* (B) or *S. aureus* (C); bacterial fitness was then evaluated by CFU counting. The results are expressed as means \pm SD (ten worms per point, $n = 3$, $^*p < 0.05$). The specificity of our RNAi screen (Figures S3A and S3B) and the efficiency of mRNA knockdown (Figure S3C) were confirmed.

(D) WISH at day 0 revealed that 18 genes were specifically upregulated in planarian intestinal tissue in response to *L. pneumophila* or *S. aureus*. Representative micrographs of two experiments (ten worms per point) are shown. Scale bars, 2.5 mm. The specificity of the WISH staining was verified (Figure S3D).

Hs-MORN2 Controls LC3 Recruitment to Phagosomes Containing *M. tuberculosis* and *L. pneumophila* in Mammalian Macrophages

We showed that infection with *M. tuberculosis* does not induce the expression of *MORN2* in macrophages, contrary to *L. pneumophila* (Figure S5A). Remarkably, we observed that GFP-Hs-MORN2 expression in macrophages infected with *M. tuberculosis* promoted the localization of bacteria ($81\% \pm 14.5\%$) in LC3-positive compartments compared to $20\% \pm 12\%$ in GFP control cells (Figure 5A). *L. pneumophila* colocal-

izes with LC3 ($85\% \pm 15\%$) and endogenous MORN2 ($92\% \pm 7.8\%$) in control macrophages (Figure 5B). The silencing of *MORN2* in macrophages decreased the colocalization of *L. pneumophila* with LC3 by 4.7-fold (Figure 5B). These data suggest that MORN2 promotes the recruitment of LC3 to phagosome-containing bacteria. When we analyzed the interaction of MORN2 with LC3, as well as with p62/SQSTM1, we observed coimmunoprecipitation of all three proteins in macrophages (Figures 5C and S6A). We investigated the role of Hs-MORN2 in the conjugation of LC3 to PE, given that PE is required for the recruitment of LC3 to membranes. Cells were challenged with potent inducers of LC3 conjugation, comprising starvation or cell treatment with either LPS or IFN γ (Mizushima et al., 2010; Xu et al., 2007). Conjugation was assessed by measuring the levels of LC3-II in the presence or absence of bafilomycin A1 (BafA1). This treatment blocks the fusion of autophagosomes with lysosomes, thereby increasing the accumulation of LC3-II. LC3-II levels showed a marked decrease after MORN2 knockdown in cells starved or treated with LPS or IFN γ (Figure 5D). In macrophages challenged with LPS, IFN γ , or starvation, we found an induction of *MORN2* mRNA (Figure S6B) as well as the strong localization of MORN2 ($74\% \pm 15\%$) with vesicles positive for

approximately 70% (Figures 4D and S5D). Expression of *D. japonica* MORN2 (*Dj-MORN2*) in human macrophages also reduced bacterial proliferation, supporting the idea of a conserved antibacterial function for MORN2 between planarians and humans (Figure S5E). To elucidate the role of MORN2 in phagocytosis-mediated restriction of bacterial growth, we investigated the interplay of MORN2 with the intracellular trafficking of *M. tuberculosis* and *L. pneumophila*. As reported, *M. tuberculosis* blocks phagosome maturation and the acquisition of the lysosomal protease marker (cathD) (Russell, 2001) (Figure 4E). Remarkably, we found in macrophages expressing GFP-Hs-MORN2 that a large majority of *M. tuberculosis* ($91\% \pm 5\%$) localized in cathD-positive compartments compared to control cells ($7\% \pm 4\%$) (Figure 4E). Under these experimental conditions, we identified the colocalization of MORN2 with compartments containing *M. tuberculosis* ($92\% \pm 7.2\%$) (Figures 4E and 5A). Expression of GFP-Hs-MORN2 also promoted the relocation of 90% of *L. pneumophila* to cathepsin-D-positive phagolysosomes compared to control cells ($14.5\% \pm 6.1\%$) (Figure 4F). In conclusion, MORN2 expression promotes the maturation of phagosome-containing *M. tuberculosis* or *L. pneumophila* into phagolysosomes.

Cell Host & Microbe
Screening in Planarians Reveals Antibacterial MORN2

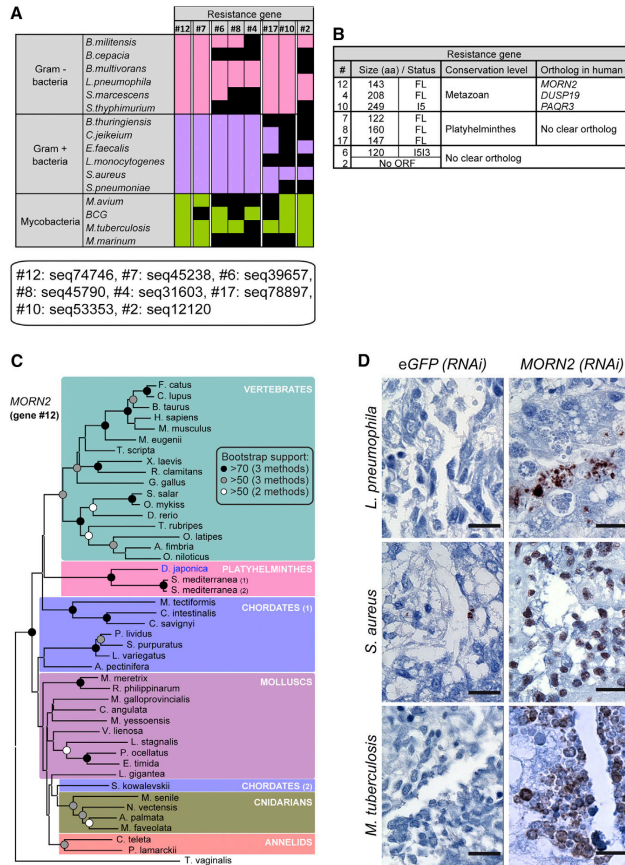


Figure 3. MORN2 Importance Highlighted by Its Spectrum of Action during Infection and Its Conservation

(A) RNAi analysis revealed that, of the 18 genes shown in Figure 2 and Table S1F, eight genes controlled at least one class of pathogen. Black boxes indicate the absence of detectable bacteria; colored boxes (pink for Gram-negative bacteria; violet for Gram-positive bacteria; green for mycobacteria) indicate the detection of bacteria (see also Table S1F).

(B) The eight *D. japonica* resistance genes were divided into three groups: genes conserved in metazoans, genes conserved in platyhelminthes, and genes with no clear orthologs. FL, full-length; IS3, incomplete at 5' and 3' ends.

(C) Phylogenetic reconstruction of *D. japonica* resistance gene #12, called *MORN2*.

(D) Immunohistochemistry demonstrating the persistence of *L. pneumophila*, *S. aureus*, and *M. tuberculosis* (brown) in intestinal cells (counterstained in blue) of *MORN2*-silenced planarians at 9 days postfeeding. Representative micrographs of two experiments (three worms per experiment) are shown. Magnification, 63 \times ; scale bars, 100 μ m. (For gene annotation, see supporting online material in the Supplemental Information section.)

genes to the colocalization of *Mycobacterium* with LC3 in cells expressing Hs-MORN2. We silenced genes required for both autophagy and LAP, such as *Atg5* and *beclin1*, and genes required only for autophagy, such as *Ulk1* and *Atg13* (Florey et al., 2011; Henault et al., 2012; Martinez et al., 2011). Inactivation of *Atg5* (Figures 6B and S6F) and *Beclin1* (Figures S6D and S6F) reduced the colocalization of *M. tuberculosis* with LC3 by 4-fold. The silencing of *Ulk1* (Figures 6B and S6C) and *Atg13* (Figures S6D and S6F) had no effect on the colocalization of *M. tuberculosis* with LC3. Silencing of *Atg5*, *Atg13*, *beclin1*, or *Ulk1* did not significantly affect bacterial phagocytosis (Figures S6E and S6F). Together, these data support a role for MORN2 in the LAP of *M. tuberculosis*. Complementary to these findings, we found that *Atg5* silencing reduced the colocalization of *M. tuberculosis* with lamp1 by 70% (Figures 6C and S6G) and of *M. tuberculosis* with by 60% (Figures 6D and S6G). Similar data were obtained by silencing LC3 (Figures 6C, 6D, and S6G). Taken together, our data show a functional role for MORN2 in the LAP of *M. tuberculosis*.

DISCUSSION

We report that planarians are extremely efficient at destroying ingested bacteria, and we identify key resistant genes such as MORN2, which is conserved in humans and involved in LC3-assisted phagocytosis.

LC3 (Figure S6C). Our data point to a role for MORN2 in the control of LC3 recruitment to phagosomes containing bacteria through the promotion of LC3 conjugation.

Hs-MORN2 Expression Promotes the LAP of *M. tuberculosis* in Mammalian Macrophages

Next, we assessed whether the expression of MORN2 reduced the proliferation of *M. tuberculosis* (strain H37Rv) via LAP or autophagy. The hallmark of autophagy is the presence of a double membrane surrounding the cytoplasmic material to be degraded (Huang and Brumell, 2014; Klionsky et al., 2012; Mizushima et al., 2010). We performed EM analysis of GFP-MORN2-expressing macrophages, under which conditions bacteria were present in LC3-positive compartments. We observed that 87% of single-membrane phagosomes surrounded *M. tuberculosis* (Figure 6A). Complementary to our EM analysis, we analyzed the contribution of four autophagy

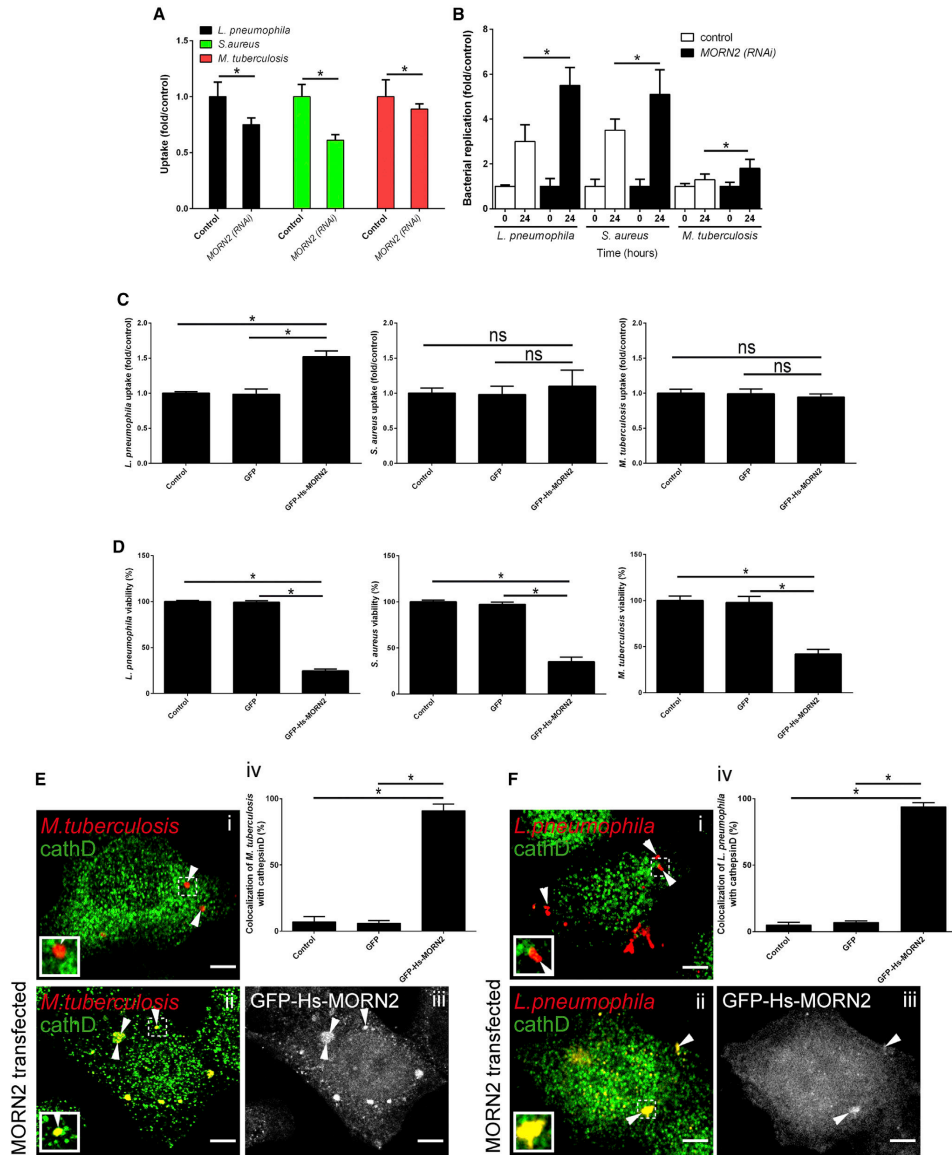


Figure 4. Hs-MORN2 Promotes Phagocytosis and Restricts Bacterial Growth in Mammalian Macrophages

(A and B) Human macrophages were subjected to RNAi targeting of *Hs-MORN2* and then infected with *L. pneumophila*, *S. aureus*, or *M. tuberculosis*. Bacterial uptake (A) and bacterial replication (B) were evaluated by CFU counting. The results are expressed as means \pm SD ($n = 3$, $^*p < 0.05$).

