

Université Bordeaux Segalen

Année 2011

Thèse n° 1835

THÈSE

Pour le

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ BORDEAUX 2

Mention : Sciences Technologie Santé

Option : Génétique

Présentée et soutenue publiquement

Le 20 décembre 2011

Par Jessica BAUD épouse MASSIERE

Née le 19 septembre 1983 à Saintes (17)

**La transition épithélio-mésenchymateuse dans les cellules
épithéliales gastriques : rôle des microARN régulés par
*Helicobacter pylori***

Membres du Jury

Mr. Martin TEICHMANN , Professeur des Universités (Bordeaux)	Président
Mr. Christophe BURUCOA , Professeur des Universités (Poitiers)	Rapporteur
Mr. Bernard MARI , Directeur de recherche CNRS (Nice)	Rapporteur
Mme. Violaine MOREAU , Chargée de recherche INSERM (Bordeaux)	Invitée
Mr. Fabien DARFEUILLE , Chargé de recherche INSERM (Bordeaux)	Invité
Mme. Cathy STAEDL , Chargé de recherche INSERM (Bordeaux)	Directeur de Thèse

Table des matières

Liste figures et tables.....	9
Introduction.....	15
I. <i>Helicobacter pylori</i>	19
A. Epidémiologie.....	19
B. La pathogenèse gastrique induite par <i>H. pylori</i>	21
C. Biologie de la bactérie	25
D. Les facteurs de virulences d' <i>H. pylori</i>	29
1. CagA et le SST4	29
2. Les adhésines.....	35
3. VacA.....	37
4. L'uréase	39
E. Les mécanismes de la carcinogenèse induite par <i>H. pylori</i>	41
1. L'adénocarcinome gastrique	43
2. Lymphome du MALT	47
F. Les modèles d'étude de l'infection de l'épithélium gastrique par <i>H. pylori</i>	49
1. Les modèles animaux	49
2. Les cellules épithéliales gastriques humaines en culture.....	55
II. La transition épithélio-mésenchymateuse	63
A. Définitions	63
1. L'épithélium et les cellules épithéliales.....	63
2. Le mésenchyme et les cellules mésenchymateuses	63
3. La transition épithélio-mésenchymateuse	65
B. Les marqueurs de la TEM	67
C. La transition épithélio-mésenchymateuse physiologique	69
1. Au cours du développement embryonnaire	69
2. Chez l'adulte	71
D. La transition épithélio-mésenchymateuse pathologique	73
1. La fibrose	73
2. La progression tumorale et les métastases.....	73
E. Les voies de régulation de la transition épithélio-mésenchymateuse.....	75
1. Les inducteurs de la TEM.....	75
2. Régulation des inducteurs de la TEM.....	79

III. Les microARN	89
A. Découverte des microARN	89
B. Biogénèse des microARN	91
1. La transcription des miARN	91
2. La maturation du pri-miARN	93
3. L'export cytoplasmique et la maturation du pré-miARN	93
4. Incorporation du miARN mature dans le complexe RISC.....	95
C. Principe de l'interaction miARN-ARNm.....	95
D. Mode d'action des miARN.....	99
1. Inhibition de la traduction par les miARN	99
2. Dégradation des ARNm cibles	103
3. Activation de la traduction	105
E. Implication des miARN dans des événements biologiques.....	107
1. miARN et infection virale	107
2. miARN et immunité	109
3. miARN et cancer	109
4. miARN, cancer gastrique et <i>H. pylori</i>	113
F. Régulation de la voie de biosynthèse des miARN	115
1. La dégradation des miARN	115
2. La localisation des miARN	117
3. La maturation des miARN.....	117
4. La transcription des pri-miARN	121
G. La boucle de régulation miR-200/ZEB1-2 dans la Transition épithélio-mésenchymateuse..	123
1. La famille des miR-200	123
2. La régulation de l'expression des miR-200.....	123
Objectif du travail.....	127
Résultats.....	131
I. Caractérisation de l'infection de cellules épithéliales gastriques humaines par <i>Helicobacter pylori</i>	135
A. Obtention de mutants isogéniques de la souche 26695 d' <i>H. pylori</i>	135
B. Les modifications morphologiques induites par <i>H. pylori</i> dans des lignées de cellules épithéliales gastriques en culture, sous la dépendance de CagA.	137
1. La lignée AGS	137
2. Les cellules MKN-74.....	137

3. La lignée NCI-N87	139
C. Activation de la voie de signalisation NF- κ B par <i>H. pylori</i> dans les cellules hôtes.....	139
D. Discussion et conclusion.....	141
II. Le miRNome des cellules AGS en conditions basales et en réponse à l'infection.....	143
A. <i>H. pylori</i> interfère avec le <i>cluster miR-371-372-373</i> caractéristique de cellules souches embryonnaires pour bloquer la progression dans le cycle cellulaire [310]	145
B. Rôle des miR-200 dans les cellules épithéliales gastriques en condition basale et en réponse à l'infection.....	147
1. Rôle de gardien du phénotype épithélial	147
2. Augmentation de l'expression des miR-200 par <i>H. pylori</i>	151
C. Discussion et conclusion.....	153
1. Rôle des miR-372-373 dans la progression du cycle cellulaire.....	153
2. Rôle des miR-200b et -200c dans le maintien du phénotype épithélial	155
III. Induction d'une transition épithélio-mésenchymateuse par <i>H. pylori</i> dans les cellules épithéliales gastriques : rôle des miR-200 et de NF- κ B.....	163
A. Induction des gènes de la TEM par <i>H. pylori</i>	163
1. ZEB1	163
2. Autres marqueurs de la TEM.....	165
B. Analyse du promoteur de miR-200b.....	167
1. L'activité du promoteur de miR-200b est inversement corrélée à l'expression de ZEB1	167
2. L'activité du promoteur de miR-200b est stimulé par NF- κ B au cours de l'infection par <i>H. pylori</i>	169
C. Rôle de NF- κ B dans l'induction de la TEM par <i>H. pylori</i>	173
D. La régulation post-transcriptionnelle de ZEB1 par les miR-200 est efficace dans les cellules infectées	175
E. Discussion et conclusion.....	177
IV. Implication de la voie du TGF β dans la TEM induite par <i>H. pylori</i> : une connexion possible entre la régulation du <i>cluster miR-371-372-373</i> et la TEM lors de l'infection.....	185
A. Le TGF β R2 est bien une cible de miR-372/373 dans les cellules AGS.....	185
B. La diminution des miR-372/373 au cours de l'infection lève l'inhibition post-transcriptionnelle de TGF β R2 dans les cellules AGS	187
C. TGF β ₁ induit une TEM dans les cellules AGS à condition d'inhiber miR-372/373.....	189
D. Discussion et conclusion.....	191
Conclusion générale et perspectives.....	195

Matériels et méthodes.....	203
I. Culture in vitro des cellules épithéliales gastriques	205
II. Culture des souches bactériennes	205
A. <i>Helicobacter pylori</i>	205
B. <i>Escherichia coli</i>	209
III. Co-culture des cellules épithéliales gastriques avec <i>H. pylori</i>	211
IV. Transfection des cellules épithéliales	213
V. Clonages	213
A. Extraction d'ADN génomique	213
B. Psi-ZEB1	213
C. Promoteur du <i>cluster miR-200b-200a-429</i>	215
D. Mutagenèse dirigée.....	217
VI. Analyse des ARN	219
A. Extraction des ARN totaux de cellules en culture	219
B. <i>Northern blot</i>	219
C. RT-PCR quantitative.....	221
1. Dosage des miARN par sonde Taqman	221
2. Dosage des ARNm	223
VII. Analyse des protéines	225
A. ELISA	225
B. Extraction et dosages de protéines	225
C. <i>Western blot</i>	227
D. Mesure de l'activité luciférase	227
E. Marquage des cellules par immunofluorescence	229
Annexes.....	233
Bibliographie.....	241

Liste des figures et tables

Figure 1 : Fréquences phylogéniques, exprimées en pourcentage, de clones bactériens isolés à partir de tissus gastriques dont la présence d' <i>H. pylori</i> a été détectée (Hp +) ou non (Hp -).....	18
Figure 2 : La prévalence de l'infection par <i>H. pylori</i> dans le monde.....	18
Figure 3 : Pathogenèse de l'infection par <i>H. pylori</i>	20
Figure 4 : Pathologies gastrointestinales induites par l'infection par <i>H. pylori</i>	22
Figure 5 : Représentation schématique de la structure gastrique.....	26
Figure 6 : Représentation schématique de la protéine CagA.....	30
Figure 7 : Composition génomique du <i>cagPAI</i> et modèle du système de sécrétion de type IV.....	32
Figure 8 : Les voies de signalisation induites par <i>Helicobacter pylori</i> dans les CEG.....	34
Figure 9 : Structure de VacA et fonction.....	36
Figure 10 : Représentation schématique d'un épithélium et des jonctions cellulaires existantes.....	62
Figure 11 : Représentation schématique du changement morphologique des cellules subissant une transition épithélio-mésenchymateuse (TEM).....	64
Figure 12 : La TEM est impliquée dans plusieurs processus cellulaires dès l'embryogenèse, mais aussi lors de processus de réparation physiologiques et pathologiques.....	64
Figure 13 : Classification de la transition épithélio-mésenchymateuse en trois types.....	66
Figure 14 : Exemples de transition épithélio-mésenchymateuse physiologique et pathologique.....	72
Figure 15 : Ensemble des voies de signalisation intracellulaires inductrices de la TEM.....	80
Figure 16 : Schéma de la voie du TGF β	82
Figure 17 : Régulation de l'expression de ZEB2 dans les cellules épithéliales et mésenchymateuses par un ARN non codant naturellement exprimé.....	84
Figure 18 : Voie de biosynthèse des microARN.....	90
Figure 19 : Mécanisme d'action des enzymes Drosha et Dicer.....	92
Figure 20 : Les voies alternatives de biogénèse des mirtrons.....	94
Figure 21 : Structure et fonction de la protéine Argonaute de <i>Pyrococcus furiosus</i>	96
Figure 22 : Principes de l'interaction miARN/ARNm.....	96
Figure 23 : Compétition entre eIF4 et AGO2.....	98
Figure 24 : Structures et conservation des protéines de la famille GW182.....	100
Figure 25 : Adressage des ARNm dans les <i>Processing Bodies</i> par le complexe miRISC.....	102
Figure 26 : Mécanisme de répression post-traductionnelle dirigé par les miARN.....	102
Figure 27 : Régulation de la maturation du pré-let-7 par LIN-28 chez <i>C. elegans</i> et les cellules de mammifères.....	118
Figure 28 : Description de la famille des miR-200.....	122
Figure 29 : Double boucle négative de régulation entre les miR-200 et ZEB1/2.....	124
Figure 30 : Construction des cassettes de résistance par PCR 3 temps et vérification de l'intégrité des mutants d' <i>H. pylori</i> 26695.....	134
Figure 31 : Infection des différentes lignées gastriques par <i>H. pylori</i> 26695 sauvage et mutées, Hp Δ CagA, Hp Δ CagE.....	138
Figure 32 : Caractérisation de l'infection des NCI-N87 par la souche sauvage 26695 d' <i>H. pylori</i>	140

Figure 33 : Activation de NF- κ B dans les cellules AGS (A) et sécrétion de l'interleukine 8 dans le milieu de culture (B) par les cellules infectées ou non par <i>H. pylori</i> 26695 ou les mutants isogéniques Δ cagA ou Δ cagE.....	142
Figure 34 : Représentation du contenu en microARN des cellules AGS co-cultivées ou non avec <i>H. pylori</i> , déterminé par pyroséquençage à haut débit (technologie Roche 454).....	144
Figure 35 : Expression de l'E-cadhérine, ZEB1, ZEB2 et les miR-200b et -200c dans différentes lignées cellulaires.....	146
Figure 36 : Effets de la suppression de fonction des miR-200b/c dans les cellules AGS.....	148
Figure 37 : Surexpression des miR-200b et miR-200c dans les cellules AGS infectées par la souche 26695 sauvage d' <i>H. pylori</i>	150
Figure 38 : Augmentation des miR-200b et miR-200c dans les cellules MKN-74 (A) et NCI-N87 (B) infectées par la souche 26695 sauvage d' <i>H. pylori</i>	152
Figure 39 : Induction de l'expression de ZEB1 dans les cellules épithéliales gastriques co-cultivées avec <i>H. pylori</i> 26695 WT.....	162
Figure 40 : ZEB1 est nécessaire au changement morphologique des cellules AGS provoqué par l'infection par <i>H. pylori</i> 26695 sauvage (WT).....	164
Figure 41 : Régulation des marqueurs épithéliaux et mésenchymateux au cours de l'infection dans les CEG, AGS, MKN74 et NCI-N87.....	166
Figure 42 : Organisation schématique du promoteur du <i>cluster miR-200b-200a-429</i> et sa régulation positive lors de l'infection.....	168
Figure 43 : Expression de p65 (RelA), composant de NF- κ B, dans les cellules AGS +/- <i>H. pylori</i> , traitées par le siNF- κ B ou un siARN contrôle.....	170
Figure 44 : Analyse de l'effet de l'inactivation de NF- κ B sur la stimulation du promoteur du <i>cluster miR-200b-200a-429</i> lors de l'infection des cellules AGS et MKN74.....	172
Figure 45 : Rôle de NF- κ B dans la TEM induite par <i>H. pylori</i> dans les AGS et les MKN74.....	174
Figure 46 : La surexpression des miR-200 est inefficace pour contrôler l'induction de la TEM dans les cellules AGS infectées.....	176
Figure 47 : Les miR-372/373 régulent TGF β R2 dans les AGS au cours de l'infection.....	186
Figure 48 : Induction d'une TEM dans les AGS après traitement par antimR-372/373 et TGF β 1.....	188
Figure 49 : Schéma général de la régulation de la TEM lors de l'infection des CEG par <i>H. pylori</i>	198
 Table 1 : Historique de la découverte d' <i>Helicobacter pylori</i> dans les pathologies gastriques.....	 24
Table 2 : Liste des différentes espèces bactériennes du genre <i>Helicobacter</i> dans le monde animal, leur biotope et les pathologies associées, outre <i>Helicobacter pylori</i>	28
Table 3 : Caractéristiques des cellules épithéliales gastriques humaines utilisées pour la compréhension de l'infection par <i>H. pylori</i>	56
Table 4 : Liste des différents marqueurs de la Transition Épithélio-Mésenchymateuse.....	68
Table 5 : Expression des facteurs de transcription Snail, ZEB et TWIST dans les tumeurs humaines.....	76
Table 6 : Les miARN les plus décrits comme étant associés au cancer.....	108
Table 7 : Caractérisation fonctionnelle des miARN dérégulés dans le cancer gastrique.....	112
Table 8 : Liste des miARN dont l'expression est significativement modifiée entre des sujets infectés et non infectés par <i>H. pylori</i> (RT-qPCR).....	114

Table 9 : Régulateurs post-transcriptionnels de la biogénèse des miARN chez les animaux.....	118
Table 10 : Liste des cibles des miR-200 validées expérimentalement.....	124
Table 11 : Expression de ZEB1/2 et des miR-200 dans mes cancers humains.....	126
Table 12 : Caractéristiques des différentes lignées cellulaires utilisées dans l'étude de l'infection par <i>H. pylori</i>	136
Table 13 : Liste des Amorces et sondes utilisées pour les expériences de RT-qPCR, de Northern blot, de clonage et d'obtention des mutants d' <i>H. pylori</i>	230-231

INTRODUCTION

Avant-propos

L'épithélium gastro-intestinal assume un rôle central d'homéostasie en tant que barrière perméable et sélective pour des ions et des petites molécules, mais infranchissable pour les antigènes et les microbes qui circulent dans le lumen du tractus digestif.

Parmi les multiples espèces de bactéries qui colonisent le tractus digestif, *Helicobacter pylori* est une bactérie pathogène particulièrement bien adaptée à l'Homme, puisqu'elle infecte l'estomac de la moitié de la population mondiale. Généralement asymptomatique, la gastrite qu'elle provoque peut évoluer en gastrite chronique, en ulcère peptique, et en cancer gastrique.

Le défi majeur dans l'étude des maladies infectieuses humaines est de comprendre en détail les bases moléculaires chez le pathogène et chez l'hôte qui contribuent au développement de la pathologie. Les différents mécanismes conduisant à la formation d'ulcères et de cancers gastriques associés à l'infection chronique par *H. pylori* ne sont pas totalement élucidés. *H. pylori* interfère avec de multiples cascades de signalisation de la cellule hôte, aboutissant à l'activation de facteurs de transcription qui régulent l'expression des gènes au niveau transcriptionnel.

Parallèlement à l'activation des cascades de signalisation, les microARN, petits ARN non codants, sont apparus récemment comme des acteurs majeurs de la régulation de l'expression des gènes en agissant à un niveau post-transcriptionnel.

L'objectif de ce travail de thèse est d'analyser comment les microARN des cellules épithéliales gastriques sont affectés par *H. pylori* et de déterminer le rôle de ces modifications dans la modulation de l'expression des gènes en réponse à l'infection. Pour répondre à ces objectifs, nous avons utilisé des systèmes modèles d'infection de cellules épithéliales gastriques humaines en culture cellulaire.

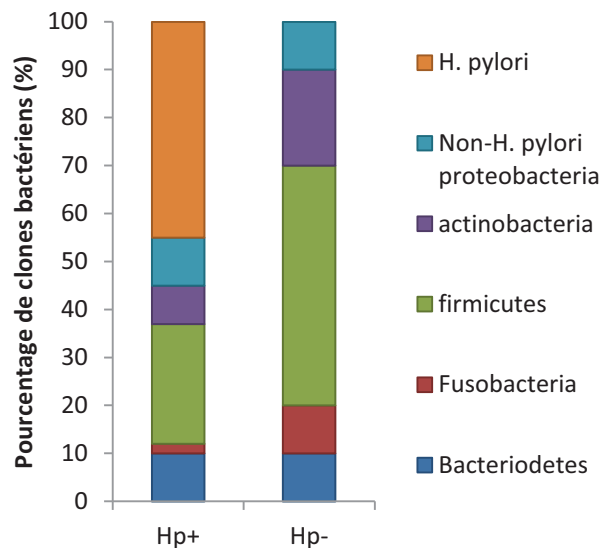


Figure 1: Fréquences phylogéniques, exprimées en pourcentage, de clones bactériens isolés à partir de tissus gastriques dont la présence d'*H. pylori* a été détectée (Hp +) ou non (Hp -). La présence d'*H. pylori* remodèle considérablement la population bactérienne stomacale. (adaptée de [1])

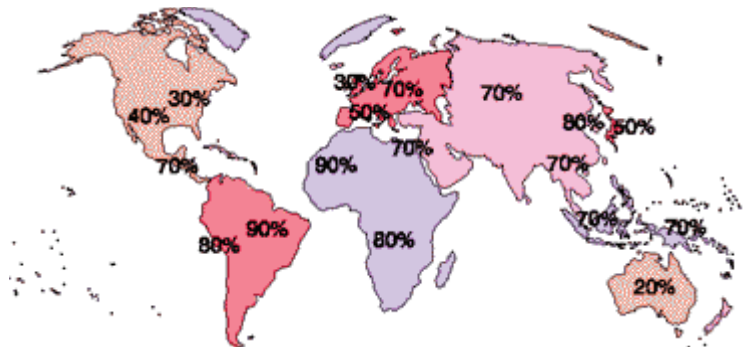


Figure 2 : La prévalence de l'infection par *H. pylori* dans le monde, 2011. L'infection corrèle avec les statuts socio-économiques plutôt que selon l'origine ethnique. L'infection à *H. pylori* est l'une des infections chroniques les plus répandues dans le monde : de 20 à 90 % des individus adultes sont infectés selon les pays, l'infection étant plus fréquente dans les pays en développement que dans ceux industrialisés. Les pourcentages indiquent la prévalence d'*H. pylori* dans la partie du monde considérée. Il faut noter que celle-ci diminue dans les pays développés (Source : www.helicobacter.com).

I. *Helicobacter pylori*

Les pathologies gastriques ont pendant longtemps été attribuées au stress, au régime alimentaire, et ce n'est qu'à la fin du XIX^{ème} siècle, avec l'avènement de la microbiologie moderne, que certains médecins suspectèrent une cause infectieuse, abolissant le dogme de la stérilité de l'estomac due à son extrême acidité [2]. Il a fallu ensuite près d'un siècle d'observations éparées de la présence de bactéries dans l'estomac, alternées avec des épisodes de scepticisme (Table 1), pour que la cause infectieuse des pathologies gastriques soit acceptée. Ceci grâce au développement de la fibroscopie gastrique permettant des biopsies gastriques de meilleure qualité et finalement au succès de la culture des bacilles isolés de l'estomac de patients par B. Marshall et R. Warren en 1984 [3]. Ces bacilles Gram négative, flagellée et microaérophile, furent classés dans le genre *Campylobacter* sous le nom *Campylobacter pyloridis* ou « *Campylobacter pylorique* ». Ils furent par la suite reclassés parmi les epsilon-protéobactéries dans un nouveau genre, *Helicobacter*, sous le nom *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) [4]. Ils ont pu alors guérir les ulcères gastroduodénaux en éradiquant cette bactérie de l'estomac des patients [5].

Ainsi, les travaux de Marshall et Warren permirent une avancée majeure dans le traitement des pathologies gastroduodénales et furent récompensés par le Prix Nobel de Médecine en 2005. Les recherches de ces vingt dernières années ont clairement établi un lien causal entre la présence d'*Helicobacter pylori* et de nombreuses pathologies gastriques telles que la gastrite chronique, les ulcères peptiques, le lymphome du MALT (*Mucosa-Associated Lymphoid Tissue*) et le carcinome gastrique. L'estomac n'est plus considéré comme une zone stérile et héberge un microbiome important, dont la diversité est largement bouleversée par l'infection par *H. pylori*, au profit de cette dernière (Figure 1) [1].

A. Epidémiologie

Plus de la moitié de la population mondiale est infectée par *H. pylori*, spécifiquement au niveau de la muqueuse gastrique, seul réservoir identifié de cette bactérie. D'autres espèces de mammifères portent d'autres espèces du genre *Helicobacter* (Table 2). La colonisation de l'estomac humain par *H. pylori* serait très ancienne, et les ancêtres d'*Homo sapiens* auraient porté l'ancêtre d'*H. pylori*, qui aurait évolué avec lui [6].

Il existe une très grande disparité dans la prévalence de la bactérie dans le monde : de 70-90% en Amérique Centrale, Amérique du Sud, Afrique, Chine et Inde, 50% en Europe Méridionale et Japon, 20-30% en Europe du Nord, Amérique du Nord et

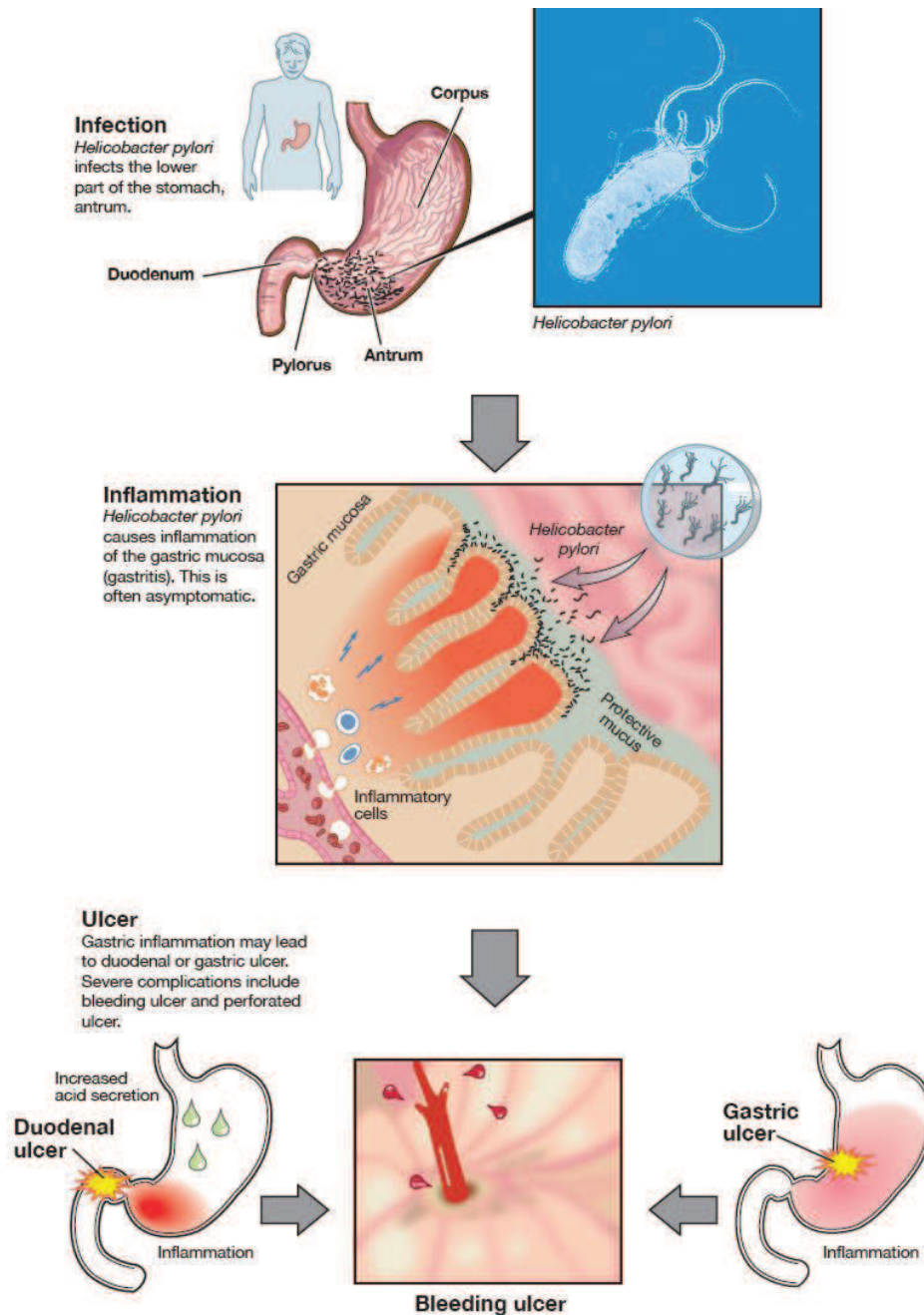


Figure 3 : Pathogenèse de l'infection par *H. pylori*. L'infection par *H. pylori* a lieu en général pendant l'enfance. Elle s'accompagne systématiquement d'une inflammation de la muqueuse gastrique, qui est asymptomatique dans la majorité des cas et va devenir chronique. Cette infection dure toute la 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.

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

Australie. L'infection s'acquiert en général au cours de la petite enfance par transmission intrafamiliale, et persiste tout au long de la vie en absence de traitement. Même dans les pays développés où la prévalence est inférieure à 30%, le taux d'infection atteint 50% chez les personnes de plus de 60 ans. La prévalence reste élevée et constante dans les pays en voie de développement, mais diminue progressivement dans les pays industrialisés avec l'amélioration des conditions d'hygiène et l'emploi massif d'antibiotiques chez les enfants (Figure 2) [7].

B. La pathogenèse gastrique induite par *H. pylori*

L'infection par *H. pylori* conduit systématiquement à un état inflammatoire de la muqueuse gastrique, ou gastrite, généralement asymptomatique. En absence de traitement, cette gastrite devient chronique. L'évolution morbide de la gastrite dépend étroitement du degré d'inflammation de la muqueuse induite par la pérennité de l'infection (Figure 3).

10-20 % des sujets infectés développent des maladies gastriques sévères, notamment des ulcères peptiques, révélés par la douleur qu'ils suscitent. L'ulcère le plus fréquent est de type « duodénal », avec hyperchlorhydrie et inflammation de l'antrum de l'estomac. L'ulcère est de type « gastrique » avec hypochlorhydrie et atrophie gastrique lorsque l'inflammation se situe de manière prédominante dans le corpus. *H. pylori* est retrouvé dans 90% et 70% des ulcères duodénaux et gastriques, respectivement. L'ulcère guérit après éradication de la bactérie par des antibiotiques (clarithromycine et amoxicilline) combinés à des supprimeurs d'acidités, comme les inhibiteurs de pompe à protons qui bloquent la H^+/K^+ -ATPase des cellules pariétales. Cependant l'usage massif des antibiotiques a fait émerger des souches bactériennes résistantes.

Selon la région géographique, 1-3% des patients infectés développent, après plusieurs décennies d'évolution, des adénocarcinomes gastriques. Ce type de cancer dérive du tissu épithélial gastrique. Malgré la diminution actuelle de son incidence dans les pays occidentaux, le cancer gastrique reste le quatrième cancer le plus fréquent et la seconde cause de décès par cancer dans le monde (740 000 décès/an ; 25% de taux de survie à 5 ans). *H. pylori* est retrouvé dans 75% de ces cancers, et constitue le facteur de risque majeur associé au cancer gastrique [8]. Les stades précoces de la maladie sont généralement silencieux du point de vue clinique, les patients étant diagnostiqués à un stade avancé de leur maladie. *H. pylori* influence vraisemblablement des stades extrêmement précoces de la carcinogénèse gastrique, comme le suggère la démonstration que l'éradication de l'infection ne diminue significativement l'incidence de cancer que chez les patients qui ne présentent pas encore de lésions préneoplasiques cliniques au moment du diagnostic [9].

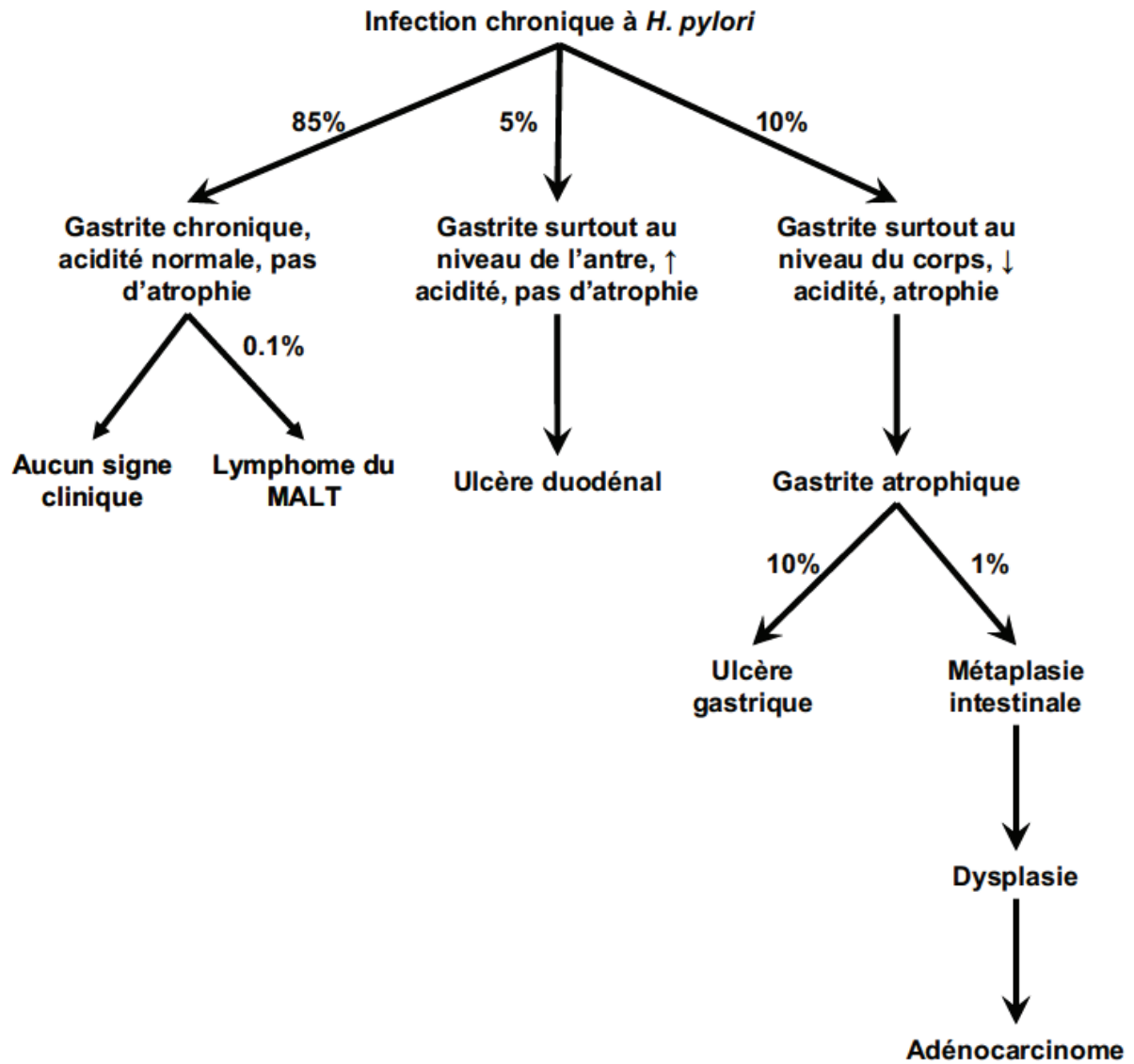


Figure 4: Pathologies gastrointestinales induites par l'infection par *H. pylori*. L'infection par *H. pylori* n'entraîne des signes cliniques que pour une partie minoritaire de la population infectée. Pour 0.1% des patients, la gastrite chronique évolue vers le lymphome du MALT. Pour 10 à 20% des patients, l'infection chronique est responsable d'une gastrite au niveau de l'antrum de l'estomac, qui évolue vers un ulcère gastrique ou duodénal. Pour 10% des patients, l'infection chronique est responsable d'une gastrite au niveau du corps qui évolue vers un ulcère gastrique et/ou un adénocarcinome. D'après [10].

Uniquement, 0,1% des patients infectés développent un lymphome du MALT (*Mucosa Associated Lymphoid Tissue*) et *H. pylori* y est retrouvé dans 90% des cas. Les lymphomes gastriques du MALT de bas grade peuvent être guéris par antibiothérapie (Figure 4).

La sévérité des pathologies associées à l'infection par *H. pylori* dépend en partie de l'hôte :

a) de son mode de vie et de déterminants environnementaux.

Le tabac et une alimentation trop riche en sel et pauvre en légumes et fruits frais (qui apportent des molécules anti-oxydantes) favorisent le développement de lésions précancéreuses de la muqueuse gastrique [11].

b) de la réponse inflammatoire.

Le processus à la base des dommages induits par la bactérie est la gastrite, avec son cortège de mécanismes immunitaires humoraux et cellulaires. L'inflammation accompagnée d'hypochlorhydrie et d'atrophie gastrique qui se développe dans le corpus (1% des patients infectés) est plus à même d'évoluer en carcinome que celle qui se développe dans l'antrum (15% des cas).

Il est généralement accepté que l'infection par *H. pylori* induit une réponse inflammatoire de type T *helper* Th1 dominante, avec une production accrue des cytokines proinflammatoires IL(*Interleukine*)-1 β et TNF(*Tumor Necrosis Factor*)- α et du puissant chemoattractant IL-8, mais non d'IL-4 ou d'IL-10 régulateurs de l'inflammation [12]. Un autre sous-groupe de lymphocytes T effecteurs, distincts des Th1 ou des Th2 et producteurs d'IL-17, interviendrait de manière antérieure et en synergie avec la réponse Th1 pour favoriser la colonisation de la muqueuse gastrique par *H. pylori* et augmenter le recrutement de cellules inflammatoires. Cette hypothèse est étayée par la réduction de la charge bactérienne et de l'inflammation après inhibition de l'activité d'IL-17 *in vivo* ou en utilisant des souris KO (*Knock Out*) pour IL-17 [13]. Une proportion plus importante de cellules Th17 dans le sang périphérique et dans les ganglions lymphatiques drainant la tumeur a été rapportée chez des patients atteints de carcinome gastrique et corrélée au stade clinique du cancer [14].

Une réponse concomitante Th2, comme celle provoquée par une infection par des vers parasites intestinaux, pourrait atténuer la réponse Th17/Th1 associée à l'infection par *H. pylori*, limitant ainsi les conséquences pathologiques de sa colonisation gastrique. Ceci pourrait expliquer le paradoxe du continent africain, où, malgré une prévalence d'*H. pylori* de plus de 80%, la prévalence du cancer gastrique est extrêmement faible (<2% des tumeurs malignes) [15].

Dates	Observations en faveur d'une cause infectieuse	Réfutations de la théorie infectieuse
1875	G. Bottcher et M. Letulle observent des bactéries dans l'estomac de patients atteints d'ulcères	Ces bactéries n'ont pas pu être isolées et cultivées
1892	G. Bizzozero décrit des bactéries spiralées Gram- dans l'estomac de chien	
1899	Observations similaires par Pel chez des patients atteints d'ulcères et de cancers gastriques	
1906	Idem par Krienitz. Les patients atteints d'ulcères sont traités au bismuth, un agent anti-bactérien	Observations de ces bactéries chez des personnes ne présentant aucun signe clinique
1975	Steer et Colin-Jones observent des bactéries spiralées Gram- chez des patients atteints d'ulcères gastriques	Décrites comme des <i>Pseudomonas</i> , considérées comme des contaminants alimentaires
1984	Marshall et Warren ont identifié les bactéries spiralées isolées de l'estomac de patients et ont réussi à les cultiver : classées initialement comme <i>Campylobacter</i>	
1989	Reclassées comme epsilon-bactéries d'un nouveau genre : <i>Helicobacter</i>	La communauté scientifique reste encore sceptique
	Marshall, puis Morris, ont ingéré une suspension de ces nouvelles bactéries, développé une gastrite et un ulcère, et ont été guéris par antibiothérapie	
	Les ulcères gastriques pouvaient être guéris chez d'autres patients par antibiothérapie	

Table 1 : Historique de la découverte d'*Helicobacter pylori* dans les pathologies gastriques, d'après [2].

c) de son polymorphisme génétique.

Ces polymorphismes affectent principalement l'expression de gènes de cytokines, qui vont moduler la réponse inflammatoire. La conjonction de certains polymorphismes pro-inflammatoires augmente le risque de cancer gastrique lors de l'infection. Ainsi, des polymorphismes dans le *cluster* de gènes codant pour l'IL-1 β , pro-inflammatoire et inhibiteur de la sécrétion d'acide, et pour le gène du récepteur antagoniste (IL-1ra), combinés à des polymorphismes des gènes du TNF- α , pro-inflammatoire, et de l'IL-10, anti-inflammatoire, conduisant à une forte production d'IL-1 β et à une hypochlorhydrie, confèrent à des patients infectés par *H. pylori* un risque vingt-sept fois plus important de développer un cancer gastrique [16-18]. C'est également le cas pour un polymorphisme dans le promoteur du gène de l'IL-8, puissant attractant de neutrophiles et de lymphocytes et régulateur de prolifération, sénescence, migration cellulaire [19].

Un certain polymorphisme dans l'exon 4 du gène du *Toll-like Receptor* (TLR)-4, qui détecte le lipopolysaccharide bactérien et en transduit le signal vers les effecteurs intracellulaires NF- κ B ou MAPK, peut provoquer une réponse inflammatoire exagérée, avec atrophie gastrique et hypochlorhydrie sévère, et augment de 2,5 fois le risque de cancer gastrique [20].

Ainsi, des sujets génétiquement prédisposés à produire une réponse inflammatoire amplifiée à l'infection créent un environnement gastrique chroniquement inflammatoire et hypochlorhydrique, favorable à *H. pylori*, mais sans doute aussi à d'autres microbes, favorisant ensemble la production de composés nitrosaminés et de radicaux libres générateurs de stress oxydatif/génotoxique.

Bien qu'*H. pylori* suscite des réponses immunes innées et acquises chez l'hôte, ce dernier reste incapable d'éliminer la bactérie de la muqueuse gastrique, et en devient un porteur chronique. Mais l'évolution pathologique de l'infection chronique par *H. pylori* dépend aussi d'effecteurs bactériens qui leurent le système immunitaire et modulent l'intensité de la réponse inflammatoire.

C. Biologie de la bactérie

Helicobacter pylori appartient à la classe des *Epsilonproteobacteria*, une ancienne classe de bactéries qui dominent les environnements extrêmes comme les sources hydrothermales abyssales et les grottes soufrées (Figure 3) [21].

La niche écologique d'*H. pylori*, l'estomac humain, constitue également un environnement très hostile pour les microbes en général. Il se caractérise par son acidité extrême, par sa viscosité due à la production de mucus, par les variations rapides et

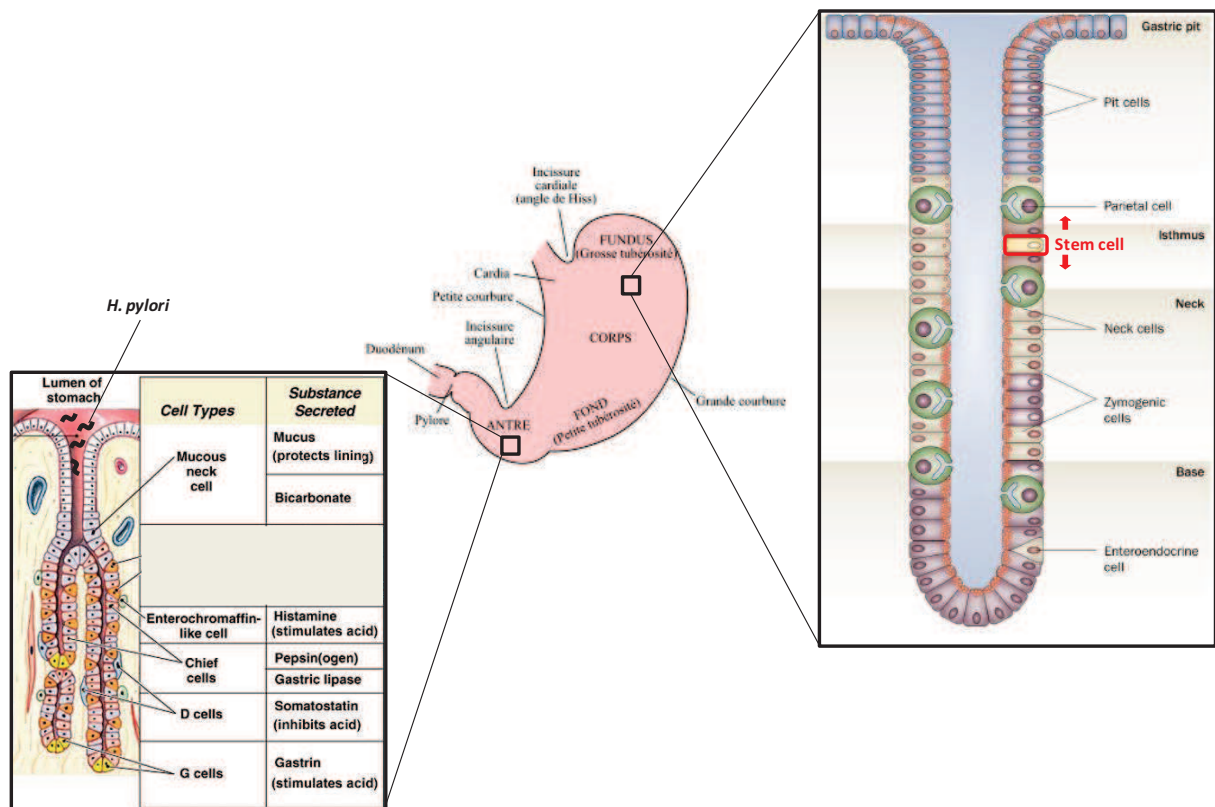


Figure 5: Représentation schématique de la structure gastrique. L'estomac est divisé en quatre régions : le cardia, fundus, le corps et l'antrum. L'épithélium gastrique est protégé par une couche de mucus sécrété par des cellules spécialisées. Les cryptes gastriques sont composées de plusieurs types cellulaires comme les cellules à mucus et les cellules entéro-endocrines. La composition cellulaire des cryptes gastriques varie dans les différentes régions de l'estomac. La colonisation par *H. pylori* est confinée à l'antrum. Les cellules D et G correspondent à des cellules entéro-endocrines qui sécrètent des hormones, somatostatine et gastrine, respectivement. La gastrine stimule la sécrétion d'acide tandis que la somatostatine inhibe cette sécrétion et est induite par l'IL-8 et le TNF- α . Les cellules souches, progénitrices des cellules différenciées de l'épithélium gastrique, se situent au niveau de l'isthme et permettent un turn-over rapide des cellules épithéliales de manière bidirectionnelle (flèches rouges). Adaptée de <http://bio150notes.blogspot.com/> [22].

fréquentes des qualités et quantités de nutriments et de sels. L'estomac se caractérise également par la présence d'une variété d'autres micro-organismes apportés par l'alimentation et par la réponse de l'hôte qui développe une inflammation chronique et y établit une batterie de mécanismes de défense immunitaire. De plus, l'épithélium gastro-intestinal est en renouvellement constant et rapide à partir de la multiplication de cellules épithéliales progénitrices. Ce processus évoquant un tapis roulant constitue un moyen de protection de l'hôte contre les pathogènes ingérés, en ne leur laissant pas le temps de coloniser la muqueuse gastro-intestinale et en éliminant rapidement les cellules endommagées. De plus, les cellules pariétales productrices d'acide dans les glandes gastriques préservent la niche de cellules souches de l'infection par *H. pylori* (Figure 5) [23].

Malgré cela, *H. pylori* parvient à coloniser la muqueuse gastrique et persister toute la vie de l'hôte dans cette niche, où elle reste essentiellement extracellulaire et non-invasive. Cependant, des bactéries virulentes invasives ont malgré tout pu être identifiées par diverses techniques microscopiques dans des lignées de cellules épithéliales [24] et dans un modèle de souris transgénique [23]. Dans ce modèle murin particulier, le nombre de cellules progénitrices a été amplifié artificiellement (suite à la destruction des cellules pariétales par l'expression constitutive d'une toxine diphtérique atténuée). C'est précisément dans quelques-unes de ces cellules que *H. pylori* a été retrouvé avec sa morphologie caractéristique, localisé dans le compartiment cytoplasmique et endosomal. La signification de cette invasion de *H. pylori* de cellules progénitrices n'est pas claire.

La colonisation et la gastrite ne sont pas distribuées de manière uniforme dans toute la muqueuse de l'estomac, mais sont limitées à l'antrum et au cardia. Cette distribution non homogène a été attribuée à la production locale d'acide (Figure 5).

