

Université Victor Segalen Bordeaux 2

Année 2010

Thèse n°1768

THÈSE

pour le

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ BORDEAUX 2

Mention : Sciences, Technologies, Santé

Option : Microbiologie

Présentée et soutenue publiquement

Le 9 Décembre 2010,

Par **Cédric Belair**

Né le 20 Novembre 1981 à Lormont (33)

Rôle des microARNs dans les infections bactériennes chez l'Homme :

*Le modèle *Helicobacter pylori*.*

Membres du Jury

Mr. Alain Blanchard, Professeur des Universités (Bordeaux)Président
Mr. Jérôme Cavaillé, Directeur de Recherche (Toulouse).....Rapporteur
Mr. Ivo Gomperts-Boneca, Chargé de Recherche (Paris).....Rapporteur
M^{elle} Christine Varon, Maître de conférences (Bordeaux)Invitée
Mr. Fabien Darfeuille, Chargé de Recherche (Bordeaux).....Invité
M^{me}. Cathy Staedel, Chargé de Recherche (Bordeaux)Directrice de thèse

*Les plus pessimistes d'aujourd'hui ont été les plus optimistes autrefois. Ils
poursuivaient de vaines illusions. L'échec les a découragés.*
Hou Che

La science est une chose merveilleuse... tant qu'il ne faut pas en vivre.
Albert Einstein

Remerciements

J'adresse tout d'abord mes remerciements aux membres du jury qui ont accepté d'évaluer ce travail. Je remercie le Professeur Alain Blanchard qui m'a fait l'honneur de présider ce jury de thèse. Je remercie également les Docteurs Jérôme Cavaillé et Ivo Gomperts-Boneca d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce manuscrit. Je remercie les Docteurs Christine Varon et Fabien Darfeuille pour leur examen de ce mémoire.

Je souhaite remercier le Docteur Jean-Jacques Toulmé de m'avoir accueilli et permis de réaliser ce travail au sien de son unité.

Je remercie ma directrice de thèse, le Docteur Cathy Staedel, pour son soutien au cours de ces 4 années.

Merci à toi, Fabien, de m'avoir fait découvrir le monde passionnant de la Recherche et d'avoir partagé ta passion pour la science. J'ai énormément appris à tes côtés et continue à apprendre. Tu as été un soutien infailible et tes critiques/questions constructives m'ont permis d'avancer.

Je remercie tous ceux sans qui ce labo aurait du mal à fonctionner : Kati Ba-Pierozzi, pour tout le volet administratif et la gestion des boulets ; Jacques Puyol pour toute la logistique, et Nathalie Pierre pour les synthèses d'oligos.

Je remercie évidemment l'ensemble des membres du laboratoire qui ont rendu ce travail au quotidien plus agréable et plus motivant :

Hélène Arnion, je te remercie d'avoir été là, notamment pendant cette période très dure qu'a été la rédaction. Nos discussions interminables et tes coups de pieds au ... m'ont permis de tenir et d'avancer.

Jacques Puyol, mon papa spirituel, partager le bureau avec toi durant ces années a été un véritable plaisir. Il y a tant de choses à dire, que l'on peut résumer par : bien plus qu'un collègue, tu es un véritable ami sur qui on peut compter.

Sandrine Chabas, je te remercie de ta patience pour répondre à mes innombrables questions de Bio mol et Bio cell et pour gérer les commandes toujours très urgentes. Et je ne dirais qu'une chose.... Tchitchaaaaa....

Laurent Azema (Toi qui est chimiste !), merci d'avoir répondu aux questions d'un biologiste sur la chimie et pour les discussions de « géopolitique ».

Et tous les autres : Sonia da Rocha, ma maman, spirituelle (la femme aux 365 paires de bottes), Kati Ba-Pierozzi (Rien ne vaut une bonne douche) Jeremy Reignier (Bonne année 2004 !), Salim Khiati (Attention au vin blanc dans les moules !), Jessica Baud (tu es la prochaine !), Laurent Bui (le roi des makis) et tous ce que j'oublie (pardon !)...

Je remercie également Nicolas Landrein pour son aide sur la mise au point des Western blot.

Je tiens à remercier La Ligue Nationale contre le Cancer, ainsi que tous ses donateurs, pour avoir financé ma quatrième année de thèse, notamment le comité des Pyrénées Atlantiques.

Merci à toi, Nancy... Tu m'as soutenue et supportée tout au long de ces 10 ans. Tu as toujours été présente pour moi dans les bons moments, comme dans les passages à vide.

Je remercie vivement ma famille, notamment mes parents, pour leur soutien indéfectible depuis le début.

MERCI à TOUS.....

Table des matières

Liste des illustrations	6
Liste des tableaux	8
Organismes	9
Abréviations	10
<u>Partie I. Données Bibliographiques.</u>	<u>13</u>
Chapitre I : Les microARNs.	14
1. Introduction.	14
2. Biogénèse des miRNAs.	15
2.1 Organisation génomique des miRNAs.	15
2.2 La transcription des gènes codants les miRNAs.	16
2.3 La maturation du pri-miRNA.	17
2.4 L'export cytoplasmique et la maturation du pre-miRNA.	18
2.5 Le chargement du miRNA mature dans le complexe RISC.	19
3. Les mécanismes de la régulation post-transcriptionnelle par les miRNAs.	20
3.1 La reconnaissance de l'ARNm cible.	21
3.2 La répression de la traduction des ARNm cibles.	22
3.2.1 La répression au niveau de l'initiation de la traduction.	23
3.2.2 La répression au niveau des étapes post-initiation de la traduction.	23
4. Le devenir du complexe ARNm-miRISC.	24
4.1 La relocalisation du complexe ARNm-miRISC.	24
4.1.1 La dégradation des ARNm inhibés par les miRNAs.	25
4.2 Les fonctions alternatives des miRNAs.	26
5. La régulation des miRNAs.	26
5.1 La régulation de la biogénèse des miRNAs.	27
5.1.1 La régulation transcriptionnelle.	27
5.1.2 La régulation post-transcriptionnelle.	28
5.2 La régulation de l'activité des miRNAs.	29
Chapitre II : Le rôle des miRNAs dans les interactions hôte-pathogènes.	32
1. Introduction.	32
1.1 La biogénèse des siRNAs.	33
1.2 L'ARN interférence dans la défense antivirale.	33
1.3 Le paradoxe des mammifères.	34
2. Les miRNAs dans les interactions hôte-pathogène.	36
2.1 Les miRNAs dans l'immunité des plantes.	36
2.2 Les miRNAs dans l'immunité des mammifères.	37
2.2.1 Les miRNAs et le système immunitaire.	37

2.2.2 Les miRNAs, un système immunitaire intracellulaire.....	39
3. La contre-défense des pathogènes.	40
3.1 Les miRNAs viraux.	41
3.2 Les « Viral Silencing Repressors ».....	43
3.3 Les « Bacterial Silencing Repressors ».	45

Chapitre III : *Helicobacter pylori*..... 47

1. Historique.	47
2. Epidémiologie et transmission.....	48
3. Pathogénèse.	49
3.1 Aspects cliniques.	49
3.2 Les déterminants de la pathogénèse.	50
3.3 Les déterminants « environnementaux ».	50
3.4 Les déterminants de l'hôte.....	51
3.4.1 Le polymorphisme génétique.	51
3.4.2 La réponse inflammatoire.....	52
3.5 Les déterminants bactériens.....	53
3.5.1 Les facteurs de colonisation.	53
3.5.1.1 L'uréase.	54
3.5.1.2 Les flagelles.....	54
3.5.1.3 Les adhésines.....	54
3.5.2 Les facteurs de virulence.....	55
3.5.2.1 La toxine vacuolisante VacA.....	55
3.5.2.1.1 Structure et variabilité de VacA.	55
3.5.2.1.2 Fonctions de VacA.	56
3.5.2.1.3 L'îlot de pathogénicité <i>cag</i>	58
3.5.2.1.3.1 Les fonctions du SST4.....	58
3.5.2.1.3.2 Fonctions cellulaires de la cytotoxine CagA.	59
3.5.2.1.3.3 Translocation et phosphorylation de CagA.	60
3.5.2.1.3.4 Fonctions cellulaires dépendantes de la phosphorylation de CagA.	61
3.5.2.1.3.5 Fonctions cellulaires indépendantes de la phosphorylation de CagA.	62

Chapitre IV : Le rôle des miRNAs au cours de l'infection par *Helicobacter pylori*..... 65

1. Introduction.	65
2. Revue publiée :	66
3. Conclusion.	67

Partie II. Partie Expérimentale..... 68

Chapitre I : Manuscrit en révision : *Helicobacter pylori* interferes with an embryonic stem cell miRNA cluster to block cell cycle progression. 69

1. Introduction.	69
-----------------------	----

2. Manuscrit en révision :	71
3. Analyse comparative de l'expression de miR-372&373 dans différentes lignées.	72
4. Régulation des miRNAs au cours de l'infection par <i>H. pylori</i>	72
Chapitre II : La régulation du <i>cluster</i> miR-371-372-373.	75
1. Introduction.	75
2. Matériels et Méthodes.	76
3. Résultats.....	79
3.1 Identification et clonage du promoteur putatif du <i>cluster</i> miR-371-372-373.	79
3.2 Etude de la méthylation du <i>cluster</i> miR-371-372-373.	81
3.3 Caractérisation du promoteur putatif du <i>cluster</i> miR-371-372-373.	84
<u>Partie III. Discussions et Perspectives.</u>	85
1. La spécificité d'expression du <i>cluster</i> miR-371-372-373.	86
2. La régulation du <i>cluster</i> miR-371-372-373.	87
3. Rôle de la toxine CagA dans la répression du <i>cluster</i> miR-371-372-373.	90
<u>Partie IV. Conclusions.</u>	94
<u>Références bibliographiques.</u>	97
<u>Annexes.</u>	111

Liste des illustrations

Figure 1 : Evolution du nombre d'entrées de la Mirbase en fonction des années.....	15
Figure 2 : Organisation génomique des miRNAs intra-géniques.....	16
Figure 3 : Mécanisme d'action des enzymes Drosha et Dicer.	17
Figure 4 : Les voies alternatives de biogénèse des miRNAs.	18
Figure 5 : Structure et fonction de la protéine Argonaute de <i>Pyrococcus furiosus</i>	19
Figure 6 : La voie canonique des miRNAs.	20
Figure 7 : Principe général de l'interaction du miRNA à l'ARNm cible.....	21
Figure 8 : Mécanismes possibles de la répression traductionnelle dirigée par les miRNAs....	23
Figure 9 : Mécanisme d'action des « éponges » à miRNAs.	30
Figure 10 : Les PRRs dans l'immunité innée des animaux.....	32
Figure 11 : Diversité des sources de siRNAs.	33
Figure 12 : La réponse des cellules mammifères aux ARNdb.	35
Figure 13 : La voie des miRNAs chez les plantes et les animaux.	36
Figure 14 : Vue générale de l'implication des miRNAs dans la différenciation et la fonction des cellules immunitaires.	38
Figure 15 : Rôle de miR-146, miR-9 et miR-155 au cours de l'activation de la réponse immunitaire innée.	39
Figure 16 : Rôle des miRNAs viraux au cours des infections virales.....	41
Figure 17 : L'interaction des VSRs avec le <i>RNA silencing</i> chez l'Homme.	44
Figure 18 : Mécanisme d'action des BSRs chez les plantes.	45
Figure 19 : Prévalence d' <i>Helicobacter pylori</i> dans le monde.	48
Figure 20 : Pathogénèse de l'infection par <i>H. pylori</i>	49
Figure 21 : Vue générale de la réponse inflammatoire déclenchée par <i>H. pylori</i>	52
Figure 22 : Morphologie d' <i>H. pylori</i> visualisée en microscopie électronique à balayage.....	54
Figure 23 : La toxine vacuolisante VacA : structure et fonctions.	56
Figure 24 : Le système de sécrétion de type IV de <i>H. pylori</i>	58
Figure 25 : Les partenaires cellulaires de la cytotoxine CagA.....	61
Figure 26 : Les fonctions cellulaires de la cytotoxine CagA.	62
Figure 27 : Contribution des facteurs environnementaux, de l'hôte et bactériens à la pathogénèse de <i>H. pylori</i>	64
Figure 28 : Analyse comparative de l'expression de miR-372&373 dans différentes lignées gastriques humaines (AGS, MKN7, MKN45, MKN74 and NCI-N87), non gastriques (HT29, HEK 293, HeLa, HuH-7, IGR-OV1, Caco2), ainsi que dans l'estomac, dans une tumeur gastrique et son tissu sain adjacent (NAT).....	72
Figure 29 : Analyse de la qualité des ARNs extraits des cellules AGS non infectées et infectées.	73
Figure 30 : Distribution des miRNAs dans les cellules AGS témoins et infectées par <i>H.</i> <i>pylori</i>	73
Figure 31 : Représentation schématique des clusters EEmiRC murin, humain, canin et bovin.	75
Figure 32 : Identification du promoteur putatif du <i>cluster</i> miR-371-372-373.....	79

Figure 33 : Activité transcriptionnelle de la région F1 dans différentes lignées cellulaires. ...	80
Figure 34 : Identification des îlots CpG potentiels du cluster miR-371-372-373.	82
Figure 35 : Analyse de la méthylation des îlots CpG1, 2 et 3 dans les différentes lignées.	83
Figure 36 : Mutagenèse des différents sites potentiels de facteurs de transcription.	84
Figure 37 : Modèle hypothétique pour la répression du cluster miR-371-372-373 au cours de l'infection.	92

Liste des tableaux

Tableau 1 : Les outils bio-informatiques de prédictions des cibles des miRNAs.....	22
Tableau 2 : Les régulateurs post-transcriptionnels de la biogénèse des miRNAs chez les animaux.	28
Tableau 3 : Liste de miRNAs cellulaires modulant la réplication de virus.....	39
Tableau 4 : Analyse des bibliothèques obtenues lors du séquençage.....	72
Tableau 5 : Séquences des amorces utilisées.	76
Tableau 6 : Liste des sites putatifs d'interaction de facteurs de transcription dans la région F1.....	84

Organismes

Procaryotes :

A. tumefaciens : *Agrobacterium tumefaciens*

E. coli : *Escherichia coli*

H. pylori : *Helicobacter pylori*

P. furiosus : *Pyrococcus furiosus*

P. syringae : *Pseudomonas syringae*

Eucaryotes :

Arabidopsis thaliana : *A. thaliana*

C. elegans : *Caenorhabditis elegans*

D. melanogaster : *Drosophila melanogaster*

S. cerevisiae : *Saccharomyces cerevisiae*

S. pombe : *Schizosaccharomyces pombe*

Virus :

CMV : cytomégalovirus

EBV : Epstein-Barr virus

FHV : flock house virus

KSHV : virus herpès du sarcome de Kaposi

PFV-1 : primate foamy virus type I

TCV : turnip crinckle virus

TEV : tobacco etch virus

VHC : virus de l'Hépatite C

VIH : virus de l'immunodéficience humaine

VSV : virus de la stomatite vésiculaire

Abréviations

β -gal : β -galactosidase
3' ou 5'UTR : 3' ou 5' untranslated region
ADN : acide désoxyribonucléique
ADNg : ADN génomique
ARN : acide ribonucléique
ARNdb : ARN double brin
ARNm : ARN messenger
ARNnc : ARN non codant
ARNr : ARN ribosomique
ARNt : ARN de transfert
BSR : bacterial silencing repressor
C19MC : chromosome 19 miRNAs cluster
cag PAI : îlot de pathogénicité *cag*
cag : cytotoxin associated genes
CagA : cytotoxin associated gene A
CagA-P : CagA phosphorylée
CAT-1 : cationic amino acid transporter 1
DMEM : Dulbecco's modified Eagle Medium
DNMT : DNA methyltransferase
EEmiRC : early embryonic microRNA cluster
EGFR : epidermal growth factor receptor
Erk : extracellular signal-regulated kinase
FAK : focal adhesion kinase
Gram⁻ : gram négatif
h : heure
h/mES : human/murine embryonic stem cell
IL-X : interleukine X
INF- γ :interféron γ
IRES : internal ribosome entry site
LPS : lipopolysaccharide
MALT : mucosa-associated lymphoid tissue

MAPK : mitogen-activated protein kinase
 min : minute
 MiPC : microprocessor complex
 miRNA : microARN
 ml : millilitre
 MOI : multiplicity of infection
 NFAT : nuclear factor of activated T cells
 NLR : nucleotide-binding domain, Leucine-Rich repeat containing receptor
 nm : nanomètre
 NOD : nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 1
 nt : nucléotide
 OMP : outer membrane protein
 ORF : open reading frame
 PABP : poly(A)-binding protein
 PAMP : pathogen-associated molecular pattern
 PAZ : Piwi-Argonaute-Zwille
 pb : paire de bases
 PCR : polymerase chain reaction
 PG : peptidoglycane
 PKR : protéine kinase R
 PRR : pattern recognition receptor
 PTGS : post-transcriptional gene silencing
 RLR : RIG-I like receptor
 RNAi : ARN interference
 RPA : RNase protection assay
 RPMI : Roswell Park Memorial Institute Medium
 s : seconde
 siRNA : small interfering RNA
 snoRNA : small nucleolar RNA
 SST4 ou 5 : système de sécrétion de type IV ou V
 stRNA : small temporal RNA
 SRF : serum responsive factor
 SVF : sérum de veau fœtal
 TGF- β : transforming growth factor β

TLR : toll-like receptor

TNF- α : tumor necrosis factor α

TSS : transcription start site

TU : transcription unit

U : unité

VacA : vacuolating toxin

VIGS : virus-induced gene silencing

viRNA : virus-derived siRNA

VSR : viral silencing repressors

Partie I. Données Bibliographiques.

Chapitre I : Les microARNs.

1. Introduction.

La découverte de l'ARN interférence (RNAi), notamment des microARNs (miRNAs), dans les années 90 a bouleversé notre vision de la régulation de l'expression des gènes et fait apparaître une nouvelle notion : l'ARN en tant que régulateur de l'expression génique. En effet, jusqu'à la fin des années 80, la vision de cette régulation était basée sur le dogme « tout protéique » de la biologie moléculaire, où l'ARN ne possède qu'un rôle structural (ARNr et ARNt) ou porteur d'information (ARNm). Cependant, les découvertes successives de l'ARNm, des ARNt, de l'épissage, et des ARN catalytiques, les ribozymes, avaient souligné l'importance de l'ARN dans l'expression des gènes. De même, la notion d'ARN régulateur a été envisagée très tôt, par Jacob et Monod (Morange, 2008). Mais, devant les rares exemples décrits dans la littérature, l'ARN régulateur fut considéré comme un outil expérimental, avec notamment le développement des ARNs antisens, plutôt qu'une réalité biologique. En 1993, le groupe de V. Ambros décrit chez le nématode *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) que le gène *lin-4* régule négativement le niveau de la protéine LIN-14, gène impliqué dans le développement larvaire de ce ver (Lee *et al.*, 1993). Le produit du gène *lin-4* code non pas une protéine mais 2 petits ARNs non codants, *lin-4S* d'une longueur de 22 nucléotides (nt) et *lin-4L* de 61 nt. Ces ARNs contenant des séquences complémentaires de régions répétées présentes dans la région 3' non traduite (3'UTR) de l'ARNm *lin-14*, il fut suggéré que ces ARNs réprimaient la traduction de cet ARNm via un mécanisme antisens. Ce fut le premier exemple d'un petit ARN endogène régulateur post-transcriptionnel chez les eucaryotes. Ces auteurs venaient de décrire pour la première fois un miRNA, nommé d'abord stRNA (*small temporal RNA*), *lin-4S*, et son précurseur (pre-miRNA), *lin-4L*. Cependant, devant l'absence d'autres exemples, cet ARN fut considéré comme une singularité de *C. elegans* jusqu'en 2000, où un deuxième miRNA, *let-7*, fut découvert, toujours chez le ver (Reinhart *et al.*, 2000). Des études ultérieures montrèrent que ces petits ARNs étaient retrouvés chez de nombreuses espèces, notamment chez les vertébrés et invertébrés, suggérant que le mécanisme de régulation post-transcriptionnel des gènes par de petits ARNs non codants avait été conservé au cours de l'évolution (Pasquinelli *et al.*, 2000; Lagos-Quintana *et al.*, 2001). Le lien avec le *RNA silencing*, découvert quelques années plus tôt chez les plantes et *C. elegans* (cf. chapitre II.1) fut établi lorsque le groupe du Dr. P. Zamore montra que Dicer, enzyme clé dans la maturation des *small interfering RNA* (siRNA) était également impliquée dans la biogénèse de *let-7* (Hutvagner *et al.*, 2001). Leurs travaux démontrèrent ainsi que les miRNAs

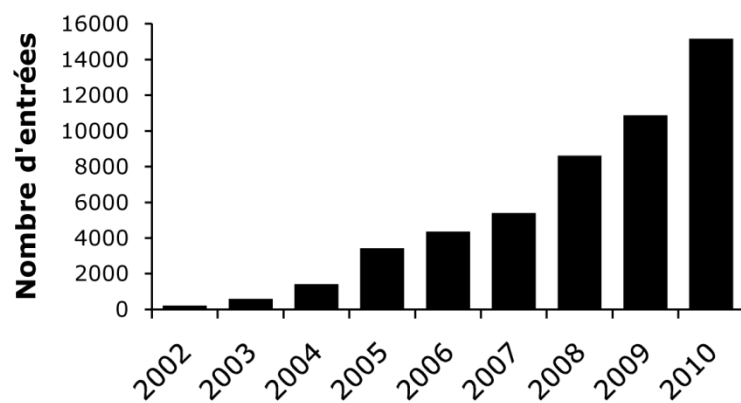


Figure 1 : Evolution du nombre d'entrées de la Mirbase en fonction des années.

Une entrée correspond à un pre-miRNA. La dernière version v16 de la Mirbase comporte 15172 entrées ou pre-miRNAs exprimant 17341 miRNAs matures potentiels dans 142 espèces différentes.

n'étaient pas des fragments de dégradation. Ces découvertes, basées sur des cribles génétiques, constituèrent le point de départ pour la recherche systématique des gènes codant les miRNAs dans différents organismes. Le séquençage des génomes, notamment celui de l'Homme, a permis de développer des outils bio-informatiques basés sur la détection des tiges-boucles caractéristiques des pre-miRNAs (Lim *et al.*, 2003), ainsi que sur la conservation des miRNAs au sein des espèces. Ces recherches ont abouti à la découverte exponentielle de miRNAs (Figure 1), qui furent répertoriés dans une base de données, la Mirbase (www.mirbase.org) (Griffiths-Jones, 2004). Actuellement, la Mirbase v16 (Septembre 2010) recense 17341 miRNAs dans 142 espèces dont 1048 chez l'Homme, 672 chez la souris, 176 chez la drosophile, 175 chez *C. elegans*, et 213 chez *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*). A l'exception des eucaryotes inférieurs tels que *Saccharomyces cerevisiae* et des procaryotes, des miRNAs ont été identifiés chez les eucaryotes unicellulaires tel que chez l'algue *Chlamydomonas reinhardtii* (Zhao *et al.*, 2007) et chez les virus. De plus, ~55% des miRNAs identifiés chez *C. elegans* possèdent des homologues chez l'Homme (Ibanez-Ventoso *et al.*, 2008). Par conséquent, la régulation post-transcriptionnelle des gènes par les miRNAs serait un mécanisme apparu très tôt au cours de l'évolution. Cette apparition a été estimée à 400 millions d'années (Floyd and Bowman, 2004). Cependant, les miRNAs des animaux semblent avoir évolué de manière différente par rapport à ceux des plantes, car leur séquence, la structure de leur précurseur ainsi que leur biogénèse sont différentes (Millar and Waterhouse, 2005; Chapman and Carrington, 2007).

Les miRNAs sont considérés aujourd'hui comme les acteurs centraux de la régulation post-transcriptionnelle des gènes. Leur rôle biologique dans de nombreux processus biologiques tels que le développement, l'immunité, la prolifération est clairement démontré, ainsi que leur dérégulation au cours des pathologies notamment le cancer ou les infections virales.

2. Biogénèse des miRNAs.

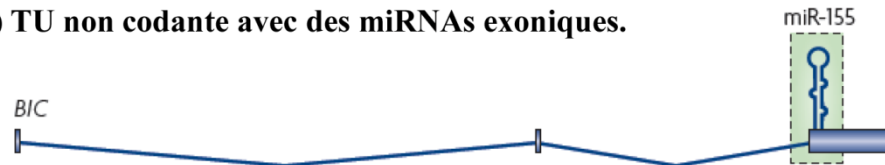
2.1 Organisation génomique des miRNAs.

Les recherches bio-informatiques et les cribles génétiques, mis en œuvre afin d'identifier les miRNAs, ont permis de comprendre l'organisation génomique des gènes codant les miRNAs. A l'intérieur d'une espèce, la plupart des gènes codant les miRNAs possèdent des formes paralogues issues d'événements de duplication. Par exemple, le génome humain possède 12 locus pour la famille des miRNAs let-7. Ces paralogues présentent

(a) TU non codante avec des miRNAs introniques.



(b) TU non codante avec des miRNAs exoniques.



(c) TU codante avec des miRNAs introniques.

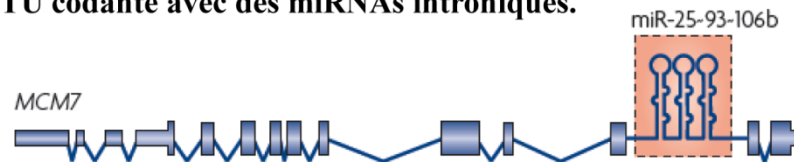


Figure 2 : Organisation génomique des miRNAs intragéniques.

Les miRNAs situés dans des régions intragéniques peuvent être divisés en 4 groupes selon leur localisation intronique ou exonique:

(a) Les miRNAs introniques situés dans des TUs non codantes. Ici est présenté l'exemple du *cluster* miR-15a-16-1 qui est retrouvé dans un intron du gène *DLEU2* codant un ARN non codant (ARNnc) (Calin *et al.*, 2002).

(b) Les miRNAs exoniques situés dans des TUs non codantes. Par exemple, le locus de miR-155, miRNA de la réponse immunitaire, se situe au niveau du gène *BIC* codant également un ARNnc (Tam, 2001).

(c) Les miRNAs introniques localisés dans des TUs codantes. C'est le cas du *cluster* miR-25-93-106b qui se localise au niveau de l'intron 13 de l'ARNm codant la protéine MCM7 (Petrocca *et al.*, 2008).

Adaptée de (Kim *et al.*, 2009).

souvent une identité de séquence, notamment au niveau de la région située en 5' du miRNA, appelée « graine » (« *seed* »), région essentielle pour la reconnaissance et l'appariement à l'ARNm cible. Cette graine permet de regrouper les miRNAs en famille, laissant envisager des actions redondantes. Cependant, la région 3' du miRNA est également impliquée dans l'appariement à la cible et les miRNAs d'une même famille présentent généralement des profils d'expression différents, ce qui suggère que les membres d'une même famille doivent avoir des fonctions distinctes *in vivo*.

On peut classer les miRNAs en 2 grands groupes : les miRNAs intergéniques et les miRNAs intragéniques. De plus, environ 50% des miRNAs des mammifères sont organisés en *cluster*, c'est-à-dire que ces miRNAs vont être générés à partir d'une unité de transcription (TU) polycistronique unique. Ces *clusters* possèdent leur propre promoteur, dans le cas des miRNAs intergéniques, ou appartiennent à des TUs codantes ou non codantes pour les miRNAs intragéniques. Dans ce dernier cas, soit ils possèdent leur propre promoteur, et par conséquent, ont leur propre régulation transcriptionnelle, comme dans le cas du miR-21 (Cai *et al.*, 2004) ; soit ils sont dépendant du promoteur de la TU dans laquelle ils sont situés et, dans ce cas, leur régulation transcriptionnelle est directement liée à celle du gène « hôte ». Concernant les miRNAs intragéniques, on distingue 3 principales organisations (Figure 2) (Rodriguez *et al.*, 2004; Olena and Patton, 2010) :

- Des TUs non codantes avec des miRNAs introniques.
- Des TUs non codantes avec des miRNAs exoniques.
- Des TUs codantes avec des miRNAs introniques. Cette organisation

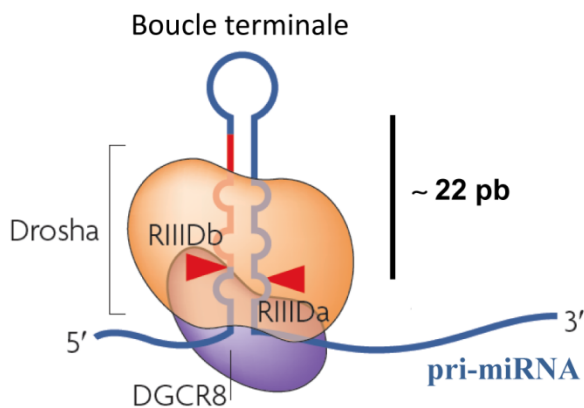
concernerait environ 40% des miRNAs.

Cette grande diversité d'organisation génomique se retrouve dans les différentes espèces. Au vu de cette complexité, il est donc facile d'imaginer une grande variété de mécanismes de régulation de ces miRNAs, illustrant ainsi leur rôle crucial dans le contrôle de l'expression des gènes.

2.2 La transcription des gènes codants les miRNAs.

A l'origine, il fut suggéré que la transcription des miRNAs soit réalisée par l'ARN polymérase III, car cette enzyme est responsable de la transcription de nombreux ARN non codants (ARNnc). Mais les études expérimentales ont montré que la majorité des miRNAs sont transcrits par l'ARN polymérase II (Cai *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2004). Cependant, de manière peu fréquente, certains miRNAs, notamment parmi les miRNAs introniques, pourraient être transcrits par l'ARN polymérase III. L'exemple le plus connu est le *cluster*

a) Maturation du pri-miRNA par Drosha.



b) Maturation du pre-miRNA par Dicer.

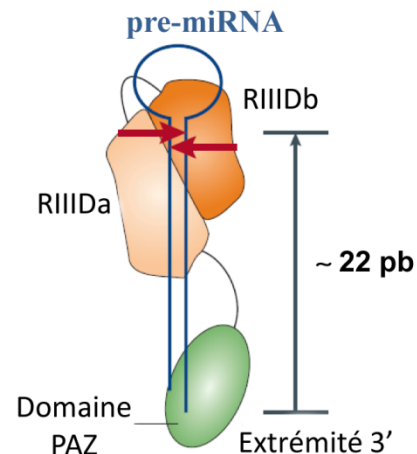


Figure 3 : Mécanisme d'action des enzymes Drosha et Dicer.

a) Drosha possède 2 domaines RNase III (RIIIDa et RIIIDb) qui interagissent ensemble pour former un dimère où les sites catalytiques sont juxtaposés. Le domaine RIIIDa coupe le brin 3' de la tige du pri-miRNA, tandis que RIIIDb coupe son brin 5', générant une extrémité 3' flanquante. Les triangles rouges indiquent les sites de coupure. En interagissant avec la tige et les régions simples brins du pri-miRNA, DGCR8 permet le bon positionnement de Drosha, ~ 22 pb avant la boucle terminale du pri-miRNA. Ces 2 protéines forment le MiPC.

b) Dicer possède également 2 domaines RNase III (RIIIDa et RIIIDb), ainsi qu'un domaine PAZ. En interagissant avec l'extrémité 3' du pre-miRNA, le domaine PAZ permet le positionnement des domaines RNase III de Dicer à ~ 22 pb de cette extrémité. Le clivage du pre-miRNA libère alors un duplex de 18 à 23 pb, constitué du miRNA mature et du miRNA*.

Adaptée de (Kim, 2005; Kim *et al.*, 2009).

C19MC (*chromosome 19 miRNAs cluster*) qui contient 59 miRNAs (Borchert *et al.*, 2006). Mais une étude récente montre que ces miRNAs sont introniques et situés dans une large TU non codante dont la transcription dépend de l'ARN polymérase II (Bortolin-Cavaille *et al.*, 2009). D'autres études ont montré que certains miRNAs introniques posséderaient leur propre promoteur, dépendant notamment de l'ARN polymérase III (Ozsolak *et al.*, 2008; Monteys *et al.*, 2010). Ainsi, ils seraient soumis à une double régulation contrôlée : par leur propre promoteur (pol III) et par celui du gène « hôte » (pol II).

Les miRNAs sont ainsi transcrits sous la forme d'un long transcrit primaire, le pri-miRNA, long de plusieurs kilobases (kb) en général et contenant des structures secondaires de type tige-boucle. Comme tous les ARNs issus d'une transcription « pol II », ce pri-miRNA possède une coiffe à son extrémité 5' et une queue poly(A) à son extrémité 3'.

2.3 La maturation du pri-miRNA.

La première étape dans la biogénèse des miRNAs est la maturation du transcrit primaire. Elle se déroule dans le noyau des cellules.

Dans la majorité des cas, le pri-miRNA est clivé par une enzyme de type RNase III, Drosha, en un second précurseur de 60-100 nt, structuré en tige-boucle, le pre-miRNA (Lee *et al.*, 2003). Drosha est une enzyme spécifique du règne animal. Par conséquent, comme nous le verrons dans le chapitre II.2.1, les plantes ont développé une voie alternative de maturation du pri-miRNA au cours de l'évolution. Cette enzyme nécessite le cofacteur « *DiGeorge syndrome critical region gene 8* » (DGCR8) (Pasha chez *Drosophila melanogaster* (*D. melanogaster*) et *C. elegans*). Ces 2 protéines forment un complexe de ~650 kiloDaltons (kDa) chez l'Homme, nommé *Microprocessor complex* (MiPC) (Denli *et al.*, 2004; Gregory *et al.*, 2004; Han *et al.*, 2004; Landthaler *et al.*, 2004). Précisément, un pri-miRNA typique est constitué d'une tige de ~33 paires de bases (pb) terminée par une boucle et flanquée de régions simples brins. DGCR8 interagit avec le pri-miRNA au niveau de la tige et des régions simples brins, permettant le positionnement de Drosha, qui clive le pri-miRNA ~22 pb avant la boucle apicale, libérant ainsi le pre-miRNA (Figure 3A) (Han *et al.*, 2006). De la même manière que pour le mécanisme d'épissage, il a été montré que la maturation du pri-miRNA était un mécanisme co-transcriptionnel (Morlando *et al.*, 2008). De même, dans le cadre des miRNAs introniques, la libération du pre-miRNA par Drosha est un événement antérieur au clivage de l'intron par le spliceosome (Figure 4A, p18) (Kim and Kim, 2007).

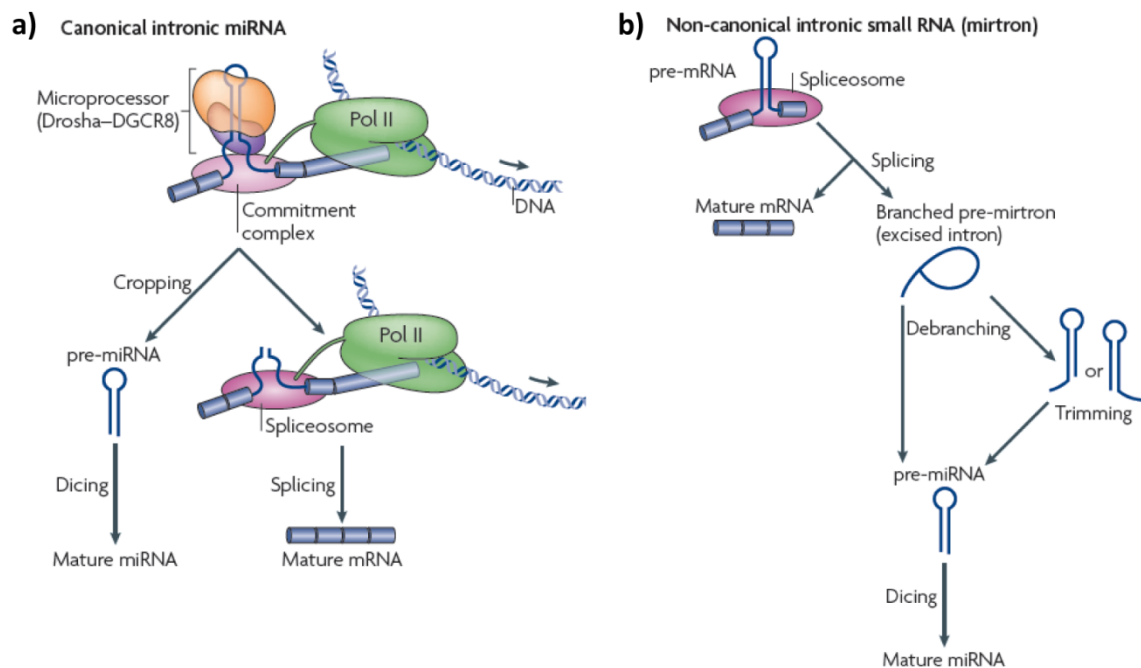


Figure 4 : Les voies alternatives de biogénèse des miRNAs.

(a) La voie canonique des miRNAs introniques. Le clivage du pri-miRNA, contenu dans l'intron, par le MiPC a lieu pendant la transcription et avant l'épissage de l'intron. Pour des raisons inconnues, l'intron contenant des miRNAs est épissé de manière plus lente que les introns adjacents dépourvus de miRNAs. Le pre-miRNA ainsi généré entre dans la voie classique de biogénèse des miRNAs, tandis que le pre-ARNm subit l'épissage pour former l'ARNm mature.

(b) La voie non canonique des mirtrons. Les mirtrons sont générés à partir des introns épissés et débranchés. Cette voie ne nécessite pas le clivage par Drosha, car les introns débranchés se structurent directement en pre-miRNA. Certains de ces pre-miRNAs présentent une extrémité simple brin qui est clivée avant l'export cytoplasmique du pre-miRNA.

D'après (Kim *et al.*, 2009).

Une voie alternative minoritaire a été décrite concernant certains miRNAs introniques (Figure 4B). Dans cette voie, la libération du pre-miRNA ne nécessite pas le clivage par Drosha, mais fait appel à la machinerie d'épissage. Une fois l'épissage de l'ARNm réalisé, l'intron en « lasso » ainsi libéré est débranché et se structure en tige-boucle, formant ainsi le pre-miRNA. Ces miRNAs issus de cette voie non canonique furent nommés des « mirtrons » (Berezikov *et al.*, 2007; Ruby *et al.*, 2007). De même, d'autres miRNAs, dérivant de la maturation d'ARNt ou de *small nucleolar RNA* (snoRNA), ont été décrits (Babiarz *et al.*, 2008; Ender *et al.*, 2008). Ainsi, il existerait de nombreuses voies alternatives, soulignant une fois de plus la complexité de la régulation de l'expression des miRNAs.

2.4 L'export cytoplasmique et la maturation du pre-miRNA.

A la suite de la maturation du pri-miRNA, le pre-miRNA est exporté dans le cytoplasme. Ce transport est réalisé par l'Exportine 5 (EXP5) (Lund *et al.*, 2004). L'EXP5, membre des récepteurs d'export nucléaire, se lie à la tige du pre-miRNA et utilise la voie classique d'export nucléaire en se liant à la protéine Cargo et au cofacteur Ran-GTP. Une fois dans le cytoplasme, l'hydrolyse du GTP entraîne la dissociation du complexe, libérant ainsi le pre-miRNA. Celui-ci va être clivé près de la boucle apicale par une endonucléase de type RNase III, Dicer, libérant un duplex de miRNAs de 19 à 23 nt de long (Hutvagner *et al.*, 2001). Ainsi, au cours du processus de maturation, une extrémité du miRNA mature est générée par Drosha tandis que l'autre extrémité est produite par Dicer. Comme les autres endonucléases de type RNase III, ces 2 enzymes génèrent des extrémités 3' flanquantes de ~ 2 nt. Cette extrémité constitue une séquence signal de reconnaissance. En effet, l'EXP5 se fixe à des tiges > 14 pb contenant une courte extrémité 3' simple brin. De même, Dicer interagit avec le pre-miRNA via un domaine PAZ (Piwi-Argonaute-Zwille) au niveau de cette extrémité 3'. Cette reconnaissance permet le bon positionnement du domaine RNase III de Dicer et le clivage du pre-miRNA ~ 22nt après cette extrémité, juste avant la boucle apicale (Figure 3B, p17).

A la différence de Drosha qui est spécifique du règne animal, Dicer est une protéine très conservée chez la plupart des eucaryotes, notamment la levure *Schizosaccharomyces pombe* (*S. pombe*), les animaux et les plantes. Certains organismes possèdent de multiples homologues de Dicer avec des rôles distincts (Lee *et al.*, 2004; Xie *et al.*, 2004). Par exemple, *D. melanogaster* possède 2 homologues de Dicer : Dcr-1, requise pour la biogénèse des

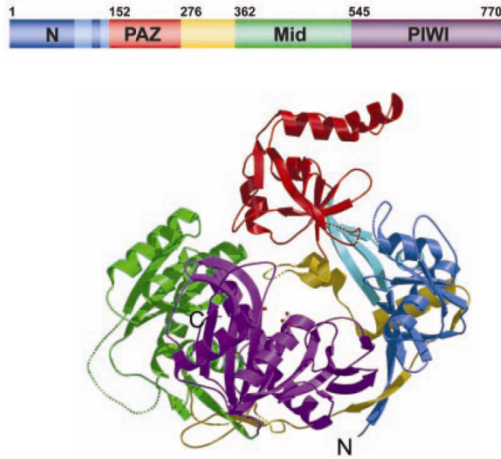
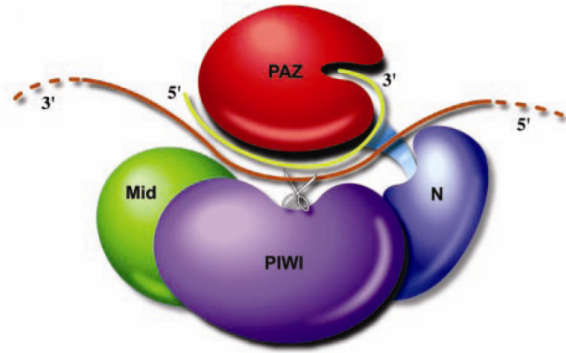
A**B**

Figure 5 : Structure et fonction de la protéine Argonaute de *Pyrococcus furiosus*.

(a) Structure schématique (haut) et crystal (bas) de la protéine AGO de *P. furiosus*. Les différents domaines sont représentés : PAZ (rouge), Mid (vert) et PIWI (violet).

(b) Représentation schématique du modèle du clivage de l'ARNm guidé par un siRNA. L'interaction de l'extrémité 3' du siRNA avec le domaine PAZ permet le positionnement de l'ARNm en face du domaine PIWI. Le site catalytique de type RNase H de ce domaine (ciseau) peut alors cliver l'ARNm au niveau d'un site situé au milieu du siRNA.

D'après (Song *et al.*, 2004).

miRNAs, et Dcr-2, impliquée dans la production des siRNAs. De même, on distingue 4 homologues Dicer-like 1-4 (DCL1-4) chez les plantes.

Des études ont montré que Dicer interagit avec de nombreuses protéines de liaison à l'ARN double brin (ARNdb). Chez l'Homme, cette enzyme interagit notamment avec 2 protéines, TRBP (*TAR RNA-binding protein*) (Chendrimada *et al.*, 2005; Haase *et al.*, 2005) et PACT (*PKR activator*) (Lee *et al.*, 2006). Le rôle de ces 2 protéines est encore incertain. Elles ne participeraient pas à l'activité de maturation, mais contribueraient à l'assemblage du complexe miRISC (*miRNA-containing RNA-induced silencing complex*).

2.5 Le chargement du miRNA mature dans le complexe RISC.

Après le clivage par Dicer, le duplex de miRNAs est dissocié et l'un des 2 brins est incorporé dans un complexe ribonucléoprotéique (RNP), nommé alors complexe miRISC, où il va se lier à une protéine de la famille des Argonautes. Ce brin est nommé le miRNA mature ou brin guide. L'autre brin, nommé miRNA star (miRNA*) ou brin passager, est éliminé par un mécanisme inconnu. Comment est sélectionné le miRNA mature par rapport au miRNA* lors du chargement ? Des études sur les siRNAs ont montré que cette sélection s'effectuerait selon la stabilité thermodynamique relative des extrémités du duplex (Khvorova *et al.*, 2003; Schwarz *et al.*, 2003). En effet, le brin présentant la paire de bases la plus instable à l'extrémité 5' serait sélectionné afin d'être chargé dans le complexe miRISC. Cependant, cette observation n'est pas stricte. Ainsi, certains miRNAs sont chargés dans le complexe miRISC avec la même fréquence que leur miRNA* correspondant.

Les principaux composants du complexe RISC sont les protéines de la famille Argonaute (AGO). Ces protéines ont un rôle essentiel dans le *RNA silencing* contrôlé par les siRNAs et les miRNAs. Les protéines Argonautes sont conservées des bactéries jusqu'à l'Homme et sont exprimées de manière ubiquitaire. Elles sont classées en 3 groupes paralogues :

- Les protéines Argonaute-like, liant les siRNAs et les miRNAs.
- Les protéines Piwi-like, liant les piwi-ARNs (piRNA).
- Les protéines Argonautes du groupe III, spécifiques de *C. elegans*, impliquées dans la liaison aux siRNAs secondaires.

Seules les protéines Argonaute-like seront abordées dans ce paragraphe.

Le nombre de gènes homologues AGO varie selon les espèces : 4 chez l'Homme (AGO1-4 ou EIF2C1-4), 5 chez *C. elegans*, 10 chez les plantes et 1 chez *S. pombe*. Les protéines AGO sont composées de 3 domaines essentiels (Figure 5) :

Biogenesis of canonical miRNA

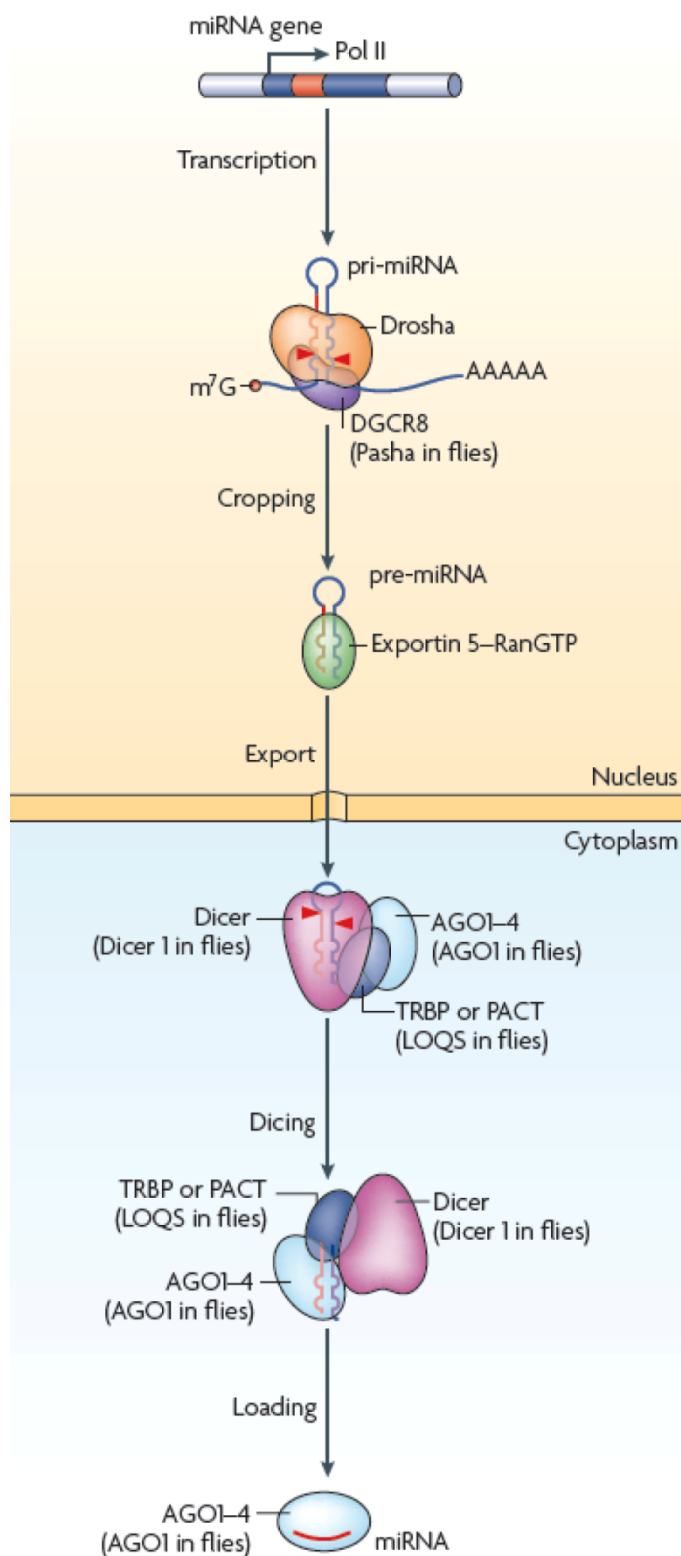


Figure 6 : La voie canonique des miRNAs.

Les gènes codant les miRNAs sont transcrits en général par l'ARN polymérase II. Le pri-miRNA ainsi généré est clivé par le MiPC, constitué de l'enzyme de type RNase III Drosha et DGCR8, pour former le pre-miRNA. Le transport cytoplasmique du pre-miRNA est assuré par l'Exportin 5, qui reconnaît son extrémité 3' flanquante. Dans le cytoplasme, l'enzyme de type RNase III Dicer assure le clivage du pre-miRNA, afin de former un duplex de miRNAs, constitué du miRNA mature et du miRNA*. Ce duplex est alors chargé dans le complexe RISC où le miRNA mature interagit avec les protéines AGO, tandis que le miRNA* est éliminé. Ce complexe miRISC ainsi formé va pouvoir se fixer à l'ARNm cible via le miRNA et induire la répression de sa traduction.

D'après (Kim *et al.*, 2009).

- Le domaine PAZ, retrouvé chez Dicer et les protéines AGO, est un domaine de liaison à l'ARNdb (Song *et al.*, 2003). Situé à l'extrémité N-terminale, il assure la reconnaissance et l'ancrage de l'extrémité 3' du miRNA ou du siRNA.

- Le domaine MID, situé entre les domaines PAZ et PIWI, assure l'ancrage de l'extrémité 5' du miRNA mature ou du siRNA. Il a été montré que l'extrémité 5'-phosphate du miRNA joue un rôle essentiel dans cet ancrage (Nykanen *et al.*, 2001).

- Le domaine PIWI est situé dans la région C-terminale. La structure de la protéine AGO de *Pyrococcus furiosus* (*P. furiosus*) a révélé que le domaine PIWI porterait, dans certains cas, une activité enzymatique de type RNase H qui permettrait de cliver l'ARNm cible du miRNA lié à AGO (Song *et al.*, 2004). On nomme cette activité endonucléasique, *slicer* (Liu *et al.*, 2004). Chez l'Homme, seule AGO2 possède cette activité *slicer*. Par conséquent, AGO2 est essentielle pour l'ARN interférence.

La maturation du pre-miRNA en duplex de miRNAs et le chargement du miRNA mature dans le complexe RISC sont des processus étroitement liés. Par conséquent, la demi-vie du duplex est relativement courte. Au point de vue moléculaire, Dicer, TRBP (et/ou PACT) et les protéines AGO interagissent et participent à la formation du complexe RISC en formant le complexe RLC (*RISC loading complex*). Au sein du complexe RLC, TRBP pourrait participer à la sélection du miRNA mature en se fixant à l'extrémité la plus stable du miRNA, permettant à l'autre extrémité, instable, d'interagir avec AGO. Cette hypothèse s'appuie sur des travaux chez *D. melanogaster* qui ont montré que R2D2, une protéine liant les ARNdb, homologue de TRBP et PACT, détecte les « inégalités thermodynamiques » du duplex. En complexe avec Dcr-2 et AGO2, R2D2 interagit avec l'extrémité la plus stable du duplex et oriente AGO2 sur le duplex miRNA/miRNA* (Liu *et al.*, 2003; Tomari *et al.*, 2004).

Une fois le complexe miRISC formé, celui-ci va pouvoir se fixer à l'ARNm cible par l'intermédiaire du miRNA mature et induire la répression de la traduction de cet ARNm. La voie canonique de biogénèse des miRNAs est résumée dans la figure 6.

3. Les mécanismes de la régulation post-transcriptionnelle par les miRNAs.

La répression de la traduction de l'ARNm cible du miRNA peut être divisée en 2 étapes :

- Reconnaissance de l'ARNm cible par le complexe miRISC
- Inhibition de la traduction et/ou dégradation de l'ARNm cible.

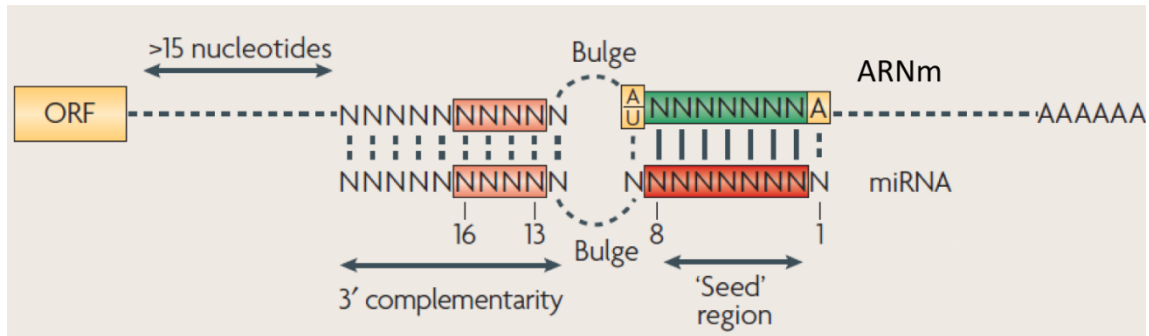


Figure 7 : Principe général de l'interaction du miRNA à l'ARNm cible.

Le miRNA interagit avec l'ARNm cible par appariement de bases. L'événement primaire de cette interaction est l'appariement parfait de la région graine (rouge) du miRNA à l'ARNm. La présence d'une adénine (surlignée en jaune) sur l'ARNm, en face de la position 1 du miRNA, ainsi que d'une adénine ou une uracile (surlignées en jaune) en face de la position 9 augmenterait l'efficacité d'interaction. Chez les mammifères, la présence de *bulge* et de mésappariements dans la région centrale bloquerait le clivage de l'ARNm par les protéines AGO. Enfin, une complémentarité raisonnable dans la moitié 3' du miRNA est nécessaire, afin de stabiliser l'interaction. A la différence des mammifères, la plupart des miRNAs de plante présentent une complémentarité parfaite avec l'ARNm, ce qui induit sa dégradation par les protéines AGO.

D'après (Filipowicz *et al.*, 2008).

3.1 La reconnaissance de l'ARNm cible.

La reconnaissance de l'ARNm cible par le complexe miRISC se fait par appariement du miRNA mature contenu dans ce complexe avec l'ARNm cible (Figure 7). Généralement, les sites d'interaction avec les miRNAs sont situés dans la région 3'UTR des ARNm et sont présents en multiples copies. Cette interaction ne se fait pas au hasard et est régie par 3 principes majeurs qui ont été déterminés de manière expérimentale et bio-informatique (Brennecke *et al.*, 2005; Grimson *et al.*, 2007; Filipowicz *et al.*, 2008) :

- Le premier principe est que l'appariement entre le miRNA et l'ARNm doit être parfait et continu dans la séquence « graine », comprise entre les nucléotides 2 et 8 du miRNA. Cet appariement constitue l'événement primaire dans l'interaction miRNA-ARNm. La présence de mésappariements, *bulges* ou appariements non canoniques (ex : GU) dans cette région déstabilise considérablement l'interaction miRNA-ARNm et affecte par conséquent la répression traductionnelle régulée par le miRNA.

- Le deuxième principe est que des *bulges* ou des mésappariements doivent être présents dans la région centrale du duplex miRNA-ARNm. Ces bulges et/ou mésappariements empêcheraient le clivage de l'ARNm par les protéines AGO.

- Enfin, une complémentarité « raisonnable » doit être observée entre l'extrémité 3' du miRNA et l'ARNm, ceci afin de stabiliser l'interaction miRNA-ARNm.

D'autres facteurs augmentent l'efficacité de cette interaction, comme, par exemple, la présence d'une séquence « AU-rich » près du site ou une localisation du site proche du codon stop ou de la queue poly(A) (Nielsen *et al.*, 2007). Ces facteurs permettraient une meilleure accessibilité du site d'interaction pour le miRNA, en permettant à la région 3'UTR de l'ARNm d'être moins structurée.

Ces principes, notamment celui de la graine, ont ainsi permis de développer des outils bio-informatiques pour la recherche des sites ciblés par les miRNAs dans les ARNm. Une liste non exhaustive de ces outils est présentée dans le tableau 1 (page suivante). En général, ils prennent en compte plusieurs critères, tels que la conservation des sites entre les espèces, les énergies de liaisons, le nombre de sites. La quasi-totalité de ces algorithmes se focalise exclusivement sur les régions 3'UTR des ARNm. Ce biais de recherche a 2 raisons : l'une est expérimentale et provient de l'observation que *lin-4* et *let-7*, les 2 premiers miRNAs découverts, présentaient des sites complémentaires dans la région 3'UTR de leur ARNm cible. L'autre est une « commodité » *in silico*. En effet, la conservation des ORFs (*Open Reading Frame*) observée entre les espèces au cours de l'évolution et imposée par

Tableau 1 : Les outils bio-informatiques de prédictions des cibles des miRNAs.

Tool ^a	Clades ^b	Criteria for Prediction and Ranking	Website URL
Site Conservation Considered			
TargetScan	m	Stringent seed pairing, site number, site type, site context (which includes factors that influence site accessibility); option of ranking by likelihood of preferential conservation rather than site context	http://targetscan.org
TargetScan	f,w	Stringent seed pairing, site number, site type	http://targetscan.org
EMBL	f	Stringent seed pairing, site number, overall predicted pairing stability	http://russell.embl-heidelberg.de
PicTar	m,f,w	Stringent seed pairing for at least one of the sites for the miRNA, site number, overall predicted pairing stability	http://pictar.mdc-berlin.de
EIMMo	m,f,w	Stringent seed pairing, site number, likelihood of preferential conservation	http://www.mirz.unibas.ch/EIMMo2
Miranda	m,f,w,+	Moderately stringent seed pairing, site number, pairing to most of the miRNA	http://www.microrna.org
miRBase Targets	m,f,w,+	Moderately stringent seed pairing, site number, overall pairing	http://microrna.sanger.ac.uk
PITA Top	m,f,w	Moderately stringent seed pairing, site number, overall predicted pairing stability, predicted site accessibility	http://genie.weizmann.ac.il/pubs/mir07/mir07_data.html
mirWIP	w	Moderately stringent seed pairing, site number, overall predicted pairing stability, predicted site accessibility	http://146.189.76.171/query
Site Conservation Not Considered			
TargetScan	m	Stringent seed pairing, site number, site type, site context (which includes factors that influence site accessibility)	http://targetscan.org
PITA All	m,f,w	Moderately stringent seed pairing, site number, overall predicted pairing stability, predicted site accessibility	http://genie.weizmann.ac.il/pubs/mir07/mir07_data.html
RNA22	m,f,w	Moderately stringent seed pairing, matches to sequence patterns generated from miRNA set, overall predicted pairing and predicted pairing stability	http://cbcsrv.watson.ibm.com/rna22.html

^aTools are listed according to criteria for prediction and ranking, which for those tools assessed with recent proteomics results generally correspond to their overall performance.

^bLetters indicate predictions provided for the mammalian/vertebrate (m), fly (f), worm (w), or additional (+) clades.

D'après (Bartel, 2009).

l'universalité du code génétique rend très difficile l'identification de sites cibles de miRNA dans ces séquences, la conservation de ce dernier étant « noyée » dans celle de l'ORF. Cette observation est d'autant plus vraie lorsqu'un nombre limité de génomes est disponible. Pour illustrer ce biais, des études ont montré que les miRNAs étaient également capables de réprimer la traduction de l'ARNm cible lorsque le site d'interaction est placé artificiellement dans les régions 5'UTR ou codantes (Lytle *et al.*, 2007).

Ainsi, ces outils bio-informatiques ont permis d'estimer à plus de 60%, le nombre de gènes humains ciblés par les miRNAs (Friedman *et al.*, 2009).

Cependant, les règles gérant les interactions miRNA-ARNm ne sont pas strictes et un nombre croissant d'exemples remettent en cause ces principes (pour revue : (Brodersen and Voinnet, 2009)). Par exemple, les 2 premiers miRNAs identifiés, lin-4 et let-7, présentent un *bulge* dans leur région graine et, pour lin-4, une faible complémentarité dans la région 3'. De même, de plus en plus de miRNAs sont décrits comme ciblant des sites présents dans les ORFs. Ainsi, les ARNm des facteurs de transcription Nanog, Oct4 et Sox2 sont ciblés par des miRNAs au niveau de leur séquence codante (Tay *et al.*, 2008).

A la différence des siRNAs et des miRNAs des plantes, la répression post-transcriptionnelle régie par les miRNAs chez les animaux n'implique pas le clivage de l'ARNm cible, même si le miRNA est incorporé dans un complexe RISC contenant une protéine Argonaute possédant une activité *slicer*, et même s'il présente une complémentarité parfaite avec sa cible. Sans induire leur clivage, les miRNAs seraient capables de réprimer la traduction des ARNm cibles et/ou induire leur dégradation. Plusieurs mécanismes de répression ont été proposés.

3.2 La répression de la traduction des ARNm cibles.

Chez les eucaryotes, la traduction est divisée en 3 étapes : l'initiation, l'élongation et la terminaison. Brièvement, l'initiation implique la reconnaissance de la coiffe à l'extrémité 5' de l'ARNm par des facteurs d'initiation de la traduction qui vont permettre le recrutement de la sous-unité 40S du ribosome. Cette sous-unité va balayer l'ARNm jusqu'au codon initiateur AUG, où la sous-unité 60S va être recrutée pour former le ribosome et ainsi, initier la traduction. Au codon stop, le ribosome se dissocie : c'est la terminaison. Les facteurs d'initiation sont capables d'interagir avec des protéines présentes au niveau de la queue poly(A) telles que la protéine PABP1 (*polyadenylate-binding protein*), induisant une « circularisation » de l'ARNm. Cette « circularisation » stimule l'initiation de la traduction en facilitant notamment le recyclage du ribosome. L'initiation est l'étape limitante de la

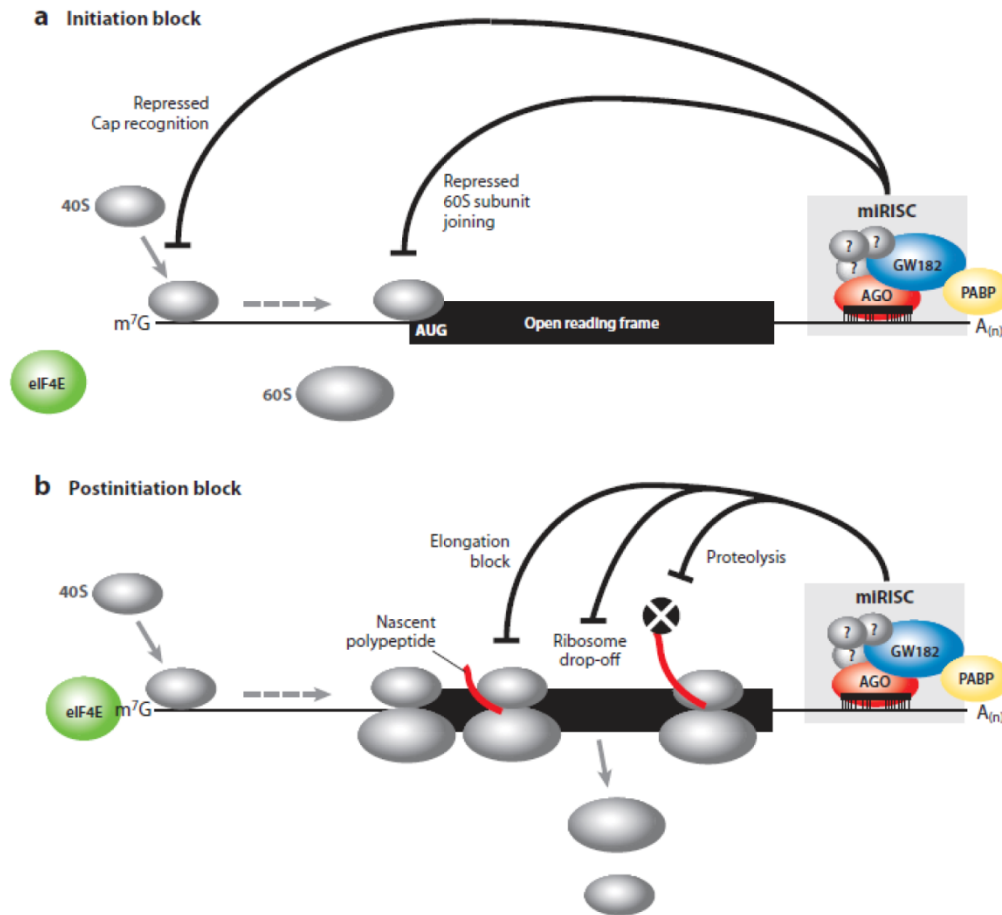


Figure 8 : Mécanismes possibles de la répression traductionnelle dirigée par les miRNAs.

(a) Blocage au niveau de l'initiation. Le complexe miRISC inhibe l'initiation de la traduction en bloquant la reconnaissance de la coiffe (m⁷G) par le facteur eIF4F et le recrutement de la sous unité 40S du ribosome, ou en empêchant la fixation de la sous unité 60S et la formation du complexe ribosomal 80S. L'interaction de la protéine GW182 avec la protéine PABP bloquerait la « circularisation » de l'ARNm dirigée par l'interaction du facteur eIF4G avec la protéine PABP, et contribuerait ainsi à la répression de l'initiation de la traduction.

(b) Blocage au niveau des étapes post-initiation. Le complexe miRISC inhiberait la traduction au niveau post-initiation en bloquant l'élongation, en provoquant le décrochage du ribosome ou en facilitant la dégradation du peptide néosynthétisé.

Les sous unités 40S et 60S du ribosome sont représentées par des sphères grises.