(legend continued on next page)

Cell Host & Microbe

Screening in Planarians Reveals Antibacterial MORN2

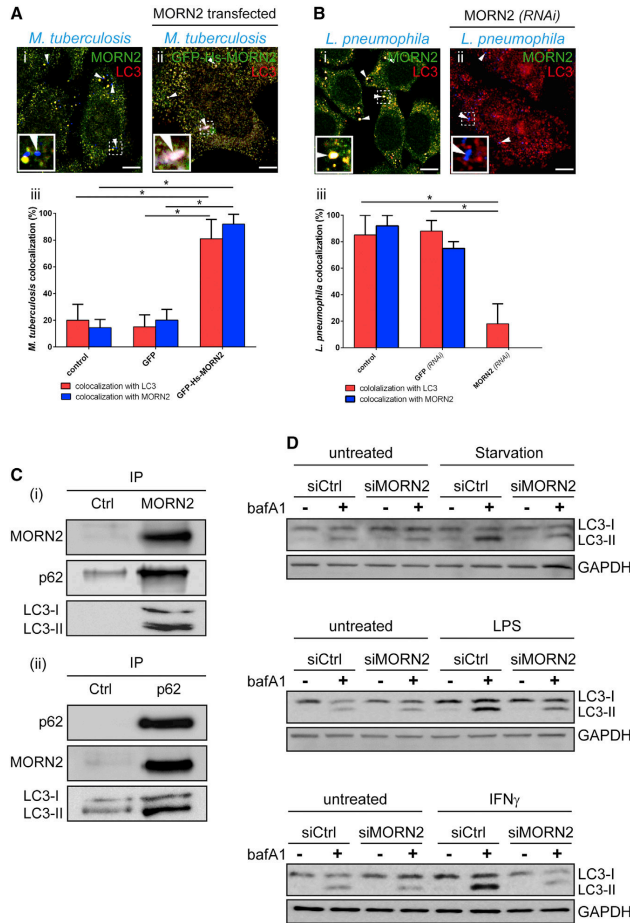


Figure 5. MORN2 Controls LC3 Recruitment to Phagosomes Containing *M. tuberculosis* or *L. pneumophila* in Mammalian Macrophages

(A) Macrophages expressing GFP-MORN2 (Aii) or not (Ai) were infected with *M. tuberculosis*. (Ai) and (Aii) show the colocalization of mycobacteria (blue) with LC3 (red) or MORN2 (green). (Aii) Quantification of this colocalization. The results are expressed as means \pm SD (n = 3, *p < 0.05). Scale bars, 5 μ m. (B) Macrophages that were either depleted of MORN2 by RNAi (Bii) or not (Bi) were infected with *L. pneumophila*. (Bi) and (Bii) demonstrated colocalization of *Legionella* (blue) with LC3 (red) and endogenous MORN2 (Bi) (green). Expression of the RNAi construct directed against MORN2 was visualized through GFP expression; (Biii) presents the quantification of this colocalization. The results are expressed as means \pm SD (n = 3, *p < 0.05). Scale bars, 5 μ m. (C) MORN2 was immunoprecipitated from BMDM lysates, and coimmunoprecipitation with p62/SQSTM1 and LC3 was visualized by immunoblotting. The blot shown is representative of two experiments. (Ci) p62 was immunoprecipitated from BMDM lysates, and coimmunoprecipitation with MORN2 and LC3 was visualized by immunoblotting. The blot shown is representative of two experiments. (D) Autophagic flux was measured in control or MORN2 knockdown HUVECs either challenged with *E. coli* LPS (1 μ g/ml) or IFN γ (20 ng/ml) or subjected to overnight starvation. LC3-II levels in the presence or absence of bafilomycin A1 (BafA1, 10 nM) were measured by immunoblotting. The blot shown is representative of three experiments.

both conserved and specific signaling pathways for engaging antimicrobial responses (Marsh and May, 2012; Stuart and Ezekowitz, 2008). We show in this work that planarians are able to resist infection by a particularly broad spectrum of bacteria. This was established with a model of infection by feeding. We report that bacteria localized to gut tissues and phagosomal-like structures following

To date, no further efforts have been made to carry out a deeper molecular characterization of planarian immunity. Interestingly, the study of model organisms such as *C. elegans* and *D. melanogaster* has revealed that many organisms possess

ingestion. These observations point to phagocytosis in planarians as an immune process for bacterial clearance. We undertook a whole-genome analysis of the planarian response to bacterial challenge combined with a functional RNAi-based

(C and D) Human macrophages were transfected with GFP-Hs-MORN2 and subsequently infected with *L. pneumophila*, *S. aureus*, or *M. tuberculosis*. Bacterial uptake (C) and bacterial viability (D) were quantified by CFU counting. The results are expressed as means \pm SD (n = 3, *p < 0.05) (see also Figure S5). (E) Colocalization of *M. tuberculosis* (red) with the phagolysosome marker cathepsin D (cathD, green) in macrophages expressing GFP-Hs-MORN2 (Eii) and (Eiii) was assessed by confocal microscopy and quantified. (Eiii) Expression of the GFP-Hs-MORN2 construct. (Eiv) Quantification of the colocalization of bacteria and cathepsin D. The results are expressed as means \pm SD (n = 3, *p < 0.05). Arrows indicate bacteria. The insert shows the colocalization of bacteria with cathepsin D. Scale bars, 5 μ m. (F) The colocalization of *L. pneumophila* (red) with the phagolysosome marker cathepsin D (cathD, green) in macrophages expressing GFP-Hs-MORN2 (Fii) or control cells (Fi) was assessed by confocal microscopy and quantified. (Fiii) Expression of the GFP-Hs-MORN2 construct. (Fiv) Quantification of the colocalization of bacteria and cathepsin D. The results are expressed as means \pm SD (n = 3, *p < 0.05). Arrows indicate bacteria. The insert shows the colocalization of bacteria with cathepsin D. Scale bars, 5 μ m.

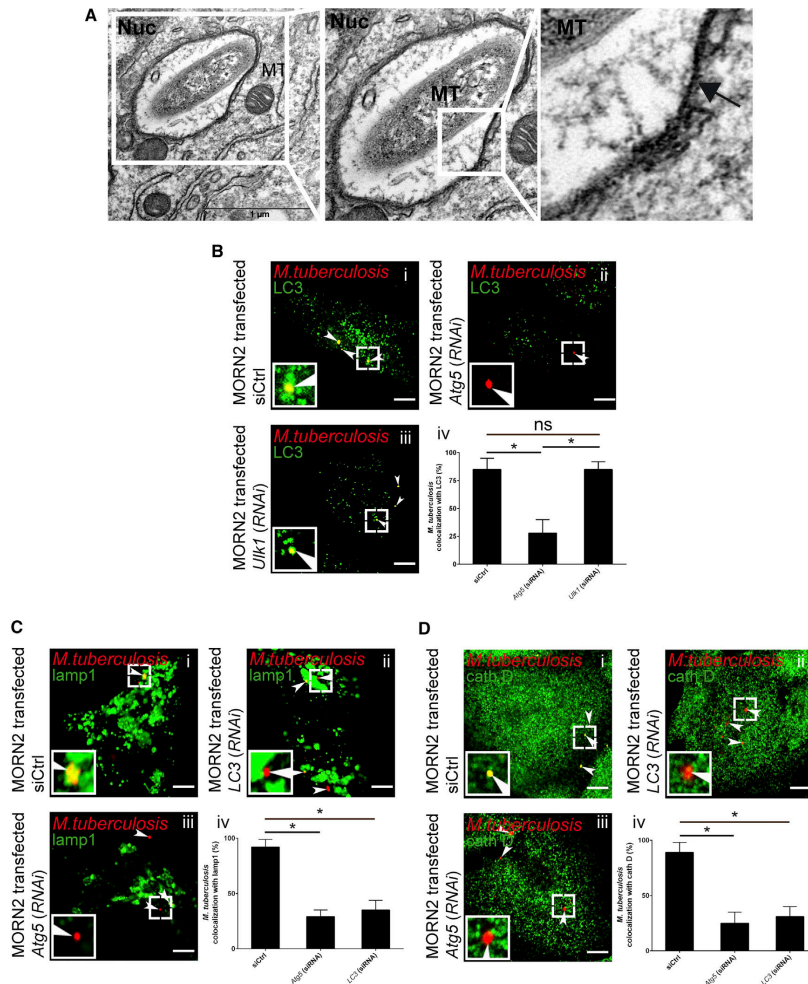


Figure 6. Hs-MORN2 Expression Promotes the LAP of *M. tuberculosis* in Mammalian Macrophages

(A) Electron micrograph of *M. tuberculosis*-infected macrophages expressing GFP-Hs-MORN2. EM revealed the presence of single membranes (indicated by a black arrow) surrounding the phagosomes containing *M. tuberculosis* (MT). Nucleus (Nuc); scale bars, 1 μ m.

(B) Colocalization of *M. tuberculosis* (red) with LC3 (green) was assessed by confocal microscopy of macrophages expressing GFP-Hs-MORN2 (B) and silenced for *Atg5* (Bii) or for *Utk1* (Biii). (Biv) presents the quantification of *M. tuberculosis* colocalization with LC3 after infection for 4 hr. The results are expressed as means \pm SD (n = 3, *p < 0.05). Arrows indicate bacteria. The insert shows bacterial colocalization with LC3. Scale bars, 5 μ m. Knockdown of *Atg5* and *Utk1* was confirmed by real time RT-PCR (Figure S6F).

(C) Colocalization of *M. tuberculosis* (red) with lamp1 (green) was assessed by confocal microscopy in macrophages expressing GFP-Hs-MORN2 (C) and silenced for LC3 (Cii) or for *Atg5* (Ciii). (Civ) Quantification of *M. tuberculosis* colocalization with lamp1 (Civ).

(D) Colocalization of *M. tuberculosis* (red) with (D) cathepsin D (cathD, green) was assessed by confocal microscopy in macrophages expressing GFP-Hs-MORN2 (D) and silenced for LC3 (Dii) or for *Atg5* (Diii). (Div) Quantification of *M. tuberculosis* colocalization with cathepsin D (Div). The results are expressed as means \pm SD (n = 3, *p < 0.05). Arrows indicate bacteria. The insert shows *M. tuberculosis* colocalization with lamp1 or cathepsin D. Scale bars, 5 μ m. Knockdown of *Atg5* and LC3 was confirmed by real time RT-PCR (Figure S6G).



Cell Host & Microbe

Screening in Planarians Reveals Antibacterial MORN2

CellPress

screen to characterize bacterial resistance pathways. Bacterial resistance genes identified here are specific to infection, given that we did not observe any functions of *MORN2* or other resistance genes in the regeneration processes of *D. japonica* (Figure S7A) and that the knockdown of *MORN2* did not affect *D. japonica* growth (Figure S7B) or the capacity of *D. japonica* to feed (Figure S7C). We tested the microinjection of bacteria as an alternative method of infection (Supplemental Information section "Microinjection results"). Infection by direct injection of *S. aureus* in worms resulted in approximately 10^4 fewer CFUs in comparison to feeding. Under these conditions, bacterial clearance did not involve the resistance genes identified, suggesting the differential involvement of immune responses according to the route or extent of infection.

Remarkably, we identified in *D. japonica* 18 resistance genes involved in the response to both *S. aureus* and *L. pneumophila* infection. These genes were further classified according to (i) their action exerted on a series of 16 bacterial strains and (ii) their homology to known factors and the existence of orthologs in humans. One-half of the resistance genes identified possess identifiable human orthologs (Supplemental Information section "Gene-by-gene summary of the sequence analysis"). We found that three of these genes, *HAGH* and *HAGHL* (gene #16), *CUTA* (gene #15), and *ATOX1* (gene #13), are implicated in metabolism and transport. *DUSP19* (gene #4), *PAQR3* (gene #10), *DYNLRB1* and *DYNLRB2* (gene #14), and *TRAPPC2L* and *TRAPPC1* (genes #9 and 11) are related to signaling and vesicular trafficking. Identification of bacterial resistance genes in planarians with human orthologs supports the importance of studying planarian immunity. With this approach, we have identified the broad importance of *MORN2* in planarian resistance to bacterial infection. Dj-MORN2 demonstrates 48% identity with human MORN2 (Hs-MORN2) at the amino acid level, which we identified as an important factor in the phagocytosis-mediated growth restriction of several bacteria. Together with the fact that *MORN2* has been lost from the ecdysozoan taxonomic group, which includes *C. elegans* and *D. melanogaster*, our work points to planarians as unique model organisms for the identification of immune factors.

Our study pinpoints a role for MORN2 in LAP of *M. tuberculosis* (strain H37Rv) in mammalian cells. We show by coimmunoprecipitation a physical link between MORN2 and components of the autophagy machinery, specifically LC3 and p62/SQSTM1. We provide evidence that expression of MORN2 promotes the colocalization of LC3 with phagosome-containing *M. tuberculosis*. We also established that MORN2 expression promotes the association of *M. tuberculosis* with LC3-positive phagosomes independently of two components of the autophagy preinitiation complex but requiring Beclin-1 and Atg5. Ulk1, Atg13, Beclin-1, and Atg5 knockdown did not affect the uptake of *M. tuberculosis* in macrophages expressing MORN2. Consistent with a role for MORN2 in enhancing the degradation of these bacteria, we report that LC3 or Atg5 knockdown decreased *M. tuberculosis* trafficking to lamp1- and cathepsin-D-positive phagolysosomes. Analysis by EM indicated a higher percentage of *M. tuberculosis* in single-membrane phagosomes. Collectively, our findings support a function for MORN2 in the LAP-mediated degradation of *M. tuberculosis* in macrophages. Note that we did not formally demonstrate that MORN2 has a similar cellular mode of action in *D. japonica*. Nevertheless, we found that expression of Dj-

MORN2 in human macrophages promotes the killing of *L. pneumophila*, *S. aureus*, and *M. tuberculosis*. This points to a conserved antibacterial function of MORN2 among different species. In parallel, we showed that MORN2 is critical for the lipidation of LC3-I in response to LPS or IFN γ challenge. Similarly, we also found that MORN2 expression increases the number of LC3-positive puncta, whereas the silencing of *MORN2* decreases their number in response to cell starvation (Figure S7D). Collectively, our data suggest the broad importance of MORN2 in immunity.

Several pathogens have evolved mechanisms to subvert LC3-mediated phagolysosomal degradation (Baxt et al., 2013; Choy et al., 2012; Huang and Brummel, 2014; Starr et al., 2012). *L. pneumophila*-expressing RavZ provides an example of the direct corruption of LC3-dependent processes, attributable to the capacity of RavZ to irreversibly delipidate LC3-II (Choy et al., 2012). We found here that *L. pneumophila* (strain Philadelphia-1) largely colocalizes with LC3-positive phagosomes in human macrophages derived from CD14-positive monocytes. Given that this strain of *L. pneumophila* is positive for RavZ, our data suggest a rather low activity for RavZ under the infection conditions used in our study. Nevertheless, MORN2 may potentially compete with RavZ effects by promoting the conjugation of LC3-I. Consistent with this idea, expression of MORN2 improves the LC3-dependent delivery of *L. pneumophila* in cathepsin-D-positive vacuoles. Considering the broad implication for MORN2 in antibacterial immunity that we uncovered here, it will be of interest to assess whether MORN2 is a target of bacterial virulence factors. In line with this idea, we found that MORN2 is weakly expressed in cells infected with *M. tuberculosis* compared to *S. aureus* and *L. pneumophila*. In parallel, we show that expression of MORN2 promotes the trafficking of *M. tuberculosis* to LC3-, cathepsin-D-, and lamp1-positive phagolysosomes. Therefore, it will be of interest to determine whether and how *M. tuberculosis* interferes with MORN2 gene expression.

In summary, our genetic and functional study of host-bacteria interactions in planarians here pinpoints a critical and conserved function of MORN2 in immunity.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Ethics Statement

All animal experiments were conducted according to the Guiding Principles of Animal Care and Use defined by the Ethics Committee for Animal Experimentation (N° 14 designated by the National Study Committee on the Ethics of Animal Experimentation) according to the rules of Decree N° 87-848 of October 19, 1987. All of the animal experiments conducted in this study were also approved by the Ethics Committee for Animal Experimentation (N° 14 from the National Study Committee on the Ethics of Animal Experimentation) where the experiments were performed (Faculty of Medicine, Marseille, experimentation permit number 10-300122013).

Planarians

The planarians used in this work belong to the species *Dugesia japonica* (asexual strain G1) and *Schmidtea mediterranea* (asexual clonal line CIW4). The animals were maintained in autoclaved stream water at 20°C and fed twice per week with calf liver. *D. japonica* and *S. mediterranea* were starved for at least 2 weeks prior to the experiments.

Worm Feeding with Bacterial Pathogens

The planarians were fed the bacterial pathogens using a protocol adapted from a dsRNA feeding method (Reddien et al., 2005). Bacterial pellets at the indicated concentrations were suspended in 30 μ l of homogenized liver, mixed



with 15 μ l of 2% ultra-low-gelling-temperature agar and 0.7 μ l of red food coloring, and allowed to solidify on ice. Room temperature solidified food was fed to the planarians. After 6 hr (defined as day 0) of feeding, the planarians were washed extensively and used for various experiments.