Plusieurs propriétés d'*H. pylori* contribuent à son adaptation spéciale à cette niche :

a) la production d'une uréase puissante, qui convertit l'urée excrétée comme déchet métabolique en ammoniac, ce qui contribue à neutraliser l'acidification de la bactérie dû au pH acide de l'estomac ;

b) une forme spiralée, des flagelles et des régulateurs chimiotactiques [25], lui permettant de se mouvoir dans le mucus épais sécrété par la muqueuse gastrique, et en particulier, de s'y enfoncer pour s'éloigner du lumen gastrique acide et se rapprocher de la surface épithéliale plus neutre ;

Quelques <i>Helicobacter</i> ayant un tropisme préférentiel pour l'estomac		
Espèces	Hôtes	Pouvoir pathogène
" <i>Candidatus Helicobacter suis</i> "	Porcs, hommes, primates non-hominiens	Gastrites chez le porc
<i>Helicobacter bizzozeronii</i> , <i>Helicobacter salomonis</i>	Chiens	Gastrites
<i>Helicobacter cynogastricus</i>	Chiens	Pouvoir pathogène inconnu
<i>Helicobacter felis</i>	Chats, chiens, guépards	Gastrites chez les carnivores
<i>Helicobacter mustelae</i>	Furets (<i>Mustela putorius furo</i>)	Gastrites chez le furet
Quelques <i>Helicobacter</i> ayant un tropisme préférentiel pour l'intestin et/ou le foie		
Espèces	Hôtes	Pouvoir pathogène
<i>Helicobacter bilis</i>	Souris, rats, hamsters, gerbilles, chiens, chats, ovins, porcs, hommes	Diarrhées sévères chez les souris co-infectées par <i>Helicobacter rodentium</i> . Pouvoir pathogène incertain pour les autres espèces
<i>Helicobacter canadensis</i>	Hommes, oies (<i>Branta canadensis</i> , <i>Branta leucopsis</i>)	Diarrhées chez l'homme.
<i>Helicobacter canis</i>	Chiens, chats, hommes	Gastro-entérite chez l'homme
<i>Helicobacter cholecystus</i>	Hamsters (<i>Mesocricetus auratus</i>)	Pancréatite centrolobulaire et cholangiofibrose.
<i>Helicobacter cinaedi</i>	Hommes, hamsters (<i>Mesocricetus auratus</i>), chiens, chats, renards, rhésus (<i>Macaca mulatta</i>), rats	Infections chez l'homme.
<i>Helicobacter fennelliae</i>	Hommes, primates non-hominiens (?), chiens (?)	Infections chez l'homme.
<i>Helicobacter ganmani</i> , <i>Helicobacter hepaticus</i> , <i>Helicobacter mastomyrinus</i> , <i>Helicobacter muridarum</i> , <i>Helicobacter rodentium</i> , <i>Helicobacter typhlonius</i>	Souris, rats	Infections chez les animaux de laboratoire. <i>Helicobacter hepaticus</i> est responsable d'hépatite chronique active chez la souris et cette espèce est impliquée dans la survenue de cancers hépatiques.
<i>Helicobacter pullorum</i>	Volailles, hommes	Hépatites vibronniennes des poules pondeuses. Entérites chez l'homme.
<i>Helicobacter troglodytes</i>	Rats, porcs, ovins	Avortements et placentites chez les ovins.

Table 2 : Liste des différentes espèces bactériennes du genre *Helicobacter* dans le monde animal, leur biotope et les pathologies associées, outre *Helicobacter pylori*.
(source : www.bacteriologie.net/medicale/helicobacter.html, Pr. J-P. Euzéby)

c) plusieurs adhésines spécifiques des glycanes de la surface épithéliale, permettant à la bactérie d'adhérer à la surface des cellules épithéliales et d'interagir intimement avec elles.

De plus, *H. pylori* se nourrit probablement des exsudats de la muqueuse gastrique endommagée par la réponse inflammatoire qu'elle provoque. Elle utilise plusieurs stratégies pour ménager la réponse inflammatoire de l'hôte et échapper ainsi à son action bactéricide, tout en la stimulant suffisamment pour se procurer les nutriments nécessaires à sa croissance [26].

D. Les facteurs de virulences d'*H. pylori*

La communication entre la bactérie et son hôte maintient un équilibre finement régulé entre la stimulation de l'inflammation et les effets anti-inflammatoires, pour lequel l'expression de facteurs de virulence est critique. Les souches d'*H. pylori* isolées de patients porteurs d'ulcères sont, en général, très virulentes, avec de fortes propriétés adhésives et productrices d'enzymes (uréase, phospholipases) à fort potentiel toxique. De plus, les génotypes d'*H. pylori* les plus fréquemment associés à la sévérité de l'inflammation gastrique sont *vacA*-positifs et *cagA*-positifs [27].

1. CagA et le SST4

L'inflammation est principalement suscitée par des fragments de peptidoglycane, un constituant de la paroi, et par la protéine CagA. Ces deux composés bactériens sont transportés à l'intérieur de la CEG (Cellule Epithéliale Gastrique) par un système multiprotéique de sécrétion de type IV (SST4). CagA et le SST4 qui permet de l'introduire dans la CEG, sont codés par une région de l'ADN chromosomique appelée îlot de pathogénicité *cag* (*cagPAI*) (Figure 6). Chez *H. pylori*, le *cagPAI* est la région du chromosome la plus étudiée. Cette région génomique de 40 kilobases (kb) contient jusqu'à 32 gènes putatifs [28, 29]. Le pourcentage de G+C de ce segment diffère du reste du génome, ce qui suggère une acquisition par transfert horizontal [30, 31]. L'un des marqueurs de la présence de l'îlot de pathogénicité est le gène *cagA*. Ce gène est présent chez 90% des souches asiatiques et chez 50 à 70% des souches occidentales [32, 33]. Cependant, la présence du gène *cagA* ne signifie pas forcément la présence d'un îlot entier et fonctionnel, celui-ci pouvant être partiellement délété [34, 35]. Des patients infectés par des souches *cagPAI*+ présentent un risque significativement plus important de développer des ulcères peptiques et des carcinomes gastriques [36].

CagA est une protéine monomérique de 135-145 kDa clonée en 1993 [37, 38], et dont l'activité est entièrement contenue dans un domaine C-terminal de 35-45 kDa

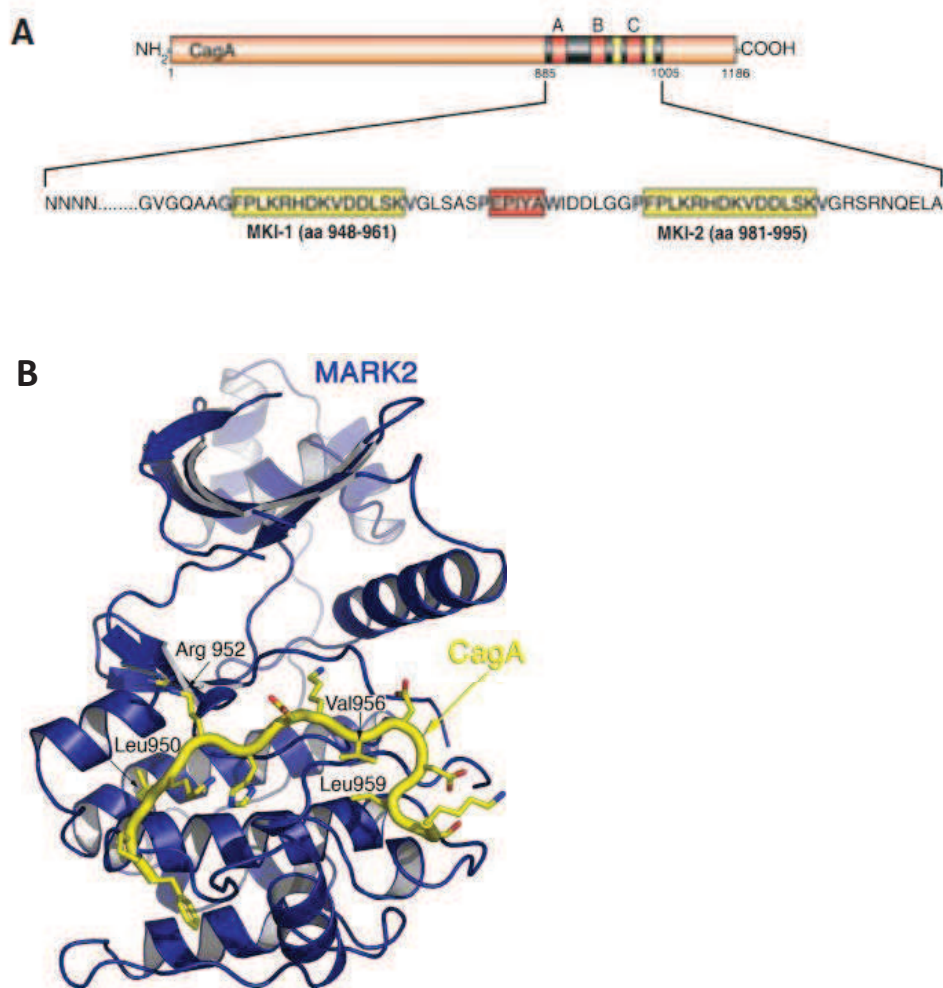


Figure 6 : Représentation schématique de la protéine CagA. A) Localisation des domaines fonctionnels de CagA, principalement en C-terminal. On y retrouve les motifs EPIYA correspondant à des sites de phosphorylation de tyrosine (boîtes rouges). Celle-ci peut être phosphorylée par les kinases Abl ou Src. De multiples segments EPIYA et la variation de leur arrangement sont retrouvés dans les isolats cliniques d'*H. pylori*. Les motifs EPIYA sont au nombre de quatre, notés A, B, C et D et leur présence est dépendante de l'origine géographique de la souche bactérienne : les segments A/B/C pour les souches occidentales et les segments A/B/D pour les souches orientales. Les boîtes de couleur jaune correspondent aux sites MKI (MARK2 kinase inhibitor). **B)** Structure du complexe CagA-MARK2. MARK2 en bleu et le domaine MKI de CagA, en jaune peuvent être visualisés sur le diagramme de Ribbon. D'après [39].

comportant des répétitions du motif EPIYA (Figure 6a) [40]. Ce domaine présente un polymorphisme qui affecte sa structure et sa virulence et coïncide avec une répartition géographique de la souche bactérienne. En effet, la protéine CagA provenant de souches très virulentes d'Asie de l'Est diffère par la composition de ce domaine des souches occidentales [41]. CagA aurait évolué par des mécanismes de recombinaisons pour aboutir aux variants hautement virulents des souches d'Asie de l'Est [42].

Le SST4 est typiquement composé de l'assemblage de 11 protéines (VirB 1 à 11) couplées à une NTPase (VirD4) (Figure 7) [43]. Le SST4 peut être vu comme une structure filamenteuse, apparentés aux *pili* sur la surface de la bactérie, utilisés par celle-ci pour la conjugaison, le transfert d'ADN ou le transport de toxines [44, 45].

Kwok *et al.* ont identifié l'intégrine $\alpha 5 \beta 1$, protéine transmembranaire connectée à la fibronectine, comme récepteur du constituant CagL du SST4, *via* son motif RGD (Arginine-Glycine-Aspartate) [46]. L'interaction CagL- $\alpha 5 \beta 1$ active la cascade de signalisation de l'intégrine, qui débute par l'autophosphorylation de FAK (*Focal Adhesion Kinase*) et l'activation de la kinase SRC qui lui est associée : ceci conduit à la phosphorylation de CagA alors transloquée dans le cytoplasme *via* le SST4 (Figure 7). De même, CagA exposée à la surface de la bactérie peut interagir avec la phosphatidylsérine, qui est externalisée du feuillet interne, où elle se trouve habituellement, vers le feuillet externe de la membrane plasmique de l'hôte au contact de la bactérie, initiant ainsi son entrée dans la cellule par un mécanisme énergétique distinct des mécanismes d'endocytose connus [47].

Une fois injectée à l'intérieur de la CEG, CagA se localise sur la face cytoplasmique de la membrane plasmique et interagit avec un nombre important de protéines structurales et régulatrices dans le cytoplasme, induisant des changements morphologiques et l'activation de voies de signalisation, qui se répercuteront par des modifications de l'expression génique.

CagA est retrouvée au niveau des contacts focaux associée à la vinculine et aux kinases FAK et SRC (Figure 8) qui phosphorylent la tyrosine du motif EPIYA [48]. Plus tardivement au cours de l'infection, une autre kinase, Abl, participe également à la phosphorylation de CagA. CagA phosphorylée entre dans une boucle de rétroaction négative de l'activité kinase de SRC, ménageant ainsi sa toxicité pour la cellule hôte, et permettant ainsi une colonisation à long-terme des souches [46, 49].

CagA phosphorylée sur le motif EPIYA se lie à et dérégule la phosphatase SHP-2 (*Src Homology Phosphatase*, codée par le « proto-oncogène » *PTPN11*) [50, 51]. L'activité promotrice de prolifération et motilité cellulaires de SHP-2 nécessite son interaction

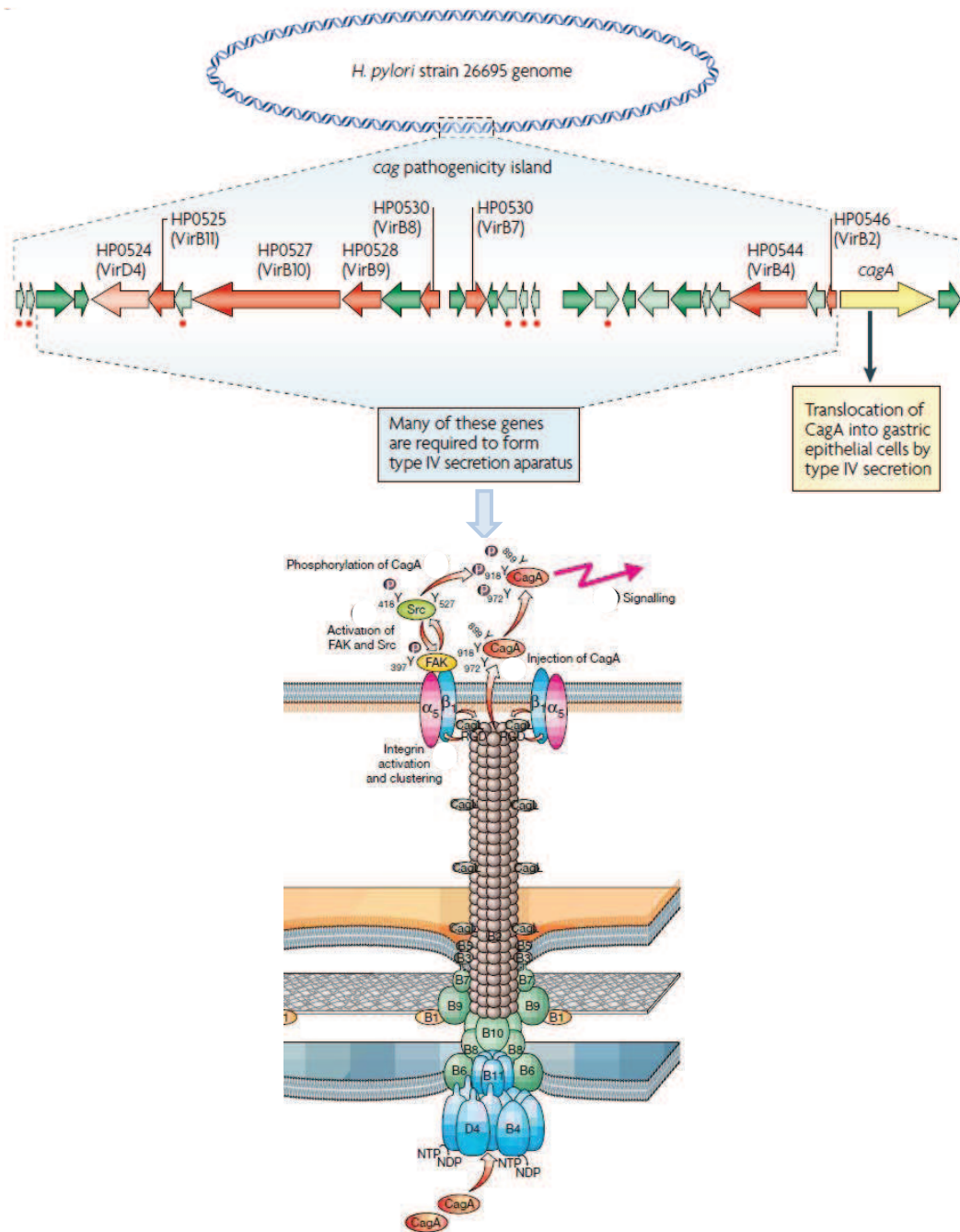


Figure 7 : Composition génomique du *cag*PAI et modèle du système de sécrétion de type IV. Arrangement des gènes composant le *cag*PAI chez la souche 26695. La plupart des gènes est impliquée dans la synthèse du SST4 qui permet l'injection de CagA et du peptidoglycane à l'intérieur de la cellule cible. Le SST4 correspond à un assemblage multiprotéiques couplé à une NTPase (VirD4) dont 7 gènes (en rouge) sont homologues à ceux du SST4 chez le phytopathogène, *Agrobacterium tumefaciens*. Les flèches marquées d'un point rouge correspondent aux gènes essentiels pour la translocation de CagA dans les CEG. Durant l'infection, *H. pylori* établit des contacts étroits avec la cellule épithéliale gastrique grâce à une liaison entre CagL et les intégrines $\alpha_5\beta_1$. Le SST4 permet ainsi l'injection cytoplasmique de CagA et du peptidoglycane dans la CEG. D'après [46].

avec la protéine Gab phosphorylée : il a été montré que CagA était capable de mimer la fonction « facteur de croissance » de la protéine eucaryote Gab, dérégulant ainsi SHP-2. [52, 53] Ceci provoque une activation continue de la cascade Ras/MEK/ERK (*Mitogen Activated Kinase kinase/Extracellular signal-regulated kinase*) promotrice de prolifération et de changements morphologiques.

Cette même voie peut être activée par la liaison de CagA, indépendamment de sa phosphorylation, à Grb2 (*Growth factor receptor bound 2*) : CagA transduit ainsi un signal similaire à celui de facteurs de croissances, court-circuitant l'activation d'un récepteur de facteur de croissance par son ligand extracellulaire [54].

CagA se lie aussi à la sérine/thréonine kinase régulatrice de polarité cellulaire PAR1/MARK (*Partitioning defective and MAP/microtubule affinity regulating kinase*), dont elle inhibe l'activité kinasique. Cette interaction et perte de fonction de PAR1/MARK provoque une rupture des jonctions intercellulaires et perte de polarité [55]. Une séquence peptidique de CagA critique pour cette interaction et responsable de l'inhibition de PAR1/MARK a été identifiée dans la souche 26695 de *H. pylori*. Il s'agit d'un domaine C-terminal comportant la répétition de 30-40 résidus contenant le motif d'acides aminés EPIYA [56], et dont la structure co-cristallisée avec PAR1b/MARK2 révèle son caractère mimétique d'inhibiteurs de protéine kinases eucaryotes (Figure 6b). Ce ne sont pas les motifs EPIYA qui sont en cause dans cette inhibition, mais une autre séquence de 14 acides aminés qui occupe le site de liaison du substrat dans MARK2. À cette même séquence, d'autres auteurs avaient originellement attribué une activité indépendante de la phosphorylation et stimulatrice de la voie c-Met/PI3K/Akt aboutissant à l'activation transcriptionnelle de la β -caténine et de NF- κ B, [57] ainsi qu'un rôle dans la multimérisation de CagA (Figure 8) [51].

Les réponses induites par CagA dans les CEG peuvent être divisées en trois catégories [58] :

- la réorganisation du cytosquelette et élongation cellulaire extrême, telles qu'elles apparaissent de manière spectaculaire dans les cellules AGS, système modèle d'infection de cellules épithéliales gastriques non polarisées en culture cellulaire, qui sera décrite ultérieurement dans cette thèse. Ces changements morphologiques dépendent principalement de la dérégulation de SHP-2, mais impliquent aussi l'inhibition de PAR-1/MARK [59].
- La rupture des jonctions intercellulaires et la perte de polarité par l'association physique directe de CagA avec des protéines des jonctions fortes intercellulaires telles que ZO-1, JAM, et E-Cadhérine [60, 61] et avec la kinase PAR1/MARK [59]. Ces effets ne requièrent pas que CagA soient phosphorylée.
- L'activation de nombreux facteurs de transcription tels que TCF/LEF, NF κ B, NFAT ou SRE/SRF, régulant le cycle cellulaire, l'immunité innée et la survie.

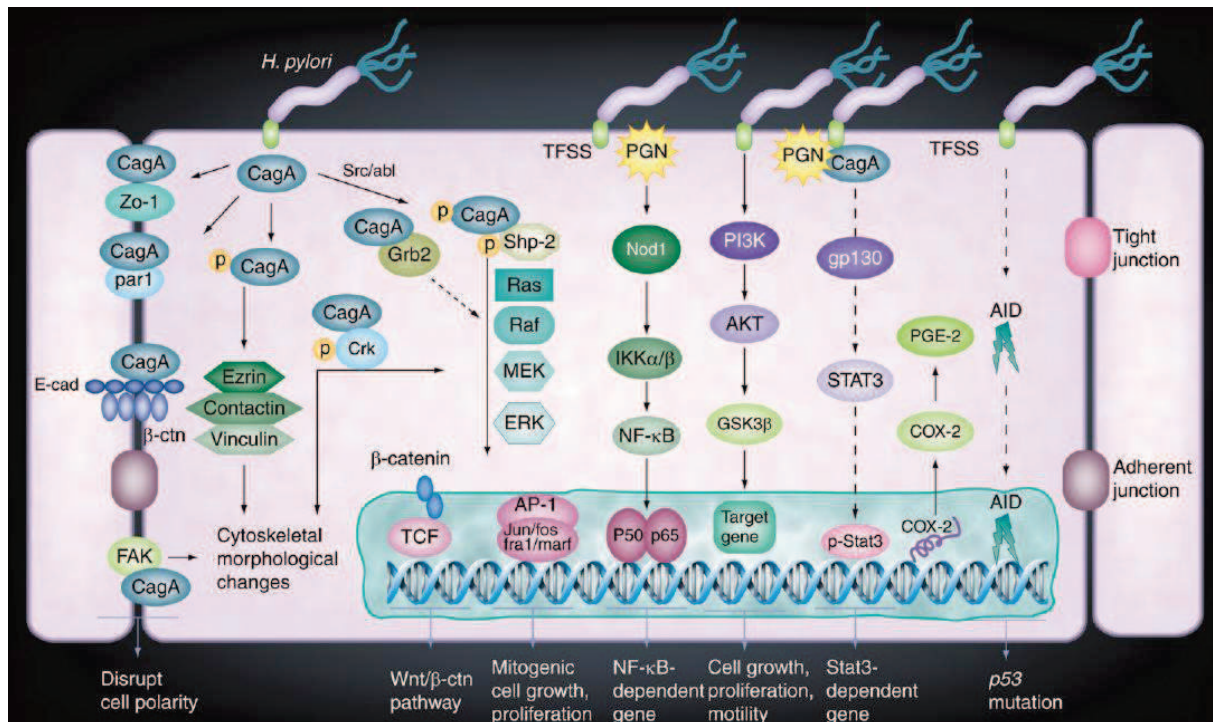


Figure 8 : Les voies de signalisation induites par *Helicobacter pylori* dans les CEG.

Les souches *cagPAI* positives d'*H. pylori* injecte CagA et le PGN dans le cytoplasme de la cellule hôte. Ces effecteurs bactériens activent de multiples voies de signalisation des CEG et confèrent un potentiel oncogénique à ces cellules. Une fois transloquée dans la CEG, CagA est phosphorylée par les kinases Src ou Abl et cible des protéines eucaryotes de manière dépendante ou indépendante de la phosphorylation de CagA. Les effets recouvrent de nombreux aspects allant de l'activation de voies oncéniques au réarrangement du cytosquelette. Le PGN active les voies NF-κB, STAT3 et PI3K. Des dérégulations perpétuelles de ces différentes voies de signalisation des CEG conduisent à la carcinogénèse induite par *H. pylori*. D'après [62].

AP : Activator Protein, b-ctn : beta-caténine, CagA : Cytotoxin-associated antigen A, COX : cyclooxygénase, E-cad : E-cadhérine, PGN : peptidoglycane, STAT : Signal Transducers and Activators of Transcription, TFSS : Type Four Secretion System.

L'activation de ces facteurs est le terme de plusieurs cascades de signalisation initiées par l'interaction de CagA avec des effecteurs ou des adaptateurs de ces voies, comme il a été dit précédemment. Ainsi, l'association de CagA avec la E-cadhérine libère la β -caténine dans le cytoplasme et permet sa translocation nucléaire et son effet co-activateur des facteurs de transcription TCF/LEF, qui transactivent un certains nombres de gènes au potentiel oncogénique [60]. CagA non phosphorylée interagit avec c-Met, ce qui initie la voie de signalisation de la phosphatidylinositol 3-kinase PI3K/Akt et active la β -caténine et NF- κ B [57, 63, 64].

CagA est donc la protéine effectrice maîtresse d'*H. pylori* [39]. Ses deux formes, phosphorylées et non phosphorylées, sont aussi importantes l'une que l'autre pour s'immiscer dans le réseau des voies de signalisation de l'hôte et les perturber au cours de l'infection, modifiant ainsi la morphologie des CEG et leur devenir.

2. Les adhésines

Alors que la plupart des bactéries *H. pylori* réside dans le gel semi-perméable constitué par le mucus gastrique, 20% d'entre elles sont fixées à la surface apicale des cellules épithéliales, par l'intermédiaire d'adhésines, protéines de la membrane externe bactérienne. Parmi elles, BabA reconnaît les antigènes de Lewis fucosylés abondants sur les cellules épithéliales gastriques et SabA les glycosphingolipides sialylés [65, 66]. L'exploitation des antigènes de Lewis de l'hôte par *H. pylori* est mise en évidence par le fait que l'antigène O de son lipopolysaccharide contient plusieurs variants d'antigènes de lewis humains, dont l'inactivation empêche la colonisation de l'estomac de souris. Par un mécanisme de mime moléculaire, ces antigènes de lewis bactériens permettraient à *H. pylori* d'échapper aux défenses immunitaires de l'hôte en empêchant la formation d'anticorps contre des épitopes partagés par la bactérie et par son hôte.

Les adhésines BabA et HomB ont été associées à la progression cancéreuse de l'infection par les souches *H. pylori* possédant le variant CagA de type occidental, mais non pas par celles possédant le variant de type Asie orientale [67], et peuvent donc être considérées comme un co-facteur de virulence. De même l'adhésine OipA participe à la régulation de la production de cytokine pro-inflammatoire, de métalloprotéinases et à l'activation de la β -caténine [68].

La fixation d'*H. pylori* sur les cellules hôtes, par l'intermédiaire de ses adhésines, pourrait rendre compte de l'injection de CagA dans leur cytoplasme, de manière indépendante des intégrines β 1, qui sont localisées sur la surface basolatérale de la cellule en contact avec la matrice extracellulaire, et donc inaccessibles à la bactérie dans un épithélium intègre. Il est possible qu'*H. pylori* se fixe d'abord par certaines de ses

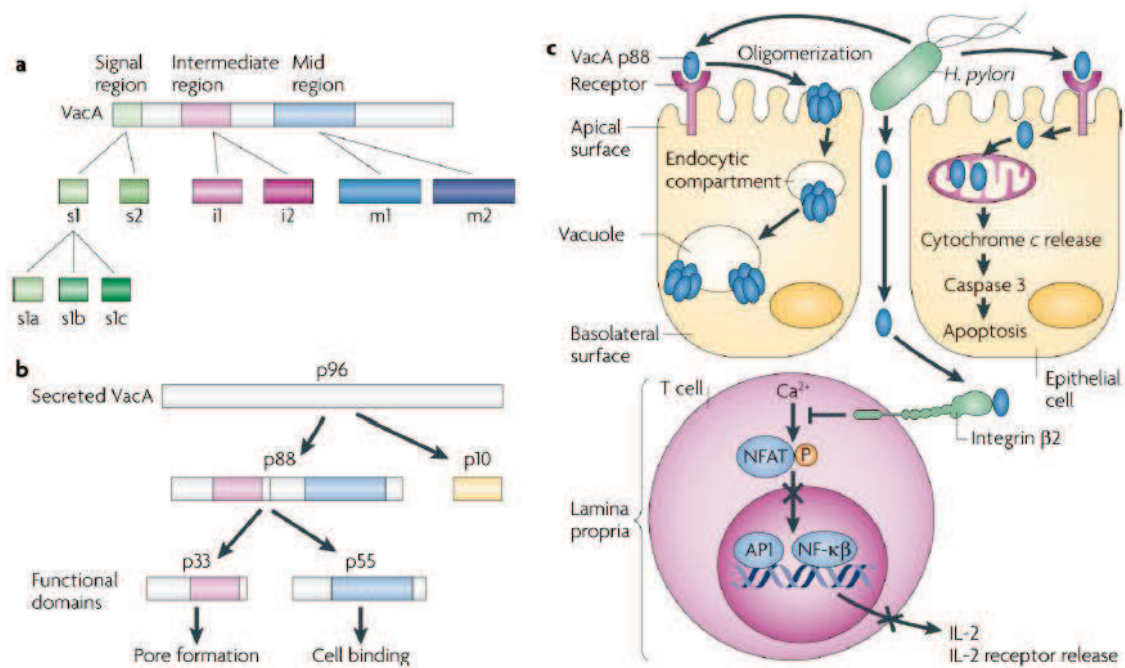


Figure 9: Structure de VacA et fonction. **A)** *vacA* est un gène mosaïque polymorphique à travers la recombinaison homologue. Les régions variables sont localisées au niveau des régions signal (s), intermédiaire (i) et méridionale (m). La région s1 est active tandis que la région s2 code pour une protéine avec un site de clivage au niveau du peptide signal, donnant naissance à une protéine plus courte en N-terminal incapable d'induire la vacuolisation des CEG. La région médiane code pour un site d'attachement aux cellules, mais l'allèle m2 correspond à une protéine VacA ayant un potentiel de vacuolisation atténué (s1m1 et s1m2 : protéine active, s2m2 : protéine inactive). Ainsi la forme la plus virulente de VacA correspond au génotype *s1m1*. La fonction de la région intermédiaire est inconnue. **B)** VacA correspond à une protéine sécrétée de 96 kDa en un domaine passager de 10 kDa (p10) et une protéine mature de 88 kDa (p88). p88 contient deux domaines fonctionnels, appelés p35 et p55. **C)** La forme monomérique de VacA se lie aux CEG de manière non spécifique et spécifique grâce aux récepteurs membranaires. Le monomère s'oligomérisse, puis est internalisé pour former des canaux anioniques conduisant à la vacuolisation des CEG. VacA induit d'autres effets tels que l'apoptose *via* la formation de pores dans les membranes mitochondriales permettant la libération du cytochrome c. VacA peut interagir avec l'intégrine β2 des cellules T et inhiber NF-κB afin d'abolir la sécrétion d'IL-2 et de bloquer les cellules T. D'après [69].

adhésines sur la surface apicale des cellules épithéliales polarisées et y injecte CagA (peut-être par un mécanisme dépendant de l'externalisation de la phosphatidylsérine [47]), suivi par l'interaction avec PAR1/MARK, permettant d'initier la rupture des jonctions cellulaires. Ce mécanisme faciliterait indirectement l'accès d'*H. pylori* aux intégrines de la surface basolatérale, aboutissant finalement à la phosphorylation de CagA et à toutes les modifications des voies de régulation et du programme génétique de l'hôte dépendant de CagA phosphorylée.

3. VacA

Cette toxine de 88 KDa (Figure 9), qui fait également partie du répertoire d'effecteurs de la virulence de la bactérie, est sécrétée par la bactérie dans son milieu environnant et est également reconnu comme un facteur important dans la pathologie de la muqueuse gastrique colonisée par *H. pylori*. Elle interfère également avec plusieurs voies de signalisation de l'hôte. Comme CagA, VacA est polymorphique et bien qu'il soit présent dans toutes les souches d'*H. pylori*, le gène *vacA* selon sa forme allélique n'est exprimé que dans 60% d'entre elles (Figure 9a) [70].

Les monomères de VacA s'oligomérisent, mais sont dissociés à pH acide, conditions qui amplifient leur activité. VacA est sécrétée sous forme d'un précurseur de 96 kDa, clivé en toxine p88 et un domaine passager de p10. p88 contient deux domaines, p33 et p55. Le domaine p33 est très hydrophobe et contient des motifs caractéristiques de dimérisation transmembranaire, qui lui confèrent la propriété de s'insérer dans les membranes cellulaires de l'hôte et d'y former des vacuoles. p55 joue un rôle crucial dans la fixation sur la cellule hôte (Figure 9b) [71].

VacA utilise différents récepteurs selon le type cellulaire ciblé [72] et notamment la sphingomyéline [73]. Parmi les diverses fonctions de VacA, sa capacité à provoquer la vacuolisation du cytoplasme des cellules hôtes est son action la plus manifeste. Ces vacuoles contiennent les marqueurs d'endosomes tardifs et de lysosomes (Figure 9c) [74]. En s'oligomérisant sur la membrane plasmique, VacA en altère la perméabilité en formant des canaux anioniques sélectifs, par lesquels des ions (Fe^{3+} , Ni^{++}) et même des molécules complexes (bicarbonate, urée, acides aminés, glucides) du milieu intracellulaire de l'hôte peuvent être relargués dans son environnement extracellulaire, profitant à la bactérie pour sa croissance [75]. Par ailleurs, VacA induit l'apoptose *via* un mécanisme impliquant le relargage du cytochrome c dans l'espace inter-membranaire mitochondrial, mécanisme qui requiert sa capacité à former des canaux ioniques (Figure 9c).

VacA participe également à l'induction de l'inflammation de la muqueuse gastrique infectée par *H. pylori*, par stimulant la production de cytokines pro-inflammatoires, parmi lesquelles IL-8 *via* NF- κ B [76] et de prostaglandines [77].

VacA affecte la cohésion de cellules épithéliales pariétales de la muqueuse gastrique en permettant l'hydrolyse de l'ezrine, protéine du cytosquelette, par la calpain-1 activée en conséquence de l'effet de la toxine sur la mobilisation de calcium intracellulaire [78]. Cette action de VacA entraîne aussi une diminution de la production d'acide par ces cellules et peut ainsi contribuer à l'hypochlorhydrie qui favorise l'évolution pathologique de l'infection. VacA est également capable d'activer la β -caténine par l'intermédiaire de la voie PI3K/Akt, contribuant ainsi au potentiel oncogénique de la bactérie [79, 80].

Parmi les nombreux rôles de VacA, celui de modulateur de l'immunité est sans doute celui qui est le plus directement impliqué dans la colonisation et la persistance d'*H. pylori*. La modulation de l'immunité par VacA peut être causée par divers mécanismes comme par exemple l'interruption de la maturation des phagosomes de monocytes et des macrophages, ce qui permet à *H. pylori* de persister dans ces cellules sans être tué, ou encore l'inhibition de l'activation des lymphocytes T et B (Figure 10c) [81].

Un nombre croissant de données de la littérature évoque la possibilité d'effets antagonistes entre CagA et VacA. CagA active le facteur de transcription NFAT dans les cellules épithéliales gastriques, alors que VacA l'inhibe [82]. CagA bloque l'induction d'apoptose induite par VacA : sa forme phosphorylée entrave le trafic de VacA dans les compartiments intracellulaires, alors que sa forme non phosphorylée mime l'action anti-apoptotique de Bcl2, empêchant VacA d'exercer sa toxicité [83, 84]. Cet antagonisme entre ces deux effecteurs bactériens se manifeste aussi dans les altérations morphologiques induites par *H. pylori* sur les cellules épithéliales : la vacuolisation des cellules hôtes est exacerbée avec des souches mutantes *vacA*⁺/*cagA*⁻, et réciproquement, les cellules sont plus allongées avec les mutants *cagA*⁺/*vacA*⁻ [85]. VacA inhibe l'activation de la voie ERK par CagA [86]. Une hypothèse pour cet antagonisme entre les deux effecteurs serait que CagA protégerait les cellules dans lesquelles elle a été injectée contre la toxicité de VacA, obligeant VacA d'aller endommager d'autres cellules afin de procurer des nutriments à la bactérie pour assurer sa persistance. Cette hypothèse se trouve vérifiée par l'association fréquente dans les souches d'*H. pylori* de la forme la plus active de CagA avec la forme la plus active de VacA, ensemble corrélée à la pathologie gastrique la plus sévère [87].

4. L'uréase

L'activité uréase d'*H. pylori* produit de l'ammoniaque, qui endommage également les cellules et en affaiblit les jonctions intercellulaires [88]. Ces deux actions facilitent l'accès de la bactérie vers les intégrines de la surface basolatérale et permettent

l'injection et la phosphorylation de CagA.

Ainsi, pour s'adapter et prospérer dans le milieu hostile constitué par la muqueuse gastrique humaine, *H. pylori* dispose de toute une panoplie d'effecteurs de colonisation et de virulence, qui exercent des effets redondants, synergiques ou au contraire antagonistes, se régulant l'un l'autre. C'est un équilibre dynamique finement orchestré entre ces effecteurs et les réponses de l'hôte qui permet à la bactérie de persister pendant des décennies dans la muqueuse gastrique et à l'hôte de rester apparemment sain, mais il comporte le risque que ne se développe une maladie grave, comme un cancer.

E. Les mécanismes de la carcinogenèse induite par *H. pylori*

En tant qu'agent étiologique de deux types distincts de cancers gastriques, le lymphome du MALT et l'adénocarcinome, *H. pylori* est la seule bactérie actuellement reconnue oncogénique, et classée carcinogène de classe 1 par l'Organisation Mondiale de la Santé (1994). C'est le dialogue continu entre les effecteurs de la bactérie et la réponse immunitaire de l'hôte, entretenant l'état inflammatoire chronique délétère pour la muqueuse et/ou interférant avec l'homéostasie de l'épithélium gastrique en dérégulant les mécanismes de prolifération et de survie cellulaires, qui peut contribuer à la carcinogenèse gastrique.

L'inflammation est à l'origine de la cancérogenèse de l'estomac induite par *H. pylori*. Les mécanismes par lesquels *H. pylori* provoque l'inflammation sont redondants [89]. Le facteur de transcription NF- κ B orchestrant les effecteurs de l'inflammation peut être activé non seulement par CagA *via* les voies Ras/MEK/ERK et/ou PI3K/Akt, mais aussi par la reconnaissance du lipopolysaccharide, des adhésines ou de la flagelline bactériens par des TLRs à la surface de la cellule hôte. La détection du peptidoglycane (PGN) injecté par le SST4 à l'intérieur du cytoplasme par NOD1 (*Nucleotide-binding oligomerization domain 1*) y participe également. NOD1 contribuerait à la défense de l'hôte contre *H. pylori* en produisant de l'interféron- β et en activant le facteur de transcription ISGF3 (*Interferon-Stimulated Gene Factor 3*) [90]. Pourquoi la bactérie met-elle en jeu une telle redondance de mécanismes pour stimuler l'inflammation ? Lamb et Chen postulent que puisque CagA et le PGN ciblent différents effecteurs de cascades de signalisation, ils agiraient de manière synergique pour activer NF- κ B, et que la bactérie profiterait de cette synergie, qui peut lui fournir des nutriments et des conditions favorables pour sa colonisation.

1. L'adénocarcinome gastrique

Il existe sous deux formes histologiques distinctes. L'adénocarcinome gastrique de type diffus affecte le plus souvent des sujets jeunes et consiste en une masse de cellules néoplasiques infiltrantes qui ne forment pas de structures glandulaires. L'adénocarcinome de type intestinal, plus fréquent, est l'aboutissement d'une série d'étapes histologiques initiée par la transition de la muqueuse normale vers une gastrite chronique superficielle, suivie par une gastrite atrophique et métaplasie intestinale, et aboutissant à la dysplasie et l'adénocarcinome. Alors qu'*H. pylori* augmente significativement le risque de l'un et l'autre de ces types d'adénocarcinomes, l'inflammation chronique n'est pas requise pour le développement de l'adénocarcinome de type diffus, ce qui révèle des mécanismes différents selon le sous-type de cancer.

Dans la diversité génétique des souches d'*H. pylori*, certains de ses gènes augmentent le risque de carcinome de manière inéluctable. C'est le cas de l'îlot de pathogénicité *cag*, dont la présence est étroitement corrélée au développement d'adénocarcinome [36, 91], car il permet l'expression de CagA et sa translocation dans le cytoplasme de l'hôte par le SST4, en même temps que le peptidoglycane et peut-être encore d'autres molécules à identifier. Le rôle oncogénique de CagA a été clairement démontré dans un modèle animal, la gerbille de Mongolie [92, 93]. Le polymorphisme du motif EPYIA de CagA apparaît particulièrement important lorsqu'on analyse les zones géographiques présentant la plus forte incidence de cancer gastrique : ces régions présentent aussi le taux le plus élevé de colonisation de *H. pylori cagA*-positive avec l'allèle EPYIA-ABD [41, 94].

Le contact des cellules épithéliales gastriques avec des souches *cag+* active de multiples voies de signalisations régulatrices de processus oncogéniques, qui augmentent le risque de transformation néoplasique si ce contact perdure pendant de longues périodes de colonisation de la bactérie.

a) Dérégulation de la prolifération/différentiation cellulaire

L'augmentation de prolifération cellulaire est un indicateur de cancer. CagA active des voies de signalisation promotrice de prolifération, comme la voie Ras/MEK/ERK/MAPK, en interagissant avec l'adaptateur Grb2 [54]. Le statut de phosphorylation de CagA (ou la proportion de CagA phosphorylée/CagA non phosphorylée) régule l'aiguillage entre les voies SHP-2/ERK dépendante de la phosphorylation de CagA et les voies JAK/STAT3 indépendante de sa phosphorylation [95]. Le récepteur bifonctionnel gp130 de l'IL-6 joue le rôle d'un commutateur entre ces deux cascades de signalisation :

la voie SHP-2/ERK régule la prolifération et la dispersion des cellules, alors que JAK/STAT3 promeut la migration cellulaire.

La β -caténine, libérée par l'interaction CagA/E-Cadhérine, stabilisée par activation de la voie Wnt et transloquée dans le noyau, devient un facteur de transcription associé aux co-facteurs LEF/TCF. Ses cibles sont des gènes activateurs du cycle cellulaire comme celui de la cycline D1, mais également *cdx1*, dont le produit est un facteur de transcription important dans la trans-différentiation en cellules intestinales, ou le gène de la mucine MUC2, un marqueur de différenciation intestinale. Cette reprogrammation génique signe une métaplasie gastrique de type intestinal [60]. Le motif moléculaire spécifique de CagA non phosphorylée intervenant dans la relocalisation de la β -caténine des jonctions adhérentes vers le noyau est le même que celui qui inhibe la kinase PAR1/MARK. Une augmentation d'expression de la β -caténine a été rapportée dans 50% des adénocarcinomes gastriques, en comparaison avec la muqueuse non tumorale, et son accumulation nucléaire est déjà détectée dans les foyers de dysplasie [96]. Dans un modèle de souris transgénique exprimant WNT1 sous contrôle du promoteur de la kératine 19, qui développent ainsi une dysplasie gastrique, Oguma *et al* ont montré que la translocation nucléaire de la β -caténine dans les cellules épithéliales gastriques dysplasiques survient précisément à proximité de l'infiltration de macrophages. Ils ont identifié le TNF- α et la voie PI3K/Akt comme le facteur responsable de l'activation de β -caténine, et ont reproduit ces événements en infectant les souris avec *H. felis* [97]. Ceci suggère que l'activation aberrante de la β -caténine précéderait le développement du cancer et qu'elle serait une étape centrale dans la régulation des réponses des cellules épithéliales pré-cancéreuses à *H. pylori*.

b) Dérégulation de l'apoptose

La réponse inflammatoire induite par *H. pylori* endommage les cellules de la muqueuse gastrique. Ces dommages s'accompagnent d'apoptose, suite à l'induction de cytokines pro-inflammatoires (notamment de TNF- α), la production de monoxyde d'azote (NO) stimulée par l'uréase, qui induit la *Nitric Oxyde Synthetase* dans la muqueuse infectée, la génération de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) par la sécrétion de γ -glutamyltranspeptidase par la bactérie [98], le facteur de virulence VacA et enfin la dégradation de la matrice extracellulaire par l'augmentation de production de métalloprotéases MMP-2 et MMP-9 [99].

L'induction et l'inhibition d'apoptose sont impliquées dans la cancérogenèse de l'estomac infecté par *H. pylori*. En effet, l'induction d'apoptose favoriserait le recrutement par les glandes gastriques des cellules souches mésenchymateuses dérivées de la moelle osseuse, pour réparer les dommages ; celles-ci finiraient par se transformer en cellules néoplasiques intraépithéliales (voir ci-dessous). Par ailleurs,

l'inhibition d'apoptose représente la perte du rôle de garde-fou contre la perpétuation de dommages à l'ADN qu'assure l'épithélium gastro-intestinal, dommages qui peuvent conduire à la transformation maligne. Ainsi, Mimuro *et al.* démontrent dans le modèle de gerbille de Mongolie infectée avec une souche *H. pylori cagA*-positive que la bactérie freine le renouvellement de la muqueuse gastrique en inhibant l'apoptose des cellules épithéliales différenciées au sommet des glandes gastriques, ce qui favorise la colonisation de la muqueuse par la bactérie [100]. Ce processus fait intervenir l'inhibiteur d'apoptose MCL-1 par l'activation de la voie SFR/SRE.

c) La différenciation aberrante de cellules souches.

Il a été clairement démontré dans un modèle souris que des cellules souches en provenance de la moelle osseuse venaient envahir la muqueuse gastrique rendue inflammatoire par *H. felis*, en particulier au niveau de foyers lésionnels, se rajoutant aux cellules souches endogènes au tissu gastrique [101]. Les cellules souches de moelle osseuse venues en renfort pour régénérer l'intégrité de la muqueuse infectée, dégénéreraient en adénocarcinome dans l'environnement inflammatoire gastrique, suggérant que l'adénocarcinome gastrique aurait pour origine les cellules souches de la moelle osseuse. Il faut remarquer que la voie Wnt par laquelle la β -caténine est activée est cruciale pour le renouvellement des cellules souches. *H. pylori* clairement interagit avec cette population cellulaire progénitrice de l'épithélium gastrique [23, 102].

Ainsi, l'étude des interactions entre les effecteurs de *H. pylori* et ceux de l'hôte interférant avec des cascades de signalisation a permis de préciser des mécanismes de carcinogénèse émergeant de foyers inflammatoires chroniques. Ces mécanismes pourraient être applicables à d'autres cancers associés à l'inflammation chronique induite par un pathogène : carcinome hépatocellulaire par les virus de l'hépatite B et C, ou carcinome hépatobiliaire par *Clostridium parvum*.

2. Lymphome du MALT

L'inflammation chronique de la muqueuse gastrique par *H. pylori* provoque aussi des lymphomes gastriques du MALT de bas grade. Ces cancers sont moins fréquents que l'adénocarcinome et ont été moins étudiés.

Nous avons souligné précédemment l'importance du contexte inflammatoire pour le développement de l'adénocarcinome : de manière similaire, le lymphome du MALT, qui émane d'une prolifération incontrôlée des lymphocytes B, est considéré comme le résultat d'une inflammation qui a dégénéré. En l'absence d'infection, la muqueuse gastrique est totalement dépourvue de tissu lymphoïde (contrairement à la muqueuse intestinale) ; mais dans un contexte de lymphome du MALT, les lymphocytes B prolifèrent et s'organisent en structure lymphoïdes similaires aux plaques de Peyer naturellement présentes dans la partie inférieure de l'intestin.

Si le rôle causal d'*H. pylori* dans la genèse de ce lymphome est clairement établie et confirmée par un modèle animal, les facteurs de virulences bactériens et les effecteurs ciblés dans les cellules immunitaires de l'hôte lors de la genèse des lymphomes gastriques de MALT restent obscurs. A des stades plus avancés, les lymphomes gastriques du MALT subissent trois translocations génétiques spécifiques, qui ont en commun de promouvoir l'activation constitutive de voie de signalisation de NF- κ B, induisant ainsi la prolifération et la survie lymphocytaire [103].

F. Les modèles d'étude de l'infection de l'épithélium gastrique par *H. pylori*

Beaucoup des données décrites ci-dessus ont été obtenues sur des modèles d'études animaux ou des cellules gastriques humaines en culture.