D'après (Fabian *et al.*, 2010).

traduction et est, par conséquent, la cible des mécanismes de régulation. Aussi, les miRNAs pourraient réprimer la traduction en affectant cette étape (Figure 8A) mais également les étapes post-initiation (Figure 8B).

3.2.1 La répression au niveau de l'initiation de la traduction.

Les données supportant l'hypothèse que les miRNAs inhibent la traduction en ciblant l'initiation proviennent de travaux réalisés sur des cultures de cellules mammifères et utilisant des gènes rapporteurs ou des ARNm endogènes. Des analyses de profil de polysomes réalisées en gradient de sucrose ont montré que l'ARNm d'un gène rapporteur ciblé de manière artificielle par let-7 présentait un décalage vers les bas poids moléculaires en présence de let-7, traduisant un effet inhibiteur sur l'initiation de la traduction (Pillai *et al.*, 2005). Ces résultats furent ultérieurement confirmés sur un ARNm endogène, CAT-1 (*Cationic amino acid transporter 1*), qui est régulé par miR-122, un miRNA spécifique du foie (Bhattacharyya *et al.*, 2006).

Un argument supplémentaire en faveur de cette hypothèse concerne l'implication de la coiffe dans la répression réalisée par les miRNAs. En effet, la traduction indépendante de la coiffe d'ARNm rapporteur contenant un site d'entrée interne du ribosome (IRES : *Internal Ribosome Entry Site*) n'est pas inhibée en présence de miRNAs (Humphreys *et al.*, 2005; Pillai *et al.*, 2005).

Cependant, d'autres études ont montré que cette répression avait lieu à d'autres étapes de la traduction.

3.2.2 La répression au niveau des étapes post-initiation de la traduction.

Des travaux contradictoires, utilisant également la technique du gradient de sucrose, ont montré que cette répression avait lieu plutôt aux étapes post-initiation. Ainsi, chez *C. elegans*, le profil en gradient de sucrose de l'ARNm lin-14 ne change pas en présence du miRNA lin-4, suggérant que le ribosome est chargé sur l'ARNm (Olsen and Ambros, 1999; Seggerson *et al.*, 2002). Des résultats similaires furent observés dans des cellules mammifères exprimant un ARNm rapporteur et un miRNA le ciblant (Petersen *et al.*, 2006). De même, les traductions dépendantes de la coiffe et de l'IRES de cistrons présents dans un rapporteur bicistronique sont toutes les 2 réprimées par un miRNA synthétique. Ces observations sont cohérentes avec une répression ayant lieu à une étape post-initiation.

On peut donc conclure qu'au vu de ces données contradictoires, les mécanismes de répression de la traduction par les miRNAs sont encore très flous. Devant la complexité de la voie des miRNAs, on peut émettre l'hypothèse que cette répression ne dépend pas d'un seul mécanisme général mais de nombreux mécanismes variables en fonction de l'ARNm cible, du miRNA et de leur régulation respective. Pour illustrer cette hypothèse, d'autres mécanismes ont été évoqués dans la répression de la traduction dépendante des miRNAs, tels qu'une dégradation du peptide naissant (Nottrott *et al.*, 2006) ou un ralentissement de la vitesse d'élongation (Figure 8B, p23) (Maroney *et al.*, 2006). Cependant, ces hypothèses demandent à être validées, car peu de données les concernant sont disponibles (Filipowicz *et al.*, 2008).

4. Le devenir du complexe ARNm-miRISC.

Une fois le complexe miRISC fixé à l'ARNm cible et la traduction de ce dernier inhibée, cet ARNm réprimé va subir une relocalisation cytoplasmique qui peut être associée à sa dégradation :

4.1 La relocalisation du complexe ARNm-miRISC.

Chez les eucaryotes, les ARNm qui ne sont pas traduits forment des complexes ribonucléoprotéiques (mRNP) qui s'accumulent dans le cytoplasme des cellules au niveau de foyers distincts, nommés les corps P (*P-bodies*) ou corps GW (*GW-bodies*) (Eulalio *et al.*, 2007). Ces corps P sont enrichis en facteurs impliqués dans la répression traductionnelle et dans la dégradation des ARNm. Ils ne contiennent pas de ribosomes et de facteurs d'initiation de la traduction (à l'exception d'eIF4E). De même, un autre type d'agrégats cytoplasmiques, les granules de stress (SGs), contenant les ARNm réprimés, se forment en réponse à divers stress ou à la suite d'une répression générale de la traduction. Il fut donc supposé que l'ARNm réprimé par un complexe miRISC pourrait se relocaliser au niveau de ces structures. Des expériences d'immunofluorescence et d'immunoprécipitation ont montré que les composants du complexe ARNm-miRISC, incluant les protéines AGO, les miRNAs et les ARNm réprimés, co-localisaient et interagissaient avec les composants des corps P, démontrant ainsi l'implication des corps P dans la voie des miRNAs et dans le devenir des ARNm réprimés (Jakymiw *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2005; Pillai *et al.*, 2005; Behm-Ansmant *et al.*, 2006; Bhattacharyya *et al.*, 2006; Leung *et al.*, 2006). Le rôle des corps P dans la répression des ARNm régie par les miRNAs fut confirmé par des travaux montrant que la délétion de certains de leurs constituants tels que le complexe Dcp1:Dcp2, Rck/p54 ou

la protéine de 182 kDa contenant des répétitions de motifs GW (GW182) abolissaient la répression d'un ARNm induite par un miRNA (Liu *et al.*, 2005; Rehwinkel *et al.*, 2005; Behm-Ansmant *et al.*, 2006; Chu and Rana, 2006). Il semblerait que la formation des corps P soit une conséquence, plutôt qu'une cause, de la répression d'un ARNm par un miRNA (Pauley *et al.*, 2006).

Cependant, la séquestration dans les corps P des ARNm réprimés est un phénomène réversible. De plus en plus d'exemples illustrent ce phénomène de réversibilité. Ainsi, dans des cellules d'hépatocarcinome humain, la traduction de l'ARNm CAT-1 est réprimée par miR-122 et cet ARNm s'accumule dans les corps P. Cependant, dans certaines conditions de stress, cet ARNm est relargué des corps P et recruté au niveau des polysomes afin d'y être traduit (Bhattacharyya *et al.*, 2006). Cette dérégulation requiert la fixation au niveau du 3'UTR de l'ARNm CAT-1 de la protéine HuR, une protéine de la famille « *AU-rich-element-binding embryonic lethal abnormal vision* (ELAV) ». Le mécanisme de cette dérégulation est actuellement inconnu. De même, APOBEC3G (*apolipoprotein B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide-like 3G*) contrecarre l'action de certains miRNAs, probablement en altérant la distribution des ARNm ciblés entre les corps P et les polysomes (Huang *et al.*, 2007).

L'implication des corps P dans la répression et le stockage des ARNm par les miRNAs est un argument supplémentaire en faveur d'une inhibition de la traduction au niveau de l'initiation, le corps P étant dépourvu de ribosomes.

Par ailleurs, les corps P sont enrichis en facteurs impliqués dans la dégradation des ARNm. Les ARNm présents dans ces corps P sont donc souvent dégradés.

4.1.1 La dégradation des ARNm inhibés par les miRNAs.

La répression des ARNm par les miRNAs est souvent accompagnée de leur dégradation. Les premières observations de ce phénomène proviennent de travaux par *microarray*, qui montrèrent que l'introduction d'un miRNA exogène dans une cellule conduisait à la diminution d'un grand nombre d'ARNm (Lim *et al.*, 2005). L'implication des corps P dans la voie des miRNAs permet de mieux comprendre ce phénomène. En effet, l'ensemble des facteurs nécessaires à la dégradation des ARNm, tels que des déadenylases, des enzymes de décoiffage et des 5'→3' exonucléases, se localisent dans les corps P. La première étape de cette dégradation est l'élimination de la queue poly(A) de l'ARNm réprimé. La protéine GW182 joue un rôle clé dans cette étape (Behm-Ansmant *et al.*, 2006). Ainsi, GW182 interagit avec la protéine AGO présente dans le complexe miRISC et permet le

recrutement d'une déadénylase qui va enlever la queue poly(A) de l'ARNm. Cette étape est suivie par l'élimination de la coiffe par les enzymes Dcp1:Dcp2 puis par la dégradation 5'→3' de l'ARNm par l'enzyme Xrn1 (Bagga *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2005; Rehwinkel *et al.*, 2005; Behm-Ansmant *et al.*, 2006) .

Cependant, si on considère que le niveau de traduction d'un ARNm peut directement affecter sa stabilité, il est possible que la dégradation de l'ARNm cible soit une conséquence de l'inhibition de sa traduction, plutôt qu'un effet direct du miRNA.

4.2 Les fonctions alternatives des miRNAs.

En plus de leur rôle de régulateur négatif de l'expression des gènes, plusieurs autres fonctions ont été attribuées à des miRNAs chez les animaux. Ainsi, des miRNAs pourraient activer la traduction de certains ARNm dans des conditions particulières. Par exemple, miR-10a est capable d'activer la traduction de protéines ribosomiques, lors de carence nutritive, en se fixant au niveau des régions 5'UTR des ARNm cibles (Orom *et al.*, 2008). De même, il a été suggéré une réversibilité d'action des miRNAs dans la régulation de la traduction des ARNm en fonction du cycle cellulaire (Vasudevan *et al.*, 2007). En effet, certains miRNAs seraient capables d'activer la traduction des ARNm cibles au cours de l'arrêt du cycle cellulaire et de la réprimer dans des cellules en prolifération.

Par ailleurs, certains miRNAs sont capables d'activer la transcription de certains gènes. MiR-373 est capable d'activer la transcription du gène codant l'E-cadhérine en se fixant à une séquence présente dans le promoteur de ce gène (Place *et al.*, 2008).

Enfin, des travaux récents ont démontré que miR-328 possédait une seconde fonction, en plus de son activité inhibitrice de la traduction (Eiring *et al.*, 2010). En se fixant à la protéine de liaison à l'ARN, hnRNP E2 (*heterogeneous nuclear RNP E2*), ce miRNA agit comme un « leurre » et bloque l'action de cette protéine. HnRNP E2 se fixe à la région 5'UTR de l'ARNm codant le facteur de transcription *C/EBPα* et inhibe sa traduction.

On peut donc conclure que la fonction des miRNAs dans la physiologie cellulaire serait beaucoup plus complexe que le simple rôle d'inhibiteur de l'expression des gènes.

5. La régulation des miRNAs.

Comme nous venons de le voir, la biogénèse des miRNAs est un processus complexe faisant intervenir d'innombrables acteurs. De plus, les miRNAs sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques tels que l'immunité, le développement, la prolifération

etc. De nombreux miRNAs présentent une expression tissulaire ou embryonnaire spécifique (Landgraf *et al.*, 2007). De par leur fonction de régulateur post-transcriptionnel de l'expression des gènes, la biogénèse et la fonction des miRNAs doivent être soumises, par conséquent, à une régulation fine et complexe afin de maintenir l'homéostasie de la cellule. Cette régulation pourra être générale ou spécifique de certains miRNAs. L'altération de ces régulations conduit inévitablement à l'apparition de pathologies, notamment les cancers.

Ainsi, on distingue 2 grands types de régulations : une régulation de la biogénèse des miRNAs, qui peut avoir lieu à un niveau transcriptionnel ou post-transcriptionnel, et une régulation de l'activité des miRNAs.

5.1 La régulation de la biogénèse des miRNAs.

5.1.1 La régulation transcriptionnelle.

La transcription est l'étape majeure de régulation dans la biogénèse des miRNAs. Une étude récente à large échelle a permis de caractériser les promoteurs de 175 miRNAs (Ozsolak *et al.*, 2008). Les résultats de cette étude suggèrent que la structure des promoteurs des miRNAs, notamment le pourcentage de GC, la présence de boîte TATA ou les modifications des histones est identique à celle des gènes codant les protéines. De la même manière que pour les protéines, de nombreux facteurs de transcription sont impliqués dans le contrôle transcriptionnel des gènes codant les miRNAs, assurant ainsi un contrôle spatio-temporel de l'expression de certains miRNAs. Ainsi, par exemple, les facteurs de transcription myogenin et MYOD1 (*Myoblast determination 1*) contrôlent l'expression au niveau des muscles des miRNAs, miR-1 et miR-133. Les analyses à large échelle, utilisant notamment la technique de Chip-Seq qui allie immunoprécipitation de la chromatine et séquençage à haut débit, ont permis d'identifier le répertoire de miRNAs régulés par certains facteurs de transcription, notamment les facteurs caractéristiques des cellules souches embryonnaires, Oct-4, Sox-2 et Nanog (Marson *et al.*, 2008). Mais ces études ont surtout permis de montrer que les miRNAs font partie de boucles de régulation positive ou négative, impliquées dans de nombreux processus tels que l'embryogénèse, la différenciation, la prolifération et l'immunité (pour revue : (Davis and Hata, 2009; Inui *et al.*, 2010)).

Par ailleurs, la régulation transcriptionnelle des gènes codant les miRNAs est étroitement liée à une régulation épigénétique, notamment au cours du développement. Ainsi, Marson *et al.* ont montré que la différenciation des cellules souches embryonnaires était accompagnée d'un remodelage épigénétique de la chromatine, notamment des modifications

Tableau 2 : Les régulateurs post-transcriptionnels de la biogénèse des miRNAs chez les animaux.

Protein	Motifs	Known Activity	Mechanisms	Target miRNA
ADARs	dsRBD	A-I RNA editing	Inhibition of Drosha and Dicer processing	A subset
p68/p72	DEAD-box	Components of Microprocessor	Promoting Drosha cleavage	A subset
p53	DNA binding	Tumor suppressor	Binding to p68 and Promoting Drosha cleavage	miR-16-1, miR-143
SMADs	DNA binding	Signal transducers of TGF β	Binding to p68 and Promoting Drosha cleavage	miR-21, miR-199a
ER α	DNA binding	Nuclear estrogen receptor	Binding to p68/p72 and inhibiting Drosha cleavage	A subset
hnRNP A1	RRM, M9	Pre-mRNA splicing	Chaperone for Drosha/DGCR8 binding	miR-18a
KSRP	KH	mRNA decay	Promoting Drosha and Dicer processing	A subset
ARS2	Plant SERRATE homolog	Nuclear Cap-binding	Enhancing Drosha processing	Global
DGCR8	dsRBD	Binding to Drosha	Stabilizing Drosha	Global
Exportin-5	RanBP	Binding to tRNAs and pre-miRNAs	Nuclear transport of pre-miRNA	Global
LIN-28	CCHC-type zinc finger	Promoting pluripotency	Inhibition of Drosha and Dicer processing, and Recruiting TUT4	let-7
TUT4	Poly(A) polymerase, CCHC-type zinc finger	Terminal uridylation	Binding to LIN-28 and inhibiting Dicer processing	let-7
TRBP	dsRBD	Binding to Dicer, MKK phosphorylation site	Stabilizing Dicer	Global
XRN-2	5' to 3' exoribonuclease	exoribonuclease	Degrading miRNA	Global
GLD2	Poly(A) polymerase	Terminal adenylation	Stabilizing miRNA	miR-122
mLin41	TRIM-NHL (RING finger)	Ubiquitinylation	Binding to Ago2 and targeting it for degradation	Let-7 and others in ES cells
TRIM32	TRIM-NHL (RING finger)	ubiquitinylation	Binding to miRISC and enhancing miRNA activity	A subset
NHL-2	TRIM-NHL (RING finger)	ubiquitinylation	Binding to miRISC and enhancing miRNA activity	A subset
Mei-P26	TRIM-NHL (RING finger)	ubiquitinylation	Binding to miRISC and inhibiting miRNA activity	A subset
Argonautes	PAZ, PIWI	Components of RISC	Stabilizing associated miRNAs	Global

ADARs, adenosine deaminase acting on RNA enzymes; dsRBD, double-stranded RNA-binding domain; DGCR8, DiGeorge syndrome critical region gene 8; TGF β , transforming growth factor b; ER α , estrogen receptor a; hnRNP A1, heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1; RRM, RNA recognition motifs; M9, nucleocytoplasmic shuttling signal sequence; KSRP, KH-type splicing regulatory protein; KH, hnRNP K homology domains; RanBP, ran-binding protein; ARS2, arsenic resistance protein 2; TUT4, terminal uridylyl transferase 4; TRIM-NHL, tripartite motif (consisting zinc fingers of both RING type and B Box type and a coiled-coil domain)-NHL repeats.

D'après (Siomi and Siomi, 2010).

des histones, au niveau de promoteurs de certains miRNAs impliqués dans l'auto-renouvellement des cellules souches (Marson *et al.*, 2008). Ces remodelages épigénétiques sont souvent observés au cours des cancers et conduisent à l'expression de miRNAs oncogéniques ou à la répression de miRNAs suppresseurs de tumeur.

5.1.2 La régulation post-transcriptionnelle.

La maturation des miRNAs comporte de nombreuses étapes qui sont autant de cibles de régulation (Siomi and Siomi, 2010). Comme la transcription, cette régulation peut être générale ou spécifique de certains miRNAs. Le rôle de cette régulation post-transcriptionnelle dans la biogénèse des miRNAs fut mis en évidence au cours de l'embryogénèse (Thomson *et al.*, 2006). Pendant le développement précoce, de nombreux pri-miRNAs sont exprimés, mais ne sont pas maturés en miRNAs matures.

Dans la majorité des cas, cette régulation implique des régulateurs post-transcriptionnels (Tableau 2). Ces régulateurs agissent principalement selon 2 mécanismes :

- soit en interagissant et modulant l'activité des enzymes Drosha et Dicer. Par exemple, les RNA hélicases p68 et p72 interagissent avec Drosha, facilitant ainsi le clivage d'un certain nombre de pri-miRNAs (Fukuda *et al.*, 2007). De même, en cas de dommages à l'ADN, la protéine p53 interagit avec Drosha et p68, augmentant ainsi la maturation d'un certain nombre de miRNAs, tels que miR-16-1 et miR-143 (Suzuki *et al.*, 2009).

- soit en agissant au niveau des précurseurs, pri-miRNA ou pre-miRNA. Plusieurs exemples d'enzymes capables de modifier les pri-miRNAs ont été décrits. Certains pri-miRNAs sont édités par l'enzyme ADAR (*Adenosine deaminase acting on RNA*), ce qui inhibe leur maturation par Drosha et peut conduire à leur dégradation (Yang *et al.*, 2006). De même, TUT4 (*Terminal uridylyl transferase 4*) est capable d'inhiber la maturation du pre-let-7 (Heo *et al.*, 2009). Cette enzyme ajoute une queue poly(U) au pre-let-7, inhibant par conséquent le clivage par Dicer. De plus, cette queue poly(U) constitue un signal de dégradation du pre-miRNA par les 3'→5' exonucléases. Enfin, hnRNP A1 est capable d'interagir spécifiquement avec le pri-miR-18a, induisant un réarrangement structural de ce pri-miRNA et facilitant ainsi son clivage par le complexe Drosha/DGCR8 (Guil and Caceres, 2007).

Outre ces régulateurs post-transcriptionnels, qui sont en général impliqués dans la régulation d'un nombre limité de miRNAs, la voie des miRNAs est capable de s'autoréguler à

travers un double rétrocontrôle négatif, agissant sur Drosha et DGCR8 (Han *et al.*, 2009). DGCR8 stabilise Drosha via une interaction directe. Dès lors, Drosha peut cliver, dans la région 5'UTR et dans la séquence codante de l'ARNm DGCR8, 2 tiges boucles qui se structurent d'une manière semblable à un pri-miRNA. Ce clivage entraîne la dégradation de l'ARNm DGCR8, et par conséquent, la diminution de DGCR8, provoquant une déstabilisation de Drosha. La cellule serait donc capable, en fonction des conditions, de contrôler la biogénèse des miRNAs en régulant l'activité du MiPC.

D'autre part, bien que peu d'exemples soient disponibles actuellement, l'activité de Dicer pourrait être régulée également. Ainsi, Lee *et al.* ont montré que Dicer pouvait être régulée de manière indirecte par séquestration des pre-miRNAs dans le noyau des cellules (Lee *et al.*, 2008). De même, l'activation de cascades de signalisation pourrait avoir un impact sur la voie des miRNAs. Ainsi, l'activation de la voie des MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) et Erk (*extracellular signal-regulated kinase*) conduit à la phosphorylation de TRBP et augmente la biogénèse des miRNAs en stabilisant le complexe Dicer-TRBP (Paroo *et al.*, 2009).

Enfin, on peut aussi imaginer que les ARNm de Dicer et Drosha soient ciblés par des miRNAs. Une étude bio-informatique a ainsi identifié 3 sites potentiels d'interaction avec let-7 dans la partie codante de l'ARNm Dicer (Forman *et al.*, 2008). Une expérience *in vitro* montra que l'ARNm Dicer pouvait être ciblé effectivement par let-7, établissant ainsi une boucle de rétrocontrôle négative entre Dicer et son produit, let-7. De même, une étude récente montre que l'expression de Dicer est régulée par la famille des miR-103/107. Cette répression serait impliquée dans la migration des cellules cancéreuses en réprimant des miRNAs ayant un rôle dans la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) (Martello *et al.*, 2010).

5.2 La régulation de l'activité des miRNAs.

Le dernier niveau de régulation concerne les miRNAs matures qui peuvent être affectés dans leur activité ou leur stabilité. Ce champ est encore faiblement exploré et peu d'exemples ont été décrits dans la littérature. Par exemple, dans les cellules mammifères de foie, la polymérase poly(A) GLD2 (ou TUTase2) est capable de monoadényler et, par conséquent, stabiliser le miR-122 (Katoh *et al.*, 2009). Cet ajout d'adénine est retrouvé sur de nombreux miRNAs (Landgraf *et al.*, 2007; Azuma-Mukai *et al.*, 2008). Ainsi, malgré leur petite taille, certains miRNAs contiennent des séquences « signal » qui contrôlent leur devenir, certainement par l'intermédiaire d'acteurs protéiques capables de reconnaître ces séquences. De même, il a été montré chez les plantes et *C. elegans* que certaines exoribonucléases étaient

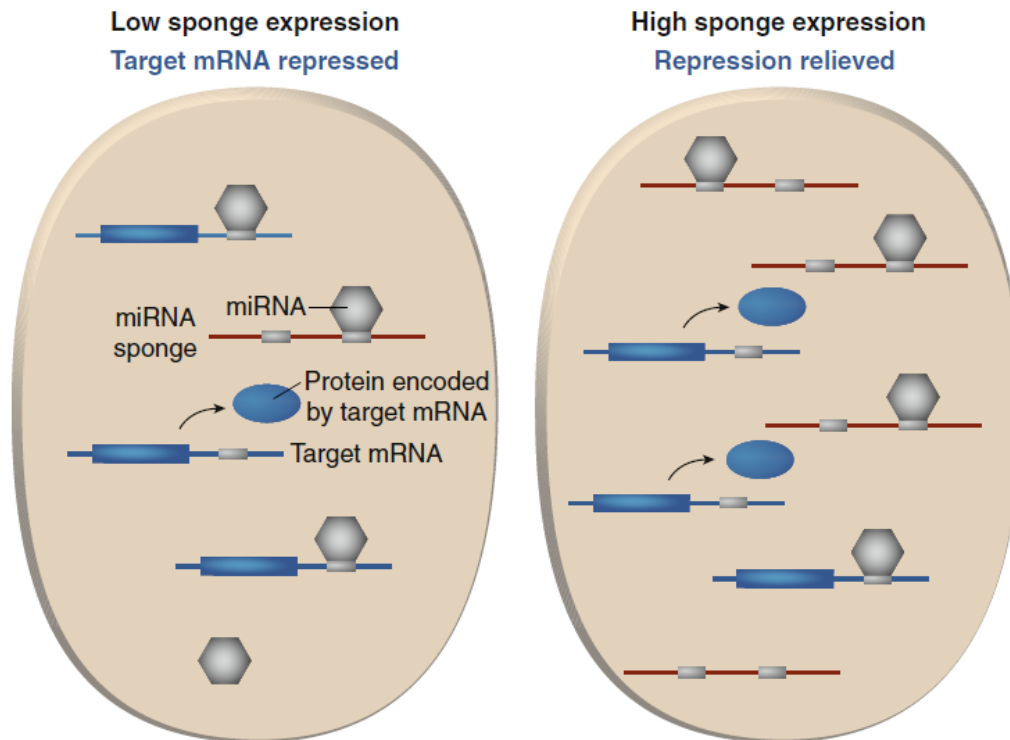


Figure 9 : Mécanisme d'action des « éponges » à miRNAs.

Les ARNs « éponges » (rouge), contenant des sites de fixation des miRNAs, entrent en compétition avec les ARNm cibles (bleu) de ces miRNAs (hexagone gris). Lorsque l'éponge est faiblement exprimée (situation de gauche), la traduction de l'ARNm cible est réprimée par le miRNA. Lorsque l'éponge est fortement exprimée (situation de droite), le miRNA est séquestré et l'ARNm cible peut être alors traduit.

D'après (Ebert and Sharp, 2010).

capables de dégrader les miRNAs matures (Ramachandran and Chen, 2008; Chatterjee and Grosshans, 2009).

Par ailleurs, la stabilité et l'activité des miRNAs sont également régulées par l'intermédiaire des protéines Argonaute. En effet, chez les mammifères, l'augmentation du taux de protéines AGO est corrélée avec une augmentation du niveau de miRNAs matures (Diederichs *et al.*, 2008). Ainsi, la régulation du niveau des protéines AGO dans les cellules participe au turn-over des miRNAs. Plusieurs facteurs régulent la stabilité des protéines AGO. Ainsi, AGO2 peut être stabilisée par hydroxylation par l'enzyme C-P4H(I) (*type I collagen prolyl-4-hydroxylase*) (Qi *et al.*, 2008). Cette enzyme est activée à la suite de divers stimuli, tels que l'hypoxie et le TGF- β , eux-mêmes capables d'induire de nombreux miRNAs. Par ailleurs, AGO2 peut être dégradée par la voie du protéasome après ubiquitinylation par une E3 ubiquitin ligase (Rybak *et al.*, 2009). Par ailleurs, un autre niveau de régulation consiste à moduler le chargement du miRNA dans le complexe RISC. Cette régulation est réalisée notamment par des protéines de la famille TRIM, qui sont capables d'interagir avec les composants du complexe miRISC, dont les protéines AGO (Neumuller *et al.*, 2008; Hammell *et al.*, 2009; Schwamborn *et al.*, 2009). Enfin, la formation et le turn-over des complexes miRISC sont connectés au compartiment des endolysosomes (Lee *et al.*, 2009; Gibbins and Voinnet, 2010). Ainsi, les facteurs requis pour la formation des endosomes régulent également le chargement des miRNAs dans le complexe RISC.

L'accessibilité des sites ciblés par les miRNAs pourrait constituer un autre niveau de régulation de l'activité des miRNAs. En effet, des travaux récents ont montré que des protéines de liaison à l'ARN étaient capables d'interagir avec les régions 3'UTR de certains ARNm et moduler ainsi l'accessibilité des sites cibles. Ainsi, la protéine *Dead end 1* (Dnd1) est capable de se fixer au niveau de la région 3'UTR de certains ARNm, et empêche ainsi la fixation des miRNAs et la répression de la traduction de cet ARNm (Kedde *et al.*, 2007). De même, le facteur ubiquitaire PUM1 (*Pumilio-1*) interagit avec la région 3'UTR de l'ARNm p27. Cette interaction induit un changement local dans la structure de cette région, libérant les sites de fixation des miR-221&222, et favorise ainsi la répression traductionnelle de cet ARNm (Kedde *et al.*, 2010).

Enfin, un ultime niveau de régulation de l'activité des miRNAs a été découvert récemment : les « éponges » à miRNAs (pour revue : (Ebert and Sharp, 2010)). Ces « éponges » sont en général de long ARNnc contenant des sites d'interaction avec des miRNAs et vont agir en inhibiteur compétitif (Figure 9). D'abord développées *in vitro* afin de bloquer l'action de certains miRNAs, plusieurs travaux ont décrit des « éponges » de miRNAs

chez divers organismes notamment les plantes, les mammifères ou les virus. Par exemple, le long ARNnc HULC (*Highly up-regulated in liver cancer*) interagit avec miR-372 dans des cellules d'hépatocarcinome et l'empêche de réprimer la traduction de son ARNm cible PRKACB (*cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit beta*) (Wang *et al.*, 2010) . La demi-vie d'un miRNA étant relativement longue, réguler le niveau d'expression de ces « éponges » permettrait à une cellule de contrôler rapidement l'activité d'un miRNA.

Pour conclure, la découverte des miRNAs a constitué une révolution dans l'étude de la régulation de l'expression des gènes, complexifiant le dogme de la biologie moléculaire. Le rôle essentiel des miRNAs dans cette régulation, ainsi que leur implication dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques sont maintenant clairement démontrés. Cependant, leurs mécanismes d'action et de régulation sont encore peu connus.

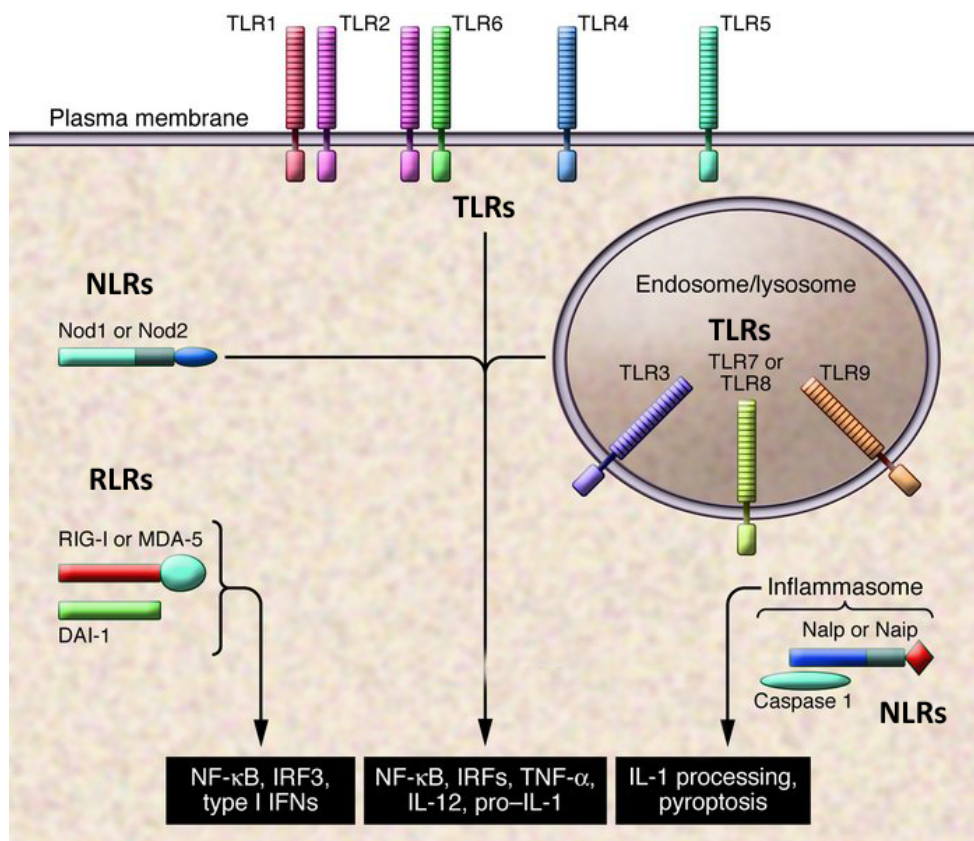


Figure 10 : Les PRRs dans l'immunité innée des animaux.

La fixation d'un PAMP sur un PRR induit une cascade de signalisation qui aboutit à l'activation de gènes pro-inflammatoires.

PRRs, *pattern recognition receptors* ; NLRs, *Nod-like receptors* ; TLRs, *Toll-like receptors* ; RLRs, *RIG-I like receptors*.

Adaptée de (Barton, 2008).

Chapitre II : Le rôle des miRNAs dans les interactions hôte-pathogènes.

1. Introduction.

La rapidité de réponse d'un organisme à une infection est primordiale pour sa survie. C'est pour cela, qu'au cours de l'évolution, les organismes ont développé tout un arsenal de mécanismes afin de détecter et contrer l'invasion et la multiplication des pathogènes. L'immunité innée joue un rôle essentiel dans la détection des pathogènes et la mise en place de la réponse de l'hôte face à un pathogène. Elle représente un mécanisme de défense très ancien, conservé chez la plupart des organismes multi-cellulaires. Elle met en jeu des familles de récepteurs, les « *pattern recognition receptors* » (PRRs), qui permettent la détection des composants d'origine microbienne, les « *pathogen-associated molecular patterns* » (PAMPs), tels que les glycanes, les acides nucléiques, ou les lipides. Les familles de PRRs les plus étudiées comportent les *Toll-like receptors* (TLRs) et les *Nucleotide-binding domain, Leucine-Rich repeat containing receptors* ou *NOD-like receptors* (NLRs), qui contient notamment la famille *Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein* (NOD) et les *RIG-I like receptors* (RLRs). Ces récepteurs sont localisés dans divers compartiments de la cellule tels que les membranes plasmique et endosomale et le cytoplasme. La reconnaissance d'un PAMP par son PRR va déclencher une cascade de signalisation, qui va aboutir à l'activation d'un certain nombre de gènes, notamment pro-inflammatoires chez les mammifères, et entraîner, en dernier recours, l'apoptose de la cellule touchée (Figure 10).

Cependant, la découverte du *RNA silencing* et de l'implication des siRNAs puis des miRNAs dans la défense des cellules contre les pathogènes a ouvert un nouveau champ d'étude pour l'immunité innée. En 1998, l'équipe d'A. Fire et C. Mello montra que l'introduction d'un ARNdb exogène dans le ver *C. elegans* induisait un mécanisme de dégradation séquence-spécifique des ARNm cellulaires présentant une homologie de séquence avec l'ARNdb introduit (Fire *et al.*, 1998). Les ARNdb étant souvent observés au cours des infections virales comme formes intermédiaires répliquatives, il fut suggéré que ce mécanisme, nommé l'ARN interférence (RNAi), pourrait être un mécanisme de défense antivirale. Ces travaux furent récompensés par le Prix Nobel de médecine en 2006 (<http://nobelprize.org>). Les travaux ultérieurs démontrèrent que ce mécanisme était effectivement essentiel pour la défense des cellules contre les pathogènes et conservé chez de nombreux organismes eucaryotes. De même, il a été montré récemment que les bactéries et les archaea possèdent également un système de défense antivirale basé sur l'ARN, et

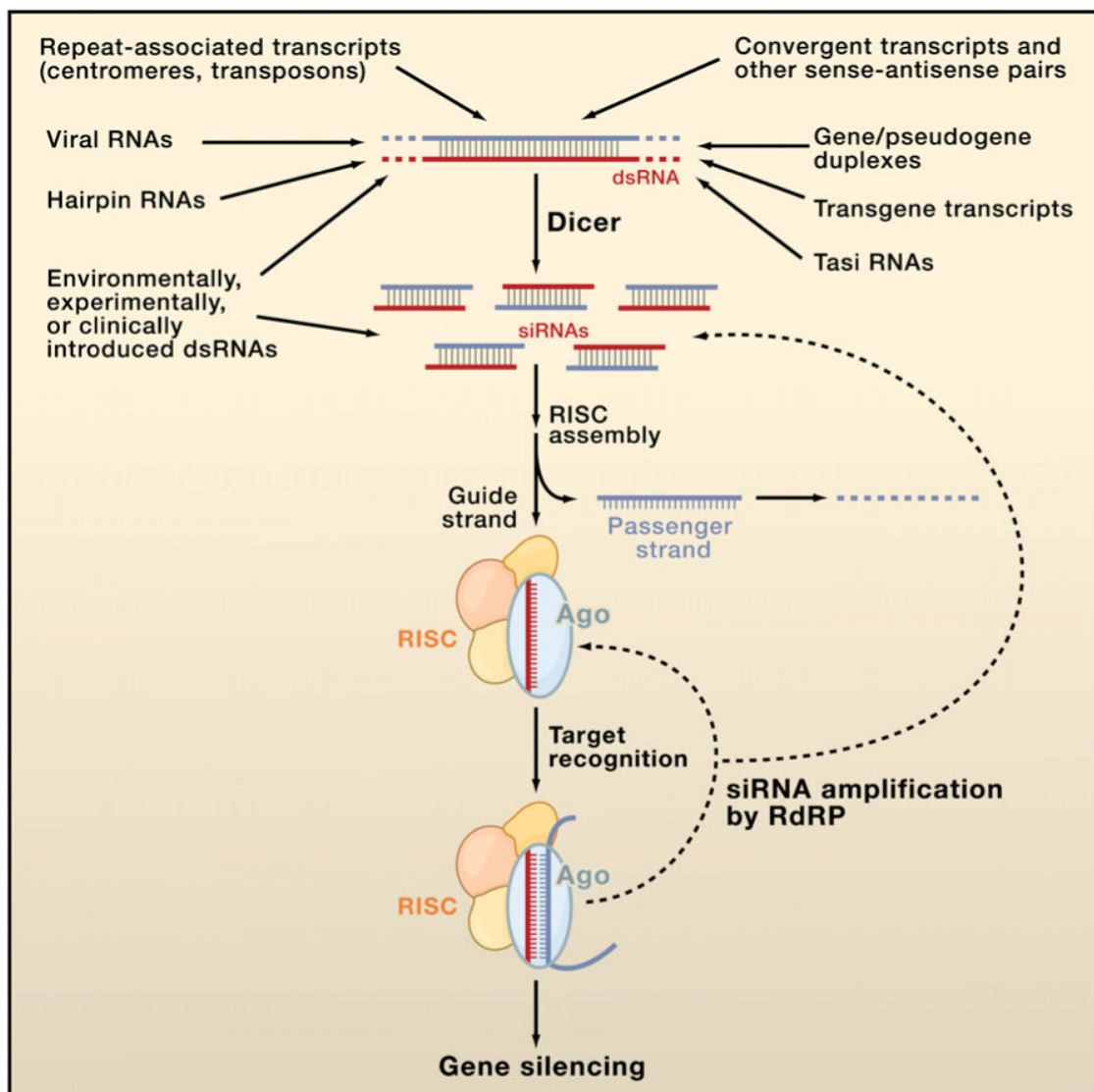


Figure 11 : Diversité des sources de siRNAs.

Plusieurs catégories de transcrits peuvent adopter des structures en ARNdb qui peuvent être clivées par Dicer en siRNAs. Ces structures ARNdb peuvent être intra ou intermoléculaires. Les duplex de siRNAs sont constitués d'un brin guide (rouge) et d'un brin passager (bleu). Le brin guide est incorporé dans le complexe RISC, alors que l'autre brin est éliminé. Le complexe siRISC reconnaît l'ARNm ciblé, via l'appariement du siRNA, et induit sa dégradation. Chez les plantes et *C. elegans*, les siRNAs peuvent être amplifiés par l'action d'ARN polymérase ARN dépendante (RdRP), augmentant l'intensité et la durée de la répression.

D'après (Carthew and Sontheimer, 2009).

rappelant le *RNA silencing*, le système CRISPR (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats*) (pour revue : (Horvath and Barrangou, 2010)).

1.1 La biogénèse des siRNAs.

A la différence des miRNAs, la biogénèse des siRNAs se déroule exclusivement dans le cytoplasme des cellules. La source des siRNAs est en général toujours la même : un long ARNdb linéaire, parfaitement complémentaire. L'origine de cet ARNdb est diverse, mais principalement exogène, notamment virale (Figure 11). Cet ARNdb est alors clivé par Dicer en un duplex de siRNAs. Ce duplex est parfaitement complémentaire et présente des extrémités 3' flanquantes. De la même manière que pour les miRNAs, le complexe RLC, composé de Dicer, TRBP et AGO2, sélectionne le brin guide présentant l'extrémité 3' la moins stable pour former le complexe siRISC. Ce brin dirige le complexe siRISC sur l'ARNm cible. A la différence des miRNAs, le siRNA s'apparie parfaitement à l'ARNm cible. Ce dernier est alors clivé par le domaine PIWI d'AGO2. L'activité *slicer* est très précise : l'ARNm est clivé entre les nucléotides appariés aux nucléotides 10 et 11 du siRNA, générant une extrémité 5'-phosphate (5'P) et 3' hydroxyle (3'OH). Par la suite, des exonucléases cytoplasmiques finissent de dégrader l'ARNm. Le complexe siRISC peut être alors recyclé vers une nouvelle cible. De la même manière que les miRNAs, la fixation du siRNA à sa cible induit une relocalisation de l'ARNm dans les corps P, où il va pouvoir être dégradé (pour revue : (Carthew and Sontheimer, 2009)).

1.2 L'ARN interférence dans la défense antivirale.

Le rôle antiviral de l'ARN interférence fut d'abord démontré dans le règne végétal (Hamilton and Baulcombe, 1999). Bien que l'implication du RNAi dans la défense contre les pathogènes ait été découverte récemment, les premières descriptions de ce phénomène, sans en connaître le mécanisme, ont été décrites dès 1928 chez le plant de tabac infecté par le « *tobacco ringspots virus* » (Baulcombe, 2004). Au début des années 90, des travaux de transgénèse chez le pétunia mirent en évidence le phénomène de « co-suppression » ou « *post-transcriptional gene silencing* » (PTGS) : l'introduction d'une copie supplémentaire d'un gène dans les cellules entraînait un phénotype inverse à celui désiré, à savoir l'extinction de l'expression du gène endogène (Napoli *et al.*, 1990; van der Krol *et al.*, 1990). Les ARNm du transgène et du gène endogène correspondant étaient réprimés au niveau post-transcriptionnel. Le même processus, nommé « quelling », fut également rapporté quelques années plus tard

chez le champignon *Neurospora crassa* (Cogoni *et al.*, 1996). Les premiers indices suggérant l'implication du PTGS dans la défense contre les pathogènes provinrent d'études sur la « résistance dérivée des pathogènes » (*pathogen-derived resistance* : PDR). Ce mécanisme consistait à exprimer dans des plantes transgéniques des formes dominantes négatives de protéines virales, notamment les réplicases. Ces plantes transgéniques devenaient résistantes aux infections par les virus qui présentaient une homologie de séquences avec la souche dont était extrait le transgène. Cette résistance s'accompagnait d'une forte diminution de l'ARNm du transgène, suggérant ainsi un mécanisme PTGS (pour revue : (Lecellier and Voinnet, 2004)). De même, des virus recombinants étaient capables d'éteindre des ARNm endogènes de plantes non transgéniques. Ce mécanisme fut nommé « *Virus-induced gene silencing* » (VIGS). Mais, la preuve définitive que les virus déclenchent une réponse PTGS dans les cellules de plantes infectées fut apportée par la démonstration que des siRNAs spécifiques des virus (*viral-derived siRNAs* : viRNA) s'accumulaient dans les cellules infectées (Hamilton and Baulcombe, 1999). Ces viRNAs, décrits à l'époque comme de « petits ARNs antisens dérivés de virus » furent découverts avant que les siRNAs ne soient caractérisés expérimentalement chez *D. melanogaster* (Hammond *et al.*, 2000; Zamore *et al.*, 2000). Par la suite, des viRNAs furent découverts chez des cellules de *D. melanogaster* infectées par le « *Flock house virus* » (FHV), démontrant que ce mécanisme antiviral était conservé chez les animaux (Li *et al.*, 2002). Ces viRNAs sont capables de s'hybrider au génome viral et ainsi induire sa dégradation de manière dépendante des protéines AGO. Les études ultérieures montrèrent que l'immunité antivirale contrôlée par les viRNAs était présente chez de nombreux organismes tels que les champignons, les plantes, les insectes, le ver à soie et *C. elegans* (pour revue : (Ding and Voinnet, 2007; Ding, 2010)). Chez ce dernier, bien qu'aucune infection virale « naturelle » n'ait été décrite à ce jour, le potentiel antiviral du *RNA silencing* a été démontré par des expériences d'infections de cellules du ver avec le FHV et le virus de la stomatite vésiculaire (VSV).

Chez ces organismes, les virus ciblés par le RNAi sont de différents types : virus à ARN de polarité positive ou négative, à ARNdb, à ADN simple et double brin.

Cependant, l'implication du RNAi dans la défense antivirale chez les mammifères reste actuellement très obscure.

1.3 Le paradoxe des mammifères.

Les ARNdb sont des formes caractéristiques que l'on retrouve notamment au cours de la réplication des virus. Depuis plus de 30 ans, il est connu que ces ARNs sont capables

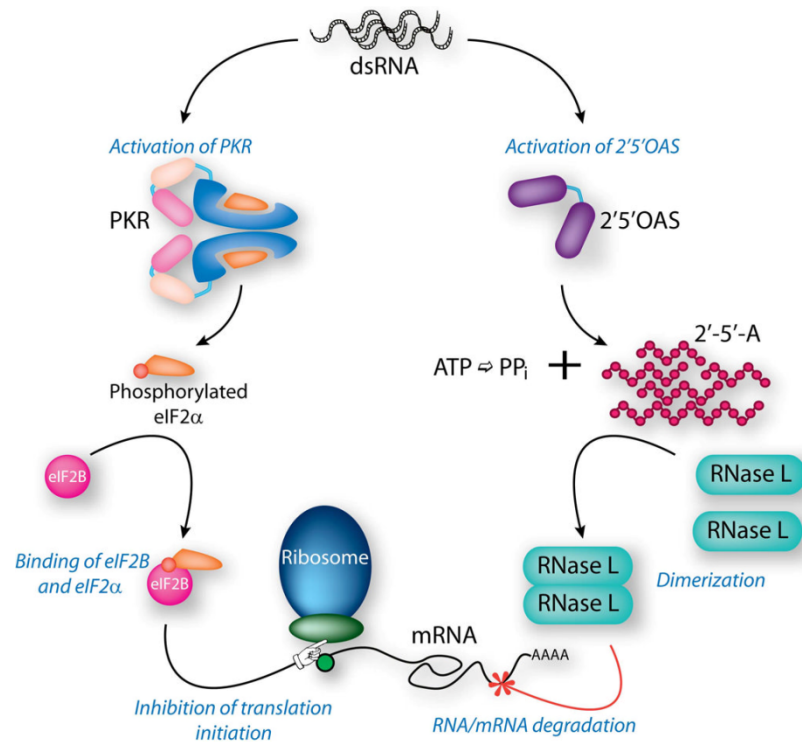


Figure 12 : La réponse des cellules mammifères aux ARNdb.

Dans les cellules mammifères, les ARNdb activent la PKR et la 2'-5' OAS. La PKR activée phosphoryle le facteur eIF2α, avec pour conséquence la séquestration du facteur eIF2B et l'inhibition de l'initiation de la traduction. La 2'-5' OAS activée induit la dimérisation de la RNase L qui va alors dégrader les ARNs de manière non spécifique.

D'après (Gantier and Williams, 2007).

d'induire, dans les cellules de mammifères, un mécanisme de défense innée qui s'accompagne d'une inhibition de la synthèse protéique, une production d'interféron et finalement la mort de la cellule infectée (Gantier and Williams, 2007). Cette réponse est un élément essentiel de la voie interféron (INF). Elle fait intervenir 2 protéines : la protéine kinase R (PKR) et la 2'-5' *Oligoadenylate synthetase* (2'-5' OAS) (Figure 12). La PKR est une Sérine/Thréonine kinase capable, une fois activée, de phosphoryler la sous unité α du facteur d'initiation de la traduction eIF2, ce qui provoque une inhibition de la traduction des ARNm. La 2'-5' OAS est une enzyme qui synthétise des oligomères d'adénine qui vont activer la RNase L. Cette ribonucléase dégrade les ARNs cellulaires et viraux et participe donc activement à l'arrêt de la synthèse protéique. Ces 2 protéines sont activées de manière efficace par l'interaction avec des ARNdb d'une longueur > 30 nt. Ce mécanisme de défense antivirale était considéré comme la réponse majeure d'une cellule mammifère contre les infections virales.

Cependant, la découverte du RNAi comme mécanisme antivirale chez les plantes et les invertébrés a posé la question de son implication dans la défense antivirale des mammifères. A l'époque, il semblait peu probable que le RNAi joue un rôle dans cette défense à cause de la réponse interféron. Mais les premiers travaux montrèrent que l'induction du RNAi, par des siRNAs artificiels dirigés contre le poliovirus, conférait aux cellules mammifères une protection antivirale efficace et indépendante de la réponse interféron (Gitlin *et al.*, 2002). Cependant, des études ultérieures sur de nombreux virus ne parvinrent pas à identifier des viRNAs dans des cellules infectées (Pfeffer *et al.*, 2005). Ces résultats indiquaient que l'ARN interférence n'était pas induit au cours de l'infection de cellules humaines par une grande variété de virus pathogènes, dont 2 virus à ARN générant de long ARNdb durant leur réplication, le virus de l'hépatite C (VHC) et le virus de la fièvre jaune. Récemment, le développement du séquençage à haut débit a permis de reconsidérer cette question. En effet, Parameswaran *et al* ont séquencé de nombreux viRNAs issus de 6 virus à ARN différents dans plus de 40 lignées cellulaires (Parameswaran *et al.*, 2010). L'abondance de ces viRNAs était très variable en fonction des virus. Cependant, la fonctionnalité de ces viRNAs, c'est-à-dire leur capacité à induire la dégradation des ARNm viraux, reste à être démontrée.

Ces résultats constituent un exemple d'un possible rôle du RNAi dans la défense antivirale des mammifères. Outre cet exemple, 2 autres preuves suggèrent l'implication du RNAi au cours des infections virales. Tout d'abord, plusieurs virus infectant les mammifères codent des protéines virales essentielles qui présentent une activité inhibitrice du *RNA silencing*. D'autre part, des travaux ont montré l'implication de certains miRNAs dans la réplication de plusieurs virus. Ces 2 points seront abordés ultérieurement.

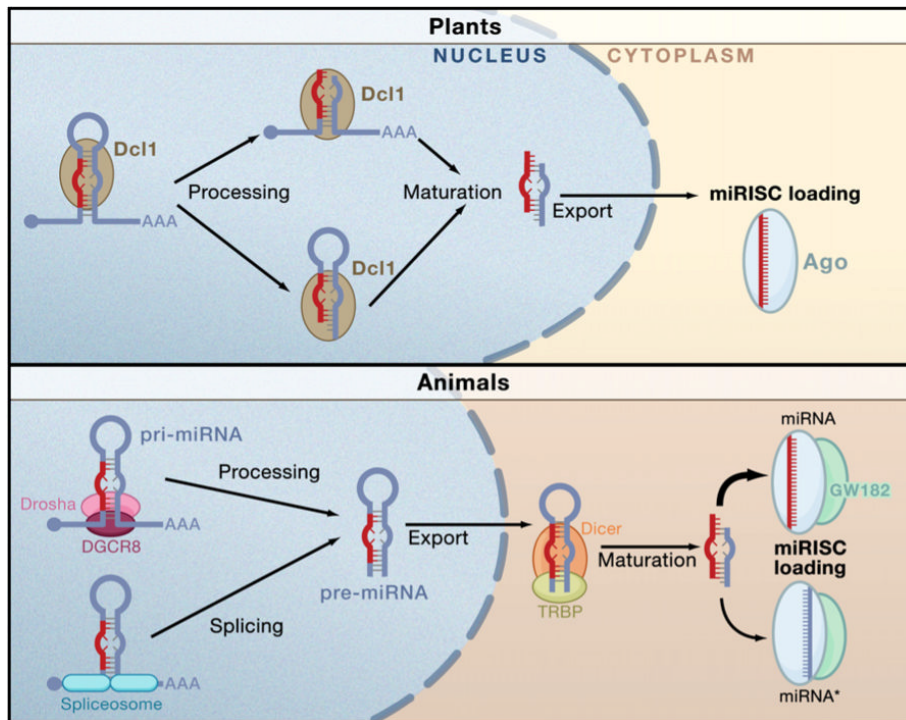


Figure 13 : La voie des miRNAs chez les plantes et les animaux.

Chez les plantes, les maturations du pri-miRNA et du pre-miRNA sont des étapes nucléaires assurées par l'enzyme Dicer-like 1 (DCL1). La boucle terminale du pre-miRNA peut être clivée avant ou après la maturation du pri-miRNA. Le duplex miRNA/miRNA* formé est méthylé et exporté dans le cytoplasme, où le brin guide du duplex va être incorporé dans le complexe RISC. Chez les animaux, le pri-miRNA est maturé par l'enzyme Drosha. Le pre-miRNA ainsi généré est exporté et clivé par Dicer pour former le duplex miRNA/miRNA*, qui est alors incorporé dans le complexe RISC.

D'après (Carthew and Sontheimer, 2009).

2. Les miRNAs dans les interactions hôte-pathogène.

Dans le but de favoriser leur multiplication, les pathogènes ont développé des mécanismes afin de détourner la machinerie de la cellule hôte. A cause de leurs fonctions essentielles dans la régulation de nombreux processus physiologiques, notamment la prolifération, la différenciation et l'apoptose, les miRNAs se trouvent impliqués dans cette interaction hôte-pathogène.

2.1 Les miRNAs dans l'immunité des plantes.

L'enzyme Droscha étant spécifique du règne animal, la biogénèse des miRNAs est légèrement différente chez les plantes, comparée aux animaux (Figure 13). Une particularité des plantes est de posséder plusieurs copies du gène codant Dicer. L'organisme modèle, *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*), possède 4 protéines Dicer-like (DCL1 à DCL4), chacune spécialisée dans la biogénèse d'un type d'ARNnc : DCL1 synthétise les miRNAs, tandis que DCL2, DCL3 et DCL4 clivent les longs ARNdb de diverses origines en siRNAs de 22, 24 et 21 nt, respectivement. Les mutations individuelles des 4 DCLs d'*A. thaliana* ne changent pas la susceptibilité d'une cellule végétale à un virus, suggérant une redondance fonctionnelle de ces protéines dans l'immunité antivirale. Cependant, des expériences de mutagenèse multiple ont montré que DCL4 possède le rôle majeur dans la défense contre les virus à ARN et produit des viRNAs de 21 nt. DCL2 et DCL3 possèdent une activité antivirale réduite, alors que le rôle de DCL1, spécialisé dans la biogénèse des miRNAs, avait un rôle négligeable dans cette défense (pour revue : (Ding, 2010)). Cependant, plusieurs miRNAs jouent un rôle dans la défense contre les pathogènes, soulignant ainsi que DCL1 participerait à l'immunité des plantes. Chez *A. thaliana*, le premier miRNA décrit impliqué dans cette défense fut le miR-393 (Navarro et al., 2006). Lors de l'infection de cette plante par la bactérie *Pseudomonas syringae* (*P. syringae*), ce miRNA est induit par un PAMP, la flagelline bactérienne, et régule la voie de signalisation de l'auxine en réprimant les récepteurs de l'auxine TIR1 (*transport inhibitor response 1*), AFB2 et 3 (*auxin signaling F-box protein 2 et 3*). L'auxine est une phytohormone essentielle pour le développement des plantes. De même, les niveaux de 2 autres miRNAs, miR-160 et miR-167, qui ciblent également des facteurs de réponse à l'auxine, sont augmentés au cours de l'infection. La répression de la voie de signalisation de l'auxine semble être un mécanisme de défense basal chez les plantes, suggérant que l'auxine favoriserait la susceptibilité des plantes aux agents pathogènes. D'autre part, de nombreux autres miRNAs, impliqués dans d'autres voies que celle de l'auxine, sont également induits

lors de l'infection par *P. syringae*. La voie des miRNAs aurait donc un rôle central dans l'immunité régulée par les PAMPs chez les plantes. En effet, lors de l'infection d'*A. thaliana* par *P. syringae*, 2 miRNAs, miR-162 et miR-168, sont réprimés, ce qui conduit à une augmentation de leurs cibles, DCL1 et AGO1, les 2 protéines essentielles de la voie des miRNAs chez les plantes (Fahlgren *et al.*, 2007). D'autres études ont mis en évidence la régulation de miRNAs chez les plantes lors d'infections par des virus ou des champignons. Mais les mécanismes de ces régulations et le rôle de ces miRNAs dans ces interactions hôte-pathogène restent inconnus pour le moment (pour revue : (Katiyar-Agarwal and Jin, 2010)).

2.2 Les miRNAs dans l'immunité des mammifères.

Les mammifères possèdent un système immunitaire complexe impliquant de nombreux types cellulaires et de nombreuses voies de signalisation. On distingue 2 types d'immunité se mettant en place au cours d'une infection : l'immunité innée qui, grâce aux PRRs, va pouvoir détecter les PAMPs et déclencher l'immunité adaptative. L'immunité innée met en jeu les cellules épithéliales et les cellules présentatrices d'antigènes, notamment les macrophages et les cellules dendritiques, tandis que l'immunité adaptative fait intervenir des cellules spécialisées comme les lymphocytes T et B. Ces immunités impliquent de nombreuses voies de signalisation dans les cellules. Par conséquent, une régulation fine de ce système est primordiale pour une défense efficace des organismes contre les pathogènes, tout en évitant une sur-activation des voies de signalisation. L'importance des miRNAs dans la régulation de nombreuses fonctions cellulaires a soulevé la question de leur implication dans le développement et le contrôle de la réponse immunitaire.

D'innombrables travaux ont permis de mettre en évidence clairement l'implication des miRNAs dans la régulation de la différenciation des cellules immunitaires, ainsi que dans leurs fonctions (pour revue : (Baltimore *et al.*, 2008; Lu and Liston, 2009)).

2.2.1 Les miRNAs et le système immunitaire.

L'importance des miRNAs dans le système immunitaire fut découverte lors d'expériences de délétions des composants de la voie des miRNAs (pour revue : (Baltimore *et al.*, 2008)). Ainsi, la délétion de Dicer dans les cellules souches hématopoïétiques rend ces cellules incapables de reconstituer le système hématopoïétique. De même, la différenciation et la survie des lymphocytes B, de même que le répertoire d'anticorps qu'elles expriment, sont sévèrement altérées lorsque l'expression des protéines AGO2 et Dicer est supprimée dans ces

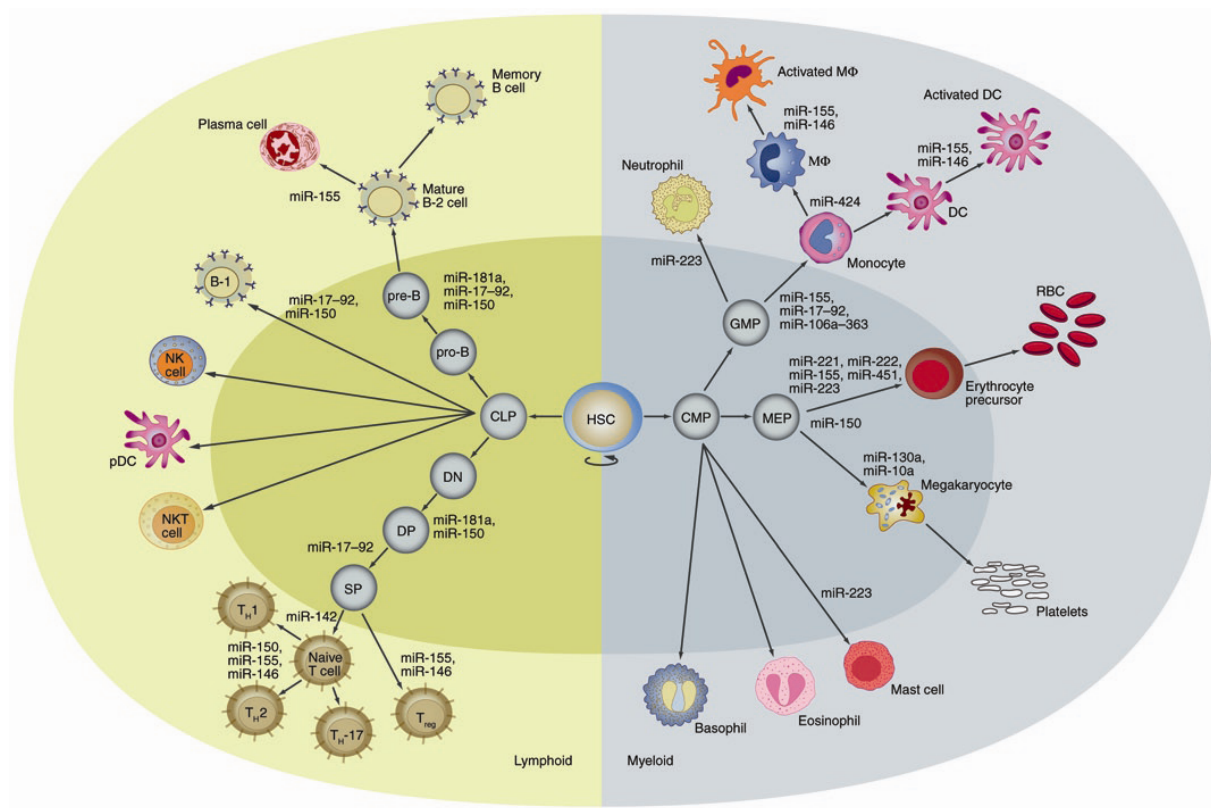


Figure 14 : Vue générale de l'implication des miRNAs dans la différenciation et la fonction des cellules immunitaires.

Les miRNAs à coté des flèches sont impliqués dans la différenciation ou la fonction des cellules indiquées. Le champ gauche représente la lignée lymphoïde, tandis que le champ droit représente la lignée myéloïde. Le cercle extérieur représente les cellules matures.

HSC, cellule souche hématopoïétique ; B-1, lymphocyte B-1 ; B-2, lymphocyte B-2 type ; pre-B, lymphocyte pre-B ; pro-B, lymphocyte pro-B ; CLP, progéniteur lymphoïde commun ; DN, lymphocyte T double-négatif ; DP, lymphocyte T double-positif ; SP, lymphocyte T simple positif ; NK, Natural killer; pDC, cellule dendritique plasmacytoïde ; NKT, Natural killer T ; TH1, lymphocyte T helper type 1 ; TH2, lymphocyte T helper type 2 ; TH-17, lymphocyte T helper producteur d'IL-17 ; Treg, lymphocyte T régulateur ; Mφ, macrophage; DC, cellule dendritique ; GMP, progéniteur granulocyte-macrophage ; CMP, progéniteur myéloïde commun ; MEP, progéniteur megakaryocyte-érythrocyte ; RBC, red blood cell (globule rouge).

D'après (Baltimore *et al.*, 2008).

cellules. Ces premiers travaux démontrant le rôle critique des miRNAs dans la biologie et la fonction des cellules immunitaires furent suivis d'études à grande échelle. Le développement de technologies, telles que le *microarray* et le séquençage à haut débit, a permis d'analyser de manière globale l'expression des miRNAs dans le système hématopoïétique, notamment au cours de la différenciation des cellules immunitaires. La différenciation des cellules souches hématopoïétiques est associée à l'expression de profils de miRNAs spécifiques des différentes lignées du système immunitaire (Figure 14). L'expression de ces miRNAs est régulée de manière spatio-temporelle au cours de la différenciation de ces cellules. Cependant, ces profils présentent de nombreux miRNAs en commun, suggérant qu'ils possèdent une fonction redondante au cours de la différenciation des différentes lignées. Par exemple, le *cluster* miR-17-92 est impliqué dans la différenciation des lymphocytes T et B, ainsi que des monocytes, où il participe à la régulation de la prolifération et de l'apoptose de leurs progéniteurs (Figure 14).

Par ailleurs, les miRNAs sont également impliqués dans la régulation des fonctions des cellules immunitaires. Ainsi, l'expression de certains miRNAs varie en fonction de l'état activé ou non de la cellule. Ce rôle est particulièrement important au niveau des cellules de l'immunité innée. En effet, les cellules de l'immunité innée telles que les granulocytes, les cellules dendritiques, les macrophages et les cellules *Natural killer* (NK) constituent les premières lignes de défense contre les pathogènes. Elles permettent de les détecter et de déclencher une réponse inflammatoire. Cependant, cette réponse doit être régulée précisément pour permettre l'éradication du pathogène tout en évitant des dommages à l'hôte. C'est la raison pour laquelle, l'activation de la réponse immunitaire innée dans ces cellules s'accompagne souvent du déclenchement de boucles de régulation qui vont contrôler l'intensité de cette réponse. De par leur fonction de répresseur de l'expression des gènes, les miRNAs sont donc des candidats désignés pour participer à cette régulation. Ainsi, plusieurs miRNAs ont été montrés comme étant induits au cours de la réponse immunitaire innée. MiR-155, la famille miR-146 et miR-9 sont les exemples les plus étudiés. L'activation des PRRs par les PAMPs déclenche dans les cellules une cascade de signalisation qui aboutit notamment à l'activation du facteur de transcription NF- κ B (*Nuclear factor kappa B*) et à la transcription de gènes pro-inflammatoires. Cette activation induit également ces 3 miRNAs qui vont agir dans une boucle de régulation négative et réprimer certains facteurs impliqués dans l'activation de ce facteur de transcription (Figure 15, p39). D'autres miRNAs sont au contraire réprimés pendant la réponse immunitaire innée. Après une stimulation des macrophages par du lipopolysaccharide (LPS), miR-125b est réprimé, ce qui conduit à

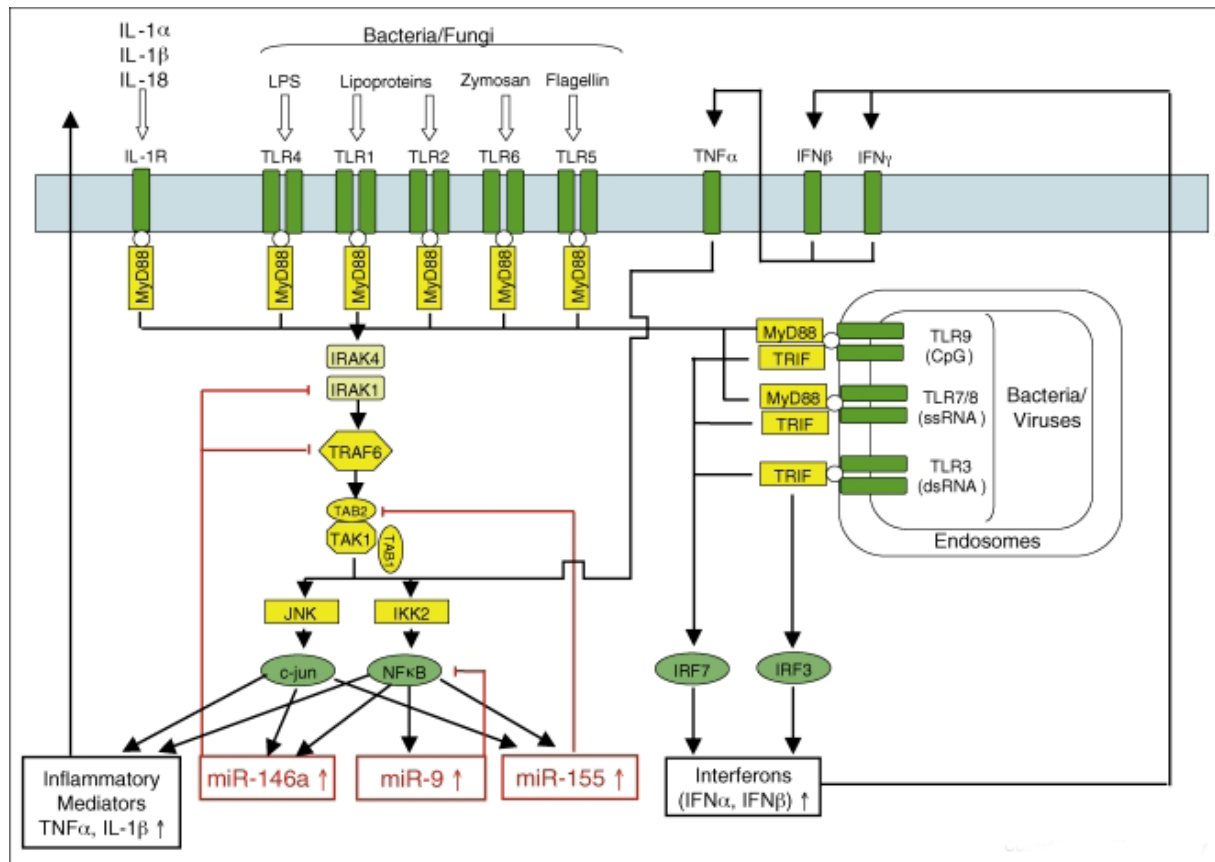


Figure 15 : Rôle de miR-146, miR-9 et miR-155 au cours de l'activation de la réponse immunitaire innée.