CFU Counting

Planarians were collected and homogenized in 20 μ l of PBS. The lysate was passed five times through a sterile syringe with a 29G needle to disrupt planarian tissue clumps, and CFUs were counted after plating 10 μ l serial dilutions onto agar plates containing appropriate bacterial growth media (see Bacterial Strains section).

Detection of Bacterial DNA

Planarian DNA was extracted using the QIAamp DNA MiniKit (QIAGEN) according to the manufacturer's recommendations. The presence of *L. pneumophila* DNA was verified by PCR.

FITC-Labeled Bacteria

The bacterial pathogens were labeled with FITC (Sigma-Aldrich). FITC-labeled bacteria were used to feed *D. japonica*. The planarians were subsequently fixed with paraformaldehyde as described elsewhere and mounted in glycerol.

RNA Extraction

Total RNA samples (one animal per sample) were prepared from planarians fed liver or a mixture of liver + bacteria for 6 hr using the TRIzol method, as recommended by the manufacturer (Invitrogen). RNA integrity was verified using a 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies).

RNA Sequencing

RNA sequencing was performed by GATC Biotech (Germany). Each sample (one worm per sample) was sequenced in duplicate using Illumina HiSeq technology (50 bp reads).

Delivery of dsRNAs via Bacterial Feeding

dsRNAs were delivered as previously described (Reddien et al., 2005). The quality of gene downregulation was controlled via Real time RT-qPCR.

WISH and Probe Synthesis

WISH was performed as previously described (Pearson et al., 2009). Planarians were imaged using a Leica M165FC stereo-microscope (Leica, Heidelberg), and the collected images were processed using Adobe Photoshop CS5 software.

Immunohistochemistry

Planarians fed with liver or a mixture of liver + bacteria were fixed and embedded in paraffin. Longitudinal tissue sections were cut and counterstained with hemolin (blue). Immunohistochemistry was performed and bacteria were detected using the primary antibodies against *L. pneumophila* or *S. aureus* or *M. tuberculosis*. Planarian tissues were imaged using a Leica DM16000 microscope (Leica, Heidelberg, Germany) with a 63 \times immersion objective.

EM

Samples were prepared for EM and then embedded in Epon resin. Ultrathin sections (80 nm) were cut with a Leica Ultracut S, and the sections were contrasted with uranyl acetate and lead citrate. The preparations were observed using a JEOL JEM 1400 transmission electron microscope operating at 100 kV, equipped with a Morada SIS camera. More than 70 phagosomes containing *M. tuberculosis* were analyzed for the presence or the absence of a double membrane or more.

Immunoprecipitation

MORN2 or p62 was immunoprecipitated via overnight incubation of total protein with an anti-MORN2 or anti-p62 antibody, followed by incubation with protein A Sepharose beads (Roche). The immunoprecipitated pellets were analyzed via immunoblotting in polyacrylamide gels using mouse anti-p62, anti-MORN2, and anti-LC3 antibodies.

LC3 Puncta Formation Assays

HeLa cells were starved for 1 hr, then fixed in 3% paraformaldehyde in PBS (pH 7.4), and prepared for immunofluorescence labeling. LC3 puncta were quantified using MetaMorph image analysis software.

Autophagic Flux Assay

RNA interference was achieved in HUVEC using ON-TARGETplus SMARTpool siRNA L-183685 targeting human Morn2 (Dharmacon) or negative control siRNA (Eurogentec). Knockdown efficiency was assessed by qRT-PCR and samples were normalized to ribosomal protein SB34. Autophagy was monitored after overnight starvation or after treatment of cells for 18 hr with *E. coli* LPS, IFN γ , or rapamycin in the presence of bafilomycin A1 during the last 3 hr of growth. LC3-I and LC3-II forms were analyzed by immunoblotting.

Quantification of Phagocytosis

Phagocytosis was quantified as previously described (Martinez et al., 2011).

Statistical Analysis

The results are expressed as means \pm SD and were analyzed using the nonparametric Mann-Whitney U test. Differences were considered significant at $p < 0.05$.

ACCESSION NUMBERS

All sequences associated with this study have been deposited at DDBJ/EMBL/GenBank under accession numbers SRX209754 and GALW01000000.

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information includes seven figures, one table, and Supplemental Experimental Procedures and can be found with this article online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2014.08.002>.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

P.A., G.M., N.B., V.T., C.T., F.C., A.B.A., C.L., B.D., D.H., A.K., S.P., and H.L. performed experiments; P.A., G.M., G.G., B.D., D.H., A.M., S.B., A.S., L.A.-B., E.L., J.-L.M., and E.G. analyzed data; P.A., G.M., G.G., A.M., L.A.-B., E.L., J.-L.M., and E.G. conceived and designed experiments; P.A., G.M., G.G., A.M., L.A.-B., E.L., J.-L.M., and E.G. wrote the manuscript; and G.M., G.G., S.P., S.B., H.L., A.S., L.A.-B., E.L., J.-L.M., and E.G. contributed materials and reagents.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to J.C. Rink (MPI-CBG, Dresden) and S. Meresse (CIML, Marseille) for providing reagents. We thank P. Pontarotti (CNRS-UMR 7353, Marseille), V. Mehraj, R. Ghodbane, P. Weber, R. Taware, E. Odonot, C. Rivet, and F. Armougom (CNRS-UMR 7278, Marseille) for their helpful comments and technical assistance. This work has been supported by POR Campagna FSE 2007-2013 (Project CREME), the CNRS (PEPS 2010 to E.G.), the Scientific Cooperation Foundation "Infectiopol Sud," and the Regional Council P.A.C.A (2009, Technical Facility to E.G.). P.A., F.C., and A.K. are fellows of "Infectiopol Sud." N.B. and C.T. are fellows of the French Ministry for Research and Technology. D.H. is a PhD fellow of the Ligue Nationale Contre le Cancer. L.A.-B. is supported by an ATIP-AVENIR grant. The E.L. team is supported by the LABEX SIGNALIFE program (ANR-11-LABX-0028-01 and ANR-11-BSV3-004-01) and COST program Action Proteostasis (BM1307). The funding sources had no role in the study design, data collection and analysis, decision to publish, or manuscript preparation. The authors declare no competing financial interests.

Received: January 13, 2014

Revised: June 13, 2014

Accepted: July 10, 2014

Published: September 10, 2014



Cell Host & Microbe

Screening in Planarians Reveals Antibacterial MORN2

CellPress

REFERENCES

- Azzopardi, P., Bennett, C.M., Graham, S.M., and Duke, T. (2009). Bacille Calmette-Guérin vaccine-related disease in HIV-infected children: a systematic review. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* **13**, 1331–1344.
- Baxt, L.A., Garza-Mayers, A.C., and Goldberg, M.B. (2013). Bacterial subversion of host innate immune pathways. *Science* **340**, 697–701.
- Belmares, J., Dettlerline, S., Pak, J.B., and Parada, J.P. (2007). *Corynebacterium endocarditis* species-specific risk factors and outcomes. *BMC Infect. Dis.* **7**, 4.
- Carvalho, A.P., Ventura, G.M., Pereira, C.B., Leão, R.S., Folescu, T.W., Higa, L., Teixeira, L.M., Plotkowski, M.C., Merquior, V.L., Albano, R.M., and Marques, E.A. (2007). *Burkholderia cenocepacia*, *B. multivorans*, *B. ambifaria* and *B. vietnamiensis* isolates from cystic fibrosis patients have different profiles of exoenzyme production. *APMIS* **115**, 311–318.
- Castonguay-Vanier, J., Vial, L., Tremblay, J., and Déziel, E. (2010). *Drosophila melanogaster* as a model host for the *Burkholderia cepacia* complex. *PLoS ONE* **5**, e11467.
- Chiang, P.C., Wu, T.L., Kuo, A.J., Huang, Y.C., Chung, T.Y., Lin, C.S., Leu, H.S., and Su, L.H. (2013). Outbreak of *Serratia marcescens* postsurgical bloodstream infection due to contaminated intravenous pain control fluids. *Int. J. Infect. Dis.* **17**, e718–e722.
- Choy, A., Dancourt, J., Mugo, B., O'Connor, T.J., Isberg, R.R., Melia, T.J., and Roy, C.R. (2012). The *Legionella* effector RavZ inhibits host autophagy through irreversible Atg8 deconjugation. *Science* **338**, 1072–1076.
- Dionne, M.S., Ghorri, N., and Schneider, D.S. (2003). *Drosophila melanogaster* is a genetically tractable model host for *Mycobacterium marinum*. *Infect. Immun.* **71**, 3540–3550.
- Elbashir, S.M., Lendeckel, W., and Tuschl, T. (2001). RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev.* **15**, 188–200.
- Elliott, S.A., and Sanchez Alvarado, A. (2013). The history and enduring contributions of planarians to the study of animal regeneration. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* **2**, 301–326.
- Fábrega, A., and Vila, J. (2013). *Salmonella enterica* serovar Typhimurium skills to succeed in the host: virulence and regulation. *Clin. Microbiol. Rev.* **26**, 308–341.
- Florey, O., Kim, S.E., Sandoval, C.P., Haynes, C.M., and Overholzer, M. (2011). Autophagy machinery mediates macroendocytic processing and entotic cell death by targeting single membranes. *Nat. Cell Biol.* **13**, 1335–1343.
- Franco, M.P., Mulder, M., Gilman, R.H., and Smits, H.L. (2007). Human brucellosis. *Lancet Infect. Dis.* **7**, 775–786.
- Gagneux, S., DeRiemer, K., Van, T., Kato-Maeda, M., de Jong, B.C., Narayanan, S., Nicol, M., Niemann, S., Kremer, K., Gutierrez, M.C., et al. (2006). Variable host-pathogen compatibility in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 2869–2873.
- Garsin, D.A., Sifri, C.D., Mylonakis, E., Qin, X., Singh, K.V., Murray, B.E., Calderwood, S.B., and Ausubel, F.M. (2001). A simple model host for identifying Gram-positive virulence factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 10892–10897.
- Gong, L., Cullinane, M., Treerat, P., Ramm, G., Prescott, M., Adler, B., Boyce, J.D., and Devenish, R.J. (2011). The *Burkholderia pseudomallei* type III secretion system and BopA are required for evasion of LC3-associated phagocytosis. *PLoS ONE* **6**, e17852.
- González-Estévez, C. (2009). Autophagy meets planarians. *Autophagy* **5**, 290–297.
- Gubbels, M.J., Vaishnav, S., Boot, N., Dubremetz, J.F., and Striepen, B. (2006). A MORN-repeat protein is a dynamic component of the *Toxoplasma gondii* cell division apparatus. *J. Cell Sci.* **119**, 2236–2245.
- Gutierrez, M.G., Master, S.S., Singh, S.B., Taylor, G.A., Colombo, M.I., and Deretic, V. (2004). Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and *Mycobacterium tuberculosis* survival in infected macrophages. *Cell* **119**, 753–766.
- Henault, J., Martinez, J., Riggs, J.M., Tian, J., Mehta, P., Clarke, L., Sasai, M., Latz, E., Brinkmann, M.M., Iwasaki, A., et al. (2012). Noncanonical autophagy is required for type I interferon secretion in response to DNA-immune complexes. *Immunity* **37**, 986–997.
- Hernandez, E., Ramisse, F., Ducoureaux, J.P., Cruel, T., and Cavallo, J.D. (1998). *Bacillus thuringiensis* subsp. *konkukian* (serotype H34) superinfection: case report and experimental evidence of pathogenicity in immunosuppressed mice. *J. Clin. Microbiol.* **36**, 2138–2139.
- Huang, J., and Brumell, J.H. (2014). Bacteria-autophagy interplay: a battle for survival. *Nat. Rev. Microbiol.* **12**, 101–114.
- Huang, J., Canadien, V., Lam, G.Y., Steinberg, B.E., Dinauer, M.C., Magalhaes, M.A., Glogauer, M., Grinstein, S., and Brumell, J.H. (2009). Activation of antibacterial autophagy by NADPH oxidases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 6226–6231.
- Im, Y.J., Davis, A.J., Perera, I.Y., Johannes, E., Allen, N.S., and Boss, W.F. (2007). The N-terminal membrane occupation and recognition nexus domain of Arabidopsis phosphatidylinositol phosphate kinase 1 regulates enzyme activity. *J. Biol. Chem.* **282**, 5443–5452.
- Jernigan, J.A., and Farr, B.M. (2000). Incubation period and sources of exposure for cutaneous *Mycobacterium marinum* infection: case report and review of the literature. *Clin. Infect. Dis.* **31**, 439–443.
- Jo, E.K., Yuk, J.M., Shin, D.M., and Sasakawa, C. (2013). Roles of autophagy in elimination of intracellular bacterial pathogens. *Front. Immunol.* **4**, <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2013.00097>.
- Khyami-Horani, H. (2002). Toxicity of *Bacillus thuringiensis* and *B. sphaericus* to laboratory populations of *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae). *J. Basic Microbiol.* **42**, 105–110.
- Kim, J.Y., Zhao, H., Martinez, J., Doggett, T.A., Kolesnikov, A.V., Tang, P.H., Ablonczy, Z., Chan, C.C., Zhou, Z., Green, D.R., and Ferguson, T.A. (2013). Noncanonical autophagy promotes the visual cycle. *Cell* **154**, 365–376.
- Kinchen, J.M., and Ravichandran, K.S. (2008). Phagosome maturation: going through the acid test. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 781–795.
- Klionsky, D.J., Abdalla, F.C., Abeliovich, H., Abraham, R.T., Acevedo-Arozena, A., Adeli, K., Agholme, L., Agnello, M., Agostinis, P., Aguirre-Ghiso, J.A., et al. (2012). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy* **8**, 445–544.
- Komura, T., Yasui, C., Miyamoto, H., and Nishikawa, Y. (2010). *Caenorhabditis elegans* as an alternative model host for legionella pneumophila, and protective effects of *Bifidobacterium infantis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**, 4105–4108.
- Köthe, M., Antl, M., Huber, B., Stoecker, K., Ebrecht, D., Steinmetz, I., and Eberl, L. (2003). Killing of *Caenorhabditis elegans* by *Burkholderia cepacia* is controlled by the cep quorum-sensing system. *Cell. Microbiol.* **5**, 343–351.
- Kurz, C.L., and Ewbank, J.J. (2000). *Caenorhabditis elegans* for the study of host-pathogen interactions. *Trends Microbiol.* **8**, 142–144.
- Labrousse, A., Chauvet, S., Couillault, C., Kurz, C.L., and Ewbank, J.J. (2000). *Caenorhabditis elegans* is a model host for *Salmonella typhimurium*. *Curr. Biol.* **10**, 1543–1545.
- Levine, B., Mizushima, N., and Virgin, H.W. (2011). Autophagy in immunity and inflammation. *Nature* **469**, 323–335.
- Marroquin, L.D., Elyassnia, D., Griffiths, J.S., Feitelson, J.S., and Aroian, R.V. (2000). *Bacillus thuringiensis* (Bt) toxin susceptibility and isolation of resistance mutants in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **155**, 1693–1699.
- Marsh, E.K., and May, R.C. (2012). *Caenorhabditis elegans*, a model organism for investigating immunity. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**, 2075–2081.
- Martinez, J., Almendinger, J., Oberst, A., Ness, R., Dillon, C.P., Fitzgerald, P., Hengartner, M.O., and Green, D.R. (2011). Microtubule-associated protein 1 light chain 3 alpha (LC3)-associated phagocytosis is required for the efficient clearance of dead cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **108**, 17396–17401.
- Martinez, J., Verbist, K., Wang, R., and Green, D.R. (2013). The relationship between metabolism and the autophagy machinery during the innate immune response. *Cell Metab.* **17**, 895–900.
- Mizushima, N., Yoshimori, T., and Levine, B. (2010). Methods in mammalian autophagy research. *Cell* **140**, 313–326.