1. Les modèles animaux

L'incidence de la gastrite chronique, des ulcères et des carcinomes gastriques liés à l'infection chronique par *H. pylori*, particulièrement en Asie, a suscité le développement de modèles animaux dans lesquels *H. pylori* était capable de coloniser l'estomac à long terme, pour y tester des antibiotiques ou des vaccins. Les animaux utilisés pour étudier expérimentalement l'infection par *H. pylori* incluent des singes, des chiens, des cochons, des chats et des rongeurs. Mais la plupart de ces modèles n'est pas idéale, parce que, outre les aspects éthiques, on ne peut pas manipuler ces animaux de manière aisée ou en grand nombre, qu'il est indispensable qu'ils soient exempts de tout autre germe, ou encore parce que les taux d'infection par *H. pylori* sont faibles.

a) La souris

L'utilisation de souris comme hôte d'*H. pylori* permet de surmonter la majorité de ces problèmes. Les bactéries sont récupérées de biopsies d'ulcères humains et données aux animaux par gavage (10^9 bactéries/animal, 3 fois, à 24h d'intervalle). Cependant, ce pathogène humain colonise difficilement l'estomac murin et la gastrite induite est moins intense que celle observée chez l'Homme.

Différentes souches de souris ou des souris transgéniques sont néanmoins utilisées comme modèle d'étude de l'infection d'*H. pylori* :

- *Le modèle de gastrite de la souris C57BL/6* : dans les souris C57BL/6, *H. felis* ou *H. pylori* provoque des lésions pré-cancéreuses qui se manifeste de manière histologique

par une gastrite atrophique, l'hyperplasie et la métaplasie, due à une réponse immunopathologique Th1.

- *Le modèle de souris Balb/c* a été décrit comme modèle expérimental du lymphome du MALT après infection à long terme avec *H. heilmannii*, *H. felis* ou la souche *H. pylori* SS1, car elle mime les lésions histologiques de la muqueuse gastrique infiltrée par des lymphocytes observée chez l'Homme, lésions réversibles par l'administration d'antibiotiques. [104] La thymectomie de souris Balb/C de 3 jours préalable à l'administration par gavage à 6 semaines, accélère le développement de la maladie inflammatoire due à la bactérie. En fait, la thymectomie provoque une gastrite auto-immune à réponse Th1 prédominante et une hyperplasie de l'épithélium ; cet environnement favorise la colonisation d'*H. pylori* dans la muqueuse et accélère considérablement la survenue des lésions histologiques [105].

- *Les modèles de souris transgéniques.* Les souris transgéniques INS-GAS exprimant le gène de la gastrine sous la dépendance du promoteur de l'insuline développent progressivement une gastrite atrophique avec diminution du nombre de cellules pariétales, hypochlorhydrie et production des facteurs de croissance Heparin-binding-EGF et TGF α , puis métaplasie gastrique, dysplasie, carcinome *in situ* et invasion vasculaire du carcinome. L'infection par *H. pylori* des souris INS-GAS accélère le développement de carcinome de la muqueuse gastrique, son invasion sub-mucosale et intravasculaire [106, 107]. La pertinence de ce modèle pour la pathologie de l'infection chez l'Homme est de mettre en évidence le rôle d'une hyperproduction chronique de gastrine agissant en synergie avec l'infection *H. pylori* pour promouvoir la carcinogénèse gastrique.

Des souris transgéniques *cagA* établies par Ohnishi *et al.* [108], qui expriment CagA de manière prédominante dans l'estomac, présentent une hyperplasie de l'épithélium gastrique. Certaines développent des polypes et des adénocarcinomes dans l'estomac et l'intestin grêle, et des lymphomes de cellules B et des leucémies myéloïdes. Ces pathologies tumorales ne se développent pas avec un transgène *cagA* muté sur les sites de phosphorylation.

b) La gerbille

De nombreuses maladies gastro-intestinales peuvent être induites avec une grande fréquence et de manière stable chez la gerbille de Mongolie (*Meriones unguiculatus*), rongeur de la famille des muridés, avec des souches virulentes d'*H. pylori* (par exemple la souche TN2GF4 *cagPAI* et *vacA* positive). Les pathologies induites sont similaires à ceux de la gastrite chronique humaine, avec une érosion de la surface de la muqueuse et l'infiltration de cellules immunitaires inflammatoires ; elles évoluent dans ce modèle en ulcères, métaplasie intestinale et carcinome gastrique [109].

La capacité des souches d'*H. pylori* et de leurs mutants isogéniques à coloniser la muqueuse gastrique de la gerbille peut être améliorée après trois passages dans des gerbilles, au terme desquels les gènes des facteurs de virulence étaient maintenues dans les bactéries ainsi adaptées à cet animal. Ces conditions optimales d'infection permettent de préciser la cinétique de la pathologie inflammatoire et du cancer induits par *H. pylori*, ainsi que le rôle joué par les différents facteurs de virulence [110].

Non pas par gavage mais par des techniques précises de microinjections dans la muqueuse, qui restreignent la population bactérienne sur une fine épaisseur de mucus, Schreiber *et al.* ont montré qu'*H. pylori* colonise une topologie très particulière dans la couche de mucus gastrique. À cet endroit, la diffusion des solutés est restreinte, et *H. pylori* utilise le gradient de pH du mucus pour s'orienter précisément dans l'espace, ce qui apparemment lui procure des conditions optimales pour y survivre de manière chronique [111].

c) *Animaux non-mammaliens*

Malgré la critique d'être très éloignées des pathologies humaines, les modèles non-mammaliens d'infection ont prouvé leur grande valeur dans l'élucidation des mécanismes d'actions et voies de signalisation activées par les facteurs de virulence de pathogènes. Ils démontrent aussi la conservation au cours de l'évolution de la réponse immunitaires innée et acquise (pour revue, [112]). Ainsi le nématode *Caenorhabditis elegans* a été utilisé pour analyser et comparer la virulence d'isolats cliniques et environnementaux (*Staphylococcus epidermidis*, *S. aureus*, *E. coli*, *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans*, *Salmonella typhimurium*), et pour réaliser des criblages de banques de molécules à la recherche de substances antimicrobiennes. La mouche *Drosophila melanogaster*, modèle établi pour les études génétiques du développement, a conduit à la caractérisation de facteurs de virulence (*Pseudomonas aeruginosa* isolés de patients atteint de fibrose kystique), à l'identification de nouveaux gènes impliqués dans l'immunité innée, l'apoptose et la production de peptides anti-microbiens. Le poisson-zèbre a été exploité comme modèle de la tuberculose humaine, en suivant en temps réel les différentes étapes de l'infection par *Mycobacterium marinum*.

Concernant *H. pylori*, le modèle *Drosophile* a montré que CagA mimait l'adaptateur Gad pour activer la phosphatase SHP-2 : en effet, la transgénèse de CagA dans les mouches compense les défauts du développement de l'œil dus à la mutation de DOSm, l'homologue de GabA [52].

2. Les cellules épithéliales gastriques humaines en culture

La restriction de la niche écologique d'*H. pylori* à la muqueuse gastrique humaine implique d'utiliser les cellules constituant cette muqueuse pour étudier les mécanismes d'action de cette bactérie. Les cellules épithéliales primaires gastriques ne sont pas accessibles facilement à l'expérimentateur, et si elles le sont, elles ne peuvent pas être cultivées *in vitro* pendant une longue période en conservant leurs propriétés épithéliales. L'inaccessibilité de ce tissu à l'expérimentateur a conduit à l'utilisation de modèles alternatifs telles que des lignées de cellules épithéliales gastriques humaines, dérivées pour la plupart de tumeurs.

a) Les cultures primaires de cellules épithéliales humaines

Des méthodes de cultures primaires de CEG ont néanmoins été développées dans le laboratoire de Dr. Ménard au Québec. Les protocoles de dissociations tissulaires classiquement utilisés (lacération et/ou cocktail de protéases de la matrice extracellulaire) ont un mauvais rendement de récupération de cellules épithéliales, et les cellules mésenchymateuses contaminantes finissent par envahir la culture primaire. Une amélioration de dissociation tissulaire à l'aide d'une solution commerciale non-enzymatique dépolymérisante de la matrice extracellulaire a permis d'obtenir des suspensions de CEG plus pures, qui adhèrent sur un support de culture, forment des colonies de cellules cohésives et proliférantes, et expriment les caractéristiques fonctionnelles (polarité cellulaire, production de mucus) d'un épithélium gastrique [113].

b) Les cellules épithéliales immortalisées

La lignée HFE-145 a été établie à partir de CEG humaines normales transfectées avec des vecteurs d'expression de l'antigène T de SV-40 et de la télomérase humaine [114]. Ces cellules se multiplient activement, expriment différentes mucines et forment des jonctions fortes intercellulaires lorsqu'elles sont cultivées en monocouche.

c) Les lignées de cellules épithéliales gastriques humaines

Des lignées de cellules épithéliales gastriques humaines ont pu être établies à partir d'adénocarcinomes gastriques ou de leurs métastases. La plupart d'entre elles présentent un phénotype épithélial et mucopeptique, et expriment une variété de marqueurs associée à l'épithélium gastrique humain adulte ou fœtal tels que des récepteurs aux facteurs de croissance, des mucines et des zymogènes. Ce sont de loin les modèles les plus utilisés pour étudier de manière reproductible les interactions entre la

	MKN-7	MKN-28	MKN-45	MKN-74	AGS	NCI-N87
Patient's gender/age	M/39	F/70	F/62	M/37	F/54	M/?
Origin of the specimen for primary culture	Lymph node metastasis	Lymph node metastasis	Liver metastasis	Liver metastasis	Gastric tumor	Liver metastasis
differentiated	well	well	poorly	moderately	moderate	well
gastric cancer type	intestinal	intestinal	diffuse	intestinal	intestinal	intestinal
p53	mis mut over express	mis mut over express	WT	WT	WT	
p21waf1/cip1 (mRNA/pro)	+/-	+/-	+/+	+/+	+/+	
APC	mut silent	mut nonsens	WT	nonsens mut	WT	WT
K-sam	WT	WT	WT	WT		
c-erbB2 (EGF R hom)	amplif	WT	WT	WT		WT
c-met	WT	WT	amplif	WT		
bcl-2	WT	WT high	WT low	WT -		
c-src kinase activity	nd	WT high	WT preserved	WT high		
c-myc	WT	WT	WT	WT		WT
EGF R (mRNA)	Medium	Medium	low	very low	+/+	+/+++
EGF (mRNA)	-	+	-	-		
TGF-α (mRNA)	high	Medium	low	low		
Amphiregulin (mRNA)	High	High	low	High		
TGF-B (mRNA/secretion)	high	high/inactive form	low	high		
Smad2	WT	WT	WT	WT		
Response to TGF-B	-	-	-	-		
IL-1α (mRNA)	high	Medium	low	low		
IL-6 (mRNA)	high	-	-	-		
IL-8 (mRNA/secretion)	high/high	Medium/medium	low/very low	High/very low		
VEGF (mRNA)	low	low	high	High		
PDGF A-chain (mRNA)	Medium	Medium	low	High		
PDGF R (mRNA)	-	-	-	-		
Basic FGF (mRNA)	-	-	+	-		
p21	WT	single nt polymorphism	WT	WT	WT	
p27	WT	WT	Rearrangement	WT	WT	
p15	WT	WT	mozygous deleti	WT/-		
p16	WT	Wt	mozygous deleti	WT/-	-	
Cyclin E mRNA/pro	amplif over express/high	WT overexpress/high	WT overexpress/high	WT low/low	WT	
Rb	WT (hyperphosphorylated)	WT (hyperphosphorylated)	WT (hyperphosphorylated)	WT (hyperphosphorylated)		
E-cadherin	WT	WT	deletion 18pb	WT	mut	WT
B-catenin	WT	WT	WT	WT	mut (gain de fonction)	wt
CD44	WT	silenced (hypermethyl prom)	WT	WT		

Table 3 : Caractéristiques des cellules épithéliales gastriques humaines utilisées pour la compréhension de l'infection par *H. pylori*. Mut : mutation

bactérie et sa cellule hôte en prolifération. Ne sont mentionnées ici que celles dont nous disposons au laboratoire (Table 3).

(1) Les cellules AGS

Elles constituent le modèle le plus répandu pour étudier les interactions entre *H. pylori* et les cellules gastriques humaines. Ces cellules sont issues de métastases hépatiques d'un adénocarcinome gastrique de type intestinal, chez une patiente âgée de 54 ans de type caucasien [115]. À cause de leur sensibilité particulière à CagA, dont l'entrée dans le cytoplasme y provoque un changement morphologique remarquable caractérisé par une elongation extrême (appelé phénotype « colibri » : voir chapitre I des résultats) et un phénotype invasif, ces cellules ont permis d'élucider la plupart des mécanismes moléculaires de CagA phosphorylée et non phosphorylés décrits précédemment.

Cependant, malgré leur forme épithéliale, ces cellules n'ont pas l'organisation et la polarité baso-latérale des cellules épithéliales gastriques. Notamment, ces cellules n'expriment pas l'E-cadhérine. Pour pallier ce défaut, une lignée AGS exprimant de manière stable l'E-cadhérine a été générée, rétablissant la fonctionnalité du complexe E-cadhérine- β -caténine [61].

(2) Les cellules MKN-74

Cette lignée dérive d'un patient japonais atteint d'un carcinome gastrique de type intestinal. Elle ne porte pas de mutation de *CDH1* ni d'hyperméthylation de son promoteur, et exprime donc une E-cadhérine normale. Elle prolifère en colonies cohésives caractéristiques de véritables lignées de cellules épithéliales.

(3) La lignée NCI-N87

Comme la lignée MKN74, cette lignée dérive d'un adénocarcinome gastrique humain différencié et présente des caractéristiques similaires de croissance. Cette lignée n'est sans doute pas homogène dans le degré de différenciation de ses cellules. En effet, le groupe de D. Ménard a isolé, par clonages cellulaires successifs de la lignée parentale, des lignées typiquement épithéliales qui, à confluence, acquièrent de manière homogène une polarité basolatérale et des jonctions fortes intercellulaires parfaitement fonctionnelles [116]. L'un de ces clones présente les caractéristiques de cellules progénitrices peu différenciées, qui rappellent le type de cellules progénitrices agranulaires qu'on trouve dans l'isthme des glandes gastriques. Un autre clone a les caractéristiques de cellules granulaires productrices de zymogènes et de mucines. Dans

des expériences de cicatrisation suite à une lésion mécanique de la couche cellulaire, ce sont les cellules du clone le moins différenciés qui régénèrent le mieux la lésion, en s'allongeant et en acquérant des capacités migratoires.

D'autres lignées souvent mentionnées dans la bibliographie sont mentionnées dans la table 3, qui récapitule les altérations génétiques des différentes lignées. Il faut mentionner également que les réponses à *H. pylori* des cellules épithéliales dans la muqueuse *in vivo* ou en culture *in vitro* peuvent différer considérablement. Par exemple, *H. pylori* ralentit la prolifération des cellules épithéliales *in vitro* [117], alors que, *in vivo*, c'est une augmentation du taux de croissance cellulaire qui est observée dans la muqueuse infectée avec des souches *cag+* [118].

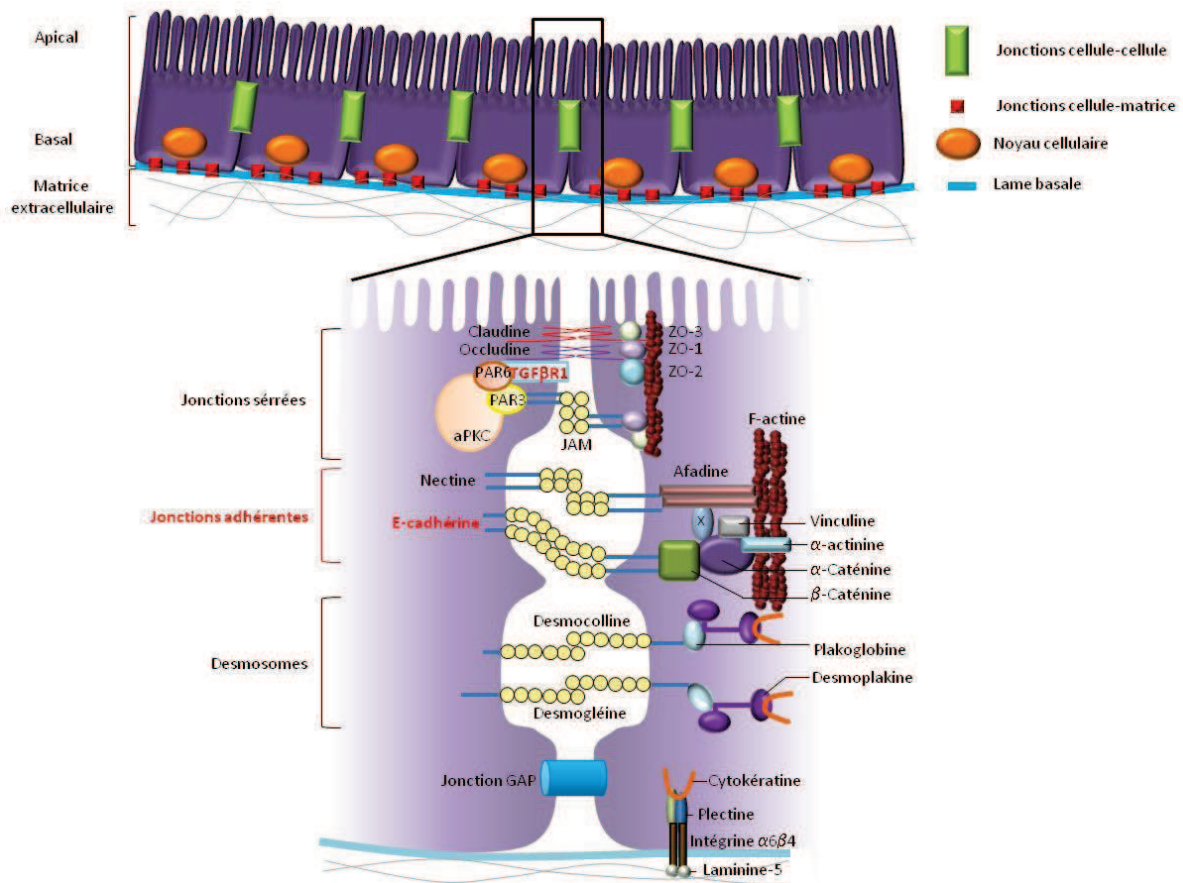


Figure 10: Représentation schématique d'un épithélium et des jonctions cellulaires existantes. Un épithélium est constitué d'une ou plusieurs couches de cellules juxtaposées et cohésives entre elles grâce à la présence de jonctions cellulaires. Il existe une organisation subcellulaire des organites, selon un axe apico-basal. Les différents types de jonctions (serrées, adhérentes, GAP et matrice-cellule) sont représentés en bas de la figure et sont mentionnées les protéines qui les composent. Lors de la TEM, l'ensemble des jonctions cellule-cellule et cellule-matrice est détérioré, notamment par extinction de l'expression de l'E-cadhérine et stimulation des récepteurs au TGF β dont le TGF β R1. Ces deux acteurs sont représentés en rouge. Adapté de [119].

II. La transition épithélio-mésenchymateuse

A. Définitions

1. L'épithélium et les cellules épithéliales

Un épithélium est une barrière naturelle constituée de cellules juxtaposées établissant des contacts étroits entre elles et reposant sur une lame basale. Elles sont associées les unes aux autres grâce à des structures membranaires hautement spécialisées, les jonctions intercellulaires, permettant la communication entre les cellules. L'organisation de ces jonctions confère aux cellules un axe de polarité apico-basal. Au niveau apical, les jonctions serrées assurent l'étanchéité de l'espace intermembranaire entre deux cellules adjacentes, les jonctions d'ancrage, ou jonctions adhérentes, assurent la cohésion mécanique du tissu et les jonctions communicantes sont impliquées dans le couplage métabolique et électrique de deux cellules adjacentes en permettant le passage de petites molécules entre leur cytoplasme. Au niveau du pôle basal, les cellules reposent sur la lame basale et sont associées à la matrice extracellulaire par l'intermédiaire de contacts focaux ou d'hémi-desmosomes composés de récepteurs transmembranaires, les intégrines, liés au cytosquelette d'actine et aux filaments intermédiaires respectivement (Figure 10). Les cellules épithéliales disposent d'une certaine mobilité qui leur permet de se déplacer au sein de la couche cellulaire à laquelle elles appartiennent, mais elles ne peuvent pas normalement se détacher de cette couche.

Les épithéliums simples se renouvellent par glissement le long de la lame basale à partir d'une zone germinative contenant des cellules souches.

2. Le mésenchyme et les cellules mésenchymateuses

Le mésenchyme désigne un tissu embryonnaire à l'origine de diverses formes de tissus chez l'adulte. Il a deux rôles importants : le premier est mécanique en tant que tissu de soutien, le second est métabolique assurant la nutrition et l'échange entre deux tissus. L'architecture mésenchymateuse peut être définie par contraste avec l'organisation épithéliale. Effectivement, les cellules mésenchymateuses ne présentent pas de jonctions intercellulaires permettant une organisation continue entre les cellules, et il y a pas de polarisation cellulaire, les organites intracellulaires étant distribués de manière aléatoire. Ces cellules n'ont que de rares contacts focaux avec les autres cellules et ne reposent pas sur une lame basale. En culture, elles ont une forme de fuseau qui les apparente à des fibroblastes. Enfin, une des particularités fondamentales des cellules mésenchymateuses est une plasticité qui permet leur migration, c'est-à-dire la répétition de phases transitoires d'extension, d'adhésion, de rétraction et de translocation. La migration requiert en outre la sécrétion d'enzymes protéolytiques détruisant la matrice

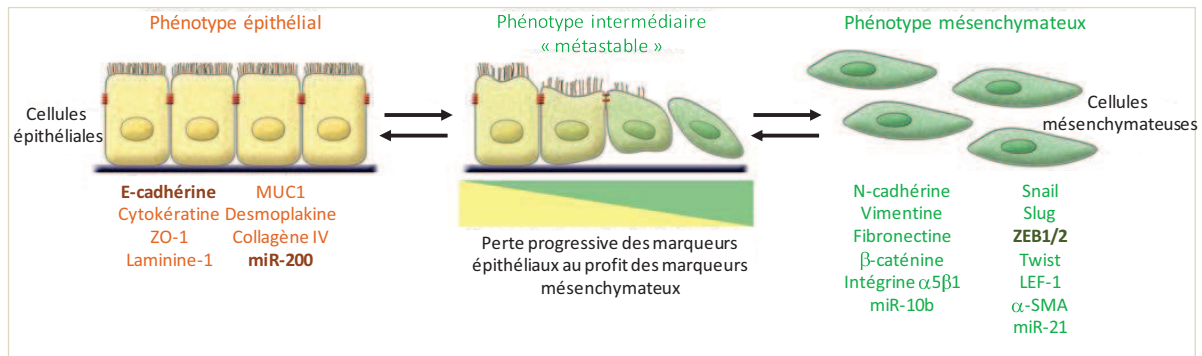


Figure 11: Représentation schématique du changement morphologique des cellules subissant une transition épithélio-mésenchymateuse (TEM). Les cellules épithéliales adhérentes et formant une couche unicellulaire acquièrent des capacités migratoires en tant que cellules isolées et adoptent une morphologie de type fibroblastoïde. L'ensemble des changements morphologiques et comportementaux sont essentiellement dus à une modification du programme génétique des cellules suite à l'intégration d'un signal, le plus souvent externe. Le mécanisme de TEM est réversible, des cellules ayant subi une TEM peuvent acquérir de nouveau un caractère épithélial par la transition mésenchymo-épithéliale (MET). Les deux états extrêmes (épithélial vs mésenchymateux) sont caractérisés par l'expression de marqueurs spécifiques à chaque situation. Ils sont listés sous chaque phénotype. Adaptée de [120].

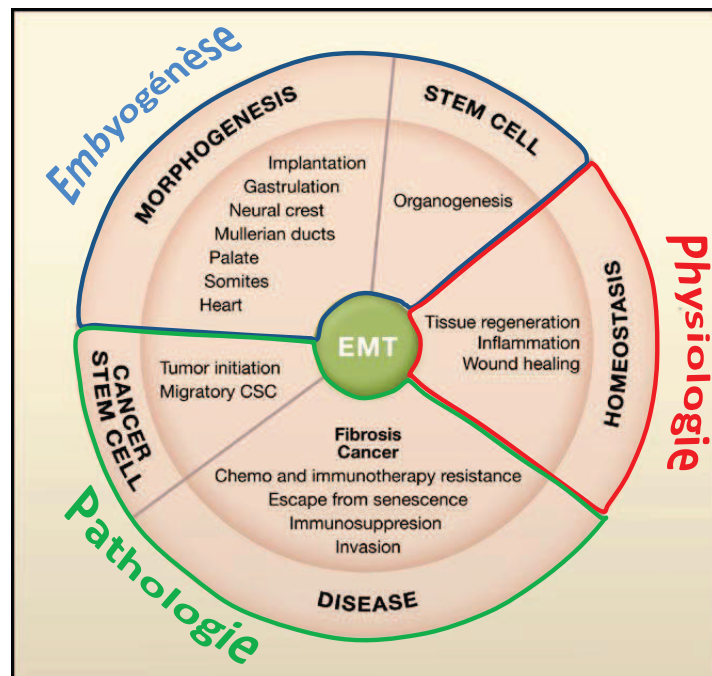


Figure 12: La TEM est impliquée dans plusieurs processus cellulaires dès l'embryogenèse, mais aussi lors de processus de réparation physiologiques et pathologiques. Adaptée de [121].

extracellulaire. Au cours du développement et de la progression tumorale, le mésenchyme peut être un état intermédiaire à la formation d'une structure épithéliale à partir d'une autre structure épithéliale, on parle alors de transition épithélio-mésenchymateuse.

3. La transition épithélio-mésenchymateuse

La transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) caractérise un processus dynamique et réversible, au cours duquel les cellules perdent leurs caractéristiques épithéliales et développent des propriétés mésenchymateuses. Ceci requiert des modifications architecturales et fonctionnelles complexes. La transition d'un phénotype à un autre recouvre un large spectre de modifications inter- et intracellulaires rarement observé en totalité, impliquant que la TEM n'est pas nécessairement un changement complet de lignage cellulaire. Les cellules ayant subi la TEM acquièrent de nouvelles capacités plastiques, comme la motilité et un phénotype fibroblastoïde apolaire typique de cellules mésenchymateuses ; elles deviennent résistantes à l'apoptose. Elles présentent des caractéristiques uniques incluant, d'une part, la perte des caractères épithéliaux telles que les jonctions cellule-cellule, l'organisation du cytosquelette d'actine et la distribution polarisée des organites intracellulaires, et d'autre part, l'expression de marqueurs mésenchymateux et la production de facteurs pro-invasifs (Figure 11).

Ce spectre de modifications survenant au cours de la TEM est lié à l'intégration de nombreux signaux extracellulaires afférents à la cellule et se trouve ainsi à la croisée de multiples processus cellulaires (Figure 12). Cette pression de transition est contrebalancée par des stimuli induisant la transition dans le sens inverse. D'une certaine manière, on peut considérer que la cellule épithéliale peut développer des modifications phénotypiques dont l'amplitude est située sur un axe borné par un phénotype épithélial complet d'un côté et un phénotype mésenchymateux complet de l'autre, sans nécessairement aboutir à une de ces limites. On distingue trois types de TEM. La TEM de type I intervient pendant l'embryogenèse et la formation des tissus. La TEM de type II réfère à une trans-différenciation des cellules lors de phénomènes physiologiques comme la cicatrisation ou la régénération des tissus, mais aussi dans la formation de fibrose. Enfin, la TEM de type III est caractéristique d'un développement pathologique avancé, la néoplasie et la formation de métastases (Figure 13) [120, 121].

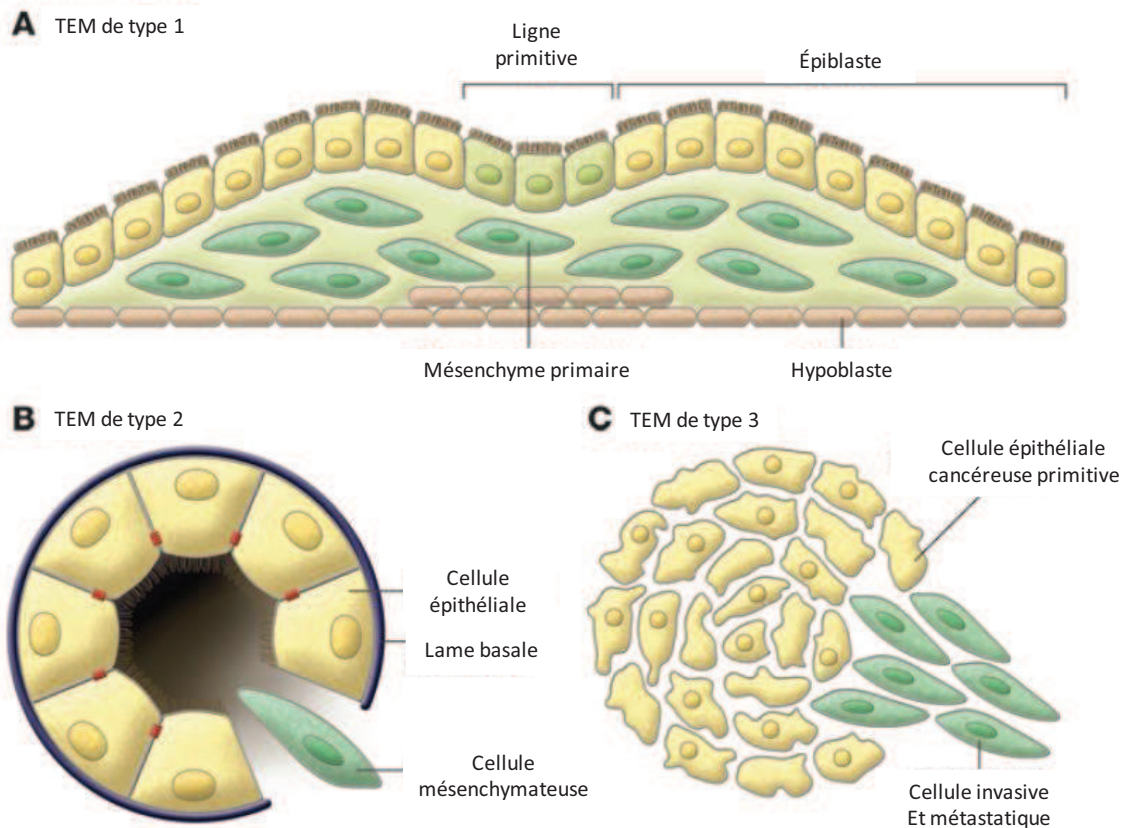


Figure 13 : Classification de la transition épithélio-mésenchymateuse en trois types. **A)** La TEM de type 1 est associée à l'implantation et la gastrulation embryonnaires. L'épithélium primaire et en particulier l'épiblaste donne lieu au mésenchyme primaire par une TEM. Celui-ci pourra alors former un épithélium secondaire par le mécanisme inverse, la MET. **B)** La TEM de type 2 est induite dans un contexte d'inflammation et de fibrose. Contrairement à la TEM de type 1, la TEM de type 2 est induite sur une longue période et peut porter atteinte aux organes. **C)** Finalement, l'épithélium associé aux organes peut se transformer en cellules cancéreuses qui pourront alors subir une TEM afin de permettre l'invasion et la formation de métastases. Ceci correspond à la TEM de type 3. Adaptée de [120].

TEM : transition épithélio-mésenchymateuse.

B. Les marqueurs de la TEM

La TEM est associée à un changement du programme génétique conduisant à l'extinction de marqueurs épithéliaux au profit de la synthèse de protéines caractéristiques de cellules mésenchymateuses. Les marqueurs communément utilisés afin de caractériser le processus de TEM dans un tissu ou des cellules en culture incluent :

- a) la perte de l'E-cadhérine au profit d'une augmentation de la N-cadhérine. La N-cadhérine, comme son nom l'indique, est impliquée dans la formation des jonctions inter-cellulaires dans le tissu nerveux, mais est aussi spécifique des cellules mésenchymateuses (Table 4).
- b) l'expression de facteurs de transcription tels que Snail1, Slug (Snail2), Twist, ZEB1, ZEB2 et E47, qui peuvent inhiber la transcription de l'E-cadhérine (Table 4). Leurs fonctions seront détaillées ultérieurement (§ E. 1. a).
- c) la relocalisation nucléaire de la β -caténine. La fonction de la β -caténine dépend de sa localisation subcellulaire. Dans une cellule épithéliale, elle est sous-membranaire du fait de son interaction physique avec l'E-cadhérine au niveau des jonctions adhérentes. Par contre, dans une cellule mésenchymateuse, elle est dissociée des jonctions par la perte de l'expression de l'E-cadhérine. Elle se retrouve dans le cytoplasme où elle sera, soit dégradée suite à sa phosphorylation par la kinase GSK3, qui sert de signal d'ubiquitination et de dégradation par le protéasome, soit transloquée dans le noyau, où elle s'associe avec les co-facteurs de transcription LEF/TCF afin d'induire ou de réprimer l'expression des gènes cibles (table 4).
- d) l'expression de vimentine, un membre de la famille des filaments intermédiaires, importants pour la structure du cytosquelette. Bien que la plupart des filaments intermédiaires soient des structures stables, la vimentine est une structure dynamique qui apporte une certaine plasticité à la cellule. La vimentine est induite par la β -caténine (table 4).
- e) la production de facteurs pro-invasifs telles que la fibronectine ou la MMP (*Matrix Metallo Proteinase*)-9 (Figure 11 et table 4).

Marqueurs de la Transition Épithélio-Mésenchymateuse

Protéines dont l'expression est augmentée

N-cadhérine
Vimentine
Fibronectine
Snail1
Snail2 (Slug)
Snail3
Twist
ZEB1
ZEB2
Gooscoid
FOXC2
Sox10
MMP-2
MMP-3
MMP-9
Intégrine $\alpha v \beta 6$

Protéines dont l'expression est diminuée

E-cadhérine
Desmoplakine
Cytokératine
Occludine
Ostéopontine (SPP1)

Protéines dont l'activité est augmentée

ILK
GSK-3 β
Rho

Protéines qui s'accumulent dans le noyau

β -caténine
Smad-2/3
NF- κ B
Snail1/2/3
Twist
ZEB1/2

Marqueurs fonctionnels *in vitro*

Augmentation de la migration
Augmentation de l'invasion
Augmentation de la dissémination
Élongation des cellules
Résistance à l'apoptose

Table 4 : Liste des différents marqueurs de la Transition Épithélio-Mésenchymateuse. Adaptée de [122].

C. La transition épithélio-mésenchymateuse physiologique

1. Au cours du développement embryonnaire

La plupart des tissus et organes adultes proviennent de plusieurs séries de conversions des cellules épithéliales en cellules mésenchymateuses, et inversement. La TEM participe à l'embryogenèse pendant la gastrulation et la migration des cellules des crêtes neurales (Figure 14) [123].

La gastrulation, troisième étape du développement des métazoaires survenant dès la troisième semaine du développement embryonnaire chez l'homme, consiste en la mise en place des tissus fondamentaux de l'embryon, par migration cellulaire, avec la formation d'un troisième feuillet, le mésoderme. Celui-ci se situe entre les deux feuillets embryonnaires préexistants, l'endoderme et l'ectoderme (ou ectoblaste). Des cellules migrent depuis l'ectoblaste à travers la ligne primitive, épaississement de l'ectoblaste, formant ainsi le troisième feuillet embryonnaire. Ce processus de TEM s'accompagne de l'induction des facteurs de transcription Snail1 et Snail2 sous l'influence de la sécrétion de molécules appartenant à la famille du TGF β , notamment de Nodal. En se fixant sur des séquences particulières de l'ADN génomique, appelées *E-boxes*, localisées dans le promoteur des gènes cibles, Snail1 et 2 régulent l'expression de certains gènes, et notamment *cdh1* codant pour l'E-cadhérine, dont ils répriment la transcription [124-127]. Ainsi, l'extinction de la synthèse de cette protéine aboutit à la rupture des jonctions intercellulaires adhérentes, libérant la β -caténine dans le cytoplasme. La β -caténine va être transloquée dans le noyau et, par son association avec les co-facteurs de transcription LEF/TCF, va activer la transcription des gènes de marqueurs mésenchymateux et favoriser ainsi le mouvement cellulaire. L'importance de la famille Snail comme répresseurs de transcription a pu être mise en évidence dans des embryons de souris déficients pour ces gènes. En effet, les embryons murins *snail*^{-/-} présentent un défaut de migration des cellules de la ligne primitive et donc un défaut de gastrulation [128]. Il n'a toutefois pas été observé de défauts de différenciation des cellules, en accord avec un rôle de Snail dans les mouvements morphogénétiques plutôt que dans la spécification.

Des événements semblables se produisent lors de la migration des cellules des crêtes neurales. Après la gastrulation, l'épiderme et les territoires neuronaux sont progressivement définis et les crêtes neurales se forment à la jonction de ces deux territoires. Grâce à la TEM, ces cellules peuvent migrer afin de donner naissance à plusieurs types cellulaires qui vont participer à la formation des futures structures nerveuses périphériques, des os et muscles lisses, ainsi que les cellules de la glie et les mélanocytes (Figure 14). Les facteurs impliqués dans la TEM au cours de la migration des cellules des crêtes neurales sont activés par les voies de signalisation de Notch, de l'acide rétinoïque [129], la voie wnt ou la voie des BMP (*Bone Morphogenetic Protein*) appartenant à la superfamille TGF β [130, 131].

Les gènes *sox* participent également à cette TEM, puisque l'expression ectopique des gènes *sox-8*, *-9* ou *-10*, par électroporation dans les cellules du tube neural chez l'embryon de poulet, suffit à induire la TEM et la migration de ces cellules. Toutefois, la différenciation de ces cellules est complètement supprimée [132].

Plusieurs cycles de TEM/TME sont également impliqués dans l'organogenèse du foie [133], du pancréas [134], des valves cardiaques et la formation du palais [135, 136]. Ainsi, dans le cas de la formation du cœur, il s'agit d'une succession de 3 cycles TEM/TME avec comme étape finale, une transition particulière dite endothélio-mésenchymateuse. En effet, ce sont des cellules endothéliales, et non épithéliales, issues du canal atrio-ventriculaire qui migrent et forment le coussin endocardique. Les cellules s'assembleront plus tard pour donner lieu aux valves atrio-ventriculaires [137]. La TEM qui forme les valves est contrôlée par trois voies de signalisations distinctes : la voie TGF β /TGF β R1-2, la voie Notch et la voie ErbB [138-140].

2. Chez l'adulte

Dans l'organisme adulte, la TEM intervient dans la réparation tissulaire.

Les travaux menés par l'équipe du Dr. Nelly Auesrperg ont démontré qu'une TEM se produisait au niveau des ovaires chez la femme adulte au cours des cycles mensuels d'ovulation. Les ovaires sont enveloppés par un épithélium ovarien de surface (EOS). Après extrusion de l'ovule lors de l'ovulation, se met en place un phénomène de cicatrisation de l'ovaire recrutant les cellules de l'EOS. La capacité de ces cellules à subir une TEM a été démontrée *in vitro* et *in vivo* en réponse à une stimulation par des facteurs de croissance et par une altération de leur matrice extracellulaire. Cette TEM tend à préserver l'homéostasie ovarienne [141].

LA TEM intervient au cours de la cicatrisation cutanée en réponse à une blessure. Les kératinocytes en bordure de la lésion acquièrent un phénotype intermédiaire, appelé état « métastable » [122], qui leur permet de se mouvoir sans s'individualiser des autres kératinocytes plus éloignées de la blessure. Les cellules métastables présentent des caractéristiques à la fois de cellules épithéliales et de cellules mésenchymateuses. Cet état est influencé par l'expression de Snail2/Slug dans les kératinocytes localisés au niveau du front migratoire. Effectivement, l'inactivation de Snail2 ou sa sur-expression compromet ou accélère la cicatrisation, respectivement [142].

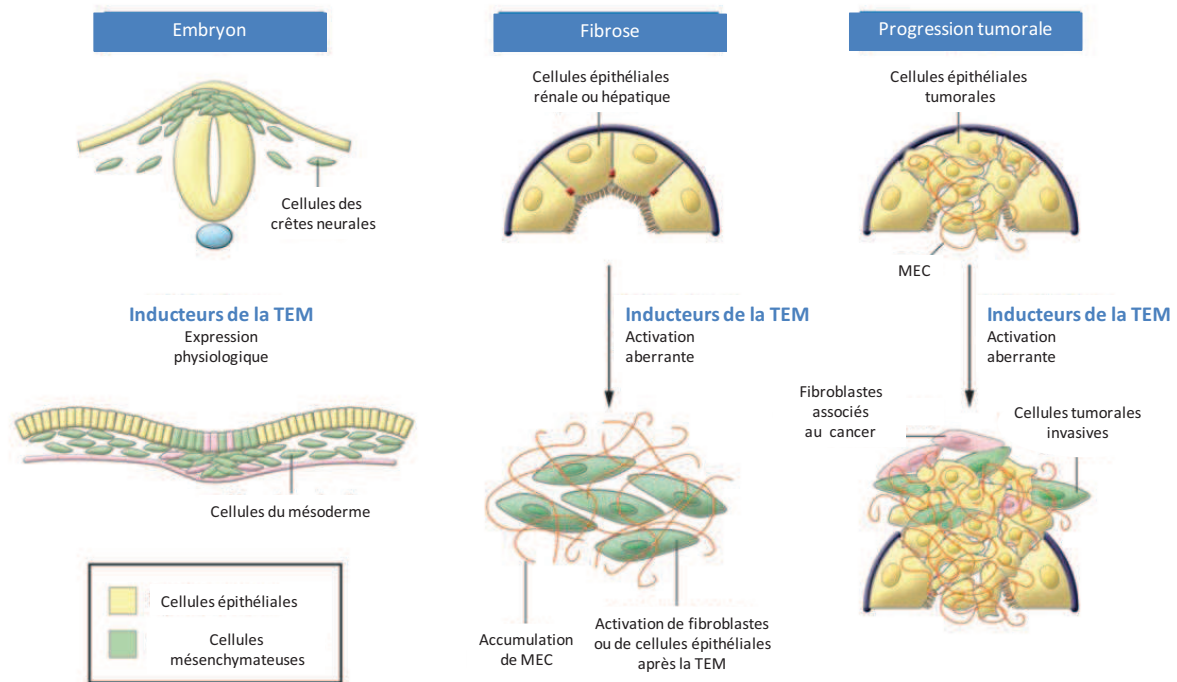


Figure 14 : Exemples de transition épithélio-mésenchymateuse physiologique et pathologique. Au cours de l'embryogénèse, la TEM intervient lors de la migration des cellules des crêtes neurales et de l'ingression du mésendoderme (à gauche). La TEM est également impliquée dans des mécanismes pathologiques tels que la formation d'organes fibrotiques et de métastases (au centre et à droite). Dans les cas pathologiques, l'activation de la TEM est aberrante. D'après [123].

MEC : Matrice Extra-Cellulaire, TEM : transition épithélio-mésenchymateuse

D. La transition épithélio-mésenchymateuse pathologique

Bien que la TEM ait été décrite initialement au cours de l'embryogenèse, ces modifications cellulaires sont reproduites au cours de deux processus pathologiques, la transformation néoplasique et la fibrose. Un profil commun de modifications morphologiques et géniques accompagne ces processus et des études récentes ont montré une remarquable similarité dans les voies de signalisation impliquées au cours de la TEM dans ces pathologies.

1. La fibrose

À l'origine, la fibrose a été décrite comme provenant d'une activation pathologique des fibroblastes du milieu interstitiel convertis en myofibroblastes. Dans les tissus atteints de fibrose, les myofibroblastes s'accumulent et sécrètent un excès de collagène et de composants de la matrice extracellulaire, qui se déposent en fibres, compromettant ainsi la fonction de l'organe. Cependant des études de traçabilité des cellules ont pu montrer la conversion de cellules épithéliales en cellules mésenchymateuses par une TEM, dans la fibrose du rein, de loin l'organe le plus étudié, mais aussi dans celle du poumon ou du foie (Figure 14) [143]. L'induction de la TEM dans les cardiomyocytes, les hépatocytes et les cellules rénales met en jeu l'induction du facteur de transcription Snail, ainsi que l'activation de la voie du TGF β [144].

2. La progression tumorale et les métastases

La TEM intervient de manière prépondérante dans l'évolution de certaines tumeurs, en particulier par l'acquisition d'un potentiel métastatique, qui confère aux cellules néoplasiques des propriétés mésenchymateuses voire de cellules souches [145]. La TEM des cellules cancéreuses leur fait perdre leurs propriétés adhésives et acquérir des propriétés migratoires et protéolytiques nécessaires à la formation de métastases (Figure 14) [146]. Au sein d'une même tumeur, le gain de marqueurs mésenchymateux comme la vimentine, S100A4 (*fibroblast-specific protein* [Fsp1]) ou Snail1, et/ou la perte de marqueurs épithéliaux comme l'E-cadhérine par exemple, sont directement corrélés à la progression tumorale et de mauvais pronostic [119, 124, 127, 147]. L'acquisition de marqueurs mésenchymateux, en particulier de S100A4, est accompagnée d'un phénotype cellulaire invasif, et à l'inverse, sa délétion a un rôle protecteur contre la formation de métastases. Des travaux similaires relatifs à la modulation de l'expression de l'E-cadhérine dans divers modèles néoplasiques, *via* l'expression de répresseurs de sa transcription, dont la liste non exhaustive comprend les facteurs de transcription Snail1/2, Twist, ZEB1/ZEB2, ont mis en évidence que la répression de cette protéine de jonction permettait de produire un phénotype invasif [119].

Cependant, il existe un grand scepticisme sur l'importance de la TEM dans la progression tumorale vers la formation de métastases, du fait que le changement morphologique des cellules, en coupes histologiques de tumeurs primaires, n'est que rarement observé. De plus, les métastases apparaissent histologiquement similaires à la tumeur primaire dont elles ont dérivé [148]. Plusieurs équipes ont essayé de démontrer l'implication de la TEM dans la progression métastatique en analysant l'expression et la localisation de ses marqueurs et inducteurs dans les tumeurs. Ces travaux font état de l'expression des inducteurs de TEM Snail et β -caténine dans les cellules en bordure de la tumeur avec une localisation nucléaire de ces marqueurs, suggérant qu'ils sont actifs en tant que facteur de transcription [149, 150]. La ressemblance phénotypique des tumeurs secondaires par rapport à la tumeur primaire peut être due à une réversion de la TEM, c'est-à-dire à une transition mésenchymo-épithéliale (TME) des cellules qui doivent pouvoir s'implanter en tant que tumeur « cohésive » dans leur localisation secondaire [151]. Cette théorie est soutenue par des analyses de l'expression des marqueurs épithéliaux et mésenchymateux au niveau des sites secondaires tumoraux : en effet, les métastases co-expriment des marqueurs épithéliaux, E-cadhérine et kératine, en même temps que des marqueurs mésenchymateux, vimentine et MMP, reflétant ainsi un état intermédiaire entre la TEM complète et la TME complète, décrit comme un phénotype métastable par le Dr Pierre Savagner [122].