Cette figure résume les mécanismes qui régulent l'induction et l'action de miR-9, miR-146 et miR-155, suite à l'activation de la voie TLR. Les boucles de régulation négative mises en jeu par ces 3 miRNAs apparaissent en rouge.

IRAK, IL-1 receptor activated kinase; IRF, interferon regulatory factor; JNK, c-jun N-terminal kinase; NF, nuclear factor; TAB, TAK-1 binding protein; TAK, Toll activated kinase, TRAF, TNF receptor associated factor.

D'après (Tsitsiou and Lindsay, 2009).

l'induction de sa cible, le *Tumor Necrosis Factor α* (TNF- α), une cytokine pro-inflammatoire.

Les miRNAs sont donc des acteurs essentiels du système immunitaire des mammifères et participent directement à la défense de l'organisme contre les infections.

2.2.2 Les miRNAs, un système immunitaire intracellulaire.

En plus du rôle dans le développement et la régulation du système immunitaire des mammifères, les miRNAs participent aussi activement à la défense des cellules contre les pathogènes, notamment contre les virus. Pour qu'un miRNA cellulaire agisse directement sur un ARN viral, cela implique la présence de séquences cibles du miRNA dans l'ARN viral. L'implication des miRNAs dans la défense cellulaire contre les virus fut démontrée par des expériences de répression de Dicer (Matskevich and Moelling, 2007; Otsuka *et al.*, 2007; Triboulet *et al.*, 2007). L'altération de la biogénèse des miRNAs entraînait une hypersensibilité des cellules au virus de l'immunodéficience humaine de type I (VIH-1), du VSV et du virus Influenza A (virus de la grippe), soulignant ainsi le rôle protecteur des miRNAs contre ces virus. Plusieurs miRNAs ayant un impact sur la réplication de certains virus ont été décrits (Tableau 3, p40) (Lecellier *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2007; Otsuka *et al.*, 2007; Pedersen *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2008). Pedersen *et al* montrèrent que l'interféron β , une cytokine sécrétée par les cellules infectées par le VHC, était capable de moduler rapidement l'expression d'un certain nombre de miRNAs (Pedersen *et al.*, 2007). Parmi ces miRNAs, 8 avaient un effet antiviral direct sur le VHC et présentaient des sites potentiels d'interaction dans le génome ARN du VHC. De même, la région 3'-UTR du VIH-1 est la cible d'un groupe de miRNAs, dont les miR-28, miR-125b, miR-150, miR-223 and miR-382. Ces miRNAs, dont l'expression est plus élevée dans les lymphocytes CD4⁺ non activés, pourraient jouer un rôle dans la latence de ce virus, en bloquant sa réplication (Huang *et al.*, 2007). Dans les cellules humaines, miR-32 est également capable d'inhiber la réplication du PFV-1 (*Primate foamy virus type I*) en se fixant directement à l'ARN viral (Lecellier *et al.*, 2005).

Par conséquent, tout comme le système interféron, les miRNAs pourraient constituer un système immunitaire cellulaire essentiel. En effet, une étude bio-informatique a montré que parmi 228 virus infectant l'Homme, 62 virus, appartenant à 6 familles différentes, présentaient des sites potentiels d'appariement à des miRNAs humains (Watanabe *et al.*, 2007). Cependant, les virus notamment les virus à ARN présentent des taux élevés de mutations dans leur génome, leur permettant d'évoluer et d'échapper rapidement aux

Tableau 3 : Liste de miRNAs cellulaires modulant la réplication de virus.

Organisme	Virus	miRNA	Références
Homme	VHC	miR-1, miR-30, miR-128, miR-196, miR-296, miR-351, miR-431 et miR-448	(Pedersen <i>et al.</i> , 2007)
Homme	VIH-1	miR-28, miR-125b, miR-150, miR-223 et miR-382	(Huang <i>et al.</i> , 2007)
Homme	CMV	miR-100 et miR-101	(Wang <i>et al.</i> , 2008)
Homme	PFV-1	miR-32	(Lecellier <i>et al.</i> , 2005)
Souris	VSV	miR-24 et miR-93	(Otsuka <i>et al.</i> , 2007)

mécanismes de défense mis en œuvre par les cellules hôtes. De ce point de vue, les miRNAs des cellules ont l'inconvénient majeur d'être très conservés. Une mutation dans le génome viral au niveau du site cible du miRNA abolirait l'interaction avec ce dernier et permettrait au virus d'échapper à cette défense cellulaire. Une solution pour la cellule serait d'exprimer plusieurs miRNAs capables de cibler le génome viral, rendant l'échappement viral impossible. Les travaux sur le VIH-1 et le VHC, qui ont montré que de nombreux miRNAs cellulaires sont capables de cibler différentes régions des génomes viraux (Tableau 3), illustrent parfaitement cette hypothèse. Les cellules, à travers le répertoire de miRNAs qu'elles expriment, possèderaient donc une arme « préventive » contre de nombreux virus.

Le *RNA silencing* avec les siRNAs et les miRNAs jouent donc un rôle central dans la défense des organismes contre les pathogènes. Au cours de l'évolution, les pathogènes ont sélectionné des mécanismes de contre-défense afin d'interférer avec la voie du *RNA silencing* et échapper ainsi à ce mécanisme de défense cellulaire.

3. La contre-défense des pathogènes.

Le *RNA silencing* constitue un outil puissant pour la cellule pour combattre les invasions microbiennes, mais également pour réguler l'expression de ses gènes. Par conséquent, les pathogènes ont développé des mécanismes pour échapper à cette voie de défense cellulaire. Les inhibiteurs du *RNA silencing* ou VSRs (*Viral Silencing Repressors*) en sont les acteurs essentiels. Mais les pathogènes, notamment les virus, ont su également tirer avantage de cet outil pour réguler leur propre réplication. En effet, les miRNAs constituent un outil efficace et peu coûteux énergiquement pour réguler les fonctions virales. Ainsi, de nombreux virus codent leurs propres miRNAs qui régulent leur réplication. Par ailleurs, le VHC, virus infectant les cellules hépatiques, a su détourner un miRNA très abondant et spécifique du foie, le miR-122, pour augmenter sa réplication (Jopling *et al.*, 2005). Ce miRNA interagit avec 2 sites situés au niveau de la région 5'UTR du génome viral et induit une augmentation de la réplication virale par un mécanisme qui reste actuellement inconnu. Pour contrer ce mécanisme, il a été montré que l'INF- β sécrété par les cellules infectées induisait une forte diminution du niveau de miR-122 dans les cellules, conduisant ainsi à une réduction de la réplication du VHC (Pedersen *et al.*, 2007).

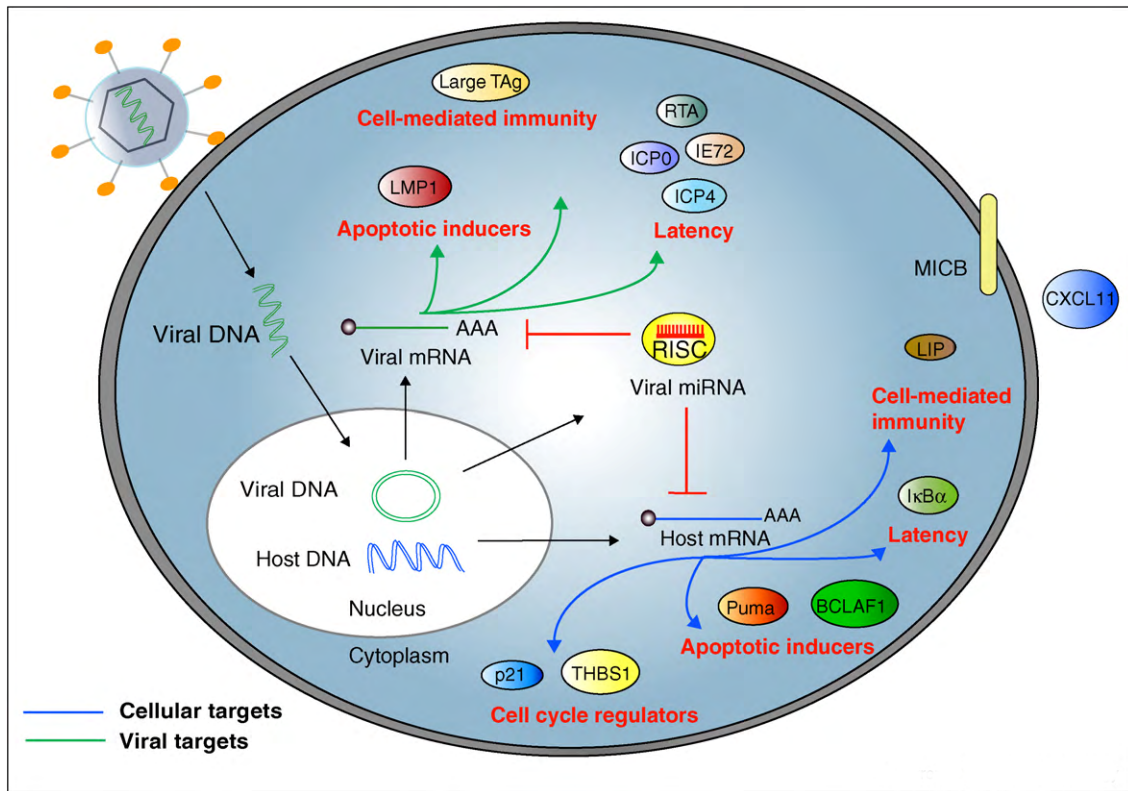


Figure 16 : Rôle des miRNAs viraux au cours des infections virales.

En ciblant les ARNm viraux et/ou cellulaires, les miRNAs viraux participent directement à la réplication virale. Ils contrôlent l'expression de protéines virales et cellulaires impliquées dans différents processus, tels que l'apoptose, la prolifération, l'immunité et la latence virale. D'après (Boss and Renne, 2010).

3.1 Les miRNAs viraux.

Le premier miRNA viral fut découvert dans des cellules de lymphomes de Burkitt infectées par le virus Epstein-Barr (EBV) (Pfeffer *et al.*, 2004). Actuellement, 235 miRNAs viraux ont été identifiés chez 20 virus différents appartenant principalement à 2 familles de virus : les herpesvirus et les polyomavirus, les herpesvirus constituant la famille majoritaire (www.mirbase.org). Ces virus sont des virus à ADN se répliquant dans le noyau des cellules hôtes et ont donc accès à l'enzyme Drosha, enzyme essentielle pour la biogénèse de leurs miRNAs. Malgré l'utilisation de techniques de séquençage à haut débit, aucun miRNA codé par les virus à ARN, tels que le VHC ou le virus Influenza A, ou à ADN avec une répllication cytoplasmique comme les poxvirus, n'a pu être identifié. L'inaccessibilité à l'enzyme nucléaire Drosha ou la nécessité des virus à ARN de protéger leur génome du clivage par Drosha et Dicer pourrait expliquer cette observation. De la même manière que les miRNAs cellulaires, les gènes codant les miRNAs sont organisés en TU simple ou regroupés sous forme de *cluster*. Du point de vue de leur biogénèse, il n'y a pas de distinctions entre celle des miRNAs de l'hôte et celle des miRNAs viraux (pour revue : (Ghosh *et al.*, 2009)). Ils peuvent également subir des mécanismes de régulation identiques, tels que le « *RNA editing* ». Cependant, à la différence des miRNAs cellulaires qui sont souvent conservés, les miRNAs viraux ne présentent pas en général d'homologie, même au sein d'une famille de virus. Ce manque de conservation peut être attribué aux taux de mutations élevés que présentent en général les virus.

Ces miRNAs viraux présentent de nombreuses fonctions et ils sont capables de réguler la traduction d'ARNm impliqués dans de nombreux processus cellulaires ou viraux (Figure 16). On distingue ainsi 3 rôles principaux pour les miRNAs viraux (pour revue : (Boss and Renne, 2010)):

- *Inhibiteurs de l'immunité cellulaire.* L'immunité cellulaire est un composant essentiel de la réponse de l'hôte contre les pathogènes intracellulaires. Le miR-UL112-1 du Cytomégalo virus (CMV) fut le premier exemple d'un miRNA viral impliqué dans l'échappement à la réponse immune, en ciblant un effecteur cellulaire de cette réponse. En effet, ce miRNA est capable de réprimer l'expression du MICB (*Major histocompatibility complex class I-related chain B*), un ligand impliqué dans la lyse des cellules infectées par les cellules NK. Par la suite, d'autres miRNAs viraux impliqués dans l'échappement immunitaire des virus ont été décrits. Les virus JC et SV40 expriment des miRNAs capables de réprimer l'antigène T, un produit viral qui déclenche une forte réponse cytotoxique. De même, le virus

Herpès du sarcome de Kaposi (KSHV) exprime 2 miRNAs qui induisent la sécrétion d'IL-6 et d'IL-10, 2 cytokines inhibant la maturation des cellules dendritiques.

- *Régulateurs de l'apoptose et du cycle cellulaire.* L'apoptose est la réponse ultime des cellules infectées, afin de limiter la propagation du virus. Actuellement, 2 virus oncogéniques, l'EBV et le KSHV, ont été décrits codant des miRNAs réprimant l'expression de facteurs pro-apoptotiques. D'autre part, plusieurs miRNAs du KSHV ciblent des protéines suppresseurs de tumeur impliquées dans la régulation du cycle cellulaire telles que la thrombospondin 1 (THBS1) et p21. Les miRNAs codés par ces 2 virus sont donc directement associés à la carcinogénèse observée lors de l'infection. En général, les miRNAs viraux et cellulaires ne présentent pas d'homologies de séquences, notamment au niveau de la graine, à l'exception du miR-K12-11, un miRNA codé par le KSHV. Ce miRNA viral est un orthologue du miRNA cellulaire oncogénique, miR-155, et possède notamment la même graine (Gottwein *et al.*, 2007). Il régule les mêmes cibles que miR-155, notamment des gènes impliqués dans la régulation de la croissance cellulaire tels que les facteurs de transcription Fos et BACH-1. Etant donné que miR-155 joue un rôle dans le développement de certains cancers, miR-K12-11 pourrait directement contribuer au développement des lymphomes de cellules B observés chez les individus infectés par le KSHV. Des analyses bio-informatiques récentes ont permis d'identifier d'autres miRNAs présentant des homologies de graine avec des miRNAs cellulaires, notamment des miRNAs oncogéniques, mais leur fonction reste à être déterminée (Ghosh *et al.*, 2009).

- *Régulateurs de la latence virale.* De nombreuses infections, par exemple celle des virus Herpès, persistent durant toute la vie de l'hôte. L'échappement au système immunitaire de l'individu est donc essentiel. Un mécanisme d'échappement mis en place par les virus Herpès est l'établissement d'une latence virale, durant laquelle un minimum de gènes viraux est exprimé. Le maintien de cette latence nécessite la répression de l'expression des gènes impliqués dans la réplication virale. Le caractère non immunogène des miRNAs en font des effecteurs idéaux pour réguler les gènes viraux pendant la phase de latence. Les miRNAs viraux impliqués dans la latence virale ciblent notamment des gènes essentiels à la réplication virale. Par exemple, le miR-BART2 de l'EBV réprime l'expression de la protéine virale BALF5, l'ADN polymérase virale. La surexpression de ce miRNA au cours de la phase lytique réduit de plus de 20% du nombre de particules virales produites.

Ainsi, les virus ont su exploiter le potentiel non immunogène des miRNAs à leur avantage, pour moduler l'expression de leurs gènes et ainsi, contrôler leur réplication, mais

également pour échapper au système immunitaire de l'hôte. Cependant, le *RNA silencing* constitue un mécanisme de défense majeur de l'hôte contre les virus. Par conséquent, au cours de l'évolution, les virus ont développé des mécanismes afin d'échapper à ce mécanisme : les « *Viral Silencing Repressors* » ou VSRs.

3.2 Les « *Viral Silencing Repressors* ».

Les VSRs ont été découverts chez les virus infectant les plantes. Le premier VSR décrit est la protéine P1/HC-Pro du TEV (*Tobacco etch virus*) (Kasschau and Carrington, 1998). Des travaux initiaux avaient montré que la protéine HcPro (*potyvirus-encoded helper component proteinase*) du potyvirus favorisait la réplication de nombreux virus. Il fut suggéré que cette protéine inhibait un mécanisme de défense contre les virus des cellules des plantes. A la suite de la découverte du RNA silencing comme mécanisme antiviral, il fut démontré que cette protéine virale était capable d'inhiber cette voie (pour revue : (Voinnet, 2005)). Cette découverte entraîna alors une recherche systématique des VSRs chez les virus. Actuellement, plus de 40 VSRs codés par des virus infectant les plantes, les champignons et les animaux ont été décrits. De nombreux virus codent plusieurs VSRs dont l'expression est régulée de manière spatio-temporelle. Les protéines virales présentant une activité VSR sont en général multifonctionnelles et essentielles pour la réplication virale. Par conséquent, cette particularité a rendu très difficile l'étude de ces VSRs au cours des infections. Les études structurales ont montré que les VSRs présentent une grande diversité de structure et de fonction. Ainsi, les VSRs représentent une adaptation récente des virus à l'immunité antivirale des cellules contrôlée par le *RNA silencing*. Malgré une origine très diverse, ils ont convergé au cours de l'évolution vers des fonctions communes. En effet, de nombreux VSRs possèdent des propriétés biochimiques analogues et leur mode d'action se résume à 2 mécanismes principaux :

- *Inhibition de la biogénèse des siRNA et des miRNAs.* La plupart de ces VSRs possèdent un domaine de liaison aux ARNdb, et peuvent ainsi se lier aux intermédiaires de réplication virale et empêcher leur clivage par Dicer. C'est le cas par exemple de la protéine B2 du FHV ou VP35 du virus Ebola (Li *et al.*, 2002; Haasnoot *et al.*, 2007). D'autres VSRs, tels que HC-Pro du TEV, sont capables d'interagir directement avec Dicer et inhiber son activité.

- *L'inhibition de l'activité des siRNAs/miRNAs.* Plusieurs stratégies ont été développées par les virus, afin d'empêcher l'action des viRNAs et miRNAs antiviraux. Les VSRs possédant un domaine de fixation aux ARNdb sont capables de se lier aux duplex de

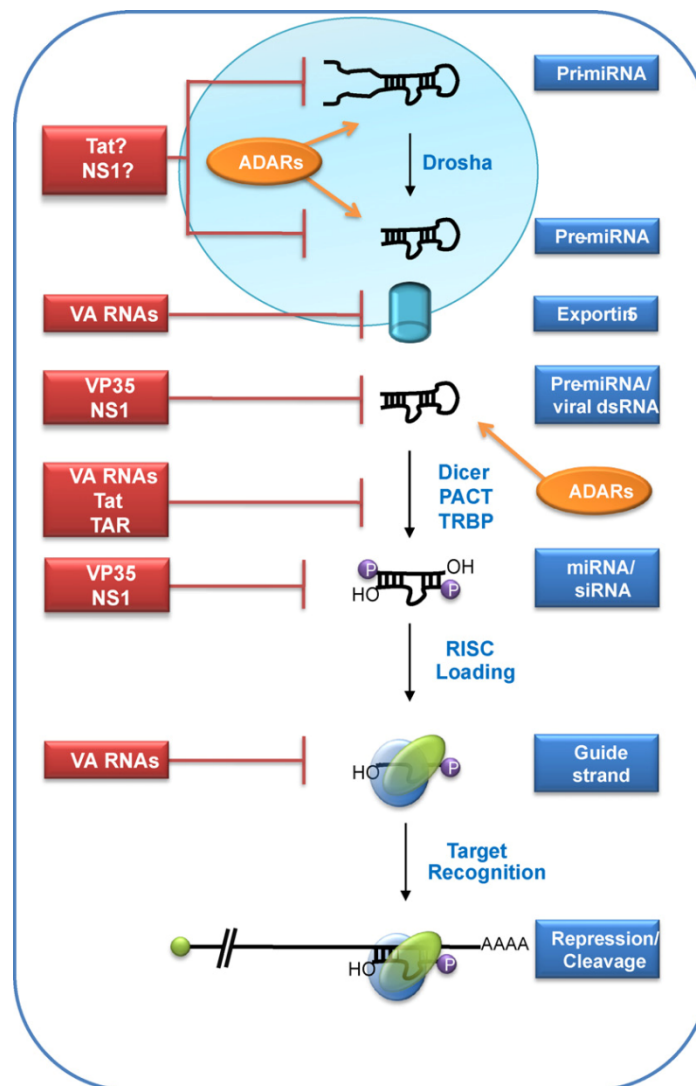


Figure 17 : L'interaction des VSRs avec le RNA silencing chez l'Homme.

Les différentes étapes du RNA silencing sont représentées dans les boîtes bleues et les VSRs dans les boîtes rouges. La protéine Tat du VIH-1 est capable d'inhiber l'activité de Dicer. La protéine VP35 du virus Ebola et NS1 du virus de la grippe sont capables de séquestrer les ARNdb. De même, Tat et NS1 pourrait interagir avec les pri- et pre-miRNAs dans le noyau des cellules. L'ARN TAR du VIH-1 serait capable de saturer la protéine TRBP.

D'après (de Vries and Berkhout, 2008).

siRNAs ou miRNAs et ainsi empêcher leur chargement dans le complexe RISC. La majorité de ces VSRs n'ont pas de spécificité concernant la longueur des ARNdb auxquels ils se lient. Ils sont capables d'interagir avec les longs ARNdb comme avec les duplex de siRNAs. Par conséquent, ils possèdent la double fonction d'inhiber la biogénèse et l'activité des siRNAs ou miRNAs. Cependant, il existe des exceptions, telles que la protéine P19 des tombavirus, qui est capable de séquestrer spécifiquement les duplex de siRNAs de 21 pb générés par DCL4 chez les plantes (Vargason *et al.*, 2003; Ye *et al.*, 2003). D'autres VSRs agissent en interagissant directement avec les effecteurs du complexe RISC, notamment les protéines AGO. Ainsi, la protéine 2b du virus de la mosaïque du concombre interagit avec AGO1 et inhibe son activité *slicer* (Zhang *et al.*, 2006). Récemment, l'équipe du Dr. Voinnet a montré que la protéine de la capsid P38 du « *Turnip crinckle virus* » (TCV) interagissait et inhibait également AGO1 via un motif Glycine/Tryptophane (GW) (Azevedo *et al.*, 2010). Ce motif est essentiel pour la réplication virale, car sa mutation abolit la virulence du TCV. P38 mime ainsi les protéines cellulaires à motifs GW normalement requises pour la fonction et l'assemblage du complexe RISC dans divers organismes.

Ainsi, l'ensemble des étapes du *RNA silencing* sont ciblées par les VSRs, ce qui reflète parfaitement la variété de mécanismes développés par les virus dans le but de bloquer ce moyen de défense cellulaire. Une liste non exhaustive des VSRs des virus infectant l'Homme, ainsi que les étapes du *RNA silencing* qu'ils ciblent, sont présentées dans la figure 17.

Les domaines de liaison aux ARNdb sont très répandus chez les VSRs. De même, le motif GW est retrouvé dans de nombreuses protéines virales et bactériennes. Par conséquent, ces 2 stratégies semblent avoir été sélectionnées par les pathogènes au cours de l'évolution pour déjouer l'immunité de l'hôte régulée par le *RNA silencing*. Cependant, certains virus ont développé des mécanismes alternatifs non protéiques afin d'inhiber cette immunité basée sur l'ARN. Les virus à ADN de type adénovirus codent 2 ARNnc impliqués dans l'inhibition de la PKR dans les cellules infectées : les ARN VA (*Virus-associated*) I et II. Ces 2 ARNs sont hautement structurés et sont très abondamment exprimés au cours de l'infection. Ces 2 ARNs agissent en saturant totalement la voie du *RNA silencing* chez les mammifères (Andersson *et al.*, 2005). L'ARN VAI est reconnu comme un substrat par Dicer et empêche par inhibition compétitive le chargement des substrats cellulaires de Dicer, notamment les pre-miRNAs. De plus, l'ARN VAI, qui est transcrit dans le noyau par l'ARN polymérase III, inhibe également le transport des pre-miRNAs du noyau vers le cytoplasme en saturant l'EXP5. L'ARN VAII interagit avec le complexe RISC, empêchant ainsi le chargement des miRNAs/siRNAs.

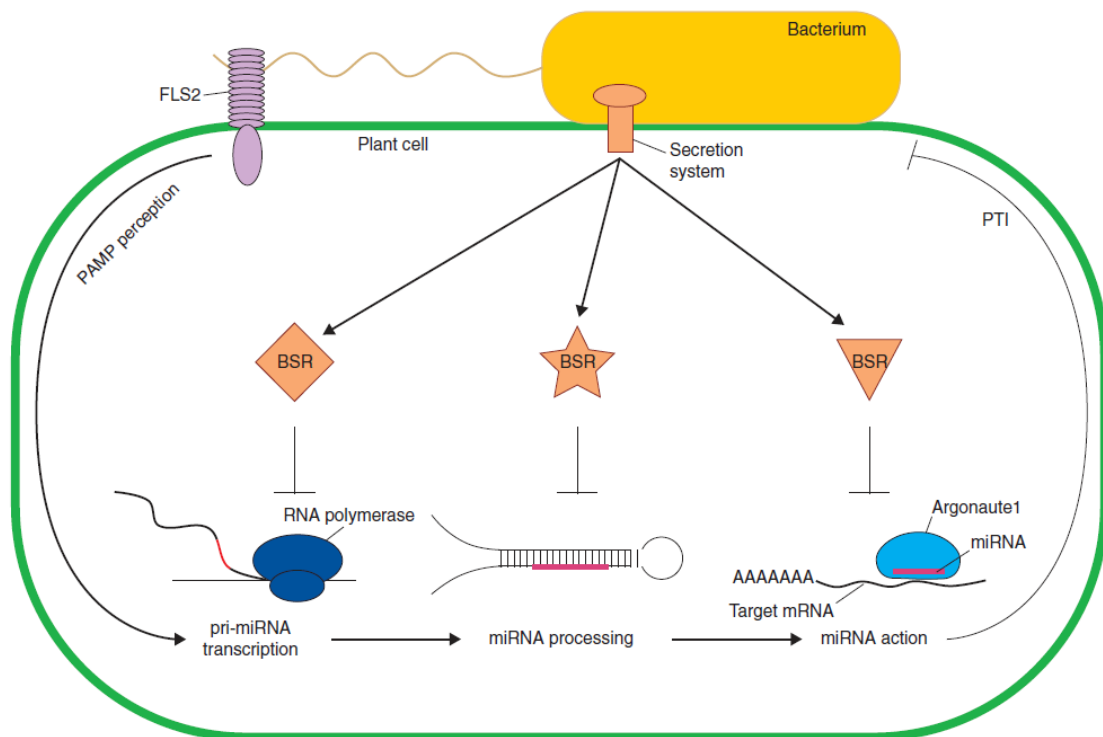


Figure 18 : Mécanisme d'action des BSRs chez les plantes.

Dans un premier temps, la cellule détecte les PAMPs bactériens, comme la flagelline détectée par le récepteur FLS2. S'en suit une cascade de signalisation qui active la transcription de certains pri-miRNAs, qui vont être maturés en miRNAs matures (rouge) et participent à la réponse de la cellule contre l'infection. De son côté, la bactérie injecte dans le cytoplasme de la cellule des effecteurs qui vont interférer avec les voies de signalisation de la cellule. Certains de ces effecteurs possèdent une activité BSR (orange) et vont bloquer les différentes étapes du *RNA silencing*.
D'après (Mosher and Baulcombe, 2008).

Outre les bénéfices pour la réplication virale, le blocage du *RNA silencing* a des conséquences dramatiques pour la cellule infectée. En effet, la séquestration des miRNAs ou l'inhibition du complexe RISC entraîne l'accumulation dans la cellule des duplex inactifs avec pour conséquence la traduction des ARNm cibles et l'expression de nombreuses protéines impliquées dans de nombreuses voies de signalisation cellulaire. Ainsi, les VSRs participent directement à la pathogénèse et constituent la meilleure preuve de l'implication du *RNA silencing* dans l'immunité innée notamment chez les mammifères.

Cependant, les virus ne sont pas les seuls pathogènes à avoir développé des inhibiteurs du *RNA silencing*.

3.3 Les « **Bacterial Silencing Repressors** ».

De la même manière que les virus, les bactéries ont développé des mécanismes pour contrer les défenses mises en place par l'hôte. Ces mécanismes impliquent notamment l'injection d'effecteurs bactériens dans le cytoplasme des cellules hôtes via des systèmes de sécrétion qui agissent comme de véritable seringue. Ces toxines, une fois injectées, vont interférer avec de nombreuses voies de signalisation cellulaire et vont induire ainsi une « reprogrammation » du transcriptome et du protéome de la cellule, afin de rendre cette dernière plus susceptible. Comme nous l'avons vu au chapitre 2.1, le *RNA silencing* est impliqué dans la défense des plantes contre les bactéries. Chez *A. thaliana*, la flagelline de *P. syringae* induit l'expression de miR-393 qui va réprimer des protéines impliquées dans la voie de signalisation de l'auxine, voie impliquée dans la défense de la cellule de plante (Navarro *et al.*, 2006). Cette bactérie est capable d'injecter un effecteur bactérien, AvrRpt2, via un SST3, qui va induire l'expression d'un nat-siRNA (*natural antisense siRNA*) impliqué dans l'immunité de la plante (Katiyar-Agarwal *et al.*, 2006). De manière identique aux virus, les bactéries ont développé des mécanismes pour contrer cette immunité régulée par le *RNA silencing*. Le groupe du Dr. O. Voinnet a montré récemment et pour la première fois que *P. syringae* avait acquis des « *Bacterial Silencing Repressors* » (BSR) capables d'inhiber différentes étapes du *RNA silencing* (Navarro *et al.*, 2008). Cette bactérie injecte, via son SST3, 3 effecteurs bactériens qui vont interférer avec différentes étapes de la voie des miRNAs. Ainsi, les toxines AvrPtoB, AvrPto et HopT-1 sont capables d'inhiber la transcription, la maturation et la fonction d'un certain nombre de miRNAs impliqués dans la défense de la cellule, notamment le miR-393 (Figure 18). Cependant, les mécanismes d'action de ces toxines restent encore inconnus.

Ces travaux constituent le premier exemple d'une bactérie capable d'interférer avec la voie des miRNAs par l'intermédiaire d'effecteurs bactériens. Ils ont ouvert un nouveau champ d'investigation concernant les interactions entre les bactéries et le *RNA silencing*. En effet, la perturbation de la physiologie cellulaire par l'injection de toxine est un phénomène quasi universel chez les bactéries pathogènes, dont *Helicobacter pylori*. Le *RNA silencing* jouant un rôle essentiel dans cette physiologie, on peut donc faire l'hypothèse que l'infection par cette bactérie conduise à une dérégulation des miRNAs.

Chapitre III : *Helicobacter pylori*.

1. Historique.

Les premières observations d'Hippocrate sur les troubles gastriques soulignent que, de tout temps, l'Homme a souffert de pathologies gastriques. Le plus célèbre des malades, Napoléon Bonaparte, se tenant le ventre avec sa main, souffrait d'un ulcère gastrique (probablement dû à *Helicobacter pylori*) qui dégénéra en cancer de l'estomac qui lui fut fatal (www.helicobacter.fr). De nombreuses causes, souvent exotiques, furent évoquées telles que le stress, le régime alimentaire ou l'atmosphère. Il fallut attendre l'avènement de la microbiologie moderne, développée par Robert Koch et Louis Pasteur, à la fin du 19^{ème} siècle, pour qu'une cause infectieuse soit suspectée. Ainsi, en 1875, les bactériologistes G. Bottcher et M. Letulle observèrent des bactéries dans l'estomac de patients atteints d'ulcères (Kidd and Modlin, 1998). Ils proposèrent un rôle étiologique de ces bactéries dans l'ulcère. Cependant, ils furent incapables d'isoler et de cultiver ces bactéries et leur hypothèse fut oubliée. Par la suite, d'autres observations ont été publiées, notamment celles du pathologiste italien Guilio Bizzozero qui décrit, en 1892, la présence de bactéries spiralées Gram négatives dans l'estomac de chiens. Ces bactéries spiralées furent par la suite observées en 1899 et 1906 par Pel et Krienitz, respectivement, au niveau de l'estomac de patients atteints d'ulcères peptiques et de cancers gastriques. Le rôle étiologique de ces bactéries dans le développement de ces pathologies fut suggéré de nouveau et certains patients furent même traités avec du bismuth, composé utilisé notamment comme agent antibactérien et traitement des ulcères gastriques. Cependant, ce rôle fut par la suite contesté à cause de la prévalence élevée de ces bactéries chez des personnes ne présentant aucuns signes cliniques. Elles furent considérées comme des contaminants issus des aliments. Aussi, l'estomac sain fut considéré comme stérile à cause de l'acidité qui y règne. Il fallut attendre 70 ans pour que ce dogme soit remis en cause grâce aux progrès technologiques, notamment au développement de la fibroscopie gastrique qui permit de faire des biopsies de meilleures qualités. Ainsi, en 1975, Steer et Colin-Jones observèrent dans la muqueuse gastrique des bacilles Gram négatifs chez 80 % des patients atteints d'ulcères gastriques (Steer and Colin-Jones, 1975). Ces bactéries, décrites comme des *Pseudomonas*, furent considérées une nouvelle fois comme des contaminants et oubliées. Enfin, en 1984, B. Marshall et R. Warren identifièrent des bacilles spiralés dans l'estomac de 58 patients volontaires et réussirent à les cultiver à partir de 11 biopsies (Marshall and Warren, 1984). Cette bactérie Gram négative, flagellée et microaérophile, fut classée dans le genre *Campylobacter* sous le nom *Campylobacter pyloridis* ou « Campylobacter pylorique ».

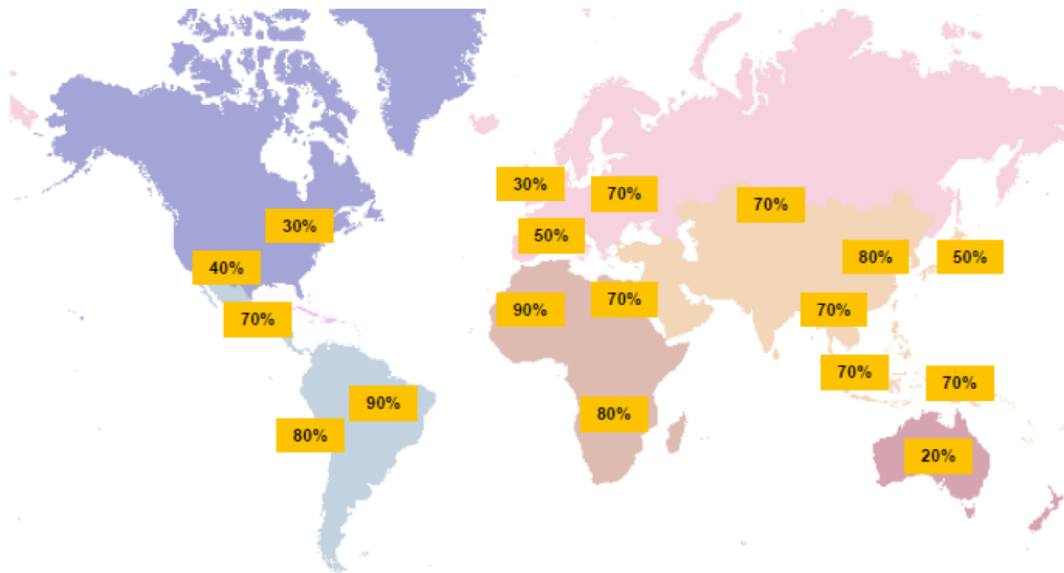


Figure 19 : Prévalence d'*Helicobacter pylori* dans le monde.

Les pourcentages indiquent la prévalence d'*H. pylori* dans la partie du monde considérée.
Illustration obtenue auprès du Groupe d'Etudes Français des *Helicobacter*
(www.helicobacter.fr).

Elle fut par la suite reclassée parmi les epsilon-protéobactéries dans un nouveau genre, *Helicobacter*, sous le nom *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) (Goodwin *et al.*, 1989). La plupart des patients porteurs de cette bactérie souffraient de gastrites chroniques et d'ulcères gastriques, ce qui laissait penser à nouveau à un rôle étiologique de cette bactérie dans ces pathologies. Devant le scepticisme de la communauté scientifique, Marshall, puis Morris par la suite, ingérèrent une suspension bactérienne, développèrent une gastrite et guérirent après un traitement antibiotique. Ce rôle fut confirmé lorsque des patients traités par antibiothérapie virent leur gastrite ou ulcère disparaître. Les travaux de Marshall et Warren, récompensés en 2005 par le Prix Nobel de Médecine (<http://nobelprize.org>), permirent une avancée majeure dans le traitement des pathologies gastroduodénales. Les recherches ultérieures montrèrent que *H. pylori* était impliquée dans de nombreuses pathologies gastriques telles que la gastrite chronique, les ulcères peptiques, le lymphome du MALT (*mucosa-associated lymphoid tissue*) et le cancer gastrique. Ainsi, l'estomac n'est plus considéré comme une zone stérile. En effet, des études moléculaires récentes ont montré par la suite que l'estomac présentait une diversité bactérienne importante (Bik *et al.*, 2006). De plus, le microbiome gastrique est largement bouleversé lors de l'infection par *H. pylori*, au profit de cette dernière.

2. Epidémiologie et transmission.

L'infection par *H. pylori* touche environ 50 % de la population mondiale. Cette infection bactérienne chronique est la plus répandue après la carie dentaire (www.helicobacter.fr). L'estomac humain est le seul réservoir identifié de cette bactérie. L'histoire de l'Homme est donc étroitement liée à celle d'*H. pylori*. Ainsi, sur la base d'études phylogéographiques, la colonisation de l'estomac par cette bactérie serait antérieure aux migrations africaines, il y a plus de 58000 ans (Linz *et al.*, 2007). L'Homme a donc colonisé le monde en transportant *H. pylori* dans son estomac. De plus, la variabilité génétique de cette bactérie a permis de retracer les flux migratoires des hommes préhistoriques à travers les continents (Falush *et al.*, 2003). La présence d'autres espèces du genre *Helicobacter* dans d'autres espèces de mammifères laisse à penser que cette colonisation serait encore plus ancienne, et que les ancêtres de l'espèce humaine auraient porté l'ancêtre d'*H. pylori* (Cover and Blaser, 2009).

Aujourd'hui, il existe une très grande disparité concernant la prévalence de cette bactérie dans le monde (Figure 19). Le taux d'infection dépend de nombreux critères tels que l'âge, l'origine géographique et les conditions de vie (www.helicobacter.fr). L'infection s'acquiert au cours de l'enfance en général et persiste tout au long de la vie en absence de

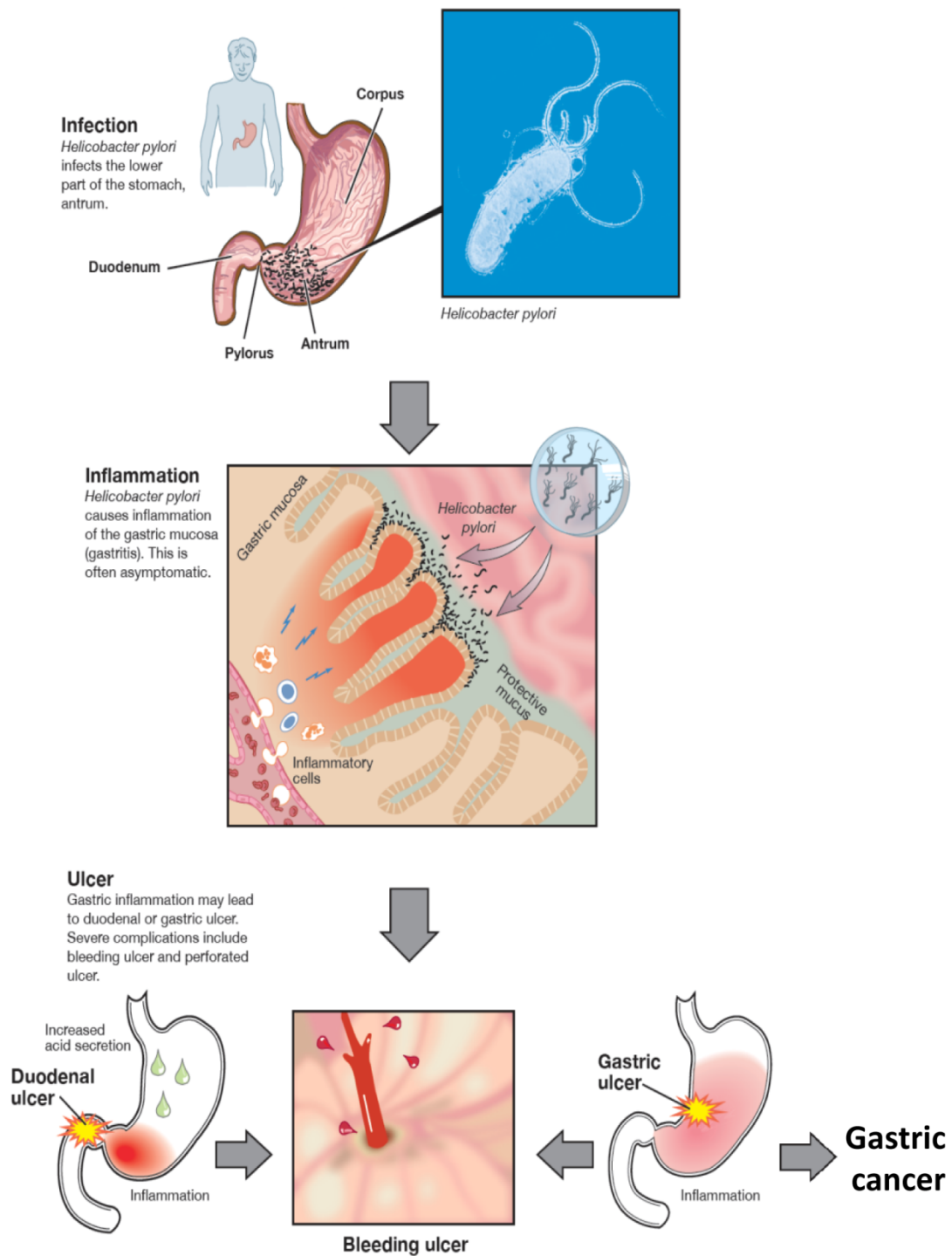


Figure 20 : Pathogénèse de l'infection par *H. pylori*.

L'infection par *H. pylori* a lieu en général pendant l'enfance. Elle s'accompagne systématiquement d'une inflammation de la muqueuse gastrique, qui est asymptomatique dans la majorité des cas et va devenir chronique. Cette infection dure toute la vie de l'individu en absence de traitement. Dans un certain nombre de cas, cette infection va déclencher l'apparition d'ulcère peptique, dont la nature diffère en fonction de la région de l'estomac touchée : duodénal lorsque l'infection touche l'antrum, ou gastrique dans le cas d'une pangastrite (corpus + antrum). La pangastrite est également directement liée au développement de l'adénocarcinome gastrique.

http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2005/press.html

traitement. La transmission se fait par voie oro-orale ou oro-fécale, et est souvent intrafamiliale. Dans les pays en voie de développement, la prévalence atteint 80 % de la population. L'acquisition de la bactérie a lieu dans les premières années de la vie et est souvent liée aux conditions d'hygiène et de promiscuité. Dans les pays développés où la prévalence est inférieure à 40 %, le taux d'infection est très faible chez les enfants et augmente avec l'âge pour atteindre 50% chez les personnes de plus de 60 ans. Alors que cette prévalence est constante dans les pays en développement, elle diminue rapidement dans les pays industrialisés avec l'amélioration des conditions d'hygiène et l'emploi massif des antibiotiques, notamment chez les enfants (Blaser, 2006; Kusters *et al.*, 2006).

Le traitement des infections à *H. pylori* consiste en une trithérapie associant un inhibiteur des pompes à protons associé à 2 antibiotiques, généralement la clarithromycine et l'amoxicilline. Cependant, l'usage massif des antibiotiques ont fait émerger des souches résistantes. L'approche vaccinale a longtemps été considérée comme peu réaliste à cause de l'inefficacité de la réponse immunitaire induite par *H. pylori*. Cependant, des essais vaccinaux concluants sur des animaux ont démontré la faisabilité du concept et plusieurs essais vaccinaux chez l'homme sont en cours.

3. Pathogénèse.

3.1 Aspects cliniques.

L'infection par *H. pylori* s'accompagne systématiquement d'une inflammation de la muqueuse gastrique, ou gastrite, qui est asymptomatique dans la majorité des cas (> 70%). Cette gastrite devient chronique et dure toute la vie en l'absence de traitement. Dans 10 à 20 % des cas, les patients développent un ulcère peptique. Le type d'ulcère observé dépend notamment de la région gastrique touchée par l'infection : ulcère duodéal avec une augmentation de la sécrétion acide lorsque l'antrum est touché, ou ulcère gastrique avec une diminution de la sécrétion acide dans le cas d'une pangastrite, qui touche le corpus et l'antrum (Figure 20). *H. pylori* est retrouvée dans plus de 90 % et 70% des ulcères duodénaux et gastriques, respectivement. D'autre part, dans 3% des cas, après plusieurs dizaines d'années d'évolution lente, cette infection chronique va aboutir au développement d'un adénocarcinome gastrique. Ce cancer gastrique est la deuxième cause de décès par cancer dans le monde avec 700000 décès par an et un taux de survie à 5 ans de 25 %. A ce jour, *H. pylori* serait retrouvée dans 75 % des cancers gastriques, faisant de cette bactérie le facteur de risque majeur associé au cancer gastrique (Herrera and Parsonnet, 2009). D'autre part, avec

une incidence inférieure à 0,3 %, *H. pylori* est également impliquée dans le développement du lymphome du MALT. En effet, 90 % des patients développant ce type de lymphome au niveau de l'estomac ont été dépistés positifs pour *H. pylori*. Tous types de cancers confondus, *H. pylori* serait responsable de 5,5 % des cancers observés dans le monde.

Pour ces raisons, en 1994, cette bactérie a été classée comme agent carcinogène de classe I par l'Agence Internationale de Recherche contre le Cancer (IARC, 1994). A ce jour, elle reste la seule bactérie impliquée dans le développement d'un cancer.

De manière surprenante, bien que la présence d'*H. pylori* ait un coût non négligeable pour l'hôte, un nombre croissant d'études montrent un bénéfice potentiel de cette bactérie sur d'autres pathologies (Cover and Blaser, 2009). Ainsi, *H. pylori* aurait un effet protecteur sur les maladies de l'œsophage, notamment le reflux gastro-œsophagien. De même, il existerait une corrélation inverse entre la présence de *H. pylori* et des pathologies telles que l'asthme ou les allergies. Enfin, des études ont suggéré que *H. pylori* pourrait avoir un rôle protecteur contre certaines maladies infectieuses, comme la tuberculose (Perry *et al.*, 2010). Cependant, ces études s'appuient en général sur des enquêtes épidémiologiques et les mécanismes moléculaires impliqués dans ces effets protecteurs restent inconnus, bien que certaines hypothèses, telles que la diminution des sécrétions acides dans le cas du reflux gastro-œsophagien ou la sécrétion de peptides antibactériens, aient été formulées.

3.2 Les déterminants de la pathogénèse.

La susceptibilité de l'hôte et la sévérité des pathologies associées à l'infection par *H. pylori* dépendent de nombreux facteurs. Ces facteurs concernent i) le mode de vie de l'individu contaminé, ii) la réponse immune, iii) le polymorphisme des gènes de l'hôte et iv) les caractéristiques génétiques de la souche bactérienne.

3.3 Les déterminants « environnementaux ».

Ce terme englobe les paramètres généraux liés au mode de vie de l'individu infecté par *H. pylori* tels que le stress, le tabac ou le comportement alimentaire. Cependant, la contribution de chacun de ces paramètres à la pathogénicité, notamment la carcinogénèse, reste très difficile à évaluer. Néanmoins, le rôle de certains facteurs a pu être clairement établi. Ainsi, le tabac et une alimentation trop riche en sel, dépourvue de fruits et légumes, c'est-à-dire de molécules anti-oxydantes telles que l'acide ascorbique et le β -carotène,

favoriseraient le développement de lésions précancéreuses dans la muqueuse gastrique (Lunet and Barros, 2003; Machida-Montani *et al.*, 2004).

3.4 Les déterminants de l'hôte.

Lors d'une infection microbienne, la réponse observée dépend notamment du polymorphisme génétique de l'individu infecté. En effet, ce polymorphisme peut directement influencer le niveau d'expression de certains gènes, en générant ou supprimant des sites de fixation pour des facteurs de transcription, et/ou en affectant l'épissage et par conséquent la traduction. Ainsi, il va influencer le métabolisme de certains composés ou l'expression de certaines cytokines, et par conséquent moduler la réponse immunitaire de l'hôte.

3.4.1 Le polymorphisme génétique.

Le polymorphisme génétique de l'hôte concerne principalement les gènes codant les cytokines. Au cours de l'infection, ce polymorphisme affecte directement la production de cytokines par les cellules épithéliales gastriques et immunitaires et intervient par conséquent dans la modulation de la réponse inflammatoire. Par exemple, l'interleukine 1 β (IL-1 β) est une cytokine pro-inflammatoire et l'inhibiteur le plus puissant de la sécrétion acide. Cette cytokine est codée au niveau du *cluster* IL-1 contenant le gène codant l'IL-1 β et celui codant le récepteur antagoniste de l'IL-1 (IL-RN). Ce *cluster* contient plusieurs polymorphismes conduisant à une forte expression d'IL-1 β . Ceci conduit à une hypoacidité gastrique lors de l'infection par *H. pylori*, aboutissant au développement d'une pangastrite, la formation d'une gastrite atrophique et l'augmentation du risque de cancer gastrique (El-Omar *et al.*, 2001; Machado *et al.*, 2001). De même, le polymorphisme du TNF- α aurait un impact sur la réponse inflammatoire gastrique et prédisposerait à l'évolution de l'infection vers le cancer gastrique (Rad *et al.*, 2004). Par ailleurs, un polymorphisme conduisant à une diminution de sécrétion de la cytokine anti-inflammatoire IL-10, et par conséquent, à une réaction inflammatoire exacerbée, est associé à un risque élevé de cancer gastrique (El-Omar *et al.*, 2003; Rad *et al.*, 2004).

Ainsi, la conjonction de certains polymorphismes pro-inflammatoires augmenterait de manière significative le risque de cancer gastrique lors de l'infection par *H. pylori*.

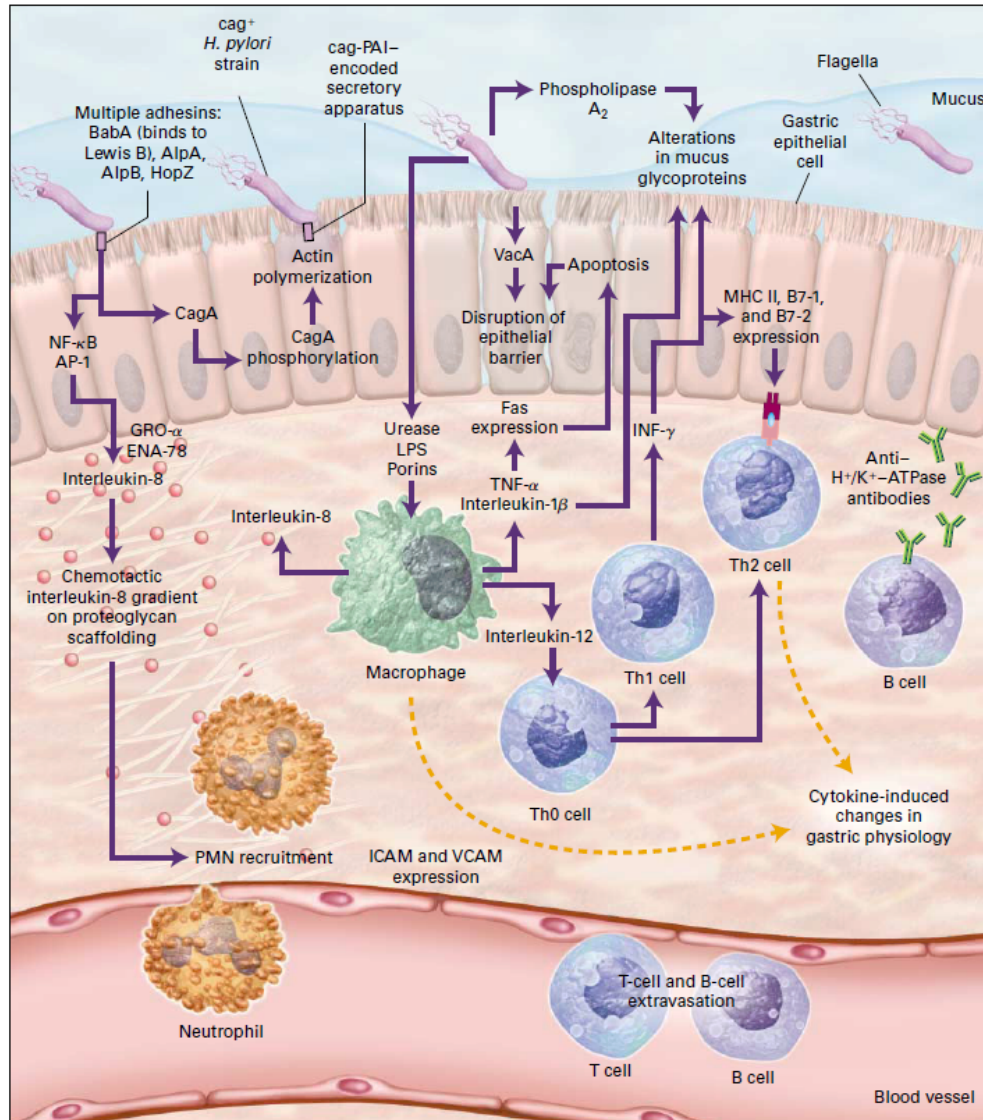


Figure 21 : Vue générale de la réponse inflammatoire déclenchée par *H. pylori*.

Durant la phase précoce de l'infection, l'interaction de *H. pylori* avec les cellules épithéliales gastriques résulte dans la sécrétion d'IL-8. Cette cytokine permet le recrutement au site de l'inflammation des polynucléaires, notamment les neutrophiles. L'activation de l'immunité innée est suivie par la mise en place de l'immunité adaptative. Les chimiokines produites, telles qu'ICAM et VCAM, permettent le recrutement des lymphocytes. Les macrophages, qui participent à la production d'IL-8, sécrètent également des cytokines, telles que l'IL-12, qui participent à l'activation des lymphocytes. L'activation chronique de ces cellules aboutit à l'altération de la muqueuse gastrique et de l'homéostasie gastrique.

D'après (Suerbaum and Michetti, 2002).

3.4.2 La réponse inflammatoire.

L'infection par *H. pylori* résulte toujours en une forte réponse immunitaire (pour revue : (Wilson and Crabtree, 2007)). *H. pylori* induit les 2 types de réponses immunitaires, à savoir humorale et cellulaire. La muqueuse gastrique constitue le premier rempart contre l'infection. L'interaction de *H. pylori* avec les cellules épithéliales gastriques, ainsi qu'avec les cellules présentatrices d'antigènes (macrophages et cellules dendritiques) présentes dans la muqueuse, déclenche une réponse immunitaire innée aboutissant à une sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 β , le TNF- α , la cytokine chimio-attractante IL-8 et l'IL-6. Cette réponse innée est activée par la reconnaissance des composants bactériens, tels que le LPS, la flagelline et le peptidoglycane (PG), par les récepteurs TLRs et NOD.

Les cytokines sécrétées vont permettre le déclenchement de la réponse immunitaire adaptative en recrutant les lymphocytes T helper (Th), T régulateur (Treg) et B au site de l'inflammation (Figure 21). En fonction des cytokines sécrétées, les lymphocytes Th peuvent se différencier en 2 classes fonctionnelles : les cellules Th1, qui sécrètent des cytokines telles que l'Interféron (IFN) γ et l'IL-2, et les cellules Th2, qui produisent des cytokines telles que l'IL-4 et l'IL-10. La réponse Th1 génère une immunité cellulaire impliquée dans la protection contre les pathogènes intracellulaires, tandis que la réponse Th2 provoque une immunité humorale impliquée notamment dans les allergies. Lors de l'infection par *H. pylori*, les cellules présentatrices d'antigènes sécrètent de l'IL-12 et orientent la réponse immune vers une réponse de type Th1 avec une abondante sécrétion d'INF- γ et d'IL-2. Cette réponse est à l'origine de l'inflammation chronique observée lors de l'infection et serait donc impliquée dans le développement des pathologies gastriques liées à *H. pylori*. De même, les cellules phagocytaires participent directement à la sévérité de l'inflammation en déclenchant le *burst* oxydatif, qui se traduit par la sécrétion de monoxyde d'azote (NO) et des dérivés réactifs de l'oxygène (ROS). La sécrétion de NO est notamment stimulée par l'uréase de *H. pylori*, qui induit l'expression de la *Nitric Oxyde Synthase* (iNOS) (Gobert *et al.*, 2002). Ce *burst* oxydatif entraîne des dommages de la muqueuse gastrique et participe par conséquent à la colonisation et à la dissémination de la bactérie dans la muqueuse.

D'autre part, une réponse humorale est également observée au cours de l'infection avec une activation des lymphocytes B et une sécrétion d'immunoglobulines (Igs), notamment des IgG, des IgM et des IgA dans le sérum et la muqueuse gastrique. Cependant, ces Igs ne confèrent pas une protection contre *H. pylori*.

Ainsi, cette réponse immunitaire est inefficace dans la majorité des cas et échoue à éradiquer la bactérie. En effet, *H. pylori* a développé des stratégies pour échapper au système immunitaire, notamment un mimétisme moléculaire. Par exemple, l'antigène de Lewis du LPS d'*H. pylori* est peu immunogène, car il mime les antigènes du groupe sanguin. De plus, il présente une certaine variation antigénique (Kusters *et al.*, 2006). De même, *H. pylori* relargue peu de flagelline et celle-ci ne stimule pas la voie du TLR5 (Gewirtz *et al.*, 2004). Par ailleurs, cette bactérie est capable de résister à la phagocytose des macrophages en neutralisant la NADPH oxydase notamment (Gobert *et al.*, 2002).

Outre le déterminisme de l'hôte, la réponse immunitaire dépend également des facteurs bactériens. Ainsi, les souches bactériennes qui possèdent les facteurs majeurs de virulence, l'îlot de pathogénicité « *cytotoxin-associated genes* » (*cag PAI*) et la toxine vacuolisante A (VacA), sont directement associées à des réponses inflammatoires plus fortes et des risques néoplasiques accrus.

3.5 Les déterminants bactériens.

H. pylori est capable de coloniser l'estomac humain pendant des décennies tout en échappant au système immunitaire de l'hôte. L'estomac est un environnement très hostile, à cause de son acidité, et est soumis à de nombreuses variations des paramètres physico-chimiques tels que la température, la disponibilité des nutriments, le pH et la tension en oxygène. Par conséquent, au cours de l'évolution, cette bactérie a développé tout un ensemble de facteurs de colonisation afin d'envahir l'estomac et échapper à l'acidité gastrique, mais également un ensemble de facteurs de virulence afin d'interférer avec le métabolisme des cellules épithéliales gastriques et des cellules immunitaires et ainsi établir sa niche pour se multiplier.

3.5.1 Les facteurs de colonisation.

Contre toute attente, *H. pylori* n'est pas une bactérie acidophile. Cette bactérie neutrophile a développé une batterie de mécanismes afin d'échapper à l'environnement acide de l'estomac. Ainsi, elle possède différents facteurs de colonisation notamment une uréase, des flagelles et des adhésines.

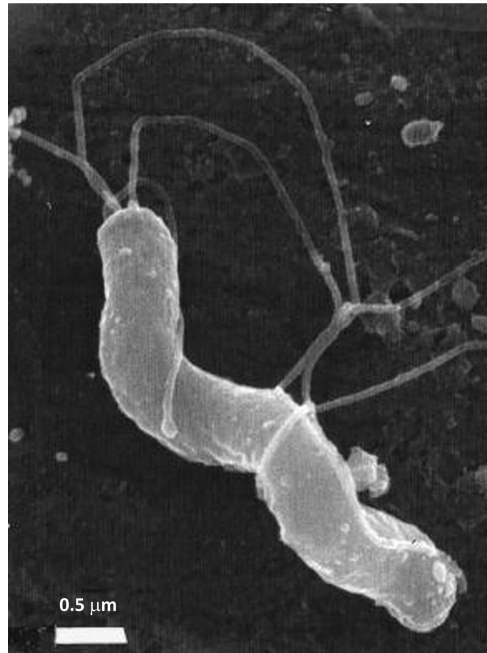


Figure 22 : Morphologie d'*H. pylori* visualisée en microscopie électronique à balayage.

H. pylori présente une morphologie spiralée avec 2 à 6 flagelles unipolaires.
L. Thompson and S. Danon, School of Microbiology & Immunology,
University of New South Wales.)

putative constitue un argument supplémentaire en faveur d'une transcription pol II dépendante et suggère que cette région conservée pourrait constituer le promoteur basal (*core promoter*) de ce *cluster*.

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons extrait par PCR, à partir de l'ADNg des cellules AGS, 2 régions, que nous avons ensuite clonées en amont d'un gène rapporteur, la luciférase firefly, dans le vecteur d'expression pGL3-b dépourvu de promoteur. La première construction, nommée F1, contient la région conservée de 300 pb, ainsi que les 80 et 280 pb situées en 3' et 5' de cette région, respectivement. La deuxième construction, nommée F2, contient la région située entre la région F1 et le pre-miR-371. A la différence de la région F1, cette région n'est pas conservée chez les mammifères. Ces 2 constructions, ainsi que les vecteurs contrôles pGL3-b dépourvu de promoteur, et pGL3-p, dans lequel la transcription du gène codant la luciférase firefly est sous la dépendance du promoteur du SV40, ont été transfectés dans des cellules AGS et l'activité de la luciférase firefly mesurée. Les cellules transfectées avec le vecteur F1 ou avec le vecteur contrôle pGL3-p présentaient une activité luciférase 40 et 60 fois plus élevée, respectivement, comparée aux cellules transfectées avec le plasmide témoin pGL3-b dépourvu de promoteur (Figure 33a). Ce résultat démontre clairement que la région F1 contient un élément transactivateur de la transcription du gène rapporteur. Par ailleurs, aucune activité luciférase significative n'a été observée dans les cellules transfectées avec le vecteur F2 (Figure 33a). Par conséquent, cette région ne permet pas la transcription du gène rapporteur. Les travaux d'Houbaviy *et al.* concernant le promoteur du *cluster* miR-290 ont montré que, chez la souris, cette région située entre la boîte TATA et le pre-miR-290-5p était transcrite puis épissée du pri-miRNA (Houbaviy *et al.*, 2005). Ce *cluster* étant conservé chez les mammifères, on peut émettre l'hypothèse que, de la même manière que chez la souris, cette région est située chez l'Homme dans le pri-miRNA. Des résultats de RT-PCR nous ont permis de confirmer que cette région était effectivement transcrite (données non montrées).

Ces résultats suggèrent que la région F1 contient effectivement le promoteur putatif du *cluster* miR-371-372-373. La région conservée et présente dans la séquence F1 constituerait donc le promoteur basal du *cluster*.

Nos travaux ont montré que l'expression du *cluster* miR-371-372-373 était spécifique aux cellules AGS. Alors que ce *cluster* est fortement exprimé dans les cellules AGS, nous avons détecté une expression significative de ce *cluster* uniquement dans 2 autres lignées : la lignée MKN-74 d'origine gastrique et la lignée Caco-2 d'origine intestinale (cf. chapitre II).

bactérie peut ainsi accéder plus facilement aux nutriments et délivrer ses toxines, mais elle s'expose au système immunitaire. Cette interaction avec les cellules gastriques est assurée par des adhésines. Ces protéines appartiennent à la famille des protéines de la membrane externe (*Outer membrane proteins* : OMPs) qui comprend plus de 30 gènes. Les plus étudiées sont les adhésines qui interagissent avec les glycoprotéines de la cellule hôte présentant des sucres modifiés, notamment les adhésines *Blood group antigen-binding adhesin* (BabA ou HopS) et *Sialic acid-binding adhesin* (SabA ou HopP). Elles se lient respectivement aux antigènes de Lewis, de type groupe sanguin, Le^b fucosylé et Le^x sialylé qui sont présents à la surface de l'épithélium gastrique (Ilver *et al.*, 1998; Mahdavi *et al.*, 2002). Ces adhésines auraient des rôles différents au cours de l'infection. BabA facilite la colonisation de la muqueuse gastrique et accroît l'inflammation en augmentant la sécrétion d'IL-8 notamment (Rad *et al.*, 2002). SabA, par contre, aurait un rôle lors de l'infection chronique. En effet, la gastrite chronique générée par *H. pylori* entraîne l'augmentation de l'expression de Le^x, le récepteur cellulaire de SabA (Mahdavi *et al.*, 2002).