- Morita, M. (1991). Phagocytic response of planarian reticular cells to heat-killed bacteria. *Hydrobiologia* 227, 193–199.
- Murray, B.E. (1990). The life and times of the *Enterococcus*. *Clin. Microbiol. Rev.* 3, 46–65.
- Muzzi, A., and Donati, C. (2011). Population genetics and evolution of the pan-genome of *Streptococcus pneumoniae*. *Int. J. Med. Microbiol.* 301, 619–622.
- Nehme, N.T., Liégeois, S., Kele, B., Giammarinaro, P., Pradel, E., Hoffmann, J.A., Ewbank, J.J., and Ferrandon, D. (2007). A model of bacterial intestinal infections in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Pathog.* 3, e173.
- O'Quinn, A.L., Wiegand, E.M., and Jeddeloh, J.A. (2001). *Burkholderia pseudomallei* kills the nematode *Caenorhabditis elegans* using an endotoxin-mediated paralysis. *Cell. Microbiol.* 3, 381–393.
- Olson, J.M., Nguyen, V.Q., Yoo, J., and Kuehle, M.K. (2009). Cutaneous manifestations of *Corynebacterium jeikeium* sepsis. *Int. J. Dermatol.* 48, 886–888.
- Pearson, B.J., Eisenhoffer, G.T., Gurley, K.A., Rink, J.C., Miller, D.E., and Sánchez Alvarado, A. (2009). Formaldehyde-based whole-mount in situ hybridization method for planarians. *Dev. Dyn.* 238, 443–450.
- Peres, A.G., and Madrenas, J. (2013). The broad landscape of immune interactions with *Staphylococcus aureus*: from commensalism to lethal infections. *Burns* 39, 380–388.
- Pujol, M., Corbella, X., Carratala, J., and Gudiol, F. (1992). Community-acquired bacteremic *Pseudomonas cepacia* pneumonia in an immunocompetent host. *Clin. Infect. Dis.* 15, 887–888.
- Reddien, P.W., Bermange, A.L., Murfitt, K.J., Jennings, J.R., and Sánchez Alvarado, A. (2005). Identification of genes needed for regeneration, stem cell function, and tissue homeostasis by systematic gene perturbation in planaria. *Dev. Cell* 8, 635–649.
- Russell, D.G. (2001). *Mycobacterium tuberculosis*: here today, and here tomorrow. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 569–577.
- Sánchez Alvarado, A., and Newmark, P.A. (1999). Double-stranded RNA specifically disrupts gene expression during planarian regeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 5049–5054.
- Sanjuan, M.A., Dillon, C.P., Tait, S.W., Moshiah, S., Dorsey, F., Connell, S., Komatsu, M., Tanaka, K., Cleveland, J.L., Withoff, S., and Green, D.R. (2007). Toll-like receptor signalling in macrophages links the autophagy pathway to phagocytosis. *Nature* 450, 1253–1257.
- Schneider, D.S., Ayres, J.S., Brandt, S.M., Costa, A., Dionne, M.S., Gordon, M.D., Mabery, E.M., Moule, M.G., Pham, L.N., and Shirasu-Hiza, M.M. (2007). *Drosophila eiger* mutants are sensitive to extracellular pathogens. *PLoS Pathog.* 3, e41.
- Sifri, C.D., Mylonakis, E., Singh, K.V., Qin, X., Garsin, D.A., Murray, B.E., Ausubel, F.M., and Calderwood, S.B. (2002). Virulence effect of *Enterococcus faecalis* protease genes and the quorum-sensing locus *fsr* in *Caenorhabditis elegans* and mice. *Infect. Immun.* 70, 5647–5650.
- Sluys, R., Kawakatsu, M., and Winsor, L. (1998). The genus *Dugesia* in Australia, with its phylogenetic analysis and historical biogeography (Platyhelminthes, Tricladida, Dugesidae). *Zool. Scr.* 27, 273–290.
- Starr, T., Child, R., Wehrly, T.D., Hansen, B., Hwang, S., López-Otin, C., Virgin, H.W., and Celli, J. (2012). Selective subversion of autophagy complexes facilitates completion of the *Brucella* intracellular cycle. *Cell Host Microbe* 11, 33–45.
- Steinert, M., Heuner, K., Buchrieser, C., Albert-Weissenberger, C., and Glöckner, G. (2007). *Legionella* pathogenicity: genome structure, regulatory networks and the host cell response. *Int. J. Med. Microbiol.* 297, 577–587.
- Stuart, L.M., and Ezekowitz, R.A. (2008). Phagocytosis and comparative innate immunity: learning on the fly. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 131–141.
- Sundaramurthy, V., Barsacchi, R., Samusik, N., Marsico, G., Gilleron, J., Kalaidzidis, I., Meyenhofer, F., Bickle, M., Kalaidzidis, Y., and Zerial, M. (2013). Integration of chemical and RNAi multiparametric profiles identifies triggers of intracellular mycobacterial killing. *Cell Host Microbe* 13, 129–142.
- Thomsen, L.E., Slutz, S.S., Tan, M.W., and Ingmer, H. (2006). *Caenorhabditis elegans* is a model host for *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 1700–1701.
- Underhill, D.M., and Ozinsky, A. (2002). Phagocytosis of microbes: complexity in action. *Annu. Rev. Immunol.* 20, 825–852.
- Vázquez-Boland, J.A., Kuhn, M., Berche, P., Chakraborty, T., Dominguez-Bernal, G., Goebel, W., González-Zorn, B., Wehland, J., and Kreft, J. (2001). *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clin. Microbiol. Rev.* 14, 584–640.
- Weiss, C.H., and Glassroth, J. (2012). Pulmonary disease caused by nontuberculous mycobacteria. *Expert Rev. Respir. Med.* 6, 597–612, quiz 613.
- Xu, Y., Jagannath, C., Liu, X.D., Sharafkhan, A., Kolodziejka, K.E., and Eissa, N.T. (2007). Toll-like receptor 4 is a sensor for autophagy associated with innate immunity. *Immunity* 27, 135–144.
- Yang, D., Lu, H., and Erickson, J.W. (2000). Evidence that processed small dsRNAs may mediate sequence-specific mRNA degradation during RNAi in *Drosophila* embryos. *Curr. Biol.* 10, 1191–1200.

Références :

1. Takai, Y., T. Sasaki, and T. Matozaki. 2001. Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev* 81: 153-208.
2. Heasman, S. J., and A. J. Ridley. 2008. Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9: 690-701.
3. Bustelo, X. R., V. Sauzeau, and I. M. Berenjeno. 2007. GTP-binding proteins of the Rho/Rac family: regulation, effectors and functions in vivo. *Bioessays* 29: 356-370.
4. Hodge, R. G., and A. J. Ridley. 2016. Regulating Rho GTPases and their regulators. *Nat Rev Mol Cell Biol* 17: 496-510.
5. Moon, S. Y., and Y. Zheng. 2003. Rho GTPase-activating proteins in cell regulation. *Trends Cell Biol* 13: 13-22.
6. Schmidt, A., and A. Hall. 2002. Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch. *Genes Dev* 16: 1587-1609.
7. Wennerberg, K., and C. J. Der. 2004. Rho-family GTPases: it's not only Rac and Rho (and I like it). *J Cell Sci* 117: 1301-1312.
8. Visvikis, O., M. P. Maddugoda, and E. Lemichez. 2010. Direct modifications of Rho proteins: deconstructing GTPase regulation. *Biol Cell* 102: 377-389.
9. DerMardirossian, C., and G. M. Bokoch. 2005. GDIs: central regulatory molecules in Rho GTPase activation. *Trends Cell Biol* 15: 356-363.
10. Engel, M. E. 1998. RhoB Is Stabilized by Transforming Growth Factor beta and Antagonizes Transcriptional Activation. *Journal of Biological Chemistry* 273: 9921-9926.
11. Doye, A., A. Mettouchi, G. Bossis, R. Clement, C. Buisson-Touati, G. Flatau, L. Gagnoux, M. Piechaczyk, P. Boquet, and E. Lemichez. 2002. CNF1 exploits the ubiquitin-proteasome machinery to restrict Rho GTPase activation for bacterial host cell invasion. *Cell* 111: 553-564.
12. Nethe, M., and P. L. Hordijk. 2010. The role of ubiquitylation and degradation in RhoGTPase signalling. *J Cell Sci* 123: 4011-4018.
13. Aktories, K. 2011. Bacterial protein toxins that modify host regulatory GTPases. *Nat Rev Microbiol* 9: 487-498.
14. Piteau, M., P. Papatheodorou, C. Schwan, A. Schlosser, K. Aktories, and G. Schmidt. 2014. Lu/BCAM adhesion glycoprotein is a receptor for Escherichia coli Cytotoxic Necrotizing Factor 1 (CNF1). *PLoS Pathog* 10: e1003884.
15. Schmidt, G., P. Papatheodorou, and K. Aktories. 2015. Novel receptors for bacterial protein toxins. *Curr Opin Microbiol* 23: 55-61.
16. Chung, J. W., S. J. Hong, K. J. Kim, D. Goti, M. F. Stins, S. Shin, V. L. Dawson, T. M. Dawson, and K. S. Kim. 2003. 37-kDa laminin receptor precursor modulates cytotoxic necrotizing factor 1-mediated RhoA activation and bacterial uptake. *J Biol Chem* 278: 16857-16862.
17. Contamin, S., A. Galmiche, A. Doye, G. Flatau, A. Benmerah, and P. Boquet. 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.
18. Pei S, D. A., 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.
19. Flatau G, L. E., Gauthier M, Chardin P, Paris S, Fiorentini C, Boquet P. 1997. Toxin-induced activation of the G protein p21 Rho by deamidation of glutamine. *Nature* 387: 729-33.

20. Gudula Schmidt, P. S., Matthias Wilm, Joërg Selzer, Matthias Mann & Klaus Aktories. 1997. Gln 63 of Rho is deamidated by Escherichia coli cytotoxic necrotizing factor-1. *Nature* Jun 12;387: 725-729.
21. Lerm, M., M. Pop, G. Fritz, K. Aktories, and G. Schmidt. 2002. Proteasomal Degradation of Cytotoxic Necrotizing Factor 1-Activated Rac. *Infection and Immunity* 70: 4053-4058.
22. Knust, Z., and G. Schmidt. 2010. Cytotoxic Necrotizing Factors (CNFs)-A Growing Toxin Family. *Toxins (Basel)* 2: 116-127.
23. Visvikis, O., P. Lorès, L. Boyer, P. Chardin, E. Lemichez, and G. Gacon. 2008. Activated Rac1, but not the tumorigenic variant Rac1b, is ubiquitinated on Lys 147 through a JNK-regulated process. *FEBS J* 275: 386-396.
24. Torrino, S., O. Visvikis, A. Doye, L. Boyer, C. Stefani, P. Munro, J. Bertoglio, G. A. Gacon, A. Mettouchi, and E. Lemichez. 2011. The E3 Ubiquitin-Ligase HACE1 Catalyzes the Ubiquitylation of Active Rac1. *Developmental Cell* 21: 959-965.
25. Castillo-Lluva, S., C. T. Tan, M. Daugaard, P. H. Sorensen, and A. Malliri. 2013. The tumour suppressor HACE1 controls cell migration by regulating Rac1 degradation. *Oncogene* 32: 1735-1742.
26. Daugaard, M., R. Nitsch, B. Razaghi, L. McDonald, A. Jarrar, S. Torrino, S. Castillo-Lluva, B. Rotblat, L. Li, A. Malliri, E. Lemichez, A. Mettouchi, J. N. Berman, J. M. Penninger, and P. H. Sorensen. 2013. Hace1 controls ROS generation of vertebrate Rac1-dependent NADPH oxidase complexes. *Nat Commun* 4: 2180.
27. Goka, E. T., and M. E. Lippman. 2015. Loss of the E3 ubiquitin ligase HACE1 results in enhanced Rac1 signaling contributing to breast cancer progression. *Oncogene*
28. Zhang, W., K.-P. Wu, M. A. Sartori, H. B. Kamadurai, A. Ordureau, C. Jiang, P. Y. Mercredi, R. Murchie, J. Hu, A. Persaud, M. Mukherjee, N. Li, A. Doye, J. R. Walker, Y. Sheng, Z. Hao, Y. Li, K. R. Brown, E. Lemichez, J. Chen, Y. Tong, J. W. Harper, J. Moffat, D. Rotin, B. A. Schulman, and S. S. Sidhu. 2016. System-Wide Modulation of HECT E3 Ligases with Selective Ubiquitin Variant Probes. *Molecular Cell*
29. Oberoi, T. K., T. Dogan, J. C. Hocking, R.-P. Scholz, J. Mooz, C. L. Anderson, C. Karreman, D. Meyer zu Heringdorf, G. Schmidt, M. Ruonala, K. Namikawa, G. S. Harms, A. Carpy, B. Macek, R. W. Köster, and K. Rajalingam. 2012. IAPs regulate the plasticity of cell migration by directly targeting Rac1 for degradation: IAPs directly ubiquitinate and degrades Rac1. *The EMBO Journal* 31: 14-28.
30. Zhao, J., R. K. Mialki, J. Wei, T. A. Coon, C. Zou, B. B. Chen, R. K. Mallampalli, and Y. Zhao. 2013. SCF E3 ligase F-box protein complex SCF(FBXL19) regulates cell migration by mediating Rac1 ubiquitination and degradation. *FASEB J* 27: 2611-2619.
31. Boyer, L., L. Turchi, B. Desnues, A. Doye, G. Ponzio, J. L. Mege, M. Yamashita, Y. E. Zhang, J. Bertoglio, G. Flatau, P. Boquet, and E. Lemichez. 2006. CNF1-induced ubiquitylation and proteasome destruction of activated RhoA is impaired in Smurf1^{-/-} cells. *Mol Biol Cell* 17: 2489-2497.
32. Hong-Rui Wang, Y. Z.,*1 Barish Ozdamar,1,2 Abiodun A. Ogunjimi,1 Evguenia Alexandrova,3 Gerald H. Thomsen,3 Jeffrey L. Wrana1,2. 2003. Regulation of Cell Polarity and Protrusion Formation by Targeting RhoA for Degradation. *Science* 302: 1775-9.
33. Etienne-Manneville, S., and A. Hall. 2001. Integrin-mediated activation of Cdc42 controls cell polarity in migrating astrocytes through PKCzeta. *Cell* 106: 489-498.
34. Sahai, E., R. Garcia-Medina, J. Pouyssegur, and E. Vial. 2007. Smurf1 regulates tumor cell plasticity and motility through degradation of RhoA leading to localized inhibition of contractility. *J Cell Biol* 176: 35-42.
35. Ozdamar, B., R. Bose, M. Barrios-Rodiles, H. R. Wang, Y. Zhang, and J. L. Wrana. 2005. Regulation of the polarity protein Par6 by TGFbeta receptors controls epithelial cell plasticity. *Science* 307: 1603-1609.