E. Les voies de régulation de la transition épithélio-mésenchymateuse

1. Les inducteurs de la TEM

a) Les facteurs de transcription Snail, Twist et ZEB

Le rôle commun de Snail, Twist et ZEB est la répression transcriptionnelle de *cdh1*, conduisant à l'extinction de l'E-cadhérine. L'E-cadhérine est une protéine essentielle dans le maintien de l'intégrité d'un épithélium. Par conséquent, l'inhibition de sa synthèse est une étape cruciale de la TEM, non seulement au cours du développement embryonnaire mais aussi dans les situations pathologiques chez l'adulte.

Les gènes codant pour les facteurs de transcription Snail1, Snail2 et Snail3 ont été les premiers identifiés comme régulateurs de l'expression de l'E-cadhérine [125]. Les différents membres de la famille Snail sont des facteurs de transcription à doigts de zinc (6 doigts de zinc de type C2H2 sont localisés dans la région C-terminale de la protéine), qui peuvent se lier à l'ADN au niveau de la séquence C/A(CAGGTG), appelée « *E-boxe* ». Snail1 et 2 sont essentiels pendant la gastrulation chez la souris, le développement des crêtes neurales chez l'embryon de poulet et de grenouille et jouent un rôle dans le mouvement et l'adhésion des cellules plutôt que dans la différenciation cellulaire [152].

Gene	Cancer factor type	Associated clinico-pathological features
SNAI1	Breast carcinoma	Lymph node metastasis ^{103,104} ; effusions ^{106,108} ; distant metastasis ^{70,105} ; tumour recurrence ^{107*}
	Ovarian carcinoma	Hypoxia ¹⁶³ ; distant metastasis ¹⁰⁶
	Colon carcinoma	VDR downregulation ^{85,110} ; distant metastasis ¹¹²
	Squamous cell carcinoma	Increased MMP expression ¹¹⁸ ; invasion and distant metastasis ^{116,117} ; expression at the tumour–stroma interface ¹²⁷
	Hepatocarcinoma	Invasive front ¹²⁰ ; poor prognosis ¹¹⁹
	Synovial sarcoma	Spindle phenotype ¹²⁴
SNAI2	Breast carcinoma	Effusions ^{106,109} ; metastasis and recurrence ¹⁰⁸ ; partial differentiation ¹⁰⁵
	Ovarian carcinoma	Overall survival ¹⁰⁶
	Colon carcinoma	Poor survival (independent prognosis factor) ¹¹³
	Squamous cell carcinoma	Lymph node metastasis; invasion and poor prognosis ¹²¹
	Lung adenocarcinoma and mesothelioma	Invasion ¹²² ; overall survival ¹²³
	Melanomas*	Metastasis ¹²⁵
ZEB2	Ovarian carcinoma	Effusions ^{106,109}
	Gastric tumours	Histological type ¹¹⁴
	Pancreatic tumours	Differentiation grade ¹²⁹
	Squamous cell carcinoma	Overall survival ¹²⁸
ZEB1	Uterine carcinoma	Poor prognosis ¹³⁰
	Colon carcinoma	E-cadherin downregulation (Snail-negative tumours) ^{60,110}
TWIST1	Ductal breast carcinoma	Invasion and angiogenesis ¹³¹ ; poor prognosis ¹⁰⁸
	Uterine carcinoma; prostate tumours	Poor survival ¹³⁶ ; metastasis ¹³³
	Gastric tumours	Histological type ¹¹⁴
	Squamous cell carcinomas	Distant metastasis ¹³⁴
	Hepatocarcinomas	Distant metastasis ¹³⁵
	Melanomas	Poor survival ¹³⁷

*Data from cell lines, tumour models or microarray data. MMP, matrix metalloproteinase; VDR, vitamin D receptor.

Table 5: Expression des facteurs de transcription Snail, ZEB et TWIST dans les tumeurs humaines. D'après [126].

D'autres répresseurs de l'E-cadhérine incluent les facteurs de transcription à domaine basique de type hélice-boucle-hélice (bHLH), tels que E47 et Twist. Les facteurs bHLH complexés en homo ou hétérodimères peuvent également se fixer à l'ADN au niveau des boîtes E, mais sur un consensus moins stringent, CANNTG, où N peut être l'une ou l'autre des 4 bases. Cette classe de protéines peut agir en tant qu'activateur ou répresseur transcriptionnel, *via* le recrutement d'enzymes modificatrices de la chromatine telles que l'Histone acétyl-transférase (HAT) p300, ou bien par son interaction avec des co-répresseurs tels que SIN3A. Les facteurs de transcription bHLH sont classés en 7 familles selon leur distribution tissulaire, leur dimérisation et leur spécificité de liaison à l'ADN. Dans le cadre de la TEM, les facteurs les plus représentatifs appartiennent à la classe I qui comporte TCF3 (isoformes E12 et E47), TCF4 codé par le gène E2A et TCF12 (isoformes α et β). Ils ont une expression ubiquitaire et agissent en tant qu'homodimères ou hétérodimères en association avec les facteurs de la classe II. La classe II comporte les facteurs Twist1 et Twist2, qui ont une spécificité tissulaire et sont toujours associés en hétérodimères avec des facteurs de la classe I [153]. Les facteurs bHLH sont impliqués dans la détermination du lignage cellulaire et le contrôle de la prolifération.

Enfin, parmi les régulateurs de l'expression de *cdh1*, on compte les facteurs ZEB (*Zinc finger E-box binding homeobox*). Cette famille de facteurs de transcription comprend deux membres, ZEB1 (δ -EF1) et ZEB2 (SIP1 *Smad Interacting Protein 1*) codés par les gènes *ZEB1* ou *ZFHX1A* et *ZEB2* ou *ZFHX1B*, respectivement. Comme leur nom l'indique, ce sont des facteurs de transcription à plusieurs doigts de zinc (3 à 4 doigts de zinc de type C2H2 et C3H localisés dans un homéodomaine), par lesquels ils interagissent avec l'ADN au niveau de boîtes E dont la séquence bipartite correspond à CACCT et CACCTG, comme celle retrouvée au niveau du promoteur de *cdh1* [154]. ZEB1 et ZEB2 peuvent transactiver la transcription de gènes cibles par leur interaction avec des co-activateurs, PCAF ou p300 pour ZEB1, ou des corépresseurs, CtBP pour ZEB2. Ce sont des facteurs exprimés pendant l'embryogenèse dans le système nerveux central, le cœur, le muscle squelettique et les cellules hématopoïétiques. Un défaut d'expression de l'un des deux facteurs ZEB dans ces tissus peut être partiellement compensé par l'autre, ce qui indique un rôle commun de ZEB1 et de ZEB2. Cependant, l'extinction de ZEB2 par *knockout* chez la souris est létale pour l'embryon, avec des défauts de migration des cellules des crêtes neurales, qui ne peuvent pas être compensés par l'expression de ZEB1 [155].

Chacun de ces facteurs régulateurs de l'expression de l'E-cadhérine sont impliqués dans la formation de cancer comme l'indique la table 5 [126]. Par exemple, l'expression de ZEB1 est importante dans la progression du cancer du colon, tandis que ZEB2 a été étudié dans les tumeurs ovariennes, gastriques, et pancréatiques, où il est associé avec un comportement invasif et agressif des tumeurs.

b) La perte de polarité cellulaire

La perte de la polarité cellulaire fait partie des étapes cruciales de la TEM, en lien avec la perte de l'expression de l'E-cadhérine. Dans les cellules épithéliales, trois complexes protéiques participent à l'élaboration et au maintien de la polarité apico-basale dans la cellule : Par, Crumbs et Scribble. Tous trois et leurs partenaires protéiques sont des cibles régulées lors de la TEM [156]. Snail1 altère la polarité cellulaire en réprimant la transcription de Crumb3 et modifie la localisation des complexes Par et Crumbs au niveau des jonctions. De manière similaire, ZEB1 réprime directement la transcription des gènes de polarité cellulaire, incluant Crumbs3, PATJ (*Paslst1-associated tight junction proteins*) et les membres du complexe de Scribble, LGL2 (*Lethal Giant Larvae 2*) [157].

c) Les protéases de la matrice extracellulaire

Snail et ZEB induisent également l'expression de protéases MMP (*Matrix MetalloProtease*) de la famille des métalloprotéases capables de dégrader la membrane basale, favorisant ainsi l'invasion. De manière intéressante, quelques protéases sont suffisantes pour induire la TEM, certainement en déclenchant une boucle de régulation positive qui stabilise les cellules dans un état mésenchymateux. Ainsi, la protéase MMP3 promeut la TEM en augmentant le niveau des espèces réactives oxygénées (ROS) qui vont à leur tour permettre indirectement l'expression de Snail1 [158]. La MMP13 induit la TEM suite à l'activation de la voie du FGF1 (*Fibroblast Growth Factor 1*) [159]. Des études menées *in vitro* et *in vivo* sur le cancer pancréatique et la formation de métastases ont révélé l'implication de la TEM dans l'induction de l'invasion cellulaire *via* l'induction de Slug/Snail2: le facteur de transcription agirait non pas en réprimant l'E-cadhérine mais plutôt en induisant l'expression de la MMP9, qui va alors permettre la dégradation de la matrice extracellulaire et la modification de l'organisation du cytosquelette d'actine au niveau de pseudopodes. L'ensemble de ces événements favorise la migration des cellules cancéreuses pancréatiques et l'invasion des tissus périphériques [160].

2. Régulation des inducteurs de la TEM

La régulation des inducteurs de la TEM peut se faire de deux manières : soit par une régulation transcriptionnelle qui implique l'activation de voies de signalisation cellulaires induites par des facteurs de croissance, soit par une régulation post-transcriptionnelle faisant intervenir des petits ARN non codants.

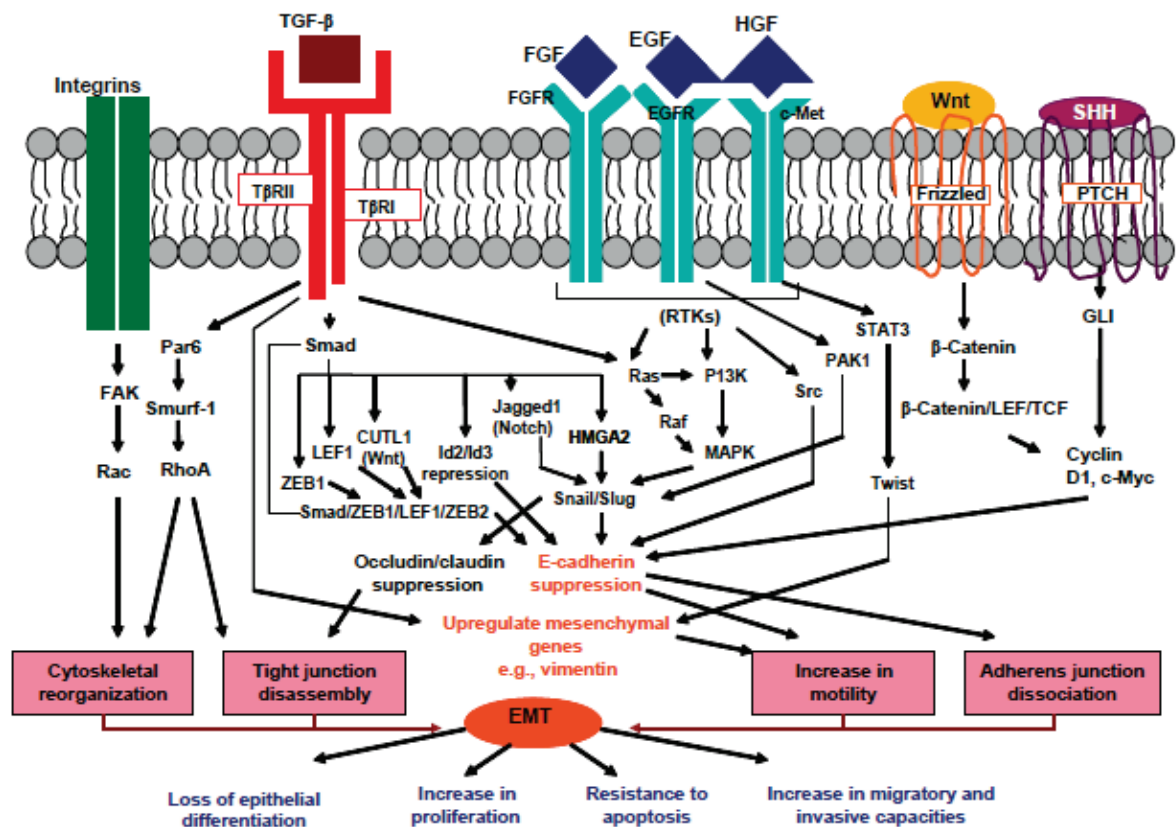


Figure 15 : Ensemble des voies de signalisation intracellulaires inductrices de la TEM. Un grand nombre de facteurs de croissance et de voies de signalisation embryonnaires (Wnt, SHH) sont impliquées dans la régulation et l'induction de la TEM. L'activation des récepteurs membranaires (TβR, Frizzled, PTCH...) permet de cibler les voies régulant la TEM, conduisant aux modifications morphologiques et géniques retrouvées lors de celle-ci (la perte d'adhérence intercellulaire, le gain de mobilité et le réarrangement du cytosquelette). Parmi ces voies, celle du TGFβ (en rouge) reste la plus importante et la plus étudiée. Il existe une régulation autocrine/paracrine de la TEM entre les différents facteurs de croissance et de survie permettant de renforcer la transformation cellulaire vers un processus de TEM [161].

a) Régulation transcriptionnelle de la TEM

L'association d'un facteur de croissance sur son récepteur membranaire à activité tyrosine kinase permet la transduction du signal par le recrutement de protéines kinases cytoplasmiques, telles que les MAPK (*Mitogen-Activated-Protein Kinases*), Src kinase ou encore la PI3K (*Phosphatidyl-Inositol 3-Kinase*). La cascade de signalisation conduit à la transcription des régulateurs transcriptionnels de la TEM, Snail, Twist et ZEB. Au cours des dix dernières années, plusieurs travaux ont montré que la TEM pouvait être provoquée par différents facteurs de croissance, dont la liste non exhaustive comprend non seulement les facteurs EGF (*Epidermal Growth Factor*), HGF (*Hepatocyte Growth Factor*), FGF (*Fibroblast Growth Factor*), PDGF (*Platelet-Derived Growth Factor*), TNF- α (Tumor Necrosis Factor) ou les intégrines, mais également des voies caractéristiques du développement embryonnaire comme les voies Wnt, SHH (*Sonic HedgeHog*) ou Notch (Figure 15).

Cependant, la voie de signalisation majeure de l'induction de la TEM est celle du TGF β (*Transforming Growth Factor- β*). Dans ce paragraphe, je ne détaillerai que la voie du TGF β , les autres voies étant décrites dans la revue de Said and Williams, 2010 [161]. De plus, la cascade de signalisation induite par le TGF β est en étroite connexion avec les autres voies de signalisation citées plus haut et amène ainsi à un phénomène d'amplification en faveur de la TEM (Figure 15).

Dans les cellules normales et dans les étapes précoces de la carcinogénèse, le TGF β joue un rôle protecteur de l'organisme contre des cellules anormales en inhibant le cycle cellulaire et en induisant l'apoptose. Néanmoins, dans les cancers avancés, ce facteur soluble peut promouvoir l'invasion et la formation de métastases, constituant le paradoxe du TGF β . Chez les mammifères, le TGF β s'exprime sous trois formes moléculaires distinctes, TGF β_1 , TGF β_2 et TGF β_3 , qui exercent des actions similaires *in vitro*. La voie de signalisation du TGF β commence par sa liaison de haute affinité à ses récepteurs membranaires, au nombre de trois : le récepteur de type 1 (T β R-I), de type 2 (T β R-II) et de type 3 (T β R-III ou betaglycane). Le T β R-III n'est pas exprimé de manière constitutive et ne porte pas d'activité enzymatique. Les deux autres types de récepteur possèdent une activité sérine/thréonine kinase au niveau de leur domaine cytoplasmique qui initie une cascade signalisation intracellulaire. La fixation du TGF β sur le T β R-II active son activité kinase, qui va trans-phosphoryler et activer le T β R-I (Figure 16). Après activation des récepteurs, T β R-I va se lier, phosphoryler et stimuler des facteurs de transcription Smad2 et Smad3, jusqu'alors latents [162]. Les protéines Smad sont apparentées et se divisent en trois catégories : les R-Smad, dont font partie Smad2 et Smad3, les co-Smad avec Smad4 et Smad4b, et enfin les anti-Smad composés de Smad6 et Smad7. Le complexe formé par Smad2 et Smad3 phosphorylés va rapidement interagir avec le co-Smad. Le complexe hétérotrimérique obtenu va être transloqué dans le noyau, où il va réguler la transcription de gènes cibles impliqués dans

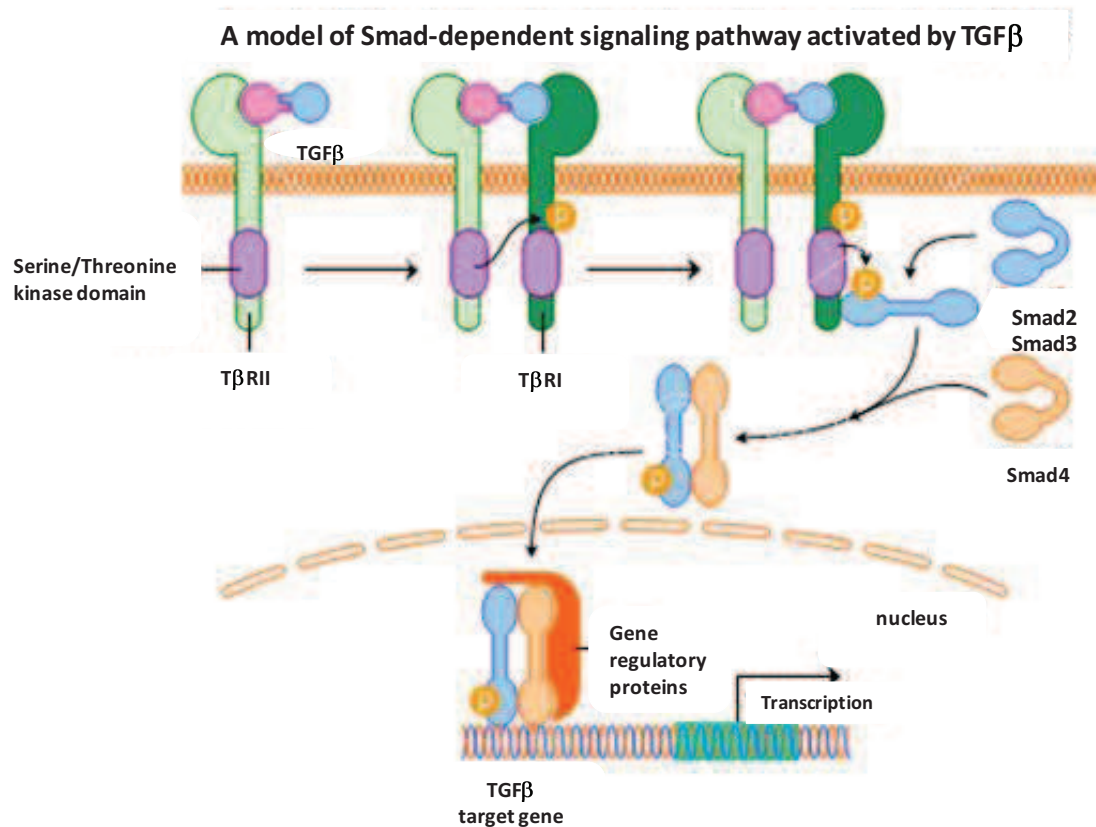


Figure 16 : Schéma de la voie du TGF β . Le facteur soluble TGF β se fixe sur le T β RII ce qui active son domaine Sérine/Thréonine kinase. T β RII va interagir et phosphoryler T β RI. T β RI activé va pouvoir stimuler les facteurs de transcription cytoplasmiques, Smad2/3 (R-Smad). A leur tour, ils vont s'associer à un co-Smad, Smad4 et le complexe va être transloqué dans le noyau où il va activer la transcription de gènes cibles grâce à l'interaction avec des co-facteurs (Source : <http://www.motifolio.com/5111158.html>).

le contrôle de la prolifération, de la différenciation et de la migration cellulaire. Les transformations cellulaires produites par l'activation du complexe Smad2/3 sont dues à la voie canonique de signalisation du TGFβ (Figure 16).

En plus de la voie canonique des Smad, le TGFβ peut interagir avec d'autres effecteurs moléculaires non canoniques comme :

- les effecteurs de la voie des MAPK (*mitogen-activated protein kinases*), ERK1/2, p38MAPK et JNK
- des médiateurs de la survie cellulaire : PI3K, AKT1/2 et mTOR.
- des médiateurs de l'inflammation : NF-κB, la cyclooxygénase-2 (COX2) et les prostaglandines.
- les protéines de la famille des petites protéines G : Ras, RhoA (Ras Homolog gene family, member A), Rac1 et Cdc42.
- des tyrosine kinases : Src, FAK et Abl

De manière intéressante, des travaux ont montré que l'association du TGFβ avec les effecteurs de voies non canoniques était amplifiée dans les cellules cancéreuses métastatiques, outrepassant l'effet suppresseur de tumeur de l'association TGFβ/Smad [163, 164]. Toutefois, la voie canonique peut contribuer à l'induction de la TEM. Le complexe Smad2/3/4 intranucléaire peut se fixer sur les boîtes E au niveau des promoteurs des inducteurs de la TEM Snail1/2, Twist [165] et ZEB1 [166] et induire leur production. Il peut également interagir avec ZEB2, aussi connu sous le nom de *Smad Interacting Protein-1*, SIP1, afin de réprimer la transcription de l'E-cadhérine. De plus, l'expression et l'activité des différents facteurs de transcription inducteurs de la TEM entretiennent une boucle de rétro-régulation positive sur la synthèse de TGFβ et sa sécrétion selon un mode autocrine [167].

b) Régulation post-transcriptionnelle de la TEM : rôle des ARN non codants

Des études récentes ont mis en lumière l'importance de la régulation du phénotype épithélial par les ARN non codants, en contrôlant la traduction des ARNm des inducteurs de la TEM, principalement les facteurs ZEB [168]. De manière intéressante, l'équipe de Cristina Peña [169] a montré que l'expression de ZEB2 reposait sur un épissage alternatif dépendant de l'expression d'un ARN non codant, noté NAT (*Natural Antisense Transcript*). Effectivement, après stimulation de la TEM par Snail, NAT était transcrit et pouvait alors s'hybrider à sa séquence cible, un intron localisé dans la région 5' non traduite de l'ARNm de ZEB2. L'interaction entre NAT et l'intron

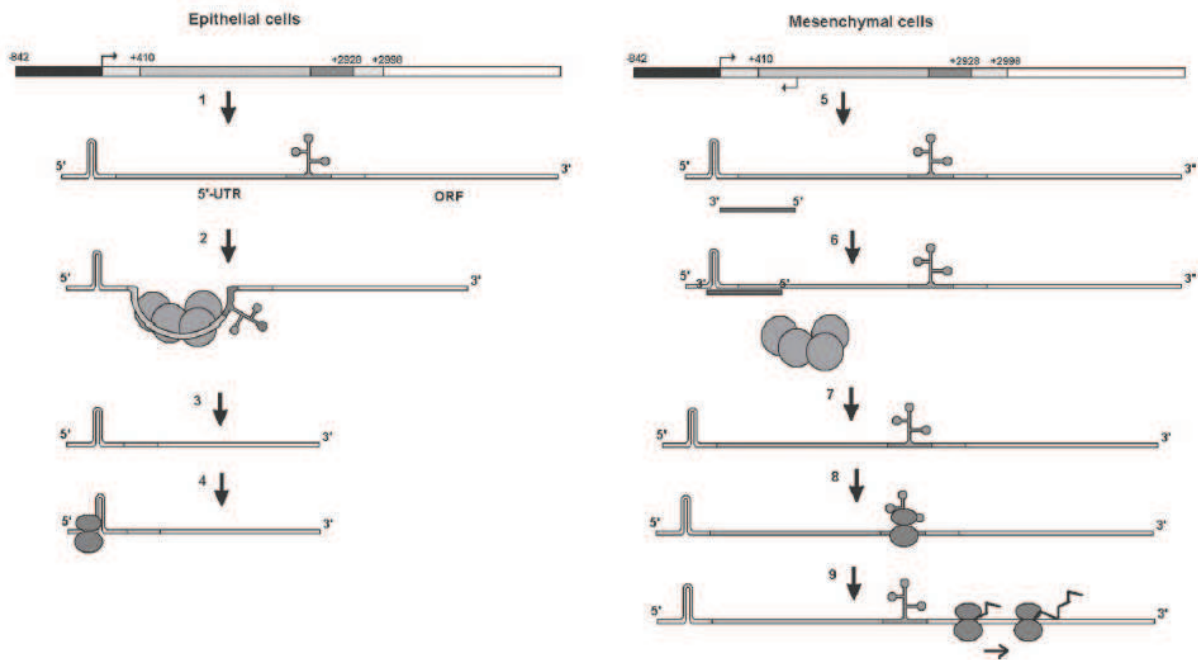


Figure 17 : Régulation de l'expression de ZEB2 dans les cellules épithéliales et mésenchymateuses par un ARN non codant naturellement exprimé. A gauche, dans une cellule épithéliale, La transcription de ZEB2 par son promoteur (boîte noire) génère un ARN composé d'une région 5'NT de 3kb (en gris) et d'un cadre ouvert de lecture (ORF, en blanc). Après fixation du spliceosome, l'intron de 2.5 kb est éliminé, générant un transcrit avec une région 5'NT de 481 nt. Cette région 5'NT contient une séquence inhibitrice de la traduction (tige-boucle qui bloque la progression du ribosome sur l'ARNm *zeb2*). A droite, dans les cellules mésenchymateuses obtenues par la TEM, La transcription de *zeb2* est accompagnée de celle d'un ARN non codant, NAT via l'activation d'un promoteur différent placé en antisens. Le NAT interagit par complémentarité de séquence avec l'ARNm de ZEB2 et empêche l'excision de l'intron par la spliceosome. L'intron conservé contient un site d'entrée du ribosome (IRES) près du codon d'initiation de la traduction. Le ribosome peut alors traduire l'ARNm de ZEB2 [169].

empêche l'épissage de celui-ci, mais permet d'initier sa traduction à partir d'un site interne d'entrée du ribosome et donc l'expression de ZEB2 (Figure 17). Comme l'ARNm de ZEB2 semble être majoritairement traduit à partir de cet IRES, NAT joue un rôle de régulateur positif de l'expression de ZEB2 et Snail1 agit alors comme un inducteur indirect de l'expression de ZEB2 dans les cellules subissant une TEM.

Outre la régulation de l'expression de ZEB2 *via* un épissage alternatif, des travaux concomittants, datant de 2008, ont pu dévoiler le rôle important d'autres petits ARN régulateurs, les microARN (miARN), en particulier ceux de la famille des miR-200 et miR-205 (La description du mécanisme de régulation des miARN, en général et entre les miR-200 et ZEB, sera abordée et détaillée dans une troisième partie) [170-174]. Ces études ont démontré qu'une sur-expression des miARN de la famille des miR-200, notamment miR-200b et miR-200c, aboutissait à une inhibition de l'expression des facteurs ZEB1/2 et par conséquent à une induction de l'expression de l'E-cadhérine. Dans les cellules exprimant les miR-200, leur contrôle s'exerçant de manière post-transcriptionnelle sur leur cible ZEB1/2 est en faveur du maintien du phénotype épithélial. En plus du rôle régulateur des miARN sur ZEB1/2, il existe une boucle de rétroaction négative entre ces miARN et les facteurs ZEB1/2. Cette boucle de double régulation négative (miR-200/ZEB et ZEB/miR-200) peut être considérée comme une balance penchant en faveur de la TEM quand ZEB1/2 sont exprimés au détriment des miARN, ou en faveur de la TME lorsque ce sont les miR-200 qui sont exprimés et qu'ils répriment ZEB1/2 (Figure 29).

III. Les microARN

A. Découverte des microARN

Les microARN (miARN) sont des ARN non codants de 21 à 23 nucléotides de long, qui ont fait leur entrée dans la catégorie des régulateurs de l'expression génique. Au cours de ces dix dernières années, les miARN se sont imposés comme des éléments majeurs du contrôle de l'expression génique au niveau post-transcriptionnel.

Initialement, les microARN ont été découverts grâce à l'étude de *lin-4*, un gène connu pour réguler le développement larvaire du ver *Caenorhabditis elegans*. Ce gène ne codait pas pour une protéine, mais conduisait à la formation de deux ARN de 22 et 61 nucléotides, le plus grand semblant être le précurseur du plus petit [175]. Puis, il a été démontré que la séquence de *lin-4* était inversement complémentaire de régions situées dans la partie 3' non traduite (3'NT) de l'ARNm de *lin-14*. La présence de *lin-4* réduisait le taux de protéine *lin-14* sans en affecter le niveau d'expression de l'ARNm. Ainsi, il a été proposé que *lin-4* régulait négativement la traduction de *lin-14* par sa fixation sur les régions 3'NT de l'ARNm de *lin-14*. *lin-4* est désormais reconnu comme appartenant à la famille des microARN. Ce n'est qu'en 2000 qu'un autre exemple d'ARN non codant régulateur de l'expression des gènes, a pu être identifié, *let-7*, jouant également un rôle dans le développement larvaire de *C. elegans* en ciblant l'ARNm de *lin-41* [176]. Peu de temps après cette découverte, des homologues de *let-7* ont été retrouvés chez l'Homme, la drosophile et beaucoup d'autres espèces d'animaux bilatériens. Ce fut le commencement de la détection des miARN dans une large variété d'espèces. Les miARN furent alors considérés comme des régulateurs exclusifs des organismes multicellulaires. Ceci a amené certains chercheurs à penser que les miARN apportaient un niveau de complexité supplémentaire dans la régulation de l'expression génique, distinguant les organismes multicellulaires des simples organismes unicellulaires. Toutefois, les miRNAs des animaux semblent avoir évolué de manière différente par rapport à ceux des plantes, car leur séquence ainsi que leur biogénèse diffèrent [177, 178].

La découverte de l'existence de miARN dans *Chlamydomonas reinhardtii*, une algue unicellulaire, et chez les virus, a bouleversé cette théorie et a indiqué que les miARN sont probablement issus d'un processus conservé au cours de l'évolution [179]. Actuellement, selon la miRBase v17 (Avril 2011), on dénombre 16772 miARN matures dont 1492 sont retrouvés chez l'homme (<http://www.mirbase.org/>). Les études fonctionnelles réalisées sur les miARN indiquent que ces petits ARN participent à la régulation de quasiment tous les processus cellulaires, puisque toute altération dans leur niveau d'expression est associée à des pathologies (cancers, maladies cardiovasculaires...) [180]. Ces résultats ne sont pas surprenants lorsqu'ils sont comparés à ceux obtenus par les bioinformaticiens, dont les prédictions évaluent à près

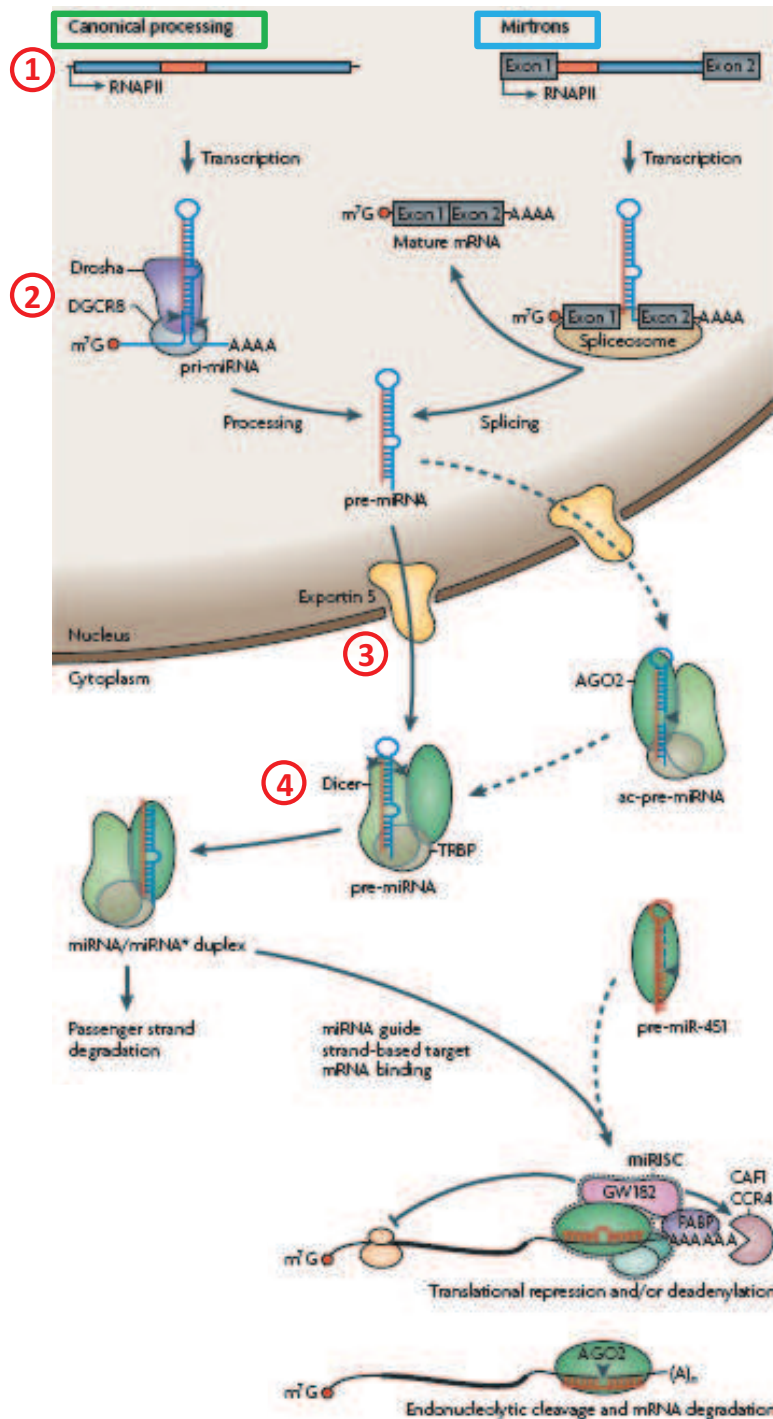


Figure 18 : Voie de biosynthèse des microARN. La voie canonique (encadré vert) et la voie des mirtrons (encadré bleu) sont représentées. La biosynthèse des miARN passe par plusieurs étapes successives et concomitantes : la transcription du pri-miARN dépendante de l'ARN Pol II (1), l'excision du pré-miARN par Drosha/DGCR8 (2), l'export du pré-miARN vers le cytoplasme *via* l'exportine 5 (3), et la maturation du pré-miARN en miARN mature par Dicer/TRBP (4). Le miARN obtenu est alors incorporé dans le complexe RISC, ainsi appelé miRISC, et va guider ce complexe vers une cible potentielle, un ARNm. L'interaction miARN/ARNm se fait par appariement de base généralement dans la région 3' NT de l'ARNm. Le duplex formé engendrera soit l'inhibition de la traduction soit la dégradation du complexe, ou les deux. D'après [181].

de 60% l'ensemble des gènes codant pour des protéines potentiellement régulées par des microARN [182].

B. Biogénèse des microARN

Les séquences codant les miARN sont dispersées dans tout le génome et peuvent être localisées soit dans les introns ou exons de gènes codants ou non codants, soit dans des régions intergéniques. Ainsi, la genèse des miARN se fait selon deux voies en fonction de la localisation de la séquence du miARN dans le génome :

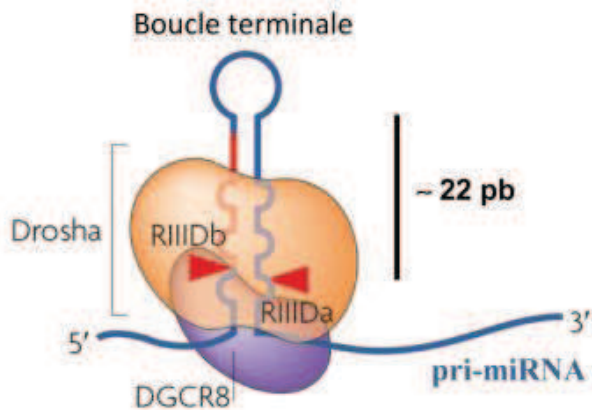
- La voie canonique est constituée de quatre étapes successives : (1) transcription du pri-microARN, (2) clivage par Drosha pour libérer un précurseur pré-microARN, (3) export de ce dernier dans le cytoplasme et (4) clivage du pré-microARN par Dicer pour donner le miARN mature (Figure 18).
- La voie non canonique alternative impliquant le spliceosome diffère dans la production du pré-miARN. Cette voie de biogénèse s'applique aux miARN introniques (Figure 18-20a). Les miRNAs issus de cette voie non canonique furent nommés des « mirtrons » [183, 184].

De même, d'autres miRNAs, dérivant de la maturation d'ARNt ou de *small nucleolar RNA* (snoRNA), ont été décrits [185, 186]. Ainsi, il existerait de nombreuses voies alternatives, soulignant la complexité de la biogénèse des miRNA [187].

1. La transcription des miARN

La génération des miARN est initiée par la production de longs transcrits endogènes, cappés en 5' et polyadénylés en 3'. De ce fait, leur transcription semble être dépendante de l'ARN polymérase II (pol II), qui transcrit les ARNm [188]. Toutefois, une transcription dépendante de l'ARN pol III a été décrite, notamment celle du cluster *miR-517* (ou C19MC) [189]. Qu'ils aient été générés par l'ARN pol II ou l'ARN pol III, ces longs transcrits primaires, appelés pri-miARN, renferment des structures caractéristiques en tige-boucle, correspondant à une tige de 33 paires de bases (pb) terminée par une boucle, entourées de régions simple brins pouvant atteindre plusieurs kilobases (kb). Lorsque des miARNs sont localisés au sein de gènes codant pour des protéines, le pri-miARN se superpose au pré-messager de son gène hôte (40% des cas). Les miARN peuvent également être transcrits à partir de leur propre promoteur. Environ 50% des miARN humains sont retrouvés dans des *clusters* génomiques et synthétisés à partir d'une seule unité de transcription polycistronique.

a) Maturation du pri-miRNA par Drosha.



b) Maturation du pre-miRNA par Dicer.

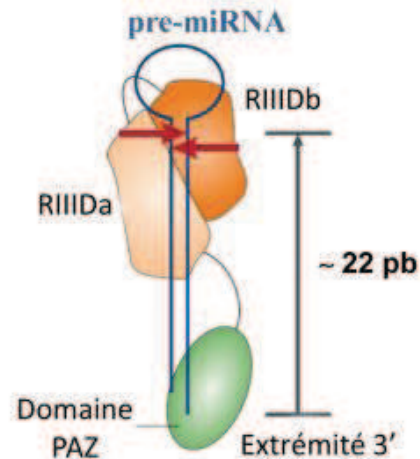


Figure 19 : Mécanisme d'action des enzymes Drosha et Dicer. A) Drosha possède deux domaines RNase III (RIIIDa et RIIIDb) qui interagissent ensemble pour former un dimère où les sites catalytiques sont juxtaposés. Le domaine RIIIDa coupe le brin 3' de la tige du pri-miRNA, tandis que RIIIDb coupe son 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. **B)** Dicer possède également 2 domaines RNase III (RIIIDa et RIIIDb), ainsi qu'un domaine PAZ. En interagissant avec l'extrémité 3' du pré-miRNA, le domaine PAZ permet le positionnement des domaines RNase III de Dicer à ~ 22 pb de cette extrémité. Le clivage du pré-miRNA libère alors un duplexe de 18 à 23 pb de miRNA mature, constitué du brin guide et du brin passager. Adapté de [190, 191].

2. La maturation du pri-miARN

La maturation des miARN débute par le clivage nucléaire du pri-miARN en un fragment en tige boucle de 60-70 nucléotides (nt), le pré-miARN. En effet, le pri-miARN est pris en charge par un complexe multiprotéique appelé *Microprocessor*, composé des protéines Drosha et DGCR8 (chez les vertébrés, ou Pasha chez les invertébrés) [192]. Drosha est une ribonucléase de type III agissant de concert avec DGCR8 (protéine de liaison à l'ARN double brin) pour libérer le pré-miARN. DGCR8 permet le bon positionnement de Drosha au site de clivage, situé 11 pb en amont de la structure tige-boucle du pri-miARN. Le pré-miARN possède alors une extrémité 5' phosphate définitive et 2 nucléotides 3' terminaux non appariés, caractéristiques d'un clivage par une RNase III (Figure 19a).

Dans le cadre des miARN contenus dans les introns d'ARNm, une étude montre que l'excision de ces pré-microARN par Drosha interviendrait sur l'ARN en cours de transcription avant même l'épissage des introns « hôtes » [193]. Toutefois, il existerait une voie alternative minoritaire concernant certains miRNAs introniques (Figure 20b). Dans cette voie, la libération du pré-miRNA ne nécessite pas le clivage par Drosha, mais fait appel à la machinerie d'épissage. Une fois l'excision de l'ARNm réalisé, l'intron en « lasso » ainsi libéré est débranché et se structure en tige-boucle, formant alors le pré-miRNA.

3. L'export cytoplasmique et la maturation du pré-miARN

Le pré-miARN est ensuite transporté activement du noyau vers le cytoplasme par l'exportine 5, un récepteur d'export nucléaire, *via* un mécanisme lié au Ran-GTP [194]. La spécificité de ce transport repose sur des déterminants structuraux du pré-miARN constitués par son extrémité 3' protrudante et la longueur de sa tige. De ce fait, non seulement l'exportine 5 permet le changement de compartiment cellulaire du pré-miARN, mais aussi le protège de la dégradation nucléaire par des ribonucléases. Dans le cytoplasme, le pré-miARN va subir sa dernière étape de maturation catalysée par Dicer, une autre ribonucléase de type III, assistée des protéines TRBP (*TAR RNA Binding Protein*) et PACT (*Protein Activator of PKR*). L'ensemble Dicer/TRBP/PACT forme le *RISC-loading complex*, ou RLC. Une fois le RLC formé, Dicer *via* son domaine PAZ se positionne au niveau de l'extrémité 3' protrudante et, grâce à ses deux domaines RNase III, clive le pré-miARN environ 22 pb après cette extrémité, juste avant la boucle apicale (Figure 19b). Ainsi l'action de l'enzyme Drosha détermine l'extrémité 5' du miARN mature, et Dicer, quant à elle, permet de déterminer l'autre extrémité.

Dicer est une protéine très conservée au cours de l'évolution, indispensable dans tous les organismes testés jusqu'ici. La suppression de l'expression de Dicer conduit à

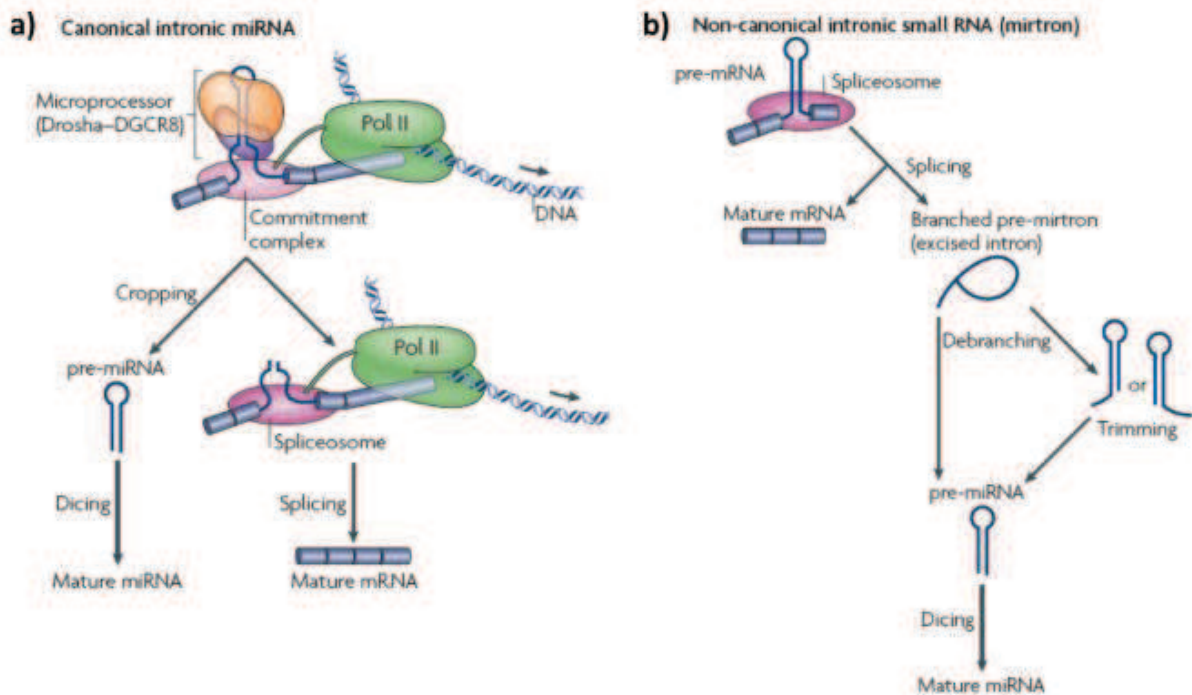


Figure 20 : Les voies alternatives de biogénèse des mirtrons. A) La voie canonique.

Le clivage du pri-miARN, contenu dans l'intron, par Drosha/DGCR8 a lieu pendant la transcription et avant l'épissage de l'intron. Pour des raisons inconnues, l'intron contenant des miARN est épissé de manière plus lente que les introns adjacents dépourvus de miARN. Le pré-miARN ainsi généré entre dans la voie classique de biogénèse des miARN, tandis que le pré-ARNm subit l'épissage pour former l'ARNm mature. **B) La voie non canonique.** 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 pré-miARN. Certains de ces pré-miARN présentent une extrémité simple brin qui est clivée avant l'export cytoplasmique du pré-miRNA. D'après [191].

une diminution voire une extinction de la production des miARN matures et est même létale dès les premiers stades embryonnaires murins. Ceci met l'accent sur l'importance de la biogénèse des miARN. Bien que le génome humain ne comporte qu'un seul gène codant pour Dicer, ce nombre varie selon l'espèce. La drosophile, *Drosophila melanogaster*, possède deux protéines Dicer homologues, associées dans des complexes différents et occupants des fonctions cellulaires différentes. Ainsi, Dicer-1, associé à Loquacious-1 (Loqs-1) est essentiel à la biogénèse des miARN tandis que Dicer-2 combiné à R2D2 joue un rôle important dans la production des siARN [187].

Après le clivage du pré-miARN, le miARN résultant correspond à un duplex de 20 à 23 nucléotides, composé du brin « guide » fonctionnel et du brin « passager » qui sera dégradé. La dissociation de ce duplexe est encore mal connue, mais il est reporté qu'il peut s'associer à différentes hélicases (p68, p72). Le miARN mature serait issu du brin de ce duplex qui aurait l'extrémité 5' la moins stable d'un point de vue thermodynamique [195].