D'autres adhésines telles que OipA (HopH), AlpA et AlpB sont impliquées dans la colonisation et l'inflammation provoquées par cette bactérie (pour revue : (Amieva and El-Omar, 2008)).

3.5.2 Les facteurs de virulence.

Outre les facteurs de colonisation, *H. pylori* possède également des facteurs de virulence qui vont lui permettre d'interférer avec le métabolisme des cellules épithéliales et immunitaires, et ainsi échapper au système immunitaire et établir sa niche afin de s'y multiplier. *H. pylori* possède 2 facteurs de virulence principaux : la toxine vacuolisante VacA et l'îlot de pathogénicité *cag* (*cag PAI*).

3.5.2.1 La toxine vacuolisante VacA.

3.5.2.1.1 Structure et variabilité de VacA.

La toxine VacA est une protéine multifonctionnelle induisant des effets pléiotropiques sur les cellules (pour revue : (Cover and Blanke, 2005; Polk and Peek, 2010)). Cette toxine fut découverte peu de temps après l'identification de *H. pylori*. Il fut montré qu'une protéine présente dans le surnageant filtré de culture bactérienne était capable d'induire la formation de larges vacuoles intracellulaires dans des cellules mammifères en culture (Leunk *et al.*, 1988). VacA est synthétisée de manière constitutive sous la forme d'une protoxine de 140 kDa. Cette

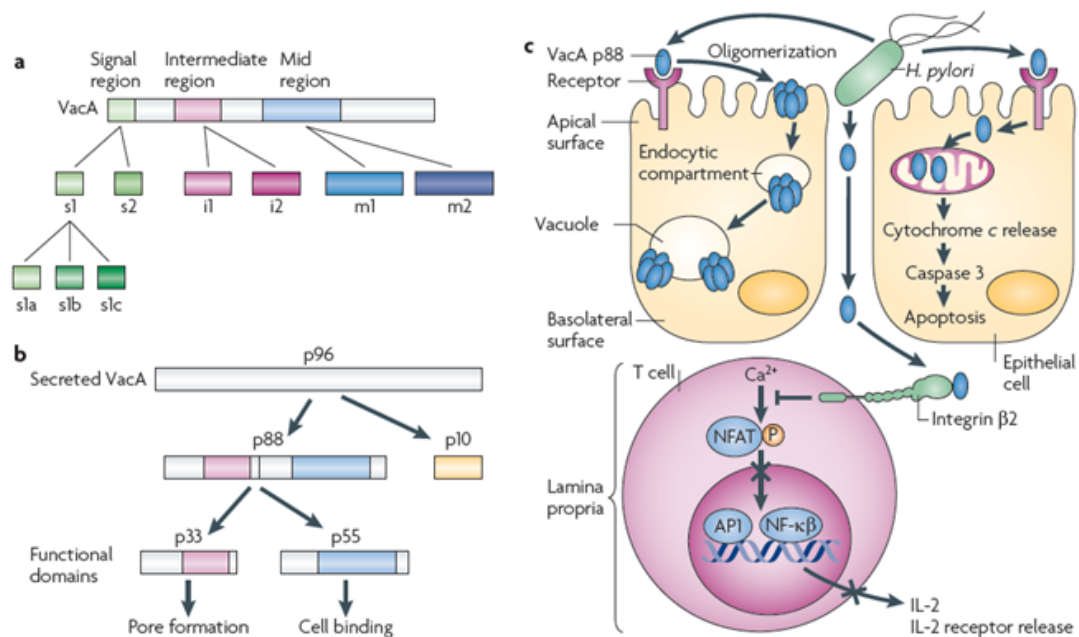


Figure 23 : La toxine vacuolisante VacA : structure et fonctions.

(a) Le gène codant VacA présente un important polymorphisme entre les différentes souches. Les régions avec une diversité de séquence sont localisées au niveau des régions signal (s), intermédiaire (i) et *mid* (m). Le fragment s1 est actif, alors que la région s2 possède un signal de clivage différent qui altère la maturation de VacA et l'empêche d'induire la vacuolisation. La région *mid* code un site d'interaction avec les cellules. La fonction de la région i est inconnue.

(b) VacA est sécrétée sous la forme d'un précurseur de 96 kDa qui est rapidement clivé pour former la protéine mature, de 88 kDa. Elle contient 2 domaines fonctionnels, p33 et p55, qui peuvent être clivés.

(c) La forme mature de VacA interagit avec les cellules épithéliales de manière non spécifique ou par interaction avec un récepteur. VacA va alors s'oligomériser au niveau de la membrane plasmique, puis va être internalisée dans les endosomes où elle va former des canaux à anions et induire la vacuolisation de la cellule. VacA peut également déclencher l'apoptose de ces cellules par la formation de pores au niveau des mitochondries, provoquant une libération de cytochrome c. Cette toxine est également capable d'inhiber l'activation et la prolifération des lymphocytes T, en se fixant sur les intégrines β2 et en inhibant l'activation du facteur de transcription NFAT.

D'après (Polk and Peek, 2010).

protéine ne présente pas de similarité avec d'autres protéines bactériennes ou eucaryotes. Cette protoxine présente plusieurs domaines : une séquence signal « s » dans la région amino-terminale (N-terminale), une région intermédiaire « i », une région centrale nommée *mid-region* ou « m », et un domaine autotransporteur situé dans la région carboxy-terminale (C-terminale) (Figure 23a). Ce domaine autotransporteur constitue un système de sécrétion de type V (SST5). En s'enchâssant dans la membrane interne, il permet la translocation de VacA vers l'espace extracellulaire. Mais VacA peut également rester localiser au niveau de la membrane de la bactérie. Le domaine autotransporteur est ensuite clivé pour libérer la forme mature de 88 kDa de la toxine. Cette forme peut subir un clivage protéolytique pour donner 2 fragments fonctionnels, p33 et p55, de 33 et 55 kDa respectivement, en interaction non covalente (Figure 23b). Le domaine p33 contient une séquence hydrophobe impliquée dans la formation des pores, tandis que la sous-unité p55 contient des domaines d'interaction avec les cellules. La toxine ainsi sécrétée est capable de se fixer à différents composants présents à la surface des cellules, tels que PTPRZ1 (*protein receptor-type tyrosine protein phosphatase-ζ*), la fibronectine, l'EGFR (*Epidermal growth factor receptor*), divers lipides, la sphingomyéline et l'intégrine β2 (CD18). Elle s'assemble en une structure oligomérique hydrosoluble et s'insère dans les membranes lipidiques, au niveau des radeaux lipidiques (*lipid rafts*) afin de former un canal à anions.

Bien que le gène *vacA* soit présent dans toutes les souches d'*H. pylori* isolées jusqu'à présent, il présente une très forte variabilité allélique, notamment au niveau des fragments « s », « i » et « m ». Cette variabilité génétique a un impact direct sur l'activité vacuolisante de VacA, ce qui a permis de classer les souches bactériennes en fonction cette variabilité. Ainsi, on distingue les sous-types s1, s2, i1, i2 m1 et m2 (Figure 23a). Les souches présentant une toxine VacA de type s1/m1 sécrètent une toxine active avec une forte activité vacuolisante et sont associées au développement d'ulcères et de cancers gastriques. Par contre, les toxines VacA de type s2/m2 ne sont pas fonctionnelles. Entre ces 2 types, on trouve différentes associations, telles que s1/m2, s2m1, ainsi que d'autres sous-types (s1a, s1b, m1a, m1b etc...), qui possèdent une activité vacuolisante plus ou moins prononcée.

3.5.2.1.2 Fonctions de VacA.

La toxine VacA possède plusieurs propriétés toxiques impliquées dans la colonisation et le devenir de l'infection par *H. pylori* (pour revue : (Cover and Blanke, 2005)).

Effets sur les cellules épithéliales : La propriété la plus étudiée est certainement son effet sur la maturation des endosomes, qui conduit à la vacuolisation des cellules épithéliales gastriques (Figure 23c, p56). En effet, cette toxine est internalisée par endocytose et va s'insérer dans les membranes des endosomes tardifs pour former des pores avec une activité de canal à ion chlore (Cl⁻). En altérant la composition en anions des endosomes, ces pores provoquent leur gonflement osmotique. Cependant, cet effet *in vivo* reste encore obscur, mais une perturbation de la fonction endosomale dans la muqueuse gastrique pourrait avoir de nombreux effets sur l'épithélium. Par ailleurs, VacA pourrait altérer le fonctionnement des mitochondries en formant des pores au niveau des membranes mitochondriales. Ceci provoquerait une diminution de la concentration d'ATP cellulaire disponible, avec pour conséquence un arrêt du cycle cellulaire. De plus, ces pores provoqueraient une libération de cytochrome c dans le cytoplasme, activant la caspase 3 et induisant, par conséquent, l'apoptose des cellules épithéliales (Figure 23c, p56).

Ainsi, la toxine VacA pourrait altérer la barrière épithéliale et entraîner le relargage de nutriments tels que des ions, des acides aminés, des sucres, dans la lumière gastrique, favorisant ainsi la multiplication de *H. pylori*.

Effets sur les cellules immunitaires : Plusieurs études ont attribué à VacA des propriétés à la fois pro- et anti-inflammatoires. En effet, cette toxine a de multiples effets sur les différentes cellules du système immunitaire. Au niveau des phagocytes, VacA est capable de bloquer la maturation des phagosomes, empêchant ainsi l'élimination de *H. pylori*. De même, cette toxine est capable de perturber *in vitro* la présentation des antigènes par les lymphocytes B (Molinari *et al.*, 1998). Ces effets seraient directement liés à l'altération de la fonction endosomale par VacA. Au niveau des lymphocytes T, VacA empêche l'activation du facteur de transcription NFAT (*Nuclear factor of activated T cells*), un régulateur essentiel des gènes impliqués dans la réponse immune, notamment pour l'activation optimale des lymphocytes T. L'inhibition de NFAT empêche la production d'IL-2, cytokine requise pour la viabilité et la prolifération des lymphocytes T. Une étude transcriptomique a montré que VacA altérerait l'expression de plus de 100 gènes dans des lymphocytes, action comparable à celle d'immunosuppresseurs puissants comme la cyclosporine A (Gebert *et al.*, 2003). Elle active notamment la voie de signalisation des MAP kinases au niveau des lymphocytes T.

Outre ces activités anti-inflammatoires, VacA présente également des propriétés pro-inflammatoires. En effet, elle est capable de stimuler la production de cytokines pro-inflammatoires, telles que l'IL-6 et le TNF- α , par les mastocytes dont elle provoque la

1. La spécificité d'expression du *cluster* miR-371-372-373.

L'expression des miR-372&373 dans les tumeurs somatiques est un évènement rare. Leur expression a été détectée dans des cancers des testicules, de l'œsophage ainsi que de la thyroïde (Voorhoeve *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2009; Rippe *et al.*, 2010). Les résultats du séquençage à haut débit nous ont permis de découvrir que le miR-372, membre du *cluster* miR-371-372-373, était le miRNA le plus abondant dans les cellules AGS. Nos travaux ont permis de confirmer que le *cluster* miR-371-372-373 est exprimé de manière abondante et surtout spécifique dans la lignée gastrique AGS. Ils constituent le premier exemple de l'expression de ce *cluster* dans un cancer gastrique.

Parmi l'ensemble des lignées d'origine gastrique ou autres que nous avons testées, l'expression des miR-372&373 n'a pu être mise en évidence uniquement dans les cellules gastriques MKN-74 et coliques Caco-2. Cependant, l'expression de ces miRNAs est très faible et probablement non fonctionnelle. En effet, LATS2 est facilement détectable dans les cellules MKN-74 et de manière aussi abondante que dans les cellules HeLa, qui n'expriment pas miR-372&373 (Figure 2, Manuscrit en révision). Par ailleurs, nous n'avons pas détecté ces 2 miRNAs dans des extraits d'ARNs de tumeurs gastriques ou d'estomac sain. Outre les cellules hES, l'expression de ce *cluster* a également été détectée dans le placenta, les testicules et l'estomac (Liang *et al.*, 2007). Nos conditions expérimentales ne nous ont pas permis de confirmer ces résultats dans des extraits d'ARNs d'estomac sain. Au vu de ces résultats, on peut se demander si l'expression du *cluster* miR-371-372-373 dans les cellules AGS reflète une réalité biologique ou si cette expression est apparue au cours de la transformation de ces cellules. Rippe *et al* ont montré que l'expression du *cluster* miR-371-372-373 dans certains adénocarcinomes de la thyroïde était associée à un réarrangement chromosomique de la région 19q13.4, contenant notamment le *cluster* miR-371-372-373 et le C19MC (Rippe *et al.*, 2010). Outre les miR-372&373, ce réarrangement provoquait également l'expression des miRNAs du C19MC. Il est peu probable qu'un tel réarrangement ait eu lieu dans les cellules AGS, car nous n'avons pas détecté l'expression des miRNAs du C19MC, notamment miR-520d, par RT-qPCR et séquençage à haut débit. D'autre part, l'expression des miR-372&373 a également été mise en évidence au niveau de tumeurs germinales de testicules, notamment de carcinomes embryonnaires (Voorhoeve *et al.*, 2006). Ces auteurs ont montré que l'expression de miR-372&373 était suffisante pour la transformation de cellules primaires. En inactivant la voie de réparation de l'ADN contrôlée par p53, ces miRNAs prédisposaient les cellules à une tolérance vis-à-vis des mutations

spécialisée et interagit avec les molécules d'adhésion cellulaire, les intégrines $\alpha 5 \beta 1$, présentes à la surface baso-latérales des cellules épithéliales (Kwok *et al.*, 2007). Cette interaction est dirigée par un motif RGD (Arginine-Glycine-Acide aspartique) présent dans CagL. La formation du SST4 est induite par le contact bactérie-cellule. Une fois assemblé, le SST4 permet l'injection dans la cellule hôte de la cytotoxine CagA, l'effecteur bactérien principal de *H. pylori*. Une fois dans le cytoplasme, cette toxine interfère avec de nombreuses voies de signalisation cellulaire. Ce point sera développé en détails dans le prochain paragraphe.

Cependant, plusieurs effets sur les cellules sont indépendants de CagA, mais dépendants du SST4. L'effet majeur lié au SST4 est l'activation de la réponse inflammatoire des cellules épithéliales gastriques. La réponse pro-inflammatoire induite par *H. pylori* implique le récepteur NOD1 (Viala *et al.*, 2004). Ce récepteur est un PRR cytoplasmique reconnaissant le peptidoglycane (PG) des bactéries Gram⁻. Lors de l'infection, la bactérie est capable d'injecter des fractions solubles du PG dans la cellule hôte via le SST4. Ces fragments, reconnus par NOD1, déclenchent la réponse inflammatoire des cellules par l'activation de la voie du NF- κ B, qui se traduit notamment par la sécrétion d'IL-8 et de β -defensin 2 (Viala *et al.*, 2004; Boughan *et al.*, 2006). Par ailleurs, d'autres travaux ont montré que le SST4 était capable d'activer, indépendamment de CagA, d'autres voies de signalisations cellulaires, notamment les voies des Rho GTPases Rac1 et Cdc42, de Erk, de l'EGFR et Egr-1 (*Early growth response gene 1*) (Churin *et al.*, 2001; Keates *et al.*, 2005). Les mécanismes d'activation sont actuellement inconnus, mais on peut imaginer l'implication d'autres effecteurs bactériens délivrés par le SST4 dans cette activation. De même, l'activation de la voie des intégrines induite par la fixation de CagL pourrait jouer un rôle dans l'induction de ces voies.

Cependant, la toxine CagA reste l'effecteur bactérien majeur dans la perturbation du métabolisme des cellules épithéliales gastriques.

3.5.2.1.3.2 Fonctions cellulaires de la cytotoxine CagA.

A l'origine, la protéine CagA fut décrite comme un marqueur aggravant de la maladie, car les patients présentant des anticorps contre cette toxine développaient plus fréquemment des ulcères peptiques et des adénocarcinomes gastriques (Covacci *et al.*, 1993). Les souches *cagA*⁺ sont associées à des inflammations accrues, une prolifération cellulaire et des métaplasies de la muqueuse gastrique. Par conséquent, dès sa découverte, il a été suggéré que CagA avait un rôle central dans ces pathologies. Dans un premier temps, un lien direct entre CagA et la pathogénèse fut établi lors d'expériences *in vivo* d'infection, notamment chez la

gerbille de Mongolie (Watanabe *et al.*, 1998; Wirth *et al.*, 1998). Le lien causal entre la toxine CagA et la carcinogénèse a ensuite été démontré par la génération de souris transgéniques exprimant CagA (Ohnishi *et al.*, 2008). Ces souris présentaient des hyperplasies et des adénocarcinomes gastriques. Ainsi, CagA est la seule oncoprotéine d'origine bactérienne décrite à ce jour. Par conséquent, les actions cellulaires de CagA, et notamment sa capacité à interférer avec de nombreuses voies de signalisation cellulaire, ont fait l'objet d'études intensives. Les expériences d'infection de modèles animaux et de cellules en culture ont permis de montrer que CagA présente un large répertoire de fonctions intracellulaires. Actuellement, 20 protéines cellulaires capables d'interagir avec CagA ont été décrites. Ces partenaires protéiques sont impliqués dans de nombreuses voies de signalisation, dont certaines sont directement liées au cancer.

3.5.2.1.3.3 Translocation et phosphorylation de CagA.

L'une des principales caractéristiques de la toxine CagA, qui a permis notamment de l'identifier comme un effecteur bactérien injecté, est sa phosphorylation (CagA-P) par des kinases cellulaires. L'injection de CagA dans les cellules épithéliales est un mécanisme non aléatoire et étroitement contrôlé. CagA possède à ses extrémités N- et C-terminales un signal de sécrétion. L'extrémité C-terminale est reconnue par la protéine du SST4, CagF qui a le rôle de protéine chaperonne et participe ainsi à la translocation de CagA dans la cellule hôte à travers le SST4 (Couturier *et al.*, 2006; Pattis *et al.*, 2007). Une fois dans le cytoplasme de la cellule, CagA est phosphorylée par des kinases cellulaires au niveau d'une tyrosine présente dans un motif Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala (EPIYA) situé dans la partie C-terminale. Le type et le nombre de motifs EPIYA varient en fonction des souches d'*H. pylori*, notamment de leur origine géographique (souches occidentales ou souches asiatiques) (Hatakeyama, 2008). D'autre part, ces régions EPIYA contiennent également un motif de multimérisation (Ren *et al.*, 2006). Les kinases cellulaires responsables de la phosphorylation de CagA sont des oncoprotéines bien caractérisées. En particulier, la famille des kinases Src (SFKs), qui est impliquée dans le réarrangement du cytosquelette, la différenciation et la prolifération des cellules, mais également dans la carcinogénèse, a été décrite capable de phosphoryler CagA au cours de l'infection (Selbach *et al.*, 2002; Stein *et al.*, 2002). Les kinases c-Abl et Arg, membres de la famille des kinases Abl, pourraient également phosphoryler CagA (Poppe *et al.*, 2007; Tammer *et al.*, 2007). La phosphorylation de CagA est un processus hautement dynamique. Lors de l'établissement du SST4, l'interaction de CagL avec les intégrines $\alpha 5\beta 1$

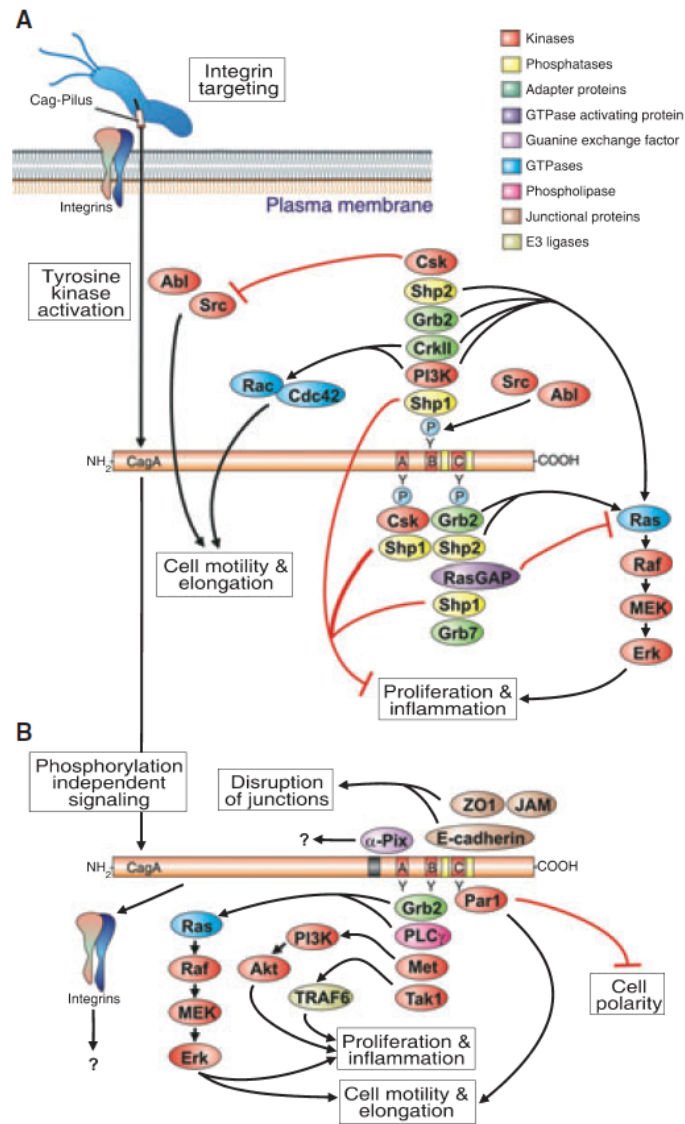


Figure 25 : Les partenaires cellulaires de la cytotoxine CagA.

(a) Les partenaires de CagA phosphorylée. Les tyrosines kinases Src et Abl phosphorylent CagA lors de sa translocation dans le cytoplasme de la cellule hôte. CagA phosphorylée peut influencer l'activation des GTPases, la motilité et l'élongation cellulaire.

(b) Les partenaires de CagA non phosphorylée. CagA non phosphorylée module des voies de signalisation impliquées dans la polarité cellulaire, les jonctions intercellulaires, la prolifération, la réponse inflammatoire, l'apoptose et le cycle cellulaire.

D'après (Backert *et al.*, 2010).

cours de l'infection par *H. pylori* (Fehri *et al.*, 2009; Ding *et al.*, 2010). Cependant, ces modifications ne dépendaient pas de la toxine CagA.

Par ailleurs, on ne peut pas exclure la présence d'une séquence régulatrice en dehors de la région promotrice que nous avons clonée. Son absence de notre vecteur rapporteur contenant le promoteur putatif pourrait expliquer l'expression du gène rapporteur dans des lignées n'exprimant pas le *cluster* miR-371-372-373. La présence d'une région régulatrice pourra être recherchée en clonant des régions de plus grande taille situées en amont du *cluster*.

Enfin, la régulation du *cluster* au cours de l'infection pourrait avoir lieu à une étape post-transcriptionnelle, notamment au niveau du pri-miRNA. Houbaviy *et al* ont montré que le pri-miRNA du *cluster* miR-290 subissait un épissage (Houbaviy *et al.*, 2005). La région épissée était située entre le promoteur putatif du *cluster* et le pre-miR-290. Notre analyse bio-informatique a permis de confirmer la présence de cette région dans le *cluster* miR-371-372-373 entre la région F1 et le pre-miR-371. La transcription de cette région a été confirmée par RT-PCR (données non montrées). L'épissage de cette région devra cependant être confirmé par la technique de *RNAse protection assay* (RPA). L'épissage du pri-miRNA est peut être nécessaire pour que ce dernier soit maturé par Drosha. En effet, des travaux ont montré que l'épissage du pri-let-7 était requis pour l'expression des miRNAs matures (Bracht *et al.*, 2004). Afin d'étudier le rôle de cet épissage dans la maturation du pri-miRNA et son lien potentiel avec la répression du *cluster* au cours de l'infection, cette région pourra être clonée en amont d'un gène rapporteur. L'expression du gène rapporteur pourra être ainsi facilement analysée et l'épissage pourra être suivi par RT-PCR et RPA.

Ces travaux, bien que préliminaires, représentent la première caractérisation du promoteur putatif du *cluster* miR-371-372-373. Son clonage dans un vecteur rapporteur constitue un outil adéquate afin d'étudier les mécanismes mis en jeu.

3. Rôle de la toxine CagA dans la répression du *cluster* miR-371-372-373.

La cytotoxine CagA constitue le facteur de virulence majeur de *H. pylori*. Sa présence dans une souche est associée à des risques accrus de développer des pathologies sévères, notamment les ulcères peptiques et les adénocarcinomes gastriques. Le rôle de cette oncoprotéine au cours de l'infection ainsi que ses interactions avec les voies de signalisation cellulaire sont de mieux en mieux caractérisées. L'utilisation de mutants isogéniques de *H. pylori* mutés pour la toxine CagA (mutant Δ CagA) ou pour le SST4 (mutant Δ CagE) (Figure

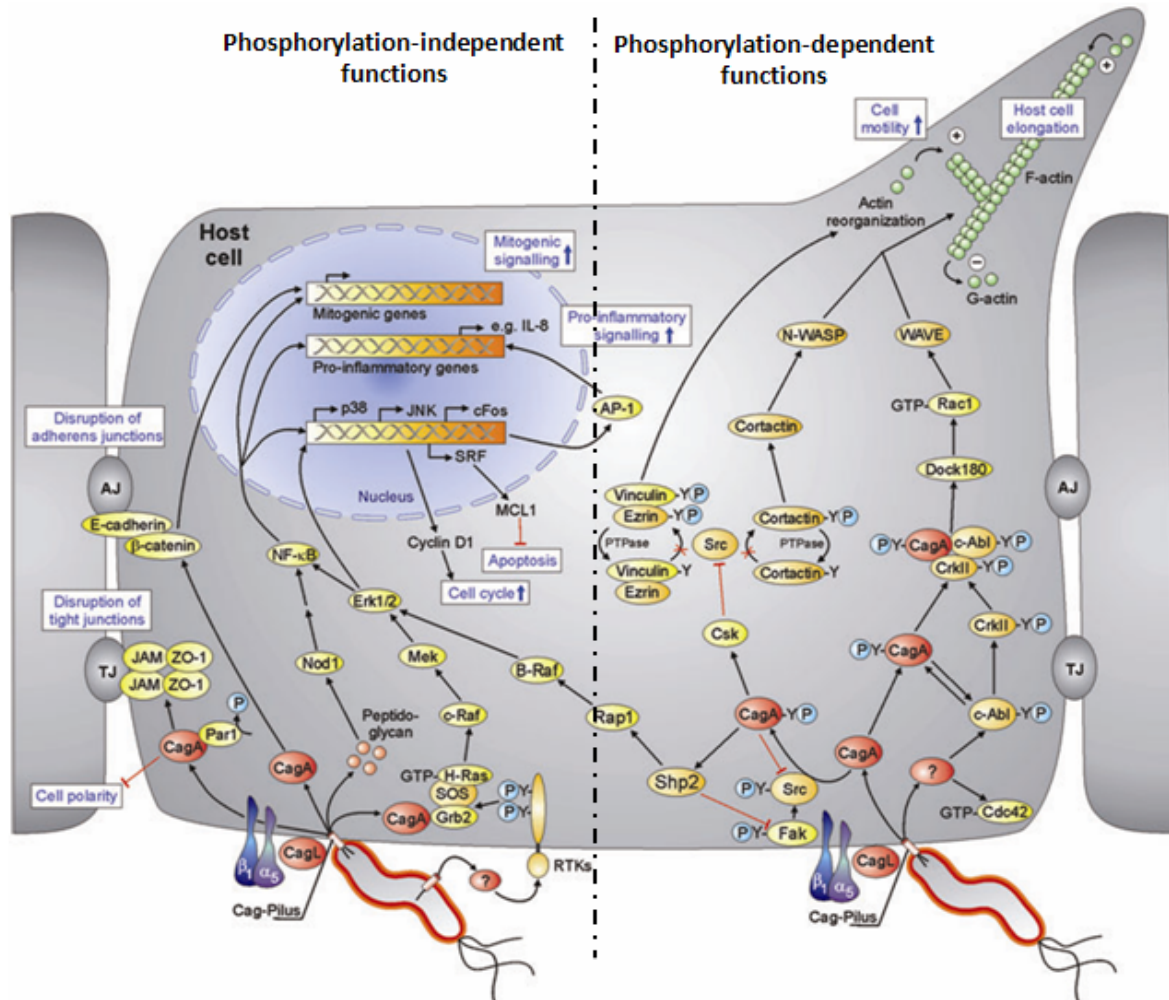


Figure 26 : Les fonctions cellulaires de la cytotoxine CagA.

En interagissant avec de nombreuses protéines cellulaires, la cytotoxine CagA (rouge) interfère avec de nombreuses voies de signalisation et provoque l'inhibition de l'apoptose, la prolifération, la désorganisation des jonctions serrées et adhérentes, la perte de la polarité cellulaire, le réarrangement du cytosquelette d'actine, la motilité et l'élongation cellulaire. Elle participe également à la réponse inflammatoire.

Les fonctions dépendantes de la phosphorylation de CagA sont présentées à droite, tandis que les fonctions indépendantes de cette phosphorylation sont illustrées à gauche.

Adaptée de (Backert and Selbach, 2008).

phosphorylation de ces protéines, et conduit à l'allongement cellulaire (Figure 26). De plus, l'inactivation de Src constitue une boucle de rétrocontrôle négative qui permet de réguler le niveau de CagA-P dans les cellules.

Enfin, une troisième voie de signalisation est impliquée dans l'allongement cellulaire : en interagissant avec la protéine adaptatrice CrkII, CagA-P active la voie Rac1. Ce phénomène est amplifié par la kinase Abl, activée par CagA, qui phosphoryle CrkII (Figure 26) (Suzuki *et al.*, 2005).

Ainsi, CagA-P est capable d'interagir avec un grand nombre de facteurs de signalisation cellulaire impliqués notamment dans le phénotype « colibri » observé au cours de l'infection. Cependant, tous les effets cellulaires de la cytotoxine CagA ne dépendent pas de sa phosphorylation.

3.5.2.1.3.5 Fonctions cellulaires indépendantes de la phosphorylation de CagA.

Onze partenaires cellulaires de CagA non phosphorylée ont été décrits. A la différence des partenaires cellulaires de CagA-P, qui sont essentiellement impliqués dans l'allongement et la motilité de la cellule infectée, les 11 protéines en interaction avec CagA non phosphorylée interviennent dans la réponse inflammatoire, le cycle cellulaire, les jonctions et la polarité cellulaire (Figure 25b, p61).

Le premier partenaire identifié de CagA non phosphorylée est la protéine adaptatrice Grb2 (*Growth factor receptor-bound protein 2*) (Mimuro *et al.*, 2002). L'interaction CagA/Grb2 conduit au recrutement d'autres partenaires et aboutit à l'activation de la voie de signalisation Erk (Figure 26). Cette voie participe directement à l'allongement cellulaire observé au cours de l'infection, mais elle stimule également un certain nombre de facteurs de transcription tels que NF- κ B, AP-1 et le SRF (*Serum Responsive Factor*). Ces facteurs de transcription sont à l'origine de l'expression de nombreuses protéines impliquées dans la prolifération cellulaire, l'apoptose et l'inflammation, telles que l'IL-8, une cytokine pro-inflammatoire et MCL1 (*Induced myeloid leukemia cell differentiation protein 1*), un facteur anti-apoptotique appartenant à la famille *Bcl-2*. De même, CagA non phosphorylée active le facteur de transcription NFAT, alors que la toxine VacA l'inhibe (Yokoyama *et al.*, 2005). Il existe donc un antagonisme fonctionnel entre CagA et VacA concernant le contrôle de la voie de signalisation NFAT.

Un autre effet cellulaire important lié à CagA non phosphorylée est la dissociation des jonctions cellule-cellule. Les épithéliums sont des barrières fonctionnelles protégeant

notamment les organismes des agressions par les pathogènes. Leur intégrité est strictement régulée et implique les jonctions serrées et adhérentes entre les cellules. Outre leur rôle dans l'établissement de cette barrière, ces jonctions régulent également plusieurs fonctions épithéliales, telles que la polarité baso-latérale de ces cellules, la prolifération, l'adhésion, et leur motilité. Lors de l'infection, *H. pylori* est capable d'altérer ces jonctions, afin de rompre cette barrière et ainsi établir sa niche. En effet, CagA est capable d'interagir avec différents composants des jonctions serrées et adhérentes (Figure 26, p62), avec pour conséquence une dissociation des complexes jonctionnels, une perte de ces jonctions et une fragilisation de l'épithélium gastrique.

Les jonctions serrées sont des structures essentielles pour le maintien de la polarité des cellules épithéliales, car elles empêchent la perte de molécules à travers les épithéliums et la diffusion de protéines membranaires et de lipides entre le pôle apical et baso-latéral de la cellule. CagA interagit avec la protéine PAR1b/MARK2 (*Partitioning-defective 1b/microtubule affinity regulating kinase-2*). PAR1b est une sérine/thréonine kinase localisée au niveau baso-latéral des cellules épithéliales, et dont le rôle essentiel est de maintenir la polarité cellulaire. La fixation de CagA à PAR1b bloque son activité kinase, ce qui conduit à la perte des jonctions serrées et de la polarité cellulaire, et par conséquent à la désorganisation de l'épithélium gastrique (Saadat *et al.*, 2007). De plus, en phosphorylant les protéines associées aux microtubules, PAR1b participe à la formation du fuseau mitotique au cours de la division cellulaire. Par conséquent, en inhibant PAR1b, CagA pourrait causer une instabilité chromosomique et participer ainsi à la carcinogénèse (Lu *et al.*, 2009). D'autre part, CagA interagit également avec les protéines des jonctions serrées ZO-1 (*Zonula Occludens-1*) et JAM (*Junctional Adhesion Molecule*). Ces interactions induisent la relocalisation de ces protéines au niveau du site d'attachement de la bactérie et par conséquent la dissociation des jonctions serrées (Amieva *et al.*, 2003).

Les jonctions adhérentes sont constituées d'un complexe protéique comprenant la protéine transmembranaire E-cadhérine, l' α - et la β -caténine (Figure 26, p62). CagA interagit avec l'E-cadhérine, déstabilisant ainsi le complexe E-cadhérine/ β -caténine et libérant la β -caténine dans le cytoplasme (Murata-Kamiya *et al.*, 2007). Ce co-facteur de transcription est alors transloqué vers le noyau de la cellule, où il va pouvoir activer la transcription de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire notamment.

En conclusion, *H. pylori* est parfaitement adaptée à l'environnement particulièrement hostile de l'estomac. Son répertoire de facteurs de colonisation et de virulence lui permet de

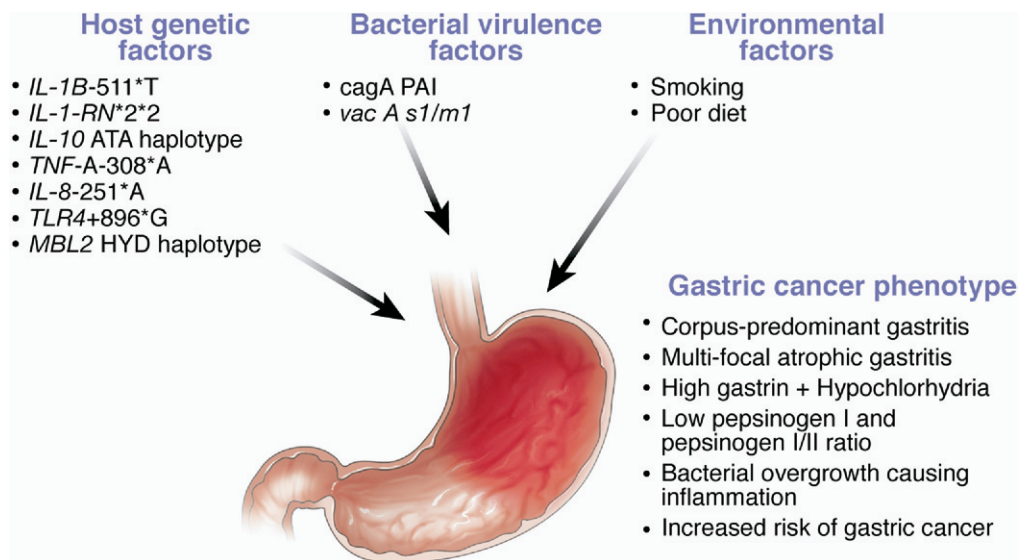


Figure 27 : Contribution des facteurs environnementaux, de l'hôte et bactériens à la pathogénèse de *H. pylori*.

Ces facteurs s'associent pour créer un environnement gastrique caractérisé par une inflammation chronique, une hypochloridie, une prolifération de la bactérie et un stress génotoxique pour la muqueuse gastrique. Cet environnement conduirait à long terme au développement du cancer gastrique.

D'après (Amieva and El-Omar, 2008).

coloniser durablement la muqueuse gastrique et d'échapper au système immunitaire de l'hôte. La sévérité des pathologies associées à l'infection dépendent de nombreux facteurs liés à l'environnement, à l'hôte et à la bactérie (Figure 27). Les travaux récents ont permis de montrer que la cytotoxine CagA possède un rôle central dans la pathogénèse, et surtout dans la carcinogénèse induite par cette bactérie. Elle est capable de perturber des voies de signalisation très diverses, dont certaines sont directement liées au cancer. Le rôle des miRNAs dans les cancers et dans la défense contre les pathogènes amène évidemment la question de leur implication au cours de l'infection par *H. pylori*.

Chapitre IV : Le rôle des miRNAs au cours de l'infection par *Helicobacter pylori*.

1. Introduction.

H. pylori est capable de perturber gravement de nombreuses voies de signalisation cellulaire, touchant de nombreux processus tels que la prolifération, l'apoptose, la migration cellulaire et l'immunité. Ces bouleversements cellulaires s'accompagnent d'une profonde modification de l'expression des gènes de la cellule affectée. Ces changements peuvent aboutir à la transformation tumorale de cette cellule et, par conséquent au cancer gastrique. Connaissant le rôle essentiel des miRNAs dans la régulation de l'expression génique et leur implication dans la défense contre les pathogènes ainsi que dans la carcinogénèse, il est donc probable qu'ils jouent un rôle au cours de l'infection par *H. pylori* ainsi que dans le développement des pathologies associées. Au cours de ces dernières années, un nombre croissant de publications a montré la dérégulation de nombreux miRNAs dans les cancers gastriques (pour revue : (Wu *et al.*, 2010)). Ces miRNAs sont impliqués dans la régulation de nombreux processus physiologiques tels que la prolifération, l'apoptose ou la régulation transcriptionnelle. Sachant que *H. pylori* constitue le facteur de risque majeur pour le développement d'un cancer gastrique, on peut donc faire l'hypothèse que cette bactérie pourrait jouer un rôle dans la dérégulation des miRNAs dans les cellules gastriques. Ce rôle pourrait être direct par l'intermédiaire de sa toxine CagA qui est considérée comme une oncoprotéine, ou indirect via l'inflammation chronique que cette bactérie induit tout au long de la vie de l'individu. En effet, CagA est capable d'interagir avec de nombreuses protéines cellulaires et il n'est pas exclu une interaction de cette toxine avec les composants du *RNA silencing* tels que les protéines AGO ou l'enzyme Dicer. De même, plusieurs miRNAs impliqués dans la régulation de l'inflammation tels que miR-155 et miR-146, possèdent également des propriétés oncogéniques.

Au début de nos travaux, aucune étude n'avait relaté la modulation de miRNAs au cours de l'infection par *H. pylori*. Cependant, un certain nombre de voies de signalisation cellulaire impliquées dans la régulation de miRNAs étaient affectées au cours de l'infection par *H. pylori*. Ces observations nous ont amené à émettre un certain nombre d'hypothèses qui ont fait l'objet d'une revue.

2. Revue publiée :

***Helicobacter pylori* and gastric cancer : possible role of miRNAs
in this intimate relationship.**

***Helicobacter pylori* and gastric cancer: possible role of microRNAs in this intimate relationship**

C. Belair, F. Darfeuille and C. Staedel

INSERM U869, Université Victor Segalen Bordeaux 2, 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux, Cedex, France

Abstract

Chronic infection by *Helicobacter pylori* is a major risk factor for gastric adenocarcinoma and mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *H. pylori* possesses a set of virulence factors, including the CagA effector, which interferes with intracellular signalling pathways and mediates phenotypic alterations, strongly evoking neoplastic transformation. MicroRNAs (miRNAs) are post-transcriptional regulators of gene expression involved in development, cell proliferation and immune responses. miRNAs are frequently altered in cancers, revealing their functions as oncogenes or tumour suppressors. However, the role, if any, that miRNAs play in the host cell responses to *H. pylori* remains unknown. This review considers the possible involvement of some miRNAs, including miR-146, miR-155, miR-21, miR-27a, miR-106-93-25 and miR-221-222 clusters and the miR-200 family in *H. pylori*-induced infection and gastric cancers. Further exploration of miRNA-mediated gene silencing, taking into account the relationship between host targets and bacterial effectors, will most certainly bring new insights into the control of gene expression in human gastric cells chronically infected by *H. pylori*.

Keywords: Cancer, gastric mucosa, *Helicobacter pylori*, microRNA, post-transcriptional gene regulation

Clin Microbiol Infect 2009; **15**: 806–812

Corresponding author and reprint requests: C. Belair, INSERM U869, Université Victor Segalen Bordeaux 2, 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux, Cedex, France
E-mail: cathy.staedel@inserm.fr; cedric.belair@inserm.fr

Gastric cancer is the second leading cause of cancer-related death worldwide [1]. The major risk factor associated with gastric adenocarcinoma is infection by *Helicobacter pylori*, a Gram-negative microaerophilic bacterium that colonizes the gastric mucosa of approximately 50% of the human population. It induces a chronic gastric inflammation, which evolves in approximately 10% of cases towards more severe forms of gastric diseases, such as peptic ulcer, gastric carcinoma and mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma. Chronic inflammation represents a major pathological background for human malignancies. *H. pylori* possesses a set of virulence factors for colonizing the gastric mucosa and establishing a chronic infection. Notably, the most virulent strains harbour the *cag* pathogenicity island (*cag* PAI), which encodes a type IV secretion system (T4SS) and the protein CagA. Once translocated into the host cell cytoplasm, CagA is phosphorylated by Src kinases and can subsequently interfere with intracellular signalling pathways, leading to cell proliferation, cytoskeletal rearrangement, cell–cell adhesion loss, extracellular matrix remodelling and β -catenin pathway

activation [2]. All of these CagA-mediated phenotypic alterations strongly suggest a role of this bacterial effector in cell transformation. Other virulence factors associated with *H. pylori* pathogenesis are adhesins (BabA, HopZ, HopH), the vacuolating cytotoxin VacA, tumour necrosis factor (TNF)- α -inducing protein [3], and the T4SS, which interacts with integrins and injects the CagA protein and components of the peptidoglycan into the host cells [4,5].

Discovered approximately 10 years ago, microRNAs (miRNAs) are currently considered as crucial post-transcriptional regulators of gene expression. Their roles in development, cell proliferation and differentiation are widely recognized, as is their importance in the regulation of immune responses [6]. Furthermore, miRNAs are frequently altered in cancer cells and reveal their functions as either oncogenes or tumour suppressors [7,8]. The emerging role of miRNAs in diverse and fundamental cellular mechanisms suggests that proper control of these regulatory elements is essential for the maintenance of a nonpathological state.

Do miRNAs play any role in the host cell responses to *H. pylori* infection? To date, only one miRNA has been reported to be up-regulated in *H. pylori*-infected cells [9]. However, the abundant literature on changes in gene expression in cells and tissues infected by this pathogen, the growing amount of data on miRNAs implicated in cancer, including gastric cancer and lymphomas, and in infection, make it worthwhile to study the possible involvement of other miRNAs in the response of the gastric mucosa to *H. pylori* infection. This could provide additional insights into the mechanisms by which this pathogen causes chronic inflammation and gastric pathologies. This review summarizes the currently available knowledge concerning the role of miRNAs in infection and carcinogenesis and raises the question of the possible involvement of some miRNA in *H. pylori*-induced infection and gastric cancer.

Human miRNA Biogenesis

MiRNAs are small noncoding RNAs that regulate gene expression by post-transcriptional silencing, most usually after binding to the 3' untranslated region (UTR) of mRNAs. MiRNAs are generated from sequential processing of longer primary transcripts by Drosha and Dicer RNases (Fig. 1). Active mature miRNAs are single-stranded RNA, 20–25 nucleotides long, integrated in a RNA-induced silencing complex and associated with the 3' UTR of specific target mRNAs to suppress their translation. RNA silencing could involve P-bodies, where the miRNA-targeted mRNAs would be relocalized [10,11].

Bioinformatic analyses lead to an estimation that as many as 30% of human genes are targets of miRNA [12]. Currently, there are 678 mature human miRNA sequences listed in the miRNA registry (<http://www.microrna.sanger.ac.uk>), with approximately 1000 predicted miRNAs, each potentially targeting approximately 200 genes.

miRNAs in the Host Response to Pathogens

Innate immunity and miRNAs

Cells recognize invading pathogens and/or their secreted effectors through 'pathogen-recognition molecules', known as Toll-like receptors (TLR) and Nod-like receptors (NLR), located on the cell membrane and in the cytoplasm, respectively. Pathogen-recognition molecules subsequently activate a set of adaptor proteins and transcription factors mediating

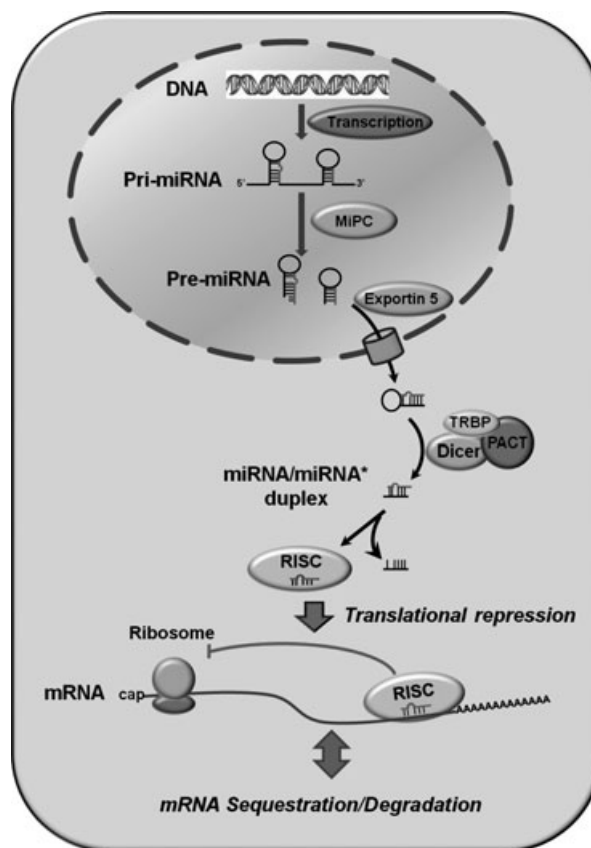


FIG. 1. Most microRNAs (miRNAs) are transcribed by RNA polymerase II (with a few exceptions that are transcribed by RNAPol III) as primary transcripts (pri-miRNAs) from independent genes or gene clusters, or sequences included in mRNA introns. These long pri-miRNAs are processed into approximately 70-nucleotide long precursor hairpins (pre-miRNAs) by the nuclear microprocessor complex (MiPC) composed notably of the RNase III-type Drosha endoribonuclease, in association with the double-stranded RNA-binding protein DGCR8 (DiGeorge syndrome critical region gene 8). Interestingly, some are generated in a microprocessor-independent fashion as spliced-out introns (mirtrons) [54]. Exportin5 then transports pre-miRNAs to the cytoplasm where they are cleaved into 20–25-bp miRNA duplexes by another RNase III-type endonuclease, Dicer, complexed in particular to TRBP (TAR RNA-binding protein) and the PKR activator PACT. One strand is selected to function as mature miRNA and is incorporated into the miRNA-induced silencing complex (RISC), which contains members of the argonaute protein family, whereas the other strand is degraded. The miRNA-RISC complex associates with the 3' untranslated region (3' UTR) of targeted mRNAs. The target mRNA is then silenced by translational inhibition or RNA degradation. This RNA silencing could implicate the P-bodies where the miRNA-mRNA duplexes could be re-localized [10,11].

host innate immunity such as the nuclear factor- κ B (NF- κ B) and the activator protein 1 (AP-1) pathways. NF- κ B has been identified as a potential molecular bridge between inflammation and cancer because improper NF- κ B activation transactivates several target genes harbouring inflammatory (e.g. cyclooxygenase 2, inducible nitric oxide synthase, TNF- α), anti-apoptotic (e.g. cIAP1 and 2, XIAP, Bcl-2, Bcl-3, Bcl-xL), cell cycle regulatory (e.g. cyclin D1) and proangiogenic (e.g. vascular endothelial growth factor, angiopoietin) functions, and/or down-regulates apoptosis-inducing genes (e.g. p53, Bax, Bad), thus contributing to tumourigenesis [13].

The involvement of miRNAs in the innate and adaptive immune responses is now established. MiR-155 and miR-146a are involved in innate immunity by regulating the acute inflammatory response in monocyte/macrophages after pathogen recognition by TLR. MiR-146a, induced by NF- κ B via TLR2, 4, 5 signalling, targets the TLR-signalling adaptators IRAK1 and TRAF6, placing this miRNA into a negative-feedback loop, regulating TLR signalling in response to bacterial products [14]. MiR-155 is induced during both bacterial and viral infection in myeloid cells through the TLR pathway, as well as by pro-inflammatory cytokines. It down-regulates FADD, RIP and IKK, other components of the TLR signalling mechanism [15]. Conversely, miR-125b is decreased in parallel to miR-155 up-regulation. MiR-125b represses TNF- α synthesis, ensuring the suppression of this pro-inflammatory cytokine under noninfectious conditions, whereas its decrease allows for TNF- α production to occur after TLR stimulation [16]. MiR-155 is up-regulated in activated B and T cells and in the germinal B cell centre [17]. This miRNA is best known for its involvement in the development of B-cell malignancies; it has been found at high levels in human B cell lymphomas [18,19], and enforced miR-155 overexpression in mouse B cells is sufficient to trigger murine B cell lymphoma [20]. It is encoded in the *BIC* locus, which represents a common viral integration site in chickens. Because of its involvement in both the innate immune response and its oncogenic potential, miR-155 could comprise an additional bridge between inflammation and cancer [21].

Exploitation of Host-cell miRNAs Pathways by Pathogens

Microbes have evolved strategies to circumvent the host immune response with the aim of establishing a sustainable infection. This includes the development of effectors that are able to interfere with the miRNA pathway. Viruses provide several examples of proteins hijacking miRNAs, thus favouring virus replication: the tomato bushy stunt virus p19 [22],

the mammalian *Nodamura* virus B2 [23], or the primate foamy virus I Tas proteins [24]. Pathogens can also take advantage of host cell miRNAs; for example, the liver-specific miR-122 enhances hepatitis C virus replication rate [25]... The parasite *Plasmodium falciparum* better survives in *Anopheles gambiae* when miRNA maturation is impaired [26].

Bacterial suppressors of the miRNA network have been recently identified in plants [27]. It was reported that *Pseudomonas syringae*, a Gram-negative bacterium, injected bacterial effectors through a type III secretion system to suppress PAMP-responsive miRNAs. This repression took place at multiple levels: transcription, miRNA biogenesis, stability and activity. This is the first example of a bacterium hijacking the miRNA system, leading to the possibility that human pathogenic bacteria, including *H. pylori*, have also evolved to suppress miRNA silencing to ensure persistent infection.

miRNAs and Gastric Cancers

MiR-21-induced expression upon *H. pylori* infection

MiR-21 is consistently up-regulated in solid human cancers, including the stomach, as compared with matching noncancerous tissue [19]. Direct targets of miR-21 have been identified, with all of them being tumour suppressors: the PTEN phosphatase [28], the actin-binding protein tropomyosin 1 [29] and the reversion-inducing-cysteine-rich protein with Kazal motifs [30]. Thus, this single miRNA provides a significant survival advantage to cells upon deregulation.

In a recent study, Zhang *et al.* [9] found that miR-21 was over-expressed in gastric cancer tissue samples and cell lines, as well as in chronically *H. pylori*-infected gastric epithelium tissue, as opposed to noninfected tissue. MiR-21 was also up-regulated in cultured gastric epithelial cells upon co-culture with *H. pylori*. This is the first evidence of miRNA modulation upon *H. pylori* infection. Zhang *et al.* [9] showed that over-expression of miR-21 promoted cell proliferation and migration and inhibited apoptosis in this cell line. AP-1 and the signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) are able to induce miR-21 [31,32]. NF- κ B activation and interleukin (IL)-6 secretion in the gastric mucosa, which activate AP-1 and STAT3, respectively, could explain miR-21 up-regulation during *H. pylori* infection.

Specific over-expression of miR-106b, -93, -25 in gastric cancers

In patients suffering from *H. pylori*-induced gastritis, a relationship was found among *cagA*-positive strains, epithelial proliferation and inflammatory reaction, mostly located at the antral lesser curvature, an area where most carcinoma

arise. The intricate balance of pro- and anti-inflammatory cytokines in chronic inflammation may mediate the outcome of *H. pylori* infection by affecting cell proliferation and apoptosis. Among the anti-inflammatory cytokines, transforming growth factor (TGF) β is involved in mucosal immunity and morphogenetic programming, comprising a cross-talk between the epithelial and stromal compartments that guides gastrointestinal cells toward proliferation, differentiation and apoptosis, thus controlling the physiological turnover of epithelial cells [33].

The downstream effectors of TGF β -dependent cell cycle arrest and apoptosis are the cyclin-dependent kinase inhibitor p21^{CIP1/WAF1} and the pro-apoptotic factor Bim, respectively. TGF β induced a marked down-regulation of the E2F1 protein and *Mcm7* mRNA as cells physiologically underwent G1/S cell cycle arrest. Furthermore, gastric tumours of diffuse type are characterized by E2F1 up-regulation and TGF- β resistance. In a microarray analysis of miRNAs associated with gastric mucosa inflammation, preneoplastic lesions or carcinomas, Petrocca et al. [35] identified several miRNAs that are associated with chronic inflammation, including up-regulated miRNAs (miR-1, miR-155) and down-regulated miRNAs (miR-205, -303, -202, -20 and 26b), as well as others that were up-regulated in human gastric adenocarcinomas, namely miR-106b, miR-93 and miR-25. Petrocca et al. [35] provide evidence that miR-106b, miR-93 and miR-25 alter the physiological response of gastric cancer cells to TGF- β , affecting both the cell cycle and apoptosis [35,36]. E2F1 is a transcriptional factor required for the G1/S transition. In resting cells, it is sequestered by the unphosphorylated retinoblastoma protein pRb. Although E2F1 self-activates its own promoter through a positive-feedback loop, it also transactivates a cluster of intronic miRNAs, miR-106b, miR-93 and miR-25, hosted in the *Mcm7* gene, inducing their accumulation in gastric primary tumours and gastric epithelial cell lines [35,36]. Conversely, miR-106b and miR-93 decrease E2F1 expression, establishing a negative-feedback loop preventing E2F1 self-activation. MiR-106b, miR-93 and miR-25 also silence p21^{CIP1/WAF1} in addition to E2F1, leading to a decreased response of gastric cells to TGF β (i.e. cells continue to grow despite a high level of the cytokine).

Prolonged exposure to TGF β leads to apoptosis. MiR-25, but not miR-106b or miR-93, negatively influences Bim in gastric cell lines through a post-transcriptional regulatory mechanism. Anti-apoptotic and pro-apoptotic responses associated with miR-106b, -93 and -25 emerge in the late phase of TGF β stimulation, when cell cycle arrest is revoked and apoptosis becomes the dominant process characterizing the response of a gastric cell to TGF β . This is relevant in a

gastric cancer model because impairment of the TGF β -mediated tumour suppressor pathway is a critical step in the development of gastric tumours.

A paralogue to the miR-106b-25 cluster is the miR-17-92 cluster at chromosome 13q31, encoding miR-17, miR-18a, miR-19a, miR-20a, miR-19b-1 and miR-92-1. The miR-17-92 cluster also harbours an oncogenic potential; indeed, miR-17-92 transcripts are elevated in B cell lymphomas [37] as well as in lung, colon and pancreas carcinomas [19], and ectopic expression of miR-17-92 causes lymphoproliferative disease and autoimmunity [38]. miRNAs encoded by that cluster are up-regulated in gastric tumour samples compared to the normal counterpart [39].

In addition to the miR-106b-25 cluster, the miR-221-222 cluster also has highly increased gastric tumour samples and, interestingly, the expression patterns of the two clusters correlate with each other [39]. Although p21^{CIP1/WAF1} was confirmed as miR-106b and miR-93 targets, there was evidence that mir-25, mir-221 and mir-222 silenced p57^{kip2} and p27^{kip1}, which are other cyclin-dependent-kinase inhibitors of the cip/kip family. Thus, these two clusters appear to be functionally co-regulated to facilitate G1/S transition in gastric tumour cells.

Putative Role of miRNAs in *H. pylori* Infection and Gastric Cancer

MiR-146, miR-155 and immunity

In *H. pylori* infection, the gastric epithelial cells provide the first line of defence against this noninvasive pathogen. In these cells, the innate immune response is characterized by the activation of the NF- κ B pathway in a NLR Nod1-dependent manner in response to *H. pylori* peptidoglycan, which is injected into the host cell cytoplasm via the T4SS [5]. This activation leads to IL-8 secretion. Other pathogen-recognition molecules, such as TLR2, TLR4 and TLR5, which sense specific Gram-negative bacterial components, including lipoproteins, lipopolysaccharide and flagellin, respectively, appear to play a minor role in the recognition of *H. pylori* by gastric epithelial cells [40]. However, miR-146a and miR-155 are not expressed in gastric epithelial cells during infection, raising the question of which miRNAs (if any) are involved in feedback regulation of NF- κ B in those cells.

Myeloid cells (monocyte/macrophage and dendritic cells) constitute the second line of defense, sensing *H. pylori* components via TLR2, TLR4 or Nod1 signalling, and secrete pro-inflammatory cytokines such as IL-6, IL-1 β and TNF- α in order to establish T and B lymphocyte-mediated adapta-

tive immunity [40]. MiR-146a and miR-155 are likely to be induced in myeloid and/or lymphocytes in response to the bacterium. Notably, the oncogenic miR-155 [16] and miR-17-92 [37] may deserve special attention in gastric MALT lymphoma, resulting from *H. pylori*-induced uncontrolled B cell proliferation.

Oncogenic miRNAs and *H. pylori*

Because specific miRNAs have been found up-regulated in gastric carcinomas, the question of their deregulation in gastric epithelium during *H. pylori* infection is obvious. As mentioned above, Zhang *et al.* [9] demonstrated a link between *H. pylori* infection and miR-21. That study should now be extended to other miRNAs implicated in gastric cancer, such as the miR-106b-25 and miR-221-222 clusters. A clue could be TGF- β , which is significantly and specifically increased by *H. pylori* in cultured gastric epithelial cells and monocytes. This effect was attributed to a soluble protein of the bacteria [34], which may, in this way, modulate the immune response, contribute to the persistence of *H. pylori* infection, and dysregulate the physiological turnover of gastric epithelial cells.

MiR-27a was also identified as an oncogenic miRNA in a gastric adenocarcinoma cell line, in which it targets the tumour suppressor prohibitin, an evolutionary conserved and ubiquitous protein interacting with pRb and its family members [41]. Another miR-27a target, the zinc finger ZBTB10, a transcriptional repressor of specificity protein (Sp) transcription factors, has been identified in breast carcinoma cells [42]. Sp factors are over-expressed in tumours, notably in gastric tumours, and contribute to the proliferative and angiogenic phenotype associated with cancer cells. Inhibition of miR-27a resulted in increased expression of ZBTB10 mRNA, decreased expression of Sp factors, and cell cycle arrest. This latter response was associated with the induction of Myt-1, another miR-27a target, which blocks G2/M transition through inactivation of the cdc2 cyclin-dependent kinase. Thus, the oncogenic activity of miR-27a is a result, at least in part, to the suppression of ZBTB10 and Myt-1. This mechanism may be relevant to *H. pylori*-induced, CagA-dependent progression to G2/M in gastric epithelial cells [43].

It is expected that multiple miRNAs may contribute to tumour development and that some miRNAs may have cooperative or redundant functions.

MiR-200 family and the epithelial-to-mesenchymal transition (EMT)

H. pylori induces an invasive phenotype in epithelial cells that resembles an EMT. Indeed, CagA, once injected into the host cell, changes the epithelial cell morphology by disrupting cell–cell junctions and inducing loss of apical–basolateral

polarity [2]. By its interaction with several junction proteins, including ZO-1, JAM and E-cadherin, CagA disturbs the assembly and function of both tight and adherent junctions [2]. Its interaction with E-cadherin leads to the release of β -catenin complexed to E-cadherin and the subsequent activation of the Wnt/ β -catenin signalling pathway [51,52]. Deregulation of β -catenin plays a crucial role in gastrointestinal cancers. Numerous targets of this transcription factor have been described, including genes implicated in proliferation, tumour invasion and metastasis. Regarding the miRNAs, a correlation between miR-375 repression and β -catenin-activating mutation in hepatocellular adenoma and carcinoma has been described [53]. However, the mechanism of this repression remains to be elucidated. In addition, a direct connection between E-cadherin and gastric carcinogenesis has been demonstrated through the finding that genetic mutations in *CDH1*, the gene encoding E-cadherin, are associated with hereditary diffuse gastric cancer [44]. The miR-200 family, which includes miR-200a, b, c, miR-141 and miR-429, inhibits EMT and invasion in cancer cells [45–48]. All of these members are implicated in a negative regulation loop, in which they repress the E-cadherin transcriptional repressors ZEB1 and ZEB2/SIPI (Zinc-finger E-box Binding homeobox 1 and 2), themselves down-regulating the miR-200 family transcription. The expression of these miRNAs is lost in invasive cancer cells harbouring a mesenchymal phenotype. Moreover, ZEB2/SIPI also represses cyclin D1 transcription [49]. This cyclin, which promotes G1/S transition, is induced via AP-1 and the cAMP-response element in gastric epithelial cells during *H. pylori* infection and under CagA dependence [50]. Therefore, a role of the miR-200 family and ZEB repressors is likely in the EMT-like phenotype observed in *H. pylori*-infected cells.

Conclusions

The miRNA family has recently emerged to challenge the accepted paradigm of gene regulation by the combinatorial action of transcriptional factors activating or repressing specific genes. It has been proposed that they can act as developmental switches and fail-safe regulators of transcriptional programmes. Regulatory loops can be established between genes coding for classical transcriptional factors and genes coding for miRNAs. It should be noted that, for a comprehensive understanding of the role of a given miRNA, the direct relationship between a miRNA and the expression of a particular target may be more important in some situations than in others, depending on the cellular context. Consequently, the therapeutic potential of miRNAs may be strictly

associated with the occurrence of specific miRNA-dependent function alterations. Further exploration of miRNA-mediated gene silencing, taking into account the host miRNA/host target/bacterial effector relationship, most certainly will bring new insights into how these small regulatory RNAs modulate gene expression in human cells that chronically harbour *H. pylori*.

Acknowledgements

We are very grateful to F. Mégraud and members of his laboratory (INSERM U853, Bordeaux, France) for their fruitful and helpful discussions on *Helicobacter* infection-related studies.

Transparency Declaration

F. D. and C. S. acknowledge the Association pour la Recherche contre le Cancer and La Ligue Nationale contre le Cancer for constant funding support of their research. The authors state that they have no conflict of interest.