36. Chen, Y., Z. Yang, M. Meng, Y. Zhao, N. Dong, H. Yan, L. Liu, M. Ding, H. B. Peng, and F. Shao. 2009. Cullin Mediates Degradation of RhoA through Evolutionarily Conserved BTB Adaptors to Control Actin Cytoskeleton Structure and Cell Movement. *Molecular Cell* 35: 841-855.
37. Tan, W., T. R. Palmby, J. Gavard, P. Amornphimoltham, Y. Zheng, and J. S. Gutkind. 2008. An essential role for Rac1 in endothelial cell function and vascular development. *The FASEB Journal* 22: 1829-1838.
38. Munro, P., G. Flatau, A. Doye, L. Boyer, O. Oregioni, J. L. Mege, L. Landraud, and E. Lemichez. 2004. Activation and proteasomal degradation of rho GTPases by cytotoxic necrotizing factor-1 elicit a controlled inflammatory response. *J Biol Chem* 279: 35849-35857.
39. Real, J. M., P. Munro, C. Buisson-Touati, E. Lemichez, P. Boquet, and L. Landraud. 2007. Specificity of immunomodulator secretion in urinary samples in response to infection by alpha-hemolysin and CNF1 bearing uropathogenic Escherichia coli. *Cytokine* 37: 22-25.
40. Rippere-Lampe, K. E., M. Lang, H. Ceri, M. Olson, H. A. Lockman, and A. D. O'Brien. 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.
41. Perona, R., S. Montaner, L. Saniger, I. Sanchez-Perez, R. Bravo, and J. C. Lacal. 1997. Activation of the nuclear factor-kappaB by Rho, CDC42, and Rac-1 proteins. *Genes & Development* 11: 463-475.
42. Tapon N, N. K., Lamarche N, Hall A. 1998. A new rac target POSH is an SH3-containing scaffold protein involved in the JNK and NF-kappaB signalling. *EMBO J* 17: 1395-1404.
43. Xu, Z., N. V. Kukekov, and L. A. Greene. 2003. POSH acts as a scaffold for a multiprotein complex that mediates JNK activation in apoptosis. *EMBO J* 22: 252-261.
44. Cammarano, M. S., and A. Minden. 2001. Dbl and the Rho GTPases Activate NF B by I B Kinase (IKK)-dependent and IKK-independent Pathways. *Journal of Biological Chemistry* 276: 25876-25882.
45. Boyer, L., L. Magoc, S. Dejardin, M. Cappillino, N. Paquette, C. Hinault, G. M. Charriere, W. K. Ip, S. Fracchia, E. Hennessy, D. Erturk-Hasdemir, J. M. Reichhart, N. Silverman, A. Lacy-Hulbert, and L. M. Stuart. 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.
46. Diabate, M., P. Munro, E. Garcia, A. Jacquell, G. Michel, S. Obba, D. Goncalves, C. Luci, S. Marchetti, D. Demon, C. Degos, Y. Bechah, J. L. Mege, M. Lamkanfi, P. Auberger, J. P. Gorvel, L. M. Stuart, L. Landraud, E. Lemichez, and L. Boyer. 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.
47. Boquet, P., and E. Lemichez. 2003. Bacterial virulence factors targeting Rho GTPases: parasitism or symbiosis. *Trends in Cell Biology* 13: 238-246.
48. Fiorentini, C., L. Falzano, A. Fabbri, A. Stringaro, M. Logozzi, S. Travaglione, S. Contamin, G. Arancia, W. Malorni, and S. Fais. 2001. Activation of rho GTPases by cytotoxic necrotizing factor 1 induces macropinocytosis and scavenging activity in epithelial cells. *Mol Biol Cell* 12: 2061-2073.
49. Dharmawardhane S, S. A., Sells MA, Chernoff J, Schmid SL, Bokoch GM. 2000. Regulation of macropinocytosis by p21-activated kinase-1. *Mol Biol Cell.* 11: 3341-52.
50. Bruno, V. M., S. Hannemann, M. Lara-Tejero, R. A. Flavell, S. H. Kleinstein, and J. E. Galán. 2009. Salmonella Typhimurium Type III Secretion Effectors Stimulate Innate Immune Responses in Cultured Epithelial Cells. *PLoS Pathog* 5: e1000538.
51. Keestra, A. M., M. G. Winter, J. J. Auburger, S. P. Frässle, M. N. Xavier, S. E. Winter, A. Kim, V. Poon, M. M. Ravesloot, J. F. Waldenmaier, R. M. Tsolis, R. A. Eigenheer, and A. J. Bäuml. 2013. Manipulation of small Rho GTPases is a pathogen-induced process detected by NOD1. *Nature* 496: 233-237.

52. Stuart, L. M., and L. Boyer. 2013. RhoGTPases — NODes for effector-triggered immunity in animals. *Cell Res* 23: 980-981.
53. Musgrove, E. A., C. E. Caldon, J. Barraclough, A. Stone, and R. L. Sutherland. 2011. Cyclin D as a therapeutic target in cancer. *Nat Rev Cancer* 11: 558-572.
54. Robles, A. I., M. L. Rodriguez-Puebla, A. B. Glick, C. Trempus, L. Hansen, P. Sicinski, R. W. Tennant, R. A. Weinberg, S. H. Yuspa, and C. J. Conti. 1998. Reduced skin tumor development in cyclin D1-deficient mice highlights the oncogenic ras pathway in vivo. *Genes & Development* 12: 2469-2474.
55. Kim, J. K., and J. A. Diehl. 2009. Nuclear cyclin D1: An oncogenic driver in human cancer. *J. Cell. Physiol.* 220: 292-296.
56. Shaulian, E., and M. Karin. 2001. AP-1 in cell proliferation and survival. *Oncogene* 20: 2390-2400.
57. Takasawa, S., T. Ikeda, T. Akiyama, K. Nata, K. Nakagawa, N. J. Shervani, N. Noguchi, S. Murakami-Kawaguchi, A. Yamauchi, I. Takahashi, T. Tomioka-Kumagai, and H. Okamoto. 2006. Cyclin D1 activation through ATF-2 in Reg-induced pancreatic β -cell regeneration. *FEBS Letters* 580: 585-591.
58. Shen, Q., I. P. Uray, Y. Li, T. I. Krisko, T. E. Strecker, H.-T. Kim, and P. H. Brown. 2007. The AP-1 transcription factor regulates breast cancer cell growth via cyclins and E2F factors. *Oncogene* 27: 366-377.
59. Marampon, F., M. C. Casimiro, M. Fu, M. J. Powell, V. M. Popov, J. Lindsay, B. M. Zani, C. Ciccarelli, G. Watanabe, R. J. Lee, and R. G. Pestell. 2008. Nerve Growth factor regulation of cyclin D1 in PC12 cells through a p21RAS extracellular signal-regulated kinase pathway requires cooperative interactions between Sp1 and nuclear factor-kappaB. *Mol Biol Cell* 19: 2566-2578.
60. Joyce, D. 1999. Integration of Rac-dependent Regulation of Cyclin D1 Transcription through a Nuclear Factor-kappa B-dependent Pathway. *Journal of Biological Chemistry* 274: 25245-25249.
61. Joneson, T., and D. Bar-Sagi. 1998. A Rac1 Effector Site Controlling Mitogenesis through Superoxide Production. *Journal of Biological Chemistry* 273: 17991-17994.
62. Klein, E. A., C. Yang, M. G. Kazanietz, and R. K. Assoian. 2007. NFkappaB-independent signaling to the cyclin D1 gene by Rac. *Cell Cycle* 6: 1115-1121.
63. Mettouchi A, K. S., Guo W, Lopez-Lago M, Lemichez E, Westwick JK, Giancotti FG. 2001. Integrin-Specific Activation of Rac Controls Progression through the G1 Phase of the Cell Cycle. *Mol Cell* 8: 115-127.
64. Moon, R. T., A. D. Kohn, G. V. De Ferrari, and A. Kaykas. 2004. WNT and beta-catenin signalling: diseases and therapies. *Nat Rev Genet* 5: 691-701.
65. Clevers, H., and R. Nusse. 2012. Wnt/beta-catenin signaling and disease. *Cell* 149: 1192-1205.
66. Duan, P., and L. F. Bonewald. 2016. The role of the wnt/ β -catenin signaling pathway in formation and maintenance of bone and teeth. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 77: 23-29.
67. Wu, X., X. Tu, K. S. Joeng, M. J. Hilton, D. A. Williams, and F. Long. 2008. Rac1 activation controls nuclear localization of beta-catenin during canonical Wnt signaling. *Cell* 133: 340-353.
68. ORY, S., H. BRAZIER, G. PAWLAK, and A. BLANGY. 2008. Rho GTPases in osteoclasts: Orchestrators of podosome arrangement. *European Journal of Cell Biology* 87: 469-477.
69. Takegahara, N., S. Kang, S. Nojima, H. Takamatsu, T. Okuno, H. Kikutani, T. Toyofuku, and A. Kumanogoh. 2010. Integral roles of a guanine nucleotide exchange factor, FARP2, in osteoclast podosome rearrangements. *The FASEB Journal* 24: 4782-4792.
70. Vives, V., M. Laurin, G. Cres, P. Larrousse, Z. Morichaud, D. Noel, J.-F. Côté, and A. Blangy. 2011. The Rac1 exchange factor Dock5 is essential for bone resorption by osteoclasts. *J Bone Miner Res* 26: 1099-1110.

71. Vives, V., G. Cres, C. Richard, M. Busson, Y. Ferrandez, A.-G. Planson, M. Zeghouf, J. Cherfils, L. Malaval, and A. Blangy. 2015. Pharmacological inhibition of Dock5 prevents osteolysis by affecting osteoclast podosome organization while preserving bone formation. *Nat Comms* 6: 6218.
72. Zoncu, R., A. Efeyan, and D. M. Sabatini. 2011. mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12: 21-35.
73. Johnson, S. C., P. S. Rabinovitch, and M. Kaeberlein. 2013. mTOR is a key modulator of ageing and age-related disease. *Nature* 493: 338-345.
74. Garami, A., F. J. Zwartkruis, T. Nobukuni, M. Joaquin, M. Rocco, H. Stocker, S. C. Kozma, E. Hafen, J. L. Bos, and G. Thomas. 2003. Insulin activation of Rheb, a mediator of mTOR/S6K/4E-BP signaling, is inhibited by TSC1 and 2. *Mol Cell* 11: 1457-1466.
75. Inoki, K. 2003. Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP activity and regulates mTOR signaling. *Genes & Development* 17: 1829-1834.
76. Zhang, Y., X. Gao, L. J. Saucedo, B. Ru, B. A. Edgar, and D. Pan. 2003. Rheb is a direct target of the tuberous sclerosis tumour suppressor proteins. *Nat Cell Biol* 5: 578-581.
77. Haghghat, A., S. Mader, A. Pause, and N. Sonenberg. 1995. Repression of cap-dependent translation by 4E-binding protein 1: competition with p220 for binding to eukaryotic initiation factor-4E. *EMBO J* 14: 5701-5709.
78. Haghghat, A., and N. Sonenberg. 1997. eIF4G Dramatically Enhances the Binding of eIF4E to the mRNA 5'-Cap Structure. *Journal of Biological Chemistry* 272: 21677-21680.
79. Wang, X., W. Li, M. Williams, N. Terada, D. R. Alessi, and C. G. Proud. 2001. Regulation of elongation factor 2 kinase by p90(RSK1) and p70 S6 kinase. *EMBO J* 20: 4370-4379.
80. Raught, B., F. Peiretti, A.-C. Gingras, M. Livingstone, D. Shahbazian, G. L. Mayeur, R. D. Polakiewicz, N. Sonenberg, and J. W. B. Hershey. 2004. Phosphorylation of eucaryotic translation initiation factor 4B Ser422 is modulated by S6 kinases. *EMBO J* 23: 1761-1769.
81. Chauvin, C., V. Koka, A. Nouschi, V. Mieulet, C. Hoareau-Aveilla, A. Dreazen, N. Cagnard, W. Carpentier, T. Kiss, O. Meyuhas, and M. Pende. 2013. Ribosomal protein S6 kinase activity controls the ribosome biogenesis transcriptional program. *Oncogene* 33: 474-483.
82. Horton, J. D., J. L. Goldstein, and M. S. Brown. 2002. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J. Clin. Invest.* 109: 1125-1131.
83. Jeon, T.-I., and T. F. Osborne. 2012. SREBPs: metabolic integrators in physiology and metabolism. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 23: 65-72.
84. Peterson, T., S. Sengupta, T. Harris, A. Carmack, S. Kang, E. Balderas, D. Guertin, K. Madden, A. Carpenter, B. Finck, and D. Sabatini. 2011. mTOR Complex 1 Regulates Lipin 1 Localization to Control the SREBP Pathway. *Cell* 146: 408-420.
85. Ben-Sahra, I., J. J. Howell, J. M. Asara, and B. D. Manning. 2013. Stimulation of de novo pyrimidine synthesis by growth signaling through mTOR and S6K1. *Science* 339: 1323-1328.
86. Robitaille, A. M., S. Christen, M. Shimobayashi, M. Cornu, L. L. Fava, S. Moes, C. Prescianotto-Baschong, U. Sauer, P. Jenoe, and M. N. Hall. 2013. Quantitative phosphoproteomics reveal mTORC1 activates de novo pyrimidine synthesis. *Science* 339: 1320-1323.
87. Ben-Sahra, I., G. Hoxhaj, S. J. Ricoult, J. M. Asara, and B. D. Manning. 2016. mTORC1 induces purine synthesis through control of the mitochondrial tetrahydrofolate cycle. *Science* 351: 728-733.
88. Saci, A., L. C. Cantley, and C. L. Carpenter. 2011. Rac1 regulates the activity of mTORC1 and mTORC2 and controls cellular size. *Mol Cell* 42: 50-61.
89. Vander Heiden, M. G., L. C. Cantley, and C. B. Thompson. 2009. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* 324: 1029-1033.
90. Hu, H., A. Juvekar, C. A. Lyssiotis, E. C. Lien, J. G. Albeck, D. Oh, G. Varma, Y. P. Hung, S. Ullas, J. Lauring, P. Seth, M. R. Lundquist, D. R. Tolan, A. K. Grant, D. J. Needleman, J. M.