4. Incorporation du miARN mature dans le complexe RISC

Le miARN simple brin est ensuite intégré dans le complexe ribonucléoprotéique nommé RISC (*RNA-induced silencing complex*) ou encore miRISC (*miRNA-induced silencing complex*), afin de le distinguer du mécanisme d'ARN interférence faisant intervenir les siARN [196-200]. Le complexe miRISC contient le miARN mature, les protéines Dicer et TRBP auxquelles sont venues se joindre les protéines Argonautes. Les membres de la famille des protéines Argonautes (AGO) sont les composants les mieux caractérisés de ce complexe. Chez les mammifères, la répression de la traduction d'un ARNm en protéine par les miARN *via* le complexe miRISC dépend de la présence des protéines AGO1-4 [201]. Par contre, lorsqu'un miARN induit le clivage de l'ARNm dont il lie la région 3' NT, seule AGO2 peut assurer cette fonction dans le miRISC, car c'est le seul membre de la famille des protéines Argonautes à posséder une fonction ribonucléase apportée par son domaine PIWI (*RNaseH-like P element induced wimpy testis*) (Figure 21) [202]. Le miARN chargé sur le miRISC va guider ce dernier sur un ou plusieurs ARNm cible(s) portant une ou plusieurs séquences complémentaires à celle du miARN. Cette fixation va induire la répression de la traduction de l'ARNm ciblé. De tels appariements prennent place généralement dans la région 3' NT des ARNm, mais il a également été montré des régulations en 5'NT [203].

C. Principe de l'interaction miARN-ARNm

Le complexe miRISC se fixe sur l'ARNm cible au niveau de régions spécifiques plus ou moins complémentaires de la séquence des miARN, appelées MREs pour *miRNA Recognition Elements* [204-206]. Cet appariement suit des règles précises, dont certaines

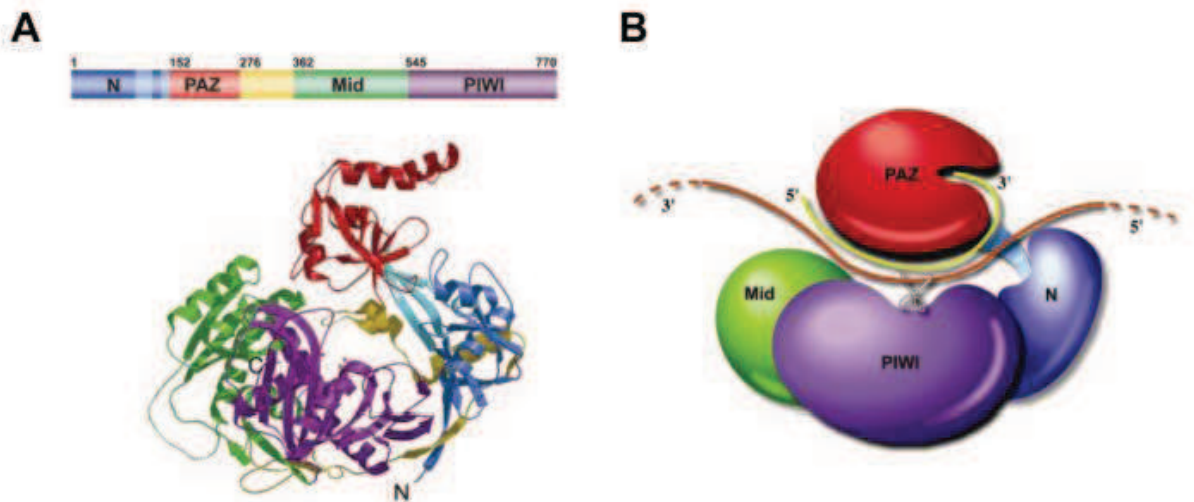


Figure 21 : Structure et fonction de la protéine Argonaute de *Pyrococcus furiosus*.
A) Structure schématique (haut) et crystal (bas) de la protéine AGO de *P. furiosus*. Les différents domaines sont représentés : PAZ (rouge), Mid (vert) et PIWI (violet). **B)** Représentation schématique du modèle du 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 [207].

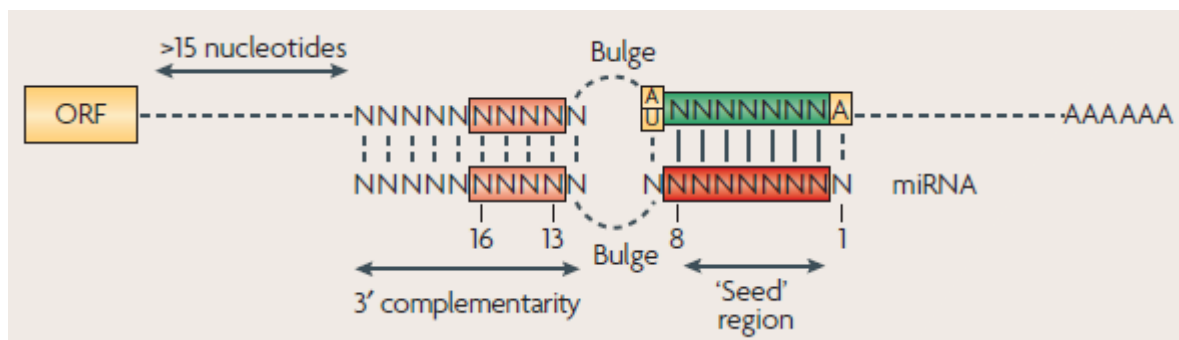


Figure 22 : Principes de l'interaction miARN/ARNm. Les miARN se lient à l'ARNm cible par appariement de bases. Chez les plantes, la plupart des miARN sont strictement complémentaires de leur cible et induisent la dégradation de l'ARNm. Au contraire, les miARN des métazoaires se lient à l'ARNm cible de manière imparfaite suivant un schéma précis de reconnaissance : 1) le respect de la complémentarité stricte au niveau de la séquence graine (encadré rouge), 2) la présence d'un boucle ou mésappariement dans la partie centrale du miARN, 3) une complémentarité suffisante dans la partie 3' du miARN surtout au niveau des résidus 13-16 (encadré orange). D'après [208].

sont indispensables à la répression exercée par le miARN sur l'ARNm. Les différents exemples de duplexes miARN-ARNm effectifs décrits dans la littérature [208, 209], associés aux recherches bioinformatiques pour dégager des règles et construire des algorithmes utilisables pour la prédiction de MRE, a permis de définir les règles suivantes (Figure 22) :

- 1- L'hybridation entre le miARN et l'ARNm doit être parfaite en 5' de la séquence du miARN, entre les nucléotides 2 et 8 du miARN. C'est ce qui constitue le noyau de nucléation du duplexe miARN-ARNm, appelé *seed* ou graine. Tout mésappariement, ou appariement de type G:U, à ce niveau, affecte considérablement l'efficacité de la régulation par le miARN [210]. De plus, un résidu A, en position 1 du miARN, et /ou un résidu A/U en position 9 du miARN, c'est-à-dire de part et d'autre de la graine, augmenterait l'efficacité de la répression suite à la liaison du microARN à l'ARNm [211]. Toutefois, la présence de ces deux résidus ne semble pas indispensable, puisqu'ils ne rentrent pas dans la région d'appariement nécessaire.
- 2- La deuxième règle est définie par la présence d'une boucle, ou d'un petit mésappariement, dans la région centrale du duplexe miARN-ARNm. L'application de cette règle préviendrait le clivage endonucléolytique catalysé par AGO2.
- 3- La troisième règle est définie par l'appariement nécessaire entre le miARN et l'ARNm dans la deuxième moitié du miARN. La complémentarité d'appariement à ce niveau participe à stabiliser le duplexe miARN-ARNm. L'hybridation dans cette région n'est pas aussi exigeante qu'au niveau de la graine, puisque des mésappariements sont possibles [209].

En plus de ces règles, d'autres facteurs peuvent influencer l'efficacité de la répression due à la liaison du miARN à l'ARNm, tels que (1) la richesse en dinucléotides AU à proximité du site de liaison du miARN, (2) la proximité de ce dernier du codon stop (ceci est particulièrement vrai pour un ARNm ayant une région 3'NT longue, mais il faut toutefois que le site de liaison soit situé au moins 15 bases en aval du codon stop), (3) la proximité de ce site de liaison avec d'autres sites de liaison pour d'autres miARN, ce qui entraînerait une coopération et/ou une redondance entre des miARN pour la répression de la traduction d'un ARNm [209]. Ainsi, la définition de l'interaction miARN-ARNm met en lumière le fait qu'un miARN peut cibler plusieurs ARNm possédant la séquence graine dans leur région 3' NT, mais aussi qu'un ARNm peut être ciblé par plusieurs miARN par la présence de plusieurs séquences graines différentes dans la région 3' NT.

Toutefois, comme à toute règle, il existe des exceptions et de plus en plus d'exemples remettent en cause ces principes (pour revue,[212]). Par exemple, les 2 premiers miARN identifiés, lin-4 et let-7, présentent un mésappariement dans leur région graine et, pour lin-4, une faible complémentarité dans la région 3', et sont

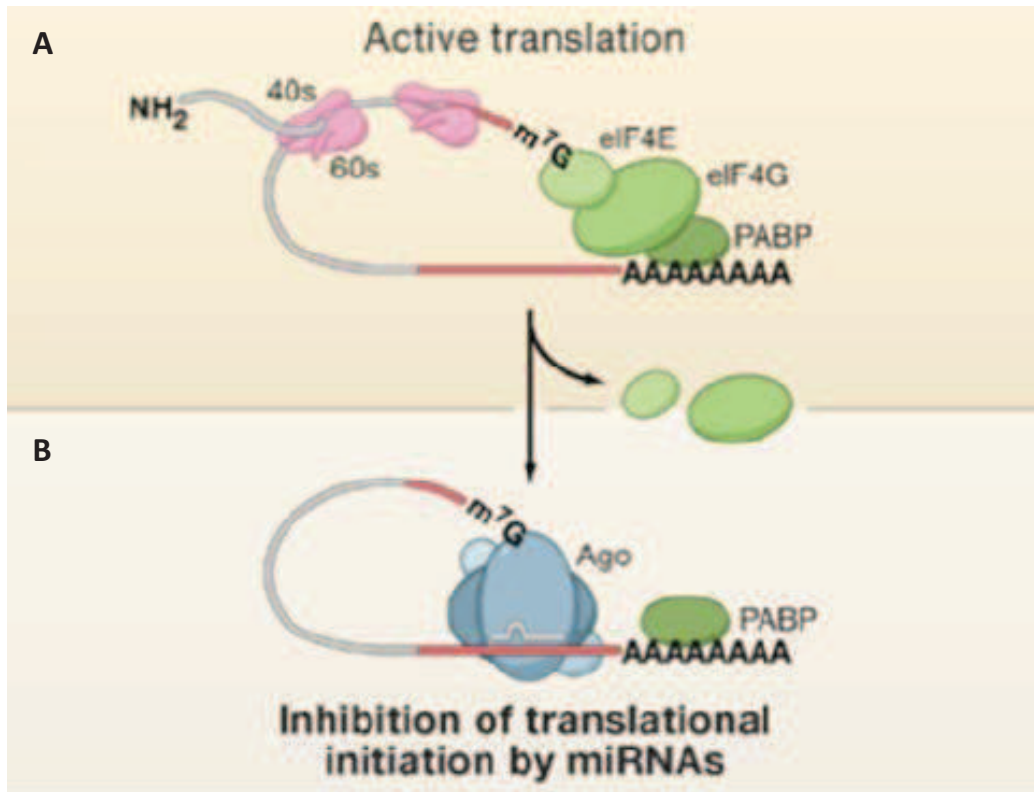


Figure 23 : Compétition entre eIF4 et AGO2. **A)** Schéma classique de l'initiation de la traduction de l'ARNm non régulé par un miARN. Le complexe eIF4F, formé de eIF4E/G/A, se lie à la coiffe et à la queue pol(A) des ARNm afin de permettre le recrutement des ribosomes et induire la traduction. **B)** l'interaction miARN-ARNm engendre une compétition entre eIF4F et AGO2, favorisant l'inhibition de la traduction de l'ARNm. D'après [213].

néanmoins efficaces. De même, de plus en plus de miARN sont décrits comme ciblant des sites présents dans les cadres ouverts de lecture d'ARNm. Ainsi, les ARNm des facteurs de transcription des cellules souches, Nanog, Oct4 et Sox2 sont ciblés par des miARN au niveau de leur séquence codante [214].

À la différence des siARN et des miARN des plantes, la répression post-transcriptionnelle régie par les miARN chez les animaux n'implique pas le clivage de l'ARNm cible, même si le miARN 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 miARN seraient capables de réprimer la traduction des ARNm cibles et/ou induire leur dégradation. Plusieurs mécanismes de répression ont été proposés.

D. Mode d'action des miARN

Les modalités d'action du complexe miRISC sont relativement mal comprises, mais semblent contrôlées par la qualité du duplex miARN-ARNm mis en jeu. Si la complémentarité est parfaite, le complexe induit alors un clivage au milieu de l'hybride miARN-ARNm entraînant la dégradation rapide de l'ARNm [197, 215-217]. Ainsi, comme les siARN, les miARN peuvent promouvoir la dégradation de l'ARNm cible. En revanche, si cette complémentarité est imparfaite (présence de mésappariements dans le duplex miARN-ARNm), on observe alors une inhibition de la traduction sans dégradation de l'ARNm cible.

1. Inhibition de la traduction par les miARN

a) Régulation au niveau de l'initiation de la traduction

L'extrémité 5' des ARNm eucaryotes possède une structure coiffe (*cap*) qui joue un rôle important dans l'initiation de la traduction et protège contre la dégradation précoce des ARNm. La coiffe est formée d'une guanosine modifiée par ajout d'un méthyle en position 7 (m7G). L'interaction de cette coiffe avec les facteurs d'initiation (eIFs : *eukaryotic Initiation Factors*) permet de recruter la sous-unité 40S au niveau de la région 5' NT des ARNm. Cette étape fait intervenir au moins onze facteurs protéiques [218], dont eIF4E, eIF4G et eIF4A qui forment le complexe eIF4F, une cible clé pour réguler l'initiation de la traduction (Figure 23a). Différentes équipes ont démontré que la coiffe et la queue poly A des ARNm cibles sont nécessaires à l'inhibition de la traduction par les miARNs (Figure 23b) [219-221]. Mathonnet *et al.* ont utilisé une construction permettant la transcription d'un ARNm rapporteur avec, dans sa région 3' NT, des séquences spécifiques du miARN let-7 et ont démontré que let-7 empêche le recrutement des ribosomes au niveau de l'ARNm rapporteur [222]. En revanche,

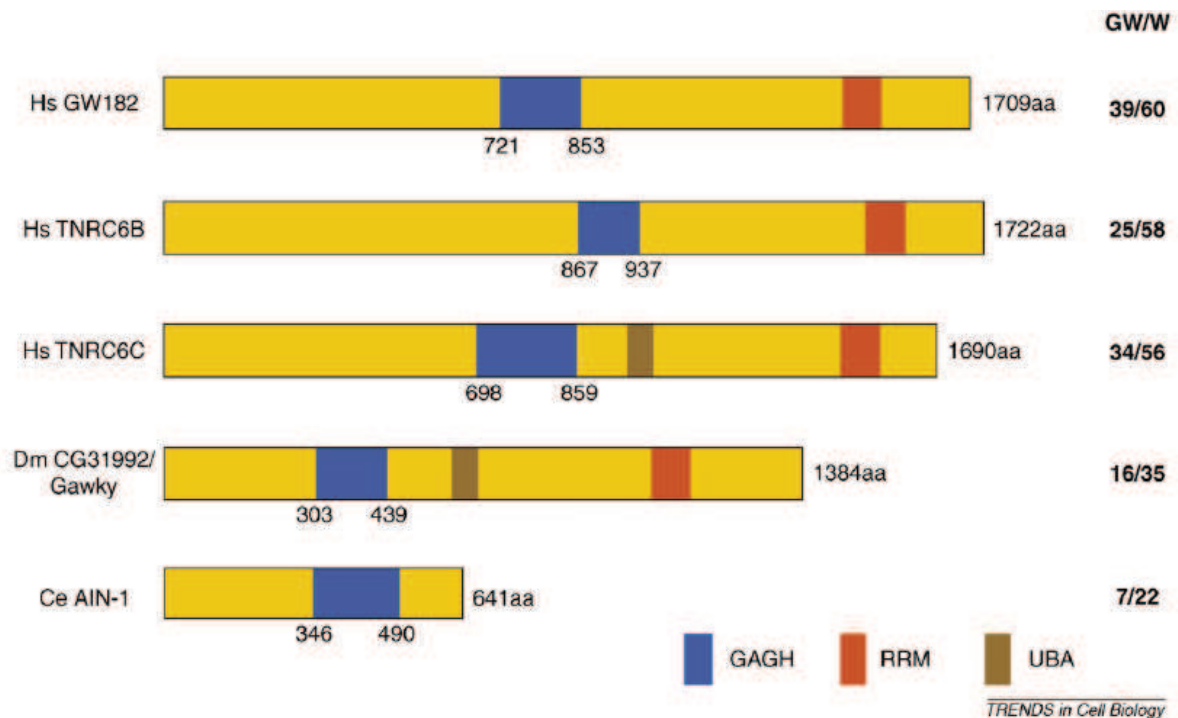


Figure 24 : Structures et conservation des protéines de la famille GW182. Sont représentées les protéines GW182 de l'Homme (Hs GW182 ou TNRC6A, TNRC6B, TNRC6C), de la drosophile (Dm) et du ver *C. elegans* (Ce). Elles sont caractérisées par un domaine RRM (domaine de reconnaissance de l'ARN : rouge), conservé dans quasiment toutes les espèces, et d'une répétition de résidus Glycine/Tryptophane (GW). GAGH (*GW182/AIN-1/Gawky homolog*, bleu) correspond au domaine unique conservé dans tous les homologues de protéines GW182 alors que le domaine UBA (*Ubiquitin-association domain*, marron) a une contribution fonctionnelle non déterminée. À droite, GW/W correspond au nombre de tryptophanes adjacents d'une glycine par rapport au nombre de tryptophanes totaux contenus dans la protéine. D'après [223].

l'addition du complexe d'initiation de la traduction eIF4F, qui se fixe sur la coiffe [224, 225], lève l'inhibition, ce qui démontre l'importance de la coiffe et la compétition de miRISC fixé en 3' NT avec un facteur d'initiation de la traduction, intervenant sur la coiffe en 5' NT.

b) Les protéines Argonautes

Les protéines AGO appartiennent à une famille de protéines de 95kDa qui contiennent deux motifs caractéristiques PAZ et PIWI retrouvés chez de nombreux organismes (Figure 21) [226]. Comme il a déjà été mentionné précédemment, les protéines AGO se lient directement aux miARN et sont les protéines principales du complexe miRISC [196-200, 217]. Des études de biochimie, de génétique et de cristallographie ont montré que le domaine PIWI a une activité ribonucléase H [207, 227, 228] et qu'AGO2 a une activité endonucléase qui catalyse le clivage du duplex miARN-ARNm [216, 217]. Cependant certaines expériences montrent que les protéines AGO induisent un blocage de traduction mais pas une dégradation de l'ARNm cible [201, 220].

Kiriakidou *et al.* ont montré que la protéine AGO2 contenait également un domaine de liaison à la coiffe m7G, et agirait au sein du complexe miRISC par compétition avec eIF4E afin de bloquer l'initiation de la traduction (Figure 23) [229].

c) Les protéines GW182

Les protéines GW182 ont été découvertes en 2002 comme une famille de protéines de 182 kDa contenant beaucoup de répétitions glycine-tryptophane et un motif RRM (*RNA Recognition Motif*) permettant de reconnaître les ARN (Figure 24). On dénombre trois paralogues GW182 chez les mammifères, TNRC6A, TNRC6B et TNRC6C alors que chez *D. melanogaster*, il n'existe qu'une seule protéine GW182. De plus, GW182 est capable de recruter des enzymes de déadénylation, qui hydrolysent la queue polyA des ARNm. De nombreuses études ont permis de démontrer que ces protéines, très conservées au cours de l'évolution, sont capables de s'associer aux protéines AGO et font partie du complexe RISC.

L'équipe de Wakiyama *et al.* a établi une lignée HEK293 qui surexprime AGO2 et GW182. En utilisant des ARNm biotinylés, cappés et polyadénylés contenant 6 sites spécifiques pour let-7, ils ont montré que les protéines AGO2 et GW182 étaient spécifiquement recrutées et que l'ARNm rapporteur était déadénylé de façon dépendante de let-7 [230]. De plus, une inactivation des protéines GW182 par ARN interférence entraîne une diminution de la répression dépendante des miARN [231-233].

Il a également été montré que ces protéines étaient localisées dans les *processing bodies* (PBs), tout comme les protéines AGO et que leur inactivation empêchait la formation des PBs [231].

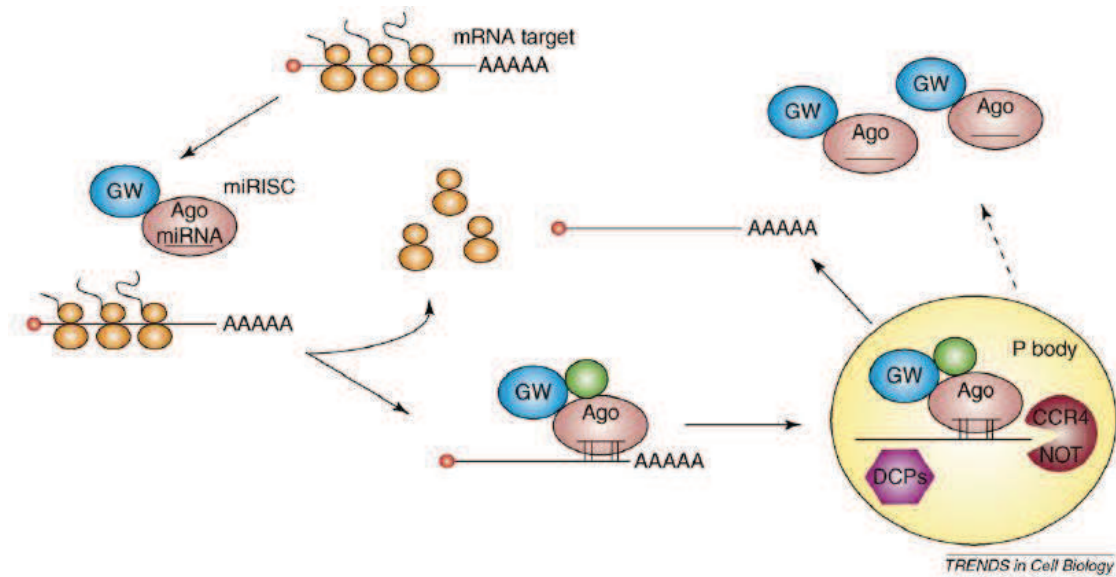


Figure 25: Adressage des ARNm dans les *Processing Bodies* par le complexe **miRISC.** miRISC composé d'AGO, du miARN et des GW182 (GW) cible l'ARNm. L'interaction physique entre miRISC et l'ARNm libère les ribosomes (orange). S'opèrent alors des changements dans le miRISC (recrutement de facteurs : vert) conduisant à la relocalisation du complexe dans les PBs. Une fois dans les PBs, les ARNm peuvent être décapés par l'enzyme DCPs, et déadénylés par CCR4-NOT ou bien être stockés pour être relargués ultérieurement dans le cytoplasme. Les PBs seraient alors des lieux de stockage/relargage afin de permettre le recyclage des ARNm et des miRISC. D'après [223]

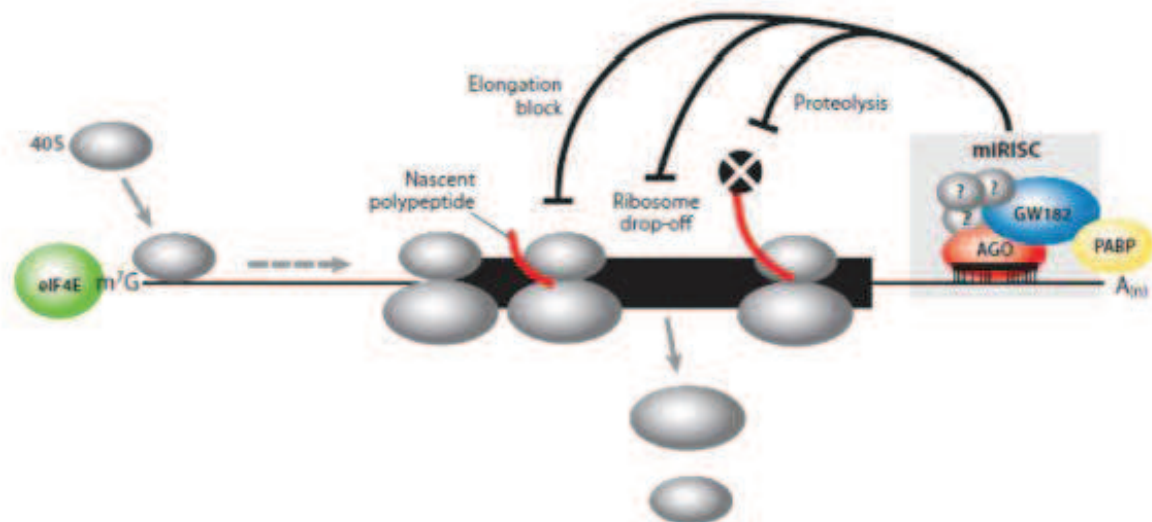


Figure 26: Mécanisme de répression post-traductionnelle dirigé par les miARN. Le complexe miRISC peut inhiber la traduction au niveau post-initiation en bloquant l'élongation et provoquant le décrochage du ribosome ou en facilitant la dégradation du peptide néosynthétisé. Les sous-unités 40S et 60S du ribosome sont représentées par des sphères grises. D'après [234].

d) Les Processing Bodies (PBs)

Les PBs sont des lieux de stockage cytoplasmiques d'ARNm, enrichis en enzymes [235]. Les ARNm peuvent y être décappés et dégradés (Figure 25). Dans les cellules HeLa, Pillai *et al.* ont montré que let-7 inhibe l'initiation de la traduction de son ARNm cible en le séquestrant dans les PBs de façon cap-dépendante [220]. Il a également été démontré que les miARNs peuvent être séquestrés dans ces PBs [220, 232, 236]. Dans certaines conditions cette séquestration est réversible. Par exemple, dans les cellules hépatiques Huh7, miR-122 inhibe l'initiation de la traduction de sa cible CAT-1 (*Cationic Aminoacid Transporter 1*) et la séquestre dans les PBs [237]. Cette inhibition est reversée quand les cellules sont soumises à un stress, ce qui entraîne le relargage de l'ARNm de CAT-1 et le recrutement des polysomes.

Ainsi les PBs correspondent à des foyers cytoplasmiques servant de lieu de stockage et/ou de dégradation des ARNm cibles. Par conséquent, ils sont enrichis en enzymes inhibitrices de la traduction, de déadénylation, de *decapping* et de dégradation des ARNm. Ce sont des structures dynamiques d'où les protéines et les ARNm rentrent et sortent continuellement. Le nombre et la taille des PBs dépendent de l'activité traductionnelle de la cellule.

e) Répression post-initiation

La régulation de la traduction par les miARNs est désormais bien documentée au niveau de l'étape d'initiation de la traduction. Cependant, différentes études montrent que les miARN co-sédimentent avec les polysomes, suggérant une régulation de la traduction au stade de l'élongation [238-242]. Il a également été montré que les polypeptides naissants sont rapidement dégradés lorsque les ARNm sont sous le contrôle des miARN [239]. Enfin, certains miARNs sont capables d'inhiber la liaison des ribosomes sur l'ARNm cible [241].

2. Dégradation des ARNm cibles

En plus de leur fonction d'inhibition de la traduction, les miARN peuvent également induire la dégradation de leur ARNm cible, comme les siARN. Si la complémentarité avec l'ARNm cible est parfaite, alors le miARN peut induire sa dégradation [197, 210, 243]. La coupure se fait toujours au même endroit entre les nucléotides 10 et 11 du miARN [197, 215, 244].

Cependant, il semblerait que chez les mammifères, la dégradation des ARNm cibles soit moins fréquente que l'inhibition de la traduction due aux miARN. En effet, la majorité des miARN affecte le niveau de protéines sans pour autant diminuer le niveau d'ARNm [245]. La dégradation des ARNm cibles pourrait être secondaire à l'inhibition de la traduction. Mathonnet *et al.* ont utilisé une construction permettant la

transcription d'un ARNm rapporteur avec des séquences spécifiques du miARN let-7 dans sa séquence 3' NT. Ils ont démontré que, bien que la traduction soit inhibée, le niveau d'ARNm rapporteur ne variait pas dans un premier temps, mais diminuait ultérieurement de façon dépendante de let-7. Ces résultats suggèrent que l'inhibition de la traduction est un événement précoce mais que la dégradation de l'ARNm peut être une étape secondaire [222]. En effet, la stabilité de l'ARNm cible dépend de la structure du duplex miARN-ARNm. Les duplex contenant une boucle sortante conduisent à une inhibition de la traduction mais ne déstabilisent pas l'ARNm cible, alors que les duplex contenant deux boucles opposées conduisent à une dégradation de l'ARNm cible [229, 246].

3. Activation de la traduction

Vasudevan *et al.* ont démontré que les miARN n'étaient pas exclusivement des répresseurs traductionnels, mais qu'ils pouvaient également jouer un rôle d'activateur traductionnel selon les phases du cycle cellulaire [247]. Ils ont utilisé le modèle de régulation du TNF α qui contient des séquences ARE (*AU-Rich Element*).

Ces séquences sont situées dans les régions 3' NT des ARNm comme les sites de liaison des miARN et elles permettent une régulation post-transcriptionnelle des ARNm. Or, dans des conditions de privation de sérum et donc d'arrêt du cycle cellulaire en G₀/G₁, le complexe AGO2-FXR1 (*fragile X mental retardation-related protein 1*) est recruté au niveau des séquences ARE de l'ARNm du TNF α , et entraîne une activation de sa traduction [248]. AGO2 intervenant également dans le complexe miRISC, les auteurs ont recherché les miARN complémentaires des séquences ARE du TNF α . Parmi les candidats, ils ont démontré que miR-369-3 était nécessaire à l'activation de la traduction du TNF α , *via* sa liaison aux séquences ARE, dans des conditions de privation de sérum. Afin de vérifier si les miARN étaient capables d'activer la traduction de leurs cibles, ils ont utilisé un système rapporteur contenant dans la région 3' NT de l'ARNm de HMGA2 (*High Mobility Group Gene A2*), une cible de let-7 qui porte 4 sites de liaison à ce miARN. Ils ont démontré que let-7 stimulait la traduction de sa cible lorsque le complexe AGO2-FXR1 est recruté dans des conditions de privation de sérum [247]. Les miARN seraient donc des répresseurs traductionnels dans les cellules en prolifération, mais deviendraient des activateurs traductionnels lorsqu'elles sont bloquées en G₁/G₀.

Ainsi, si la fonction principale des miRNA est d'inhiber la traduction d'ARNm sur lesquels ils peuvent se fixer, on ne peut pas exclure que d'autres fonctions existent selon les ARNm ciblés ou le stade de développement. Si les constructions contenant des gènes rapporteurs avec des MRE artificiels ou isolés ont été très utiles dans la compréhension des mécanismes de régulation par les miRNA, leurs fonctions diffèrent ou sont peut-être plus vastes *in vivo*. Les régions 3' NT natives pourraient contenir, en plus des MRE, des sites de liaison à des co-facteurs importants dans la régulation de la traduction par les miRNA.

E. Implication des miARN dans des évènements biologiques

Les miARN ont un rôle pivot dans un grand nombre d'évènements biologiques nécessitant une régulation stricte, incluant le développement embryonnaire, la prolifération, la différenciation, la taille des organes, l'hématopoïèse et les interactions hôte-pathogène. L'amélioration de la caractérisation de la fonction des miARN a permis non seulement de dévoiler l'ampleur des mécanismes régulés par les miARN, mais aussi de révéler des profils d'expression des miARN aberrants dans diverses pathologies, en particulier dans les cancers [249].

1. miARN et infection virale

Les virus utilisent les miARN pour contrôler leur cellule hôte et réciproquement, la cellule hôte utilise les miARN pour cibler les fonctions essentielles du virus. Des résultats expérimentaux montrent que les miARN sont impliqués dans l'immunité innée et fonctionnent en tant que défenseurs de la cellule hôte contre l'ADN et l'ARN viral.

Les pathogènes peuvent eux-même produire des miARN. Ainsi, il a été reporté que le virus SV-40 portait dans son génome un gène codant pour un miARN, miR-S1. Celui-ci participe à rendre les cellules infectées indétectables par le système immunitaire. Il s'exprime en fin de réplication du virus et permet la dégradation d'ARNm codant pour l'antigène T, limitant ainsi l'exposition des cellules infectées aux lymphocytes cytotoxiques T.

Heureusement, les miARN participe à la lutte contre les pathogènes. Le premier miARN anti-viral décrit limite l'accumulation du rétrovirus PFV-1 (*Primate Foamy Virus type 1*) dans les cellules [250]. Un autre exemple relate le rôle de la machinerie des miARN dans le contrôle de la réplication du virus de l'immunodéficience humaine-1 (VIH-1). La région 3' NT du VIH-1 est la cible d'un groupe de miRNA, dont les miR-28, miR-125b, miR-150, miR-223 and miR-382. Ces miRNA, 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 [251]. Le virus de l'hépatite C infectant les cellules hépatiques, a détourné un miRNA très abondant et spécifique du foie, miR-122, au profit de sa réplication [252]. Ce miRNA interagit avec 2 sites situés au niveau de la région 5' NT du génome viral et induit une augmentation de la réplication virale par un mécanisme qui reste actuellement inconnu. Pour contrer ce mécanisme, les cellules infectées sécrètent de l'interféron- β qui induit une forte diminution du niveau de miR-122 dans les cellules, conduisant ainsi à une réduction de la réplication du VHC [253].

miRNA	Tissue type specificity	Chromosomal location	Property	Malignancy
<i>let-7</i> family	Ubiquitous	Multiple members (chromosomes 3, 9, 11, 19, 21, 22)	TS	CLL [119], lymphoma [120], gastric [121], lung [122], prostate [9], breast [123], ovarian [121], colon [121], leiomyoma [121], melanoma [121]
<i>miR-15a/16-1</i> cluster	Ubiquitous	13q14.2	TS	CLL [124], lymphoma [9], multiple myeloma [9], pituitary adenoma [125], prostate [125], pancreatic [125]
<i>miR-17-92</i> family	Ubiquitous	Multiple members (chromosomes 7, 13, X)	OG	Lymphoma [126], multiple myeloma [9], lung [122], colon [126], medulloblastoma [127], breast [123], prostate [128]
<i>miR-21</i>	Ubiquitous	17q23.1	OG	Lymphoma, breast, lung, prostate, gastric, cervical, head and neck, colorectal, glioblastoma (for all: [129])
<i>miR-26a</i>	Ubiquitous	3p22.2 (–1) 12q14.1 (–2)	TS OG	Lymphoma [130], hepatocellular carcinoma [131], thyroid carcinoma [132] Glioblastoma [44,133]
<i>miR-34a/b/c</i>	Ubiquitous	1p36.22 (a) 11q23.1 (b) 11q23.1 (c)	TS	CLL [119], lymphoma [9] Pancreatic [9], colon [9], neuroblastoma [134] Glioblastoma [135]
<i>miR-155</i>	Haematopoietic system	21q21.3	OG	Lymphoma (ie Burkitt's, Hodgkin's, non-Hodgkin's) [9], CLL [9,18], breast [123], lung [9], colon [9], pancreatic [9]
<i>miR-200/141</i> family	Epithelial-specific	Multiple members (chromosomes 1, 12)	TS	Breast [123,136], renal clear cell carcinoma [137], gastric [138], bladder [139]
<i>miR-205</i>	Epithelial-specific	1q32.2	OG/TS TS	Ovarian [140–142] Prostate [143,144], bladder [145], breast [136,146,147], oesophageal [148]
<i>miR-206</i>	Skeletal muscle-specific	6p12.2	OG TS	Ovarian [149] Rhabdomyosarcoma [150], breast [151]
<i>miR-9</i>	Nervous system-specific	1q22 (–1) 5q14.3 (–2) 15q26.1 (–3)	TS OG/TS	Medulloblastoma [152], ovarian [153] Breast [57,154,155]

Table 6 : Les miARN les plus décrits comme étant associés au cancer. Les miARN sont sur- ou sous-exprimés dans les cancers et sont décrits comme oncogénique (OG) ou suppresseurs de tumeur (TS). D'après [254].

2. miARN et immunité

Les miARN sont désormais considérés comme des régulateurs critiques de la réponse immunitaire chez les mammifères. Des KO de différents facteurs protéiques de la machinerie des miARN, ainsi que des pertes ou dérégulation de certains miARN, compromettent sérieusement le développement immunitaire et peuvent conduire à des désordres tels que des maladies auto-immunes et des cancers. Bien que les miARN matures modulent l'expression de quelques protéines parmi des centaines de cibles ARNm, ils peuvent influencer des processus physiologiques en régulant la concentration de seulement quelques protéines cellulaires clés [255]. Ainsi, la délétion conditionnelle de Dicer dans les cellules souches hématopoïétiques rend ces cellules incapables de reconstituer le système hématopoïétique. De plus, 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 cellules. La perte de miR-223, qui contrôle la production et l'activation des granulocytes chez la souris, augmente le nombre de granulocytes et les rend hypersensibles à des stimuli, favorisant leur activité fongicide. Ainsi, miR-223 en régulant la production des granulocytes contrôle l'intensité de la réponse inflammatoire.

Plusieurs travaux font état de l'induction d'un certain nombre de miRNA au cours de la réponse immunitaire innée. miR-155, miR-146 et miR-9 sont les exemples les plus étudiés. L'activation du facteur de transcription NF- κ B, lors de la réponse immunitaire, permet la transcription de gènes pro-inflammatoires, mais induit également ces 3 miRNA qui vont agir dans une boucle de régulation négative et réprimer certains facteurs impliqués dans l'activation de ce facteur de transcription [256, 257]. D'autres miRNAs sont, au contraire, réprimés pendant la réponse immunitaire innée. Après une stimulation des macrophages par du lipopolysaccharide bactérien, miR-125b est réprimé, ce qui conduit à l'induction de sa cible, le TNF- α , une cytokine proinflammatoire.

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

3. miARN et cancer

À l'heure actuelle, l'implication de miARN dans les différentes étapes de la cancérogénèse est unanimement admise. Certains miARN exercent des fonctions de suppresseurs de tumeur et d'autres des fonctions d'oncogènes (Table 6). En effet, certains miARN contrôlent l'expression d'oncogènes et leur répression fréquente dans certains cancers conduit à la surexpression d'oncogènes : ce sont les TSmiR (*Tumor suppressor miRNA*), comme let-7 qui cible RAS. Au contraire, d'autres microARN susceptibles d'inhiber l'expression de suppresseurs de tumeurs sont surexprimés dans les cancers : ce sont les oncomiR. La famille let-7 a été la première famille de miARN à

à être identifiée comme TSmiARN. Johnson et coll. ont pu montrer expérimentalement l'inhibition de l'expression de l'oncogène RAS par let-7 dans des lignées cellulaires humaines cancéreuses. Dans les cancers du poumon, let-7 a une expression réduite associée à une forte expression de RAS et constitue un facteur de mauvais pronostic. De nombreuses études ont montré d'autres miARN sous-exprimés dans les cancers par rapport au tissu sain, tels que miR-143 et miR-145 dans les cancers colorectaux [258], miR-145 dans les cancers du sein [259] ou miR-29b dans les leucémies lymphoïdes chroniques [260].

Par opposition aux TSmiRs, les oncomiRs sont souvent surexprimés dans les cancers et entraînent des effets prolifératifs ou anti-apoptotiques. L'un des premiers oncomiR identifié est miR-155. Sa surexpression est retrouvée dans les lymphomes B diffus à grandes cellules, les cancers du sein et du colon. Dans les souris transgéniques, la surexpression de miR-155 (sous le contrôle de l'*enhancer* des immunoglobulines) suffit à provoquer une leucémie aiguë lymphoblastique ou à un lymphome de haut grade [261]. Le développement des méthodes d'analyse de l'expression des miARN, par microarrays, RT-qPCR ou encore le séquençage à haut débit ont permis d'acquérir de nombreux profils d'expression des miARN dans des tissus donnés et ce de manière exponentielle. Certains de ces profils d'expression en miARN sont disponibles sur le site NCBI Gene Expression Omnibus, www.microrna.org, <http://www.mirz.unibas.ch>. Ainsi, une étude menée dans le cadre du cancer du sein a pu révéler un contenu en miARN spécifique [262]. miR-9 est surexprimé dans ces cellules et il cible et inhibe la traduction de l'ARNm *CDH1*, codant pour l'E-cadhérine, ce qui conduit à l'augmentation des propriétés invasives de ces cellules. Ainsi, des cellules de cancer du sein non métastatiques surexprimant miR-9, sont capables de former des métastases pulmonaires, chez la souris. La production accrue du facteur angiogénique VEGF (*Vascular Endothelium Growth Factor*), transcrit par la β -caténine qui a été activée en conséquence de la répression de l'E-cadhérine par miR-9, est impliquée dans l'invasivité accrue des cellules du cancer du sein.

Un autre exemple concerne le *cluster* miR-17-92, contenant plusieurs miARN oncogéniques. Ils sont retrouvés induits dans divers types de cancer dont le lymphome à cellules B, les cancers du poumon, du sein et du pancréas. Les gènes cibles des miR-17-92 sont E2F1, PTEN et p21^{CIP1/WAF1}, des régulateurs du cycle cellulaire [263].

Plusieurs recherches ont démontré le rôle des TSmiARN dans les cancers gastro-intestinaux. Une diminution des miR-15b et miR-16, ciblant BCL2, dans les cellules de cancer gastrique humain permet le développement d'une résistance multidrogue en modulant l'apoptose. Une autre équipe a pu mettre en avant le rôle des miR-135a et miR-135b. Ils ciblent la région 3'NT de l'ARNm *APC* (*adenomatous Polyposis Coli*), supprime son expression et active la voie Wnt. Une augmentation considérable du niveau de miR-135b est observée dans les cancers colorectaux corrélée avec un faible taux d'ARNm *APC*, indépendamment d'une mutation du gène *APC*.

Name	Up or down regulation	Target gene	Reference
let-7	Down	HMGA2	[41,42]
miR-9	Down	RAB34, NF- κ B	[36,43]
miR-29	Down	Cdc42	[44]
miR-129	Down	Cdk6, SOX4	[45,46]
miR-141	Down	FGFR2	[38]
miR-148a	Down	CCKBR	[47]
miR-152	Down	CCKBR	[47]
miR-181c	Down	Notch4, RAS	[48]
miR-212	Down	MECP2	[49]
miR-218	Down	NF- κ B, COX-2, Robo1	[50]
miR-331-3p	Down	E2F1	[51]
miR-375	Down	PDK1, 14-3-3zeta	[37]
miR-433	Down	GRB2	[36]
miR-21	Up	RECK	[39]
miR-27a	Up	Prohibitin	[52]
miR-106a	Up	Rb1	[53]
miR-130b	Up	RUNX3	[54]
miR-150	Up	EGR2	[55]
miR-372	Up	LATS2	[56]
miR-421	Up	CBX7, RBMXL1	[57]
miR-650	Up	ING4	[58]
miR-106b-25 cluster	Up	p21 ^{Cip1} , p57 ^{Kip2} , Bim	[40,53,59]
miR-222~221 cluster	Up	p27 ^{Kip1} , p57 ^{Kip2}	[40]

Table 7: Caractérisation fonctionnelle des miARN dérégulés dans le cancer gastrique. D'après [264].

4. miARN, cancer gastrique et *H. pylori*

Plusieurs équipes ont cherché à caractériser le profil d'expression des miARN dans le cancer gastrique vs le tissu sain, par diverses méthodes (microarrays, RT-qPCR). L'ensemble de ces travaux n'a permis de révéler que quelques miARN retrouvés dans les différentes études et de multiples discordances quant à l'expression de la majorité d'entre eux. La variabilité des résultats montre bien qu'il est difficile d'établir un profil en miARN unique, pour un cancer donné, sans compter les problèmes liés aux méthodes employées. Plusieurs travaux montrent une dérégulation de l'expression et donc de la fonction des TSmiARN, soit par une perte de l'inhibition des oncogènes ou par interférence au niveau des voies qui contrôle la prolifération cellulaire (Table 7). Par exemple, Du *et al.* ont montré que le miR-141 est significativement diminué dans 80% des tumeurs gastriques primaires comparées au tissu sein adjacent. Une diminution du miR-141, appartenant à la famille des miR-200, est associée à un potentiel prolifératif dans les lignées cellulaires gastriques cancéreuses et une faible différenciation cellulaire. La surexpression de ce miARN, par transfection de mimes de sa séquence, inhibe la prolifération des cellules gastriques en conséquence de l'inhibition de l'expression de FGFR2 (*Fibroblast Growth Factor Receptor 2*) [265].

Au contraire, certains miARN ont été retrouvés surexprimés et jouant un rôle d'oncomiR dans le cancer gastrique. miR-21, un des oncomiR les plus fréquemment surexprimé dans différents types de tumeurs, est observé à un niveau élevé dans le cancer gastrique. L'expression élevée du miR-21 augmente de façon significative la prolifération et le caractère invasif des cellules issues de cancer gastrique. L'effet oncogénique de miR-21 peut être lié à la régulation de RECK, un gène suppresseur de tumeur [266].

Des miARN organisés en *cluster* peuvent avoir des fonctions communes et des miARN présents dans des clusters différents peuvent aussi avoir des fonctions similaires. Ainsi, *miR-222~221* et *miR-106b-25* sont deux *clusters* de miARN oncogéniques anormalement surexprimés dans des tissus cancéreux gastriques comparé au tissu sain. Ces deux *clusters* exercent leur fonction d'oncogènes en supprimant l'expression des membres de la famille Cip/Kip, des protéines inhibitrices des CDK (*Cycline dependent kinases*), p57^{Kip2}, p21^{Cip1} et p27^{Kip1}. La surexpression de ces miARN active Cdk2 et facilite la transition G₁/S du cycle cellulaire. La surexpression du *cluster miR-106b-25* dans le cancer gastrique est dépendante du facteur de transcription E2F1, comme ont pu le montrer Petrocca *et al.* Les miR-106b-93-25 exercent un rétrocontrôle négatif sur E2F1 par répression de la traduction de l'ARNm *E2F1* [267].