References

1. Peek RM Jr, Blaser MJ. *Helicobacter pylori* and gastrointestinal tract adenocarcinomas. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 28–37.
2. Wessler S, Backert S. Molecular mechanisms of epithelial-barrier disruption by *Helicobacter pylori*. *Trends Microbiol* 2008; 16: 397–405.
3. Suganuma M, Yamaguchi K, Ono Y et al. TNF- α -inducing protein, a carcinogenic factor secreted from *H. pylori*, enters gastric cancer cells. *Int J Cancer* 2008; 123: 117–122.
4. Kwok T, Zabler D, Urman S et al. *Helicobacter* exploits integrin for type IV secretion and kinase activation. *Nature* 2007; 449: 862–866.
5. Viala J, Chaput C, Boneca IG et al. Nod1 responds to peptidoglycan delivered by the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island. *Nat Immunol* 2004; 5: 1166–1174.
6. Baltimore D, Boldin MP, O'Connell RM, Rao DS, Taganov KD. MicroRNAs: new regulators of immune cell development and function. *Nat Immunol* 2008; 9: 839–845.
7. Barbarotto E, Schmittgen TD, Calin GA. MicroRNAs and cancer: profile, profile, profile. *Int J Cancer* 2008; 122: 969–977.
8. Lu J, Getz G, Miska EA et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 2005; 435: 834–838.
9. Zhang Z, Li Z, Gao C et al. miR-21 plays a pivotal role in gastric cancer pathogenesis and progression. *Lab Invest* 2008; 88: 1358–1366.
10. Kato M, Slack FJ. microRNAs: small molecules with big roles – C. elegans to human cancer. *Biol Cell* 2008; 100: 71–81.
11. Schickel R, Boyerinas B, Park SM, Peter ME. MicroRNAs: key players in the immune system, differentiation, tumorigenesis and cell death. *Oncogene* 2008; 27: 5959–5974.
12. Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 2005; 120: 15–20.
13. Pikarsky E, Porat RM, Stein I et al. NF- κ B functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer. *Nature* 2004; 431: 461–466.
14. Taganov KD, Boldin MP, Chang KJ, Baltimore D. NF- κ B-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 12481–12486.
15. O'Connell RM, Taganov KD, Boldin MP, Cheng G, Baltimore D. MicroRNA-155 is induced during the macrophage inflammatory response. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 1604–1609.
16. Tili E, Michaille J, Cimino A et al. Modulation of miR-155 and miR-125b levels following lipopolysaccharide/TNF- α stimulation and their possible roles in regulating the response to endotoxin shock. *J Immunol* 2007; 179: 5082–5089.
17. Tam W, Dahlberg JE. miR-155/BIC as an oncogenic microRNA. *Genes Chromosomes Cancer* 2006; 45: 211–212.
18. Jiang J, Lee E, Schmittgen T. Increased expression of microRNA-155 in Epstein-Barr virus transformed lymphoblastoid cell lines. *Genes Chromosomes Cancer* 2006; 45: 103–106.
19. Volinia S, Calin GA, Liu CG et al. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 2257–2261.
20. Costinean S, Zanesi N, Pekarsky Y et al. Pre-B cell proliferation and lymphoblastic leukemia/high-grade lymphoma in E(mu)-miR155 transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 7024–7029.
21. Karin M, Lawrence T, Nizet V. Innate immunity gone awry: linking microbial infections to chronic inflammation and cancer. *Cell* 2006; 124: 823–835.
22. Ye K, Malinina L, Patel DJ. Recognition of small interfering RNA by a viral suppressor of RNA silencing. *Nature* 2003; 426: 874–878.
23. Sullivan CS, Ganem D. A virus-encoded inhibitor that blocks RNA interference in mammalian cells. *J Virol* 2005; 79: 7371–7379.
24. Lecellier CH, Dunoyer P, Arar K et al. A cellular microRNA mediates antiviral defense in human cells. *Science* 2005; 308: 557–560.
25. Jopling CL, Yi M, Lancaster AM, Lemon SM, Sarnow P. Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific microRNA. *Science* 2005; 309: 1577–1581.
26. Winter F, Edaye S, Huttenhofer A, Brunel C. Anopheles gambiae miRNAs as actors of defence reaction against *Plasmodium* invasion. *Nucleic Acids Res* 2007; 35: 6953–6962.
27. Navarro L, Jay F, Nomura K, He SY, Voinnet O. Suppression of the microRNA pathway by bacterial effector proteins. *Science* 2008; 321: 964–967.
28. Meng F, Henson R, Wehbe-Janek H, Ghoshal K, Jacob ST, Patel T. MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer. *Gastroenterology* 2007; 133: 647–658.
29. Zhu S, Si ML, Wu H, Mo YY. MicroRNA-21 targets the tumor suppressor gene tropomyosin I (TPM1). *J Biol Chem* 2007; 282: 14328–14336.
30. Zhang L, Volinia S, Bonome T et al. Genomic and epigenetic alterations deregulate microRNA expression in human epithelial ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105: 7004–7009.
31. Fujita S, Ito T, Mizutani T et al. miR-21 Gene expression triggered by AP-1 is sustained through a double-negative feedback mechanism. *J Mol Biol* 2008; 378: 492–504.
32. Löffler D, Brocke-Heidrich K, Pfeifer G et al. Interleukin-6 dependent survival of multiple myeloma cells involves the Stat3-mediated induction of microRNA-21 through a highly conserved enhancer. *Blood* 2007; 110: 1330–1333.
33. van den Brink GR, Offerhaus GJ. The morphogenetic code and colon cancer development. *Cancer Cell* 2007; 11: 109–117.
34. Wu MS, Lin JT, Hsu PN et al. Preferential induction of transforming growth factor- β production in gastric epithelial cells and monocytes by *Helicobacter pylori* soluble proteins. *J Infect Dis* 2007; 196: 1386–1393.

35. Petrocca F, Visone R, Onelli MR *et al.* E2F1-regulated microRNAs impair TGFbeta-dependent cell-cycle arrest and apoptosis in gastric cancer. *Cancer Cell* 2008; 13: 272–286.
36. Petrocca F, Vecchione A, Croce CM. Emerging role of miR-106b-25/miR-17-92 clusters in the control of transforming growth factor beta signaling. *Cancer Res* 2008; 68: 8191–8194.
37. He L, Thomson JM, Hemann MT *et al.* A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature* 2005; 435: 828–833.
38. Xiao C, Srinivasan L, Calado DP *et al.* Lymphoproliferative disease and autoimmunity in mice with increased miR-17-92 expression in lymphocytes. *Nat Immunol* 2008; 9: 405–414.
39. Kim Y, Yu J, Han T *et al.* 2009 Functional links between clustered microRNAs: suppression of cell-cycle inhibitors by microRNA clusters in gastric cancer. *Nucleic Acid Research*, [Epub ahead of print].
40. Ferrero RL. Innate immune recognition of the extracellular mucosal pathogen, *Helicobacter pylori*. *Mol Immunol* 2005; 42: 879–885.
41. Liu T, Tang H, Lang Y, Liu M, Li X. MicroRNA-27a functions as an oncogene in gastric adenocarcinoma by targeting prohibitin. *Cancer Lett* 2008; 273: 233–242.
42. Mertens-Talcott SU, Chintharlapalli S, Li X, Safe S. The oncogenic microRNA-27a targets genes that regulate specificity protein transcription factors and the G2-M checkpoint in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Cancer Res* 2007; 67: 11001–11011.
43. Peek RM Jr, Blaser MJ, Mays DJ *et al.* *Helicobacter pylori* strain-specific genotypes and modulation of the gastric epithelial cell cycle. *Cancer Res* 1999; 59: 6124–6131.
44. Guilford PJ, Hopkins JB, Grady WM *et al.* E-cadherin germline mutations define an inherited cancer syndrome dominated by diffuse gastric cancer. *Hum Mutat* 1999; 14: 249–255.
45. Burk U, Schubert J, Wellner U *et al.* A reciprocal repression between ZEB1 and members of the miR-200 family promotes EMT and invasion in cancer cells. *EMBO Rep* 2008; 9: 582–589.
46. Christoffersen NR, Silahtaroglu A, Orom UA, Kauppinen S, Lund AH. miR-200b mediates post-transcriptional repression of ZFHXB. *Rna* 2007; 13: 1172–1178.
47. Gregory PA, Bert AG, Paterson EL *et al.* The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1. *Nat Cell Biol* 2008; 10: 593–601.
48. Park SM, Gaur AB, Lengyel E, Peter ME. The miR-200 family determines the epithelial phenotype of cancer cells by targeting the E-cadherin repressors ZEB1 and ZEB2. *Genes Dev* 2008; 22: 894–907.
49. Mejlvang J, Krijavetska M, Vandewalle C *et al.* Direct repression of cyclin D1 by SIP1 attenuates cell cycle progression in cells undergoing an epithelial mesenchymal transition. *Mol Biol Cell* 2007; 18: 4615–4624.
50. Chang YJ, Wu MS, Lin JT, Pestell RG, Blaser MJ, Chen CC. Mechanisms for *Helicobacter pylori* CagA-induced cyclin D1 expression that affect cell cycle. *Cell Microbiol* 2006; 8: 1740–1752.
51. Franco AT, Israel DA, Washington MK *et al.* Activation of beta-catenin by carcinogenic *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 10646–10651.
52. Murata-Kamiya N, Kurashima Y, Teishikata Y *et al.* *Helicobacter pylori* CagA interacts with E-cadherin and deregulates the beta-catenin signal that promotes intestinal transdifferentiation in gastric epithelial cells. *Oncogene* 2007; 26: 4617–4626.
53. Ladeiro Y, Couchy G, Balabaud C *et al.* MicroRNA profiling in hepatocellular tumors is associated with clinical features and oncogene/tumor suppressor gene mutations. *Hepatology* 2008; 47: 1955–1963.
54. Okamura K, Chung W, Lai E. The long and short of inverted repeat genes in animals: microRNAs, mirtrons and hairpin RNAs. *Cell Cycle* 2008; 7: 2840–2845.

3. Conclusion.

Depuis la publication de cette revue, plusieurs travaux concernant l'implication de miRNAs dans la réponse des cellules infectées par *H. pylori* ont été publiés. Certains de ces résultats ont confirmé plusieurs des hypothèses formulées. Ainsi, Fassi-Fehri *et al.* ont montré une induction de miR-155 lors de l'infection *in vitro* par *H. pylori* d'une lignée de lymphocytes T (Fassi Fehri *et al.*, 2010). Cette induction ne dépendait pas de l'îlot de pathogénicité *cag*, mais de la toxine VacA et du facteur de transcription Foxp3. D'autres études ont montré des changements significatifs de l'expression des miRNAs dans la muqueuse gastrique de patients infectés (Matsushima *et al.*, 2010). Plusieurs miRNAs impliqués dans les cancers ou dans la réponse immunitaire étaient ainsi réprimés ou surexprimés chez ces patients. Ainsi, miR-223, miRNA spécifique des granulocytes et impliqué dans leur maturation (Baltimore *et al.*, 2008), était induit près de 6 fois. De même, la famille des miR-200, acteurs essentiels de la transition épithélio-mésenchymateuse (pour revue : (Gregory *et al.*, 2008)), étaient réprimés dans la muqueuse gastrique infectée. La répression de ces miRNAs est directement liée à la migration des cellules tumorales, car leurs cibles décrites sont les répresseurs transcriptionnels de l'E-cadhérine ZEB1/2 (*Zinc finger E-box-binding homeobox*). Cependant, ces travaux ayant été réalisés à partir de la muqueuse gastrique, ni les cellules impliquées, ni les mécanismes moléculaires mis en jeu n'ont pu être identifiés. Enfin, une étude récente réalisée chez la souris a montré que 2 miRNAs spécifiques du tissu musculaire, miR-1 et miR-133, étaient réprimés au cours de l'infection chronique provoquée par *H. pylori* (Saito *et al.*, 2010). Cette répression était accompagnée de l'augmentation des cibles de ces 2 miRNAs, HDAC4 (*histone deacetylase 4*) et SRF, 2 protéines impliquées dans de nombreux cancers.

Malgré le nombre croissant de publications concernant la régulation des miRNAs au cours de l'infection par *H. pylori*, les mécanismes moléculaires impliqués dans ces régulations restent largement inconnus. De même, le rôle des effecteurs bactériens, notamment de la toxine CagA, dans ces régulations ainsi que la présence potentielle de BSR chez cette bactérie restent également inconnus.

Partie II. Partie Expérimentale.

Chapitre I : Manuscrit en révision : *Helicobacter pylori* interferes with an embryonic stem cell miRNA cluster to block cell cycle progression.

1. Introduction.

Les épithéliums constituent la première ligne de défense de l'organisme contre les agressions extérieures, notamment les pathogènes. Outre leur rôle de barrière physique, les cellules épithéliales ont un rôle critique dans l'initiation et la régulation des immunités innée et adaptative. Pour ceci, elles possèdent toute une gamme de récepteurs tels que les TLRs, les NLRs et les RLRs, afin de détecter les PAMPs. Elles vont développer diverses réponses, notamment la sécrétion de peptides antimicrobiens et de cytokines proinflammatoires. Ces cellules expriment également un vaste répertoire de protéines impliquées dans la réponse immune telles que les complexes majeurs d'histocompatibilité (CMH), des chimiokines, des cytokines et des prostaglandines, qui vont permettre le développement d'une réponse immunitaire adaptative. Cette réponse immunitaire épithéliale doit être strictement contrôlée pour éviter de causer des lésions au niveau du tissu sain.

Les miRNAs participent activement à la physiologie des cellules épithéliales, notamment dans la régulation de différents mécanismes tels que la différenciation et la prolifération de ces cellules, mais également dans le maintien de l'intégrité de la barrière en régulant les protéines impliquées dans les jonctions cellulaires (pour revue : (Liu *et al.*, 2009)). Plusieurs publications évoquées dans la partie I (chapitre II) ont montré l'implication des miRNAs dans la défense innée de ces cellules contre les pathogènes, notamment en tant que miRNAs antiviraux. Cependant, le rôle des miRNAs dans la défense antibactérienne des cellules épithéliales reste peu étudié. De même, la présence de BSR potentiel chez les bactéries pathogènes pour l'Homme est encore inconnue.

L'objectif de ces travaux était donc d'étudier le rôle des miRNAs dans la réponse des cellules épithéliales gastriques au cours de l'infection par *H. pylori*. Les travaux à partir de l'estomac de patients ou de souris infectées ne permettent d'identifier l'origine cellulaire des miRNAs régulés, la muqueuse gastrique étant composée d'un grand nombre de types cellulaires différents. La culture de cellules épithéliales gastriques primaires n'étant pas possible à ce jour, nous avons donc choisi d'utiliser un modèle d'infection *in vitro* couramment utilisé : la lignée épithéliale gastrique AGS (Barranco *et al.*, 1983). Dans un premier temps, nous avons déterminé le répertoire de miRNAs exprimés par cette lignée par pyroséquençage à haut débit. De manière surprenante, le miRNA le plus abondant dans les

cellules AGS, miR-372, est un miRNA spécifique des cellules souches embryonnaires impliqué dans la régulation du cycle cellulaire. Ce miRNA, organisé en *cluster* avec 2 autres miRNAs, est fortement réprimé au cours de l'infection, conduisant à une modulation du cycle cellulaire des cellules infectées.

D'autre part, une analyse comparative de l'expression de miR-372&373 nous a permis de mettre en évidence une spécificité d'expression au niveau des cellules AGS.

Enfin, après avoir déterminé le répertoire de miRNAs exprimés par la lignée AGS, nous avons réalisé également un séquençage à haut débit sur des cellules AGS en co-culture avec *H. pylori* afin d'étudier l'expression différentielle des miRNAs au cours de l'infection.

Ces 2 derniers points ne sont pas présentés dans l'article en révision et feront l'objet d'un paragraphe à la suite de l'article. Les informations supplémentaires de cet article sont fournies en annexe.

2. Manuscrit en révision :

***Helicobacter pylori* interferes with an embryonic stem cell miRNA cluster to block cell cycle progression.**



**Helicobacter pylori interferes with an embryonic stem cell
miRNA cluster to block cell cycle progression**

Journal:	<i>Nucleic Acids Research</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	1 Standard Manuscript
Key Words:	miRNA, Helicobacter pylori, gastric cancer, cell cycle

SCHOLARONE™
Manuscripts

Review

Helicobacter pylori interferes with an embryonic stem cell
miRNA cluster to block cell cycle progression

Cédric Belair^{1,2}, Jessica Baud^{1,2}, Sandrine Chabas^{1,2}, Cynthia M. Sharma³, Jörg
Hackermüller⁴, Jörg Vogel³, Cathy Staedel^{1,2#} and Fabien Darfeuille^{1,2#}

¹INSERM U869 and ² Université de Bordeaux, F-33076 Bordeaux Cedex, France

³RNA biology group, Max Planck Institute for Infection Biology, D-10117 Berlin, Germany

⁴RNomics Group, Fraunhofer Institute for Cell Therapy and Immunology, D-04103 Leipzig,
Germany

Co-corresponding authors:

E-mail: cathy.staedel@inserm.fr, fabien.darfeuille@inserm.fr

Phone: +33557574601

Fax: +33557571015

Running title: MicroRNA Repression by *Helicobacter pylori*

ABSTRACT

MicroRNAs, post-transcriptional regulators of eukaryotic gene expression, are implicated in host defense against pathogens. Viruses and bacteria have evolved strategies to suppress microRNA functions with the aim to establish a sustainable infection. In this work, we report that *Helicobacter pylori*, a bacterium responsible for severe human gastric inflammatory diseases, down-regulates an embryonic stem cell microRNA cluster in a gastric epithelial cell line. By using a deep sequencing approach, we reveal that hsa-miR-372 is the most abundant miRNA expressed in this cell line where, together with hsa-miR-373, it promotes cell proliferation by silencing the Large Tumor Suppressor 2 (LATS2) gene expression. Shortly after *H. pylori* infection, miR-372&373 synthesis is inhibited, leading to the post-transcriptional release of LATS2 expression and thus, to a cell cycle arrest at the G1/S transition. This down-regulation of a specific cell cycle-regulating microRNA is dependent on the bacterial effector CagA. These data constitute a novel example of host-pathogen interplay involving microRNAs and unveil the couple LATS2/miR-372&373 as an unexpected mechanism in infection-induced cell cycle arrest in proliferating gastric cells which may be relevant of inhibition of gastric epithelium renewal, a major host defense mechanism against bacterial infections.

Keywords: microRNAs/ cell cycle/ gastric cancer/ *Helicobacter pylori*

INTRODUCTION

MicroRNAs (miRNAs) are small endogenous non-coding RNAs, which have recently emerged, with small interfering RNAs (siRNAs), as key components of the RNA silencing machinery in eukaryotes. Most of them are involved in the tight control of development and cell cycle progression (1,2), and are frequently de-regulated in severe pathologies, notably in cancers (3,4). However, the importance of RNA silencing has been primarily demonstrated in plant defense mechanisms against viruses, where it protects the host by processing long double stranded (ds) RNAs into siRNAs which, like miRNAs, are loaded onto Argonaute-RNA induced silencing complexes (AGO-RISC) (5) to down-regulate gene expression and therefore inhibit virus replication. Recently, it appears clearly that miRNAs are also implicated in host defense against diverse pathogens, including viruses, bacteria and parasites. For example, the human hsa-miR-32 counteracts the accumulation of primate foamy virus type 1 (PFV-1) in human cells, targeting directly the PFV-1 genome and inhibiting its translation (6). Similarly, the *Arabidopsis thaliana* miR-393, a pathogen-associated molecule pattern (PAMP)-responsive miRNA, contributes to the resistance of the plant against a virulent *Pseudomonas syringae* (*P. syringae*) bacterial strain (7). In response, pathogens have evolved strategies to counteract RNA silencing. Numbers of pathogen-derived RNA silencing suppressors have been described in eukaryotes, like the p19 protein of the tomato bushy stunt virus, which selectively sequesters short dsRNA (8), the Tas protein of PFV-1, which blocks the miRNA-directed silencing (6) or the AvrPto, AvrPtoB and HopT1 proteins of *P. syringae*, which suppress miR-393a/b biogenesis and activity (9).

In mammals, the miRNA pathway is a key actor of innate immunity, and viruses are able to exploit the non-antigenic potential of miRNAs to favor their replication (10). Two miRNAs, miR-146a and miR-155 are major regulators of innate immune responses in monocytes/macrophages (11-13). Both are strongly induced through Toll-like receptor (TLR) engagement after PAMP recognition and NF-κB activation. In turn, they target the TLR

1
2
3 signaling cascades and thus moderate the life-threatening overproduction of inflammatory
4
5 cytokines through a negative feed-back loop.
6
7

8 However, the epithelial barrier constitutes the first line of defense against pathogens.
9
10 In contrast to results obtained in immune cells, miR-155 and miR-146 were not found up-
11
12 regulated in mouse lungs, among the numbers of miRNAs rapidly induced after bacterial
13
14 lipopolysaccharide exposure, suggesting that epithelial cells may express a different set of
15
16 miRNAs than immune cells in response to pathogens (14). The importance of miRNAs in
17
18 epithelial defense against pathogens was recently highlighted in biliary epithelial cells
19
20 infected with the protozoan parasite *Cryptosporidium parvum* (*C. parvum*), an infection model
21
22 in which let-7i and miR-513 contributed to the epithelial immune response. Indeed, upon *C.*
23
24 *parvum* infection, these miRNAs were down-regulated, in a MyD88/NF- κ B -dependent
25
26 manner for let-7i, leading to the up-regulation of TLR4 and B7-H1 expression, respectively
27
28 (15-17) .
29
30
31
32

33 *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) is a Gram-negative microaerophilic bacterium that
34
35 chronically infects the gastric mucosa of about half of the world population, and constitutes
36
37 the primary etiological cause of gastritis, peptic ulcer and gastric cancers (18). The most
38
39 virulent strains, associated with a high risk of gastric adenocarcinomas (19), harbor in their
40
41 genome a cluster of 31 genes, called the *cag* pathogenicity island (*cagPAI*), which encodes a
42
43 type IV secretion system (T4SS) and the CagA toxin. This T4SS interacts with host cell
44
45 surface and injects the CagA protein into the cytoplasm (20). The translocated CagA
46
47 interferes then with intracellular signaling pathways, which subsequently alters cell-to-cell
48
49 adhesion, cell polarity and proliferation (21-23). A functional T4SS is also essential for the
50
51 induction of innate immune response, characterized by NF- κ B activation and IL-8
52
53 production in gastric epithelial cells (24).
54
55
56
57

58 The extent to which miRNAs contribute to the gastric epithelial cell response to *H.*
59
60 *pylori* infection has been little explored (25). So far, only two miRNAs, miR-21 and miR-155,

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

have been reported up-regulated in both *H. pylori*-infected human gastric mucosa and *in vitro* cell culture (26,27). As the gastric epithelial cells are the first line of defense against *H. pylori*, triggering the immune response, it is relevant to further assess how miRNA are modulated upon *H. pylori* infection in these cells. With this aim, we used a common gastric epithelial cell model, the human AGS cell line (28). First, we employed a deep-sequencing approach to identify the AGS miRNAs profile. Surprisingly, the most abundant one, miR-372, belongs to a miRNAs cluster, miR-371-372-373, specifically expressed in embryonic stem cells. Moreover, this cluster is repressed upon *H. pylori* infection in a CagA-dependent manner. The repression of miR-372&373 is associated with the up-regulation of their target, the cell cycle regulator LATS2, leading to the inhibition of cell cycle progression in *H. pylori*-infected cells.

MATERIAL AND METHODS

Cell culture. All the tissue culture reagents were from Invitrogen (France). AGS gastric epithelial cell line (ATCC CRL 1739) was maintained in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM)/F-12 (Ham's) medium, the other gastric epithelial cell line MKN-74 (HSRRB FC-2008-028) in RPMI medium and the cervix cancer cell line (HeLa) in DMEM. All media were supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), 2mM L-glutamine and 1% non-essential amino-acids. Cells were grown at 37°C in a humidified 5% CO₂ atmosphere.

***Helicobacter pylori* culture.** *H. pylori* 26695 strain (CIP 106780, Institut Pasteur, Paris, France) and its isogenic mutants, as well as P12 (generous gift of T. Meyer, MPI, Berlin, Germany), SS1 and X47-2AL (generous gift of H. de Reuse, Institut Pasteur, Paris, France) strains were grown on columbia agar plates supplemented with 7% laked horse blood, the Dent selective supplement (Oxoid), and 20 µg/ml kanamycine for the isogenic mutants, for 24 h at 37°C, in anaerobic jars, under microaerobic conditions (10% CO₂, 6% O₂) generated by CampyGen bags (Oxoid). After 24 h incubation, the bacteria were expanded onto fresh plates and grown for 24 additional hours. For infection, bacteria were harvested in complete Ham's medium and quantified by optical density at 600 nm, assuming that OD₆₀₀=1 corresponded to 10⁹ bacteria.

Construction of *H. pylori* isogenic mutants. The isogenic knockout mutants 26695 •*cagA* and •*cagE* were constructed as previously described (58). The genomic DNA of *H. pylori* strain 26695 and the vector pUC18K2 were used as template for all PCR amplifications in order to generate the kanamycine resistance cassette. The primers are listed in Table S4.

Co-culture of AGS cells with *H. pylori*. Before co-culture, the culture medium was replaced with fresh one and the bacterial suspension was added to AGS cells at 60-70% confluence at the indicated multiplicity of infection (MOI). The co-cultures were incubated at 37°C, in a humidified 5% CO₂ atmosphere.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

RNA extraction. Total RNA was extracted using Trizol reagent (Invitrogen), according to the manufacturer's protocol. RNA concentrations were determined by a NanoDrop spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Inc.). RNA quality was analyzed on a 2100 (Agilent Technologies).

454 miRNA libraries Libraries for 454 pyrosequencing of cDNA were constructed by *Vertis* Biotechnology AG, Germany (<http://www.vertis-biotech.com/>) as described previously for eukaryotic microRNA (59). Specifically, total RNA was prepared from AGS cells and treated with DNase I. Small RNA species were isolated from DNase I treated RNA using the mirVana miRNA isolation kit (Ambion, Austin, Texas, USA). The small RNAs were separated on a denaturing 12,5% polyacrylamide (PAA) gel and stained with SYBRgreenII. As molecular mass standard a mixture of oligonucleotides was used, also as internal size marker within the RNA samples. The population of miRNAs with a length of 19–29 bases was obtained by passive elution of the RNAs from the gel. The miRNAs were then precipitated with ethanol and dissolved in 20 µl water, and 100 ng of RNA was used for cDNA synthesis. The RNAs were first poly(A)-tailed using poly(A) polymerase followed by ligation of a RNA adapter to the 5'-phosphate of the miRNAs. First-strand cDNA synthesis was then performed using an oligo(dT)-adapter primer and M-MLV-RNase H- reverse transcriptase. Incubation temperatures were 42°C for 20 min, ramp to 55°C followed by 55°C for 5 min. The resulting cDNAs were then PCR-amplified to about 30 ng/µl in 16 cycles using a high fidelity DNA polymerase and barcode sequences (GTGA) were attached to the 5'-ends of the cDNAs.

The combined length of the flanking sequences is 104 bases. Therefore, PCR-products containing miRNA sequences of 19-29 nt must have a total length of about 120-135 bp. PAGE analysis of the PCR-amplified cDNAs revealed that the cDNAs were of the expected size. The 120–135 bp fractions of the cDNAs were obtained by separation of the cDNAs on preparative 6% PAA-gels. The eluted cDNAs were finally extracted with phenol/chloroform

and precipitated with ethanol. DNA pellet was dissolved in 30 μ l water. Concentration of the samples was about 10 ng/ μ l. The resulting cDNA libraries were sequenced on a Roche GS20 454 sequencer at the MPI for Molecular Genetics in Berlin, Germany.

MiRNA sequencing analysis. 454 reads were aligned against the respective set of mature miRNAs using the R package mirMap454. Briefly, mirMap454 attempts to identify common 5' and 3' adapter sequences in the reads and removes these prior to further analysis. Each read is aligned against all mature miRNAs in the database semi-globally using dynamic programming. The simple scoring scheme employed allows terminal gaps in the mature miRNA sequence at no costs, while indels in general are scored with +3, mismatches with +2 and mismatches to N with +1. Motivated by the error distribution of 454 reads, up to three terminal mismatches are ignored in scoring the alignment if the remainder of the sequences aligns without indels or mismatches. For each read the alignment to a mature miRNA with lowest score is identified. If the score of this alignment is 5 or less, the read is considered to be mapped to this miRNA. If the read maps to n different miRNAs with equal scores, 1/n reads are counted as mapped to each of these miRNAs. Results of this analysis are presented in supplementary Table S1.

Quantitative RT-PCR. TaqMan® microRNA assays (Applied Biosystems) were used to quantify the expression of mature miR-371-3p (AB 002124), miR-372 (AB 000560) and miR-373 (AB 000561). Real-time RT-qPCR was performed in triplicate on 20 ng total RNA according to the manufacturer's instructions. MiR-372 copy number was determined by absolute RT-qPCR. Sample Ct value was compared to a standard curve determined using serially diluted synthetic miR-372 (Table S4) and expressed as copies per cell on the basis of our determination of 1 μ g RNA/10⁵ AGS cells. LATS2 mRNA and pri-miR-371-372-373 levels were determined by RT-qPCR using PerfeCta® SYBR® Green SuperMix (Quanta BioSciences). cDNA was synthesized with Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen) using oligo(dT)₂₀ primer according to the manufacturer's protocol. All primers used for qPCR

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

are listed in Table S4. MiRNAs levels were normalized to U6 snRNA (RNU6b, AB 001093) or to SNORD49A (RNU49, AB 001005) in infection experiments, because RNU6b was found affected by the infection. The levels of LATS2 mRNA or pri-miR-371-372-373 were normalized to the ribosomal protein P0 mRNA. Relative expressions were calculated using the comparative Ct method.

Northern blots. Total RNA (20 µg) were resolved on a 15% denaturing PAA gel and blotted onto nylon membranes (Hybond-N, GE Healthcare). Membranes were incubated with 5'-³²P-radiolabelled LNA/DNA probes in 50% formamide, 5X SSPE, 5X Denhardt solution, 0.5% SDS, 20µg/ml salmon sperm DNA, at 42°C overnight in a hybridization oven. After two washes for 5 min each in 2X SSC, 0.1% SDS at 42°C, the blots were analyzed and quantified by phosphorimaging (Molecular imager PharosFX^{plus}, Biorad). All sequences of probes are listed in Table S4.

Western Blot. Cells were harvested in ice cold Ham's medium and washed with ice cold PBS. The cell pellets were lysed in ProteoJETTM Mammalian Cell lysis reagent (Fermentas) supplemented with 5 mM EDTA and 1X ProteoBlockTM Protease inhibitor cocktail (Fermentas). Proteins were separated by SDS-PAGE and western blot was performed using Immobilon-P transfer membrane (Millipore), according to standard procedures. Anti-LATS2 (clone ST-3D10, Abnova) and anti-α-tubulin (clone B-5-1-2, Sigma-Aldrich) antibodies were used at a 1:500 and 1:30000 dilutions, respectively.

Cell transfections. All transfections were performed using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol. The oligonucleotides sequences are indicated in Table S4. Double-stranded mimic 372-373 were generated by incubating equimolar amounts of complementary, heat-denatured single RNA strands in 60 mM KCl, 6 mM Hepes pH 7.5, 0.2 mM MgCl₂ buffer, for 20 min at room temperature. AGS cells were transfected twice with 100 nM of miRNA-antisense (as372-373), 100 nM scrambled oligonucleotides (sc372-373) or 25 nM double-stranded mimics. NF-kB activation was monitored using the BD Mercury

1
2
3 firefly luciferase reporters (Beckton-Dickinson) according to the manufacturer's instructions.
4
5 Briefly, 48 h before infection, cells were transfected with either 1 μ g NF- κ B-luc or TAL
6
7 (luciferase without promoter) vectors, together with 10 ng of pRL-SV40 control vector
8
9 (Promega). LATS2 translation efficiency was assessed with the luciferase sensor pGL3-
10
11 LATS2. At the second transfection round with as372-373 or sc372-373, the oligonucleotides
12
13 were mixed with 100 ng pGL3-LATS2 or pGL3 plasmids, and 10 ng pRL-SV40 control vector
14
15 (Promega). Firefly and *Renilla* luciferases were measured 48 h post-transfection using the
16
17 Dual Luciferase Assay (Promega). Firefly luciferase activities were normalized for
18
19 transfection efficiency by *Renilla* luciferase.
20
21
22

23
24 **Construction of the LATS2 reporter AGS cell line.** The LATS2 3'UTR sequence was
25
26 obtained by PCR using pGL3-LATS2 as template and the primers indicated in Table S4. The
27
28 PCR product was cloned into the pEGFP-C1 vector (Clontech) downstream to *egfp* gene.
29
30 Stable LATS2 reporter AGS cells were obtained after selection with 400 μ g/ml geneticin
31
32 (Gibco) of AGS cells transfected with the pEGFP-3'UTR-LATS2 vector.
33
34

35
36 **Cell-cycle analysis by flow cytometry.** After co-culture with *H. pylori*, adherent and floating
37
38 cells were collected together, washed once in ice-cold PBS and fixed in 70% ice-cold ethanol
39
40 for 24 h. Fixed cells were stained in a 0.5mg/ml propidium iodide, 0.1% (w/v) RNase A,
41
42 0.1% (w/v) BSA PBS solution and analyzed for DNA content by flow cytometry (BD
43
44 FACSCanto cytometer, BD Biosciences).
45
46

47
48 **BrdU incorporation.** AGS cells were transfected twice with as372-373, sc372-373 or mimic
49
50 372-373 before co-culture with *H. pylori*. Cells were pulse-labeled with 10 nM 5-Bromo-2'-
51
52 deoxyuridine (BrdU) for 1 h before the end of the co-culture. Cells were harvested and BrdU
53
54 incorporation was detected by immunofluorescent staining using the FITC BrdU Flow kit
55
56 (BD Pharmingen) and quantified by flow cytometry on an EpicsXL Beckman Coulter flow
57
58 cytometer.
59
60

RESULTS

AGS cell line expresses a particular set of miRNAs

The AGS cell line has been widely used in *in vitro* experiments to recapitulate early events of *H. pylori* infection occurring within actively replicating gastric mucosa (29,30). To address the complete miRNA profile of the AGS cell line, we employed a high-throughput pyrosequencing approach. A cDNA library of growing AGS cells was generated and submitted to “454” technology. 44,012 sequences were analyzed, that resulted in 25,348 (57.6%) sequences matching with mature human miRNA sequences of the miRBase 14.0 (Table S1). The other sequences corresponded to various RNA degradation products or unidentified sequences. Mature miRNAs identified with this method can be classified in function of their respective number of reads (Fig. 1A), their genomic organization in clusters (Fig. 1B) or their function previously assigned to them in other studies (Table S2). We decided to restrict our analysis to the 38 most abundant miRNAs (>100 reads, Fig. 1A). Consistent with their respective genomic annotations, many of the mature miRNAs identified were organized in clusters. Thus, the miRNA signature of AGS cells can be summarized into three major clusters: the miR-371-372-373 cluster, the miR-17-92 cluster and the miR-23b-27b-24-2 cluster, which represent 18.6%, 12.4% and 12.1% of total number of reads, respectively (Fig. 1B). Members of the miR-200 and let-7 families were also highly represented: miR-200b, miR-200c and let-7a being the most expressed of these family members in AGS cells (Table S1).

The expression of some of these miRNAs was confirmed by quantitative RT-PCR (RT-qPCR) (Fig. 1C) and northern blot (data not shown). As expected, all miRNA tested that were present in our miRNA sequencing library were also detected by RT-qPCR. However two miRNAs reported to be present in AGS cells (31) and absent from our library, were weakly detected by RT-qPCR (close to the detection threshold) suggesting that our library might lack some miRNA faintly expressed in this cell line.

MiR-372 and miR-373 regulate LATS2 expression in AGS cells

The peculiarity of the AGS miRNA repertoire, which beside contains ubiquitous miRNAs such as miR-16, miR-21, miR-17, miR-92, lies in the outstanding abundance of miR-372, which represents in the range of 10^6 copies/ng total RNA or 10^4 copies per cell (see Material and Methods). Intriguingly, miR-372 is an embryonic stem cell-specific miRNA (32), also found highly expressed in placenta (33). It belongs to a cluster located on the chromosomal region 19q13.42, which comprises 4 miRNAs, all of them highly expressed in AGS cells: miR-371-5p, miR-371-3p, miR-372 and miR-373 (Fig. 1A, black bars). MiR-372 or miR-373 expression is considered as a rare event in tumors, and was only found in testicular germ cell tumors (34), esophageal tumors (35) and thyroid adenomas (36).

In testicular and esophageal tumors, in which they are abundant, miR-372&373 have been reported to act as oncogenes repressing the Large Tumor Suppressor homolog 2 (LATS2), a serine-threonine kinase involved in cell cycle regulation (34,35). Performing immunoblot analysis of LATS2, we did not detect LATS2 in AGS cells, in contrast to the other gastric cell line MKN-74 and the cervix cancer cell line HeLa (Fig. 2B, upper panel). It appears that the LATS2 level was inversely correlated to the expression of miR-372&373 in these cell lines (Fig. 2B, lower panel). These results suggest that LATS2 could be repressed at the post-transcriptional level by miR-372&373 in AGS cells. To validate this hypothesis, we transfected into AGS cells a luciferase sensor (pGL3-LATS2) containing the 3'untranslated region (UTR) of LATS2, which harbors two miR-372 and -373 pairing sites (34) downstream to the firefly luciferase coding sequence (Fig. 2A). As expected from cells expressing high miR-372&373 levels, we observed a 60% inhibition of luciferase expression, as compared to the control pGL3 reporter (Fig. 2C). To confirm a role of miR-372&373 in this repression, we

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

designed antisense oligonucleotides (as372, as373) and their scrambled controls (sc372, sc373), in order to block these miRNAs. The levels of miR-372 or 373 by as372/as373 were each specifically decreased by 90%, as verified by RT-qPCR and northern blot analysis (Fig. S1A and B, respectively). We transfected either pGL3-LATS2, or the control pGL3 vector, together with as372-373 or the control sc372-373, and analyzed the luciferase activity. In as372-373 treated cells, the firefly luciferase expression was significantly de-repressed and almost reached the levels of that of the control vector (Fig. 2C), contrarily to the cells treated with sc372-373, which did not affect the basal miR-372 or -373 levels. Altogether, these results indicate that LATS2 is indeed a direct target of miR-372&373 in AGS cells.

Inhibition of LATS2 by miR-372&373 conferred a growth advantage to cells (34,35). To confirm that LATS2 is a functional target of miR-372&373 in AGS cells, we analyzed cell cycle progression of as372-373-treated cells using the BrdU incorporation method, which measures the rate of DNA synthesis occurring in the S phase of the cell cycle. As372-373-treated AGS cells present a significantly delay of about 50% in S phase progression compared to sc372-373 treated cells (Fig. 2D). This delay results in a decrease in cell proliferation rate (Fig. S1C). Altogether, these results indicate that the high expression of miR-372&373 confers a growth advantage to AGS cells through the inhibition of LATS2 expression.

The miR-371-372-373 cluster is down-regulated in response to *H. pylori* infection

Both the abundance and function of miR-372&373 in AGS cells prompted us to analyze its regulation upon *H. pylori* infection. With this aim, AGS cells were cultured in the presence of *H. pylori* 26695 strain at a multiplicity of infection (MOI) of 100 and the miR-371-372-373 cluster expression was analyzed 24 h later. Mature miR-371-3p, miR-372 and miR-

373 were all significantly down-regulated (up to 50%) upon infection, as shown by RT-qPCR and northern blot analysis (Fig. 3A and B, respectively). This repression was not the consequence of a global effect on the miRNA pathway, as some other miRNAs were differently modulated upon infection. For example, miR-106b and miR-19b were slightly repressed, while miR-21 was up-regulated upon infection, in concordance with prior observations (27). We also found miRNA levels unchanged upon infection, such as miR-93 and miR-320 (Fig. 3A). Down-regulation of miR-372&373 upon infection was also evidenced by northern blot analysis (Fig. 3B), which in addition revealed that miRNA precursors (pre-miRNA) were even more strongly repressed than the mature forms (Fig. 3B, upper part of the blot for miR-373). These findings suggested that the regulation took place at an initial step of miR-371-372-373 biogenesis. We confirmed this hypothesis by RT-qPCR on the primary polycistronic miRNA transcript (pri-miRNA) of the cluster (Fig. 3C and 3D). Indeed, the pri-miRNA was rapidly down-regulated upon *H. pylori* infection, as soon as 2 h post-infection at MOI 100 (Fig. 3C), and in a MOI-dependent manner (Fig. 3D). Altogether, these results show that the miR-371-372-373 cluster, being one of the most abundant miRNAs in AGS cells, is strongly decreased at the pri-miRNA level upon *H. pylori* infection.

MiR-371-372-373 cluster is repressed in a CagA-dependent manner

To assess whether the down-regulation of the miR-371-372-373 cluster was related to a functional *H. pylori* cagPAI, we compared the effect of wild type (wt) bacteria to those of isogenic mutants deleted either for the *cagA* (Δ CagA) or for the T4SS constituent *cagE* (Δ CagE) genes. As previously described (24,37), these mutants like wt *H. pylori* induced vacuolization of AGS cells, an effect due to the vacuolating toxin VacA, but failed to provoke cell elongation and scattering, the so-called “hummingbird” phenotype, characteristic of

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

AGS cells infected with wt *H. pylori* (Fig. S2A). Moreover, these mutants were impaired in their pro-inflammatory effects on AGS cells, as measured by NF- κ B activation and IL-8 secretion (Fig. S2B-C). Interestingly, both mutants have a very weak effect on the miR-371-372-373 cluster (Fig. 4A). Indeed, when AGS cells were co-cultivated with the Δ CagA or Δ CagE mutants, which are, respectively, unable to produce the CagA toxin or to inject it into the host cell cytoplasm, the pri-miRNA was not repressed, compared to cells infected with wt *H. pylori*. These data show that the down-regulation of the miR-371-372-373 cluster upon *H. pylori* infection is mediated by the translocation of the CagA toxin into AGS cells.

To evaluate the effects of the down-regulation of miR-372&373, we analyzed the regulation of their common target, LATS2, in AGS cells upon *H. pylori* infection. We observed that LATS2 mRNA (Fig. 4B) and protein levels (Fig. 4C) were inversely correlated to those of miR-372&373 upon *H. pylori* infection. Indeed, LATS2 protein was drastically up-regulated in infected AGS cells and, likewise, its mRNA level was also raised up to 2 fold upon infection. Moreover, similarly to the pri-miR-371-372-373 repression, LATS2 accumulation was dependent on the CagA toxin, as no changes in LATS2 expression were observed either at the mRNA and protein levels in AGS cells infected with the Δ CagA or Δ CagE mutants, conversely to wt *H. pylori* (Fig. 4B-C).

To confirm that LATS2 synthesis was de-repressed at the post-transcriptional level after miR-372&373 down-regulation in AGS cells infected with wt *H. pylori*, we generated a stable LATS2 reporter AGS cell line expressing a fluorescent sensor containing the 3'UTR of LATS2 downstream of the enhanced green fluorescent protein (EGFP). This reporter system allowed us a direct observation of LATS2 post-transcriptional regulation in living cells. As depicted in Fig. 4D (panel c), green

fluorescence appeared only upon infection with wt *H. pylori*, mainly in cells exhibiting the hummingbird phenotype (Fig. 4D, panel c and d), whereas uninfected cells (Fig. 4D, panel a) or cells infected with the Δ CagA or Δ CagE mutant strains (Fig. 4D, panel e and g) remained non fluorescent. We also used this reporter cell line to assess whether other strains, naturally expressing CagA (type I) or not (type II), were able to induce LATS2 expression. Indeed type I strains, like 26695 and P12, were able to switch on the fluorescence of the reporter cells as the 26695 strain did, whereas type II strains like SS1 and X47-2AL did not (Fig. S3B). We were also able to correlate this translational activation with a concomitant down-regulation of the pri-miR371-372-373 transcript level (Fig. S3A). These data confirm that the CagA-dependent accumulation of LATS2 protein involve a post-transcriptional release of its production mediated by the down-regulation of miR-372&373.

MiR-372 and miR-373 down-regulation is involved in *H. pylori*-induced cell cycle arrest in G1 phase.

To assess whether LATS2 up-regulation was functionally relevant, we analyzed cell cycle progression of AGS cells upon infection. In agreement with previous observations (29), AGS cells infected for 24 h with wt *H. pylori* presented a noticeable alteration of the cell cycle, characterized by an accumulation of cells in the G1 phase, in the detriment of cells in S and G2/M phases (Fig. S4). Accordingly, measuring BrdU incorporation 24 h post-infection, we observed a 80% reduction of AGS cells in S phase, which reflects a cell cycle arrest at the G1/S transition (Fig. 5A). As already shown by Murata-Kamiya and colleagues (22), this reduction was dependent on the CagA toxin, as cells infected with the Δ CagA or Δ CagE mutants did not show such inhibition of cell cycle progression (Fig. 5A and S5). To ascertain

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

that the inhibition of G1/S transition was due to the down-regulation of miR-372&373, we treated AGS cells with synthetic miR-372 and miR-373 prior to infection, in order to dampen their down-regulation upon infection. In this case, the proportion of infected cells in S phase remained as high as in untreated and uninfected cells (Fig. 5B), indicating that wt *H. pylori* became unable to arrest AGS cell cycle progression. Conversely, blocking miR-372&373 with as372-373 prior to infection facilitated the infection-induced inhibition of DNA synthesis, which then reached its maximum.

The effects of these experimental manipulations of miR-372&373 on the efficiency by which wt *H. pylori* blocks AGS cell cycle demonstrate that the regulation of these miRNAs contribute to the arrest at the G1/S transition in infected AGS cells. These results combined to the above ones reveal an unexpected mechanism involved in the cell cycle arrest upon infection: the CagA-dependent de-repression of LATS2 by the down-regulation of miR-372&373.

DISCUSSION

Recent data have highlighted the importance of miRNA in epithelial defense against pathogens like *Cryptosporidium parvum* (16,17) or *Toxoplasma gondii* (38). Gastric mucosa homeostasis is controlled by both immune and developmental mechanisms and its disruption by *H. pylori* infection can lead to severe inflammatory disorders or cancerous lesions of the stomach. While the impact of pathogens on the miRNA-mediated regulation of immune responses is beginning to be precisely understood (39), little is known about bacteria interfering with miRNAs regulating cell cycle and developmental pathways. In this study, we report that the bacterial pathogen *H. pylori* specifically down-regulates an embryonic-specific miRNA cluster involved in the growth regulation of AGS cells, a non polarized epithelial cell system commonly used to study *H. pylori*-host interactions. Through a deep-sequencing approach, we identified the whole content of miRNAs expressed in this gastric adenocarcinoma cell line. Among the 38 most expressed miRNAs, we found several miRNA previously described in gastric cancer, notably the miR-106b-93-25 cluster, the miR-221-222 cluster, miR-21 and let-7a (27,40,41). But we were surprised to discover that the most abundant of this repertoire, miR-372, belongs to a specific cluster encoding 3 other miRNAs, miR-371-5p, miR-371-3p and miR-373 normally expressed in human embryonic stem cells (32,42). Interestingly these miRNAs were also mentioned in a miRNA profiling study in normal human tissues (33), in which they were found highly and specifically expressed in placenta, but also faintly detectable in testis and stomach.

Functional links of miR-371-372-373 cluster with miR-106b-93-25 and miR-221-222 in gastric cancer

MiR-372&373 were initially discovered as novel oncogenes participating in the development of human testicular germ cell tumors by targeting the cell cycle inhibitor LATS2 (34). Interestingly this embryonic stem cell miRNA cluster shares some similarities

with two miRNA clusters recently found to be overexpressed in gastric carcinomas, namely the miR-106b-93-25 cluster (41) and the miR-221-222 cluster (40). In gastric cancers, these two clusters have been described to silence the CIP/KIP family members, p21^{Cip1}, p27^{Kip1} and p57^{Kip2}, allowing the cell to overcome the G1/S checkpoint (40,41). Surprisingly, these two clusters are poorly expressed in AGS cells as compared to other gastric cell lines and their expression levels are close to those observed in normal gastric mucosa ((40,41) and our unpublished data). One explanation is that, in this cell line, the oncogenic role of these two clusters could have been replaced by the miR-371-372-373 cluster over-expression. Indeed, miR-372&373 belong to the miR-106b family which includes miR-93, miR-17-5p and miR-20a (43). Members of this family harbor the same seed sequence, stressing that they might share similar functions. Recently, they have been shown to overcome the p21^{Cip1}-induced cell cycle arrest observed during Ras-induced senescence (43). In testicular germ cell tumors, which retained functional, wild type p53, miR-372&373 act as oncogenes silencing LATS2 and thus allowing cell proliferation (34). Indeed, LATS2 is a serine/threonine kinase involved in a positive feedback loop with p53 (44) that can induce G1/S arrest by inhibiting Cyclin E/CDK2 kinase activity (45). Interestingly, AGS cells express low wt p53 (46) and high p21^{cip1/waf1} levels in basal growth conditions ((47) and our unpublished results). Thereby, like in the testicular germ cell tumors, abundant miR-372&373 in AGS cells, that totally silence LATS2, may participate to their active cell cycle progression despite high levels of p21^{cip1/waf1}.

***H. pylori* represses the miR-371-372-373 expression via its major virulence factor CagA**

We report here that *H. pylori* specifically inhibits the synthesis of miR-372&373 at the primary transcript level and that this repression relies on CagA translocation in AGS cells through a functional T4SS. Very interestingly, these two miRNAs already described to promote cell proliferation (34) have also been found to be repressed upon differentiation of embryonic stem cells in specific culture conditions (32). In fact, *H. pylori*, via its major virulence factor CagA, can induce an intestinal trans-differentiation program in gastric

epithelial cells that have undergone a cell cycle arrest (22). In these cells, the proliferation is blocked at the G1/S transition after 24 h in the presence of *cagPAI*+ *H. pylori* and this stop is dependent on the translocation of CagA into the host cell (22,47). Therefore one could imagine that the observed repression of miR-372&373 in AGS cells could be a consequence of a block in cell division. However, at 2 hours post infection, when cell proliferation has not been stopped yet, the pri-miR-371-372-373 was already down-regulated close to its minimal level. This latter result suggests that the CagA-dependent repression of this cluster is a primary event and not a consequence of the cell cycle arrest. Further investigations may uncover the possible role of cell signaling pathways in this repression such as ERK, the PI3K/Akt and notably the Src kinase, the activation of which occurs at this very initial stage of infection (48).

The cell cycle arrest at the G1/S transition in AGS cells is mediated by the up-regulation of LATS2 protein

In this paper we also reveal a new mechanism involved in the cell cycle arrest in AGS cells upon *H. pylori* infection. Indeed we show that this bacterium induces a block in cell cycle progression at the G1/S transition via the post-transcriptional de-repression of LATS2 synthesis. While several cell cycle regulators have been studied in this context, such as p21^{cip1/waf1} (29,47,49), or p27^{kip1} (50,51), our data indicate that an additional pathway can occur in AGS cells. Indeed *H. pylori* is no longer able to block cell proliferation when the level of LATS2 is maintained low by two miRNA mimics. However, because the 3'UTR of p21^{cip1/waf1} has also been proposed to be targeted by miR-372&373 (52), we certainly cannot exclude that its induction also participate in this cell cycle arrest (22,47). However the block at the G1/S transition in AGS cells requires the de-repression of LATS2 synthesis *via* the repression of miR-372&373. Our results with the EGFP-LATS2 reporter cell line infected with type I strains, which harbor a functional *cagPAI*, clearly indicate that *H. pylori* induce a post-transcriptional release of LATS2 synthesis in a CagA-dependent manner through the down-

regulation of the miRNA cluster. These data unveil the couple LATS2/miR-372&373 as an unexpected mechanism in CagA-induced cell cycle arrest in proliferating gastric cells.

AGS cells exhibit a stem cell miRNA signature

Because *cagPAI* increases the risk for infected patients to develop severe atrophic gastritis and distal intestinal-type gastric cancer (53), the perturbations of cell cycle progression elicited by *H. pylori* in gastric epithelial cells gave raise to many studies, some of which having precisely used AGS cells as a model system of an actively replicating gastric mucosa (29,49,54). The miRNA content in AGS cells is characterized by its relative high abundance in embryonic stem cell miRNA (Table S2). In fact the growth advantages that AGS cells gained from the high expression of miR-371-372-373 cluster confer to them characteristics of gastric stem cell/progenitors rather than gastric mucosa differentiated epithelium. Epithelium turnover, which results from the balanced progenitor cell generation and differentiated cell death, is a major host defense mechanism against pathogens and its alteration is commonly observed upon bacterial infections (55). Iwai and colleagues have shown that *Shigella flexneri* blocks cell cycle of intestinal progenitors through the injection of its bacterial effector IpaB (56). In an animal model, the same group has demonstrated that *H. pylori*, through CagA delivery, suppresses apoptosis at superficial gastric pit cells, leading to delayed gastric epithelium self-renewal. Hence, it is tempting to speculate that *H. pylori* could repress this specific embryonic miRNA cluster in gastric progenitors in order to interfere with the gastric epithelium self-renewal, but in a manner that Mimuro and co-workers did not observe (57).

FUNDING

This work was supported by grants from the Association de la Recherche contre le Cancer (#4856); and Ligue Nationale contre le Cancer (LNCC –comité de la Dordogne). CB and JB were supported by the French Ministry of Research.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. Philippe Lehours for providing the AGS cell line, Pr. Thomas Meyer for the gift of the P12 strain, Dr. Reuven Agami for providing the pGL3-LATS2 and pGL3 vectors and Dr. Cecile Duplaa for providing the pEGFP-C1 vector. We are very grateful to Pr. Francis Mégraud for discussions and to Dr. Hilde de Reuse for material and technical help in the *H. pylori* mutant construction as well as for *H. pylori* strains. We acknowledge Nathalie Pierre for in house oligonucleotide synthesis.

REFERENCES

1. Kim, V.N. (2008) Cell cycle micromanagement in embryonic stem cells. *Nat Genet*, **40**, 1391-1392.

2. Wang, Y. and Blelloch, R. (2009) Cell cycle regulation by MicroRNAs in embryonic stem cells. *Cancer Res*, **69**, 4093-4096.

3. Croce, C.M. (2009) Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer. *Nat Rev Genet*, **10**, 704-714.

4. Kato, M. and Slack, F.J. (2008) microRNAs: small molecules with big roles - C. elegans to human cancer. *Biol Cell*, **100**, 71-81.

5. Baulcombe, D. (2004) RNA silencing in plants. *Nature*, **431**, 356-363.

6. Lecellier, C.H., Dunoyer, P., Arar, K., Lehmann-Che, J., Eyquem, S., Himber, C., Saib, A. and Voinnet, O. (2005) A cellular microRNA mediates antiviral defense in human cells. *Science*, **308**, 557-560.

7. Navarro, L., Dunoyer, P., Jay, F., Arnold, B., Dharmasiri, N., Estelle, M., Voinnet, O. and Jones, J.D. (2006) A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling. *Science*, **312**, 436-439.

8. Ye, K., Malinina, L. and Patel, D.J. (2003) Recognition of small interfering RNA by a viral suppressor of RNA silencing. *Nature*, **426**, 874-878.

9. Navarro, L., Jay, F., Nomura, K., He, S.Y. and Voinnet, O. (2008) Suppression of the microRNA pathway by bacterial effector proteins. *Science*, **321**, 964-967.

10. Parameswaran, P., Sklan, E., Wilkins, C., Burgon, T., Samuel, M.A., Lu, R., Ansel, K.M., Heissmeyer, V., Einav, S., Jackson, W. *et al.* (2010) Six RNA viruses and forty-one hosts: viral small RNAs and modulation of small RNA repertoires in vertebrate and invertebrate systems. *PLoS Pathog*, **6**, e1000764.

11. O'Connell, R.M., Taganov, K.D., Boldin, M.P., Cheng, G. and Baltimore, D. (2007) MicroRNA-155 is induced during the macrophage inflammatory response. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 1604-1609.

12. Taganov, K.D., Boldin, M.P. and Baltimore, D. (2007) MicroRNAs and immunity: tiny players in a big field. *Immunity*, **26**, 133-137.

13. Taganov, K.D., Boldin, M.P., Chang, K.J. and Baltimore, D. (2006) NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 12481-12486.

14. Moschos, S.A., Williams, A.E., Perry, M.M., Birrell, M.A., Belvisi, M.G. and Lindsay, M.A. (2007) Expression profiling in vivo demonstrates rapid changes in lung microRNA levels following lipopolysaccharide-induced inflammation but not in the anti-inflammatory action of glucocorticoids. *BMC Genomics*, **8**, 240.

15. Chen, X.M., Splinter, P.L., O'Hara, S.P. and LaRusso, N.F. (2007) A cellular microRNA, let-7i, regulates Toll-like receptor 4 expression and contributes to cholangiocyte immune responses against *Cryptosporidium parvum* infection. *J Biol Chem*, **282**, 28929-28938.

16. O'Hara, S.P., Splinter, P.L., Gajdos, G.B., Trussoni, C.E., Fernandez-Zapico, M.E., Chen, X.M. and LaRusso, N.F. (2010) NFkappaB p50-CCAAT/enhancer-binding protein beta (C/EBPbeta)-mediated transcriptional repression of microRNA let-7i following microbial infection. *J Biol Chem*, **285**, 216-225.

17. Zhou, R., Hu, G., Liu, J., Gong, A.Y., Drescher, K.M. and Chen, X.M. (2009) NF-kappaB p65-dependent transactivation of miRNA genes following *Cryptosporidium*

- parvum infection stimulates epithelial cell immune responses. *PLoS Pathog*, **5**, e1000681.
18. Cover, T.L. and Blaser, M.J. (2009) *Helicobacter pylori* in health and disease. *Gastroenterology*, **136**, 1863-1873.
 19. Hatakeyama, M. (2004) Oncogenic mechanisms of the *Helicobacter pylori* CagA protein. *Nat Rev Cancer*, **4**, 688-694.
 20. Kwok, T., Zabler, D., Urman, S., Rohde, M., Hartig, R., Wessler, S., Misselwitz, R., Berger, J., Sewald, N., Konig, W. *et al.* (2007) *Helicobacter* exploits integrin for type IV secretion and kinase activation. *Nature*, **449**, 862-866.
 21. Mimuro, H., Berg, D.E. and Sasakawa, C. (2008) Control of epithelial cell structure and developmental fate: lessons from *Helicobacter pylori*. *Bioessays*, **30**, 515-520.
 22. Murata-Kamiya, N., Kurashima, Y., Teishikata, Y., Yamahashi, Y., Saito, Y., Higashi, H., Aburatani, H., Akiyama, T., Peek, R.M., Jr., Azuma, T. *et al.* (2007) *Helicobacter pylori* CagA interacts with E-cadherin and deregulates the beta-catenin signal that promotes intestinal transdifferentiation in gastric epithelial cells. *Oncogene*, **26**, 4617-4626.
 23. Wessler, S. and Backert, S. (2008) Molecular mechanisms of epithelial-barrier disruption by *Helicobacter pylori*. *Trends Microbiol*, **16**, 397-405.
 24. Viala, J., Chaput, C., Boneca, I.G., Cardona, A., Girardin, S.E., Moran, A.P., Athman, R., Memet, S., Huerre, M.R., Coyle, A.J. *et al.* (2004) Nod1 responds to peptidoglycan delivered by the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island. *Nat Immunol*, **5**, 1166-1174.
 25. Belair, C., Darfeuille, F. and Staedel, C. (2009) *Helicobacter pylori* and gastric cancer: possible role of microRNAs in this intimate relationship. *Clin Microbiol Infect*, **15**, 806-812.
 26. Fassi Fehri, L., Koch, M., Belogolova, E., Khalil, H., Bolz, C., Kalali, B., Mollenkopf, H.J., Beigier-Bompadre, M., Karlas, A., Schneider, T. *et al.* (2010) *Helicobacter pylori* induces miR-155 in T cells in a cAMP-Foxp3-dependent manner. *PLoS One*, **5**, e9500.
 27. Zhang, Z., Li, Z., Gao, C., Chen, P., Chen, J., Liu, W., Xiao, S. and Lu, H. (2008) miR-21 plays a pivotal role in gastric cancer pathogenesis and progression. *Lab Invest*, **88**, 1358-1366.
 28. Barranco, S.C., Townsend, C.M., Jr., Casartelli, C., Macik, B.G., Burger, N.L., Boerwinkle, W.R. and Gourley, W.K. (1983) Establishment and characterization of an in vitro model system for human adenocarcinoma of the stomach. *Cancer Res*, **43**, 1703-1709.
 29. Peek, R.M., Jr., Blaser, M.J., Mays, D.J., Forsyth, M.H., Cover, T.L., Song, S.Y., Krishna, U. and Pietenpol, J.A. (1999) *Helicobacter pylori* strain-specific genotypes and modulation of the gastric epithelial cell cycle. *Cancer Res*, **59**, 6124-6131.
 30. Selbach, M., Moese, S., Meyer, T.F. and Backert, S. (2002) Functional analysis of the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island reveals both VirD4-CagA-dependent and VirD4-CagA-independent mechanisms. *Infect Immun*, **70**, 665-671.
 31. Xiao, B., Liu, Z., Li, B.S., Tang, B., Li, W., Guo, G., Shi, Y., Wang, F., Wu, Y., Tong, W.D. *et al.* (2009) Induction of microRNA-155 during *Helicobacter pylori* infection and its negative regulatory role in the inflammatory response. *J Infect Dis*, **200**, 916-925.

32. Suh, M.R., Lee, Y., Kim, J.Y., Kim, S.K., Moon, S.H., Lee, J.Y., Cha, K.Y., Chung, H.M., Yoon, H.S., Moon, S.Y. *et al.* (2004) Human embryonic stem cells express a unique set of microRNAs. *Dev Biol*, **270**, 488-498.

33. Liang, Y., Ridzon, D., Wong, L. and Chen, C. (2007) Characterization of microRNA expression profiles in normal human tissues. *BMC Genomics*, **8**, 166.

34. Voorhoeve, P.M., le Sage, C., Schrier, M., Gillis, A.J., Stoop, H., Nagel, R., Liu, Y.P., van Duijse, J., Drost, J., Griekspoor, A. *et al.* (2006) A genetic screen implicates miRNA-372 and miRNA-373 as oncogenes in testicular germ cell tumors. *Cell*, **124**, 1169-1181.

35. Lee, K.H., Goan, Y.G., Hsiao, M., Lee, C.H., Jian, S.H., Lin, J.T., Chen, Y.L. and Lu, P.J. (2009) MicroRNA-373 (miR-373) post-transcriptionally regulates large tumor suppressor, homolog 2 (LATS2) and stimulates proliferation in human esophageal cancer. *Exp Cell Res*, **315**, 2529-2538.

36. Rippe, V., Dittberner, L., Lorenz, V.N., Drieschner, N., Nimzyk, R., Sendt, W., Junker, K., Belge, G. and Bullerdiek, J. (2010) The two stem cell microRNA gene clusters C19MC and miR-371-3 are activated by specific chromosomal rearrangements in a subgroup of thyroid adenomas. *PLoS One*, **5**, e9485.

37. Fischer, W., Puls, J., Buhrdorf, R., Gebert, B., Odenbreit, S. and Haas, R. (2001) Systematic mutagenesis of the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island: essential genes for CagA translocation in host cells and induction of interleukin-8. *Mol Microbiol*, **42**, 1337-1348.

38. Zeiner, G.M., Norman, K.L., Thomson, J.M., Hammond, S.M. and Boothroyd, J.C. (2010) *Toxoplasma gondii* infection specifically increases the levels of key host microRNAs. *PLoS One*, **5**, e8742.

39. O'Connell, R.M., Rao, D.S., Chaudhuri, A.A. and Baltimore, D. (2010) Physiological and pathological roles for microRNAs in the immune system. *Nat Rev Immunol*, **10**, 111-122.

40. Kim, Y.K., Yu, J., Han, T.S., Park, S.Y., Namkoong, B., Kim, D.H., Hur, K., Yoo, M.W., Lee, H.J., Yang, H.K. *et al.* (2009) Functional links between clustered microRNAs: suppression of cell-cycle inhibitors by microRNA clusters in gastric cancer. *Nucleic Acids Res*, **37**, 1672-1681.

41. Petrocca, F., Visone, R., Onelli, M.R., Shah, M.H., Nicoloso, M.S., de Martino, I., Iliopoulos, D., Pillozzi, E., Liu, C.G., Negrini, M. *et al.* (2008) E2F1-regulated microRNAs impair TGFbeta-dependent cell-cycle arrest and apoptosis in gastric cancer. *Cancer Cell*, **13**, 272-286.

42. Li, S.S., Yu, S.L., Kao, L.P., Tsai, Z.Y., Singh, S., Chen, B.Z., Ho, B.C., Liu, Y.H. and Yang, P.C. (2009) Target identification of microRNAs expressed highly in human embryonic stem cells. *J Cell Biochem*, **106**, 1020-1030.

43. Borgdorff, V., Lleonart, M.E., Bishop, C.L., Fessart, D., Bergin, A.H., Overhoff, M.G. and Beach, D.H. (2010) Multiple microRNAs rescue from Ras-induced senescence by inhibiting p21(Waf1/Cip1). *Oncogene*, **29**, 2262-2271.

44. Aylon, Y., Michael, D., Shmueli, A., Yabuta, N., Nojima, H. and Oren, M. (2006) A positive feedback loop between the p53 and Lats2 tumor suppressors prevents tetraploidization. *Genes Dev*, **20**, 2687-2700.

45. Li, Y., Pei, J., Xia, H., Ke, H., Wang, H. and Tao, W. (2003) Lats2, a putative tumor suppressor, inhibits G1/S transition. *Oncogene*, **22**, 4398-4405.

46. Chen, G., Sordillo, E.M., Ramey, W.G., Reidy, J., Holt, P.R., Krajewski, S., Reed, J.C., Blaser, M.J. and Moss, S.F. (1997) Apoptosis in gastric epithelial cells is induced by *Helicobacter pylori* and accompanied by increased expression of BAK. *Biochem Biophys Res Commun*, **239**, 626-632.
47. Yokoyama, K., Higashi, H., Ishikawa, S., Fujii, Y., Kondo, S., Kato, H., Azuma, T., Wada, A., Hirayama, T., Aburatani, H. *et al.* (2005) Functional antagonism between *Helicobacter pylori* CagA and vacuolating toxin VacA in control of the NFAT signaling pathway in gastric epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 9661-9666.
48. Backert, S., Tegtmeyer, N. and Selbach, M. (2010) The versatility of *Helicobacter pylori* CagA effector protein functions: The master key hypothesis. *Helicobacter*, **15**, 163-176.
49. Ahmed, A., Smoot, D., Littleton, G., Tackey, R., Walters, C.S., Kashanchi, F., Allen, C.R. and Ashktorab, H. (2000) *Helicobacter pylori* inhibits gastric cell cycle progression. *Microbes Infect*, **2**, 1159-1169.
50. Kuzushita, N., Rogers, A.B., Monti, N.A., Whary, M.T., Park, M.J., Aswad, B.I., Shirin, H., Koff, A., Eguchi, H. and Moss, S.F. (2005) p27kip1 deficiency confers susceptibility to gastric carcinogenesis in *Helicobacter pylori*-infected mice. *Gastroenterology*, **129**, 1544-1556.
51. Shirin, H., Sordillo, E.M., Kolevska, T.K., Hibshoosh, H., Kawabata, Y., Oh, S.H., Kuebler, J.F., Delohery, T., Weghorst, C.M., Weinstein, I.B. *et al.* (2000) Chronic *Helicobacter pylori* infection induces an apoptosis-resistant phenotype associated with decreased expression of p27(kip1). *Infect Immun*, **68**, 5321-5328.
52. Wu, S., Huang, S., Ding, J., Zhao, Y., Liang, L., Liu, T., Zhan, R. and He, X. (2010) Multiple microRNAs modulate p21Cip1/Waf1 expression by directly targeting its 3' untranslated region. *Oncogene*, **29**, 2302-2308.
53. Blaser, M.J., Perez-Perez, G.I., Kleanthous, H., Cover, T.L., Peek, R.M., Chyou, P.H., Stemmermann, G.N. and Nomura, A. (1995) Infection with *Helicobacter pylori* strains possessing cagA is associated with an increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach. *Cancer Res*, **55**, 2111-2115.
54. Ding, S.Z., Smith, M.F., Jr. and Goldberg, J.B. (2008) *Helicobacter pylori* and mitogen-activated protein kinases regulate the cell cycle, proliferation and apoptosis in gastric epithelial cells. *J Gastroenterol Hepatol*, **23**, e67-78.
55. Kim, M., Ashida, H., Ogawa, M., Yoshikawa, Y., Mimuro, H. and Sasakawa, C. (2010) Bacterial interactions with the host epithelium. *Cell Host Microbe*, **8**, 20-35.
56. Iwai, H., Kim, M., Yoshikawa, Y., Ashida, H., Ogawa, M., Fujita, Y., Muller, D., Kirikae, T., Jackson, P.K., Kotani, S. *et al.* (2007) A bacterial effector targets Mad2L2, an APC inhibitor, to modulate host cell cycling. *Cell*, **130**, 611-623.
57. Mimuro, H., Suzuki, T., Nagai, S., Rieder, G., Suzuki, M., Nagai, T., Fujita, Y., Nagamatsu, K., Ishijima, N., Koyasu, S. *et al.* (2007) *Helicobacter pylori* dampens gut epithelial self-renewal by inhibiting apoptosis, a bacterial strategy to enhance colonization of the stomach. *Cell Host Microbe*, **2**, 250-263.
58. Schauer, K., Gouget, B., Carriere, M., Labigne, A. and de Reuse, H. (2007) Novel nickel transport mechanism across the bacterial outer membrane energized by the TonB/ExbB/ExbD machinery. *Mol Microbiol*, **63**, 1054-1068.
59. Berezikov, E., Thuemmler, F., van Laake, L.W., Kondova, I., Bontrop, R., Cuppen, E. and Plasterk, R.H. (2006) Diversity of microRNAs in human and chimpanzee brain. *Nat Genet*, **38**, 1375-1377.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: MiRNAs expression profile in AGS cells.