- Asara, L. C. Cantley, and G. M. Wulf. 2016. Phosphoinositide 3-Kinase Regulates Glycolysis through Mobilization of Aldolase from the Actin Cytoskeleton. *Cell* 164: 433-446.
91. Wang, J. B., J. W. Erickson, R. Fuji, S. Ramachandran, P. Gao, R. Dinavahi, K. F. Wilson, A. L. Ambrosio, S. M. Dias, C. V. Dang, and R. A. Cerione. 2010. Targeting mitochondrial glutaminase activity inhibits oncogenic transformation. *Cancer Cell* 18: 207-219.
92. Krebs, A., M. Rothkegel, M. Klar, and B. M. Jockusch. 2001. Characterization of functional domains of mDia1, a link between the small GTPase Rho and the actin cytoskeleton. *J Cell Sci* 114: 3663-3672.
93. Riento, K., and A. J. Ridley. 2003. Rocks: multifunctional kinases in cell behaviour. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4: 446-456.
94. Amann, K. J., and T. D. Pollard. 2001. The Arp2/3 complex nucleates actin filament branches from the sides of pre-existing filaments. *Nat Cell Biol* 3: 306-310.
95. Takenawa, T., and H. Miki. 2001. WASP and WAVE family proteins: key molecules for rapid rearrangement of cortical actin filaments and cell movement. *J Cell Sci* 114: 1801-1809.
96. Edwards, D. C., L. C. Sanders, G. M. Bokoch, and G. N. Gill. 1999. Activation of LIM-kinase by Pak1 couples Rac/Cdc42 GTPase signalling to actin cytoskeletal dynamics. *Nat Cell Biol* 1: 253-259.
97. Mack, N. A., H. J. Whalley, S. Castillo-Lluva, and A. Malliri. 2011. The diverse roles of Rac signaling in tumorigenesis. *cc* 10: 1571-1581.
98. Pickart, C. M., and M. J. Eddins. 2004. Ubiquitin: structures, functions, mechanisms. *Biochim Biophys Acta* 1695: 55-72.
99. Kerscher, O., R. Felberbaum, and M. Hochstrasser. 2006. Modification of proteins by ubiquitin and ubiquitin-like proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol* 22: 159-180.
100. Welchman, R. L., C. Gordon, and R. J. Mayer. 2005. Ubiquitin and ubiquitin-like proteins as multifunctional signals. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6: 599-609.
101. Metzger, M. B., V. A. Hristova, and A. M. Weissman. 2012. HECT and RING finger families of E3 ubiquitin ligases at a glance. *J Cell Sci* 125: 531-537.
102. Haglund, K., and I. Dikic. 2005. Ubiquitylation and cell signaling. *EMBO J* 24: 3353-3359.
103. Malynn, B. A., and A. Ma. 2010. Ubiquitin makes its mark on immune regulation. *Immunity* 33: 843-852.
104. Wada, K., M. Niida, M. Tanaka, and T. Kamitani. 2009. Ro52-mediated monoubiquitination of IKK β down-regulates NF- κ B signalling. *J Biochem* 146: 821-832.
105. Finley, D. 2009. Recognition and processing of ubiquitin-protein conjugates by the proteasome. *Annu Rev Biochem* 78: 477-513.
106. Lander, G. C., E. Estrin, M. E. Matyskiela, C. Bashore, E. Nogales, and A. Martin. 2012. Complete subunit architecture of the proteasome regulatory particle. *Nature* 482: 186-191.
107. Amerik, A. Y., and M. Hochstrasser. 2004. Mechanism and function of deubiquitinating enzymes. *Biochim Biophys Acta* 1695: 189-207.
108. Jacobson, A. D., N. Y. Zhang, P. Xu, K. J. Han, S. Noone, J. Peng, and C. W. Liu. 2009. The lysine 48 and lysine 63 ubiquitin conjugates are processed differently by the 26 S proteasome. *J Biol Chem* 284: 35485-35494.
109. Borden, K. L. 2000. RING domains: master builders of molecular scaffolds. *J Mol Biol* 295: 1103-1112.
110. Deshaies, R. J., and C. A. Joazeiro. 2009. RING domain E3 ubiquitin ligases. *Annu Rev Biochem* 78: 399-434.
111. Lin, D. I., O. Barbash, K. G. Kumar, J. D. Weber, J. W. Harper, A. J. Klein-Szanto, A. Rustgi, S. Y. Fuchs, and J. A. Diehl. 2006. Phosphorylation-dependent ubiquitination of cyclin D1 by the SCF(FBX4- α B crystallin) complex. *Mol Cell* 24: 355-366.
112. Nalepa, G., M. Rolfe, and J. W. Harper. 2006. Drug discovery in the ubiquitin-proteasome system. *Nat Rev Drug Discov* 5: 596-613.

113. Deshaies, R. J., and C. A. Joazeiro. 2009. RING domain E3 ubiquitin ligases. *Annu Rev Biochem* 78: 399-434.
114. Acquaviva, C., and J. Pines. 2006. The anaphase-promoting complex/cyclosome: APC/C. *J Cell Sci* 119: 2401-2404.
115. Peters, J. M. 2006. The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7: 644-656.
116. Pickart, C. M., and D. Fushman. 2004. Polyubiquitin chains: polymeric protein signals. *Curr Opin Chem Biol* 8: 610-616.
117. Scheffner, M., J. M. Huibregtse, R. D. Vierstra, and P. M. Howley. 1993. The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell* 75: 495-505.
118. Hoppe, T. 2005. Multiubiquitylation by E4 enzymes: 'one size' doesn't fit all. *Trends Biochem Sci* 30: 183-187.
119. Marín, I. 2010. Animal HECT ubiquitin ligases: evolution and functional implications. *BMC Evol Biol* 10: 56.
120. Rotin, D., and S. Kumar. 2009. Physiological functions of the HECT family of ubiquitin ligases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10: 398-409.
121. Anglesio, M. S., V. Evdokimova, N. Melnyk, L. Zhang, C. V. Fernandez, P. E. Grundy, S. Leach, M. A. Marra, A. R. Brooks-Wilson, J. Penninger, and P. H. Sorensen. 2004. Differential expression of a novel ankyrin containing E3 ubiquitin-protein ligase, Hace1, in sporadic Wilms' tumor versus normal kidney. *Hum Mol Genet* 13: 2061-2074.
122. Zhang, L., M. S. Anglesio, M. O'Sullivan, F. Zhang, G. Yang, R. Sarao, P. N. Mai, S. Cronin, H. Hara, N. Melnyk, L. Li, T. Wada, P. P. Liu, J. Farrar, R. J. Arceci, P. H. Sorensen, and J. M. Penninger. 2007. The E3 ligase HACE1 is a critical chromosome 6q21 tumor suppressor involved in multiple cancers. *Nat Med* 13: 1060-1069.
123. Goka, E. T., and M. E. Lippman. 2015. Loss of the E3 ubiquitin ligase HACE1 results in enhanced Rac1 signaling contributing to breast cancer progression. *Oncogene*
124. Cetinbas, N., M. Dugaard, A. R. Mullen, S. Hajee, B. Rotblat, A. Lopez, A. Li, R. J. DeBerardinis, and P. H. Sorensen. 2014. Loss of the tumor suppressor Hace1 leads to ROS-dependent glutamine addiction. *Oncogene* 0:
125. Rotblat, B., A. L. Southwell, D. E. Ehrnhoefer, N. H. Skotte, M. Metzler, S. Franciosi, G. Leprivier, S. P. Somasekharan, A. Barokas, Y. Deng, T. Tang, J. Mathers, N. Cetinbas, M. Dugaard, B. Kwok, L. Li, C. J. Carnie, D. Fink, R. Nitsch, J. D. Galpin, C. A. Ahern, G. Melino, J. M. Penninger, M. R. Hayden, and P. H. Sorensen. 2014. HACE1 reduces oxidative stress and mutant Huntingtin toxicity by promoting the NRF2 response. *Proc Natl Acad Sci U S A*
126. Zhang, L., X. Chen, P. Sharma, M. Moon, A. D. Sheftel, F. Dawood, M. P. Nghiem, J. Wu, R. K. Li, A. O. Gramolini, P. H. Sorensen, J. M. Penninger, J. H. Brumell, and P. P. Liu. 2014. HACE1-dependent protein degradation provides cardiac protection in response to haemodynamic stress. *Nat Commun* 5: 3430.
127. Liu, Z., P. Chen, H. Gao, Y. Gu, J. Yang, H. Peng, X. Xu, H. Wang, M. Yang, X. Liu, L. Fan, S. Chen, J. Zhou, Y. Sun, K. Ruan, S. Cheng, M. Komatsu, E. White, L. Li, H. Ji, D. Finley, and R. Hu. 2014. Ubiquitylation of Autophagy Receptor Optineurin by HACE1 Activates Selective Autophagy for Tumor Suppression. *Cancer Cell* 26: 106-120.
128. Whittaker, C. A., and R. O. Hynes. 2002. Distribution and evolution of von Willebrand/integrin A domains: widely dispersed domains with roles in cell adhesion and elsewhere. *Mol Biol Cell* 13: 3369-3387.
129. Humphries, J. D., A. Byron, and M. J. Humphries. 2006. Integrin ligands at a glance. *J Cell Sci* 119: 3901-3903.

130. Nishida, N., C. Xie, M. Shimaoka, Y. Cheng, T. Walz, and T. A. Springer. 2006. Activation of leukocyte beta2 integrins by conversion from bent to extended conformations. *Immunity* 25: 583-594.
131. Zhu, J., C. V. Carman, M. Kim, M. Shimaoka, T. A. Springer, and B. H. Luo. 2007. Requirement of alpha and beta subunit transmembrane helix separation for integrin outside-in signaling. *Blood* 110: 2475-2483.
132. Shattil, S. J., C. Kim, and M. H. Ginsberg. 2010. The final steps of integrin activation: the end game. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11: 288-300.
133. Tadokoro, S., S. J. Shattil, K. Eto, V. Tai, R. C. Liddington, J. M. de Pereda, M. H. Ginsberg, and D. A. Calderwood. 2003. Talin binding to integrin beta tails: a final common step in integrin activation. *Science* 302: 103-106.
134. Kim, C., F. Ye, X. Hu, and M. H. Ginsberg. 2012. Talin activates integrins by altering the topology of the β transmembrane domain. *J Cell Biol* 197: 605-611.
135. Mitra, S. K., D. A. Hanson, and D. D. Schlaepfer. 2005. Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6: 56-68.
136. Brugnera, E., L. Haney, C. Grimsley, M. Lu, S. F. Walk, A. C. Tosello-Trampont, I. G. Macara, H. Madhani, G. R. Fink, and K. S. Ravichandran. 2002. Unconventional Rac-GEF activity is mediated through the Dock180-ELMO complex. *Nat Cell Biol* 4: 574-582.
137. Pasapera, A. M., I. C. Schneider, E. Rericha, D. D. Schlaepfer, and C. M. Waterman. 2010. Myosin II activity regulates vinculin recruitment to focal adhesions through FAK-mediated paxillin phosphorylation. *J Cell Biol* 188: 877-890.
138. Xiang-Dong Ren¹, William B. Kiosses^{1,*}, David J. Sieg², Carol A. Otey³, David D. Schlaepfer² and Martin Alexander Schwartz^{1,‡}. 2000. Focal adhesion kinase suppresses Rho activity to promote focal adhesion turnover. *J Cell Sci*. 113: 3673-3678.
139. Arthur WT1, P. L. A., Burrridge K. 2000. Integrin engagement suppresses RhoA activity via a c-Src-dependent mechanism. *Curr Biol* 10: 719-722.
140. Obergfell, A., K. Eto, A. Mocsai, C. Buensuceso, S. L. Moores, J. S. Brugge, C. A. Lowell, and S. J. Shattil. 2002. Coordinate interactions of Csk, Src, and Syk kinases with [alpha]IIb[beta]3 initiate integrin signaling to the cytoskeleton. *J Cell Biol* 157: 265-275.
141. Hamelers, I. H., C. Olivo, A. E. Mertens, D. M. Pegtel, R. A. van der Kammen, A. Sonnenberg, and J. G. Collard. 2005. The Rac activator Tiam1 is required for (alpha)3(beta)1-mediated laminin-5 deposition, cell spreading, and cell migration. *J Cell Biol* 171: 871-881.
142. Taniguchi, S., H. Liu, T. Nakazawa, K. Yokoyama, T. Tezuka, and T. Yamamoto. 2003. p250GAP, a neural RhoGAP protein, is associated with and phosphorylated by Fyn. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 306: 151-155.
143. Marignani, P. A., and C. L. Carpenter. 2001. Vav2 is required for cell spreading. *J Cell Biol* 154: 177-186.
144. Moro, L., L. Dolce, S. Cabodi, E. Bergatto, E. Boeri Erba, M. Smeriglio, E. Turco, S. F. Retta, M. G. Giuffrida, M. Venturino, J. Godovac-Zimmermann, A. Conti, E. Schaefer, L. Beguinot, C. Tacchetti, P. Gaggini, L. Silengo, G. Tarone, and P. Defilippi. 2002. Integrin-induced epidermal growth factor (EGF) receptor activation requires c-Src and p130Cas and leads to phosphorylation of specific EGF receptor tyrosines. *J Biol Chem* 277: 9405-9414.
145. Marcoux, N., and K. Vuori. 2003. EGF receptor mediates adhesion-dependent activation of the Rac GTPase: a role for phosphatidylinositol 3-kinase and Vav2. *Oncogene* 22: 6100-6106.
146. Vakaloglou, K. M., G. Chrysanthis, and C. G. Zervas. 2016. IPP Complex Reinforces Adhesion by Relaying Tension-Dependent Signals to Inhibit Integrin Turnover. *Cell Rep* 14: 2668-2682.
147. Hannigan, G., A. A. Troussard, and S. Dedhar. 2005. Integrin-linked kinase: a cancer therapeutic target unique among its ILK. *Nat Rev Cancer* 5: 51-63.