La modification de l'expression des miARN peut également être liée à la régulation des protéines impliquées dans la biosynthèse des miARN. Kim *et al.* ont mis en évidence une perte de l'expression d'Ago2, conduisant à un défaut de maturation des pré-miARN, dans 40% des cancers gastriques ayant une instabilité des microsatellites [268].

miRNA	Relative expression values	
	<i>H. pylori</i> -positive (n=22)	<i>H. pylori</i> -negative (n=14)
hsa-let-7a	0.020 ± 0.002	0.042 ± 0.003
hsa-let-7b	0.137 ± 0.013	0.282 ± 0.017
hsa-let-7d	0.024 ± 0.002	0.048 ± 0.003
hsa-let-7e	0.190 ± 0.018	0.388 ± 0.021
hsa-let-7f	0.004 ± 0.001	0.012 ± 0.003
hsa-miRNA-101	0.003 ± 0.001	0.006 ± 0.002
hsa-miRNA-103	0.026 ± 0.002	0.053 ± 0.003
hsa-miRNA-106b	0.105 ± 0.008	0.218 ± 0.015
hsa-miRNA-125a	0.030 ± 0.008	0.062 ± 0.016
hsa-miRNA-130a	0.036 ± 0.003	0.076 ± 0.009
hsa-miRNA-141	0.096 ± 0.021	0.399 ± 0.026
hsa-miRNA-200a	0.603 ± 0.059	1.588 ± 0.102
hsa-miRNA-200b	1.308 ± 0.151	2.768 ± 0.200
hsa-miRNA-200c	1.550 ± 0.252	3.982 ± 0.269
hsa-miRNA-203	0.288 ± 0.040	1.027 ± 0.072
hsa-miRNA-204	0.002 ± 0.001	0.017 ± 0.002
hsa-miRNA-210	0.024 ± 0.005	0.048 ± 0.004
hsa-miRNA-214	0.035 ± 0.004	0.077 ± 0.005
hsa-miRNA-223	5.921 ± 0.789	0.990 ± 0.095
hsa-miRNA-31	1.060 ± 0.136	2.178 ± 0.151
hsa-miRNA-32	0.0006 ± 0.0001	0.0012 ± 0.003
hsa-miRNA-320	0.228 ± 0.016	0.472 ± 0.028
hsa-miRNA-375	1.107 ± 0.205	2.273 ± 0.166
hsa-miRNA-377	0.0009 ± 0.0003	0.0018 ± 0.0002
hsa-miRNA-379	0.0007 ± 0.0002	0.0018 ± 0.0004
hsa-miRNA-429	0.101 ± 0.017	0.206 ± 0.015
hsa-miRNA-455	0.0095 ± 0.001	0.050 ± 0.006
hsa-miRNA-491-5p	0.002 ± 0.001	0.004 ± 0.001
hsa-miRNA-500	0.006 ± 0.001	0.012 ± 0.002
hsa-miRNA-532	0.092 ± 0.007	0.215 ± 0.008
hsa-miRNA-652	0.030 ± 0.004	0.067 ± 0.003

Values are expressed as mean ± standard error.

Table 8 : Liste des miARN dont l'expression est significativement modifiée entre des sujets infectés et non infectés par *H. pylori* (RT-qPCR). D'après [269].

H. pylori est le principal facteur de risque pour le cancer gastrique (cf introduction I). L'expression des miARN a été analysée dans des muqueuses gastriques humaines infectées ou non par *H. pylori*. Par une analyse à haut débit, Matsushima *et al.* ont trouvés 31 miARN dont l'expression était altérée dans des muqueuses gastriques *H. pylori*-positives vs *H. pylori*-négatives (Gene Expression Omnibus : GSE19769) (Table 8) [269]. Parmi ceux-ci, 8 miARN ont été identifiés comme des discriminateurs fiables entre des sujets infectés par rapport à des sujets non infectés : l'augmentation de miR-223 et la diminution de miR-31, let-7e, miR-141, miR-203, miR-204 et miR-455. L'expression de miR-223 est confinée aux cellules myéloïdes, et sa surexpression dans les muqueuses infectées est directement corrélée à l'infiltration de neutrophiles dans le tissu gastrique, suggérant que l'augmentation de ce miARN dériverait en fait des neutrophiles infiltrant le tissu. Dans cette étude, la plupart des miARN sont diminués en réponse à l'infection, notamment des membres de la famille let-7. La diminution de let-7e dans les muqueuses infectées pourrait être causée par NF- κ B et lever l'inhibition sur le TLR4, comme il a été montré dans un modèle d'infection de cholangiocyte par *Cryptosporidium parvum* [270]. Alternativement, elle pourrait être due à la répression de sa transcription par c-myc via la voie MAPK [271]. D'autres travaux ont également retrouvé une diminution des TSmiARN let-7 ainsi que des miR-124a-1, -2, -3 [272] et une induction d'oncomiR comme miR-21 [266]. En ce qui concerne les miR-124a-1-2-3, la modulation de leur expression fait intervenir des phénomènes de méthylation de l'ADN.

Ainsi, les altérations dans la régulation de l'expression et de la fonction des miARN sont des aspects à prendre en compte dans la compréhension des mécanismes qui participent à la formation des cancers.

F. Régulation de la voie de biosynthèse des miARN

La régulation de la synthèse des miARN peut intervenir à de multiples niveaux : la dégradation des miARN matures, leur localisation cellulaire, la maturation des pri- et pré-miARN et finalement leur transcription [181, 273].

1. La dégradation des miARN

Les miARN sont des molécules plutôt stables, avec une longue demi-vie. En effet, des expériences utilisant des inhibiteurs de la Pol II ou bien des inhibiteurs des enzymes impliqués dans la maturation des miARN ont montré que la demi-vie des miARN est de l'ordre de plusieurs heures, voire plusieurs jours, dans des lignées cellulaires ou au sein d'organes. Cependant cette stabilité est contradictoire par rapport à leur fonction universelle de régulateurs de l'expression des gènes de type ON/OFF, impliqués notamment dans le développement et nécessitant un métabolisme actif. On ne connaît que peu d'exemples de renouvellement rapide des miARN : c'est le cas du miR-29b, en

cluster avec son paralogue miR-29a, et est principalement localisé dans le noyau cellulaire. miR-29b est plus vite dégradé dans les cellules mammaires en croissance. La dégradation accélérée du miR-29b dépend de séquences présentes au niveau de la terminaison 3' du miARN mature, indépendamment de la séquence de localisation nucléaire qui y figure. Toutefois, la régulation appliquée sur miR-29b ne se répercute pas sur celle du miR-29a co-transcrit [274].

La dégradation des miARN est une étape de la voie de biosynthèse des miARN qui a suscité le moins d'attention, mais des études récentes menées chez *Arabidopsis thaliana* et chez le ver *C. elegans*, ont permis de détecter des exoribonucléases impliquées dans le turn-over des miARN tout en ayant des polarités de dégradation différentes, 3' vers le 5' chez la plante (par *Small RNA degrading nuclease 1* : SDN1, SDN2, SDN3) [275] et 5' vers le 3' chez le ver (par XRN-2) [276].

2. La localisation des miARN

La localisation subcellulaire appropriée d'une protéine ou d'une ribonucléoprotéine est essentielle à sa fonction. La compartimentation peut donc contrôler l'association de protéines, concentrer des facteurs qui agissent ensemble ou éloigner des partenaires afin de réguler une voie de signalisation. Beaucoup d'études tendent à montrer que des composants du complexe miRISC peuvent interagir avec des structures cellulaires particulières. Les PBs et les granules de stress ont émergé comme étant des foyers cytoplasmiques importants dans la répression de l'expression de gènes par les miARN, tout comme les corps multivésiculaires ou MVBs (*MultiVesicular Bodies*). Des travaux récents ont démontré le rôle des MVBs, compartiment endosomal tardif spécialisé, en tant qu'organelle contribuant à la fonction des miARN. Le blocage de la formation des MVBs par suppression de facteurs ESCRT (*Endosomal Sorting Complex Required for Transport*) inhibe la fonction des miARN, tandis que leur maintien (par inactivation du gène *HSP4* : *Hermansky-Pudlak syndrome 4*) la stimule. De plus, l'épuisement en certains facteurs ESCRT conduit à une accumulation des protéines GW182 et une inhibition du chargement du miARN dans le complexe miRISC [277]. Ceci suggère que l'élimination des GW182 du complexe miRISC et leur translocation vers les MVBs sont importantes pour la formation de nouveaux miRISC.

3. La maturation des miARN

Le contrôle de la maturation des miARN est un autre moyen déterminant pour le profil d'expression des miARN au niveau spatio-temporel. Il concerne donc la régulation des enzymes Drosha et Dicer. Comme il a été décrit précédemment, chacune de ces RNases opère en complexe avec des partenaires protéiques s'associant aux ARN double brin, comme DGCR8 ou TRBP chez les mammifères. À la fois le niveau d'expression et l'activité de ces différents acteurs protéiques sont soumis à des régulations qui peuvent

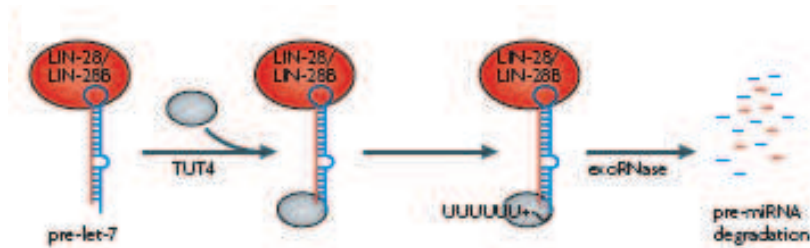


Figure 27 : Régulation de la maturation du pré-let-7 par LIN-28 chez *C. elegans* et les cellules de mammifères. Le recrutement de la poly(U) polymérase TUT4 permet l'ajout de résidus uraciles en 3' du pré-miARN. Cette polyuridylation empêche le clivage par Dicer et induit la dégradation du précurseur par un mécanisme encore inconnu. D'après [181].

Protein	Motifs	Known Activity	Mechanisms	Target miRNA	References
ADARs	dsRBD	A-I RNA editing	Inhibition of Drosha and Dicer processing	A subset	Yang et al. 2006; Kawahara et al. 2007
p68/p72	DEAD-box	Components of Microprocessor	Promoting Drosha cleavage	A subset	Fukuda et al. 2007
p53	DNA binding	Tumor suppressor	Binding to p68 and Promoting Drosha cleavage	miR-16-1, miR-143	Suzuki et al. 2009
SMADs	DNA binding	Signal transducers of TGFβ	Binding to p68 and Promoting Drosha cleavage	miR-21, miR-199a	Davis et al. 2008
ERα	DNA binding	Nuclear estrogen receptor	Binding to p68/p72 and inhibiting Drosha cleavage	A subset	Yamagata et al. 2009
hnRNP A1	RRM, M9	Pre-mRNA splicing	Chaperone for Drosha/DGCR8 binding	miR-18a	Guil and Cáceres, 2007
KSRP	KH	mRNA decay	Promoting Drosha and Dicer processing	A subset	Trabucchi et al. 2009
ARS2	Plant SERRATE homolog	Nuclear Cap-binding	Enhancing Drosha processing	Global	Gruber et al. 2009; Sabin et al. 2009
DGCR8	dsRBD	Binding to Drosha	Stabilizing Drosha	Global	Han et al. 2009
Exportin-5	RanBP	Binding to tRNAs and pre-miRNAs	Nuclear transport of pre-miRNA	Global	Grimm et al., 2006; Diederichs et al., 2008
LIN-28	CCHC-type zinc finger	Promoting pluripotency	Inhibition of Drosha and Dicer processing, and Recruiting TUT4	let-7	Heo et al. 2008; Newman et al 2008; Rybak et al. 2008; Viswanathan et al. 2008
TUT4	Poly(A) polymerase, CCHC-type zinc finger	Terminal uridylation	Binding to LIN-28 and inhibiting Dicer processing	let-7	Hagan et al. 2009; Heo et al. 2009
TRBP	dsRBD	Binding to Dicer, MKK phosphorylation site	Stabilizing Dicer	Global	Paroo et al., 2009
XRN-2	5' to 3' exoribonuclease	exoribonuclease	Degrading miRNA	Global	Chatterjee and Grosshans, 2009
GLD2	Poly(A) polymerase	Terminal adenylation	Stabilizing miRNA	miR-122	Katoh et al., 2009
mLin41	TRIM-NHL (RING finger)	Ubiquitylation	Binding to Ago2 and targeting it for degradation	Let-7 and others in ES cells	Rybak et al., 2009
TRIM32	TRIM-NHL (RING finger)	ubiquitylation	Binding to miRISC and enhancing miRNA activity	A subset	Hammell et al., 2009
NHL-2	TRIM-NHL (RING finger)	ubiquitylation	Binding to miRISC and enhancing miRNA activity	A subset	Schwamborn et al., 2009
Mei-P26	TRIM-NHL (RING finger)	ubiquitylation	Binding to miRISC and inhibiting miRNA activity	A subset	Neumüller et al., 2008
Argonautes	PAZ, PIWI	Components of RISC	Stabilizing associated miRNAs	Global	Diederichs et al., 2008

Table 9 : Régulateurs post-transcriptionnels de la biogénèse des miARN chez les animaux. D'après [273].

affecter la production des miARN. Par exemple, DGCR8 en interagissant avec Drosha, stabilise cette dernière, et en retour Drosha contrôle le niveau de DGCR8 par clivage d'une structure en épingle à cheveux présente dans l'ARNm de DGCR8 et induit alors sa dégradation. Garder un ratio Drosha/DGCR8 normal est important puisqu'une augmentation de trois fois du niveau de DGCR8 suffit à inhiber de façon drastique le clivage endonucléolytique effectué par Drosha, *in vitro* [278-280].

D'autres facteurs interagissant avec Drosha ou Dicer peuvent intervenir dans la régulation des précurseurs des miARN. Les protéines hélicases, p68 et p72, composants du *microprocessor* avec Drosha, sont responsables de la maturation d'un tiers des pri-miARN chez la souris. Dans des cellules déficientes pour *p68* ou *p72*, les niveaux de pré-miARN, mais pas ceux des pri-miARN, sont significativement réduits, dus à une diminution de la fixation de Drosha sur les pri-miARN. *p68* et *p72* interagissent avec un large spectre de protéines afin de promouvoir la maturation des pri-miARN. Ainsi, une interaction entre *p68* et le gène suppresseur de tumeur *p53* est observée lors de la maturation des pri-miR-16-1, pri-miR-143 et pri-miR-145, en réponse à un dommage à l'ADN dans des cellules cancéreuses [281].

Le régulateur négatif de la biogénèse des miARN le plus connu est LIN-28, qui agit non seulement sur la maturation du pri-miARN mais également sur celle du pré-miARN. En effet, le miARN *let-7* mature n'est pas synthétisé dans les cellules souches embryonnaires (CSE) et dans d'autres progéniteurs malgré une forte transcription du pri-*let-7*. LIN-28 se fixe sur la boucle terminale du pri-*let-7*, ce qui interfère avec le clivage dépendant de Drosha. LIN-28 peut également se fixer sur le pré-*let-7* afin de bloquer la maturation par Dicer. De même, LIN-28 interagit avec TUT4 (*Terminal uridylyl transferase 4*) pour inhiber la maturation du pré-*let-7* (Figure 27) [282]. Cette enzyme ajoute une queue poly(U) au pré-*let-7*, inhibant par conséquent le clivage par Dicer. De plus, cette queue poly(U) constitue un signal de dégradation du pré-miRNA par les 3'-5' exonucléases. La répression exercée par LIN-28 est spécifique de la famille des miARN *let-7*. Le système de régulation LIN-28/*let-7* est hautement conservé et joue un rôle important dans le maintien de la pluripotence des CSE.

L'accumulation de Dicer est dépendante de son partenaire TRBP et une diminution de l'expression de TRBP conduit à une déstabilisation de Dicer et un défaut de maturation des pré-miARN. Dans des carcinomes humains, des mutations inactivant TRBP empêche Dicer de fonctionner. TRBP est lui-même stabilisé par phosphorylation d'une sérine catalysée par la voie MAPK/ERK. TRBP phosphorylé promeut la croissance et la survie cellulaire, dues à une sur-expression de miARN impliqués dans la croissance et une diminution de la production des TSmiARN comme *let-7*.

La maturation des miARN est également régulée par des facteurs extracellulaires. La voie du TGFβ et des BMP régule la maturation des pri-miARN en pré-miARN *via* les protéines SMAD présentes, avec *p68* et Drosha, dans un complexe en interaction avec le pri-miR-21. Ce complexe permet une augmentation du niveau de miR-21 [283]. Cependant le mécanisme de contrôle de la maturation des miARN par les SMAD reste inconnu (Table 9).

4. La transcription des pri-miARN

Elle se produit de la même façon que celle des gènes codants et est responsable de l'expression spatio-temporelle des miARN. En effet, l'organisation de la région promotrice de miARN autonomes est similaire à celle des gènes codant pour des protéines. La présence d'îlots CpG, de séquences consensus telles que la boîte TATA ainsi que de modifications d'histones indique que les promoteurs des gènes des miARN sont contrôlés, en *trans*, par des facteurs activateurs ou répresseurs de transcription et en *cis*, par des modifications de la structure de la chromatine. Plusieurs facteurs de transcription (FT) régulent l'expression de miARN de manière positive ou négative. Par exemple, le FT oncogénique MYC transactive le cluster *miR-17-92* dans les cellules de lymphome et *miR-9* dans les cellules de neuroblastome. MYC peut également avoir un rôle d'inhibiteur de la transcription des miARN comme dans le cas du *miR-15a*, permettant ainsi la formation de tumeur. D'autres FT peuvent agir de concert avec les miARN afin de prévenir la formation de cancer. C'est le cas de P53 qui va stimuler l'expression des *miR-34* et *miR-107* afin de renforcer son rôle d'inhibiteur de la progression du cycle cellulaire et d'inducteur d'apoptose [181].

La modification des histones et donc le remodelage de la chromatine est un moyen important de réguler la transcription de gènes codant pour les miARN. Le FT REST (*RE1 silencing transcription factor*) recrute des protéines de modification de la chromatine telles que des histones déacétylases et les protéines liant les îlots CpG méthylés (MeCP2) au niveau de promoteur de *miR-124*, empêchant sa transcription dans les cellules progénitrices neuronales. REST est inhibé au cours de la différenciation afin de permettre une forte expression de *miR-124* dans les neurones en formation. Enfin, des études ont pu montrer l'importance du statut de méthylation des promoteurs de miARN, notamment des *miR-148a*, *miR-34b/c*, *miR-9* et *let-7* dont leur transcription est régulée par des ADN méthyltransférases, DNMT1 et DNMT3b [284].

La régulation de la transcription des gènes des miARN rentre souvent dans une boucle de rétrocontrôle avec les FT. En effet, plusieurs exemples montrent que les miARN participent à leur propre régulation *via* un rétrocontrôle de l'expression des FT qui les régulent. Ces systèmes de rétrocontrôle peuvent faire intervenir une ou plusieurs boucles de régulation positives ou négatives. Par exemple, le FT PITX3 et le *miR-133b* participent à une boucle simple de rétrocontrôle négative qui permet de réguler la différenciation des neurones dopaminergiques. Dans ce schéma de régulation PITX3 stimule la transcription de *miR-133b* qui, à son tour, va inhiber la traduction de l'ARNm de PITX3. D'autres exemples plus sophistiqués impliquent des doubles boucles de régulation négatives comme celle qui existe entre les miARN de la famille des *miR-200* et les FT ZEB1/ZEB2 lors de la transition épithélio-mésenchymateuse.

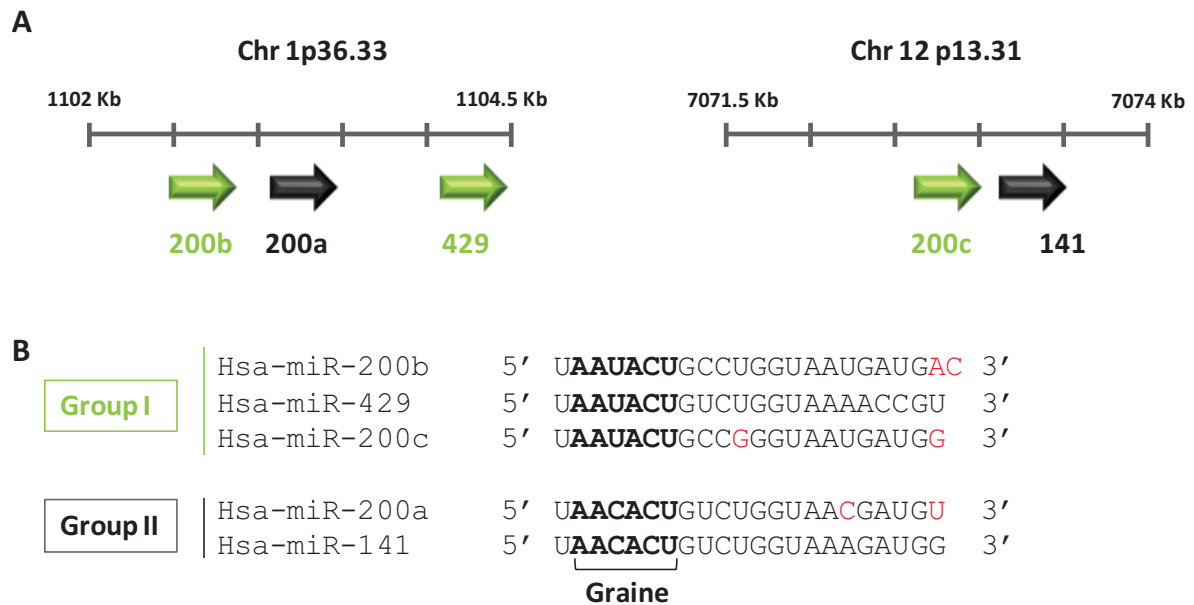


Figure 28 : Description de la famille des miR-200. A) Cette famille de miARN est composée de cinq membres : miR-200a/b/c, miR-141 et miR-429. Ils sont regroupés sur deux *clusters* différents localisés sur deux chromosomes distincts. Ainsi, le *cluster* miR-200b-200a-429 sur le chromosome 1 génère un transcrit primaire d'environ 7 kb. Le *cluster* miR-200c-141 est localisé sur le chromosome 12, le +1 de transcription est mal défini. **B)** Ces miARN peuvent être classés selon leur homologie au niveau de la séquence graine (en gras) qui va ainsi déterminer les cibles ARNm. MiR-200b/c et -429 appartiennent au groupe I (vert) tandis que miR-200a et -141 appartiennent au groupe II (noir). Il faut remarquer la grande homologie de séquence entre les miARN de la famille des miR-200, ils ne diffèrent, au sein du même groupe que par quelques nucléotides (rouge).

G. La boucle de régulation miR-200/ZEB1-2 dans la Transition épithélio-mésenchymateuse

1. La famille des miR-200

Cette famille de miARN est composée de 5 miARN localisés dans deux régions chromosomiques différentes, en deux unités de transcription indépendantes. En effet, la famille des miR-200 comporte le cluster *miR-200b-200a-429* localisé sur le chromosome 1 (Chr 1p36.33) et le cluster *miR-200c-141* présent sur le chromosome 12 (Chr 12p13.31) (Figure 28a). Ces cinq miARN sont très proches au point de vue séquence nucléotidique et sont bien conservés chez les animaux placentaires notamment chez la souris où leur organisation génomique est identique mise à part leur localisation qui se retrouve sur les chromosomes 4 et 6, respectivement. Ils peuvent être classés en deux sous-groupes selon la séquence de leur graine. Ainsi, les miR-200b, -200c et 429 font partie du premier groupe et les miR-141 et -200a, du second car ils partagent des graines identiques (Figure 28b). Ils sont exprimés dès le développement embryonnaire afin de permettre des cycles de différenciation/dédifférenciation des cellules à caractère pluripotent.

Leur expression est caractéristique des cellules et tissus épithéliaux et ils sont pour cela considérés comme étant des marqueurs épithéliaux.

À partir de l'année 2008, une explosion de travaux a rapporté que ces miARN étaient impliqués dans une double boucle de régulation négative avec leur cible, préalablement prédite par analyse bioinformatique, ZEB1/ZEB2. Ce schéma de régulation particulier prend place dans le cadre de la régulation de la transition épithélio-mésenchymateuse, phénomène décrit précédemment et participant à la cicatrisation, et de manière pathologique, à la carcinogénèse et la formation de métastases.

2. La régulation de l'expression des miR-200

ZEB1 et ZEB2 sont des FT, répresseurs transcriptionnel de l'E-cadhérine, décrits précédemment. Il existe effectivement une régulation négative par les miR-200 de l'expression de ZEB1 et de ZEB2, de manière post-transcriptionnelle et réciproquement une régulation négative par ZEB1/2 sur la transcription des pri-miR-200. Ainsi, une cellule au phénotype épithélial exprime l'ensemble des marqueurs épithéliaux dont les miARN de la famille des miR-200 au détriment de ZEB1/2, tandis qu'une cellule à caractère mésenchymateux exprime ZEB1/2, mais pas les miR-200. L'expression de cette famille de miARN permet une régulation post-transcriptionnelle de leur cible, ZEB1/2 par interaction des miARN avec des sites de liaison localisés dans la région 3'NT de leurs ARNm (table 10). On ne compte pas moins de huit sites de fixation des miR-200 (cinq pour le sous-groupe 1 et trois pour le sous-groupe 2) pour ZEB1 et neuf sites d'interaction (six pour le sous-groupe 1 et 3 pour le sous-groupe 2)

Cible	Membre des miR-200	Références
ZEB1	Tous	[172, 174, 285-287]
ZEB2	Tous	[172, 174, 287]
TGFβ2	miR-141, miR-200c	[285]
ERBB receptor feedback inhibitor (ERRFI1)	miR-200c	[288]
Friend of GATA2 (FOG2)	Tous, miR-8 (homologue des miR-200 chez la drosophile)	[289]
Polycomb ring finger oncogene (BMI1)	miR-200c	[290, 291]
WAS protein family member 3 (WASF3, WAVE3)	miR-200b	[292]
β-caténine (CTNNB1)	miR-200a	[293]
Class III β-tubulin (TUBB3)	miR-200c	[294]
Phospholipase C gamma (PLCG1)	miR-200b/c, miR-429	[295]
FAS-associated phosphatase 1 (FAP1)	miR-200c	[296]
Rnd3	miR-200b	[297]
Bcl2	miR-200b/a, miR-429	[298]
Suz 12 (sous-unité du polycomb repressor complex PRC2)	miR-200b	[299]

Table 10 : Liste des cibles des miR-200 validées expérimentalement.

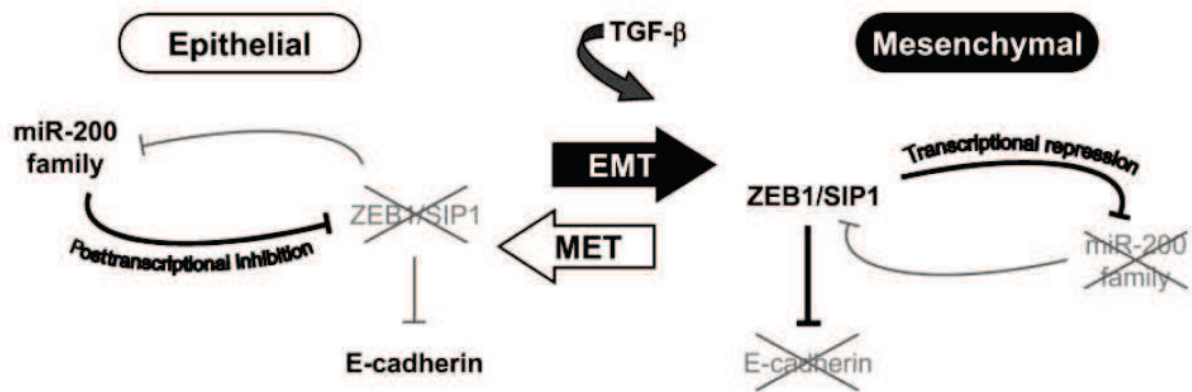


Figure 29 : Double boucle négative de régulation entre les miR-200 et ZEB1/2.

Dans les cellules épithéliales, un état stable est maintenu par un niveau élevé de miR-200 qui va inhiber ZEB1/2 et ainsi permettre l'expression de l'E-cadherine. Le passage à un état mésenchymateux par la TEM induite par le TGFβ augmente le niveau d'expression de ZEB1/2. ZEB1/2 peuvent alors se fixer sur les boîtes E présentes dans les promoteurs de leurs gènes cibles, notamment le promoteur des *clusters* miR-200b-200a-429 et miR-200c-141. Cette fixation entraîne la répression de la traduction de ces deux unités de transcription. Ce système correspond donc à un double rétrocontrôle négatif permettant de maintenir un état d'équilibre dépendant des niveaux d'expression de ZEB1/2 et des miR-200. D'après [170].

pour ZEB2. La preuve de l'interaction et de la régulation de ZEB1/2 par les miR-200 a été faite par l'utilisation de vecteurs rapporteurs contenant en aval du gène de la luciférase, la séquence correspondant à la région 3' NT des ARNm *ZEB1/2*. De ce fait, la transfection de ces vecteurs dans des cellules exprimant les miR-200 conduit à une extinction de l'activité de la luciférase par répression traductionnelle. L'utilisation d'inhibiteurs des miARN spécifiques des miR-200 (oligonucléotides complémentaires des miARN matures) ou la mutation des sites de reconnaissance des miARN dans la région 3' NT des ARNm empêchent la régulation de la traduction de l'ARNm de la luciférase par les miARN et rétablissent l'activité luciférase [172-174].

D'autres études ont démontré une régulation rétroactive de ZEB1/2 sur les miR-200 au niveau de leur promoteur [170, 285]. Dans le but d'identifier le promoteur des deux *clusters* et d'étudier la régulation de leur transcription, Burk *et al.* ainsi que Bracken *et al.* ont cloné une région promotrice potentielle de chacun des *clusters* dans des vecteurs rapporteurs, en amont du gène de la luciférase. Dans les séquences clonées, ils ont pu identifier la présence de deux boîtes E dans le promoteur de *miR-200b-200a-429* et de cinq sites de fixation pour ZEB1/2 dans le promoteur putatif de *miR-200c-141*. Ils ont alors observé une extinction de l'activité luciférase dépendante de ZEB1/2 indiquant que l'un ou l'autre de ces FT, en se fixant sur les boîtes E du promoteur de chaque *cluster*, était un répresseur transcriptionnel de ces *clusters*.

De l'ensemble de ces études se détachent un schéma de régulation interdépendante entre les miR-200 et ZEB1/2 favorisant soit le phénotype épithélial, soit le phénotype mésenchymateux. En effet, dans une cellule épithéliale, l'expression élevée des miR-200 inhibe la traduction des ARNm de ZEB1/2, permettant la transcription de l'E-cadhérine et favorisant le maintien du phénotype épithélial. À l'inverse, dans une cellule mésenchymateuse, ZEB1/2 exprimés interagissent avec les boîtes E dans les promoteurs des deux *clusters* de miARN et dans celui de l'E-cadhérine et empêchent la transcription de ces effecteurs épithéliaux en faveur de la synthèse de protéines spécifiques des cellules mésenchymateuses (Figure 29).

La transformation d'une cellule épithéliale en une cellule mésenchymateuse peut être induite par des stimuli extracellulaires tels que le TGF β . Gregory *et al.* ont montré récemment une connexion entre la sécrétion autocrine du TGF β et la boucle de régulation miR-200/ZEB dans la TEM [300]. La régulation existante entre les miR-200 et ZEB1/2 est importante pour le maintien d'un état non pathologique et une pression génétique et/ou environnementale en faveur de l'un ou l'autre des partenaires de cette double boucle rétroactive peut conduire au développement de pathologies. En effet, des modifications de l'expression des miR-200 ou de ZEB1/2 peuvent influencer l'évolution de cancers (table 11).

Cancer type	Associated features	References
ZEB1		
Lung	Correlates with lack of E-cadherin in NSCLC Correlates with resistance to celecoxib and erlotinib in NSCLC	Dohadwala <i>et al</i> , 2006 Reckamp <i>et al</i> , 2008
Colorectal	Increased levels in cancer cells of invasive regions	Spaderna <i>et al</i> , 2006; Aigner <i>et al</i> , 2007
Pancreatic	Correlates with poor prognosis Correlates with lack of E-cadherin	Wellner <i>et al</i> , 2009 Arumugam <i>et al</i> , 2009
Gallbladder	Increased levels in invasive tumour cells	Adachi <i>et al</i> , 2009
Breast	Increased levels in undifferentiated cancer cells of invasive ductal and lobular cancers Strongly increased levels in triple negative cancers	Aigner <i>et al</i> , 2007 Graham <i>et al</i> , 2009
Ovarian	Increased levels in metastasis	Elloul <i>et al</i> , 2010
Endometrial	Increased levels in highly aggressive type II cancers	Spolstra <i>et al</i> , 2006; Singh <i>et al</i> , 2008; Hurt <i>et al</i> , 2008
Prostate	Correlates with high Gleason score	Graham <i>et al</i> , 2008
ZEB2		
Pancreatic	Correlates with lack of E-cadherin	Imamichi <i>et al</i> , 2007
Stomach	Increased levels in intestinal type with low E-cadherin	Rosivatz <i>et al</i> , 2002
Bladder	Correlates with poor outcome	Sayan <i>et al</i> , 2009
Ovarian	Increased levels in effusions	Elloul <i>et al</i> , 2005
miR-200		
Pancreatic	miR-200 increased levels in benign PanIN compared with normal duct miR-200 reduced in pancreatic neuroendocrine tumours	du Rieu <i>et al</i> , 2010 Olson <i>et al</i> , 2009
Liver	miR-200c reduced in benign liver tumours	Ladeiro <i>et al</i> , 2008
Stomach	miR-141 reduced in gastric cancer	Du <i>et al</i> , 2009
Breast	Low expression of miR-200 in basal type compared with other types of breast cancer Reduced expression of miR-200a/c in metastases compared with primary tumour	Burk <i>et al</i> , 2008; Gregory <i>et al</i> , 2008a Iliopoulos <i>et al</i> , 2009
Ovarian	Low expression of miR-200a/b/429 correlates with poor survival miR-200 upregulated in ovarian cancer High expression of miR-200 correlates with poor prognosis	Hu <i>et al</i> , 2009 Nam <i>et al</i> , 2008 Bendoraite <i>et al</i> , 2010

Table 11: Expression de ZEB1/2 et des miR-200 dans mes cancers humains. D'après [301].

Objectif du travail

Mon travail de thèse s'inscrit dans le cadre du projet d'équipe consistant à analyser l'expression de miARNs affectés par *H. pylori* dans des cellules épithéliales gastriques et d'en caractériser le rôle en identifiant les cibles impliquées dans ce contexte.

Ce projet a commencé par une analyse globale du répertoire des miRNA des cellules AGS en conditions basales ou en co-culture avec *H. pylori*. Cette analyse et l'étude par Cédric Belair du rôle de miR-372 et miR-373 dans la réponse de l'hôte à cette infection ont donné lieu à la publication «*Helicobacter pylori* interferes with an embryonic stem cell microRNA cluster to block cell cycle progression » (*Silence* 2011), jointe à ce manuscrit et brièvement commentée en chapitre II.A des résultats.

J'ai participé à ce travail à mon arrivée au laboratoire, mais le principal travail qui m'a été confié dans le cadre de la thèse est l'étude d'une autre famille de miARN affectée par la bactérie, les miR-200. J'en ai défini le rôle régulateur de la transition épithélio-mésenchymateuse de cellules épithéliales gastriques humaines en culture (chapitre II.B). Puis je me suis attachée à comprendre pourquoi, paradoxalement, ces miARN étaient surexprimés dans des conditions d'infection (Chapitre III).

Enfin, dans le chapitre IV, je suis revenue à miR-372 et miR-373, étudiés initialement dans le cadre d'un arrêt du cycle cellulaire provoqué par la bactérie, en identifiant une autre cible de ces miARN : j'ai pu montrer qu'ils participaient à la transition épithélio-mésenchymateuse régulée par les miR-200, en interférant avec l'un des récepteurs du TGF β .

RESULTATS

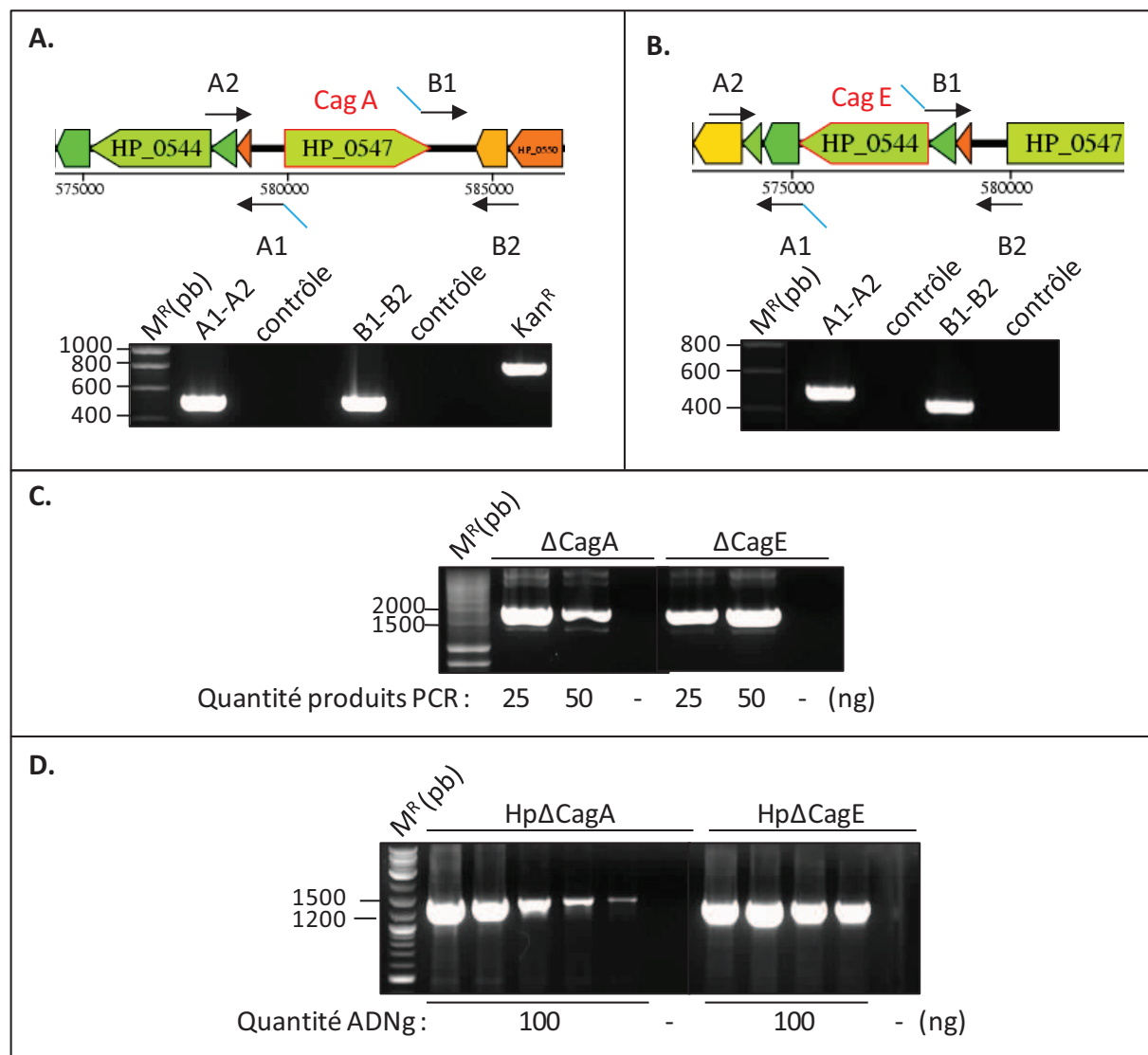


Figure 30 : Construction des cassettes de résistance par PCR 3 temps et vérification de l'intégrité des mutants d'*H. pylori* 26695. **A,B)** Représentation de la région génomique où se trouve les gènes HP-0547 et HP-0544 codant pour le facteur de virulence CagA et la protéine CagE, respectivement. En dessous, sont visualisés les résultats de la première PCR nécessaire à la création des différents fragments de la cassette de résistance (A1-A2 : région homologue amont, B1-B2 : région homologue avale et Kan^R : gène *aphA3* conférant la résistance à la kanamycine). **C)** PCR d'assemblage des différents fragments PCR afin d'obtenir les cassettes de résistance, Δ CagA et Δ CagE (Région A + Kan^R + région B). Plusieurs quantités de produits PCR de départ sont utilisés. **D)** Vérification de l'insertion des cassettes au bon locus dans le génome d'*H. pylori* 26695. Elle est effectuée par PCR sur ADN génomique extrait des bactéries résistantes à la kanamycine. Tous les contrôles sont obtenus par PCR sans matrice. ADNg : ADN génomique, M^R : marqueur de taille, ng : nanogramme, pb : paire de base.

I. Caractérisation de l'infection de cellules épithéliales gastriques humaines par *Helicobacter pylori*

Lorsque notre équipe a commencé ce nouveau projet consistant à analyser les miARN en réponse à *H. pylori*, le modèle d'étude constitué par des lignées de cellules épithéliales gastriques humaines en coculture avec *H. pylori* semblait le plus simple à mettre en place. Ainsi ce travail est basé sur l'utilisation de ces modèles *in vitro*, avec la lignée AGS, modèle le plus répandu et qui a fourni le plus de données sur les interactions entre la bactérie et les cellules humaines, et deux autres lignées plus différenciées que les cellules AGS, toutes trois dérivées d'adénocarcinomes. Les caractéristiques des ces trois lignées sont mentionnées dans la table 12.

Par ailleurs, étant donnée l'importance de l'îlot de pathogénicité *cag* dans les modifications d'expression géniques induites dans les cellules hôtes, nous avons généré des mutants de cette bactérie pour déléter CagA et pour inactiver le SST4.

A. Obtention de mutants isogéniques de la souche 26695 d'*H. pylori*

Sachant qu'*H. pylori* possède un système de recombinaison extrêmement efficace [302] et est capable d'absorber de l'ADN exogène via le SST4, nous avons utilisé ces propriétés pour déléter les gènes *cagA* et *cagE* dont le produit est un constituant du SST4, dans l'îlot de pathogénicité *cag* de l'ADN chromosomique bactérien. Les délétions de l'un et l'autre des gènes ont été réalisées par insertion, au locus du gène, d'une cassette de résistance contenant le gène *aphA3* conférant la résistance à la kanamycine, par recombinaison homologue [303]. Pour ne pas affecter l'expression des gènes flanquants (mutation polaire), les séquences homologues ont été choisies de manière à respecter l'intégrité des séquences régulatrices des gènes aux alentours. La cassette de résistance flanquée de deux régions homologues de 500 pb (Figure 30) a été obtenue par une réaction PCR en 3 temps et elle a été utilisée pour transformer la souche *H. pylori* 26695 sauvage. Après obtention de clones Kan^R, l'insertion de la cassette de résistance au bon locus a été vérifiée par PCR sur l'ADN génomique extrait à partir de plusieurs mutants $\Delta cagA$ ou $\Delta cagE :: aphA3$ (Hp Δ CagA-1/2/3/4/5, Hp Δ CagE-1/2/3/4) (Figure 30). Chaque clone sélectionné présente une bande migrant à la taille attendue de 1472 pb.

L'observation par microscopie optique des mutants $\Delta cagA$ et $\Delta cagE$ d'*H. pylori* 26695 n'a pas permis de déceler des changements morphologiques évidents, notamment de la mobilité de la bactérie (données non montrées). Par ailleurs les souches mutantes ne présentent pas non plus de modification des activités uréase et oxydative caractéristiques d'*H. pylori*. Leur croissance en milieu solide ou liquide est

Type cellulaire	Genre/âge	Origine	Type de cancer gastrique	Morphologie	Temps de doublement	Caractéristiques génétiques
AGS	F/54	estomac	intestinal	Epithéliale Peu cohésive	24h	- <i>Cdh1</i> muté - <i>Ctnnb1</i> mutation gain de fonction
MKN74	H/37	Métastases hépatiques	intestinal	Epithéliale cohésive	48h	- <i>APC</i> mutation non sens - <i>cdh1</i> WT - P53 WT
NCI-N87	H/ ?	Métastases hépatiques	intestinal	Epithéliale Polarité cellulaire Microvillosités	47h	- Sécrétion de mucine6, pepsine et lipase gastrique - <i>Cdh1</i> WT - P53 WT

Table 12 : Caractéristiques des différentes lignées cellulaires utilisées dans l'étude de l'infection par *H. pylori*. *Cdh1* : gène de l'E-Cadhérine, *Ctnnb1* : gène de la β -caténine, F : femme, H : homme, h : heure, WT : sauvage.

similaire à celle de la souche sauvage indiquant qu'elle n'est pas affectée par l'inactivation de l'un de ces gènes.

B. Les modifications morphologiques induites par *H. pylori* dans des lignées de cellules épithéliales gastriques en culture, sous la dépendance de CagA.

1. La lignée AGS

En absence d'*H. pylori*, les cellules AGS prolifèrent activement (temps de doublement de 20-24 h) et forment une monocouche de cellules pavimenteuses cohésives, caractéristique d'un phénotype épithélial.

En présence de la souche sauvage 26695 d'*H. pylori* à une multiplicité d'infection (MOI) de 100, nous pouvons observer un allongement extrême et l'individualisation de quelques cellules dès 6 h et de l'ensemble des cellules après 24 h (Figure 31). La disparition du caractère épithélial au profit de cellules non cohésives et extrêmement allongées a été nommé « phénotype colibri » (*hummingbird*) parce qu'il rappelle le bec pointu et l'extrémité des ailes effilées de cet oiseau. En plus du changement de la forme générale des cellules, leur cytoplasme s'est rempli de vacuoles : ceci étant l'effet de la toxine VacA. Les changements dramatiques de la morphologie des cellules AGS ne surviennent qu'avec la souche sauvage : en effet, si on incube les cellules AGS avec les souches mutantes HpΔCagA ou HpΔCagE, nous observons uniquement la présence de vacuoles dans le cytoplasme des cellules, mais non plus l'allongement cellulaire et la dislocation de la monocouche.

La lignée AGS est à l'origine de la majorité des données caractérisant les interactions du facteur de virulence CagA avec les constituants des jonctions cellulaires décrites précédemment. Elle présente néanmoins un défaut majeur pour une cellule épithéliale : l'absence d'expression d'E-cadhérine.

2. Les cellules MKN-74

À l'état basal, cette lignée de cellules épithéliales gastriques dérivées d'un adénocarcinome gastrique de type intestinal, prolifère plus lentement que les cellules AGS (temps de dédoublement de presque 48 h), en petites colonies très cohésives de cellules pavimenteuses, plus grandes et plus hautes que les cellules AGS.