(A) MiRNAs content of AGS cells was determined by highthroughput “454” pyrosequencing (see supplementary Table S1). Bars indicate the number of reads for each miRNA out of 25,348 miRNA matching sequences. Only the 42 most abundant miRNAs are plotted in order of decreasing number of reads. Black bars indicate mature miRNAs belonging to the miR-371-372-373 cluster.

(B) Pie chart represents the percentage and clustering of the most highly expressed miRNAs in AGS cells. Percentage represents the number of reads of each miRNA relative to the total number of reads.

(C) Endogenous expression of some mature miRNAs in AGS cells was measured by RT-qPCR. Bars indicate the relative expression of each miRNA normalized to U6 snRNA (RNU6B). Data are mean $\pm$ SD of three independent experiments.

Figure 2: MiR-372 and miR-373-mediated regulation of LATS2 translation and AGS cell proliferation.

(A) Schematic representation of the pGL3 vector (control) and the pGL3-LATS2 sensor containing the 3’untranslated region (UTR) of the LATS2 human gene, which harbors two predicted miR-372&373 target sequences (34). Also shown is the predicted base-pairing formed between miR-372 or miR-373 with each of the LATS2 3’UTR binding sites as predicted in <http://pictar.mdc-berlin.de>. Seed regions of miR-372 and miR-373 are underlined.

(B) LATS2 levels and mature miR-372 and miR-373 expression in AGS, MKN-74 and HeLa cells were determined by immunoblot and northern blot, respectively. α -tubulin and U6 snRNA were used as loading controls.

(C) The pGL3 and pGL3-LATS2 vectors were transfected into either parental AGS (mock), or cells treated with 100 nM of as372-373 or the sc372-373 control oligonucleotides. Transfection efficiency was assessed with the pRL-SV40 vector. Luciferase activities were measured 48 h post-transfection. Bars indicate the relative firefly luciferase activity normalized to the *Renilla* activity and compared to pGL3. Data are mean $\pm$ SD from three independent experiments. * and **, P -value < 0.05 and 0.01 , respectively.

(D) The DNA synthesis rate was measured by BrdU incorporation (10 nM for 1 h) in untreated (mock) AGS cells or cells treated for 48 h with 100 nM as372-373 or sc372-373. Bars represent the relative BrdU incorporation compared to that of untreated cells. Data are mean $\pm$ SD of three independent experiments. **, P -value < 0.01 .

Figure 3: *H. pylori*-induced down-regulation of mature miR-371, miR-372 and miR-373 levels in AGS cells.

(A) Endogenous expression of mature miR-371-3p, miR-372 and miR-373 (black bars), or miR-19b, miR-106b, miR-21 and miR-93 (grey bars), was determined by RT-qPCR in AGS cells 24 h post-infection at MOI 100. Bars indicate the relative miRNA expression normalized to SNORD49A (RNU49) and compared to uninfected AGS cells. Data represent mean $\pm$ SD of three independent experiments. ** and ***, P -value < 0.01 and 0.001 , respectively.

(B) Northern Blot analysis of mature miR-372, miR-373 and pre-miR-373 expression in uninfected (lane 2) or *H. pylori*-infected AGS cells (lane 3) in the same conditions as in (A); lane 1: M, size marker (nucleotides). A representative blot is shown.

(C, D) Expression of the primary miR-371-372-373 cluster transcript at different time after infection (MOI 100) (C), and as a function of the MOI at 6 h post-infection (D). Bars indicate the relative pri-miRNA expression determined by RT-qPCR, normalized to the ribosomal protein P0 mRNA and compared to uninfected AGS cells. A representative experiment is shown.

Figure 4: CagA-dependent repression of pri-miR-371-372-373 and up-regulation of LATS2 expression.

(A, B) Expression of the primary miR-371-372-373 cluster transcript **(A)** or LATS2 mRNA **(B)** was determined by RT-qPCR in uninfected AGS cells or cells infected for 24 h at MOI 100 with either *H. pylori* 26695 or its Δ CagA or Δ CagE isogenic mutants. Bars indicate the relative pri-miRNA or LATS2 mRNA expression normalized to the ribosomal protein P0 mRNA and compared to uninfected AGS cells. Data are mean $\pm$ SD of three independent experiments. ** and ***, *P*-value < 0.01 and 0.001, respectively.

(C) LATS2 immunoblot of AGS cells infected or not with *H. pylori* or its isogenic mutants as described above; α -tubulin was used as a loading control.

(D) EGFP fluorescence of LATS2 reporter cells infected or not with wt *H. pylori*, or the Δ CagA or Δ CagE isogenic mutants. Cells were infected as described above and observed 24 h later on an inverted microscope (Zeiss) in phase contrast (right panels) or epifluorescence (left panels).

Figure 5: Role of miR-372 and miR-373 in *H. pylori*-induced cell cycle arrest in AGS cells.

(A-B) DNA synthesis rate of uninfected AGS cells or cells co-cultured for 24 h with wt *H. pylori* or its isogenic mutants Δ CagA and Δ CagE (A), and parental AGS cells (mock), or cells treated either with 100 nM of a mixture (1:1) of anti-miR-372 and miR-373 antisense oligonucleotides (as372-373), 25 nM miR-372 and miR-373 double-stranded RNA mimics or 100 nM scrambled oligonucleotides (sc372-373), cultured with or without wt *H. pylori* for 24 h (B), was measured by BrdU-pulse labeling. Bars represent the relative BrdU incorporation level compared to that of uninfected (A) or uninfected parental (B) AGS cells. Data are mean $\pm$ SD of 2 independent experiments.

Fig_1

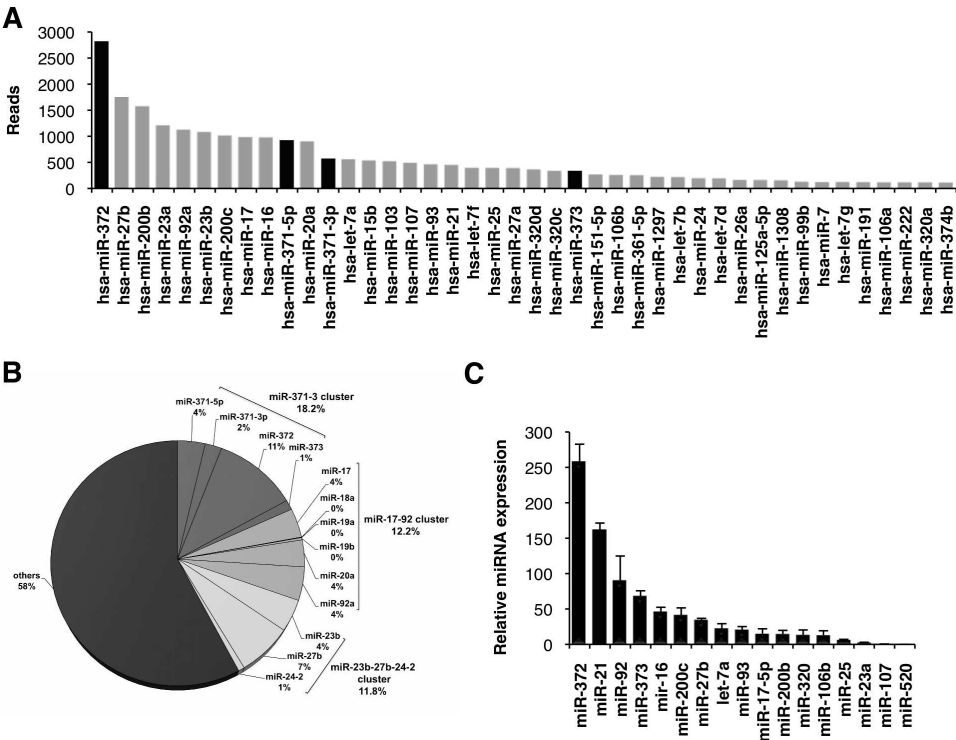


Figure 1
169x149mm (300 x 300 DPI)

Fig_2

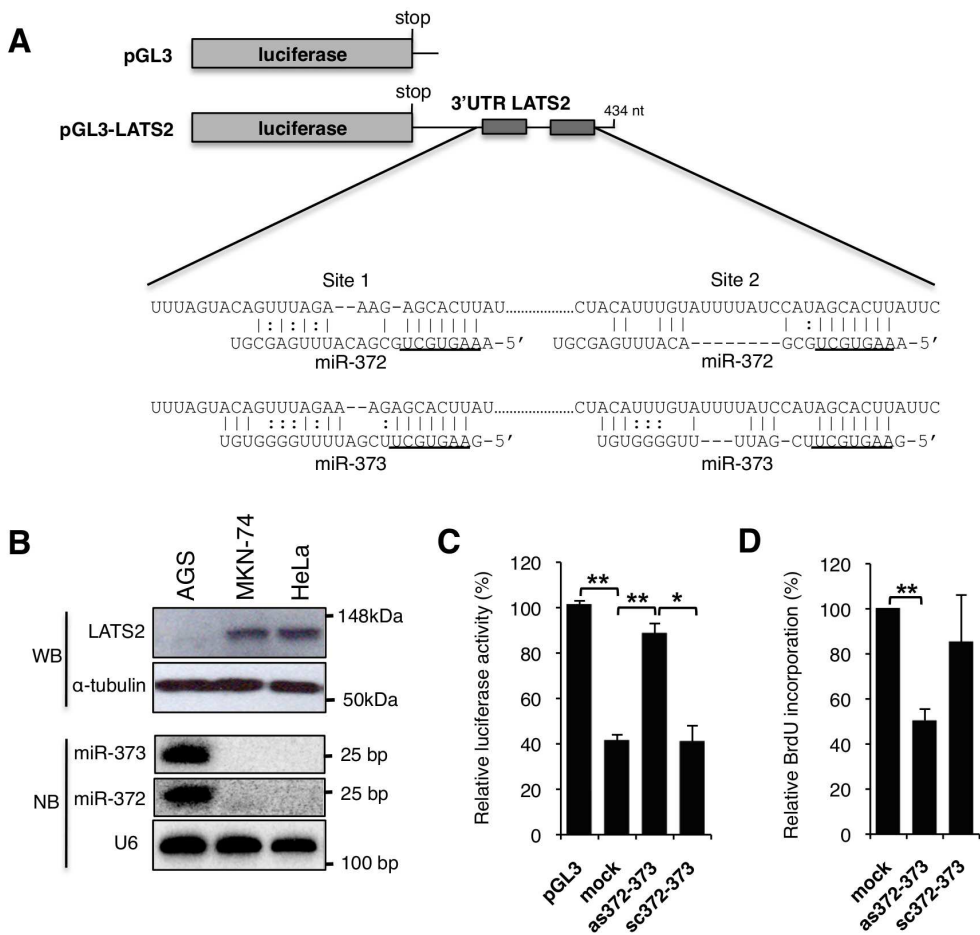


Figure 2
147x147mm (300 x 300 DPI)

Fig_3

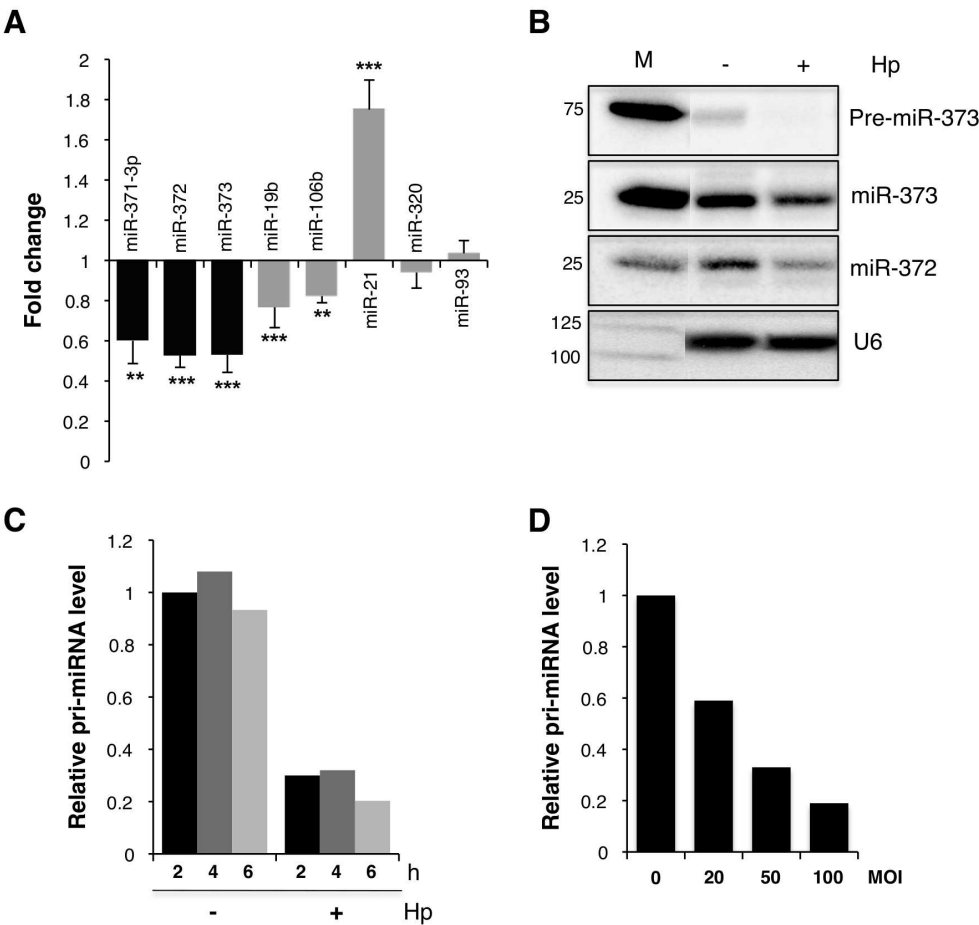


Figure 3
152x163mm (300 x 300 DPI)

Fig_4

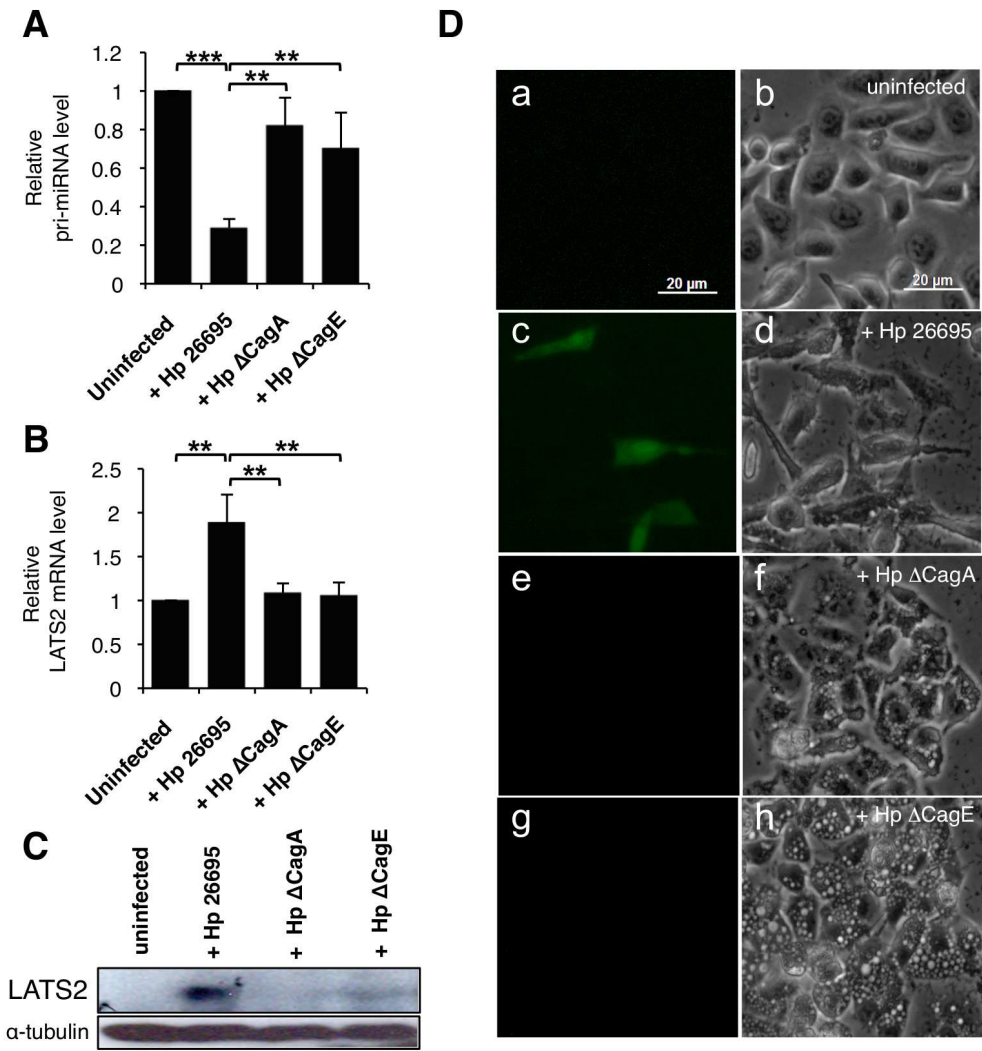


Figure 4
131x153mm (300 x 300 DPI)

Fig_5

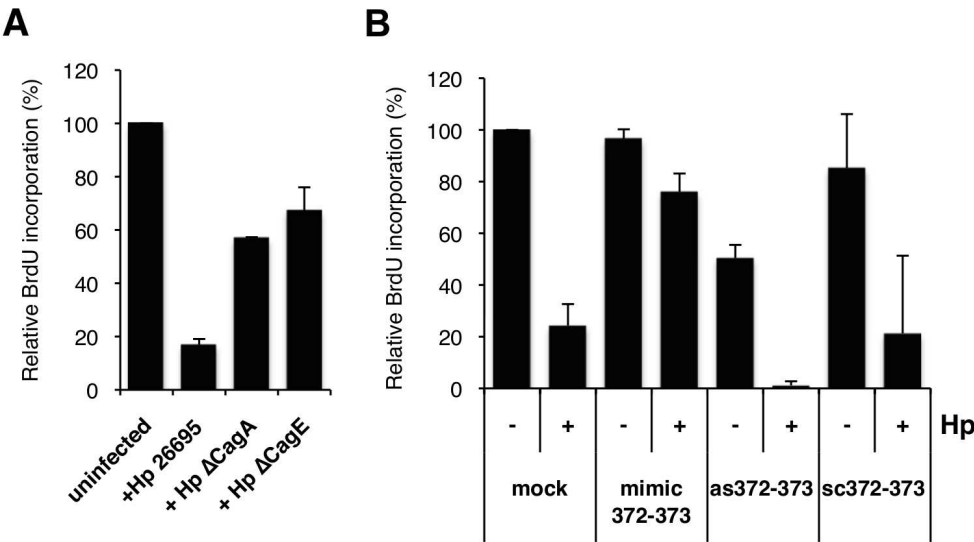


Figure 5
130x89mm (300 x 300 DPI)

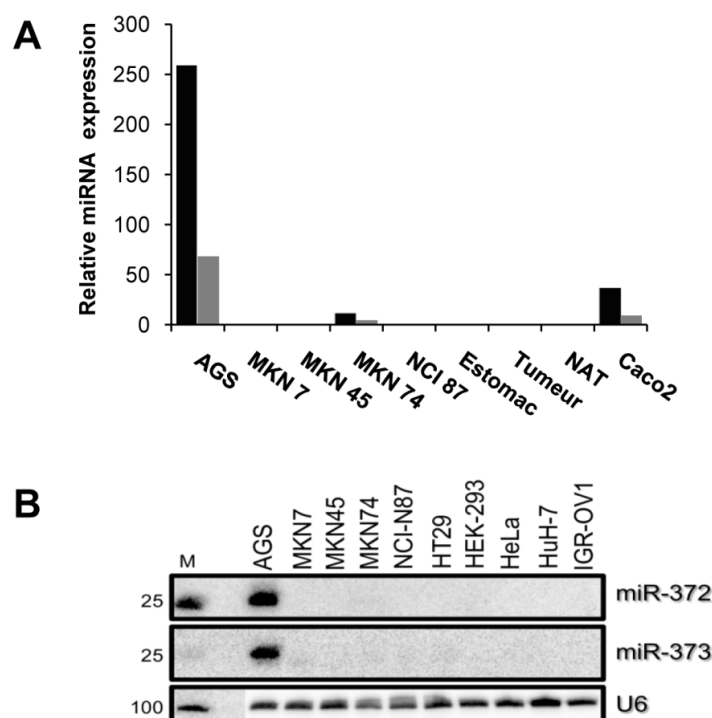


Figure 28 : Analyse comparative de l'expression de miR-372&373 dans différentes lignées gastriques humaines (AGS, MKN7, MKN45, MKN74 and NCI-N87), non gastriques (HT29, HEK 293, HeLa, HuH-7, IGR-OV1, Caco-2), ainsi que dans l'estomac, dans une tumeur gastrique et son tissu sain adjacent (NAT).

(A) L'expression de miR-372 (barre noire) et miR-373 (barre grise) a été déterminée par RT-qPCR dans les cellules AGS, MKN7, MKN45, MKN74, NCI-N87 et Caco-2 (Don du Dr Christine Varon, INSERM U853), dans l'estomac humain (AM7996, Ambion), dans une tumeur gastrique (AM7264, Ambion) et son NAT (AM7264, Ambion). Les barres indiquent l'expression relative des miRNAs normalisée par rapport à l'expression du snRNA U6 (RNU6B). Les données d'une expérience représentative sont présentées.

(B) Analyse Northern blot de l'expression de miR-372&373 dans les cellules AGS, MKN7, MKN45, MKN74, NCI-N87, HT29, HEK 293, HeLa, HuH-7 and IGR-OV1. Le snRNA U6 a été utilisé comme contrôle de charge. M: Marqueur radiomarqué (Promega) en paires de bases.

Tableau 4 : Analyse des bibliothèques obtenues lors du séquençage.

Banque	Nombre de séquences	Nombre de miRNAs	Nombre de séquences de <i>H. pylori</i>	Nombre de séquences de <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>
AGS1(infectées)	42220	17808 (42,2 %) ^a	2180	581
AGS2(contrôles)	42590	25348 (59,5%)	62	138

^a le pourcentage représente la proportion de miRNAs identifiés dans le nombre totale de séquences.

3. Analyse comparative de l'expression de miR-372&373 dans différentes lignées.

Le séquençage à haut débit des petits ARNs des cellules AGS nous a permis de mettre en évidence que miR-372 était le miRNA le plus abondant dans ces cellules. Ce miRNA ainsi que miR-373 sont 2 miRNAs spécifiques des cellules souches embryonnaires. Leur expression a également été détectée dans le placenta et de manière très faible dans les testicules et l'estomac (Liang *et al.*, 2007). De même, malgré leur potentiel oncogénique, leur expression au cours des cancers semble un évènement rare, car ils ont été détectés seulement dans des cancers des testicules, de l'oesophage et de la thyroïde (Voorhoeve *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2009; Rippe *et al.*, 2010). Par conséquent, nous avons analysé l'expression de ces 2 miRNAs dans de nombreuses lignées cellulaires, gastriques et autres, ainsi que dans des ARNs totaux extraits d'estomac sain et de tumeurs gastriques (Ambion), par RT-qPCR (Figure 28a) et Northern blot (Figure 28b). Outre les cellules AGS où ils sont très abondants, nous avons détecté miR-372&373 uniquement dans la lignée gastrique MKN-74 et dans la lignée colique Caco-2 (Figure 28a). Cependant, l'expression de ces 2 miRNAs dans ces cellules est relativement faible comparée aux cellules AGS. Aucune expression de ces miRNAs n'a pu être mise en évidence dans les autres lignées cellulaires testées (Figure 28a-b). De même, nous n'avons pas détecté ces 2 miRNAs dans l'estomac sain, ni dans la tumeur gastrique ou dans le tissu sain adjacent à cette tumeur (Figure 28b). Ces résultats confirment que l'expression de ces miRNAs est un évènement rare dans les cancers, notamment dans les cancers gastriques.

4. Régulation des miRNAs au cours de l'infection par *H. pylori*.

Une fois le profil des miRNAs exprimés dans les cellules AGS déterminé, nous avons étudié leur régulation au cours de l'infection. Les cellules AGS ont été infectées à une MOI de 240 pendant 5 heures. Ensuite, les ARNs de ces cellules ont été extraits et les petits ARNs (18-25 nt) ont été purifiés et soumis à un pyroséquençage à haut débit. L'analyse des bibliothèques de séquences obtenues à partir des cellules témoins ou des cellules infectées est présentée dans le tableau 4. 42220 séquences ont été obtenues et alignées par Blast sur la Mirbase v14 afin d'identifier les miRNAs. 17808 miRNAs, soit 42,2 % des séquences, ont ainsi été identifiés. Le reste des séquences correspond à des fragments de dégradation des ARNs, des séquences inconnues et également à des ARNs bactériens. En effet, 2180 séquences correspondant à des ARNs d'*H. pylori* ont été ainsi identifiées. Cette contamination est due à l'adhésion des bactéries aux cellules AGS au cours de l'infection. Nous avons pu vérifier cette

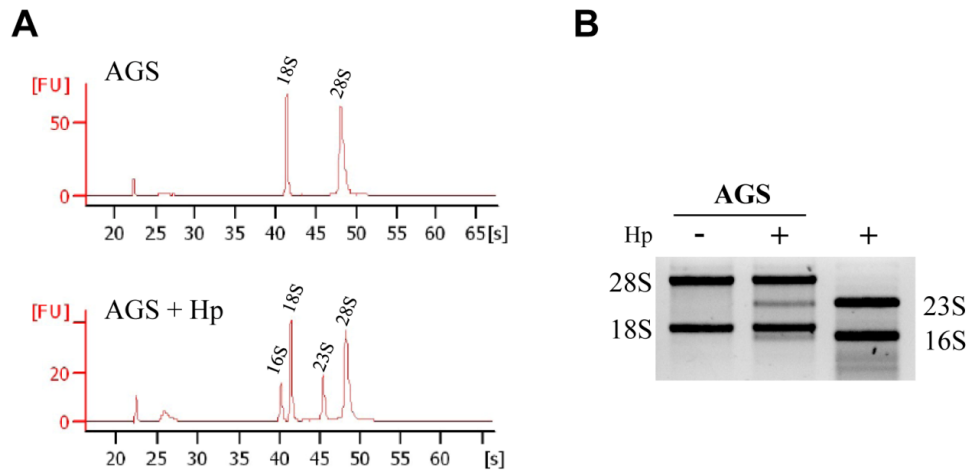


Figure 29 : Analyse de la qualité des ARNs extraits des cellules AGS non infectées et infectées.

La qualité des ARNs extraits des cellules AGS non infectées et infectées a été analysée par migration sur une puce RNA Nano (Agilent technologies) (A) et sur gel d'agarose (B). Les ARNr eucaryotes (28S, 18S) et bactériens (23S, 16S) sont indiqués.

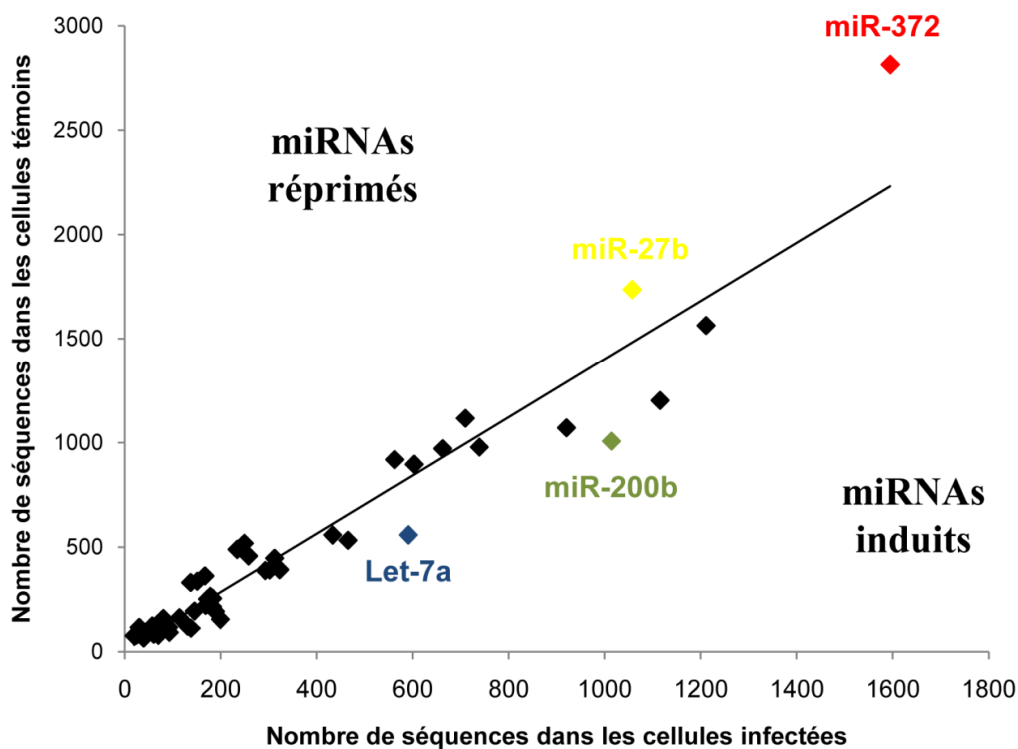


Figure 30 : Distribution des miRNAs dans les cellules AGS témoins et infectées par *H. pylori*.

L'expression des miRNAs, formulée en nombre de séquences, a été mesurée par séquençage à haut débit dans 2 conditions : les cellules AGS contrôles et les cellules infectées par *H. pylori*. La droite représente la courbe de tendance.

contamination lors de l'analyse de la qualité des ARNs purifiés (Figure 29). Cette analyse a été réalisée par migration des ARNs totaux des cellules sur des puces Agilent (Figure 29a) et sur gel d'agarose (Figure 29b). Ces 2 expériences permettent de visualiser 2 pics principaux dans les cellules AGS, les ARNr 28S et 18S (Figure 29a). Dans les cellules infectées, on observe l'apparition de 2 pics supplémentaires, correspondant aux ARNr bactériens 23S et 16S. D'autre part, 581 séquences s'alignant avec des ARNs de *Mycoplasma hyopneumoniae* ont été identifiées. Les alignements par Blast ont montré que ces 581 séquences correspondaient à des séquences très conservées chez les procaryotes telles que les ARNr et les ARNt. L'absence de contamination aux mycoplasmes ayant été préalablement vérifiée, il est donc probable que ces séquences appartiennent à *H. pylori*. (données non montrées).

La présence de ces séquences bactériennes est la cause d'une sous-estimation du nombre de miRNAs dans la banque ARN des cellules infectées. En effet, pour un nombre équivalent de séquences obtenues pour les 2 banques (42220 séquences pour la librairie AGS1 (cellules infectées) contre 42590 pour la librairie AGS2 (cellules non infectées), tableau 4, p72), le nombre de miRNAs identifiés est largement inférieur dans les cellules infectées comparé aux cellules contrôles (17808 miRNAs contre 25348 miRNAs, respectivement, tableau 4, p72). Cette sous-estimation rend difficile l'analyse de la régulation des miRNAs au cours de l'infection. Cependant, en comparant le nombre de séquences de chaque miRNA dans les cellules infectées à celui observé dans les cellules témoins, on observe que de nombreux miRNAs sont faiblement exprimés (nombre de séquences < 200) et ne seraient pas réguler au cours de l'infection (Figure 30). Cette observation nous a permis de déterminer une courbe de tendance. Ainsi, l'expression de la majorité des miRNAs ne seraient pas affectés au cours de l'infection par *H. pylori* (Figure 30). Cependant, un certain nombre de miRNAs ne se situent pas sur la courbe de tendance (e.g miR-27b, miR-200b, let-7a, miR-372), suggérant que leur expression serait altérée au cours de l'infection. Les résultats de ce séquençage nous ont permis de confirmer la répression du miR-372 au cours de l'infection. Par ailleurs, d'autres miRNAs seraient régulés différemment. Par exemple, miR-27b est également réprimé au cours de l'infection. Par contre, let-7a et miR-200b sont induits. Pour un certain nombre d'entre eux, nous avons pu confirmer ces résultats par d'autres techniques comme le northern blot et la RT-qPCR, et leur régulation est en cours d'étude dans notre laboratoire. Les résultats du séquençage n'ont cependant pas permis de confirmer l'induction de miR-21 observée par Zhang *et al.* (Zhang *et al.*, 2008) et nous-mêmes par RT-qPCR (Figure 3, Manuscrit en révision). On peut expliquer cette observation par des conditions expérimentales différentes. En effet, l'induction du miR-21 a été observée après 24 h d'infection, alors que le

séquençage à haut débit a été réalisé après seulement 5 h d'infection. On peut donc faire l'hypothèse que l'induction du miR-21 serait un événement tardif au cours de l'infection.

Ainsi, les résultats du séquençage à haut débit sur les cellules infectées montrent que de nombreux miRNAs seraient régulés au cours de l'infection, démontrant que les miRNAs joueraient un rôle important au cours de l'infection. Cependant, ces résultats devront être confirmés, les mécanismes de régulation identifiés et le rôle des effecteurs bactériens analysés.

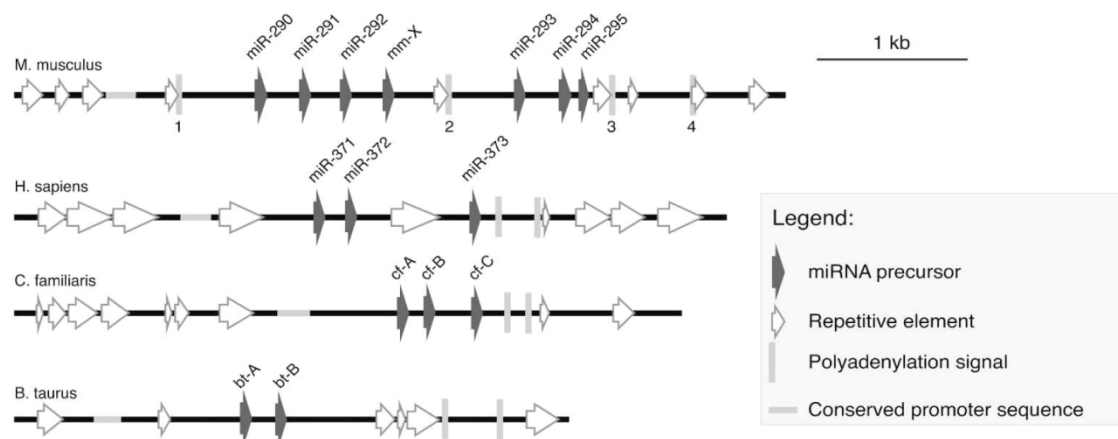


Figure 31 : Représentation schématique des clusters EEmiRC murin, humain, canin et bovin.

Adaptée d'(Houbaviy *et al.*, 2005).

Chapitre II : La régulation du *cluster* miR-371-372-373.

1. Introduction.

Dans la dernière partie de nos travaux, nous avons entrepris d'identifier les mécanismes impliqués dans la régulation de l'expression du *cluster* miR-371-372-373, notamment au cours de l'infection par *H. pylori*.

Alors que le rôle de ce *cluster* dans les cancers, ainsi qu'au niveau des cellules souches embryonnaires, est de mieux en mieux caractérisé, les mécanismes impliqués dans sa régulation n'ont toujours pas été identifiés. En effet, les propriétés oncogéniques du *cluster* miR-371-372-373, notamment de miR-372&373, ont été clairement mises en évidence dans plusieurs cancers (Voorhoeve *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2009), et nous avons confirmé leur rôle dans la prolifération des cellules AGS. De même, son rôle dans le développement embryonnaire précoce a été caractérisé. A l'origine, miR-372&373 furent identifiés dans les cellules souches embryonnaires humaines (hES), où ils sont abondamment et spécifiquement exprimés (Suh *et al.*, 2004). Leur expression est par la suite rapidement réprimée au cours de la différenciation de ces cellules. Ce *cluster* fait partie de la famille des EEmiRC (*Early Embryonic microRNA cluster*), famille conservée uniquement chez les mammifères placentaires (Figure 31) (Houbaviy *et al.*, 2005). Son rôle dans les cellules hES a été peu étudié à cause des contraintes bioéthiques que présente la manipulation de ces cellules. Cependant, les fonctions de son homologue murin, le *cluster* miR-290, est maintenant bien connu dans les cellules souches embryonnaires de souris (mES). Le *cluster* miR-290 est constitué de 7 miRNAs (Figure 31), notamment les miR-291-3p, miR-294 et miR-295, qui présentent la même graine que miR-372&373, suggérant que leurs fonctions ont été conservées au cours de l'évolution. Ce *cluster* est très abondant dans les cellules mES où il représente plus de 70 % des miRNAs exprimés (Marson *et al.*, 2008). Ils jouent un rôle essentiel dans l'auto-renouvellement et la pluripotence de ces cellules en régulant leur cycle cellulaire, notamment la transition G1/S (Judson *et al.*, 2009; Wang and Blelloch, 2009). De la même manière que miR-372&373 chez l'Homme, miR-291-3p, miR-294 et miR-295 sont capables de réprimer LATS2, afin de permettre l'auto-renouvellement des cellules mES. Outre son rôle dans la régulation du cycle cellulaire, le *cluster* miR-290 serait également impliqué dans le contrôle de la méthylation de l'ADN observée au cours de la différenciation des cellules mES (Benetti *et al.*, 2008; Sinkkonen *et al.*, 2008). La différenciation des cellules souches embryonnaires s'accompagne d'un changement drastique au niveau de leur transcriptome avec une répression de l'expression des gènes impliqués dans l'auto-

Tableau 5 : Séquences des amorces utilisées.

Amorce	Séquence	Site de restriction	
5'-Prom371	AAAAGATCTCACGGTCTCACTCTGTCC	BglII	Clonage du promoteur
Rev1-prom371	AAAAGCTTAGCAATACTCACAGAGGCCAAT	HindIII	
R-LEF1mut	GCCACCCTGCTCCCAGAGATCCTAGCTTGCCTTAGTCAG		Mutagenèse dirigée
F-LEF1mut	TAAGGCAAGCTAGGATCTCTGGGAGCAGGGTGGCTTGGG		
F-LEF2mut	TGGGCTTTAATCCTATCTCTGTTGAGTGGGCTCTCACCTATA		
R-LEF2mut	GAGAGCCCACTCAACAGAGATAGGATTAAAGCCCACCCCTT		
F-TATAmut	AGCGGGCTCTACCCACTAGTAGAACGCAGCTGCAGTGAAC	SpeI	
R-TATAmut	CTGCAGCTGCGTTCTACTAGTGGGTGAGAGCCCACTCAACT		
R-Sp1mut	TCATTCCCCCTGGTCACTAGTCCAAGCCACCCTGCTCCCTT		
F-Sp1mut	AGCAGGGTGGCTTGGACTAGTGACCAGGGGGAATGAGAGGG		
1FwprimiR371	ACCATTTTGATTGGGTGAGG		PCR bisulfite
R2-prom371B	TTCTCTTCCTTTCACCATCTAAC		
F3-prom371B	GTTAGATGGTGAAAGGAAGAGAA		
R-primiRBisulf	TACATATCAATTATAACACCAAC		
F1-prom371B	GGTAATTTTTGTATTTTTTTGGTAGAG		Analyse HRM
R1-prom371B	TCATCCACTCAACAAATATTTAAATA		
F4	TTTGTGGGTTTTAAATGTGGAGTAT		
R4	AAAACCTATACCCAAAACAATTTCC		
M13Reverse	CAGGAAACAGCTATGAC		Séquençage TopoTA
M13Forward	GTAAAACGACGGCCAG		

renouvellement, notamment les facteurs de transcription Oct4, Sox2 et Nanog. Cette répression implique des événements épigénétiques, notamment un remodelage des histones et une méthylation de l'ADN. Le *cluster* miR-290 participerait activement à ce phénomène, en contrôlant l'expression du répresseur transcriptionnel, *retinoblastoma-like 2* (rbl2), des enzymes impliquées dans la méthylation de l'ADN, les DNA méthyltransférases.

Au même titre que les facteurs de transcription Oct4, Sox2 et Nanog, les EEmiRC jouent donc un rôle essentiel dans l'auto-renouvellement et la pluripotence des cellules ES. Cependant, la régulation de leur expression et les acteurs impliqués restent actuellement inconnus. Les cellules AGS constituent donc un outil de choix pour l'étude du *cluster* miR-371-372-373.

Nos travaux ont montré que la répression du *cluster* miR-371-372-373 au cours de l'infection était un phénomène très rapide, ayant lieu à une étape précoce de la biogénèse des miRNAs. En effet, le niveau de pri-miRNA chute de plus de 70 % dans les cellules après seulement 2 h d'infection (Figure 3C, manuscrit en révision). A partir de ces résultats, on peut envisager 2 hypothèses concernant la régulation du *cluster* au cours de l'infection : une régulation transcriptionnelle ou une régulation post-transcriptionnelle, au niveau de la maturation du pri-miRNA. Afin de répondre à cette question, nous avons identifié et cloné le promoteur putatif du *cluster* miR-371-372-373 en amont d'un gène rapporteur. Dans un deuxième temps, nous avons entrepris de le caractériser, notamment au point de vue des sites de fixation de facteurs de transcription associés à son activité. Cet outil nous permettra de suivre son activité transcriptionnelle, notamment au cours de l'infection.

2. Matériels et Méthodes.

Les amorces utilisées pour les différentes PCR et la mutagenèse dirigée sont listées dans le tableau 5. Les amorces utilisées pour le séquençage bisulfite et l'analyse HRM ont été dessinées avec le logiciel MethPrimer (Li and Dahiya, 2002).

Plasmides : Le plasmide pCR®2.1-TOPO® (Invitrogen) de 3,9 kb contient le gène codant pour la sous-unité α de la β -galactosidase (β -gal) dont l'expression est sous la dépendance du promoteur Plac. L'activité β -gal d'une bactérie transformée avec ce plasmide est révélée par la coloration bleue de la colonie en présence d'un substrat chromogène de la β -gal, le 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside (X-gal). Un site de clonage multiple est situé dans ce gène. Le clonage d'une séquence au niveau de ce site abolit

l'expression d'une β -gal fonctionnelle dans les bactéries transformées avec ce plasmide. En présence de X-gal, ces colonies bactériennes resteront blanches.

Les plasmides pGL3-basic (pGL3-b) de 4,8 kb et pGL3-promoter (pGL3-p) de 5 kb (Dons du Dr. Cécile Duplaa, INSERM U828, Pessac) contiennent le gène codant la luciférase firefly. Dans le pGL3-b, ce gène est dépourvu de promoteur alors que, dans le pGL3-p, la transcription de ce gène est sous la dépendance du promoteur SV40 (*Simian virus 40*).

Le plasmide pRL-SV40 (Proméga), utilisé comme témoin de transfection, contient le gène de la luciférase *Renilla* sous la dépendance du promoteur SV40.

Ces plasmides contiennent également un gène de résistance à l'ampicilline, ainsi qu'une origine de répllication bactérienne.

Séquençage de l'ADN génomique après traitement au bisulfite de sodium : L'ADN génomique (ADNg) des différentes lignées cellulaires est extrait selon le protocole du kit DNeasy (Qiagen). La concentration de l'ADNg est déterminée par mesure de l'absorbance à 260 nm (NanoDrop Technologies, Inc.). 2 μ g d'ADNg sont traités au bisulfite de sodium et purifiés selon le protocole du kit Epitect[®] bisulfite (Qiagen). L'ADNg traité est dosé et 200 ng sont utilisés pour la PCR (*Polymerase chain reaction*), dont le mélange réactionnel (50 μ l) contient 10 mM KCl, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 20 mM Tris-HCl (pH 8,8), 2 mM MgSO₄, 0,1% Triton[®] X-100, 200 μ M dNTPs, 10 pmoles de chaque amorce (Tableau 5, p76) et 5 U de *Taq* DNA polymérase (New England Biolabs). Après une étape initiale de dénaturation, 2 minutes (min) à 94°C, la PCR consiste à 30 cycles : 15 s à 94°C, 30 s à 54°C, 15 s à 72°C, puis à une dernière étape 10 min à 72°C. Les produits de PCR sont ensuite clonés dans le plasmide pCR[®]2.1-Topo[®] selon le protocole du kit TOPO TA cloning (Invitrogen). Les produits de ligation sont électroporés dans des bactéries *Escherichia coli* (*E. coli*) XL1-Blue et ces dernières sont alors étalées sur milieu Luria-Bertani (LB) solide supplémenté avec 100 μ g/ml d'ampicilline et 1,6 mg de X-Gal puis incubées une nuit à 37°C. Les plasmides sont ensuite extraits des colonies blanches et les inserts qu'ils contiennent sont séquencés (kit BigDye Terminator v1.1, Applied Biosystems).

Analyse par HRM (High Resolution Melt) : 50 ng d'ADNg traité au bisulfite sont analysés selon le protocole du kit Epitect[®] HRM (Qiagen). La PCR est réalisée sur un thermocycleur Rotor-Gene Q (Qiagen) et consiste à une étape d'activation de la *Taq* polymérase 5 min à 95°C suivie de 45 cycles : 10 s à 95°C, 30 s à 55°C et 10 s à 72°C. La PCR est suivie d'une analyse HRM de 65°C à 95°C avec des incréments de 0,1°C.

Clonage du promoteur putatif du cluster miR-371-372-373 : Tout d'abord, les différentes régions du promoteur putatif du *cluster* miR-371-372-373 ont été amplifiées par PCR à partir de 200 ng d'ADNg extrait des cellules AGS, selon un protocole standard de PCR (Expand High Fidelity^{PLUS} PCR System, Roche Applied Science). Après vérification de la taille des fragments obtenus, les produits de PCR sont purifiés selon le protocole du kit Qiaquick PCR purification (Qiagen) et leur concentration est déterminée par mesure de l'absorbance à 260 nm. Ces produits de PCR et le plasmide pGL3-b sont alors digérés pendant 2 h à 37°C par 20 U de *Bgl*III (New England Biolabs). Les produits de digestion sont alors purifiés par phénol/chloroforme (v/v) et précipités avec 2 volumes d'éthanol, en présence de 0,1 volume d'acétate de sodium 3M, pendant une nuit à -20°C. Ces produits sont ensuite digérés par 20 U de *Hind*III (New England Biolabs) pendant 2 h à 37°C et purifiés de la même manière. Le plasmide doublement digéré pGL3-b est alors déphosphorylé pendant 1 h à 37°C par 0,5 U de CIP (*Calf Intestinal Alkaline Phosphatase*, New England Biolabs), purifié par phénol/chloroforme (v/v) et précipité une nuit à -20°C. Plasmide et inserts sont alors resuspendus dans 10 µl d'H₂O et dosés au Nanodrop. Les inserts sont ligués dans le plasmide pendant 16 h à 16°C, avec un rapport molaire de 3 moles d'insert par mole de plasmide. Le mélange de ligation contient 100 ng du plasmide pGL3-b digéré et déphosphorylé, 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1 mM ATP, 25 µg/ml BSA, 5 à 15 ng d'insert, et 400 U de T4 DNA ligase (New England Biolabs). 2 µl de la ligation sont alors incubés 1 min à 4°C avec 50 µl de bactéries électrocompétentes *E. coli* XL1 Blue puis le mélange subit un choc électrique de 2500V.cm⁻¹ pendant 5 ms. 250 µl de SOC sont alors ajoutés et les bactéries électroporées sont incubées 1 h à 37°C sous agitation. 1/10 de cette culture est étalée sur milieu LB solide supplémenté en ampicilline (100 µg/ml) et incubée une nuit à 37°C. La présence des inserts est vérifiée par PCR sur colonies. Les plasmides sont extraits selon le protocole du kit HP Genelute Plasmid Midiprep (SIGMA) et les inserts qu'ils contiennent sont séquencés (kit BigDye Terminator v1.1, Applied Biosystems).

Mutagenèse dirigée par PCR : Le mélange réactionnel de la PCR (50 µl) contient 10 ng de plasmide parental, 200 µM dNTPs, 20 mM Tris-HCl (pH 8,8), 2 mM MgSO₄, 10 mM KCl, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 0,1 % Triton[®] X-100, 0,1 mg/ml BSA, 10 pmoles de chacune des amorces, et 2,5 unités (U) de *Pfu Turbo* DNA polymérase (Agilent Technologies). Après une étape initiale de dénaturation, 2 min à 95°C, la PCR consiste à 30 cycles de 30 s à 95°C, 1 min à 60°C, 1 min/kb à 72°C, puis à une dernière étape 10 min à 72°C. Les produits de PCR sont ensuite incubés pendant 1,5 h avec 20 U de *Dpn*I (Invitrogen) afin de dégrader le

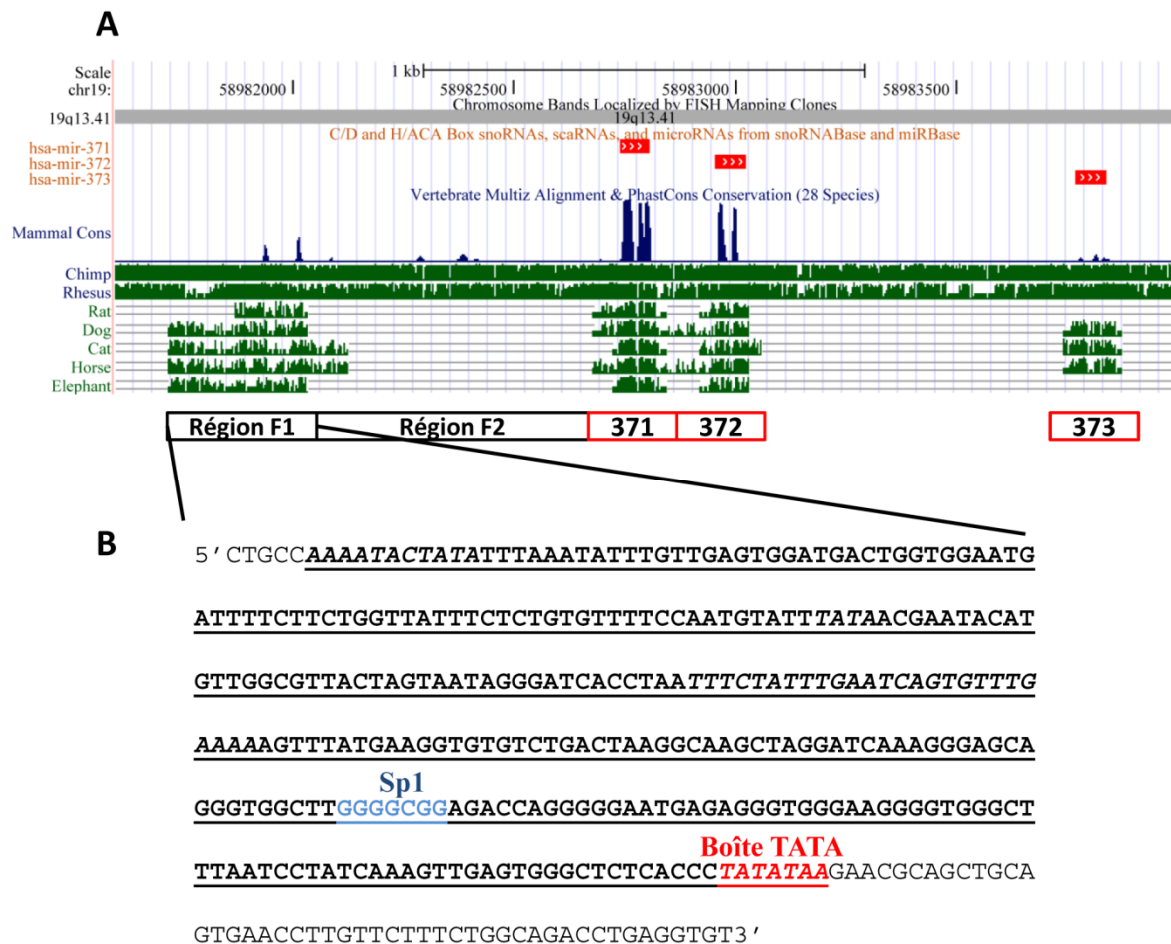


Figure 32 : Identification du promoteur putatif du *cluster* miR-371-372-373.

A. Représentation schématique du locus génomique contenant le *cluster* miR-371-372-373, ainsi que la région en amont, comme visualisée sur le UCSC Genome Browser. La conservation de ces régions chez les mammifères placentaires est également représentée. La localisation des régions F1 et F2, et des miR-371, 372 et 373 est indiquée.

B. Séquence de la région F1. La région surlignée représente la région conservée chez les mammifères placentaires. La boîte TATA, ainsi que le site Sp1 sont indiqués en rouge et bleu, respectivement.

plasmide parental méthylé. 5 µl des produits de PCR sont alors transformés dans des bactéries chimiocompétentes *E. coli* XL1 Blue selon un protocole standard. Les bactéries ainsi transformées sont étalées sur milieu LB solide supplémenté avec 100 µg/ml d'ampicilline et incubées une nuit à 37°C. La mutagénèse des plasmides extraits des colonies obtenues est vérifiée par digestion enzymatique et séquençage (kit BigDye Terminator v1.1, Applied Biosystems).

Culture cellulaire et Transfection : La veille de la transfection, les cellules sontensemencées dans des plaques 24 puits (Nunc) à raison de 80000, 80000 et 300000 cellules/puits pour les cellules AGS, HeLa et MKN-74, respectivement. Le lendemain, 150 ng de plasmide et 5 ng de plasmide contrôle pRL-SV40 sont transfectés dans ces cellules selon le protocole de la lipofectamine 2000 (Invitrogen). Après 6-7 h d'incubation, le milieu est changé. Les activités des luciférase firefly et *Renilla* sont mesurées, 24 h ou 48 h après la transfection selon le protocole du kit Dual luciferase (Promega). L'activité de la luciférase firefly est normalisée par rapport à celle de la luciférase *Renilla*, contrôle d'efficacité de transfection.

3. Résultats.

3.1 Identification et clonage du promoteur putatif du *cluster* miR-371-372-373.

Afin d'identifier le promoteur putatif de ce *cluster*, nous avons réalisé une analyse bio-informatique de la région chromosomique contenant le *cluster* miR-371-372-373. Ce *cluster* est situé sur le chromosome 19 au niveau de la bande 13q41. L'analyse de la conservation de séquence chez les mammifères nous a permis d'identifier une région très conservée d'environ 300 pb située 700 pb en amont du miR-371 (Figure 32a). La caractéristique la plus évidente de cette région est la présence à son extrémité 3' d'un motif TATATAAG qui correspond à une boîte TATA canonique. Cette boîte TATA est parfaitement conservée chez les mammifères. Comme nous l'avons abordé dans l'introduction, la transcription de la majorité des miRNAs est contrôlée par l'ARN polymérase II (Cai *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2004). Dans la première partie de ce travail, l'utilisation d'une amorce oligo(dT) lors des transcriptions inverses réalisées sur le pri-miRNA démontre la présence d'une queue poly(A) à l'extrémité 3' de ce pri-miRNA, le pri-miRNA ne présentant pas de région poly(A) dans sa séquence. A partir de cette observation, on peut donc faire l'hypothèse que la transcription du *cluster* miR-371-372-373 est contrôlée par l'ARN polymérase II. La présence de cette boîte TATA

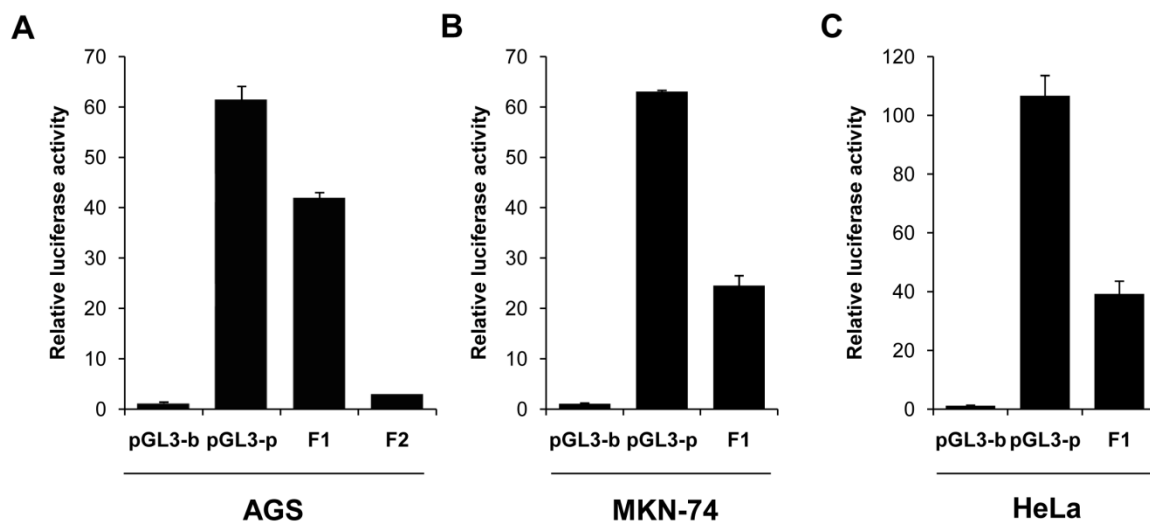


Figure 33 : Activité transcriptionnelle de la région F1 dans différentes lignées cellulaires.

Les différentes constructions pGL3-b, pGL3-p, F1 et F2 ont été transfectées dans les lignées AGS (A), MKN-74 (B) et HeLa (C), puis l'activité luciférase a été dosée 24 h après transfection. Les histogrammes représentent l'activité relative de la luciférase firefly, normalisée par rapport à celle de la *Renilla* et comparée au pGL3-b. Les données représentatives d'une expérience sont présentées.

putative constitue un argument supplémentaire en faveur d'une transcription pol II dépendante et suggère que cette région conservée pourrait constituer le promoteur basal (*core promoter*) de ce *cluster*.

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons extrait par PCR, à partir de l'ADNg des cellules AGS, 2 régions, que nous avons ensuite cloné en amont d'un gène rapporteur, la luciférase firefly, dans le vecteur d'expression pGL3-b dépourvu de promoteur. La première construction, nommée F1, contient la région conservée de 300 pb, ainsi que les 80 et 280 pb situées en 3' et 5' de cette région, respectivement. La deuxième construction, nommée F2, contient la région située entre la région F1 et le pre-miR-371. A la différence de la région F1, cette région n'est pas conservée chez les mammifères. Ces 2 constructions, ainsi que les vecteurs contrôles pGL3-b dépourvu de promoteur, et pGL3-p, dans lequel la transcription du gène codant la luciférase firefly est sous la dépendance du promoteur du SV40, ont été transfectés dans des cellules AGS et l'activité de la luciférase firefly mesurée. Les cellules transfectées avec le vecteur F1 ou avec le vecteur contrôle pGL3-p présentaient une activité luciférase 40 et 60 fois plus élevée, respectivement, comparée aux cellules transfectées avec le plasmide témoin pGL3-b dépourvu de promoteur (Figure 33a). Ce résultat démontre clairement que la région F1 contient un élément transactivateur de la transcription du gène rapporteur. Par ailleurs, aucune activité luciférase significative n'a été observée dans les cellules transfectées avec le vecteur F2 (Figure 33a). Par conséquent, cette région ne permet pas la transcription du gène rapporteur. Les travaux d'Houbaviy *et al.* concernant le promoteur du *cluster* miR-290 ont montré que, chez la souris, cette région située entre la boîte TATA et le pre-miR-290-5p était transcrite puis épissée du pri-miRNA (Houbaviy *et al.*, 2005). Ce *cluster* étant conservé chez les mammifères, on peut émettre l'hypothèse que, de la même manière que chez la souris, cette région est située chez l'Homme dans le pri-miRNA. Des résultats de RT-PCR nous ont permis de confirmer que cette région était effectivement transcrite (données non montrées).

Ces résultats suggèrent que la région F1 contient effectivement le promoteur putatif du *cluster* miR-371-372-373. La région conservée et présente dans la séquence F1 constituerait donc le promoteur basal du *cluster*.

Nos travaux ont montré que l'expression du *cluster* miR-371-372-373 était spécifique aux cellules AGS. Alors que ce *cluster* est fortement exprimé dans les cellules AGS, nous avons détecté une expression significative de ce *cluster* uniquement dans 2 autres lignées : la lignée MKN-74 d'origine gastrique et la lignée Caco-2 d'origine intestinale (cf. chapitre II).

Cependant, cette expression est relativement faible et non fonctionnelle dans le cas des MKN-74, LATS2 étant facilement détectable par Western blot dans ces cellules (Figure 2, Manuscrit en révision). Afin de vérifier si l'activité transcriptionnelle de la région F1 était également spécifique des cellules AGS, 2 autres lignées cellulaires ont été transfectées avec le vecteur F1 : la lignée HeLa d'origine cervicale, qui n'exprime pas le *cluster* miR-371-372-373, et la lignée MKN-74, qui l'exprime faiblement. De manière surprenante, ces 2 types cellulaires présentaient une activité luciférase (Figure 33b-c, p80) : l'activité mesurée dans les cellules HeLa était identique à celle mesurée dans les cellules AGS (Figure 33c, p80), tandis que celle des cellules MKN-74 était inférieure de 50 % (Figure 33b, p80). Par conséquent, la région F1 permet également l'expression du gène rapporteur dans les lignées MKN-74 et HeLa.

On peut donc conclure que la région F1, contenant le promoteur basal, ne permet pas d'expliquer la spécificité d'expression du *cluster* miR-371-372-373 observée au niveau des cellules AGS. Par conséquent, on peut formuler plusieurs hypothèses concernant la régulation de l'expression de ce *cluster* dans ces lignées cellulaires :

- Présence de mutations « gain de fonction » dans le cas des cellules AGS ou perte de fonctions dans les autres lignées. Cependant, le séquençage du *cluster* miR-371-372-373, ainsi que de la région F1, n'a pas permis de mettre en évidence la présence de mutations au niveau de l'ADNg de ces différentes lignées (données non montrées).
- Présence d'une séquence génomique régulatrice hors de la région F1. L'analyse bio-informatique des séquences à proximité de la région F1 ne nous a pas permis de mettre en évidence d'autres régions conservées de manière significative parmi les mammifères placentaires.
- Implication de phénomènes épigénétiques, notamment de la méthylation de l'ADN. En effet, l'altération de la régulation épigénétique de l'expression des gènes est fréquemment observée au cours de pathologie telle que le cancer, et il nous a paru important d'évaluer ce mécanisme dans les cellules AGS, MKN-74 et Caco-2 exprimant des taux variables du pri-miR-371-372-373.

3.2 Etude de la méthylation du *cluster* miR-371-372-373.

Le *cluster* miR-371-372-373 est spécifiquement exprimé dans les cellules hES, puis son expression disparaît rapidement au cours de la différenciation de ces cellules (Suh *et al.*, 2004). Son expression a également été détectée dans le placenta et de manière très faible dans les testicules et l'estomac (Liang *et al.*, 2007). La différenciation des cellules hES s'accompagne d'un bouleversement de l'expression génique, avec notamment une extinction

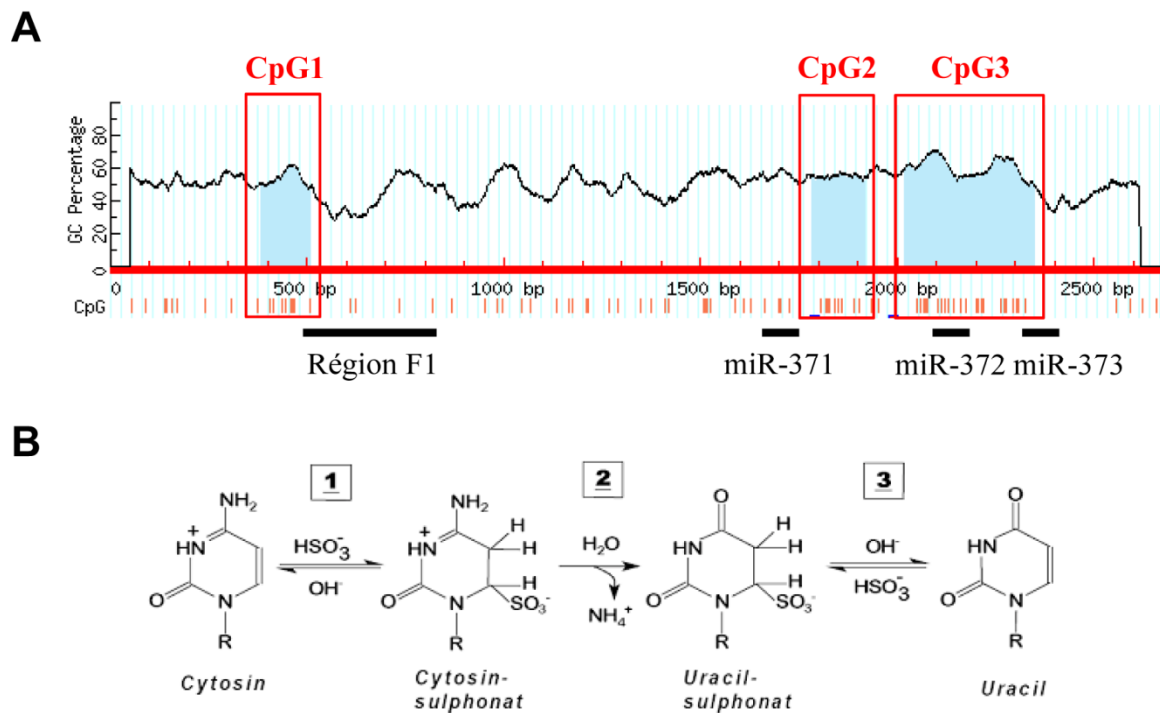


Figure 34 : Identification des îlots CpG potentiels du cluster miR-371-372-373.