148. Tucker, K. L., T. Sage, J. M. Stevens, P. A. Jordan, S. Jones, N. E. Barrett, R. St-Arnaud, J. Frampton, S. Dedhar, and J. M. Gibbins. 2008. A dual role for integrin-linked kinase in platelets: regulating integrin function and alpha-granule secretion. *Blood* 112: 4523-4531.
149. Tadokoro SI, S. S. J., Eto K, Tai V, Liddington RC, de Pereda JM, Ginsberg MH, Calderwood DA. 2003. Talin binding to integrin beta tails: a final common step in integrin activation. *Science* 302: 103-106.
150. Tanentzapf, G., and N. H. Brown. 2006. An interaction between integrin and the talin FERM domain mediates integrin activation but not linkage to the cytoskeleton. *Nat Cell Biol* 8: 601-606.
151. Wegener, K. L., A. W. Partridge, J. Han, A. R. Pickford, R. C. Liddington, M. H. Ginsberg, and I. D. Campbell. 2007. Structural basis of integrin activation by talin. *Cell* 128: 171-182.
152. Watanabe, N., L. Bodin, M. Pandey, M. Krause, S. Coughlin, V. A. Boussiotis, M. H. Ginsberg, and S. J. Shattil. 2008. Mechanisms and consequences of agonist-induced talin recruitment to platelet integrin α IIb β 3. *J Cell Biol* 181: 1211-1222.
153. Humphries, J. D., P. Wang, C. Streuli, B. Geiger, M. J. Humphries, and C. Ballestrem. 2007. Vinculin controls focal adhesion formation by direct interactions with talin and actin. *J Cell Biol* 179: 1043-1057.
154. Ziegler, W. H., R. C. Liddington, and D. R. Critchley. 2006. The structure and regulation of vinculin. *Trends Cell Biol* 16: 453-460.
155. Cohen, D. M., B. Kutscher, H. Chen, D. B. Murphy, and S. W. Craig. 2006. A Conformational Switch in Vinculin Drives Formation and Dynamics of a Talin-Vinculin Complex at Focal Adhesions. *Journal of Biological Chemistry* 281: 16006-16015.
156. Chen, Y., and N. V. Dokholyan. 2006. Insights into Allosteric Control of Vinculin Function from Its Large Scale Conformational Dynamics. *Journal of Biological Chemistry* 281: 29148-29154.
157. Chen, H., D. M. Choudhury, and S. W. Craig. 2006. Coincidence of Actin Filaments and Talin Is Required to Activate Vinculin. *Journal of Biological Chemistry* 281: 40389-40398.
158. Sjöblom, B., A. Salmazo, and K. Djinović-Carugo. 2008. Alpha-actinin structure and regulation. *Cell Mol Life Sci* 65: 2688-2701.
159. Choi, C. K., M. Vicente-Manzanares, J. Zareno, L. A. Whitmore, A. Mogilner, and A. R. Horwitz. 2008. Actin and alpha-actinin orchestrate the assembly and maturation of nascent adhesions in a myosin II motor-independent manner. *Nat Cell Biol* 10: 1039-1050.
160. Alexandrova, A. Y., K. Arnold, S. Schaub, J. M. Vasiliev, J. J. Meister, A. D. Bershadsky, and A. B. Verkhovsky. 2008. Comparative dynamics of retrograde actin flow and focal adhesions: formation of nascent adhesions triggers transition from fast to slow flow. *PLoS One* 3: e3234.
161. Winograd-Katz, S. E., R. Fassler, B. Geiger, and K. R. Legate. 2014. The integrin adhesome: from genes and proteins to human disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15: 273-288.
162. Parsons, J. T., A. R. Horwitz, and M. A. Schwartz. 2010. Cell adhesion: integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11: 633-643.
163. Mao, Y., and J. E. Schwarzbauer. 2005. Fibronectin fibrillogenesis, a cell-mediated matrix assembly process. *Matrix Biol* 24: 389-399.
164. Murphy, D. A., and S. A. Courtneidge. 2011. The 'ins' and 'outs' of podosomes and invadopodia: characteristics, formation and function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12: 413-426.
165. Linder, S. 2009. Invadosomes at a glance. *Journal of Cell Science* 122: 3009-3013.
166. Burgstaller, G., and M. Gimona. 2005. Podosome-mediated matrix resorption and cell motility in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288: H3001-5.
167. Vassilev, A., K. J. Kaneko, H. Shu, Y. Zhao, and M. L. DePamphilis. 2001. TEAD/TEF transcription factors utilize the activation domain of YAP65, a Src/Yes-associated protein localized in the cytoplasm. *Genes Dev* 15: 1229-1241.
168. Dupont, S., L. Morsut, M. Aragona, E. Enzo, S. Giulitti, M. Cordenonsi, F. Zanconato, D. Le, Jimmy, M. Forcato, S. Bicciato, N. Elvassore, and S. Piccolo. 2011. Role of YAP/TAZ in mechanotransduction. *Nature* 474: 179-183.

169. Sun, Z., H.-Y. Tseng, S. Tan, F. Senger, L. Kurzawa, D. Dedden, N. Mizuno, A. A. Wasik, M. Thery, A. R. Dunn, and R. Fässler. 2016. Kank2 activates talin, reduces force transduction across integrins and induces central adhesion formation. *Nat Cell Biol* 18: 941-953.
170. Calvo, F., N. Ege, A. Grande-Garcia, S. Hooper, R. P. Jenkins, S. I. Chaudhry, K. Harrington, P. Williamson, E. Moeendarbary, G. Charras, and E. Sahai. 2013. Mechanotransduction and YAP-dependent matrix remodelling is required for the generation and maintenance of cancer-associated fibroblasts. *Nat Cell Biol* 15: 637-646.
171. Chang, C., H. L. Goel, H. Gao, B. Pursell, L. D. Shultz, D. L. Greiner, S. Ingerpuu, M. Patarroyo, S. Cao, E. Lim, J. Mao, K. K. McKee, P. D. Yurchenco, and A. M. Mercurio. 2015. A laminin 511 matrix is regulated by TAZ and functions as the ligand for the $\alpha 6\beta 1$ integrin to sustain breast cancer stem cells. *Genes Dev.* 29: 1-6.
172. Chan, E. H., M. Nousiainen, R. B. Chalamalasetty, A. Schäfer, E. A. Nigg, and H. H. Silljé. 2005. The Ste20-like kinase Mst2 activates the human large tumor suppressor kinase Lats1. *Oncogene* 24: 2076-2086.
173. Praskova, M., F. Xia, and J. Avruch. 2008. MOBKL1A/MOBKL1B phosphorylation by MST1 and MST2 inhibits cell proliferation. *Curr Biol* 18: 311-321.
174. Serrano, I., P. C. McDonald, F. Lock, W. J. Muller, and S. Dedhar. 2013. Inactivation of the Hippo tumour suppressor pathway by integrin-linked kinase. *Nat Comms* 4:
175. Polte, T. R., and S. K. Hanks. 1995. Interaction between focal adhesion kinase and Crk-associated tyrosine kinase substrate p130Cas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 10678-10682.
176. Li, X., and H. S. Earp. 1997. Paxillin Is Tyrosine-phosphorylated by and Preferentially Associates with the Calcium-dependent Tyrosine Kinase in Rat Liver Epithelial Cells. *Journal of Biological Chemistry* 272: 14341-14348.
177. Sakai R1, I. A., Hirano N, Ogawa S, Tanaka T, Mano H, Yazaki Y, Hirai H. 1994. A novel signaling molecule, p130, forms stable complexes in vivo with v-Crk and v-Src in a tyrosine phosphorylation-dependent manner. *EMBO J* 13: 3748-3756.
178. Donato, D. M., L. M. Ryzhova, L. M. Meenderink, I. Kaverina, and S. K. Hanks. 2010. Dynamics and mechanism of p130Cas localization to focal adhesions. *J Biol Chem* 285: 20769-20779.
179. Sawada, Y., M. Tamada, B. J. Dubin-Thaler, O. Cherniavskaya, R. Sakai, S. Tanaka, and M. P. Sheetz. 2006. Force sensing by mechanical extension of the Src family kinase substrate p130Cas. *Cell* 127: 1015-1026.
180. Tamada, M., M. P. Sheetz, and Y. Sawada. 2004. Activation of a signaling cascade by cytoskeleton stretch. *Dev Cell* 7: 709-718.
181. Bae, Y. H., K. L. Mui, B. Y. Hsu, S. L. Liu, A. Cretu, Z. Razinia, T. Xu, E. Puré, and R. K. Assoian. 2014. A FAK-Cas-Rac-lamellipodin signaling module transduces extracellular matrix stiffness into mechanosensitive cell cycling. *Sci Signal* 7: ra57.
182. del Rio, A., R. Perez-Jimenez, R. Liu, P. Roca-Cusachs, J. M. Fernandez, and M. P. Sheetz. 2009. Stretching single talin rod molecules activates vinculin binding. *Science* 323: 638-641.
183. Margadant, C., H. N. Monsuur, J. C. Norman, and A. Sonnenberg. 2011. Mechanisms of integrin activation and trafficking. *Curr Opin Cell Biol* 23: 607-614.
184. Haining, A. W., T. J. Lieberthal, and A. Del Río Hernández. 2016. Talin: a mechanosensitive molecule in health and disease. *FASEB J* 30: 2073-2085.
185. Zhou, A. X., J. H. Hartwig, and L. M. Akyürek. 2010. Filamins in cell signaling, transcription and organ development. *Trends Cell Biol* 20: 113-123.
186. D'Addario, M., P. D. Arora, R. P. Ellen, and C. A. McCulloch. 2002. Interaction of p38 and Sp1 in a mechanical force-induced, beta 1 integrin-mediated transcriptional circuit that regulates the actin-binding protein filamin-A. *J Biol Chem* 277: 47541-47550.
187. Furuike S, I. T., Yamazaki M. 2001. Mechanical unfolding of single filamin A (ABP-280) molecules detected by atomic force microscopy. *FEBS Lett.* 498: 72-75.

188. Yamazaki, M., S. Furuike, and T. Ito. 2002. Mechanical response of single filamin A (ABP-280) molecules and its role in the actin cytoskeleton. *J Muscle Res Cell Motil* 23: 525-534.
189. Razinia, Z., T. Mäkelä, J. Ylännä, and D. A. Calderwood. 2012. Filamins in mechanosensing and signaling. *Annu Rev Biophys* 41: 227-246.
190. Ehrlicher, A. J., F. Nakamura, J. H. Hartwig, D. A. Weitz, and T. P. Stossel. 2011. Mechanical strain in actin networks regulates FilGAP and integrin binding to filamin A. *Nature* 478: 260-263.
191. Ohta, Y., J. H. Hartwig, and T. P. Stossel. 2006. FilGAP, a Rho- and ROCK-regulated GAP for Rac binds filamin A to control actin remodelling. *Nat Cell Biol* 8: 803-814.
192. Ricard-Blum, S. 2011. The collagen family. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3: a004978.
193. Fratzl P1, M. K., Zizak I, Rapp G, Amenitsch H, Bernstorff S. 1998. Fibrillar structure and mechanical properties of collagen. *J Struct Biol.* 122: 119-122.
194. Myllyharju, J., and K. I. Kivirikko. 2004. Collagens, modifying enzymes and their mutations in humans, flies and worms. *Trends Genet* 20: 33-43.
195. Cui, H., C. Freeman, G. A. Jacobson, and D. H. Small. 2013. Proteoglycans in the central nervous system: role in development, neural repair, and Alzheimer's disease. *IUBMB Life* 65: 108-120.
196. Aumailley, M., L. Bruckner-Tuderman, W. G. Carter, R. Deutzmann, D. Edgar, P. Ekblom, J. Engel, E. Engvall, E. Hohenester, J. C. Jones, H. K. Kleinman, M. P. Marinkovich, G. R. Martin, U. Mayer, G. Meneguzzi, J. H. Miner, K. Miyazaki, M. Patarroyo, M. Paulsson, V. Quaranta, J. R. Sanes, T. Sasaki, K. Sekiguchi, L. M. Sorokin, J. F. Talts, K. Tryggvason, J. Uitto, I. Virtanen, K. von der Mark, U. M. Wewer, Y. Yamada, and P. D. Yurchenco. 2005. A simplified laminin nomenclature. *Matrix Biol* 24: 326-332.
197. Miner, J. H., and P. D. Yurchenco. 2004. Laminin functions in tissue morphogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20: 255-284.
198. Schwarzbauer, J. E., and D. W. DeSimone. 2011. Fibronectins, their fibrillogenesis, and in vivo functions. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3:
199. Murphy, G. 2008. The ADAMs: signalling scissors in the tumour microenvironment. *Nat Rev Cancer* 8: 929-941.
200. Kruse, M. N., C. Becker, D. Lottaz, D. Köhler, I. Yiallourous, H. W. Krell, E. E. Sterchi, and W. Stöcker. 2004. Human meprin alpha and beta homo-oligomers: cleavage of basement membrane proteins and sensitivity to metalloprotease inhibitors. *Biochem J* 378: 383-389.
201. Lu, P., K. Takai, V. M. Weaver, and Z. Werb. 2011. Extracellular matrix degradation and remodeling in development and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3:
202. Barker, H. E., T. R. Cox, and J. T. Erler. 2012. The rationale for targeting the LOX family in cancer. *Nat Rev Cancer* 12: 540-552.
203. Paszek, M. J., N. Zahir, K. R. Johnson, J. N. Lakins, G. I. Rozenberg, A. Gefen, C. A. Reinhart-King, S. S. Margulies, M. Dembo, D. Boettiger, D. A. Hammer, and V. M. Weaver. 2005. Tensional homeostasis and the malignant phenotype. *Cancer Cell* 8: 241-254.
204. Kim, H. E., S. S. Dalal, E. Young, M. J. Legato, M. L. Weisfeldt, and J. D'Armiento. 2000. Disruption of the myocardial extracellular matrix leads to cardiac dysfunction. *J Clin Invest* 106: 857-866.
205. Echtermeyer, F., J. Bertrand, R. Dreier, I. Meinecke, K. Neugebauer, M. Fuerst, Y. J. Lee, Y. W. Song, C. Herzog, G. Theilmeier, and T. Pap. 2009. Syndecan-4 regulates ADAMTS-5 activation and cartilage breakdown in osteoarthritis. *Nat Med* 15: 1072-1076.
206. Martignetti, J. A., A. A. Aqeel, W. A. Sewairi, C. E. Boumah, M. Kambouris, S. A. Mayouf, K. V. Sheth, W. A. Eid, O. Dowling, J. Harris, M. J. Glucksman, S. Bahabri, B. F. Meyer, and R. J. Desnick. 2001. Mutation of the matrix metalloproteinase 2 gene (MMP2) causes a multicentric osteolysis and arthritis syndrome. *Nat Genet* 28: 261-265.
207. El-Serag, H. B. 2011. Hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 365: 1118-1127.