En présence de la bactérie de souche sauvage, ces cellules ne s'allongent pas comme les cellules AGS, mais présentent néanmoins un cytoplasme extrêmement vacuolisé dû à la toxine bactérienne VacA. Leur sensibilité pour la bactérie se manifeste par le détachement de cellules de la monocouche, sous la forme de cellules mortes en

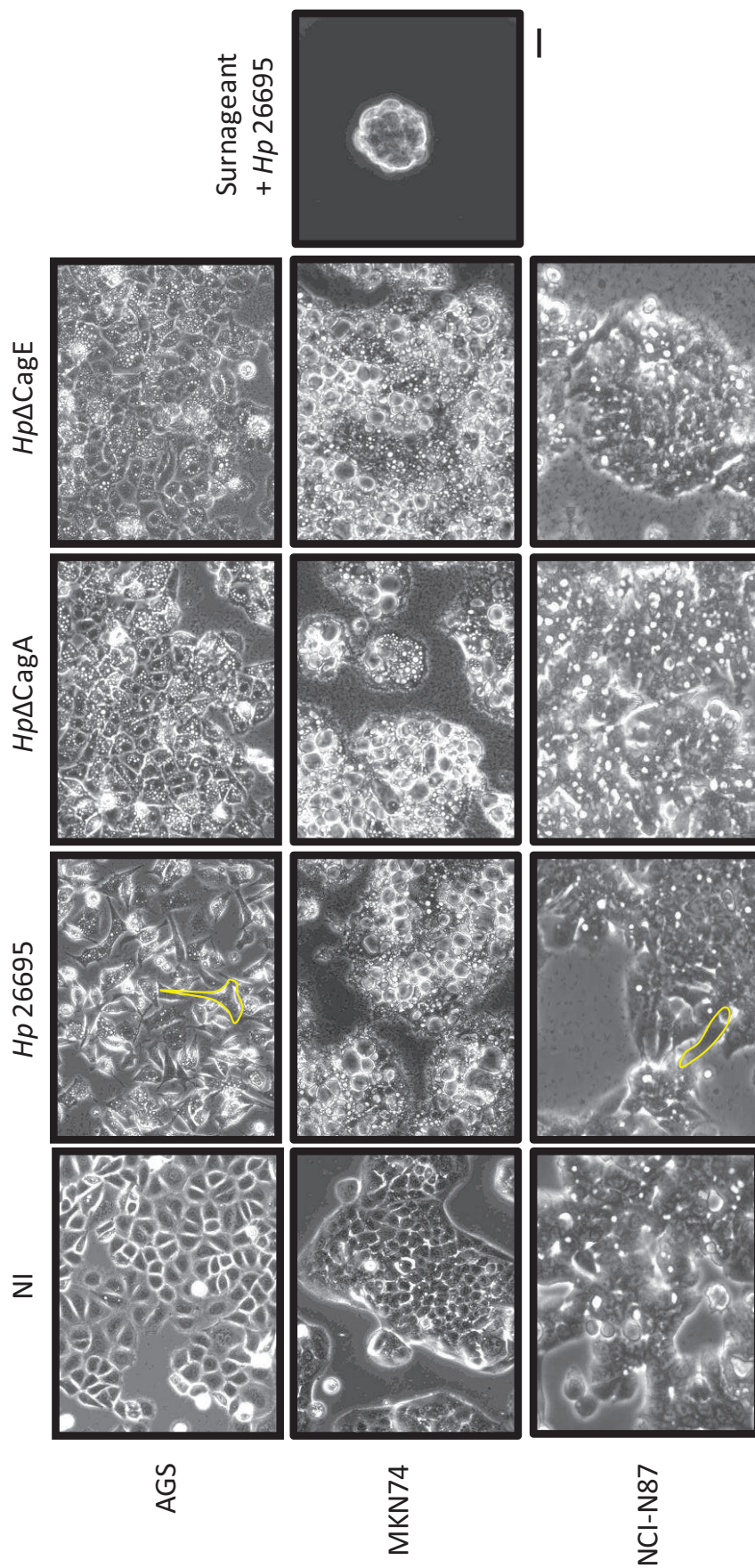


Figure 31: Infection des différentes lignées gastriques par *H. pylori* 26695 sauvage et mutées, HpΔCagA, HpΔCagE. Observation par microscopie optique en contraste de phase des lignées cellulaires AGS, MKN74, NCI-N87 non infectées (NI) ou infectées par les différentes souches d'*H. pylori* 26695 pendant 24h et avec une MOI de 100. L'infection par la souche bactérienne sauvage des AGS et NCI-N87 se manifeste par l'apparition d'un phénotype fibroblastique des cellules, appelé phénotype « colibri ». Il est toutefois plus atténué dans le cas des NCI-N87. Ce n'est qu'avec les MKN74 co-cultivées avec la bactérie que nous observons un décollement d'amas de cellules encore vivantes du support de culture. Pour chaque type cellulaire, la vacuolisation des cellules est due à la toxine VacA d'*H. pylori*. L'utilisation des souches mutantes abolit la transition morphologique des cellules et il ne persiste que les effets provoqués par VacA. Barre = 50µm.

majorité, mais aussi de quelques petits îlots flottants (Figure 31) contenant des cellules vivantes capables de réadhérer sur un nouveau support de culture. Ce phénomène laisse à penser que des cellules non adhérentes mais vivantes auraient pu acquérir des capacités de migration voire d'invasion au cours de l'infection.

3. La lignée NCI-N87

Comme la lignée MKN-74, cette lignée dérive d'un adénocarcinome gastrique de type intestinal, et, à l'état basal, prolifère activement sous la forme de colonies très cohésives de cellules pavimenteuses. Les vacuoles qu'elles présentent à l'état basal après quelques jours de culture sont les manifestations de leur capacité à sécréter du mucus, qui rend le milieu de culture opaque.

Leur réponse morphologique à *H. pylori* de souche sauvage est peu manifeste, à part la présence de quelques cellules plus allongées en bordure de colonies, qui restent apparemment cohésives (Figure 31). Dans l'intention initiale d'utiliser principalement la lignée NCI-N87 comme modèle d'interactions d'*H. pylori* avec des cellules épithéliales gastriques, nous avons réalisé une étude morphologique plus poussée en immunocytochimie et en microscopie électronique. En effet, le marquage en immunofluorescence de l'E-Cadhérine avant et après co-culture avec *H. pylori* pendant 48h à une MOI de 30 montre la désorganisation de l'E-cadhérine, initialement membranaire, en réponse à *H. pylori* (Figure 32A), malgré l'apparente cohésion de colonies cellulaires. L'image de microscopie électronique en Figure 32B montre le contact intime de la bactérie avec la surface apicale de ces cellules couvertes de microvillosités.

C. Activation de la voie de signalisation NF- κ B par *H. pylori* dans les cellules hôtes

Outre les changements morphologiques des cellules, l'infection des cellules humaines par *H. pylori* peut être suivie par des marqueurs moléculaires quantifiables, notamment l'activation de la voie NF- κ B, qui caractérise l'immunité innée, entraînant la production de la chimiokine IL-8 et sa sécrétion dans le milieu de culture au cours de l'infection.

L'activation de NF- κ B peut être quantifiée grâce à un vecteur rapporteur portant 6 sites de fixation de NF- κ B sur l'ADN en amont du gène de la luciférase, en plus d'une boîte TATA. L'IL-8 produite en conséquence de cette activation peut être dosée dans le milieu de culture par un test ELISA de type « sandwich ». On peut observer que l'activation de NF- κ B dans les cellules AGS dépend principalement du facteur de virulence CagA et de l'intégrité du SST4 (Figure 33A). De même, la sécrétion d'IL-8 dans les AGS et les NCI-N87 est dépendante de la translocation de CagA dans la cellule hôte (Figure 33B). En effet, l'utilisation des deux souches mutantes provoque une nette diminution, voire la suppression, à la fois de l'activation de NF- κ B et de la sécrétion d'IL-

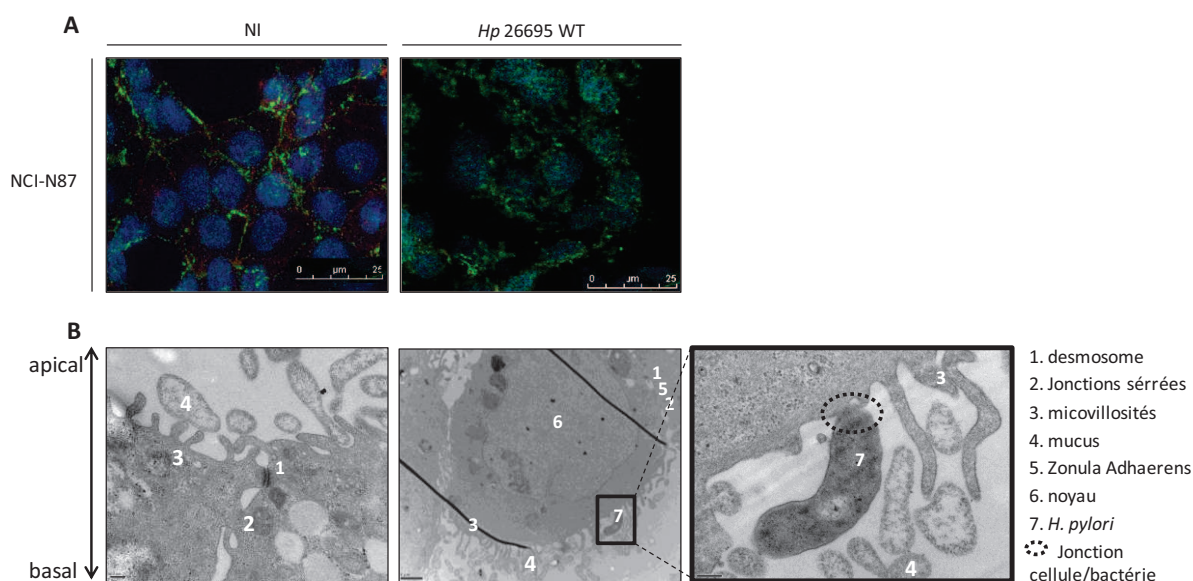


Figure 32 : Caractérisation de l'infection des NCI-N87 par la souche sauvage 26695 d'*H. pylori*. **A)** Immunofluorescence de la E-cadhérine dans les cellules NCI-N87 en conditions basales ou infectées pendant 48h avec *H. pylori* de souche sauvage à une MOI de 30. Les cellules ont été cultivées sur lamelles de verre et fixées par le paraformaldéhyde 3%. L'E-cadhérine est immunomarkée à l'Alexafluor 488 (vert), le cytosquelette d'actine est marquée à la phalloïdine-Alexafluor 594 (rouge) et le noyau est marqué au Hoechst 33342 (bleu). Les préparations sont observées en microscopie confocale (Leica). On observe une désorganisation du cytosquelette et une délocalisation de l'E-Cadhérine lors de l'infection, malgré une apparente cohésion de la monocouche cellulaire **B)** Observation de l'interaction d'*H. pylori* et des cellules NCI-N87 en microscopie électronique à transmission. Les cellules ont été cultivées et infectées en *Transwells* pendant 48h à une MOI de 30, puis fixées et incluses selon un procédé classique, pour être colorées au citrate de plomb (Service de Microscopie Electronique de Bordeaux 2). La culture en Transwell a permis d'orienter les coupes. On observe une interaction étroite de la bactérie avec la membrane plasmique apicale des cellules NCI-N87.

8, par rapport à la souche sauvage. Contrairement au mutant $\Delta CagE$, le mutant $\Delta CagA$ provoque encore une légère stimulation de NF- κ B et de l'IL-8, qui est due au peptidoglycane bactérien, transloqué par le SST4 et détecté par NOD1 dans le cytoplasme. Le mutant $\Delta CagE$ est incapable d'injecter ces deux composés bactériens stimulateurs de la voie NF- κ B.

D. Discussion et conclusion

Ces observations, concordantes avec la littérature en ce qui concerne les cellules AGS, mettent en évidence d'une part la variabilité de la réponse morphologique des modèles cellulaires à *H. pylori*, et d'autre part l'importance de l'injection de CagA dans ces réponses. Le phénotype « colibri » acquis en présence d'*H. pylori cag+* est une caractéristique propre aux cellules AGS. Elle est sans doute liée à la mutation qu'elle porte dans le gène *cdh1* codant pour la protéine E-cadhérine, impliquée dans les jonctions adhérentes cellules-cellules, et ciblée par CagA [55]. La déficience de l'E-cadhérine semble conférer à cette lignée cellulaire une plasticité morphologique plus importante que dans les deux autres lignées. Elle rend ces cellules extrêmement sensibles à la bactérie, puisque le premier bastion de la barrière épithéliale est déjà surmonté. En effet, en générant une lignée AGS-E-cadhérine, Oliveira *et al.* montrent que le rétablissement de la fonctionnalité de l'E-cadhérine abolit la plasticité et les capacités invasives des cellules AGS en réponse à la bactérie [61].

Saito *et al.* font clairement la distinction entre la réponse à *H. pylori* de cellules épithéliales polarisées ou non polarisées [304]. Alors que leurs observations concordent avec les nôtres pour les cellules AGS, cellules épithéliales non polarisées, ils rapportent que dans des cellules épithéliales polarisées, dont le modèle est la lignée MDCK (*Madin-Darby Canine Kidney*), CagA conduit à la destruction de jonctions fortes intercellulaires, la perte de la polarité et l'extrusion de cellules de la monocouche épithéliale. Ce phénotype rappelle ce que nous observons dans la lignée MKN74, qui a conservé plus de caractères différenciés épithéliaux que la lignée AGS et dans laquelle *H. pylori* provoquerait l'extrusion de cellules de la monocouche. Perdant ainsi leurs contacts intercellulaires et avec le support de culture, la plupart des cellules MKN74 entrent en apoptose (*anoïkis*), mais quelques unes organisées en amas libres dans le milieu seraient capables de survivre.

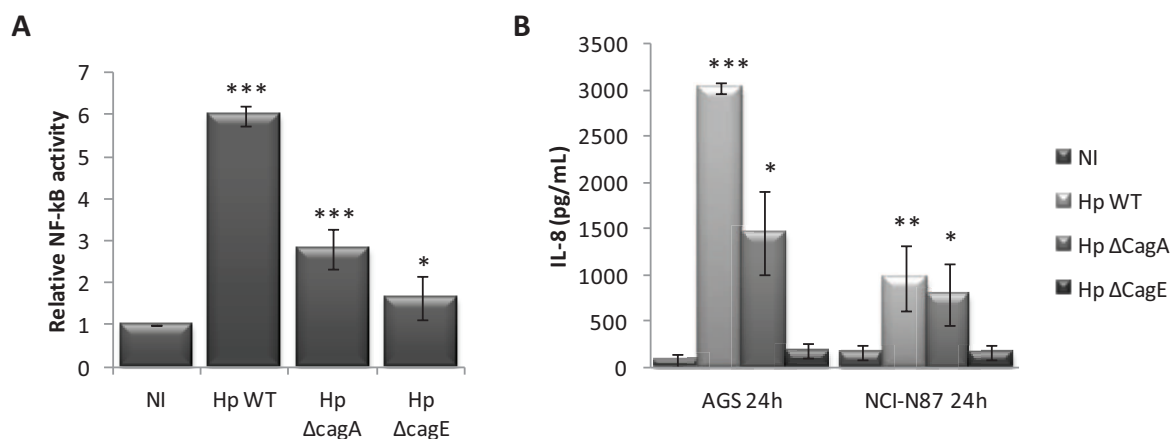


Figure 33: Activation de NF-κB dans les cellules AGS (A) et sécrétion de l'interleukine 8 dans le milieu de culture (B) par les cellules infectées ou non par *H. pylori* 26695 ou les mutants isogéniques $\Delta cagA$ ou $\Delta cagE$. L'activation de NF-κB est mesurée à l'aide d'un vecteur rapporteur portant 6 sites de fixation sur l'ADN de NF-κB et une boîte TATA en amont de la luciférase. Le dosage de la sécrétion de l'IL-8 a été réalisée dans deux lignées (AGS et NCI-N87) infectées par les souches sauvage et mutantes d'*H. pylori*. Par la méthode d'ELISA sandwich, nous avons révélé une augmentation de la sécrétion de l'IL-8 après infection de ces cellules et ceci de manière dépendante de la présence du facteur de virulence CagA. L'IL-8 produite reflète l'activité de NF-κB dans ces cellules. Ces données sont représentatives d'expériences avec n=3 et la p-valeur est représentée par * quand $p < 0.5$, ** quand $p < 0.1$ et *** quand $p < 0.001$.

II. Le miRNome des cellules AGS en conditions basales et en réponse à l'infection

L'avancée des connaissances apportées récemment par les miRNA sur la régulation de l'expression génique a bousculé le paradigme du contrôle des gènes seulement par des facteurs de transcription activant ou réprimant des gènes spécifiques. Ainsi, après plusieurs études ayant établi le transcriptome de cellules gastriques en réponse à l'infection par *H. pylori* [305-307], la question qui se pose maintenant et qui est à l'origine de ce travail est la suivante: « Les miRNAs interviennent-ils dans les réponses des cellules hôtes à l'infection par *H. pylori* ? ».

Les données qui permettent de répondre à cette question sont encore peu nombreuses. La première mise en évidence d'une modulation de miARN par *H. pylori* a été apportée par Zhang *et al* [266]. Ces auteurs font état d'une sur-expression de l'oncomir miR-21 dans du tissu gastrique tumoral, des lignées cellulaires gastriques co-cultivées avec la bactérie, ainsi que de la muqueuse gastrique chroniquement infectée par rapport à de la muqueuse non infectée. Les niveaux élevés de miR-21, dépendants des facteurs de transcription AP-1 et STAT3 (*Signal transducer and activator of transcription 3*) activés pendant l'infection, favorisent, la prolifération, la migration et la survie des cellules en culture en ciblant les suppresseurs de tumeurs PTEN, la tropomyosin et RECK (*REversion-inducing Cystein-rich protein with Kazal motifs*). Petrocca *et al.* [267] ont comparé les expressions de miARN dans du tissu gastrique normal, de gastrite chronique et de carcinome gastrique, et identifié 7 miRNAs associés à l'inflammation chronique, parmi lesquels une augmentation de miR-1 et de miR-155. Plus récemment, Fassi-Fehri *et al.* ont montré une induction de miR-155 dans une lignée de lymphocytes T co-cultivée avec *H. pylori*, sous la dépendance de la toxine bactérienne VacA et du facteur de transcription Foxp3 [308]. Une analyse globale par *microarray* des miARN exprimés dans la muqueuse gastrique de patients infectés par *H. pylori* fait ressortir 8 miARN dont l'expression différentielle est une signature fiable de l'état infecté par cette bactérie [269]. Parmi ceux-ci, la surexpression importante de miR-223 dans la muqueuse infectée rend compte de l'infiltration de neutrophiles. Excepté miR-223, les autres miARNs affectés par l'infection sont globalement réduits par rapport à ceux de la muqueuse saine. De manière intéressante, cette analyse rapporte une diminution significative des miR-200a, -200b, 200c dans le tissu infecté. Enfin, une étude chez la souris rapporte la répression de miR-1 et miR-133 de l'estomac au cours de l'infection chronique par *H. pylori* [309]: ces miARN spécifiques du muscle ciblent l'*histone deacetylase 4* et le *serum response factor*, dont l'expression augmente dans l'estomac infecté, provoquant l'hyperplasie de la couche musculaire et la dyspepsie.

Ces données bibliographiques montrent comment les changements d'expression des miARN rendent d'avantage compte des modifications de l'hétérogénéité cellulaire du tissu infecté que des mécanismes survenant réellement dans les cellules épithéliales, qui restent largement inconnus. Comme les cellules épithéliales gastriques constituent la première ligne de défense contre *H. pylori*, et que ce sont elles qui sont dramatiquement affectées par l'injection de l'effecteur bactérien CagA, il nous a paru pertinent de comprendre comment les miARNs étaient modulés dans ce type cellulaire, précisément en réponse à *H. pylori*. Notre équipe a utilisé une approche globale pour caractériser le profil de miARN dans les cellules AGS, modèle cellulaire le plus couramment utilisé pour mimer *in vitro* les interactions d'*H. pylori* avec des cellules épithéliales gastriques. Cette approche globale a été réalisée par séquençage à haut débit des petits ARN de 18-25 nucléotides exprimés dans les cellules AGS, en conditions basales ou infectées, pendant 6 heures avec la souche 26695 *cag+* d'*H. pylori* (publi jointe, Annexe 1). L'analyse globale du MiRNome des cellules AGS a révélé que cette lignée cellulaire portait une signature particulière de miARN (Figure 34A), avec trois *clusters* majoritaires : *miR-371-372-373* (18,6% du MiRNome), *miR-17-92* (12,4%) et *miR-23b-27b-24-2* (12,1%) auxquels s'ajoute la famille *miR-200* (11%) (encadré Figure 34). Nous nous sommes intéressés aux miARN les plus abondants, et dont l'expression était la plus affectée par l'infection. Ceci concerne :

a) *miR-372*, le miARN le plus abondant du miRnome à l'état basal (Figure 34A), diminué au cours de l'infection (*p-value* de $5,1 \cdot 10^{-13}$ calculée selon le test de Fisher (Table S1)) (Figure 34B),

b) *miR-200b* et *miR-200c*, augmenté au cours de l'infection (*p-values* de $8 \cdot 10^{-3}$ et $9,9 \cdot 10^{-17}$, respectivement, calculées selon le test de Fisher (Figure 34B).

A. *H. pylori* interfère avec le cluster *miR-371-372-373* caractéristique de cellules souches embryonnaires pour bloquer la progression dans le cycle cellulaire [310]

Ce travail montre que *miR-372*, le miARN le plus exprimé par les cellules AGS (de l'ordre de 10^4 copies par cellule) et *miR-373*, appartenant au même cluster, répriment la traduction de *LATS2* (*Large Antigen Tumor Suppressor 2*), une sérine/thréonine kinase régulant la progression du cycle cellulaire en G₁/S. L'inhibition de la fonction de ces miARN par des oligonucléotides antisens lève la répression post-transcriptionnelle de *LATS2*, provoquant un arrêt des cellules en G₁/S et une diminution de leur taux de prolifération.

H. pylori diminue l'expression de ces deux miARN en réprimant leur transcript primaire dès 2 heures d'infection, de manière dépendante de la MOI et de la

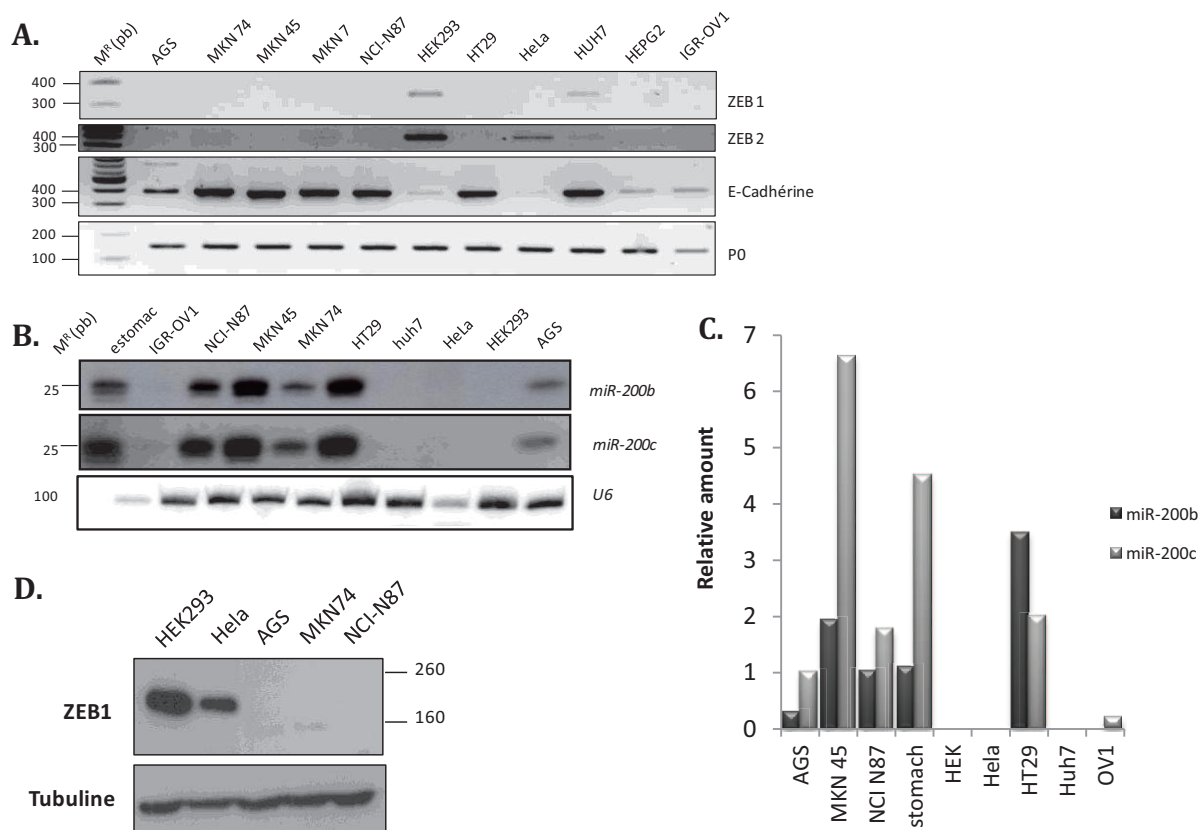


Figure 35 : Expression de l'E-cadhérine, ZEB1, ZEB2 et les miR-200b et -200c dans différentes lignées cellulaire. **A)** Analyse de l'expression de ZEB1, ZEB2 et l'E-cadhérine dans différentes lignées gastriques humaines (AGS, MKN7, MKN45, MKN74 and NCI-N87) et non gastriques (HT29, HEK 293, HeLa, HuH-7, IGR-OV1) en RT-PCR et visualisation sur un gel d'agarose 1% coloré au bromure d'éthidium. L'E-cadhérine ne s'exprime qu'en absence d'expression de ces deux répresseurs de transcription, ZEB1 et/ou ZEB2. P0 est utilisé comme gène contrôle. **B)** Northern blot de miR-200b et miR-200c dans les lignées cellulaires précédemment nommées ainsi que dans l'estomac sain. L'expression de ces deux miARN est caractéristiques des lignées cellulaires épithéliales. U6 sert de contrôle de dépôt. **C)** Détection du niveau d'expression des miR-200b (barres noires) et miR-200c (barres grises) dans plusieurs lignées cellulaires épithéliales ou non, par RT-qPCR. Les données sont normalisées par rapport à U6. **D)** Western blot sur ZEB1 dans trois lignées épithéliales gastriques, AGS, MKN74 et NCI-N87, ainsi que dans les lignées HeLa (épithéliale) et HEK293 (non épithéliale). Nous retrouvons l'expression de ZEB1 uniquement dans les cellules non épithéliales, à l'exception des cellules HeLa pour lesquelles on retrouve des caractéristiques moléculaires de cellules mésenchymateuses. La tubuline sert de contrôle de charge.

translocation de CagA. En conséquence, la protéine LATS2 s'accumule et contribue à l'arrêt du cycle en G₁/S des cellules infectées. L'addition de mimes synthétiques de miR-372 et -373 ou des siARN anti-LATS2 pendant l'infection, empêchent l'arrêt du cycle cellulaire provoqué par la bactérie.

MiR-372 et miR-373 ne sont exprimés que dans la lignée AGS (Annexe 2).

B. Rôle des miR-200 dans les cellules épithéliales gastriques en condition basale et en réponse à l'infection

Une autre famille de miARN fortement exprimée dans les cellules AGS en conditions basales est celle des miR-200, impliquée dans la régulation de la transition épithélio-mésenchymateuse. Le séquençage à haut débit a révélé que seuls les miR-200b et miR-200c de cette famille étaient exprimés dans les AGS, où ils représentent 11% de l'ensemble du MIRnome. Les trois autres membres de la famille, miR-200a, miR-429 et miR-141, n'ont pas été retrouvés dans cette lignée.

1. Rôle de gardien du phénotype épithélial

L'expression de miR-200b/c a été confirmée par RT-qPCR ou *northern blot*, non seulement dans les cellules AGS, mais également dans d'autres lignées de cellules épithéliales gastriques (CEG) (MKN74, NCI-N87, MKN-7) ou colique (HT29) (Figure 35B et C). D'autres lignées épithéliales, d'origine cervicale comme les cellules Hela, hépatique comme les cellules Huh7 ou encore les cellules mésenchymateuses HEK293 n'expriment pas ces miRNA. Pour la plupart des lignées sauf Huh7, il existe une corrélation entre l'expression des miR-200b/c et celle de l'E-cadhérine et une relation inverse avec celle de leurs cibles ZEB1 ou ZEB2 (Figure 35A). La relation inverse entre les miR-200 et ZEB1 est confirmée au niveau protéique, comme le montre le western blot de la figure 35D : les CEG n'expriment pas la protéine ZEB1, contrairement aux cellules Hela et aux cellules mésenchymateuses HEK293.

Pour caractériser le rôle des miR-200 en conditions basales, nous avons réprimé leur fonction à l'aide d'oligonucléotides antisens, appelés antimiR-200b/c. Pour vérifier leur spécificité, nous avons comparé leurs effets à ceux d'oligonucléotides de séquence brouillée (*scrambled*), notés sc200. Ces oligonucléotides ont été transfectés dans les cellules AGS et MKN74 et une analyse morphologique et moléculaire a été réalisée. La répression spécifique de miR-200b/c par les antimiR-200b/c est confirmée par RT-qPCR dans les deux types cellulaires, puisque leur concentration résiduelle détectable n'est plus que de 25% en moyenne par rapport à celle des cellules traitées avec les oligonucléotides contrôle sc200 (Figure 36B).

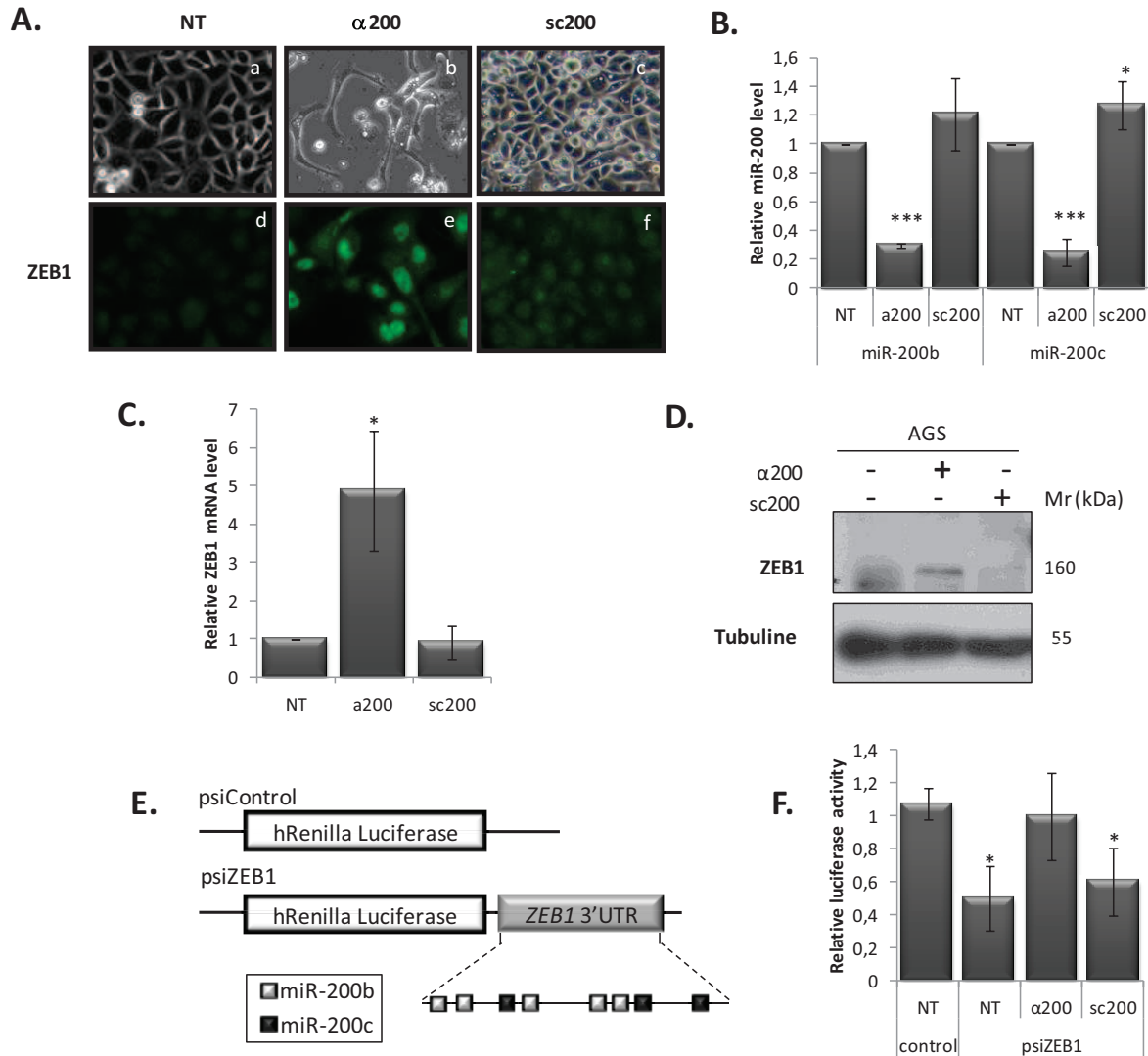


Figure 36 : Effets de la suppression de fonction des miR-200b/c dans les cellules AGS. **A)** Observation en microscopie optique, en contraste de phase (a-c) et en épifluorescence (d-e) de la morphologie et de l'expression de ZEB1 (marquage nucléaire vert), respectivement, des cellules traitées par des oligonucléotides antimiR-200b/c ou sc200. **B)** Mesure par RT-qPCR de l'efficacité du traitement antimiR-200b/c sur le niveau relatif des miR-200b/c dans les AGS. **C)** Expression de ZEB1 au niveau de l'ARNm, mesurée par RT-qPCR **D)** Western blot de ZEB1 et de tubuline après traitement par les antimir-200b/c ou les sc200. **E)** Représentation schématique de la région 3'NT de l'ARNm de ZEB1 avec la localisation des multiples sites de liaison de miR-200b (boîtes grises) et miR-200c (boîtes noires). Cette région est ensuite introduite dans le vecteur rapporteur psiCHECK-2 vide (psiControl) pour donner le vecteur psiZEB1. **F)** Mesure de l'activité luciférase relative de psiZEB1 par rapport au psiControl après traitement ou non aux oligonucléotides. Les RT-qPCR sont normalisées par rapport au NT ainsi qu'à un gène de référence, U6 pour les miARN, P0 pour ZEB1. Les données sont représentatives d'expériences n=3, avec les p-valeur suivantes, * = $p < 0.05$, *** = $p < 0.001$. a200 : antimiR-200b/c, NT : non traité, sc200 : *scramble* 200

Dans les cellules AGS, nous observons un changement drastique du phénotype cellulaire en présence des anti-miR-200b/c (Figure 36A). En effet, ces cellules pavimenteuses et assez cohésives entre elles (Figure 36A-a) deviennent très allongées et isolées les unes des autres (Figure 36A-b) en présence des anti-miR-200b/c, mais conservent leur phénotype initial en présence des oligonucléotides sc200 (Figure 36A-c). Cette transition morphologique rappelle une transition épithélio-mésenchymateuse (TEM).

D'un point de vue moléculaire, nous observons une accumulation de la protéine ZEB1, cible des miR-200b/c, dans les cellules traitées par les anti-miR-200b/c, comme l'attestent les analyses par immunofluorescence et western blot (Figure 36 A-d-f et 36D), mais non dans les cellules témoins ou traitées par les oligonucléotides contrôles sc200. ZEB1 s'accumule principalement dans le noyau, comme on peut s'y attendre d'un facteur de transcription. L'accumulation de la protéine est accompagnée d'une augmentation de l'ARNm de ZEB1 de 5 fois dans les AGS traitées avec les anti-miR-200b/c, par rapport aux cellules traitées avec les sc200 (Figure 36C).

Quant aux cellules MKN-74, les effets morphologiques du traitement par les anti-miR-200b/c se manifestent plutôt par l'apparition d'îlots cellulaires détachés du tapis cellulaire et du support de culture. Ces îlots, comparables à ceux présentés en Figure 31, sont composés de cellules toujours vivantes, qui peuvent réadhérer s'ils sont transférés dans une nouvelle boîte de culture (données non montrées). Comme les cellules AGS, les cellules MKN-74 traitées par les anti-miR-200b/c expriment 6,68 +/- 2,34 fois plus d'ARNm ZEB1 que les cellules traitées au sc200.

Pour caractériser davantage la régulation existant entre ZEB1 et les miR-200 dans ces cellules, nous avons construit un vecteur rapporteur contenant le gène codant pour la luciférase *Renilla* avec, en aval, la séquence 3' non traduite (3'NT) de l'ARNm de ZEB1, qui contient cinq sites de fixation pour miR-200b et trois pour miR-200c (Figure 36E). Ce gène rapporteur, noté psi-ZEB1, peut ainsi être régulé de manière post-transcriptionnelle par des variations de miR-200b/c. Le vecteur rapporteur contient également une unité transcriptionnelle de luciférase *firefly* dépourvue de 3'NT et donc non soumise à une régulation par des miRNA. Une fois le vecteur rapporteur exprimé dans les cellules AGS, par transfection transitoire, la lumière émise par l'activité de chaque luciférase, qui traduit le taux de chaque protéine luciférase, est mesurée dans différentes conditions de traitement par les oligonucléotides anti-miR-200b/c ou sc200. L'activité *Renilla* soumise à la régulation post-transcriptionnelle par les miR-200b/c, est normalisée par rapport à celle de la *firefly*, qui sert de standard interne. Ainsi l'activité relative de luciférase produite par le vecteur psiZEB1 se trouve diminuée dans les cellules AGS par rapport à celle du vecteur contrôle vide (Figure 36F). Ceci s'explique par le fait que les miR-200b/c, naturellement exprimés dans cette lignée cellulaire, vont pouvoir se fixer sur leurs sites dans la région 3'NT de ZEB1, et par conséquent inhiber

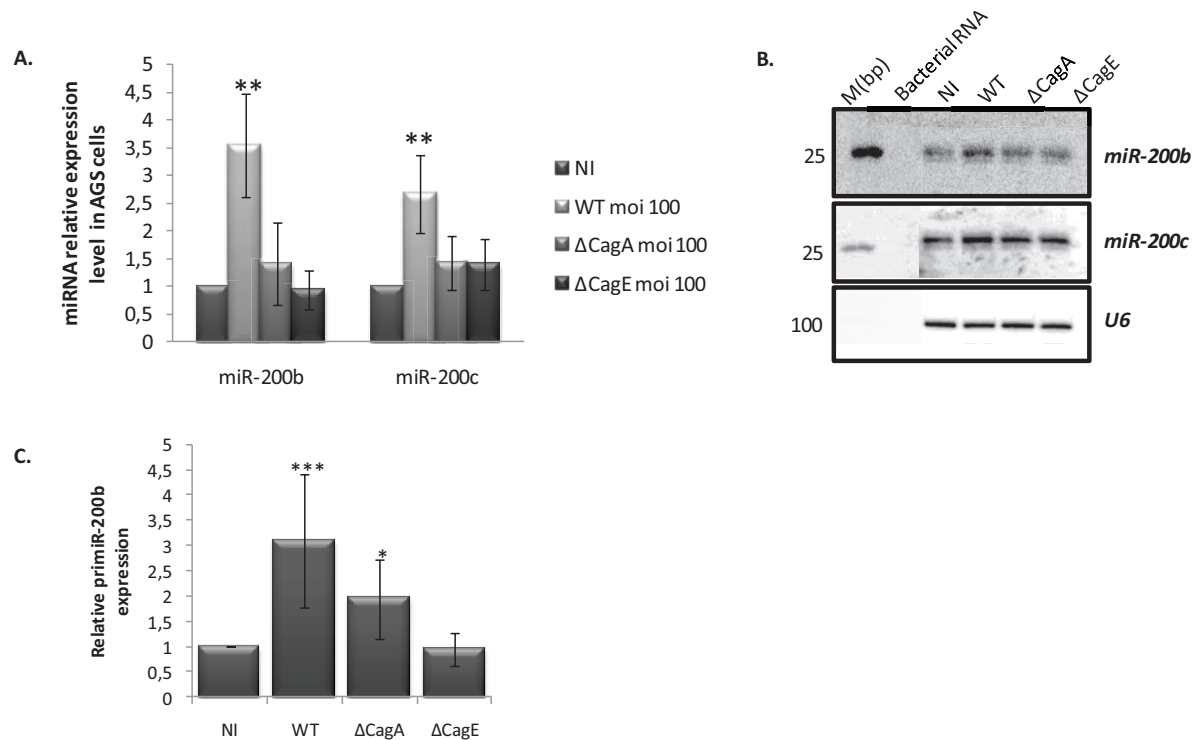


Figure 37 : Surexpression des miR-200b et miR-200c dans les cellules AGS infectées par la souche 26695 sauvage d'*H. pylori*. **A)** Analyse par RT-qPCR du niveau d'expression des miR-200b et -200c dans les cellules AGS soumises à infection par la souche sauvage et les mutants isogéniques Δ cagA et Δ cagE, pendant 24h à une MOI de 100. L'induction des miR-200b/c est dépendante de l'injection de la toxine bactérienne CagA. **B)** Northern blot de miR-200b et -200c dans les mêmes conditions d'infections que (A); U6 est utilisé comme témoin de charge. **C)** Expression du transcrit primaire primir-200b-200a-429 dans les mêmes conditions d'infections que (A). Les données de RT-qPCR sont normalisées par rapport au NI et aux ARN de référence U6 pour les miARN matures et P0 pour le primir. Elles sont représentatives d'expériences avec n=4 et les p-valeurs correspondent à * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$ et *** : $p < 0.001$. NI : non infectées, WT : *H. pylori* sauvage.

post-transcriptionnellement la synthèse de luciférase *Renilla*, aboutissant à une diminution de la lumière émise. Pour valider cette interprétation, nous avons traité les cellules par les anti-miR-200b/c pour inhiber la fonction des miR-200 endogènes : nous observons dans ce cas que l'inhibition post-transcriptionnelle de la synthèse de luciférase *Renilla* est levée et l'activité luciférase relative est augmentée par rapport à celle des cellules non traitées ou traitées par les sc200, jusqu'à atteindre le niveau d'activité luciférase du vecteur vide.

Ainsi, dans ces deux lignées de CEG, l'inactivation des miR-200 par les antisens altère le phénotype épithélial et, dans le cas des AGS, provoque une transition mésenchymateuse manifeste. Ceci indique que miR-200b et -200c jouent bien un rôle de gardien du phénotype épithélial en inhibant post-transcriptionnellement ZEB1 et sans doute aussi en déstabilisant son ARN messager, comme en témoignent le taux d'induction élevé de l'ARNm ZEB1 en présence des antisens.

2. Augmentation de l'expression des miR-200 par *H. pylori*

Parmi les changements d'expression de miARN révélés par le séquençage à haut débit entre les cellules AGS cultivées ou non avec *H. pylori*, ceux des miR-200b et -200c se trouvaient augmentés de manière significative en réponse à l'infection (Figure 34B). Cette observation était surprenante, puisque, comme nous venons de le démontrer, nous nous attendions à ce que les modifications morphologiques provoquées par *H. pylori* sur les cellules AGS s'accompagnent plutôt d'une diminution des miR-200.

Nous avons pu confirmer par *northern blot* et RT-qPCR les augmentations de miR-200b/c dans les cellules AGS en réponse à l'infection (Figure 37A et B). En effet, par l'une et l'autre de ces méthodes, nous observons une augmentation des miR-200b et miR-200c de 3,5 et 2,5 fois, respectivement, dans les cellules infectées avec la souche sauvage (WT) d'*H. pylori*. De manière intéressante, cette augmentation est dépendante de l'injection de la toxine CagA bactérienne dans ces cellules, puisque l'infection par les deux mutants isogéniques, $\Delta CagA$ ou $\Delta CagE$, n'induit pas cette augmentation. De plus, les variations des miR-200 matures en réponse à l'infection sont parallèles à celle du transcrit primaire pri-miR-200b-200a-429, qui se trouve augmenté de 3 fois avec *H. pylori* WT et de 2 fois avec le mutant $\Delta CagA$, mais inchangé avec le mutant $\Delta CagE$ (Figure 37C).

Ainsi, les cellules AGS, qui perdent leurs caractéristiques morphologiques épithéliales en réponse à l'effecteur CagA, produisent davantage de miR-200b/c matures, probablement en conséquence d'une stimulation de la transcription de leurs gènes : cette régulation apparaît donc paradoxale en regard du rôle de gardien du phénotype épithélial que nous avons montré précédemment pour ces cellules.

Nous avons également pu mettre en évidence une augmentation des miR-200 dans les autres lignées MKN-74 ou NCI-N87 en réponse à l'infection par la souche

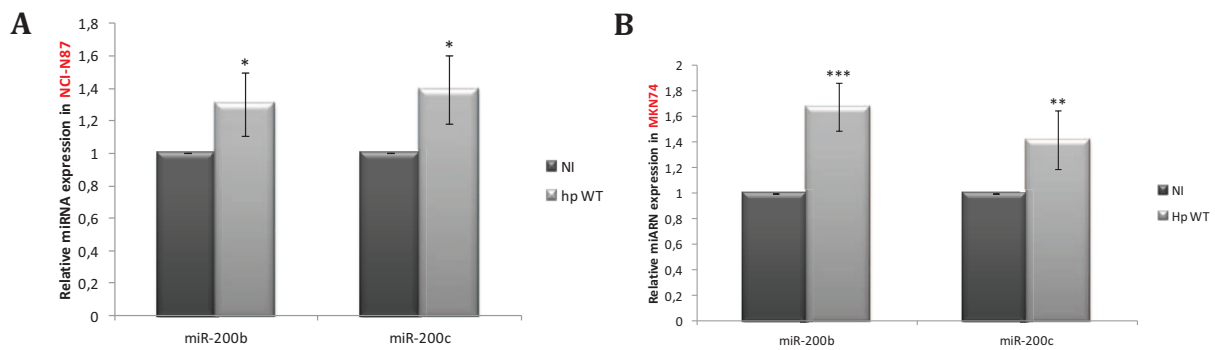


Figure 38 : Augmentation des miR-200b et miR-200c dans les cellules MKN-74 (A) et NCI-N87 (B) infectées par la souche 26695 sauvage d'*H. pylori*. Le niveau d'expression relative des miR-200b et -200c ont été déterminés par RT-qPCR dans les cellules infectée par la souche sauvage (Hp WT) pendant 24h à une MOI de 100. Les données sont normalisées par rapport au NI et à l'ARN de référence U6. Elles sont représentatives d'expériences avec n=4 et les p-valeur correspondent à * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$. NI : non infectées, Hp WT : *H. pylori* sauvage.

sauvage d'*H. pylori* (Figure 38), suggérant que ce phénomène ne se limiterait pas seulement au cas particulier des cellules AGS, mais constituerait une réponse générale de CEG à l'infection par *H. pylori*.

C. Discussion et conclusion

À notre connaissance, aucune analyse globale du miRNome des cellules AGS infectées ou non par *H. pylori* n'avait été publiée auparavant. Notre analyse révèle un répertoire particulier constitué d'une quarantaine de miARN identifiables et répertoriés dans la miRBase 14.0, qui, avec l'expression majoritaire du *cluster miR-371-372-373* caractéristique de cellules souches embryonnaires, confère à ces cellules gastriques modèles un statut particuliers de cellules souches ou précurseurs gastriques, plutôt que de cellules épithéliales différenciées.

1. Rôle des miR-372-373 dans la progression du cycle cellulaire

Ces miARN ciblant LATS2, un régulateur du cycle cellulaire, sont restreints aux cellules AGS, auxquelles ils confèrent un avantage de croissance. MiR-372 et -373 appartiennent à la famille des miRNA spécifiques des cellules souches embryonnaires régulateurs du cycle cellulaire, encore appelés les ESCC (*embryonic stem cell-specific cell cycle-regulating*) miRNA, incluant également mir-302a-d (qui ne sont pas exprimé par les cellules AGS). Les miARN ESCC ciblent de nombreux inhibiteurs du cycle cellulaire, permettant la progression particulière du cycle dans les cellules souches embryonnaires et la reprogrammation de cellules somatiques en cellules souches pluripotentes induites (iPSC) [311-313].

À part dans les cellules souches embryonnaires, l'expression de miR-372 et -373 est relativement rare : elle a été décrite dans des tumeurs testiculaires d'origine germinale, des adénocarcinomes de l'œsophage et de la thyroïde [314-316]. En plus des cellules AGS, notre équipe a retrouvé l'expression de miR-372 dans quelques cas de carcinomes gastriques humains de type diffus (C. Staedel, communication personnelle, collaboration avec C. Varon, INSERM U853 Bordeaux). Cette observation permet de rajouter ces 2 miARN à la liste des mécanismes de dérégulation du cycle cellulaire impliquant des miARN dans le carcinome gastrique : la surexpression des miR-106b et -93 [267], de miR-221 et -222 [317] et de miR-372 et -373 convergent de manière redondante vers des inhibiteurs de la progression G₁/S, p21^{cip1/WAF1}, p27^{kip1}, p57^{kip2} et LATS2, dont ils répriment la traduction.