(A) La recherche des îlots a été réalisée par le logiciel MethPrimer (Li and Dahiya, 2002). La courbe représente le pourcentage de GC dans la région du *cluster* miR-371-372-373 en fonction de la distance en pb de l'extrémité 5'. Les îlots CpG sont encadrés en rouge. Le positionnement de la région F1 et des miR-371, 372 et 373 est représenté par un trait noir.

(B) Principe de la conversion des cytosines non méthylées par le bisulfite de sodium. La réaction en 3 étapes comprend une sulphonation de la cytosine [1], suivie d'une désamination [2] de la cytosine, puis de la désulphonation de l'uracile ainsi formée [3].

des gènes impliqués dans la pluripotence et l'auto-renouvellement de ces cellules. Les mécanismes épigénétiques jouent un rôle essentiel dans ce processus. L'épigénétique est l'étude des modifications héréditaires et réversibles de l'expression des gènes, qui se produisent sans altération de la séquence primaire de l'ADN génomique. Ce phénomène implique plusieurs mécanismes tels que les modifications post-traductionnelles des histones, le positionnement des nucléosomes sur l'ADNg et la méthylation des cytosines de l'ADN (pour revue : (Bernstein *et al.*, 2007)). Généralement, ces modifications ont lieu durant la différenciation et sont transmises de manière stable au cours des divisions cellulaires. La méthylation de l'ADN est certainement la modification la plus étudiée chez les mammifères. Elle est contrôlée par des enzymes notamment les DNMTs (*DNA methyltransférases*). Elle consiste en une modification covalente des résidus cytosines au niveau des dinucléotides CpG. Ces dinucléotides CpG ne sont pas distribués de manière aléatoire dans le génome, mais se concentrent au niveau de régions, nommées îlots CpG, ou au niveau de larges séquences répétées telles que les centromères. Ces îlots CpG sont préférentiellement retrouvés au niveau des promoteurs des gènes où leur méthylation induit une répression transcriptionnelle durable. Ainsi, 60 % des promoteurs humains contiennent un îlot CpG. La majorité de ces îlots ne sont pas méthylés dans les cellules ES et le deviennent au cours de la différenciation cellulaire. Ainsi, les promoteurs des gènes codant les facteurs de transcription impliqués dans le maintien de la pluripotence des cellules, Oct-4 et Nanog, sont rapidement méthylés au cours de la différenciation des cellules ES. L'altération de ce processus joue un rôle essentiel au cours de la carcinogénèse (pour revue : (Jones and Baylin, 2007; Sharma *et al.*, 2010)).

Par conséquent, nous avons recherché la présence d'îlots CpG dans une région chromosomique de 2,5 kb comprenant le *cluster* miR-371-372-373 ainsi que la région F1. L'analyse bio-informatique (MethPrimer, (Li and Dahiya, 2002)) a révélé la présence de 3 îlots potentiels dans cette région (Figure 34a). Le premier îlot, CpG1, de taille modeste (~ 130 pb) est situé en 5' de la région F1. Les 2 autres îlots, CpG2 et 3, de 180 et 300 pb respectivement, sont situés à l'intérieur du *cluster*. L'îlot CpG2 est situé entre les pre-miR-371 et 372, tandis que l'îlot CpG3 recouvre les pre-miR-372 et 373. Nous avons alors entrepris d'analyser le profil de méthylation de ces îlots dans les cellules AGS, ainsi que dans d'autres lignées cellulaires. Nous avons utilisé la technique de traitement de l'ADNg au bisulfite de sodium. Ce composé induit une conversion des cytosines non méthylées en uracile, par un mécanisme présenté dans la figure 34b. Lors de la PCR qui suit, l'uracile est reconnue par la *Taq* polymérase comme une thymine. La présence d'un groupement méthyle en position 5 de la

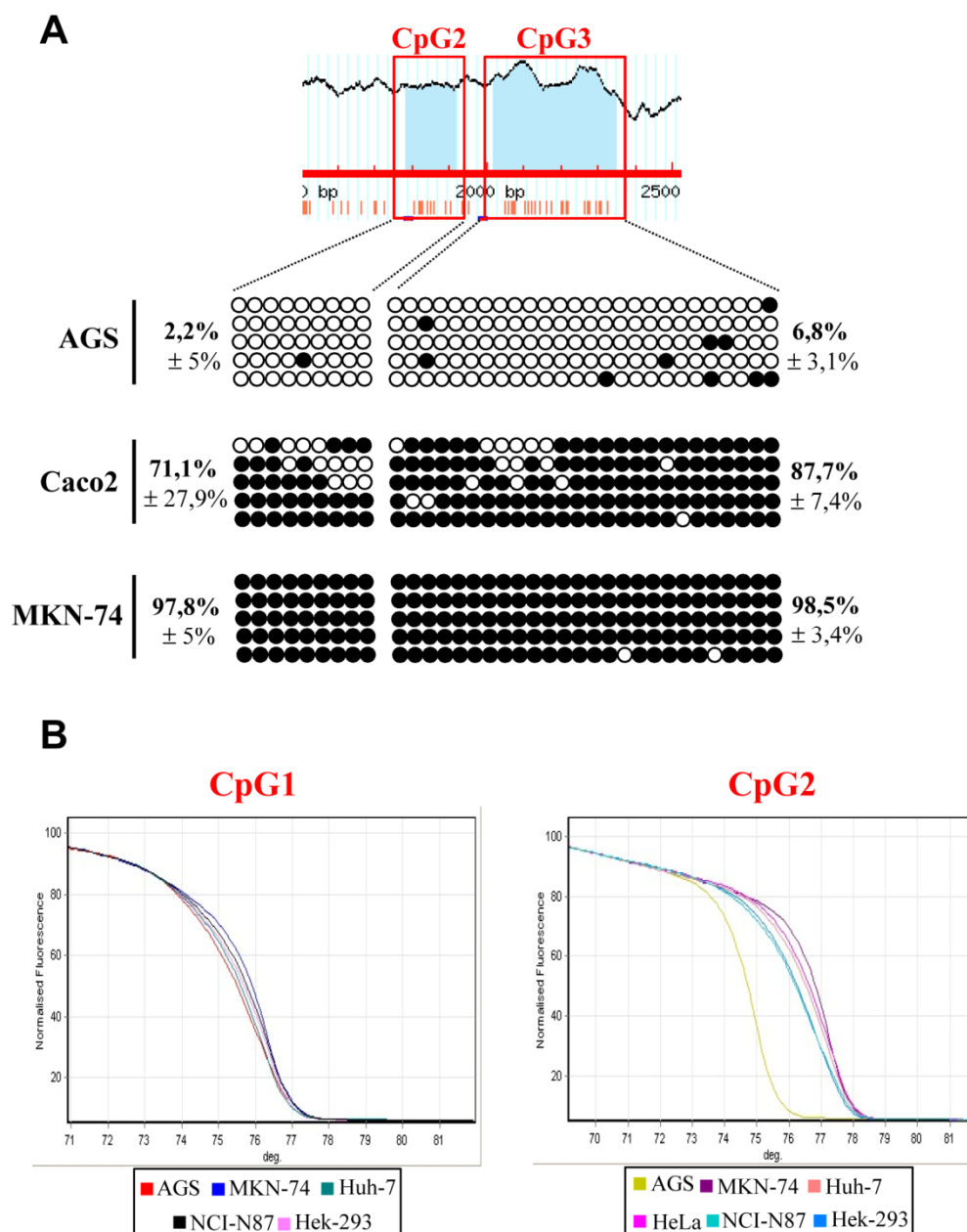


Figure 35 : Analyse de la méthylation des îlots CpG1, 2 et 3 dans les différentes lignées.

Les îlots CpG1, 2 et 3 ont été amplifiés par PCR à partir de l'ADNg traité au bisulfite de sodium de différentes lignées cellulaires.

(A) Les produits de PCR ont été clonés et séquencés. Les cercles représentent les dinucléotides CpG présents dans les îlots : noir, méthylé ; blanc, non méthylé. 5 clones bactériens ont été séquencés par lignée cellulaire. Le pourcentage représente le taux moyen $\pm$ écartype de méthylation des îlots CpG2 et 3.

(B) Analyse HRM des îlots CpG1 et 2 dans différentes lignées. La courbe de dénaturation thermique représente l'intensité normalisée de fluorescence en fonction de la température.

cytosine empêche cette conversion. Les îlots ont alors été amplifiés par PCR à partir de l'ADNg ainsi traité, clonés et séquencés.

Dans les cellules AGS, les îlots CpG2 et 3 présentent un très faible taux de méthylation, 2,2 % et 6,8 % respectivement (Figure 35a). A l'inverse, ces îlots sont fortement méthylés dans les lignées MKN-74 (CpG2 : 97,8 %, CpG3 : 98,5 %) et Caco-2 (CpG2 : 71,1 %, CpG3 : 87,7 %). Ces taux de méthylation dans ces lignées cellulaires corréleront parfaitement avec les niveaux d'expression observés dans ces cellules. D'autre part, l'îlot CpG1 est méthylé dans toutes les lignées testées, y compris dans les cellules AGS (données non montrées).

Ces résultats ont été confirmés sur les îlots CpG1 et 2 par une analyse HRM (Figure 35b). Cette technique associe une PCR, à partir de l'ADNg traité au bisulfite de sodium et en présence d'un intercalant fluorescent, et une dénaturation thermique des produits de PCR permettant de déterminer leur T_m . Cette technique est extrêmement sensible et permet de distinguer des produits de PCR ne différant que d'une seule paire de base. Ainsi, les produits de PCR d'îlot CpG non méthylé seront plus riches en thymine. Par conséquent, leur T_m sera inférieur à celui des produits de PCR des îlots CpG méthylés, riches en cytosines. Concernant l'îlot CpG1, aucune différence significative de T_m n'a été observée entre les différentes lignées cellulaires (Figure 35b). Les résultats du séquençage ayant montré que cet îlot était méthylé dans les cellules AGS, on peut donc conclure qu'il est fort probable que cet îlot soit également méthylé dans toutes les autres lignées testées. Concernant l'îlot CpG2, on observe que les produits de PCR des cellules AGS présentent un T_m nettement inférieur ($< 2^\circ\text{C}$) par rapport aux autres types cellulaires (Figure 35b). Par comparaison aux résultats obtenus lors du séquençage, on peut donc conclure également que la lignée AGS est la seule lignée testée où l'îlot CpG2 n'est pas méthylé.

Ces résultats préliminaires constituent un bon argument pour expliquer les différences d'expression du *cluster* miR-371-372-373 observées entre les lignées cellulaires. En effet, le taux de méthylation des îlots CpG2 et 3 corréleront parfaitement avec le niveau d'expression des miR-372&373 dans les différents types cellulaires. Seules les cellules AGS, où ces îlots ne sont pas méthylés, présentent une très forte expression du *cluster* miR-371-372-373. Par contre, l'îlot CpG1 ne serait pas impliqué dans le niveau d'expression de ce *cluster*. On peut donc faire l'hypothèse que la spécificité d'expression de ce *cluster* de miRNAs au niveau des cellules AGS pourrait être directement liée aux taux de méthylation de 2 îlots CpG situés entre les pre-miR-371 et 372 et recouvrant les pre-miR-372 et 373.

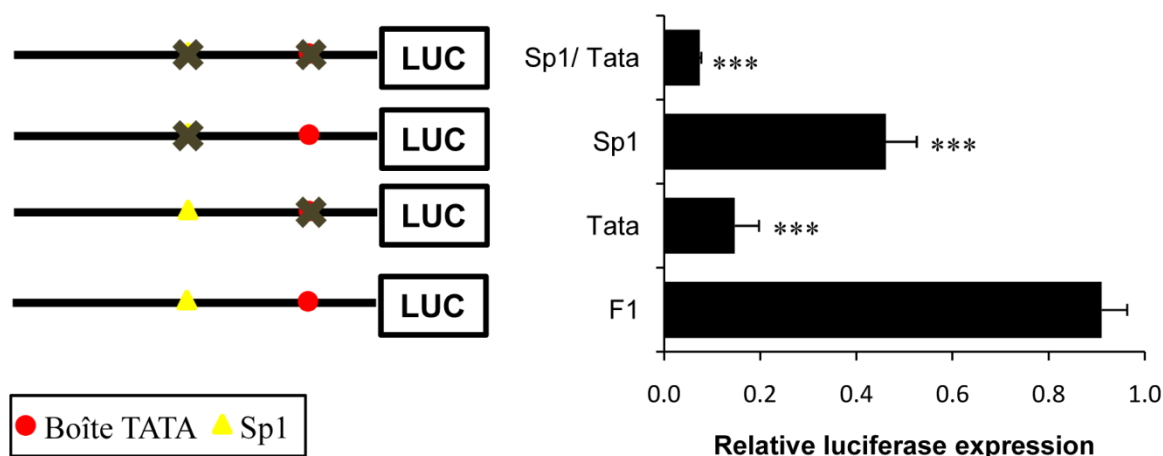


Figure 36 : Mutagénèse des différents sites potentiels de facteurs de transcription.

Les différents plasmides ont été transfectés dans les cellules AGS puis l'activité luciférase a été dosée 24 h après transfection. Les histogrammes représentent l'activité relative de la luciférase firefly, normalisée par rapport à celle de la *Renilla* et comparée au vecteur F1. Les données représentées sont la moyenne $\pm$ écart-type de 3 expériences indépendantes. *** : $p < 0,001$.

Tableau 6 : Liste des sites putatifs d'interaction de facteurs de transcription dans la région F1

Facteur de transcription	Brin d'ADN ^a	Similarité de matrice ^b	Séquence ^c	Conservation ^d
LEF1/TCF	+	0,962	ctaggatCAAAGgggagc	H, Ch
SP1	+	0,923	cttgGGGCggagacc	E
Krüppel-like factor	+	0,929	gggtgggaaGGGtgggct	H
LEF1/TCF	+	0,962	atcctatCAAAttgag	H
Boîte TATA	+	0,927	ccctaTATAagaacgca	E

^a +, brin positif ; -, brin négatif.

^b La similarité de matrice est définie par le logiciel MatInspector (Cartharius *et al.*, 2005). Valeur minimum, 0 ; valeur maximum, 1. Une similarité $> 0,8$ est considérée comme « bonne ».

^c Séquence correspondant à une matrice de MatInspector. Les bases en lettre capitale correspondent à la séquence *core* référencée dans ce logiciel. Les bases en rouge représentent la séquence consensus du site de fixation du facteur de transcription.

^d Conservation des sites : H : Homme, Ch : Cheval, E : Euthériens.

3.3 Caractérisation du promoteur putatif du *cluster* miR-371-372-373.

Nous avons identifié et cloné le promoteur putatif basal du *cluster* miR-371-372-373. Afin d'identifier les acteurs impliqués dans la transcription de ce *cluster*, une recherche bio-informatique des sites potentiels d'interaction des facteurs de transcription a été réalisée sur la région F1 en utilisant le programme MatInspector (Genomatix Software GmbH). Cette recherche a permis d'identifier un certain nombre de sites potentiels (Tableau 6). Dans une étude préliminaire, nous nous sommes focalisés sur 2 sites, une boîte TATA et un site riche en dinucléotides GC, site d'ancrage du facteur de transcription Sp1 (Figure 32b, p79). Ces 2 sites sont conservés chez les mammifères placentaires, ce qui suggère une fonction importante. Le facteur de transcription Sp1 est une protéine exprimée de manière ubiquitaire, qui peut activer ou réprimer la transcription d'un grand nombre de gènes impliqués dans de nombreux processus tels que la prolifération cellulaire, la différenciation, l'apoptose, la réponse immune (pour revue : (Tan and Khachigian, 2009)). Il est capable d'interagir avec de nombreux facteurs de transcription, des composants de la machinerie basale de transcription, mais également avec des facteurs de remodelage de la chromatine tels que les *histones déacétylases* (HDAC).

Afin de déterminer l'implication de ces 2 sites dans l'expression du *cluster*, nous avons réalisé une mutagénèse dirigée de ces sites dans le vecteur rapporteur F1. Ces vecteurs mutés ont alors été transfectés dans les cellules AGS et l'activité luciférase a été mesurée (Figure 36). La mutation de la boîte TATA provoque une réduction importante (85 %) de l'activité luciférase dans les cellules transfectées. La présence de cette boîte TATA est donc indispensable pour l'expression de la luciférase. De même, la mutation du site Sp1 induit une diminution de 50 % de l'activité luciférase dans les cellules. Enfin, la double mutation de la boîte TATA et du site Sp1 provoque une réduction encore plus importante (95%) de l'activité luciférase par rapport aux simples mutations. On peut donc conclure que ces 2 sites sont indispensables à l'expression du gène rapporteur. Par conséquent, ces 2 sites seraient impliqués dans l'expression du *cluster* miR-371-372-373.

Ainsi, nos résultats, bien que préliminaires, montrent que les mécanismes épigénétiques joueraient un rôle important dans la régulation de l'expression du *cluster* 371-372-373. Toute dérégulation de ces mécanismes conduirait à l'expression fortuite de ces miRNAs, et aurait des conséquences dramatiques pour la cellule les exprimant, à cause de leurs propriétés oncogéniques. Nos travaux sur la régulation du *cluster* miR-371-372-373, bien que préliminaires, constituent la première caractérisation du promoteur putatif de ce *cluster*.

Partie III. Discussions et Perspectives.

1. La spécificité d'expression du *cluster* miR-371-372-373.

L'expression des miR-372&373 dans les tumeurs somatiques est un évènement rare. Leur expression a été détectée dans des cancers des testicules, de l'œsophage ainsi que de la thyroïde (Voorhoeve *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2009; Rippe *et al.*, 2010). Les résultats du séquençage à haut débit nous ont permis de découvrir que le miR-372, membre du *cluster* miR-371-372-373, était le miRNA le plus abondant dans les cellules AGS. Nos travaux ont permis de confirmer que le *cluster* miR-371-372-373 est exprimé de manière abondante et surtout spécifique dans la lignée gastrique AGS. Ils constituent le premier exemple de l'expression de ce *cluster* dans un cancer gastrique.

Parmi l'ensemble des lignées d'origine gastrique ou autres que nous avons testées, l'expression des miR-372&373 n'a pu être mise en évidence uniquement dans les cellules gastriques MKN-74 et coliques Caco-2. Cependant, l'expression de ces miRNAs est très faible et probablement non fonctionnelle. En effet, LATS2 est facilement détectable dans les cellules MKN-74 et de manière aussi abondante que dans les cellules HeLa, qui n'expriment pas miR-372&373 (Figure 2, Manuscrit en révision). Par ailleurs, nous n'avons pas détecté ces 2 miRNAs dans des extraits d'ARNs de tumeurs gastriques ou d'estomac sain. Outre les cellules hES, l'expression de ce *cluster* a également été détectée dans le placenta, les testicules et l'estomac (Liang *et al.*, 2007). Nos conditions expérimentales ne nous ont pas permis de confirmer ces résultats dans des extraits d'ARNs d'estomac sain. Au vu de ces résultats, on peut se demander si l'expression du *cluster* miR-371-372-373 dans les cellules AGS reflète une réalité biologique ou si cette expression est apparue au cours de la transformation de ces cellules. Rippe *et al* ont montré que l'expression du *cluster* miR-371-372-373 dans certains adénocarcinomes de la thyroïde était associée à un réarrangement chromosomique de la région 19q13.4, contenant notamment le *cluster* miR-371-372-373 et le C19MC (Rippe *et al.*, 2010). Outre les miR-372&373, ce réarrangement provoquait également l'expression des miRNAs du C19MC. Il est peu probable qu'un tel réarrangement ait eu lieu dans les cellules AGS, car nous n'avons pas détecté l'expression des miRNAs du C19MC, notamment miR-520d, par RT-qPCR et séquençage à haut débit. D'autre part, l'expression des miR-372&373 a également été mise en évidence au niveau de tumeurs germinales de testicules, notamment de carcinomes embryonnaires (Voorhoeve *et al.*, 2006). Ces auteurs ont montré que l'expression de miR-372&373 était suffisante pour la transformation de cellules primaires. En inactivant la voie de réparation de l'ADN contrôlée par p53, ces miRNAs prédisposaient les cellules à une tolérance vis-à-vis des mutations

oncogéniques et, par conséquent, à l'accumulation d'évènements carcinogènes. L'expression de ces miRNAs, au niveau des cellules de tumeurs germinales, ne serait pas simplement une réminiscence de leur phénotype de cellule ES, mais constituerait plutôt un événement sélectionné au cours de la carcinogénèse. Il est donc probable que l'expression du *cluster* ait constitué un événement primaire lors de la transformation des cellules AGS.

Par ailleurs, Liang *et al.* ont détecté miR-373 dans l'estomac (Liang *et al.*, 2007), mais l'expression de ce miRNA était très faible. Ces travaux ont été réalisés à partir d'ARNs extraits de la muqueuse gastrique, qui contient de nombreux types cellulaires différents, notamment des cellules épithéliales. On peut donc émettre l'hypothèse que l'expression de ce *cluster* de miRNAs soit restreinte à un type cellulaire particulier au niveau de l'estomac. Ces miRNAs étant impliqués dans l'auto-renouvellement et le maintien de la pluripotence des cellules souches, on peut imaginer que le *cluster* miR-371-372-373 soit exprimé au niveau des cellules souches de l'épithélium gastrique, les progéniteurs gastriques. Comme nous l'avons suggéré dans la discussion du manuscrit en révision, la répression de ce *cluster* au niveau des progéniteurs gastriques au cours de l'infection constituerait un mécanisme développé par *H. pylori*, afin d'altérer le renouvellement de l'épithélium gastrique.

Nous avons envisagé de vérifier l'expression du *cluster* miR-371-372-373 au niveau de la muqueuse gastrique par hybridation *in situ* à partir de biopsies de patients (collaboration Christine Varon, INSERM U853). Cette technique devrait nous permettre de vérifier l'expression de ces miRNAs au niveau de l'estomac et éventuellement d'identifier les types cellulaires exprimant ces miRNAs. Dans le cas où nous confirmerions l'expression de ces miRNAs au niveau de la muqueuse gastrique, nous pourrions alors envisager une étude *in vivo* chez la souris ou la gerbille de Mongolie, afin de confirmer la répression du *cluster* miR-290, l'homologue murin de *cluster* miR-371-372-373, au cours de l'infection par *H. pylori*.

2. La régulation du *cluster* miR-371-372-373.

Identifier les mécanismes gouvernant l'expression du *cluster* miR-371-372-373 est essentielle afin de comprendre leur dérégulation au cours de l'infection par *H. pylori*. La répression de ce *cluster* au cours de l'infection a lieu précocement, au niveau du pri-miRNA. Ce résultat permet d'envisager une régulation au niveau de la transcription du *cluster* ou au niveau de la maturation du pri-miRNA. Afin de répondre à cette question, nous avons entrepris de caractériser le promoteur du *cluster* miR-371-372-373. Nos résultats préliminaires ont mis en évidence qu'une région conservée chez les mammifères euthériens, située en amont de la région codant le pri-miRNA, permettait l'expression d'un gène

rapporteur et correspondrait au promoteur putatif du *cluster*. L'analyse bio-informatique de cette région a mise en évidence la présence de 2 séquences particulièrement conservées : une boîte TATA et un site riche en GC. La mutagénèse dirigée de ces sites a confirmé leur rôle essentiel pour l'activité transcriptionnelle de cette région. Ces sites font partie des séquences consensus reconnues par la machinerie transcriptionnelle basale. La boîte TATA est reconnue par la protéine TBP (*TATA box binding protein*), co-facteur de l'ARN polymérase II, tandis que le site riche en GC est reconnu par le facteur de transcription Sp1. Ce facteur, exprimé de manière ubiquitaire, est impliqué dans de nombreux processus tels que la prolifération, l'apoptose, la différenciation et la réponse immune (pour revue : (Tan and Khachigian, 2009)). Il est capable d'interagir avec de nombreux facteurs de transcription tels que c-myc, c-Jun ou STAT1, mais également avec des protéines impliquées dans le remodelage de la chromatine tels que p300 et les HDACs (*Histone deacetylases*). L'implication de Sp1 dans l'expression du *cluster* miR-371-372-373 pourra être vérifiée par des expériences de Chip (*Chromatin immunoprecipitation*). D'autre part, la boîte TATA est située en général à environ une trentaine de paires de bases du site d'initiation de la transcription (TSS). Nous avons entrepris d'identifier le TSS du *cluster* en utilisant les techniques d'extension d'amorce et 5'-RACE (*Rapid amplification of cDNA ends*).

Plusieurs travaux ont déjà relaté le clonage et la caractérisation de promoteur de miRNAs présentant une expression spécifique de certains tissus (Barroso-delJesus *et al.*, 2008; Avnit-Sagi *et al.*, 2009). Barroso-delJesus *et al* ont notamment cloné et caractérisé le promoteur du *cluster* miR-302. De la même manière que le *cluster* miR-371-372-373, l'expression de ce *cluster* de miRNAs est spécifique des cellules hES et son expression est réprimée au cours de la différenciation. En clonant le promoteur de ce *cluster* dans un vecteur rapporteur, ces auteurs ont réussi à reproduire la spécificité d'expression de ce *cluster* au niveau des cellules hES, ainsi que sa répression au cours de la différenciation. L'expression de ce *cluster* dépendait des facteurs de transcription spécifiques des cellules hES, notamment Oct-4 et Nanog. Nos résultats montrent que la région du promoteur putatif du *cluster* miR-371-372-373 ne suffit pas à expliquer la spécificité d'expression du *cluster* au niveau des cellules AGS. En effet, cette région permet l'expression du gène rapporteur dans des lignées cellulaires n'exprimant pas (les cellules HeLa) ou très faiblement (les cellules MKN-74) le *cluster* miR-371-372-373. Nos résultats confirment ceux d'Houbaviy *et al* obtenus sur le promoteur du *cluster* miR-290, l'homologue murin du *cluster* miR-371-372-373 (Houbaviy *et al.*, 2005). Ces auteurs n'avaient pas retrouvé la spécificité d'expression du *cluster* miR-290 après clonage de son promoteur dans un vecteur rapporteur.

Ainsi, l'ensemble de ces résultats suggère que des facteurs de transcription spécifiques, tels que les facteurs des cellules souches Oct-4, Nanog ou Sox-2, ne sont pas requis pour la transcription basal des EEmiRCs.

A l'origine, ce *cluster* a été identifié comme un marqueur spécifique des cellules hES (Suh *et al.*, 2004). Son expression est rapidement réprimée au cours de la différenciation de ces cellules. La différenciation des cellules hES s'accompagne d'une modification majeure de leur transcriptome, avec une répression de l'expression des gènes impliqués dans le maintien de la pluripotence de ces cellules et une expression des gènes de différenciation. Ce bouleversement met en jeu des phénomènes épigénétiques, tels que la méthylation de l'ADN et les modifications des histones, qui vont aboutir à un remodelage de la chromatine. Nous avons montré que la forte expression du *cluster* miR-371-372-373 dans les cellules AGS était corrélée avec l'absence de méthylation de 2 îlots CpG présents au niveau des pre-miR-372 et 373. De même, la faible expression de ces miRNAs dans les cellules MKN-74 et Caco-2 coïncide avec la méthylation de ces îlots CpG. Il est donc fort probable que la répression du *cluster* miR-371-372-373 au cours de la différenciation des cellules hES soit régulée par des phénomènes épigénétiques, dont la méthylation de l'ADN. Il serait donc intéressant de confirmer le rôle de la méthylation de ces îlots CpG dans l'expression du *cluster* miR-371-372-373, notamment en traitant les cellules MKN-74 et/ou Caco-2 avec la 5-Aza-2'-Desoxycytidine, un inhibiteur des DNMTs. Une étude récente a montré que le traitement des cellules MKN-74 avec ce composé augmentait de plus de 11 fois l'expression des miR-372&373 dans ces cellules (Suzuki *et al.*, 2010). Il faudra donc confirmer que cette augmentation d'expression est associée à la déméthylation de ces 2 îlots CpG dans les cellules MKN-74 traitées.

Ces résultats préliminaires suggèrent que la répression de l'expression du *cluster* miR-371-372-373 dans les cellules, notamment au cours de la différenciation, aurait lieu par remodelage de la chromatine, avec formation d'hétérochromatine au niveau du locus. Ce remodelage est associé aux modifications épigénétiques que peut subir l'ADN génomique telles que la méthylation de l'ADN ou les modifications post-traductionnelles des histones. L'implication de ces événements dans la régulation de l'expression du *cluster* miR-371-372-373 au cours de l'infection par *H. pylori* devra être analysée. Le remodelage de la chromatine pourra être analysé au cours de l'infection par des expériences de CHiPs, en utilisant notamment des anticorps spécifiques de certaines modifications d'histones associées à l'activation ou à la répression de la transcription. De plus, le rôle de CagA devra être analysé. Plusieurs travaux ont déjà montré des modifications post-transcriptionnelles des histones au

cours de l'infection par *H. pylori* (Fehri *et al.*, 2009; Ding *et al.*, 2010). Cependant, ces modifications ne dépendaient pas de la toxine CagA.

Par ailleurs, on ne peut pas exclure la présence d'une séquence régulatrice en dehors de la région promotrice que nous avons cloné. Son absence de notre vecteur rapporteur contenant le promoteur putatif pourrait expliquer l'expression du gène rapporteur dans des lignées n'exprimant pas le *cluster* miR-371-372-373. La présence d'une région régulatrice pourra être recherchée en clonant des régions de plus grande taille situées en amont du *cluster*.

Enfin, la régulation du *cluster* au cours de l'infection pourrait avoir lieu à une étape post-transcriptionnelle, notamment au niveau du pri-miRNA. Houbaviy *et al* ont montré que le pri-miRNA du *cluster* miR-290 subissait un épissage (Houbaviy *et al.*, 2005). La région épissée était située entre le promoteur putatif du *cluster* et le pre-miR-290. Notre analyse bio-informatique a permis de confirmer la présence de cette région dans le *cluster* miR-371-372-373 entre la région F1 et le pre-miR-371. La transcription de cette région a été confirmée par RT-PCR (données non montrées). L'épissage de cette région devra cependant être confirmé par la technique de *RNAse protection assay* (RPA). L'épissage du pri-miRNA est peut être nécessaire pour que ce dernier soit maturé par Drosha. En effet, des travaux ont montré que l'épissage du pri-let-7 était requis pour l'expression des miRNAs matures (Bracht *et al.*, 2004). Afin d'étudier le rôle de cet épissage dans la maturation du pri-miRNA et son lien potentiel avec la répression du *cluster* au cours de l'infection, cette région pourra être clonée en amont d'un gène rapporteur. L'expression du gène rapporteur pourra être ainsi facilement analysée et l'épissage pourra être suivi par RT-PCR et RPA.

Ces travaux, bien que préliminaires, représentent la première caractérisation du promoteur putatif du *cluster* miR-371-372-373. Son clonage dans un vecteur rapporteur constitue un outil adéquate afin d'étudier les mécanismes mis en jeu.

3. Rôle de la toxine CagA dans la répression du *cluster* miR-371-372-373.

La cytotoxine CagA constitue le facteur de virulence majeur de *H. pylori*. Sa présence dans une souche est associée à des risques accrus de développer des pathologies sévères, notamment les ulcères peptiques et les adénocarcinomes gastriques. Le rôle de cette oncoprotéine au cours de l'infection ainsi que ses interactions avec les voies de signalisation cellulaire sont de mieux en mieux caractérisées. L'utilisation de mutants isogéniques de *H. pylori* mutés pour la toxine CagA (mutant Δ CagA) ou pour le SST4 (mutant Δ CagE) (Figure

4, manuscrit en révision) et de souches *cag PAI* négative (souche SS1 et X-47AL) nous a permis de mettre en évidence que la répression du *cluster* miR-371-372-373 au cours de l'infection par *H. pylori* dépendait de l'injection de la toxine CagA dans les cellules AGS, de même que l'augmentation de LATS2 et l'arrêt du cycle cellulaire. Cependant, les cellules infectées avec les mutants Δ CagA et Δ CagE présentaient également une diminution d'incorporation de BrdU (Figure 5, manuscrit en révision). Cette diminution était cependant bien moins forte comparée aux cellules infectées avec les souches sauvages. Cette réduction pourrait être provoquée par d'autres facteurs de virulence de *H. pylori*, dont la toxine VacA. En effet, plusieurs travaux ont montré que VacA était capable d'induire un blocage du cycle cellulaire des cellules infectées au niveau de la transition G1/S (Ricci *et al.*, 1996; Peek *et al.*, 1999; Manente *et al.*, 2008). Cependant, nos résultats obtenus avec les mutants Δ CagA et Δ CagE, qui sécrètent la toxine VacA, permettent de conclure que cette toxine n'intervient pas dans la répression du *cluster* miR-371-372-373.

Afin de confirmer le rôle de la toxine CagA dans la répression du *cluster*, nous avons envisagé de cloner le gène *cagA* dans un vecteur d'expression eucaryote et de l'exprimer de manière ectopique dans les cellules AGS. Plusieurs travaux ont montré que l'expression ectopique de CagA dans les cellules AGS induisait une accumulation des cellules dans la phase G0/G1 du cycle cellulaire (Yokoyama *et al.*, 2005; Saito *et al.*, 2010). Ce blocage de la prolifération était indépendant de la phosphorylation de CagA. On peut donc faire l'hypothèse que cet arrêt du cycle cellulaire serait une conséquence de l'induction de LATS2 suite à la répression des miR-372&373 par CagA. Cependant, ces auteurs ont montré que l'arrêt de prolifération des cellules AGS provoqué par CagA coïncidait avec l'induction de p21^{WAF1/Cip1}. De la même manière que LATS2, p21^{WAF1/Cip1} est une protéine impliquée dans la régulation de la transition G1/S. Ces 2 protéines inhibent notamment l'activité du complexe cycline E/CDK2 (*Cyclin-dependent kinase 2*) (el-Deiry *et al.*, 1993; Li *et al.*, 2003). L'activité de ce complexe est indispensable à la transition G1/S du cycle cellulaire. Des résultats préliminaires nous ont permis de confirmer l'induction dépendante de CagA de p21^{WAF1/Cip1} au cours de l'infection des cellules AGS par *H. pylori* (données non montrées). Cette induction a lieu au niveau de l'ARNm et de la protéine. Par conséquent, on ne peut pas exclure que le blocage de la prolifération observé au cours de l'infection implique l'action conjointe de LATS2 et p21^{WAF1/Cip1}. Le rôle de ces 2 protéines dans la régulation du cycle cellulaire au cours de l'infection devra donc être confirmé par l'utilisation de siRNAs par exemple. Par ailleurs, nos résultats ont montré que l'arrêt du cycle cellulaire induit au cours de l'infection dépendait de la répression des miR-372&373. Le blocage de la répression de ces miRNAs via la

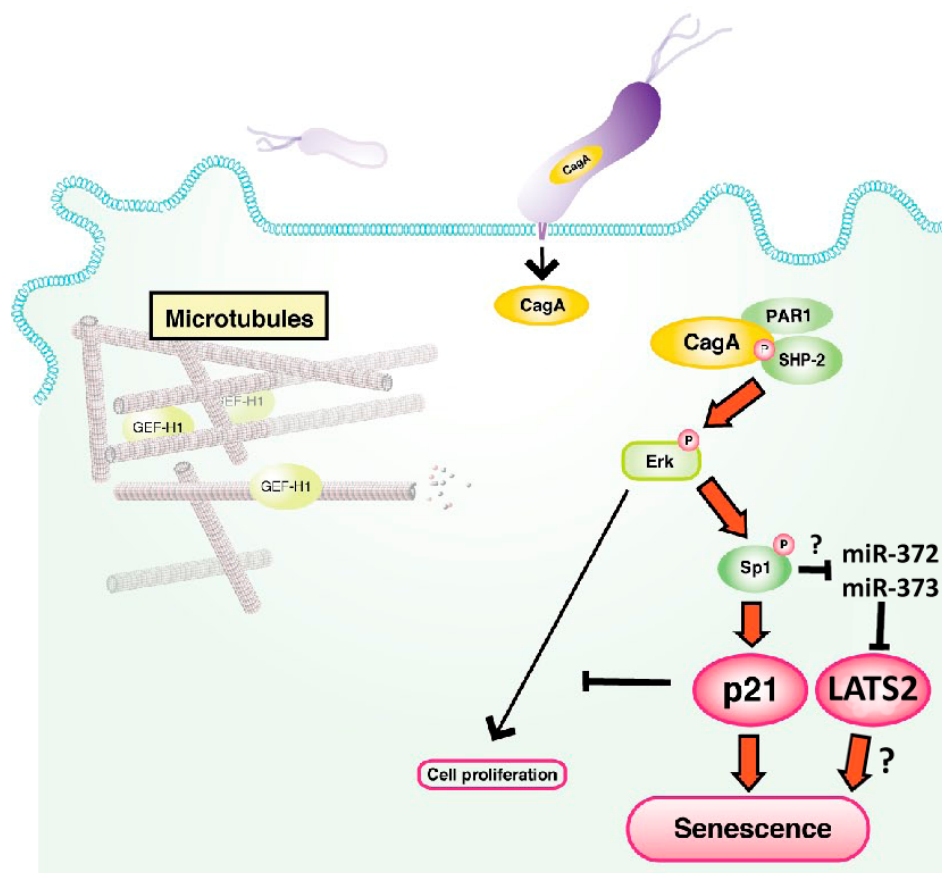


Figure 37 : Modèle hypothétique pour la répression du cluster miR-371-372-373 au cours de l'infection.

Dans les cellules non polarisées, CagA interagit et dérégule les protéines cellulaires telles que Shp2, ce qui conduit à une activation aberrante de la voie de signalisation Erk. Cette activation conduit à l'accumulation de p21, induisant un arrêt du cycle cellulaire puis la sénescence de la cellule. Dans les cellules AGS, l'infection par *H. pylori* conduit à la répression dépendante de CagA du cluster miR-371-372-373. Cette répression aboutit à l'expression de LATS2 et à un arrêt du cycle cellulaire.

Adaptée de (Saito *et al.*, 2010).

transfection de *mimics* empêchait l'arrêt du cycle cellulaire au cours de l'infection (Figure 5, Manuscrit en révision). Il serait donc intéressant d'étudier le rôle de la répression des miR-372&373 dans l'induction de p21^{WAF1/Cip1}. Voorhoeve *et al.* ont montré que les cellules exprimant miR-372&373 continuaient de proliférer lors de l'induction de p21^{WAF1/Cip1} (Voorhoeve *et al.*, 2006). Dans ces cellules, la présence de ces miRNAs permettait de garder un complexe cycline E/CDK2 actif, malgré la présence de fort taux de p21^{WAF1/Cip1}. Ces travaux ont été confirmés récemment (Borgdorff *et al.*, 2010). Par conséquent, la répression des miR-372&373 au cours de l'infection serait donc indispensable pour que l'augmentation de p21^{WAF1/Cip1} soit fonctionnelle et participe au blocage de la prolifération des cellules infectées. De plus, des travaux récents ont montré que p21^{WAF1/Cip1} pourrait être une cible de miR-372&373 (Qi *et al.*, 2009). On peut donc émettre l'hypothèse que l'arrêt du cycle cellulaire observé au cours de l'infection des cellules AGS par *H. pylori* fasse intervenir un mécanisme de régulation temporel de LATS2 et p21^{WAF1/Cip1} où la répression précoce du *cluster* miR-371-372-373 serait indispensable afin de permettre l'expression de LATS2 et l'action de p21^{WAF1/Cip1}. Saito *et al.* ont montré récemment que l'expression ectopique de la cytotoxine CagA dans des cellules non polarisées, comme les cellules AGS, constituait un stress oncogénique, conduisant à l'accumulation de p21^{WAF1/Cip1}, à l'arrêt du cycle cellulaire et à la sénescence de la cellule. (Saito *et al.*, 2010). Ce processus impliquait une activation aberrante de la voie de signalisation Erk *via* une dérégulation des protéines Shp2 par CagA. Ces auteurs suggéraient que l'induction de p21^{WAF1/Cip1} serait la conséquence de la phosphorylation et l'activation du facteur de transcription Sp1 par la kinase Erk. Nos résultats préliminaires montrent que le facteur Sp1 pourrait être impliqué dans l'expression des miR-372&373. Il sera donc intéressant d'étudier le rôle de la voie Erk et du facteur Sp1 dans la répression du *cluster* miR-371-372-373 observée au cours de l'infection (Figure 37). La toxine CagA interférant avec de nombreuses voies de signalisation cellulaire impliquées notamment dans la régulation de la prolifération, comme la voie des MAPK, on peut faire l'hypothèse que cette toxine agisse de manière indirecte sur la régulation du *cluster* miR-371-372-373.

Nos travaux sont le premier exemple d'un effecteur bactérien capable d'interférer avec des miRNAs chez l'Homme. Cependant, nos résultats sont trop préliminaires pour pouvoir qualifier la toxine CagA de BSR. En effet, le mécanisme d'action de cette toxine sur la régulation du *cluster* miR-371-372-373 reste inconnu. Ce mécanisme pourrait être indirect, en agissant sur les voies de signalisation impliquées dans l'expression du *cluster* miR-371-372-

373, ou direct, en bloquant la biogénèse des miR-372&373. Les VSRs et BSRs, capables d'agir directement sur la voie des miRNAs, utilisent principalement 2 mécanismes : la séquestration des ARNdb via un domaine de liaison aux ARNdb (dsRBD : *dsRNA binding domain*) ou l'interaction avec les composants de la voie des miRNAs, notamment les protéines AGO. Ces interactions se font par l'intermédiaire de motifs GW (Azevedo *et al.*, 2010; Giner *et al.*, 2010). Ces mécanismes aboutissent à l'inhibition du *RNA silencing*. Une recherche bio-informatique ne nous a pas permis de mettre en évidence la présence de motifs dsRBD ou GW dans la toxine CagA. De plus, les résultats du séquençage à haut débit montrent que de nombreux miRNAs sont régulés au cours de l'infection par *H. pylori*. Certains sont réprimés, comme le *cluster* miR-371-372-373, tandis que d'autres sont induits, tels que les miRNAs de la famille des miR-200 (travaux de Jessica Baud, INSERM U869). Il est donc peu probable que la toxine CagA agisse en tant qu'inhibiteur direct du *RNA silencing*, action qui se traduirait par une diminution générale des miRNAs dans les cellules infectées. Cependant, on ne peut pas exclure que cette toxine interagisse avec des facteurs spécifiques impliqués dans la maturation des précurseurs du *cluster* miR-371-372-373.

Partie IV. Conclusions.

Les capacités d'*H. pylori* à interférer avec les fonctions cellulaires font de cette bactérie un modèle d'étude particulièrement intéressant. A la différence d'autres bactéries pathogènes, la capacité d'*H. pylori* à perturber les voies de signalisation cellulaire se résume principalement à un effecteur, la cytotoxine CagA. Une fois injectée dans le cytoplasme de la cellule hôte, cette toxine est capable d'interagir avec un très grand nombre de protéines cellulaires impliquées dans de nombreux processus, tels que l'élongation et la motilité cellulaire, la prolifération, et l'apoptose. Elle est considérée comme l'effecteur bactérien ayant le plus grand nombre de partenaires cellulaires.

Lorsque ce travail a été entrepris, la capacité d'*H. pylori* à interférer avec la voie des miRNAs, acteurs principaux de la régulation post-transcriptionnelle de l'expression des gènes, était inconnue. Ces petits ARNs non codants sont impliqués dans de nombreux processus cellulaires et leur dérégulation est souvent observée au cours de pathologies telles que le cancer. Notre objectif était donc d'explorer les modifications d'expression de miRNAs en réponse à l'infection par *H. pylori*, susceptibles d'apporter de nouveaux éléments dans la compréhension des mécanismes mis en place par la bactérie pour interagir avec la cellule hôte et qui rendent cette bactérie oncogénique.

En combinant une méthode d'analyse globale, à savoir un séquençage à haut débit de petits ARNs, et un modèle cellulaire couramment utilisé pour étudier les interactions de *H. pylori* avec des cellules épithéliales gastriques, la lignée gastrique AGS, nous avons identifié pour la première fois le répertoire de miRNAs exprimés par cette lignée et mis en évidence l'expression inattendue d'un *cluster* de miRNAs spécifique des cellules souches embryonnaires, le *cluster* miR-371-372-373. En réprimant au niveau post-transcriptionnel l'expression de LATS2, un gène suppresseur de tumeur inhibiteur du cycle cellulaire, miR-372&373 participent à la perte de contrôle du cycle cellulaire de ces cellules.

Par ailleurs, les miRNAs sont également impliqués dans la défense de l'hôte contre les pathogènes. Au cours de l'évolution, les pathogènes ont développé des mécanismes de contre défense, les suppresseurs du *RNA silencing*. Nos résultats montrent que les miRNAs jouent un rôle au cours de l'infection par *H. pylori*. En effet, l'expression de nombreux miRNAs est altérée au cours de l'infection et les miRNAs du *cluster* miR-371-372-373 sont les miRNAs les plus réprimés au cours de l'infection. En permettant l'accumulation de LATS2, leur répression conduit à un arrêt du cycle cellulaire. Cet événement peut être empêché ou au contraire facilité en modulant expérimentalement les niveaux de miR-372&373 avec des mimes ou des antisens, respectivement, de ces miRNAs. Le blocage de la prolifération cellulaire pourrait refléter un mécanisme développé par la bactérie pour ralentir l'auto-

renouvellement de l'épithélium gastrique et ainsi favoriser sa colonisation. De manière importante, la répression du *cluster* miR-371-372-373 dépend de la translocation de la cytotoxine CagA dans les cellules hôtes. Nos travaux sont le premier exemple d'un effecteur bactérien capable d'interférer avec des miRNAs chez l'Homme.

Nos travaux préliminaires sur les mécanismes impliqués dans la régulation de l'expression du *cluster* miR-371-372-373 373 à l'état basal et en réponse à l'infection nous ont permis d'isoler le promoteur putatif de ce *cluster*, et de caractériser des îlots CpG dont la méthylation pourrait participer à la modulation de l'expression du *cluster*. Les travaux ultérieurs permettront d'identifier les voies de signalisation impliquées dans la régulation de ce *cluster*.

En conclusion, ce travail de thèse a permis de mettre en évidence les miRNAs comme de nouveaux acteurs dans l'interaction d'*H. pylori* avec les cellules épithéliales gastriques.

Références bibliographiques.

- Amieva, M. R. and E. M. El-Omar (2008). "Host-bacterial interactions in *Helicobacter pylori* infection." *Gastroenterology* **134**(1): 306-23.
- Amieva, M. R., R. Vogelman, et al. (2003). "Disruption of the epithelial apical-junctional complex by *Helicobacter pylori* CagA." *Science* **300**(5624): 1430-4.
- Andersson, M. G., P. C. Haasnoot, et al. (2005). "Suppression of RNA interference by adenovirus virus-associated RNA." *J Virol* **79**(15): 9556-65.
- Avnit-Sagi, T., L. Kantorovich, et al. (2009). "The promoter of the pri-miR-375 gene directs expression selectively to the endocrine pancreas." *PLoS One* **4**(4): e5033.
- Azevedo, J., D. Garcia, et al. (2010). "Argonaute quenching and global changes in Dicer homeostasis caused by a pathogen-encoded GW repeat protein." *Genes Dev* **24**(9): 904-15.
- Azuma-Mukai, A., H. Oguri, et al. (2008). "Characterization of endogenous human Argonautes and their miRNA partners in RNA silencing." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(23): 7964-9.
- Babiarz, J. E., J. G. Ruby, et al. (2008). "Mouse ES cells express endogenous shRNAs, siRNAs, and other Microprocessor-independent, Dicer-dependent small RNAs." *Genes Dev* **22**(20): 2773-85.
- Backert, S. and M. Selbach (2008). "Role of type IV secretion in *Helicobacter pylori* pathogenesis." *Cell Microbiol* **10**(8): 1573-81.
- Backert, S., N. Tegtmeyer, et al. (2010). "The versatility of *Helicobacter pylori* CagA effector protein functions: The master key hypothesis." *Helicobacter* **15**(3): 163-76.
- Bagga, S., J. Bracht, et al. (2005). "Regulation by let-7 and lin-4 miRNAs results in target mRNA degradation." *Cell* **122**(4): 553-63.
- Baltimore, D., M. P. Boldin, et al. (2008). "MicroRNAs: new regulators of immune cell development and function." *Nat Immunol* **9**(8): 839-45.
- Barranco, S. C., C. M. Townsend, Jr., et al. (1983). "Establishment and characterization of an in vitro model system for human adenocarcinoma of the stomach." *Cancer Res* **43**(4): 1703-9.
- Barroso-delJesus, A., C. Romero-Lopez, et al. (2008). "Embryonic stem cell-specific miR302-367 cluster: human gene structure and functional characterization of its core promoter." *Mol Cell Biol* **28**(21): 6609-19.
- Bartel, D. P. (2009). "MicroRNAs: target recognition and regulatory functions." *Cell* **136**(2): 215-33.
- Barton, G. M. (2008). "A calculated response: control of inflammation by the innate immune system." *J Clin Invest* **118**(2): 413-20.
- Baulcombe, D. (2004). "RNA silencing in plants." *Nature* **431**(7006): 356-63.
- Behm-Ansmant, I., J. Rehwinkel, et al. (2006). "mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4:NOT deadenylase and DCP1:DCP2 decapping complexes." *Genes Dev* **20**(14): 1885-98.
- Benetti, R., S. Gonzalo, et al. (2008). "A mammalian microRNA cluster controls DNA methylation and telomere recombination via Rbl2-dependent regulation of DNA methyltransferases." *Nat Struct Mol Biol* **15**(3): 268-79.
- Berezikov, E., W. J. Chung, et al. (2007). "Mammalian mirtron genes." *Mol Cell* **28**(2): 328-36.
- Bernstein, B. E., A. Meissner, et al. (2007). "The mammalian epigenome." *Cell* **128**(4): 669-81.
- Bhattacharyya, S. N., R. Habermacher, et al. (2006). "Relief of microRNA-mediated translational repression in human cells subjected to stress." *Cell* **125**(6): 1111-24.

- Bik, E. M., P. B. Eckburg, et al. (2006). "Molecular analysis of the bacterial microbiota in the human stomach." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(3): 732-7.
- Blaser, M. J. (2006). "Who are we? Indigenous microbes and the ecology of human diseases." *EMBO Rep* **7**(10): 956-60.
- Blaser, M. J., G. I. Perez-Perez, et al. (1995). "Infection with *Helicobacter pylori* strains possessing *cagA* is associated with an increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach." *Cancer Res* **55**(10): 2111-5.
- Borchert, G. M., W. Lanier, et al. (2006). "RNA polymerase III transcribes human microRNAs." *Nat Struct Mol Biol* **13**(12): 1097-101.
- Borgdorff, V., M. E. Lleonart, et al. (2010). "Multiple microRNAs rescue from Ras-induced senescence by inhibiting p21(Waf1/Cip1)." *Oncogene* **29**(15): 2262-71.
- Bortolin-Cavaille, M. L., M. Dance, et al. (2009). "C19MC microRNAs are processed from introns of large Pol-II, non-protein-coding transcripts." *Nucleic Acids Res* **37**(10): 3464-73.
- Boss, I. W. and R. Renne (2010). "Viral miRNAs: tools for immune evasion." *Curr Opin Microbiol* **13**(4): 540-5.
- Boughan, P. K., R. H. Argent, et al. (2006). "Nucleotide-binding oligomerization domain-1 and epidermal growth factor receptor: critical regulators of beta-defensins during *Helicobacter pylori* infection." *J Biol Chem* **281**(17): 11637-48.
- Bracht, J., S. Hunter, et al. (2004). "Trans-splicing and polyadenylation of let-7 microRNA primary transcripts." *Rna* **10**(10): 1586-94.
- Brennecke, J., A. Stark, et al. (2005). "Principles of microRNA-target recognition." *PLoS Biol* **3**(3): e85.
- Brodersen, P. and O. Voinnet (2009). "Revisiting the principles of microRNA target recognition and mode of action." *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**(2): 141-8.
- Cai, X., C. H. Hagedorn, et al. (2004). "Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs." *Rna* **10**(12): 1957-66.
- Calin, G. A., C. D. Dumitru, et al. (2002). "Frequent deletions and down-regulation of microRNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(24): 15524-9.
- Cartharius, K., K. Frech, et al. (2005). "MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites." *Bioinformatics* **21**(13): 2933-42.
- Carthew, R. W. and E. J. Sontheimer (2009). "Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs." *Cell* **136**(4): 642-55.
- Chapman, E. J. and J. C. Carrington (2007). "Specialization and evolution of endogenous small RNA pathways." *Nat Rev Genet* **8**(11): 884-96.
- Chatterjee, S. and H. Grosshans (2009). "Active turnover modulates mature microRNA activity in *Caenorhabditis elegans*." *Nature* **461**(7263): 546-9.
- Chendrimada, T. P., R. I. Gregory, et al. (2005). "TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing." *Nature* **436**(7051): 740-4.
- Chu, C. Y. and T. M. Rana (2006). "Translation repression in human cells by microRNA-induced gene silencing requires RCK/p54." *PLoS Biol* **4**(7): e210.
- Churin, Y., E. Kardalinos, et al. (2001). "Pathogenicity island-dependent activation of Rho GTPases Rac1 and Cdc42 in *Helicobacter pylori* infection." *Mol Microbiol* **40**(4): 815-23.
- Cogoni, C., J. T. Irelan, et al. (1996). "Transgene silencing of the *al-1* gene in vegetative cells of *Neurospora* is mediated by a cytoplasmic effector and does not depend on DNA-DNA interactions or DNA methylation." *Embo J* **15**(12): 3153-63.

- Couturier, M. R., E. Tasca, et al. (2006). "Interaction with CagF is required for translocation of CagA into the host via the *Helicobacter pylori* type IV secretion system." *Infect Immun* **74**(1): 273-81.
- Covacci, A., S. Censini, et al. (1993). "Molecular characterization of the 128-kDa immunodominant antigen of *Helicobacter pylori* associated with cytotoxicity and duodenal ulcer." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(12): 5791-5.
- Cover, T. L. and S. R. Blanke (2005). "*Helicobacter pylori* VacA, a paradigm for toxin multifunctionality." *Nat Rev Microbiol* **3**(4): 320-32.
- Cover, T. L. and M. J. Blaser (2009). "*Helicobacter pylori* in health and disease." *Gastroenterology* **136**(6): 1863-73.
- Davis, B. N. and A. Hata (2009). "Regulation of MicroRNA Biogenesis: A miRiad of mechanisms." *Cell Commun Signal* **7**: 18.
- de Vries, W. and B. Berkhout (2008). "RNAi suppressors encoded by pathogenic human viruses." *Int J Biochem Cell Biol* **40**(10): 2007-12.
- Denli, A. M., B. B. Tops, et al. (2004). "Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex." *Nature* **432**(7014): 231-5.
- Diederichs, S., S. Jung, et al. (2008). "Coexpression of Argonaute-2 enhances RNA interference toward perfect match binding sites." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(27): 9284-9.
- Ding, S. W. (2010). "RNA-based antiviral immunity." *Nat Rev Immunol* **10**(9): 632-44.
- Ding, S. W. and O. Voinnet (2007). "Antiviral immunity directed by small RNAs." *Cell* **130**(3): 413-26.
- Ding, S. Z., W. Fischer, et al. (2010). "*Helicobacter pylori*-induced histone modification, associated gene expression in gastric epithelial cells, and its implication in pathogenesis." *PLoS One* **5**(4): e9875.
- Ebert, M. S. and P. A. Sharp (2010). "Emerging Roles for Natural MicroRNA Sponges." *Curr Biol* **20**(19): R858-61.
- Eiring, A. M., J. G. Harb, et al. (2010). "miR-328 functions as an RNA decoy to modulate hnRNP E2 regulation of mRNA translation in leukemic blasts." *Cell* **140**(5): 652-65.
- el-Deiry, W. S., T. Tokino, et al. (1993). "WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression." *Cell* **75**(4): 817-25.
- El-Omar, E. M., M. Carrington, et al. (2001). "The role of interleukin-1 polymorphisms in the pathogenesis of gastric cancer." *Nature* **412**(6842): 99.
- El-Omar, E. M., C. S. Rabkin, et al. (2003). "Increased risk of noncardia gastric cancer associated with proinflammatory cytokine gene polymorphisms." *Gastroenterology* **124**(5): 1193-201.
- Ender, C., A. Krek, et al. (2008). "A human snoRNA with microRNA-like functions." *Mol Cell* **32**(4): 519-28.
- Eulalio, A., I. Behm-Ansmant, et al. (2007). "P bodies: at the crossroads of post-transcriptional pathways." *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**(1): 9-22.
- Fabian, M. R., N. Sonenberg, et al. (2010). "Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs." *Annu Rev Biochem* **79**: 351-79.
- Fahlgren, N., M. D. Howell, et al. (2007). "High-throughput sequencing of Arabidopsis microRNAs: evidence for frequent birth and death of MIRNA genes." *PLoS One* **2**(2): e219.
- Falush, D., T. Wirth, et al. (2003). "Traces of human migrations in *Helicobacter pylori* populations." *Science* **299**(5612): 1582-5.
- Fassi Fehri, L., M. Koch, et al. (2010). "*Helicobacter pylori* induces miR-155 in T cells in a cAMP-Foxp3-dependent manner." *PLoS One* **5**(3): e9500.

- Fehri, L. F., C. Rechner, et al. (2009). "Helicobacter pylori-induced modification of the histone H3 phosphorylation status in gastric epithelial cells reflects its impact on cell cycle regulation." *Epigenetics* **4**(8): 577-86.
- Filipowicz, W., S. N. Bhattacharyya, et al. (2008). "Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight?" *Nat Rev Genet* **9**(2): 102-14.
- Fire, A., S. Xu, et al. (1998). "Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*." *Nature* **391**(6669): 806-11.
- Floyd, S. K. and J. L. Bowman (2004). "Gene regulation: ancient microRNA target sequences in plants." *Nature* **428**(6982): 485-6.
- Forman, J. J., A. Legesse-Miller, et al. (2008). "A search for conserved sequences in coding regions reveals that the let-7 microRNA targets Dicer within its coding sequence." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(39): 14879-84.
- Friedman, R. C., K. K. Farh, et al. (2009). "Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs." *Genome Res* **19**(1): 92-105.
- Fukuda, T., K. Yamagata, et al. (2007). "DEAD-box RNA helicase subunits of the Drosha complex are required for processing of rRNA and a subset of microRNAs." *Nat Cell Biol* **9**(5): 604-11.
- Gantier, M. P. and B. R. Williams (2007). "The response of mammalian cells to double-stranded RNA." *Cytokine Growth Factor Rev* **18**(5-6): 363-71.
- Gebert, B., W. Fischer, et al. (2003). "Helicobacter pylori vacuolating cytotoxin inhibits T lymphocyte activation." *Science* **301**(5636): 1099-102.
- Gewirtz, A. T., Y. Yu, et al. (2004). "Helicobacter pylori flagellin evades toll-like receptor 5-mediated innate immunity." *J Infect Dis* **189**(10): 1914-20.
- Ghosh, Z., B. Mallick, et al. (2009). "Cellular versus viral microRNAs in host-virus interaction." *Nucleic Acids Res* **37**(4): 1035-48.
- Gibbings, D. and O. Voinnet (2010). "Control of RNA silencing and localization by endolysosomes." *Trends Cell Biol*.
- Giner, A., L. Lakatos, et al. (2010). "Viral protein inhibits RISC activity by argonaute binding through conserved WG/GW motifs." *PLoS Pathog* **6**(7): e1000996.
- Gitlin, L., S. Karelsky, et al. (2002). "Short interfering RNA confers intracellular antiviral immunity in human cells." *Nature* **418**(6896): 430-4.
- Gobert, A. P., B. D. Mersey, et al. (2002). "Cutting edge: urease release by Helicobacter pylori stimulates macrophage inducible nitric oxide synthase." *J Immunol* **168**(12): 6002-6.
- Goodwin, C. S., W. McConnell, et al. (1989). "Cellular fatty acid composition of Campylobacter pylori from primates and ferrets compared with those of other campylobacters." *J Clin Microbiol* **27**(5): 938-43.
- Gottwein, E., N. Mukherjee, et al. (2007). "A viral microRNA functions as an orthologue of cellular miR-155." *Nature* **450**(7172): 1096-9.
- Gregory, P. A., C. P. Bracken, et al. (2008). "MicroRNAs as regulators of epithelial-mesenchymal transition." *Cell Cycle* **7**(20): 3112-8.
- Gregory, R. I., K. P. Yan, et al. (2004). "The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs." *Nature* **432**(7014): 235-40.
- Griffiths-Jones, S. (2004). "The microRNA Registry." *Nucleic Acids Res* **32**(Database issue): D109-11.
- Grimson, A., K. K. Farh, et al. (2007). "MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing." *Mol Cell* **27**(1): 91-105.
- Guil, S. and J. F. Caceres (2007). "The multifunctional RNA-binding protein hnRNP A1 is required for processing of miR-18a." *Nat Struct Mol Biol* **14**(7): 591-6.

- Haase, A. D., L. Jaskiewicz, et al. (2005). "TRBP, a regulator of cellular PKR and HIV-1 virus expression, interacts with Dicer and functions in RNA silencing." EMBO Rep **6**(10): 961-7.
- Haasnoot, J., W. de Vries, et al. (2007). "The Ebola virus VP35 protein is a suppressor of RNA silencing." PLoS Pathog **3**(6): e86.
- Hamilton, A. J. and D. C. Baulcombe (1999). "A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants." Science **286**(5441): 950-2.
- Hammell, C. M., I. Lubin, et al. (2009). "nhl-2 Modulates microRNA activity in *Caenorhabditis elegans*." Cell **136**(5): 926-38.
- Hammond, S. M., E. Bernstein, et al. (2000). "An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells." Nature **404**(6775): 293-6.
- Han, J., Y. Lee, et al. (2004). "The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing." Genes Dev **18**(24): 3016-27.
- Han, J., Y. Lee, et al. (2006). "Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex." Cell **125**(5): 887-901.
- Han, J., J. S. Pedersen, et al. (2009). "Posttranscriptional crossregulation between Drosha and DGCR8." Cell **136**(1): 75-84.
- Hatakeyama, M. (2008). "SagA of CagA in *Helicobacter pylori* pathogenesis." Curr Opin Microbiol **11**(1): 30-7.
- Heo, I., C. Joo, et al. (2009). "TUT4 in concert with Lin28 suppresses microRNA biogenesis through pre-microRNA uridylation." Cell **138**(4): 696-708.
- Herrera, V. and J. Parsonnet (2009). "*Helicobacter pylori* and gastric adenocarcinoma." Clin Microbiol Infect **15**(11): 971-6.
- Hessey, S. J., J. Spencer, et al. (1990). "Bacterial adhesion and disease activity in *Helicobacter* associated chronic gastritis." Gut **31**(2): 134-8.
- Higashi, H., A. Nakaya, et al. (2004). "*Helicobacter pylori* CagA induces Ras-independent morphogenetic response through SHP-2 recruitment and activation." J Biol Chem **279**(17): 17205-16.
- Higashi, H., R. Tsutsumi, et al. (2002). "SHP-2 tyrosine phosphatase as an intracellular target of *Helicobacter pylori* CagA protein." Science **295**(5555): 683-6.
- Horvath, P. and R. Barrangou (2010). "CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea." Science **327**(5962): 167-70.
- Houbaviy, H. B., L. Dennis, et al. (2005). "Characterization of a highly variable eutherian microRNA gene." Rna **11**(8): 1245-57.
- Huang, J., Z. Liang, et al. (2007). "Derepression of microRNA-mediated protein translation inhibition by apolipoprotein B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide-like 3G (APOBEC3G) and its family members." J Biol Chem **282**(46): 33632-40.
- Huang, J., F. Wang, et al. (2007). "Cellular microRNAs contribute to HIV-1 latency in resting primary CD4+ T lymphocytes." Nat Med **13**(10): 1241-7.
- Huang, Q., K. Gumireddy, et al. (2008). "The microRNAs miR-373 and miR-520c promote tumour invasion and metastasis." Nat Cell Biol **10**(2): 202-10.
- Humphreys, D. T., B. J. Westman, et al. (2005). "MicroRNAs control translation initiation by inhibiting eukaryotic initiation factor 4E/cap and poly(A) tail function." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(47): 16961-6.
- Hutvagner, G., J. McLachlan, et al. (2001). "A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA." Science **293**(5531): 834-8.
- Ibanez-Ventoso, C., M. Vora, et al. (2008). "Sequence relationships among *C. elegans*, *D. melanogaster* and human microRNAs highlight the extensive conservation of microRNAs in biology." PLoS One **3**(7): e2818.