208. Verrecchia, F., M. L. Chu, and A. Mauviel. 2001. Identification of novel TGF-beta /Smad gene targets in dermal fibroblasts using a combined cDNA microarray/promoter transactivation approach. *J Biol Chem* 276: 17058-17062.
209. Mchedlidze, T., M. Waldner, S. Zopf, J. Walker, A. Rankin, M. Schuchmann, D. Voehringer, A. McKenzie, M. Neurath, S. Pflanz, and S. Wirtz. 2013. Interleukin-33-Dependent Innate Lymphoid Cells Mediate Hepatic Fibrosis. *Immunity* 39: 357-371.
210. Erler, J. T., K. L. Bennewith, M. Nicolau, N. Dornhöfer, C. Kong, Q. T. Le, J. T. Chi, S. S. Jeffrey, and A. J. Giaccia. 2006. Lysyl oxidase is essential for hypoxia-induced metastasis. *Nature* 440: 1222-1226.
211. Erler, J. T., K. L. Bennewith, T. R. Cox, G. Lang, D. Bird, A. Koong, Q. T. Le, and A. J. Giaccia. 2009. Hypoxia-induced lysyl oxidase is a critical mediator of bone marrow cell recruitment to form the premetastatic niche. *Cancer Cell* 15: 35-44.
212. Elkabets, M., A. M. Gifford, C. Scheel, B. Nilsson, F. Reinhardt, M. A. Bray, A. E. Carpenter, K. Jirström, K. Magnusson, B. L. Ebert, F. Pontén, R. A. Weinberg, and S. S. McAllister. 2011. Human tumors instigate granulins-expressing hematopoietic cells that promote malignancy by activating stromal fibroblasts in mice. *J Clin Invest* 121: 784-799.
213. Kaplan, R. N., R. D. Riba, S. Zacharoulis, A. H. Bramley, L. Vincent, C. Costa, D. D. MacDonald, D. K. Jin, K. Shido, S. A. Kerns, Z. Zhu, D. Hicklin, Y. Wu, J. L. Port, N. Altorki, E. R. Port, D. Ruggero, S. V. Shmelkov, K. K. Jensen, S. Rafii, and D. Lyden. 2005. VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature* 438: 820-827.
214. Psaila, B., and D. Lyden. 2009. The metastatic niche: adapting the foreign soil. *Nat Rev Cancer* 9: 285-293.
215. Levental, K. R., H. Yu, L. Kass, J. N. Lakins, M. Egeblad, J. T. Erler, S. F. Fong, K. Csiszar, A. Giaccia, W. Weninger, M. Yamauchi, D. L. Gasser, and V. M. Weaver. 2009. Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signaling. *Cell* 139: 891-906.
216. Paszek, M. J., N. Zahir, K. R. Johnson, J. N. Lakins, G. I. Rozenberg, A. Gefen, C. A. Reinhart-King, S. S. Margulies, M. Dembo, D. Boettiger, D. A. Hammer, and V. M. Weaver. 2005. Tensional homeostasis and the malignant phenotype. *Cancer Cell* 8: 241-254.
217. Samuel, M. S., J. I. Lopez, E. J. McGhee, D. R. Croft, D. Strachan, P. Timpson, J. Munro, E. Schröder, J. Zhou, V. G. Brunton, N. Barker, H. Clevers, O. J. Sansom, K. I. Anderson, V. M. Weaver, and M. F. Olson. 2011. Actomyosin-mediated cellular tension drives increased tissue stiffness and β -catenin activation to induce epidermal hyperplasia and tumor growth. *Cancer Cell* 19: 776-791.
218. Goetz, J. G., S. Minguet, I. Navarro-Lerida, J. J. Lazcano, R. Samaniego, E. Calvo, M. Tello, T. Osteso-Ibanez, T. Pellinen, A. Echarri, A. Cerezo, A. J. Klein-Szanto, R. Garcia, P. J. Keely, P. Sanchez-Mateos, E. Cukierman, and M. A. Del Pozo. 2011. Biomechanical remodeling of the microenvironment by stromal caveolin-1 favors tumor invasion and metastasis. *Cell* 146: 148-163.
219. Torrino, S., O. Visvikis, A. Doye, L. Boyer, C. Stefani, P. Munro, J. Bertoglio, G. Gacon, A. Mettouchi, and E. Lemichez. 2011. The E3 Ubiquitin-Ligase HACE1 Catalyzes the Ubiquitylation of Active Rac1. *Developmental Cell* 21: 959-965.
220. Wild, P., H. Farhan, D. G. McEwan, S. Wagner, V. V. Rogov, N. R. Brady, B. Richter, J. Korac, O. Waidmann, C. Choudhary, V. Dotsch, D. Bumann, and I. Dikic. 2011. Phosphorylation of the autophagy receptor optineurin restricts Salmonella growth. *Science* 333: 228-233.
221. Zhu, G., C. J. Wu, Y. Zhao, and J. D. Ashwell. 2007. Optineurin negatively regulates TNFalpha-induced NF-kappaB activation by competing with NEMO for ubiquitinated RIP. *Curr Biol* 17: 1438-1443.
222. Laplantine, E., E. Fontan, J. Chiaravalli, T. Lopez, G. Lakisic, M. Véron, F. Agou, and A. Israël. 2009. NEMO specifically recognizes K63-linked poly-ubiquitin chains through a new bipartite ubiquitin-binding domain. *EMBO J* 28: 2885-2895.

223. Sahlender, D. A., R. C. Roberts, S. D. Arden, G. Spudich, M. J. Taylor, J. P. Luzio, J. Kendrick-Jones, and F. Buss. 2005. Optineurin links myosin VI to the Golgi complex and is involved in Golgi organization and exocytosis. *J Cell Biol* 169: 285-295.
224. Bond, L. M., A. A. Peden, J. Kendrick-Jones, J. R. Sellers, and F. Buss. 2011. Myosin VI and its binding partner optineurin are involved in secretory vesicle fusion at the plasma membrane. *Mol Biol Cell* 22: 54-65.
225. Kachaner, D., J. Filipe, E. Laplantine, A. Bauch, K. L. Bennett, G. Superti-Furga, A. Israel, and R. Weil. 2012. Plk1-dependent phosphorylation of optineurin provides a negative feedback mechanism for mitotic progression. *Molecular Cell* 45: 553-566.
226. Sahlender, D. A., R. C. Roberts, S. D. Arden, G. Spudich, M. J. Taylor, J. P. Luzio, J. Kendrick-Jones, and F. Buss. 2005. Optineurin links myosin VI to the Golgi complex and is involved in Golgi organization and exocytosis. *J Cell Biol* 169: 285-295.
227. Chibalina, M. V., A. Poliakov, J. Kendrick-Jones, and F. Buss. 2010. Myosin VI and optineurin are required for polarized EGFR delivery and directed migration. *Traffic* 11: 1290-1303.
228. Wollscheid, H. P., M. Biancospino, F. He, E. Magistrati, E. Molteni, M. Lupia, P. Soffientini, K. Rottner, U. Cavallaro, U. Pozzoli, M. Mapelli, K. J. Walters, and S. Polo. 2016. Diverse functions of myosin VI elucidated by an isoform-specific α -helix domain. *Nat Struct Mol Biol*
229. Zhu, G., C. J. Wu, Y. Zhao, and J. D. Ashwell. 2007. Optineurin negatively regulates TNF α -induced NF- κ B activation by competing with NEMO for ubiquitinated RIP. *Curr Biol* 17: 1438-1443.
230. Nakazawa, S., D. Oikawa, R. Ishii, T. Ayaki, H. Takahashi, H. Takeda, R. Ishitani, K. Kamei, I. Takeyoshi, H. Kawakami, K. Iwai, I. Hatada, T. Sawasaki, H. Ito, O. Nureki, and F. Tokunaga. 2016. Linear ubiquitination is involved in the pathogenesis of optineurin-associated amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Commun* 7: 12547.
231. Obaid, R., S. E. Wani, A. Azfer, T. Hurd, R. Jones, P. Cohen, S. H. Ralston, and O. M. Albagha. 2015. Optineurin Negatively Regulates Osteoclast Differentiation by Modulating NF- κ B and Interferon Signaling: Implications for Paget's Disease. *Cell Rep*
232. Nakagawa, I., A. Amano, N. Mizushima, A. Yamamoto, H. Yamaguchi, T. Kamimoto, A. Nara, J. Funao, M. Nakata, K. Tsuda, S. Hamada, and T. Yoshimori. 2004. Autophagy defends cells against invading group A Streptococcus. *Science* 306: 1037-1040.
233. Shibutani, S. T., T. Saitoh, H. Nowag, C. Münz, and T. Yoshimori. 2015. Autophagy and autophagy-related proteins in the immune system. *Nat Immunol* 16: 1014-1024.
234. Visvikis, O., N. Ihuegbu, S. A. Labed, L. G. Luhachack, A. M. Alves, A. C. Wollenberg, L. M. Stuart, G. D. Stormo, and J. E. Irazoqui. 2014. Innate host defense requires TFEB-mediated transcription of cytoprotective and antimicrobial genes. *Immunity* 40: 896-909.
235. Lazarou, M., D. A. Sliter, L. A. Kane, S. A. Sarraf, C. Wang, J. L. Burman, D. P. Sideris, A. I. Fogel, and R. J. Youle. 2015. The ubiquitin kinase PINK1 recruits autophagy receptors to induce mitophagy. *Nature*
236. Richter, B., D. A. Sliter, L. Herhaus, A. Stolz, C. Wang, P. Beli, G. Zaffagnini, P. Wild, S. Martens, S. A. Wagner, R. J. Youle, and I. Dikic. 2016. Phosphorylation of OPTN by TBK1 enhances its binding to Ub chains and promotes selective autophagy of damaged mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA* 113: 4039-4044.
237. Meng, Q., J. Lv, H. Ge, L. Zhang, F. Xue, Y. Zhu, and P. Liu. 2012. Overexpressed mutant optineurin(E50K) induces retinal ganglion cells apoptosis via the mitochondrial pathway. *Mol Biol Rep* 39: 5867-5873.
238. Minegishi, Y., D. Iejima, H. Kobayashi, Z. L. Chi, K. Kawase, T. Yamamoto, T. Seki, S. Yuasa, K. Fukuda, and T. Iwata. 2013. Enhanced optineurin E50K-TBK1 interaction evokes protein insolubility and initiates familial primary open-angle glaucoma. *Hum Mol Genet* 22: 3559-3567.
239. Maruyama, H., H. Morino, H. Ito, Y. Izumi, H. Kato, Y. Watanabe, Y. Kinoshita, M. Kamada, H. Nodera, H. Suzuki, O. Komure, S. Matsuura, K. Kobatake, N. Morimoto, K. Abe, N.

- Suzuki, M. Aoki, A. Kawata, T. Hirai, T. Kato, K. Ogasawara, A. Hirano, T. Takumi, H. Kusaka, K. Hagiwara, R. Kaji, and H. Kawakami. 2010. Mutations of optineurin in amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 465: 223-226.
240. Cirulli, E. T., B. N. Lasseigne, S. Petrovski, P. C. Sapp, P. A. Dion, C. S. Leblond, J. Couthouis, Y. F. Lu, Q. Wang, B. J. Krueger, Z. Ren, J. Keebler, Y. Han, S. E. Levy, B. E. Boone, J. R. Wimbish, L. L. Waite, A. L. Jones, J. P. Carulli, A. G. Day-Williams, J. F. Staropoli, W. W. Xin, A. Chesi, A. R. Raphael, D. McKenna-Yasek, J. Cady, J. M. Vianney de Jong, K. P. Kenna, B. N. Smith, S. Topp, J. Miller, A. Gkazi, S. C. FALS, A. Al-Chalabi, L. H. van den Berg, J. Veldink, V. Silani, N. Ticozzi, C. E. Shaw, R. H. Baloh, S. Appel, E. Simpson, C. Lagier-Tourenne, S. M. Pulst, S. Gibson, J. Q. Trojanowski, L. Elman, L. McCluskey, M. Grossman, N. A. Shneider, W. K. Chung, J. M. Ravits, J. D. Glass, K. B. Sims, V. M. Van Deerlin, T. Maniatis, S. D. Hayes, A. Ordureau, S. Swarup, J. Landers, F. Baas, A. S. Allen, R. S. Bedlack, J. W. Harper, A. D. Gitler, G. A. Rouleau, R. Brown, M. B. Harms, G. M. Cooper, T. Harris, R. M. Myers, and D. B. Goldstein. 2015. Exome sequencing in amyotrophic lateral sclerosis identifies risk genes and pathways. *Science* 347: 1436-1441.
241. Ito, Y., D. Ofengeim, A. Najafov, S. Das, S. Saberi, Y. Li, J. Hitomi, H. Zhu, H. Chen, L. Mayo, J. Geng, P. Amin, J. P. DeWitt, A. K. Mookhtiar, M. Florez, A. T. Ouchida, J. B. Fan, M. Pasparakis, M. A. Kelliher, J. Ravits, and J. Yuan. 2016. RIPK1 mediates axonal degeneration by promoting inflammation and necroptosis in ALS. *Science* 353: 603-608.
242. Maruyama, H., H. Morino, H. Ito, Y. Izumi, H. Kato, Y. Watanabe, Y. Kinoshita, M. Kamada, H. Nodera, H. Suzuki, O. Komure, S. Matsuura, K. Kobatake, N. Morimoto, K. Abe, N. Suzuki, M. Aoki, A. Kawata, T. Hirai, T. Kato, K. Ogasawara, A. Hirano, T. Takumi, H. Kusaka, K. Hagiwara, R. Kaji, and H. Kawakami. 2010. Mutations of optineurin in amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 465: 223-226.
243. Moore, A. S., and E. L. Holzbaur. 2016. Dynamic recruitment and activation of ALS-associated TBK1 with its target optineurin are required for efficient mitophagy. *Proc Natl Acad Sci USA* 113: E3349-58.
244. Korac, J., V. Schaeffer, I. Kovacevic, A. M. Clement, B. Jungblut, C. Behl, J. Terzic, and I. Dikic. 2013. Ubiquitin-independent function of optineurin in autophagic clearance of protein aggregates. *J Cell Sci* 126: 580-592.
245. Albagha, O. M. E., M. R. Visconti, N. Alonso, A. L. Langston, T. Cundy, R. Dargie, M. G. Dunlop, W. D. Fraser, M. J. Hooper, G. Isaia, G. C. Nicholson, J. del Pino Montes, R. Gonzalez-Sarmiento, M. di Stefano, A. Tenesa, J. P. Walsh, and S. H. Ralston. 2010. Genome-wide association study identifies variants at CSF1, OPTN and TNFRSF11A as genetic risk factors for Paget's disease of bone. *Nat Genet* 42: 520-524.
246. Duvel, K., J. L. Yecies, S. Menon, P. Raman, A. I. Lipovsky, A. L. Souza, E. Triantafellow, Q. Ma, R. Gorski, S. Cleaver, M. G. Vander Heiden, J. P. MacKeigan, P. M. Finan, C. B. Clish, L. O. Murphy, and B. D. Manning. 2010. Activation of a metabolic gene regulatory network downstream of mTOR complex 1. *Mol Cell* 39: 171-183.
247. Matthew G. Vander Heiden,² Lewis C. Cantley,^{2*} Craig B. Thompson^{3*}. Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *science*
248. Yecies, J. L., and B. D. Manning. 2011. Transcriptional control of cellular metabolism by mTOR signaling. *Cancer Res* 71: 2815-2820.
249. Wong, Y. C., and E. L. Holzbaur. 2014. Optineurin is an autophagy receptor for damaged mitochondria in parkin-mediated mitophagy that is disrupted by an ALS-linked mutation. *Proc Natl Acad Sci USA* 111: E4439-48.
250. Morita, M., S. P. Gravel, V. Chenard, K. Sikstrom, L. Zheng, T. Alain, V. Gandin, D. Avizonis, M. Arguello, C. Zakaria, S. McLaughlan, Y. Nouet, A. Pause, M. Pollak, E. Gottlieb, O. Larsson, J. St-Pierre, I. Topisirovic, and N. Sonenberg. 2013. mTORC1 controls mitochondrial activity and biogenesis through 4E-BP-dependent translational regulation. *Cell Metab* 18: 698-711.

251. Oakes, P. W., Y. Beckham, J. Stricker, and M. L. Gardel. 2012. Tension is required but not sufficient for focal adhesion maturation without a stress fiber template. *J Cell Biol* 196: 363-374.
252. Kenific, C. M., S. J. Stehbens, J. Goldsmith, A. M. Leidal, N. Faure, J. Ye, T. Wittmann, and J. Debnath. 2016. NBR1 enables autophagy-dependent focal adhesion turnover. *J Cell Biol* 212: 577-590.
253. Sharifi, M., E. Mowers, L. Drake, C. Collier, H. Chen, M. Zamora, S. Mui, and K. Macleod. 2016. Autophagy Promotes Focal Adhesion Disassembly and Cell Motility of Metastatic Tumor Cells through the Direct Interaction of Paxillin with LC3. *Cell Reports* 15: 1660-1672.
254. Abnave, P., G. Mottola, G. Gimenez, N. Boucherit, V. Trouplin, C. Torre, F. Conti, A. BenÂ Amara, C. Lepolard, B. Djian, D. Hamaoui, A. Mettouchi, A. Kumar, S. Pagnotta, S. Bonatti, H. Lepidi, A. Salvetti, L. Abi-Rached, E. Lemichez, J.-L. Mege, and E. Ghigo. 2014. Screening in Planarians Identifies MORN2 as a Key Component in LC3-Associated Phagocytosis and Resistance to Bacterial Infection. *Cell Host & Microbe* 16: 338-350.