- Ilver, D., A. Arnqvist, et al. (1998). "Helicobacter pylori adhesin binding fucosylated histo-blood group antigens revealed by retagging." Science **279**(5349): 373-7.
- Inui, M., G. Martello, et al. (2010). "MicroRNA control of signal transduction." Nat Rev Mol Cell Biol **11**(4): 252-63.
- Jakymiw, A., S. Lian, et al. (2005). "Disruption of GW bodies impairs mammalian RNA interference." Nat Cell Biol **7**(12): 1267-74.
- Jones, P. A. and S. B. Baylin (2007). "The epigenomics of cancer." Cell **128**(4): 683-92.
- Jopling, C. L., M. Yi, et al. (2005). "Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA." Science **309**(5740): 1577-81.
- Judson, R. L., J. E. Babiarz, et al. (2009). "Embryonic stem cell-specific microRNAs promote induced pluripotency." Nat Biotechnol **27**(5): 459-61.
- Kasschau, K. D. and J. C. Carrington (1998). "A counterdefensive strategy of plant viruses: suppression of posttranscriptional gene silencing." Cell **95**(4): 461-70.
- Katiyar-Agarwal, S. and H. Jin (2010). "Role of small RNAs in host-microbe interactions." Annu Rev Phytopathol **48**: 225-46.
- Katiyar-Agarwal, S., R. Morgan, et al. (2006). "A pathogen-inducible endogenous siRNA in plant immunity." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(47): 18002-7.
- Katoh, T., Y. Sakaguchi, et al. (2009). "Selective stabilization of mammalian microRNAs by 3' adenylation mediated by the cytoplasmic poly(A) polymerase GLD-2." Genes Dev **23**(4): 433-8.
- Keates, S., A. C. Keates, et al. (2005). "Transactivation of the epidermal growth factor receptor by cag+ Helicobacter pylori induces upregulation of the early growth response gene Egr-1 in gastric epithelial cells." Gut **54**(10): 1363-9.
- Kedde, M., M. J. Strasser, et al. (2007). "RNA-binding protein Dnd1 inhibits microRNA access to target mRNA." Cell **131**(7): 1273-86.
- Kedde, M., M. van Kouwenhove, et al. (2010). "A Pumilio-induced RNA structure switch in p27-3' UTR controls miR-221 and miR-222 accessibility." Nat Cell Biol **12**(10): 1014-20.
- Khvorova, A., A. Reynolds, et al. (2003). "Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias." Cell **115**(2): 209-16.
- Kidd, M. and I. M. Modlin (1998). "A century of Helicobacter pylori: paradigms lost-paradigms regained." Digestion **59**(1): 1-15.
- Kim, V. N. (2005). "MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing." Nat Rev Mol Cell Biol **6**(5): 376-85.
- Kim, V. N., J. Han, et al. (2009). "Biogenesis of small RNAs in animals." Nat Rev Mol Cell Biol **10**(2): 126-39.
- Kim, Y. K. and V. N. Kim (2007). "Processing of intronic microRNAs." Embo J **26**(3): 775-83.
- Kusters, J. G., A. H. van Vliet, et al. (2006). "Pathogenesis of Helicobacter pylori infection." Clin Microbiol Rev **19**(3): 449-90.
- Kwok, T., D. Zabler, et al. (2007). "Helicobacter exploits integrin for type IV secretion and kinase activation." Nature **449**(7164): 862-6.
- Lagos-Quintana, M., R. Rauhut, et al. (2001). "Identification of novel genes coding for small expressed RNAs." Science **294**(5543): 853-8.
- Landgraf, P., M. Rusu, et al. (2007). "A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing." Cell **129**(7): 1401-14.
- Landthaler, M., A. Yalcin, et al. (2004). "The human DiGeorge syndrome critical region gene 8 and Its D. melanogaster homolog are required for miRNA biogenesis." Curr Biol **14**(23): 2162-7.

- Lecellier, C. H., P. Dunoyer, et al. (2005). "A cellular microRNA mediates antiviral defense in human cells." *Science* **308**(5721): 557-60.
- Lecellier, C. H. and O. Voinnet (2004). "RNA silencing: no mercy for viruses?" *Immunol Rev* **198**: 285-303.
- Lee, E. J., M. Baek, et al. (2008). "Systematic evaluation of microRNA processing patterns in tissues, cell lines, and tumors." *Rna* **14**(1): 35-42.
- Lee, K. H., Y. G. Goan, et al. (2009). "MicroRNA-373 (miR-373) post-transcriptionally regulates large tumor suppressor, homolog 2 (LATS2) and stimulates proliferation in human esophageal cancer." *Exp Cell Res* **315**(15): 2529-38.
- Lee, R. C., R. L. Feinbaum, et al. (1993). "The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*." *Cell* **75**(5): 843-54.
- Lee, Y., C. Ahn, et al. (2003). "The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing." *Nature* **425**(6956): 415-9.
- Lee, Y., I. Hur, et al. (2006). "The role of PACT in the RNA silencing pathway." *Embo J* **25**(3): 522-32.
- Lee, Y., M. Kim, et al. (2004). "MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II." *Embo J* **23**(20): 4051-60.
- Lee, Y. S., K. Nakahara, et al. (2004). "Distinct roles for *Drosophila* Dicer-1 and Dicer-2 in the siRNA/miRNA silencing pathways." *Cell* **117**(1): 69-81.
- Lee, Y. S., S. Pressman, et al. (2009). "Silencing by small RNAs is linked to endosomal trafficking." *Nat Cell Biol* **11**(9): 1150-6.
- Leung, A. K., J. M. Calabrese, et al. (2006). "Quantitative analysis of Argonaute protein reveals microRNA-dependent localization to stress granules." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(48): 18125-30.
- Leunk, R. D., P. T. Johnson, et al. (1988). "Cytotoxic activity in broth-culture filtrates of *Campylobacter pylori*." *J Med Microbiol* **26**(2): 93-9.
- Li, H., W. X. Li, et al. (2002). "Induction and suppression of RNA silencing by an animal virus." *Science* **296**(5571): 1319-21.
- Li, L. C. and R. Dahiya (2002). "MethPrimer: designing primers for methylation PCRs." *Bioinformatics* **18**(11): 1427-31.
- Li, Y., J. Pei, et al. (2003). "Lats2, a putative tumor suppressor, inhibits G1/S transition." *Oncogene* **22**(28): 4398-405.
- Liang, Y., D. Ridzon, et al. (2007). "Characterization of microRNA expression profiles in normal human tissues." *BMC Genomics* **8**: 166.
- Lim, L. P., M. E. Glasner, et al. (2003). "Vertebrate microRNA genes." *Science* **299**(5612): 1540.
- Lim, L. P., N. C. Lau, et al. (2005). "Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs." *Nature* **433**(7027): 769-73.
- Linz, B., F. Balloux, et al. (2007). "An African origin for the intimate association between humans and *Helicobacter pylori*." *Nature* **445**(7130): 915-8.
- Liu, J., M. A. Carmell, et al. (2004). "Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi." *Science* **305**(5689): 1437-41.
- Liu, J., K. M. Drescher, et al. (2009). "MicroRNAs and Epithelial Immunity." *Int Rev Immunol* **28**(3-4): 139-54.
- Liu, J., F. V. Rivas, et al. (2005). "A role for the P-body component GW182 in microRNA function." *Nat Cell Biol* **7**(12): 1261-6.
- Liu, J., M. A. Valencia-Sanchez, et al. (2005). "MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies." *Nat Cell Biol* **7**(7): 719-23.
- Liu, Q., T. A. Rand, et al. (2003). "R2D2, a bridge between the initiation and effector steps of the *Drosophila* RNAi pathway." *Science* **301**(5641): 1921-5.

- Lu, H., N. Murata-Kamiya, et al. (2009). "Role of partitioning-defective 1/microtubule affinity-regulating kinases in the morphogenetic activity of *Helicobacter pylori* CagA." J Biol Chem **284**(34): 23024-36.
- Lu, L. F. and A. Liston (2009). "MicroRNA in the immune system, microRNA as an immune system." Immunology **127**(3): 291-8.
- Lund, E., S. Guttinger, et al. (2004). "Nuclear export of microRNA precursors." Science **303**(5654): 95-8.
- Lunet, N. and H. Barros (2003). "Helicobacter pylori infection and gastric cancer: facing the enigmas." Int J Cancer **106**(6): 953-60.
- Lytle, J. R., T. A. Yario, et al. (2007). "Target mRNAs are repressed as efficiently by microRNA-binding sites in the 5' UTR as in the 3' UTR." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(23): 9667-72.
- Machado, J. C., P. Pharoah, et al. (2001). "Interleukin 1B and interleukin 1RN polymorphisms are associated with increased risk of gastric carcinoma." Gastroenterology **121**(4): 823-9.
- Machida-Montani, A., S. Sasazuki, et al. (2004). "Association of *Helicobacter pylori* infection and environmental factors in non-cardia gastric cancer in Japan." Gastric Cancer **7**(1): 46-53.
- Mahdavi, J., B. Sondén, et al. (2002). "Helicobacter pylori SabA adhesin in persistent infection and chronic inflammation." Science **297**(5581): 573-8.
- Manente, L., A. Perna, et al. (2008). "The *Helicobacter pylori*'s protein VacA has direct effects on the regulation of cell cycle and apoptosis in gastric epithelial cells." J Cell Physiol **214**(3): 582-7.
- Maroney, P. A., Y. Yu, et al. (2006). "Evidence that microRNAs are associated with translating messenger RNAs in human cells." Nat Struct Mol Biol **13**(12): 1102-7.
- Marshall, B. J. and J. R. Warren (1984). "Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration." Lancet **1**(8390): 1311-5.
- Marson, A., S. S. Levine, et al. (2008). "Connecting microRNA genes to the core transcriptional regulatory circuitry of embryonic stem cells." Cell **134**(3): 521-33.
- Martello, G., A. Rosato, et al. (2010). "A MicroRNA targeting dicer for metastasis control." Cell **141**(7): 1195-207.
- Matskevich, A. A. and K. Moelling (2007). "Dicer is involved in protection against influenza A virus infection." J Gen Virol **88**(Pt 10): 2627-35.
- Matsushima, K., H. Isomoto, et al. (2010). "MicroRNA signatures in *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosa." Int J Cancer.
- Millar, A. A. and P. M. Waterhouse (2005). "Plant and animal microRNAs: similarities and differences." Funct Integr Genomics **5**(3): 129-35.
- Mimuro, H., T. Suzuki, et al. (2002). "Grb2 is a key mediator of *Helicobacter pylori* CagA protein activities." Mol Cell **10**(4): 745-55.
- Moese, S., M. Selbach, et al. (2007). "The *Helicobacter pylori* CagA protein disrupts matrix adhesion of gastric epithelial cells by dephosphorylation of vinculin." Cell Microbiol **9**(5): 1148-61.
- Moese, S., M. Selbach, et al. (2004). "Helicobacter pylori induces AGS cell motility and elongation via independent signaling pathways." Infect Immun **72**(6): 3646-9.
- Molinari, M., M. Salio, et al. (1998). "Selective inhibition of li-dependent antigen presentation by *Helicobacter pylori* toxin VacA." J Exp Med **187**(1): 135-40.
- Monteys, A. M., R. M. Spengler, et al. (2010). "Structure and activity of putative intronic miRNA promoters." Rna **16**(3): 495-505.
- Morange, M. (2008). "What history tells us XIV. Regulation of gene expression by non-coding RNAs: the early steps." J Biosci **33**(3): 327-31.

- Morlando, M., M. Ballarino, et al. (2008). "Primary microRNA transcripts are processed co-transcriptionally." *Nat Struct Mol Biol* **15**(9): 902-9.
- Mosher, R. A. and D. C. Baulcombe (2008). "Bacterial pathogens encode suppressors of RNA-mediated silencing." *Genome Biol* **9**(10): 237.
- Murata-Kamiya, N., Y. Kurashima, et al. (2007). "Helicobacter pylori CagA interacts with E-cadherin and deregulates the beta-catenin signal that promotes intestinal transdifferentiation in gastric epithelial cells." *Oncogene* **26**(32): 4617-26.
- Napoli, C., C. Lemieux, et al. (1990). "Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans." *Plant Cell* **2**(4): 279-289.
- Navarro, L., P. Dunoyer, et al. (2006). "A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling." *Science* **312**(5772): 436-9.
- Navarro, L., F. Jay, et al. (2008). "Suppression of the microRNA pathway by bacterial effector proteins." *Science* **321**(5891): 964-7.
- Neumuller, R. A., J. Betschinger, et al. (2008). "Mei-P26 regulates microRNAs and cell growth in the Drosophila ovarian stem cell lineage." *Nature* **454**(7201): 241-5.
- Niehus, E., H. Gressmann, et al. (2004). "Genome-wide analysis of transcriptional hierarchy and feedback regulation in the flagellar system of Helicobacter pylori." *Mol Microbiol* **52**(4): 947-61.
- Nielsen, C. B., N. Shomron, et al. (2007). "Determinants of targeting by endogenous and exogenous microRNAs and siRNAs." *Rna* **13**(11): 1894-910.
- Nottrott, S., M. J. Simard, et al. (2006). "Human let-7a miRNA blocks protein production on actively translating polyribosomes." *Nat Struct Mol Biol* **13**(12): 1108-14.
- Nykanen, A., B. Haley, et al. (2001). "ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway." *Cell* **107**(3): 309-21.
- Ohnishi, N., H. Yuasa, et al. (2008). "Transgenic expression of Helicobacter pylori CagA induces gastrointestinal and hematopoietic neoplasms in mouse." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(3): 1003-8.
- Olena, A. F. and J. G. Patton (2010). "Genomic organization of microRNAs." *J Cell Physiol* **222**(3): 540-5.
- Olsen, P. H. and V. Ambros (1999). "The lin-4 regulatory RNA controls developmental timing in Caenorhabditis elegans by blocking LIN-14 protein synthesis after the initiation of translation." *Dev Biol* **216**(2): 671-80.
- Orom, U. A., F. C. Nielsen, et al. (2008). "MicroRNA-10a binds the 5'UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation." *Mol Cell* **30**(4): 460-71.
- Otsuka, M., Q. Jing, et al. (2007). "Hypersusceptibility to vesicular stomatitis virus infection in Dicer1-deficient mice is due to impaired miR24 and miR93 expression." *Immunity* **27**(1): 123-34.
- Ottemann, K. M. and A. C. Lowenthal (2002). "Helicobacter pylori uses motility for initial colonization and to attain robust infection." *Infect Immun* **70**(4): 1984-90.
- Ozsolak, F., L. L. Poling, et al. (2008). "Chromatin structure analyses identify miRNA promoters." *Genes Dev* **22**(22): 3172-83.
- Parameswaran, P., E. Sklan, et al. (2010). "Six RNA viruses and forty-one hosts: viral small RNAs and modulation of small RNA repertoires in vertebrate and invertebrate systems." *PLoS Pathog* **6**(2): e1000764.
- Paroo, Z., X. Ye, et al. (2009). "Phosphorylation of the human microRNA-generating complex mediates MAPK/Erk signaling." *Cell* **139**(1): 112-22.
- Pasquinelli, A. E., B. J. Reinhart, et al. (2000). "Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA." *Nature* **408**(6808): 86-9.

- Pattis, I., E. Weiss, et al. (2007). "The *Helicobacter pylori* CagF protein is a type IV secretion chaperone-like molecule that binds close to the C-terminal secretion signal of the CagA effector protein." *Microbiology* **153**(Pt 9): 2896-909.
- Pauley, K. M., T. Eystathioy, et al. (2006). "Formation of GW bodies is a consequence of microRNA genesis." *EMBO Rep* **7**(9): 904-10.
- Pedersen, I. M., G. Cheng, et al. (2007). "Interferon modulation of cellular microRNAs as an antiviral mechanism." *Nature* **449**(7164): 919-22.
- Peek, R. M., Jr., M. J. Blaser, et al. (1999). "Helicobacter pylori strain-specific genotypes and modulation of the gastric epithelial cell cycle." *Cancer Res* **59**(24): 6124-31.
- Perry, S., B. C. de Jong, et al. (2010). "Infection with *Helicobacter pylori* is associated with protection against tuberculosis." *PLoS One* **5**(1): e8804.
- Petersen, C. P., M. E. Bordeleau, et al. (2006). "Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells." *Mol Cell* **21**(4): 533-42.
- Petrocca, F., R. Visone, et al. (2008). "E2F1-regulated microRNAs impair TGFbeta-dependent cell-cycle arrest and apoptosis in gastric cancer." *Cancer Cell* **13**(3): 272-86.
- Pfeffer, S., A. Sewer, et al. (2005). "Identification of microRNAs of the herpesvirus family." *Nat Methods* **2**(4): 269-76.
- Pfeffer, S., M. Zavolan, et al. (2004). "Identification of virus-encoded microRNAs." *Science* **304**(5671): 734-6.
- Pillai, R. S., S. N. Bhattacharyya, et al. (2005). "Inhibition of translational initiation by Let-7 MicroRNA in human cells." *Science* **309**(5740): 1573-6.
- Place, R. F., L. C. Li, et al. (2008). "MicroRNA-373 induces expression of genes with complementary promoter sequences." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(5): 1608-13.
- Polk, D. B. and R. M. Peek, Jr. (2010). "Helicobacter pylori: gastric cancer and beyond." *Nat Rev Cancer* **10**(6): 403-14.
- Poppe, M., S. M. Feller, et al. (2007). "Phosphorylation of *Helicobacter pylori* CagA by c-Abl leads to cell motility." *Oncogene* **26**(24): 3462-72.
- Qi, H. H., P. P. Ongusaha, et al. (2008). "Prolyl 4-hydroxylation regulates Argonaute 2 stability." *Nature* **455**(7211): 421-4.
- Qi, J., J. Y. Yu, et al. (2009). "microRNAs regulate human embryonic stem cell division." *Cell Cycle* **8**(22): 3729-41.
- Rad, R., A. Dossumbekova, et al. (2004). "Cytokine gene polymorphisms influence mucosal cytokine expression, gastric inflammation, and host specific colonisation during *Helicobacter pylori* infection." *Gut* **53**(8): 1082-9.
- Rad, R., M. Gerhard, et al. (2002). "The *Helicobacter pylori* blood group antigen-binding adhesin facilitates bacterial colonization and augments a nonspecific immune response." *J Immunol* **168**(6): 3033-41.
- Ramachandran, V. and X. Chen (2008). "Degradation of microRNAs by a family of exoribonucleases in Arabidopsis." *Science* **321**(5895): 1490-2.
- Rehwinkel, J., I. Behm-Ansmant, et al. (2005). "A crucial role for GW182 and the DCP1:DCP2 decapping complex in miRNA-mediated gene silencing." *Rna* **11**(11): 1640-7.
- Reinhart, B. J., F. J. Slack, et al. (2000). "The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*." *Nature* **403**(6772): 901-6.
- Ren, S., H. Higashi, et al. (2006). "Structural basis and functional consequence of *Helicobacter pylori* CagA multimerization in cells." *J Biol Chem* **281**(43): 32344-52.
- Ricci, V., C. Ciacci, et al. (1996). "Effect of *Helicobacter pylori* on gastric epithelial cell migration and proliferation in vitro: role of VacA and CagA." *Infect Immun* **64**(7): 2829-33.

- Rippe, V., L. Dittberner, et al. (2010). "The two stem cell microRNA gene clusters C19MC and miR-371-3 are activated by specific chromosomal rearrangements in a subgroup of thyroid adenomas." *PLoS One* **5**(3): e9485.
- Rodriguez, A., S. Griffiths-Jones, et al. (2004). "Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units." *Genome Res* **14**(10A): 1902-10.
- Ruby, J. G., C. H. Jan, et al. (2007). "Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing." *Nature* **448**(7149): 83-6.
- Rybak, A., H. Fuchs, et al. (2009). "The let-7 target gene mouse lin-41 is a stem cell specific E3 ubiquitin ligase for the miRNA pathway protein Ago2." *Nat Cell Biol* **11**(12): 1411-20.
- Saadat, I., H. Higashi, et al. (2007). "Helicobacter pylori CagA targets PAR1/MARK kinase to disrupt epithelial cell polarity." *Nature* **447**(7142): 330-3.
- Saito, Y., N. Murata-Kamiya, et al. (2010). "Conversion of Helicobacter pylori CagA from senescence inducer to oncogenic driver through polarity-dependent regulation of p21." *J Exp Med* **207**(10): 2157-74.
- Saito, Y., H. Suzuki, et al. (2010). "Dysfunctional gastric emptying with downregulation of muscle-specific microRNAs in Helicobacter pylori-infected mice." *Gastroenterology*.
- Schwamborn, J. C., E. Berezikov, et al. (2009). "The TRIM-NHL protein TRIM32 activates microRNAs and prevents self-renewal in mouse neural progenitors." *Cell* **136**(5): 913-25.
- Schwarz, D. S., G. Hutvagner, et al. (2003). "Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex." *Cell* **115**(2): 199-208.
- Seggerman, K., L. Tang, et al. (2002). "Two genetic circuits repress the Caenorhabditis elegans heterochronic gene lin-28 after translation initiation." *Dev Biol* **243**(2): 215-25.
- Selbach, M., S. Moese, et al. (2004). "The Helicobacter pylori CagA protein induces tyrosine dephosphorylation of ezrin." *Proteomics* **4**(10): 2961-8.
- Selbach, M., S. Moese, et al. (2002). "Src is the kinase of the Helicobacter pylori CagA protein in vitro and in vivo." *J Biol Chem* **277**(9): 6775-8.
- Selbach, M., S. Moese, et al. (2003). "The Helicobacter pylori CagA protein induces cortactin dephosphorylation and actin rearrangement by c-Src inactivation." *Embo J* **22**(3): 515-28.
- Sharma, S., T. K. Kelly, et al. (2010). "Epigenetics in cancer." *Carcinogenesis* **31**(1): 27-36.
- Sinkkonen, L., T. Hugenschmidt, et al. (2008). "MicroRNAs control de novo DNA methylation through regulation of transcriptional repressors in mouse embryonic stem cells." *Nat Struct Mol Biol* **15**(3): 259-67.
- Siomi, H. and M. C. Siomi (2010). "Posttranscriptional regulation of microRNA biogenesis in animals." *Mol Cell* **38**(3): 323-32.
- Song, J. J., J. Liu, et al. (2003). "The crystal structure of the Argonaute2 PAZ domain reveals an RNA binding motif in RNAi effector complexes." *Nat Struct Biol* **10**(12): 1026-32.
- Song, J. J., S. K. Smith, et al. (2004). "Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity." *Science* **305**(5689): 1434-7.
- Steer, H. W. and D. G. Colin-Jones (1975). "Mucosal changes in gastric ulceration and their response to carbenoxolone sodium." *Gut* **16**(8): 590-7.
- Stein, M., F. Bagnoli, et al. (2002). "c-Src/Lyn kinases activate Helicobacter pylori CagA through tyrosine phosphorylation of the EPIYA motifs." *Mol Microbiol* **43**(4): 971-80.
- Suerbaum, S. and P. Michetti (2002). "Helicobacter pylori infection." *N Engl J Med* **347**(15): 1175-86.
- Suh, M. R., Y. Lee, et al. (2004). "Human embryonic stem cells express a unique set of microRNAs." *Dev Biol* **270**(2): 488-98.

- Suzuki, H., E. Yamamoto, et al. (2010). "Methylation-associated silencing of microRNA-34b/c in gastric cancer and its involvement in an epigenetic field defect." Carcinogenesis.
- Suzuki, H. I., K. Yamagata, et al. (2009). "Modulation of microRNA processing by p53." Nature **460**(7254): 529-33.
- Suzuki, M., H. Mimuro, et al. (2005). "Interaction of CagA with Crk plays an important role in Helicobacter pylori-induced loss of gastric epithelial cell adhesion." J Exp Med **202**(9): 1235-47.
- Tam, W. (2001). "Identification and characterization of human BIC, a gene on chromosome 21 that encodes a noncoding RNA." Gene **274**(1-2): 157-67.
- Tammer, I., S. Brandt, et al. (2007). "Activation of Abl by Helicobacter pylori: a novel kinase for CagA and crucial mediator of host cell scattering." Gastroenterology **132**(4): 1309-19.
- Tan, N. Y. and L. M. Khachigian (2009). "Sp1 phosphorylation and its regulation of gene transcription." Mol Cell Biol **29**(10): 2483-8.
- Tay, Y., J. Zhang, et al. (2008). "MicroRNAs to Nanog, Oct4 and Sox2 coding regions modulate embryonic stem cell differentiation." Nature **455**(7216): 1124-8.
- Thomson, J. M., M. Newman, et al. (2006). "Extensive post-transcriptional regulation of microRNAs and its implications for cancer." Genes Dev **20**(16): 2202-7.
- Tomari, Y., C. Matranga, et al. (2004). "A protein sensor for siRNA asymmetry." Science **306**(5700): 1377-80.
- Triboulet, R., B. Mari, et al. (2007). "Suppression of microRNA-silencing pathway by HIV-1 during virus replication." Science **315**(5818): 1579-82.
- Tsitsiou, E. and M. A. Lindsay (2009). "microRNAs and the immune response." Curr Opin Pharmacol **9**(4): 514-20.
- Tsutsumi, R., H. Higashi, et al. (2003). "Attenuation of Helicobacter pylori CagA x SHP-2 signaling by interaction between CagA and C-terminal Src kinase." J Biol Chem **278**(6): 3664-70.
- Tsutsumi, R., A. Takahashi, et al. (2006). "Focal adhesion kinase is a substrate and downstream effector of SHP-2 complexed with Helicobacter pylori CagA." Mol Cell Biol **26**(1): 261-76.
- van der Krol, A. R., L. A. Mur, et al. (1990). "Flavonoid genes in petunia: addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression." Plant Cell **2**(4): 291-9.
- Vargason, J. M., G. Szitty, et al. (2003). "Size selective recognition of siRNA by an RNA silencing suppressor." Cell **115**(7): 799-811.
- Vasudevan, S., Y. Tong, et al. (2007). "Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation." Science **318**(5858): 1931-4.
- Viala, J., C. Chaput, et al. (2004). "Nod1 responds to peptidoglycan delivered by the Helicobacter pylori cag pathogenicity island." Nat Immunol **5**(11): 1166-74.
- Voinnet, O. (2005). "Induction and suppression of RNA silencing: insights from viral infections." Nat Rev Genet **6**(3): 206-20.
- Voorhoeve, P. M., C. le Sage, et al. (2006). "A genetic screen implicates miRNA-372 and miRNA-373 as oncogenes in testicular germ cell tumors." Cell **124**(6): 1169-81.
- Wang, F. Z., F. Weber, et al. (2008). "Human cytomegalovirus infection alters the expression of cellular microRNA species that affect its replication." J Virol **82**(18): 9065-74.
- Wang, J., X. Liu, et al. (2010). "CREB up-regulates long non-coding RNA, HULC expression through interaction with microRNA-372 in liver cancer." Nucleic Acids Res **38**(16): 5366-83.

- Wang, Y. and R. Blelloch (2009). "Cell cycle regulation by MicroRNAs in embryonic stem cells." Cancer Res **69**(10): 4093-6.
- Watanabe, T., M. Tada, et al. (1998). "Helicobacter pylori infection induces gastric cancer in mongolian gerbils." Gastroenterology **115**(3): 642-8.
- Watanabe, Y., A. Kishi, et al. (2007). "Computational analysis of microRNA-mediated antiviral defense in humans." FEBS Lett **581**(24): 4603-10.
- Wilson, K. T. and J. E. Crabtree (2007). "Immunology of Helicobacter pylori: insights into the failure of the immune response and perspectives on vaccine studies." Gastroenterology **133**(1): 288-308.
- Wirth, H. P., M. H. Beins, et al. (1998). "Experimental infection of Mongolian gerbils with wild-type and mutant Helicobacter pylori strains." Infect Immun **66**(10): 4856-66.
- Wu, W. K., C. W. Lee, et al. (2010). "MicroRNA dysregulation in gastric cancer: a new player enters the game." Oncogene.
- Xie, Z., L. K. Johansen, et al. (2004). "Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants." PLoS Biol **2**(5): E104.
- Yang, W., T. P. Chendrimada, et al. (2006). "Modulation of microRNA processing and expression through RNA editing by ADAR deaminases." Nat Struct Mol Biol **13**(1): 13-21.
- Ye, K., L. Malinina, et al. (2003). "Recognition of small interfering RNA by a viral suppressor of RNA silencing." Nature **426**(6968): 874-8.
- Yokoyama, K., H. Higashi, et al. (2005). "Functional antagonism between Helicobacter pylori CagA and vacuolating toxin VacA in control of the NFAT signaling pathway in gastric epithelial cells." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(27): 9661-6.
- Zamore, P. D., T. Tuschl, et al. (2000). "RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals." Cell **101**(1): 25-33.
- Zhang, X., Y. R. Yuan, et al. (2006). "Cucumber mosaic virus-encoded 2b suppressor inhibits Arabidopsis Argonaute1 cleavage activity to counter plant defense." Genes Dev **20**(23): 3255-68.
- Zhang, Z., Z. Li, et al. (2008). "miR-21 plays a pivotal role in gastric cancer pathogenesis and progression." Lab Invest **88**(12): 1358-66.
- Zhao, T., G. Li, et al. (2007). "A complex system of small RNAs in the unicellular green alga Chlamydomonas reinhardtii." Genes Dev **21**(10): 1190-203.

Annexes.

Supplementary Information

Helicobacter pylori interferes with an embryonic stem cell miRNA cluster to block cell cycle progression

C. Belair *et al.*

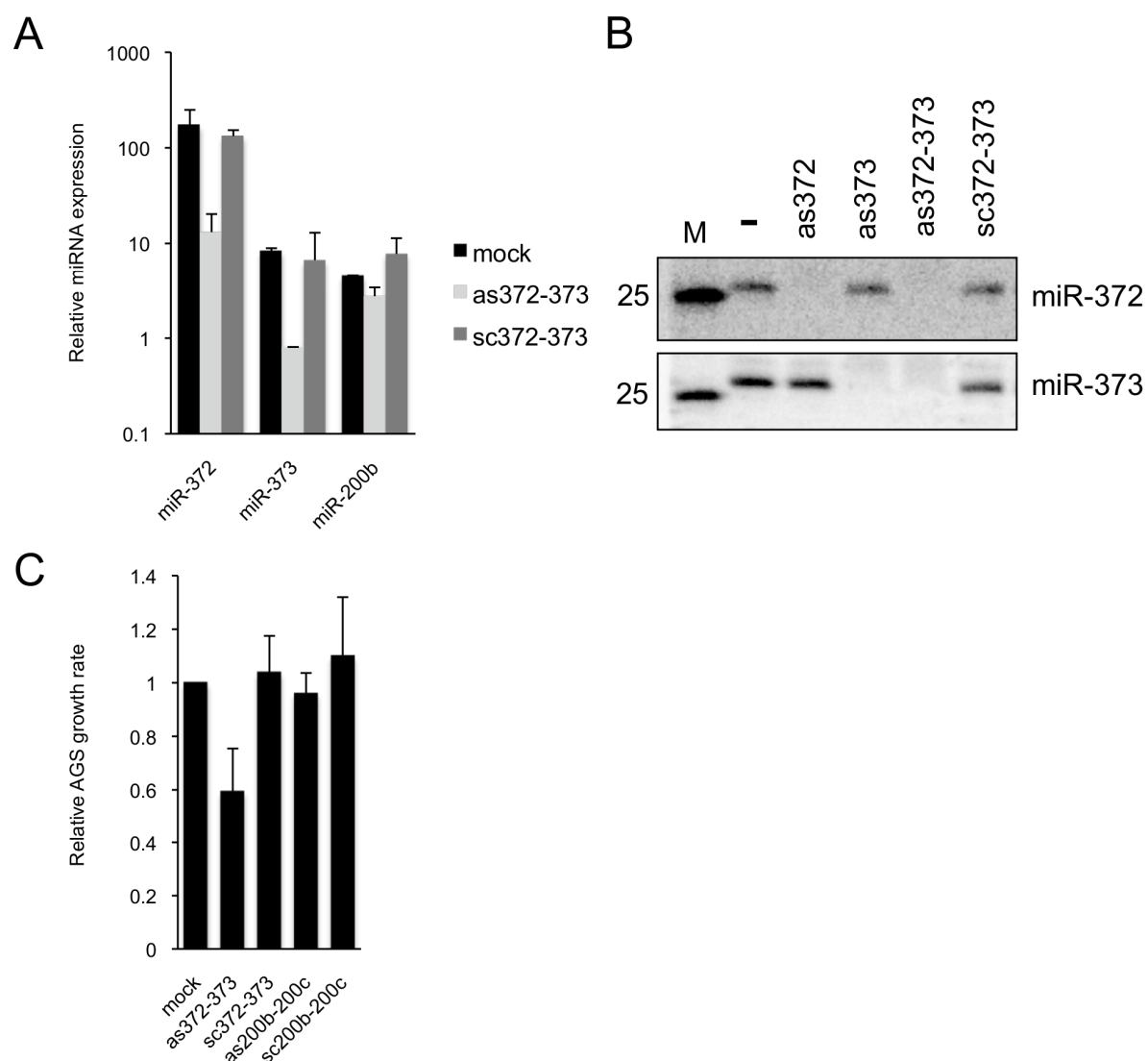
This supplement contains:

Supplementary Figures S1-S4, Supplementary Tables S1-S4, References.

Figure	Title	Page
S1	Effect of antisense oligonucleotide treatment on miRNA expression (A,B) and cell growth rate (C).	2
S2	<i>H. pylori</i> -induced morphological changes (A) and pro-inflammatory responses (B and C) in AGS cells.	4
S3	<i>H. pylori</i> strain-specific repression of pri-miR-371-372-373 and up-regulation of the EGFP-3'UTR LATS2 reporter gene	6
S4	CagA-dependent accumulation of <i>H. pylori</i> -infected AGS cells in G0/G1 phase.	7

Table	Title	Page
S1	454 results of the miRNA content in AGS cells	8
S2	miRNA listed in regards of their known function	12
S3	<i>H. pylori</i> strains used in this study	13
S4	Oligonucleotides used in this study	14
	References	15

Figure S1



Effect of antisense oligonucleotides treatment on miRNA expression (A, B) and cell growth rate (C).

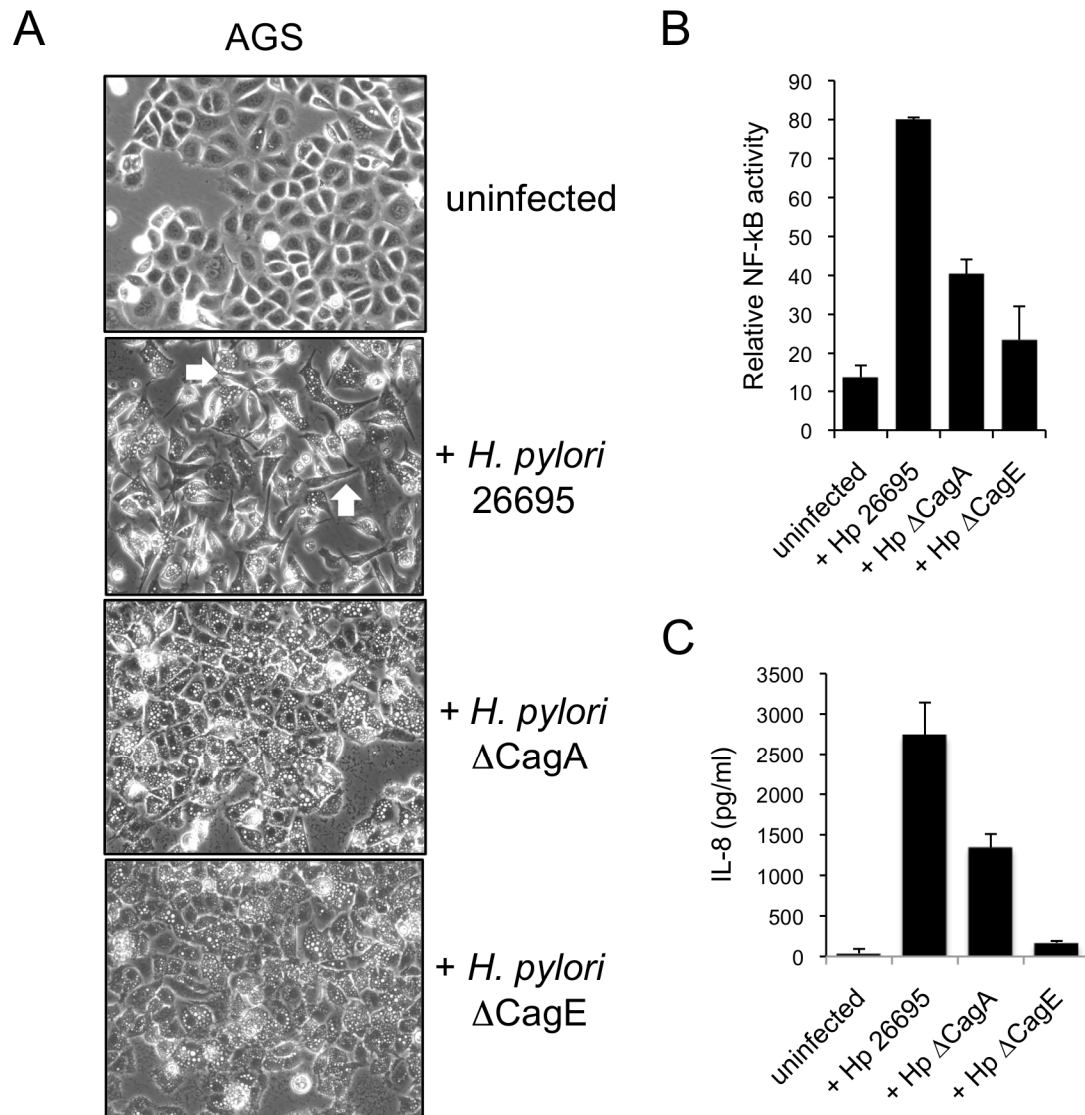
AGS cells were treated twice with 100 nM of LNA/DNA antisense (as) or scramble (sc) oligonucleotides.

(A) Endogenous expression of miR-372, -373 and -200b was determined 48h post-transfection by RT-qPCR in untreated cells (mock) or cells treated with as372-373 or sc372-373 oligonucleotides (see Table S3 for sequences). Bars indicate relative miRNA expression normalized to U6 snRNA (RNU6b). Data are mean $\pm$ SD of 2 independent experiments.

(B) Northern Blot analysis of untreated cells (lane 2) or cells treated with as372 (lane 3), as373 (lane 4), the mix as372-373 (lane 5) or the mix sc372-373 (lane 6). M: DNA (bp) marker lane (Promega).

(C) Comparison of AGS growth rate between non treated (mock) or cells treated with antisense (as372-373, as200b-200c) or scrambled (sc372-373, sc200b-200c) oligonucleotides. Cells were plated at a density of 10^5 cells per well in a 6-well plate and counted at day 2 and day 3 after plating. The results are expressed as the relative increase in cell number between day 3 and day 2, normalized to that of untreated AGS cells. Data are mean $\pm$ SD of 3 independent experiments in duplicates.

Figure S2

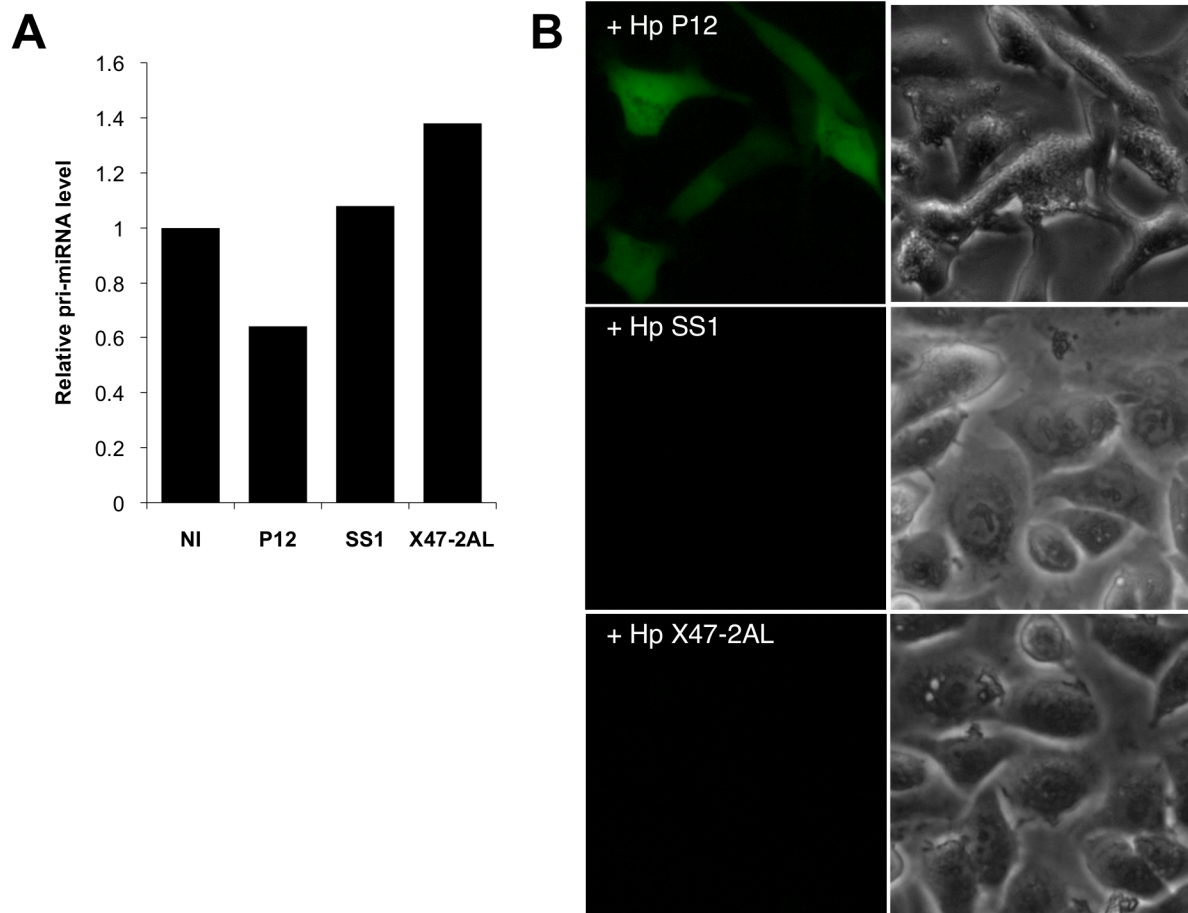


***H. pylori*-induced morphological changes (A) and pro-inflammatory responses (B and C) in AGS cells.**

(A) Morphology of uninfected AGS cells or cells co-cultured for 24h with *H. pylori* 26695 wild type (wt) strain or its isogenic mutants *H. pylori* Δ CagA and Δ CagE at MOI 100 was visualized by phase contrast microscopy. Uninfected AGS cells display an epithelial morphology. Co-culture with *H. pylori* 26695 wt strain causes cell elongation, so called “hummingbird” phenotype, and vacuoles. The “hummingbird” phenotype is CagA-dependent, as cells co-cultured with *H. pylori* 26695 mutated for the CagA toxin (*H. pylori* Δ CagA) or unable to inject CagA (*H. pylori* Δ CagE) harbor only vacuoles, an effect due to the VacA toxin secreted into the culture medium.

(B, C) Pro-inflammatory responses of AGS cells co-cultured for 24h with *H. pylori* 26695 wt strain or its isogenic mutants Δ CagA and Δ CagE at MOI 100 were analyzed by NF- κ B activation (B) and Interleukine-8 (IL-8) secretion (C). As previously described [9], NF- κ B activation and IL-8 secretion were both CagA and TSSIV dependent. NF- κ B activation was monitored using the BD Mercury firefly luciferase reporters (Beckton-Dickinson) containing NF- κ B binding sites upstream of the firefly luciferase. Bars indicate the firefly luciferase activity normalized to *Renilla* luciferase, minus TAL activity. Data represent the mean $\pm$ SD of 2 independent experiments. Interleukine-8 (IL-8) secreted in the culture medium was measured 24 h post-infection using ELISA (R&D systems). The results represent the mean $\pm$ SD of 4 independent experiments.

Figure S3



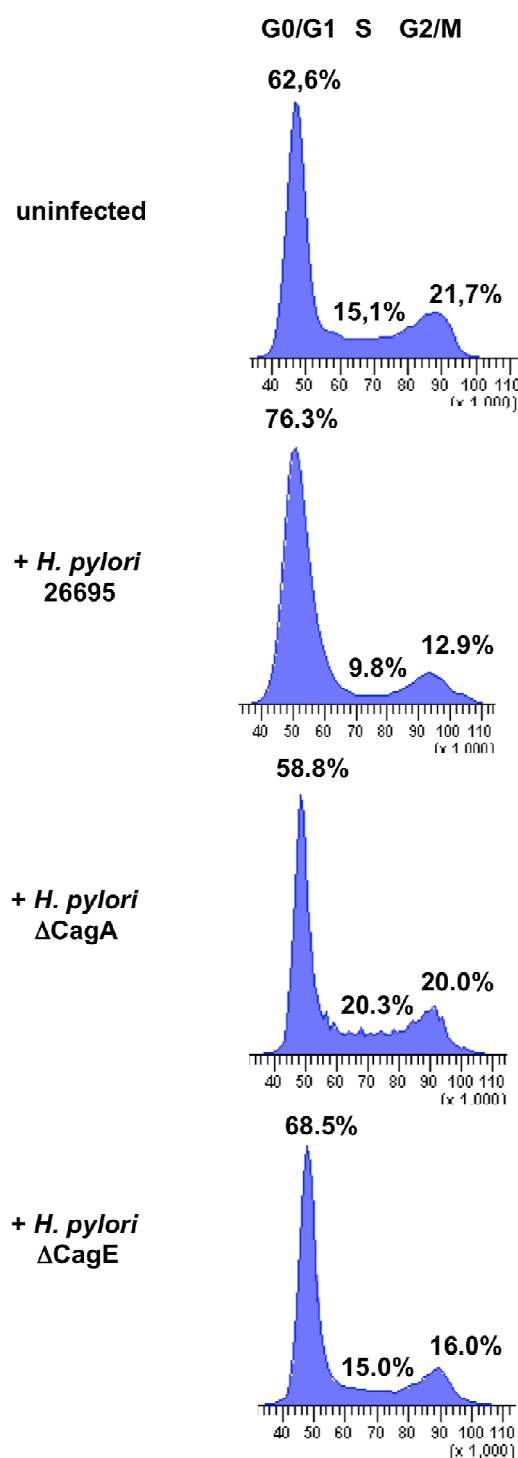
***H. pylori* strain-specific repression of pri-miR-371-372-373 and up-regulation of the EGFP-3'UTR LATS2 reporter gene**

AGS cells were infected with *H. pylori* type I strains (P12) or type II strain (SS1, X47) at a MOI 100 for 24 h.

(A) Expression of the pri-miR-371-372-373 was determined by RT-qPCR in non infected cells (NI) or cells infected with the different *H. pylori* strains. Bars indicate relative pri-miRNA expression normalized to ribosomal protein P0. A representative experiment is shown.

(B) EGFP fluorescence of LATS2 reporter cells infected or not with *H. pylori* strains. Cells were observed 24 h post-infection on an inverted microscope (Zeiss) in phase contrast (right panels) or epifluorescence (left panels).

Figure S4



CagA-dependent accumulation of *H. pylori*-infected AGS cells in G0/G1 phase.

Cellular DNA contents of uninfected AGS cells or cells co-cultured for 24h with wt, Δ CagA or Δ CagE *H. pylori* were stained by iodide propidium and analyzed by flow cytometry.

Table S1: 454 results of the miRNA content in AGS cells (MirBase 14.0).
MiRNA studied in this paper are represented in bold.

MiRNA name	Number of reads in AGS cells
hsa-miR-372	2814
hsa-miR-27b	1735.5
hsa-miR-200b	1564
hsa-miR-23a	1202
hsa-miR-92a	1117
hsa-miR-23b	1071
hsa-miR-200c	1007
hsa-miR-17	978.333313
hsa-miR-16	971
hsa-miR-371-5p	919
hsa-miR-20a	896.333313
hsa-miR-371-3p	558
hsa-let-7a	557.5
hsa-miR-15b	533
hsa-miR-103	518.5
hsa-miR-107	489,5
hsa-miR-93	458
hsa-miR-21	447
hsa-let-7f	392.5
hsa-miR-25	391
hsa-miR-27a	388.5
hsa-miR-320d	362.666687
hsa-miR-320c	336.666687
hsa-miR-373	331
hsa-miR-151-5p	265
hsa-miR-106b	255.5
hsa-miR-361-5p	252
hsa-miR-1297	221
hsa-let-7b	215
hsa-miR-24	195
hsa-let-7d	193
hsa-miR-26a	164
hsa-miR-125a-5p	160
hsa-miR-1308	155
hsa-miR-99b	129
hsa-miR-7	123
hsa-let-7g	122
hsa-miR-191	121
hsa-miR-106a	117.3333359
hsa-miR-222	117
hsa-miR-320a	116.6666641
hsa-miR-374b	113
hsa-miR-15a	94
hsa-miR-203	93
hsa-miR-1827	93
hsa-miR-22	84
hsa-let-7e	79.5
hsa-miR-19b	77

hsa-miR-221	66
hsa-miR-182	65
hsa-miR-30b	65
hsa-miR-30d	63
hsa-miR-532-3p	63
hsa-miR-34a	60
hsa-miR-194	59
hsa-miR-151-3p	50
hsa-miR-1307	50
hsa-miR-30c	44
hsa-miR-26b	43
hsa-miR-378	43
hsa-miR-185	40
hsa-miR-29a	38
hsa-miR-423-3p	36
hsa-miR-532-5p	36
hsa-miR-141	34
hsa-miR-1979	33
hsa-miR-148a	27
hsa-miR-190	27
hsa-miR-425	26
hsa-miR-183	25
hsa-miR-455-3p	24
hsa-miR-720	23
hsa-miR-30e	21
hsa-miR-130b	20
hsa-miR-502-3p	20
hsa-miR-590-3p	18
hsa-miR-10a	17
hsa-miR-195	16
hsa-miR-374a	16
hsa-miR-28-5p	15
hsa-let-7i	15
hsa-miR-18a	14
hsa-miR-192	14
hsa-miR-92b	14
hsa-miR-140-3p	13
hsa-miR-429	13
hsa-miR-652	13
hsa-miR-421	13
hsa-miR-365	12
hsa-miR-501-3p	12
hsa-miR-942	12
hsa-miR-28-3p	11
hsa-miR-31	11
hsa-miR-135b	11
hsa-miR-484	11
hsa-miR-497	11
hsa-miR-500	11
hsa-miR-886-5p	11
hsa-miR-98	10
hsa-miR-301a	10

hsa-miR-362-5p	10
hsa-miR-362-3p	10
hsa-miR-96	9
hsa-miR-128	9
hsa-miR-130a	9
hsa-miR-1274b	9
hsa-miR-101	8
hsa-miR-210	8
hsa-miR-324-3p	8
hsa-miR-345	8
hsa-miR-1275	8
hsa-miR-1280	8
hsa-miR-186	7
hsa-miR-330-3p	7
hsa-miR-1301	7
hsa-miR-454	7
hsa-miR-1975	7
hsa-miR-215	6
hsa-miR-200a	6
hsa-miR-361-3p	6
hsa-miR-339-5p	6
hsa-miR-671-5p	6
hsa-miR-744	6
hsa-miR-302b	5.666666508
hsa-miR-132	5
hsa-miR-1303	5
hsa-miR-1268	5
hsa-miR-19a	4
hsa-miR-29c	4
hsa-miR-324-5p	4
hsa-miR-486-5p	4
hsa-miR-146b-5p	4
hsa-miR-574-3p	4
hsa-miR-615-3p	4
hsa-miR-877	4
hsa-miR-302e	3.666666269
hsa-miR-302f	3.666666269
hsa-miR-196a	3
hsa-miR-197	3
hsa-miR-125a-3p	3
hsa-miR-149	3
hsa-miR-574-5p	3
hsa-miR-584	3
hsa-miR-1226	3
hsa-miR-1261	3
hsa-miR-218	2
hsa-miR-140-5p	2
hsa-miR-296-3p	2
hsa-miR-375	2
hsa-miR-148b	2
hsa-miR-331-3p	2
hsa-miR-423-5p	2

hsa-miR-486-3p	2
hsa-miR-501-5p	2
hsa-miR-502-5p	2
hsa-miR-505	2
hsa-miR-573	2
hsa-miR-548c-5p	2
hsa-miR-660	2
hsa-miR-935	2
hsa-miR-519c-5p	1.5
hsa-miR-519b-5p	1.5
hsa-miR-32	1
hsa-miR-181b	1
hsa-miR-199b-5p	1
hsa-miR-204	1
hsa-miR-219-5p	1
hsa-miR-152	1
hsa-miR-184	1
hsa-miR-302a	1
hsa-miR-330-5p	1
hsa-miR-331-5p	1
hsa-miR-339-3p	1
hsa-miR-335	1
hsa-miR-193b	1
hsa-miR-181d	1
hsa-miR-518b	1
hsa-miR-455-5p	1
hsa-miR-550	1
hsa-miR-624	1
hsa-miR-628-5p	1
hsa-miR-641	1
hsa-miR-642	1
hsa-miR-643	1
hsa-miR-767-5p	1
hsa-miR-1283	1
hsa-miR-874	1
hsa-miR-301b	1
hsa-miR-1180	1
hsa-miR-1246	1
hsa-miR-1257	1
hsa-miR-1259	1
hsa-miR-1274a	1
hsa-miR-548i	1
hsa-miR-664	1
hsa-miR-2110	1
hsa-miR-2277	1
hsa-miR-2278	1
hsa-let-7c	0.5
hsa-miR-20b	0,5
Total	25348

Curriculum vitae

Cédric BELAIR,

PhD in Microbiology

Date of birth: November 20th, 1981
Work phone: +33 (0) 557571014
Mobile phone: +33 (0) 670505726
E-mail: cedric.belair@free.fr

Address: 44 Cours de la République
Chez Mr. Guy Belair
33490 St Macaire
France

Education:

2010: **PhD** in Microbiology-Immunology, University of Bordeaux, France.
2006: **M. Sc.** in Microbiology-Immunology with honours, University of Bordeaux, France.
2004: **B. Sc.** in Cell Biology and Physiology with honours, University of Bordeaux, France.
2003: **'D.E.U.G'** with honours (equivalent to the two first academic years), University of Bordeaux, France.
1999: **'Baccalauréat'** with honours (equivalent to A level in Sciences).

Fellowship:

January 2010, **Ph.D. fellowship** from the French National League against Cancer (1 year).
January 2010, **Ph.D. fellowship** from the French Cancer Research Association (ARC, 1 year).
December 2009, **Research fellowship** from the French National League against Cancer (12000€)

Laboratory Experiences:

2006-2010: *PhD* project, INSERM U869, Team of Dr F. Darfeuille, Bordeaux, France:

« **Regulation of microRNAs upon *Helicobacter pylori* infection.** »

January-September 2006: M. Sc. Training course, INSERM U386, group of Dr. J-J. Toulme:

« **Functional screening of RNA aptamers targeted to the HCV IRES.** »

April-May 2005: M. Sc. Training course, INSERM U876, group of Pr. H. de Verneuil:

« **Role of HIF-1 α in hematopoietic stem cells.** »

February-June 2002: Voluntary training course, INSERM U386, group of Dr J-J. Toulme:

« **Characterization of aptamers targeted to the VIH-1 TAR element.** »

Supervision of trainees:

September 2006-June 2007, Elodie Rance, M. Sc. in Genetics.
January-February 2008, Laura Thuillier, Associate Degree in Biotechnology.
April-May 2010, Nelly Ménard, Undergraduate in Bioengineering.

Technical Skills:

Molecular biology:

Quantitative RT-PCR, Western blot, PCR, Cloning, Site-directed mutagenesis, Epigenetic analysis (HRM analysis, Bisulfite sequencing), ELISA, Sequencing, Primer extension, Electrophoretic Mobility Shift Assay, *In vitro* translation assay (RRL), Bioinformatic tools (ClustalW, Blast, Blat).

Cellular biology:

Cell culture (Gastric cell lines: AGS, MKN7, 45, 74, NCI-N87; HeLa; Hek293; Caco-2, HT-29; Huh7, HepG2), Immunofluorescence, Transfection, Flow cytometry, Bacteriology (*Escherichia coli*, *Helicobacter pylori*), Cell cycle analysis (propidium iodide staining, BrDU incorporation), Lentiviral transduction.

Publications:

Belair, C., Baud, J., Chabas, S., Sharma, CM., Hackermüller J., Vogel, J., Staedel, C. and Darfeuille, F. *Helicobacter pylori*-Induced Cell Cycle Arrest in Gastric Epithelial Cells is Mediated by an Embryonic Stem Cell MicroRNA Cluster. *In Revision for Nucleic Acid Research*.

Belair, C., Darfeuille, F. and Staedel, C. (2009) *Helicobacter pylori* and gastric cancer: possible role of microRNAs in this intimate relationship. *Clin Microbiol Infect.* 15(9):806-12.

Communications:

F. Darfeuille, **C. Belair,** J. Baud, S. Chabas, C. M Sharma, J. Hackermüller, J. Vogel, C. Staedel. **MiRNAs, gastric cancer and *Helicobacter pylori*: what else?... Stem cells?** 5th Microsymposium on Small RNAs, IMBA, Vienna, Austria, May 2010.

C. Belair, J. Baud, S. Chabas, C. M Sharma, J. Hackermüller, J. Vogel, C. Staedel and F. Darfeuille. **MiRNAs, gastric cancer and *Helicobacter pylori*: what else?... Stem cells?** Meeting “Around the Stem Cell”, Bordeaux, France, March 2010.

C. Belair, J. Baud, S. Chabas, C. M Sharma, J. Hackermüller, J. Vogel, C. Staedel and F. Darfeuille. **MiRNA regulation by bacterial effector: *Helicobacter pylori* as a study case model.** GBD 2009: “MicroRNA and small non-coding RNA: new actors in pathophysiology”. Nice, France, October 2009.

C. Belair, S. Reigadas, E. Rance, S. Chabas, S. Durrieu, E. Ledan-Schuster, C. Staedel, J.J Toulmé. **Functional screening of RNA aptamers targeted to the HCV IRES.** 8th meeting of French Research Association against AIDS and Hepatitis, Paris, France, January 2008.

S. Reigadas, **C. Belair,** S. Chabas, S. Durrieu, E. Ledan-Schuster, J.J Toulmé. **Identification by functional screening of RNA aptamers directed against the HCV IRES.** SifrARN meeting, Rennes, France, July 2006.

Posters:

E. Dausse, **C. Belair,** C. Staedel, J.J Toulmé. **Regulating mRNA translation with a kiss.** 18th International Roundtable on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids, Kyoto, Japan, September 2008.

C. Belair, S. Chabas, J. Baud, C. Sharma, J. Vogel, S. Hoffmann, P. Stadler, F. Darfeuille, C. Staedel. **MicroRNAs and bacterial infection: microRNA expression in human gastric cells in response to *Helicobacter pylori* infection.** 6th Meeting of Figeac, Figeac, France, September 2008.

C. Belair, S. Reigadas, E. Rance, S. Chabas, S. Durrieu, E. Ledan-Schuster, C. Staedel, J.J Toulmé. **Functional screening of RNA aptamers targeted to the HCV IRES.** 14th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Glasgow, Scotland, September 2007.

C. Belair, S. Reigadas, S. Chabas, S. Durrieu, E. Ledan-Schuster, C. Staedel, J.J Toulmé. **Identification by functional screening of RNA aptamers directed against the HCV IRES.** 19th JACQUES CARTIER meeting, Lyon, France, December 2006.

Miscellaneous:

Referee activity for Cancer Letter and Cellular and Molecular Life Sciences.

References:

Dr Fabien Darfeuille, PhD
INSERM U869
University of Bordeaux
146 Rue Léo Saignat
Bat 3a 1er etg
33076 Bordeaux, FRANCE
fabien.darfeuille@inserm.fr

Dr Cathy Staedel, PhD
INSERM U869
University of Bordeaux
146 Rue Léo Saignat
Bat 3a 1er etg
33076 Bordeaux, FRANCE
cathy.staedel@inserm.fr

Dr Jean-Jacques Toulmé, PhD
INSERM U869
University of Bordeaux
146 Rue Léo Saignat
Bat 3a 1er etg
33076 Bordeaux, FRANCE
jean-jacques.toulme@inserm.fr

Curriculum vitae

Cédric BELAIR,

PhD in Microbiology

Date of birth: November 20th, 1981
Work phone: +33 (0) 557571014
Mobile phone: +33 (0) 670505726
E-mail: cedric.belair@free.fr

Address: 44 Cours de la République
Chez Mr. Guy Belair
33490 St Macaire
France

Education:

2010: **PhD** in Microbiology-Immunology, University of Bordeaux, France.
2006: **M. Sc.** in Microbiology-Immunology with honours, University of Bordeaux, France.
2004: **B. Sc.** in Cell Biology and Physiology with honours, University of Bordeaux, France.
2003: **'D.E.U.G'** with honours (equivalent to the two first academic years), University of Bordeaux, France.
1999: **'Baccalauréat'** with honours (equivalent to A level in Sciences).

Fellowship:

January 2010, **Ph.D. fellowship** from the French National League against Cancer (1 year).
January 2010, **Ph.D. fellowship** from the French Cancer Research Association (ARC, 1 year).
December 2009, **Research fellowship** from the French National League against Cancer (12000€)

Laboratory Experiences:

2006-2010: *PhD* project, INSERM U869, Team of Dr F. Darfeuille, Bordeaux, France:

« **Regulation of microRNAs upon *Helicobacter pylori* infection.** »

January-September 2006: M. Sc. Training course, INSERM U386, group of Dr. J-J. Toulme:

« **Functional screening of RNA aptamers targeted to the HCV IRES.** »

April-May 2005: M. Sc. Training course, INSERM U876, group of Pr. H. de Verneuil:

« **Role of HIF-1 α in hematopoietic stem cells.** »

February-June 2002: Voluntary training course, INSERM U386, group of Dr J-J. Toulme:

« **Characterization of aptamers targeted to the VIH-1 TAR element.** »

Supervision of trainees:

September 2006-June 2007, Elodie Rance, M. Sc. in Genetics.
January-February 2008, Laura Thuillier, Associate Degree in Biotechnology.
April-May 2010, Nelly Ménard, Undergraduate in Bioengineering.

Technical Skills:

Molecular biology:

Quantitative RT-PCR, Western blot, PCR, Cloning, Site-directed mutagenesis, Epigenetic analysis (HRM analysis, Bisulfite sequencing), ELISA, Sequencing, Primer extension, Electrophoretic Mobility Shift Assay, *In vitro* translation assay (RRL), Bioinformatic tools (ClustalW, Blast, Blat).

Cellular biology:

Cell culture (Gastric cell lines: AGS, MKN7, 45, 74, NCI-N87; HeLa; Hek293; Caco-2, HT-29; Huh7, HepG2), Immunofluorescence, Transfection, Flow cytometry, Bacteriology (*Escherichia coli*, *Helicobacter pylori*), Cell cycle analysis (propidium iodide staining, BrDU incorporation), Lentiviral transduction.

Publications:

Belair, C., Baud, J., Chabas, S., Sharma, CM., Hackermüller J., Vogel, J., Staedel, C. and Darfeuille, F. *Helicobacter pylori*-Induced Cell Cycle Arrest in Gastric Epithelial Cells is Mediated by an Embryonic Stem Cell MicroRNA Cluster. *In Revision for Nucleic Acid Research*.

Belair, C., Darfeuille, F. and Staedel, C. (2009) *Helicobacter pylori* and gastric cancer: possible role of microRNAs in this intimate relationship. *Clin Microbiol Infect.* 15(9):806-12.

Communications:

F. Darfeuille, **C. Belair,** J. Baud, S. Chabas, C. M Sharma, J. Hackermüller, J. Vogel, C. Staedel. **MiRNAs, gastric cancer and *Helicobacter pylori*: what else?... Stem cells?** 5th Microsymposium on Small RNAs, IMBA, Vienna, Austria, May 2010.

C. Belair, J. Baud, S. Chabas, C. M Sharma, J. Hackermüller, J. Vogel, C. Staedel and F. Darfeuille. **MiRNAs, gastric cancer and *Helicobacter pylori*: what else?... Stem cells?** Meeting “Around the Stem Cell”, Bordeaux, France, March 2010.

C. Belair, J. Baud, S. Chabas, C. M Sharma, J. Hackermüller, J. Vogel, C. Staedel and F. Darfeuille. **MiRNA regulation by bacterial effector: *Helicobacter pylori* as a study case model.** GBD 2009: “MicroRNA and small non-coding RNA: new actors in pathophysiology”. Nice, France, October 2009.

C. Belair, S. Reigadas, E. Rance, S. Chabas, S. Durrieu, E. Ledan-Schuster, C. Staedel, J.J Toulmé. **Functional screening of RNA aptamers targeted to the HCV IRES.** 8th meeting of French Research Association against AIDS and Hepatitis, Paris, France, January 2008.

S. Reigadas, **C. Belair,** S. Chabas, S. Durrieu, E. Ledan-Schuster, J.J Toulmé. **Identification by functional screening of RNA aptamers directed against the HCV IRES.** SifrARN meeting, Rennes, France, July 2006.

Posters:

E. Dausse, **C. Belair,** C. Staedel, J.J Toulmé. **Regulating mRNA translation with a kiss.** 18th International Roundtable on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids, Kyoto, Japan, September 2008.

C. Belair, S. Chabas, J. Baud, C. Sharma, J. Vogel, S. Hoffmann, P. Stadler, F. Darfeuille, C. Staedel. **MicroRNAs and bacterial infection: microRNA expression in human gastric cells in response to *Helicobacter pylori* infection.** 6th Meeting of Figeac, Figeac, France, September 2008.

C. Belair, S. Reigadas, E. Rance, S. Chabas, S. Durrieu, E. Ledan-Schuster, C. Staedel, J.J Toulmé. **Functional screening of RNA aptamers targeted to the HCV IRES.** 14th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Glasgow, Scotland, September 2007.

C. Belair, S. Reigadas, S. Chabas, S. Durrieu, E. Ledan-Schuster, C. Staedel, J.J Toulmé. **Identification by functional screening of RNA aptamers directed against the HCV IRES.** 19th JACQUES CARTIER meeting, Lyon, France, December 2006.

Miscellaneous:

Referee activity for Cancer Letter and Cellular and Molecular Life Sciences.

References:

Dr Fabien Darfeuille, PhD
INSERM U869
University of Bordeaux
146 Rue Léo Saignat
Bat 3a 1er etg
33076 Bordeaux, FRANCE
fabien.darfeuille@inserm.fr

Dr Cathy Staedel, PhD
INSERM U869
University of Bordeaux
146 Rue Léo Saignat
Bat 3a 1er etg
33076 Bordeaux, FRANCE
cathy.staedel@inserm.fr

Dr Jean-Jacques Toulmé, PhD
INSERM U869
University of Bordeaux
146 Rue Léo Saignat
Bat 3a 1er etg
33076 Bordeaux, FRANCE
jean-jacques.toulme@inserm.fr