H. pylori réprime le *cluster* miR-371-372-373 dans les cellules AGS, de manière dépendante de CagA, ce qui entraîne la dé-répression post-transcriptionnelle de LATS2 et l'arrêt du cycle cellulaire à la transition G₁/S. L'effet inhibiteur de la prolifération cellulaire des cellules infectées est difficile à interpréter pour cette bactérie oncogénique. De même, il est difficile de concilier les observations contradictoires d'*H. pylori*, via CagA, stimulant la prolifération cellulaire *in vivo* [118, 318] et bloquant la progression du cycle dans des cellules épithéliales en culture *in vitro*. Pour situer nos résultats dans le contexte du mécanisme d'action oncogénique de la bactérie, nous avons proposé l'hypothèse [310] selon laquelle *H. pylori*, en bloquant l'auto-renouvellement des cellules gastriques progénitrices (que pourrait représenter le modèle AGS), rendrait la muqueuse atrophique et incapable d'éliminer les cellules endommagées, ce qui est un stade pré-cancéreux dans la transformation néolasique de l'épithélium gastrique [100]. En complément de notre hypothèse, les travaux récents de Saito *et al.* [304] mettent en évidence que l'effet oncogène de CagA repose sur la polarité de la cellule infectée par la bactérie. CagA active la voie ERK, que les cellules épithéliales non polarisées (comme les cellules AGS) considèrent comme un stress oncogénique et y répondent par une augmentation de p21^{cip1/WAF1}, un blocage du cycle cellulaire et induction de sénescence. Dans des cellules épithéliales polarisées, l'activation de la voie ERK active la voie GEF-H1 (*Guanine nucleotide exchange factor H1*)-RhoA-ROCK-c-Myc : le facteur de transcription c-Myc transactive le *cluster* miR-17-92, dont miR-17 et miR-20a ciblent p21^{cip1/WAF1} et empêchent son accumulation. Dans les cellules polarisées, CagA exerce donc un rôle mitogène. Donc dans un contexte de glande gastrique où des cellules épithéliales de plusieurs degrés de polarité sont présentes et susceptibles d'interagir avec *H. pylori*, CagA pourrait exploiter les voies de signalisation selon la polarité cellulaire pour promouvoir de manières multiples son effet oncogène.

Dans cette même publication, Saito *et al.* rapportent également que l'effet mitogène de CagA dans les cellules épithéliales polarisées était associée à une TEM, un processus que nous avons été amené à étudier suite à l'observation de la variation d'expression des miR-200 en réponse à *H. pylori*.

2. Rôle des miR-200b et -200c dans le maintien du phénotype épithélial

Contrairement à miR-372 ou miR-373, miR-200b et -200c sont exprimés dans toutes les lignées de cellules épithéliales gastriques étudiées. Nos résultats montrent les conséquences dramatiques de la suppression de leur fonction dans les cellules AGS et MKN74 : l'inhibition de la fonction des miR-200 par des antisens induit le phénotype « colibri » dans les cellules AGS, et un détachement du support de culture et formation d'îlots cellulaires libres dans les cellules MKN-74. Ces résultats mettent en évidence l'importance de ces miARN pour le maintien du phénotype épithélial.

Le mécanisme d'action des miR-200b/c est la répression post-transcriptionnelle de ZEB1, ce que nous avons mis en évidence en utilisant un système rapporteur senseur des miR-200 endogènes. Cette répression de traduction du messenger de ZEB1 est sans doute associée à la dégradation de celui-ci, puisque nous observons aussi une augmentation du taux d'ARNm de ZEB1 en présence des antisens. Une autre cible des miR-200b/c est ZEB2 (ou SIP1, *Smad Interacting Protein*), dont la fonction est redondante par rapport à celle de ZEB1, mais qui n'est pas exprimée dans les cellules AGS, ni MKN-74.

À part ZEB1 et ZEB2, on connaît peu d'autres cibles des miR-200. Dans un travail réalisé en collaboration avec le Dr. V. Moreau sur les cellules de carcinome hépatocellulaire (publication jointe en fin de manuscrit), nous avons mis en évidence la régulation des miR-200b/c en fonction de l'expression de Rnd3. Une extinction de Rnd3 (cible des miR-200, table 9) dans les Hep3B (lignée cellulaire d'hépatocarcinome) conduit à une sous-expression des miR-200, accompagnée d'une augmentation de l'expression de ZEB1 et de manière plus importante, de ZEB2. Ce changement d'expression se traduit par la mise en place d'une TEM dans ces cellules *via* l'induction de la voie de signalisation RhoA/ROCK. Le traitement des cellules cancéreuses par des mimes synthétiques de miR-200 leur confère une morphologie proche d'hépatocytes en culture (Grise, en révision pour *Hepathology*, Annexe 3). Ces données confortent la démonstration du rôle des miR-200 comme gardien du phénotype épithélial.

L'effet des antimir-200b/c sur la morphologie des cellules AGS et MKN-74 (Figure 36) ressemble à celui d'*H. pylori* injectant CagA dans leur cytoplasme (Figure 31). C'est pourquoi nous nous attendions à une diminution d'expression des miR-200 dans les cellules infectées. Or nous observons une augmentation, très significative dans les résultats du séquençage, et confirmée par diverses méthodes et dans différentes lignées. Nos résultats contredisent les données de la littérature. En effet, dans des cellules gastriques infectées par le virus Epstein-Barr (EBV), un virus associé à 10% des adénocarcinomes gastriques [319], les niveaux d'expression de miR-200b et -200a sont significativement diminués dans les carcinomes gastriques positifs pour EBV, par rapport à des carcinomes négatifs pour le virus ou à la muqueuse gastrique saine, et leur diminution est directement corrélée à celle de l'E-cadhérine. Par ailleurs la lignée stable MKN-74-EBV exprimant de manière chronique les effecteurs de l'EBV présente un phénotype mésenchymateux avec diminution de miR-200b et -200a et surexpression de ZEB1, par rapport à la lignée parentale ; la transfection d'un mime de miR-200b permet de restaurer le niveau d'E-Cadhérine dans les cellules infectées à l'EBV. Des données de *microarrays* de miARN mentionnent également une diminution de miR-200a dans les muqueuses infectées ([269] et table 8), mais sans préciser davantage la part de l'hétérogénéité cellulaire dans les variations de miARN dans la muqueuse infectée, infiltrée de neutrophiles.

Devant ce paradoxe, nous avons donc cherché à comprendre le rôle et les mécanismes de cette réponse particulière des miR-200b/c des cellules épithéliales gastriques à *H. pylori*. Pour cela, il nous fallait d'abord démontrer que les modifications morphologiques induites par *H. pylori* correspondaient réellement à une TEM.

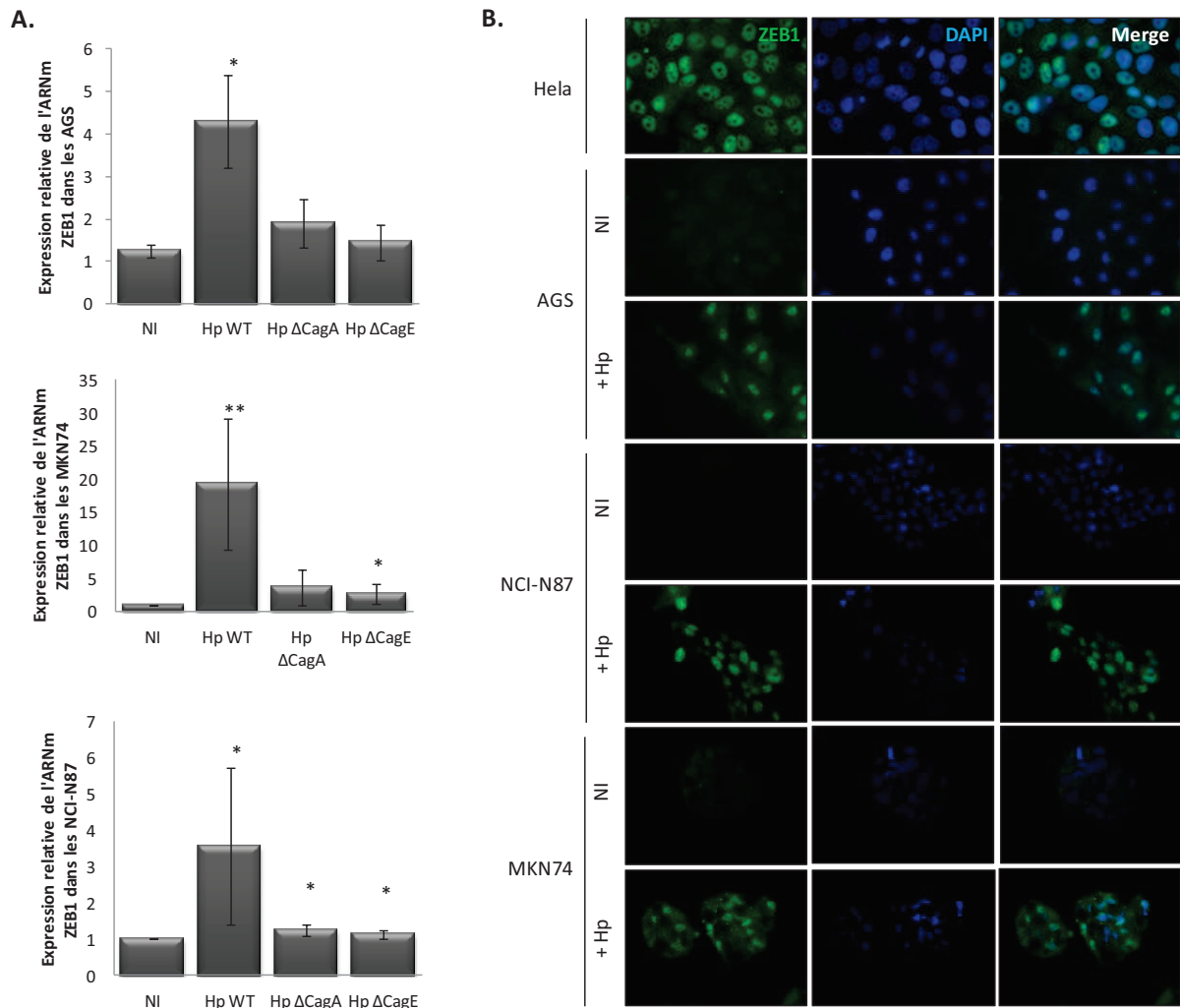


Figure 39: Induction de l'expression de ZEB1 dans les cellules épithéliales gastriques co-cultivées avec *H. pylori* 26695 WT. **A)** Analyse par RT-qPCR de la quantité relative l'ARNm de ZEB1 dans les lignées AGS, MKN74 et NCI-N87 en présence ou en absence des souches bactériennes sauvage (WT) ou mutantes. Nous remarquons que dans toutes les lignées utilisées, il y a une induction de l'expression de l'ARNm de ZEB1 lorsque les cellules sont infectées par la souche sauvage. Les résultats sont normalisés par rapport à P0 et par rapport aux cellules non infectées (NI). Les histogrammes sont représentatifs de données effectuées en doublet avec $n=4$ et où les p -valeurs correspondent à **: $p<0.01$, *: $p<0.05$. **B)** Immunofluorescence de ZEB1 (en vert) dans les cellules +/- *H. pylori* de souche sauvage. Les cellules HeLa sont utilisées en tant que contrôle positif (-) et contrôle négatif sans anticorps primaire (contrôle). Nous observons l'apparition de la fluorescence verte dans le noyau des cellules infectées, superposée à la coloration de l'ADN au DAPI (bleu) traduisant l'accumulation nucléaire de ZEB1.

III. Induction d'une transition épithélio-mésenchymateuse par *H. pylori* dans les cellules épithéliales gastriques : rôle des miR-200 et de NF- κ B.

Nous avons décrit dans les chapitres précédents que des lignées de cellules épithéliales gastriques soumises à la virulence d'*H. pylori* subissaient des changements morphologiques caractérisés par la perte de leur caractère épithélial, qui sont autant d'indices en faveur d'un processus de TEM induit par *H. pylori*. Nous nous sommes intéressés ici aux modifications d'expression de différents marqueurs de la TEM qui accompagnent ces transformations, afin de définir s'il s'agit réellement d'une TEM.

A. Induction des gènes de la TEM par *H. pylori*

1. ZEB1

Notre intérêt a porté particulièrement sur ZEB1, en tant qu'inducteur de la TEM et cible principale des miR-200. Nous avons décrit précédemment que ZEB1 n'était pas exprimé dans nos lignées en conditions basales, contrairement aux miR-200 et à la E-cadhérine (Figure 35). En effet, selon le schéma communément admis de régulation de la TEM, ZEB1/2 sont réprimés en partie par régulation post-transcriptionnelle par l'expression élevée des miR-200 et ceci permet ainsi de lever l'effet répresseur de ces facteurs de transcription sur le promoteur de l'E-cadhérine et permettre l'expression de celle-ci.

Après culture de l'une ou l'autre des lignées de CEG, AGS, MKN74 et NCI-N87 avec la souche 26695 d'*H. pylori* sauvage, pendant 24h à une MOI de 100, l'expression de l'ARNm de ZEB1, mesurée par RT-qPCR, est stimulée de plus de 4 fois dans les AGS, 19 fois dans les MKN74, et de 3.6 fois dans les NCI-N87, par rapport aux cellules non infectées (Figure 39A). Cette augmentation de l'ARNm se traduit par l'accumulation de la protéine ZEB1 après exposition à *H. pylori* dans l'une ou l'autre des lignées, comme le montrent le *western blot* en Figure 40B pour les cellules AGS et l'analyse cytochimique des trois lignées par immunofluorescence en Figure 39B. Les images de la Figure 10B mettent bien en évidence l'accumulation nucléaire de ZEB1 uniquement dans les cellules infectées, comme dans les cellules Hela à l'état basal, utilisées comme témoin positif. Nous remarquons également que l'augmentation d'expression de ZEB1 est dépendante de la présence du facteur de virulence CagA dans les cellules, puisqu'une infection des cellules par les souches mutantes isogéniques d'*H. pylori* qui n'expriment pas CagA ou ne permettent pas son injection dans les cellules hôtes, ne permet pas non plus d'augmenter le niveau de ZEB1 dans ces cellules (Figure 39A).

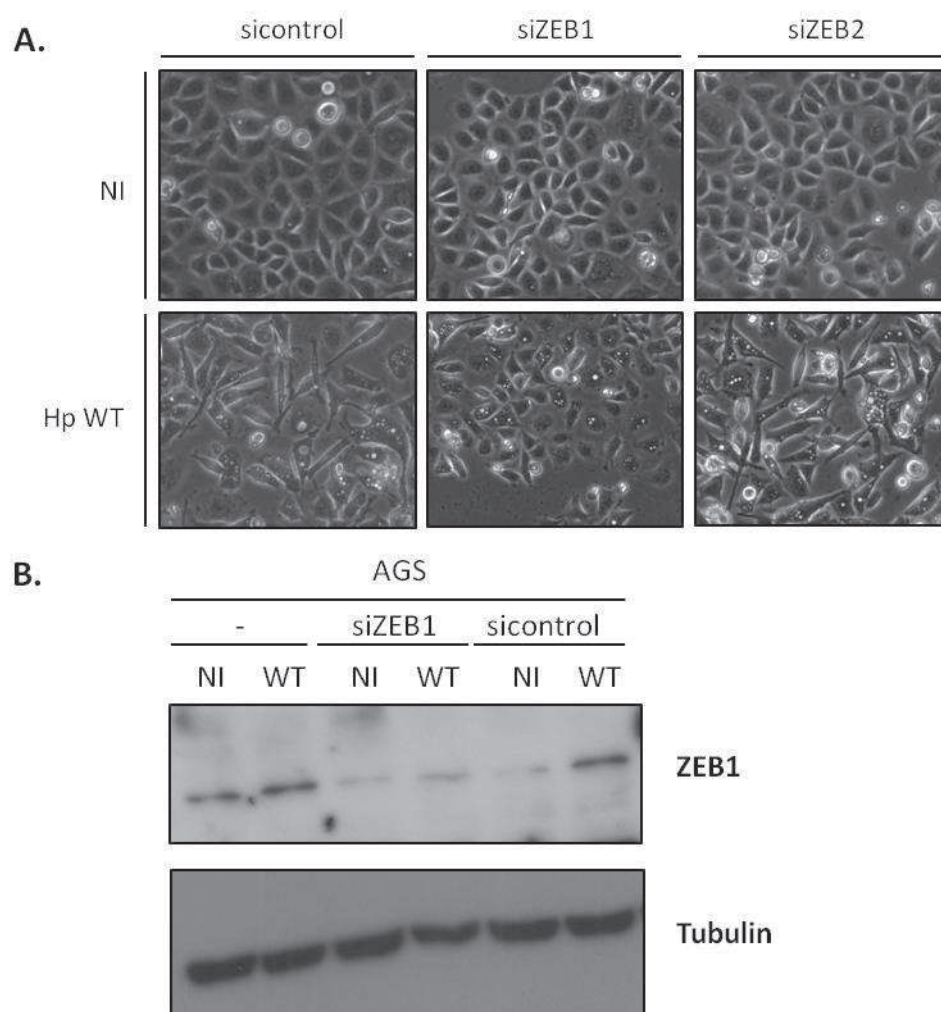


Figure 40 : ZEB1 est nécessaire au changement morphologique des cellules AGS provoqué par l'infection par *H. pylori* 26695 sauvage (WT). **A)** Morphologie des cellules visualisée par microscopie optique en contraste de phase après traitement par les siARN et infection par la souche sauvage d'*H. pylori*. Dans le cas des cellules AGS traitées avec 20 nM siZEB1, nous observons une atténuation de la transition phénotypique appelée « colibri », ce qui n'est pas le cas lorsque les AGS sont traitées avec un siARN dirigé contre ZEB2 (20 nM, siZEB2) ou un siARN contrôle (20 nM, sicontrol). **B)** Analyse du niveau protéique de ZEB1 par *western blot* dans les cellules AGS traitées avec siZEB1, sicontrol ou non traitées (-). Nous retrouvons l'induction de ZEB1 dans les cellules non traitées (-) ou traitées sicontrol lorsque les cellules sont infectées par la souche bactérienne sauvage (WT). Le traitement siZEB1 empêche l'induction protéique de ZEB1. La tubuline est un témoin de la quantité de protéines déposées dans le gel.

Afin de déterminer l'importance de ZEB1 dans la transition morphologique induite par *H. pylori*, nous avons utilisé des siARN ciblant l'ARNm de ZEB1 (notés siZEB1), afin d'empêcher son expression après infection. L'efficacité des siZEB1 par rapport à un siARN contrôle est vérifiée par *western blot* (Figure 40B) : en effet, les cellules traitées par les siZEB1 (les 2 pistes au centre du WB) ne présentent plus de stimulation de ZEB1 après infection, contrairement aux cellules témoins (les 2 pistes à gauche) ou traitées avec les siARN contrôles (les 2 pistes à droite). De manière intéressante, les cellules AGS traitées avec siZEB1 et infectées par la souche sauvage d'*H. pylori* ne présentent plus le phénotype « colibri » que de manière très atténuée, alors que les cellules traitées par les siARN contre ZEB2 (qui n'est pas exprimé dans ces cellules) présentent les altérations morphologiques attendues (Figure 40A). Ainsi, ZEB1 apparaît comme un effecteur essentiel pour la transition morphologique induite par *H. pylori* dans les cellules AGS.

2. Autres marqueurs de la TEM

Lors de la TEM, plusieurs gènes sont régulés afin de promouvoir le remodelage du cytosquelette, la capacité migratoire et l'invasion. Outre ZEB1/2, d'autres facteurs de transcription participent à cette transition, tels que Snail1/3, Slug (Snail2) ou Twist1/2. Nous ne pouvons donc pas exclure une collaboration de l'un ou l'autre de ces effecteurs dans l'induction de la transition morphologique subie par les CEG lors de l'infection par *H. pylori*. Ainsi, nous avons étudié, par RT-qPCR, les changements d'expression de différents marqueurs de la TEM, dans les trois lignées de CEG soumises à l'infection par la souche sauvage d'*H. pylori*. La Figure 41 regroupe l'ensemble des résultats et met en évidence l'induction de la plupart des marqueurs mésenchymateux étudiés, à des degrés divers. Ainsi, la vimentine, l'intégrine $\alpha 5$ et la MMP-9, qui participent respectivement au remodelage du cytosquelette et aux propriétés migratoires des cellules mésenchymateuses, sont induites dans les trois lignées en réponse à l'infection. Il faut noter particulièrement les forts taux d'induction de ces marqueurs, tout comme celui de ZEB1 dans les cellules MKN-74 infectées, qui contrastent avec la discrétion des changements morphologiques provoqués par la bactérie dans cette lignée (Figure 31). Parmi les facteurs de transcription de la TEM, nous observons un doublement significatif de Snail1 et 3 dans les cellules AGS, mais Slug et Twist1 y sont indétectables. MKN74 répond à l'infection par une augmentation de plus de 3 fois de Snail1, Slug et Snail3 après l'infection, et n'exprime pas Twist. Dans les cellules NCI-N87, tous les facteurs de transcription sont exprimés, mais seuls Slug et Snail3 subissent une stimulation notable.

L'induction de ZEB1 et d'autres marqueurs mésenchymateux dans les cellules infectées par *H. pylori* suggèrent que les changements morphologiques observés

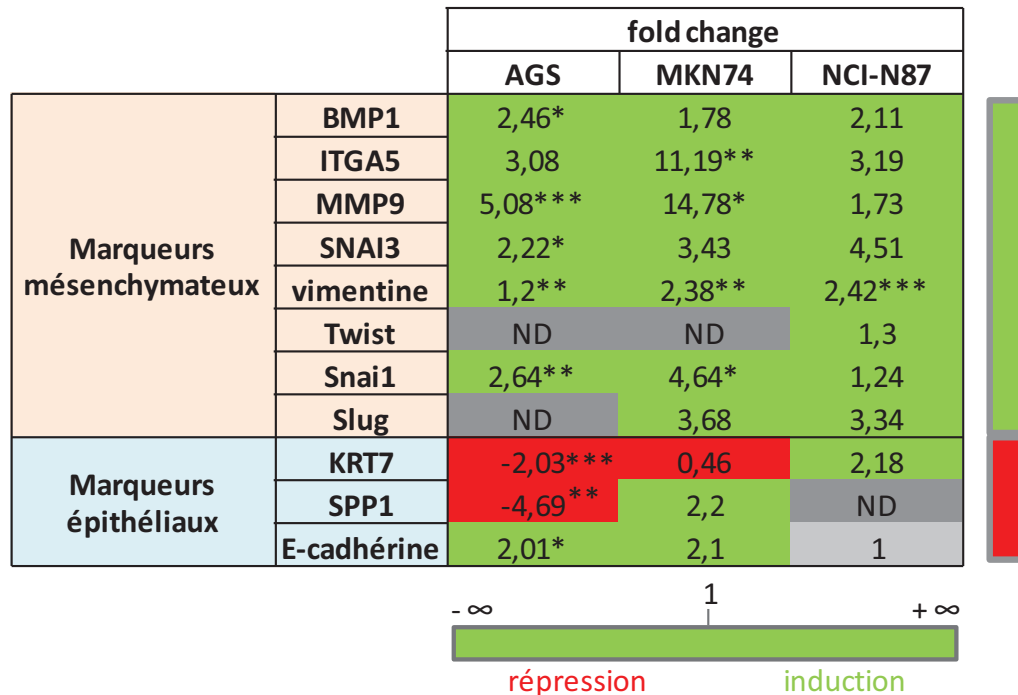


Figure 41 : Régulation des marqueurs épithéliaux et mésenchymateux au cours de l'infection dans les CEG, AGS, MKN74 et NCI-N87. Les chiffres représentent la modification de l'expression des différents gènes mesurée par RT-qPCR. Les résultats sont exprimés par le *fold change*, c'est-à-dire la variation d'expression positive ou négative dans les cellules infectées par rapport aux cellules non infectées. Une valeur supérieure à 1 correspond ainsi à une induction de l'expression et est surlignée en vert, tandis qu'une valeur inférieure à 1 ou négative signifie une répression de l'expression du gène analysé et est surligné en rouge. Globalement, dans les trois lignées utilisées, nous observons une induction des marqueurs mésenchymateux (barre verticale verte) au détriment des marqueurs épithéliaux (barre verticale rouge). Les différentes données ont été obtenus avec minimum n=3 et les *p*-valeur sont visualisables, *** : $p < 0.001$, ** : $p < 0.01$ et * : $p < 0.05$, ND pour non détecté (gris), signifie qu'aucun signal n'a pu être détecté lors de la qPCR.

correspondent à une TEM. Pour confirmer cette hypothèse, nous avons également analysé l'expression des marqueurs épithéliaux par RT-qPCR, que nous nous attendons à voir diminuer : nous avons ainsi observé la régulation négative de la kératine 7 de 4 fois et de l'ostéopontine (ou SPP1 *secreted phosphoprotein1*) de 8 fois dans les cellules infectées. Cependant, l'E-cadhérine n'obéit pas à cette régulation négative et apparaît même stimulée dans les AGS et MKN74 en réponse à *H. pylori*.

L'ensemble de ces résultats mettant en évidence l'induction de marqueurs mésenchymateux et la répression de marqueurs épithéliaux (à l'exception de l'E-cadhérine) dans trois lignées de CEG infectées, démontre qu'*H. pylori* y met en place une réelle transition épithélio-mésenchymateuse. Cette conclusion fait surgir encore davantage le paradoxe évoqué précédemment par l'augmentation des miR-200, marqueurs épithéliaux, dans ces cellules en réponse à l'infection.

B. Analyse du promoteur de miR-200b

1. L'activité du promoteur de miR-200b est inversement corrélée à l'expression de ZEB1

Pour approfondir nos investigations sur les causes de la régulation positive des miR-200 que nous avons observée lors de l'infection (Figures 34B et 37), nous nous sommes intéressés au promoteur du *cluster miR-200b-200a-429*. En effet, nous voulons nous assurer que l'augmentation des miR-200 matures, accompagnée de celle du transcrit primaire de miR-200b notamment, était réellement due à une activation transcriptionnelle du *cluster miR-200b-200a-149*. De plus, le promoteur de ce *cluster* pouvait receler des sites pour des facteurs de transcription particuliers, susceptibles de nous livrer des indices sur la raison de sa régulation positive.

L'étude du promoteur du *cluster miR-200b-200a-429* a déjà été entreprise par Braken *et al.*, qui a déterminé une région promotrice basale positionnée de -341 à +120 par rapport au site initial de transcription [170]. Les travaux menés par cette équipe ont permis de caractériser deux sites de liaison à l'ADN, appelés *E-boxes*, reconnus par les répresseurs de transcription ZEB1/2. Par alignements multiples de cette séquence chez différentes espèces, nous avons constaté qu'il s'agissait d'une région hautement conservée, en particulier chez les mammifères placentaires (Figure 42A). À notre tour, nous avons extrait cette séquence nucléotidique de 461 pb par PCR à partir de l'ADN génomique des cellules AGS et l'avons cloné en amont d'un gène rapporteur, la luciférase *firefly*, dans le vecteur d'expression pGL3-b dépourvu de promoteur ; la construction obtenue a été nommée pGL3prom200b. Nous avons transfecté cette construction, ou les vecteurs contrôles pGL3-b dépourvu de promoteur, ou pGL3-p dans lequel la transcription du gène codant la luciférase *firefly* est sous la dépendance du promoteur du SV40, chacun en présence de traces de vecteur rapporteur normalisateur

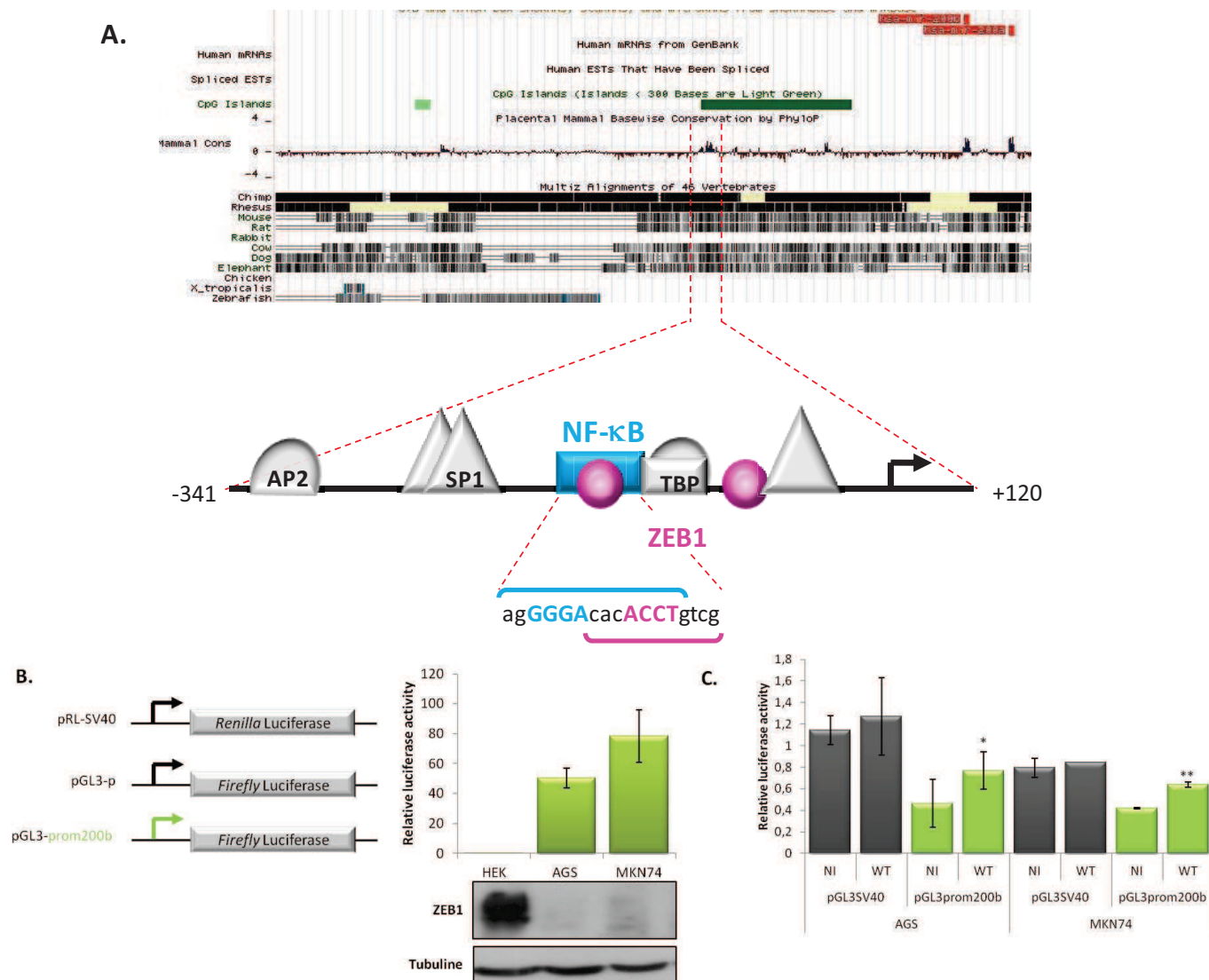


Figure 42 : Organisation schématique du promoteur du cluster *miR-200b-200a-429* et sa régulation positive lors de l'infection. **A)** Conservation et représentation schématique de la région promotrice du cluster *miR-200b-200a-429*, entre les positions -341 et +120, avec la localisation de sites de fixation pour plusieurs facteurs de transcription généraux tels que TBP, SP1 ou AP2, ainsi que les deux sites de fixation pour ZEB1, répresseur de transcription du cluster. Un site pour NF-κB a pu être identifié dans cette séquence, superposé au site n°1 de ZEB1. **B)** Activité du promoteur dans les cellules Hek293, AGS et MKN74, mesurée par le vecteur rapporteur pGL3-prom200b et comparée au vecteur contrôle pGL3-p, 72h post-transfection. L'expression de ZEB1 dans chaque lignée est visualisée par western blot. Seules les lignées cellulaires n'exprimant pas ZEB1 ont une transcription active de la luciférase. **C)** Analyse fonctionnelle du promoteur dans les AGS lors de l'infection par la souche 26695 sauvage d'*H. pylori* (MOI 100 pendant 24h), normalisée par rapport au vecteur contrôle pGL3-p dans les cellules non infectées. Le promoteur de *miR-200b* est stimulé lors de l'infection et provoque une augmentation de l'activité de la luciférase. Les données sont représentatives d'expérience avec $n=5$ et les p -valeurs correspondent à * : $p<0.05$, ** : $p<0.01$.

pRL (*Renilla* Luciferase)-SV40, dans différents types cellulaires et mesuré l'activité luciférase relative (*firefly/Renilla*) générée par chaque couple de vecteurs. Les cellules AGS transfectées avec le vecteur pGL3prom200b 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 (données non montrées), ce qui confirme les résultats de Bracken (2008), à savoir que cette région contient bien un élément promoteur de la transcription du gène rapporteur.

Afin de vérifier si l'activité transcriptionnelle de la région promotrice était spécifique de cellules épithéliales, nous avons transfecté en parallèle les vecteurs pGL3prom200b ou pGL3-p en présence de traces de pRL-SV40 dans les cellules mésenchymateuses HEK293, ou les CEG AGS et MKN74, et avons mesuré l'activité relative des luciférase à 3 jours post-transfection. Nous observons une forte activité du promoteur de miR-200b dans les CEG et au contraire une activité insignifiante dans les cellules HEK (Figure 42B). Dans ces trois lignées, l'activité du promoteur est inversement corrélée à l'expression de ZEB1, conformément à son rôle connu de répresseur transcriptionnel de *miR-200b-200a-429*.

2. L'activité du promoteur de miR-200b est stimulé par NF-κB au cours de l'infection par *H. pylori*

Nous avons ensuite étudié son activité au cours de l'infection par *H. pylori*, qui provoque l'accumulation de ZEB1. Les cellules AGS ont été transfectées avec les vecteurs rapporteur pGL3prom200b ou pGL3-p, en présence de traces du standard interne pRL-SV40, puis infectées 24h après par la souche sauvage de *H. pylori* 26695 à une MOI de 100. L'activité relative de la luciférase *firefly* déterminée à 24h post-infection révèle une activité promotrice de pGL3prom200b 2 fois plus importante dans les cellules AGS et les MKN74 infectées, par rapport aux cellules non infectées, malgré l'accumulation de ZEB1 dans ces conditions (figure 39), alors que celle du vecteur pGL3-p reste inchangée au cours de l'infection (Figure 42 C).

Dans les travaux de Bracken *et al* [170], seules les *E-boxes* reconnues par ZEB1/2 avaient été recherchées dans la séquence -321/+120 du promoteur *cluster miR-200b-200a-149*. Pour apporter des données supplémentaires sur la régulation de ce *cluster*, nous avons recherché la présence d'autres sites de liaison de facteurs de transcription dans cette séquence, grâce au logiciel bioinformatique MatInspector. Nous avons identifié plusieurs domaines de liaison pour des facteurs de transcription dont la liste non exhaustive comprend les facteurs SP1, AP2 (facteurs de transcription généraux), *Krüppel-like*, SRE (*Serum Response Element*) ou encore NF-κB (Figure 42A). Il faut rappeler que NF-κB est activé lors de l'infection des cellules épithéliales gastriques par *H. pylori* (Figure 33), et notamment de manière dépendante de la translocation de CagA

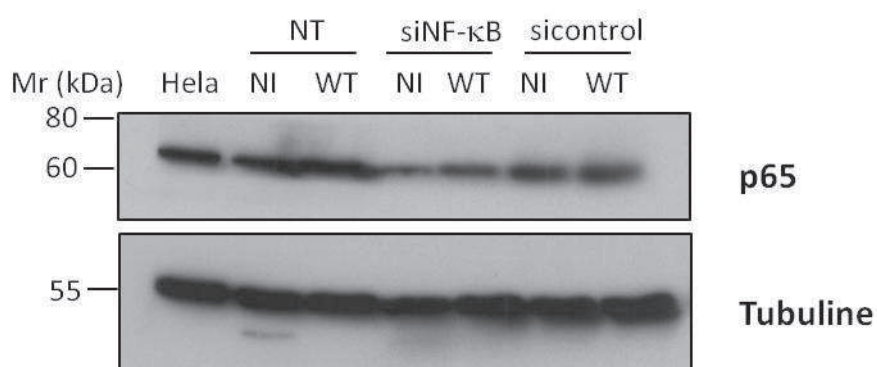


Figure 43 : Expression de p65 (RelA), composant de NF-κB, dans les cellules AGS +/- *H. pylori*, traitées par le siNF-κB ou un siARN contrôle. L'utilisation de siARN dirigés contre la protéine p65 de NF-κB (piste 4 et 5 du gel) ne permet pas une extinction efficace de la protéine dans les cellules AGS non infectées (NI) et infectées par la souche sauvage 26695 d'*H. pylori* (WT). Les protéines des cellules HeLa servent de contrôle positif. La tubuline est un contrôle de charge.

dans les cellules hôtes. Par ailleurs, le profil d'activation de NF- κ B en réponse à l'infection par la souche sauvage ou les mutants isogéniques rappelle celui des variations des miR-200b ou -200c matures ou encore du pri-miR-200b (Figure 37). C'est pourquoi il nous est apparu comme un bon candidat pour expliquer la régulation positive de ce *cluster* au cours de l'infection. Le cœur du site de reconnaissance de NF- κ B sur le promoteur de miR-200b est situé à seulement quelques nucléotides en amont du premier site de fixation de ZEB1. Du fait du chevauchement des deux sites, il pourrait y avoir une compétition de fixation de ces deux facteurs sur le promoteur au cours de l'infection. Nous émettons l'hypothèse que, lors de l'infection, NF- κ B activé est transloqué dans le noyau et se fixe sur son site dans le promoteur du *miR-200b-200a-429*, limitant ainsi l'accès de ZEB1, lui aussi augmenté au cours de l'infection. Cette compétition NF- κ B/ZEB1 au sein du promoteur de miR-200b, qui pourrait dépendre de leur niveau d'expression relatif, serait en faveur de NF- κ B au cours de l'infection, régulant positivement l'activité du promoteur, en particulier dans les cellules AGS.

Afin de valider cette hypothèse, nous devons d'abord démontrer que NF- κ B exerce une régulation positive sur le promoteur de miR-200b, en particulier au cours de l'infection. Pour cela, nous avons cherché à inhiber NF- κ B par plusieurs moyens. Nous avons d'abord utilisé des siARN dirigés contre RelA, un des partenaires protéiques composant le facteur de transcription NF- κ B. Les transfections répétées de ces molécules dans les cellules AGS pour épuiser l'ARNm de RelA n'ont pas démontré une réelle efficacité dans la régulation de NF- κ B, comme le montrent *western blot* (Figure 43). Nous avons ensuite utilisé des inhibiteurs pharmacologiques de NF- κ B. Dans les conditions basales, NF- κ B est séquestré dans le compartiment cytoplasmique par son association avec I κ B. L'activation de la voie NF- κ B consiste en une cascade d'activités kinases qui phosphorylent I κ B, qui sera détruit après ubiquitination par le protéasome, libérant ainsi NF- κ B de son emprise. NF- κ B libéré est transloqué dans le noyau où il peut alors exercer son rôle de facteur de transcription. MG132 est un inhibiteur de l'ubiquitination en général, et en particulier de celle de I κ B, mais en présence de *H. pylori*, il induit une mortalité massive quelques heures à peine après l'addition de la bactérie dans les cultures cellulaires. SN50 est un peptide compétiteur du signal de translocation nucléaire de NF- κ B et a été utilisé à une dose de 17 μ M. Enfin, face au prix de cet inhibiteur, nous nous sommes tournés vers une approche génétique, en transfectant transitoirement un vecteur d'expression de I κ B en fusion avec l'EGFP (don de Dr. F. Bellock, Pessac) de manière à surexprimer l'inhibiteur I κ B de NF- κ B. pI κ B-EGFP (ou son témoin pEGFP) a été co-transfecté avec pGL3prom200b (ou son témoin pGL3-p). En parallèle, nous avons vérifié l'efficacité de la surexpression de I κ B à empêcher l'activation de NF- κ B, à l'aide du vecteur rapporteur comportant le gène *luciférase* sous la dépendance de 6 sites de fixation de NF- κ B sur l'ADN, utilisé précédemment (Figure 32).

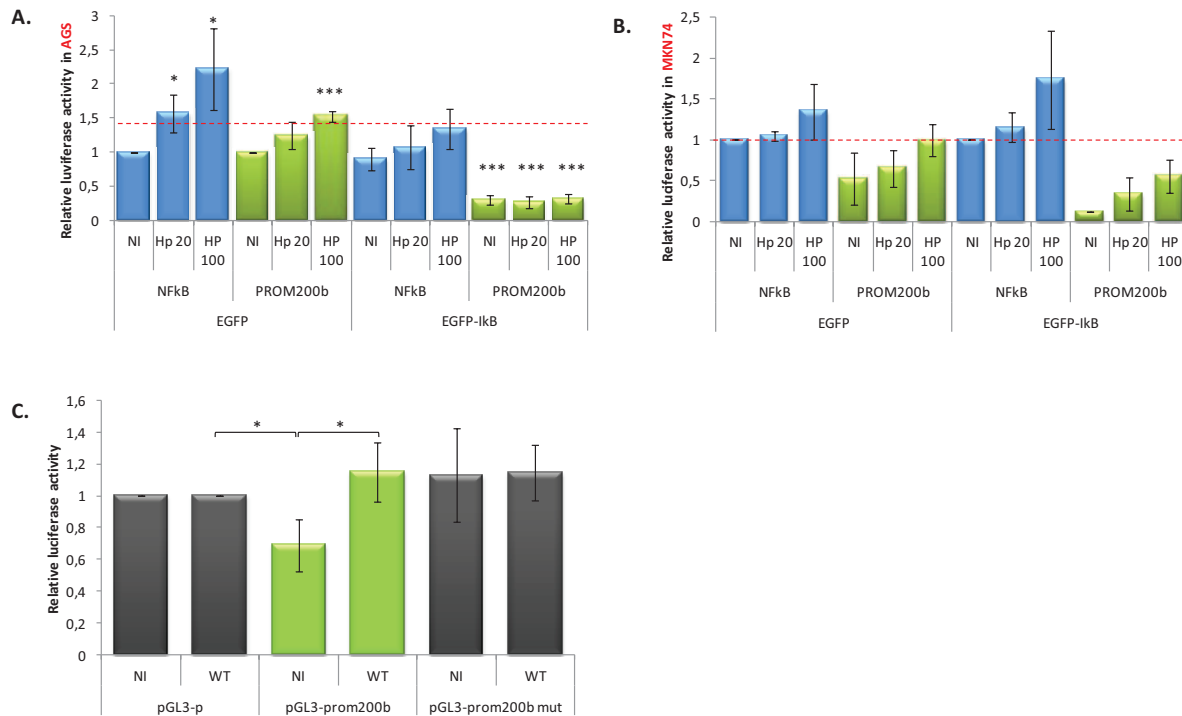


Figure 44 : Analyse de l'effet de l'inactivation de NF- κ B sur la stimulation du promoteur du *cluster miR-200b-200a-429* lors de l'infection des cellules AGS et MKN74. A) Les cellules AGS ont été transfectées par les vecteurs rapporteurs de NF- κ B (+traces de pRL-SV40) ou du promoteur de miR-200b (+ traces de pRL-SV40), chacun en présence de pEGFP ou de pIκB-EGFP, puis soumises à l'infection par *H. pylori* 26695 de souche sauvage à des MOI croissantes. L'activité luciférase relative est mesurée à 24h post-infection. L'activité NF- κ B est stimulée au cours de l'infection tout comme l'activité du promoteur du miR-200b. L'inhibition de NF- κ B par la surexpression de son séquestrateur IκB supprime l'activité luciférase liée au promoteur de miR-200b dans les cellules AGS. **B)** Les cellules MKN74 ont été transfectées et infectées dans les mêmes conditions que les cellules AGS en (A). Mais l'inactivation de NF- κ B par la surexpression de IκB est inefficace dans ces cellules, et l'activité du promoteur de miR-200b n'est pas affectée de manière significative par la surexpression de IκB. **C)** Conséquence de la mutagenèse dirigée effectuée sur le site de fixation de NF- κ B dans le promoteur de miR-200b dans les AGS. Les cellules ont été transfectées avec pGL3, pGL3prom200b ou pGL3prom200b muté, chacun en présence de traces de pRL-SV40, puis infectées avec *H. pylori* à MOI 100. Les activités luciférases relatives sont mesurées à 24h post-infection. Alors que le promoteur parental pGL3-prom200b est activé lors de l'infection, celle du promoteur portant la mutation pGL3-prom200b mut se trouve augmentée en conditions basales, mais n'est plus sensible à l'infection, tout comme le vecteur pGL3p. Les données sont représentatives d'expériences n=3, avec les p-valeur suivantes, *: $p < 0.05$, *** : $p < 0.001$.

Après 24h de co-culture avec *H. pylori* de souche sauvage, les cellules AGS témoins, transfectées avec l'EGFP, présentent une activation de NF- κ B parallèle à celle du promoteur de miR-200b, toutes deux dépendantes de la multiplicité d'infection (Figure 44A). Dans les mêmes conditions, les cellules AGS transfectées avec I κ B-EGFP ne présentent quasiment plus d'activation de NF- κ B en réponse à l'infection, l'activité du promoteur de miR-200b est effondrée et insensible à l'infection. Ainsi NF- κ B stimule l'activité transcriptionnelle du promoteur du *cluster miR-200b-200a-149* dans les cellules AGS, non seulement au cours de l'infection, mais également dans des conditions basales.

Dans les cellules MKN74 témoins, transfectées avec EGFP, l'activation de NF- κ B à MOI de 100 n'est pas significative par rapport à celle de cellules non infectées (Figure 44B). La surexpression de I κ B dans ces cellules MKN74 est inefficace, car les tendances de variations observées ne sont pas significatives. Des expériences supplémentaires utilisant d'autres méthodes sont nécessaires pour déterminer le rôle de NF- κ B sur l'activation du promoteur de miR-200b dans ces cellules.

Pour démontrer que l'effet de NF- κ B sur le promoteur de miR-200b s'exerce par sa fixation sur le site que nous avons identifié, chevauchant celui de ZEB1, nous avons muté ce site par mutagénèse dirigée sur le vecteur pGL3prom200b, en remplaçant les trois guanosines sur le coeur du site de liaison par trois adénosines. La construction mutée a été transfectée dans la lignée AGS co-cultivée ou non avec *H. pylori*. De manière inattendue, l'activité luciférase du promoteur miR-200b muté sur le site de fixation de NF- κ B est fortement stimulée par rapport à celle du promoteur originel dans les conditions basales. Elle n'est pas stimulée davantage dans les cellules infectées, contrairement à celle du promoteur originel (Figure 44C). Le vecteur pGL3prom200b muté sur le site NF- κ B se comporte comme pGL3-p, ou encore comme celui qui est muté sur les sites ZEB1/2, décrit dans la publication de Bracken [170] : il est donc possible que les mutations par lesquelles nous pensions empêcher la fixation de NF- κ B affectent tout de même les sites de fixation de ZEB1.

C. Rôle de NF- κ B dans l'induction de la TEM par *H. pylori*

Nous avons observé que les cellules AGS transfectées avec le vecteur d'expression pEGFP-I κ B ne subissaient plus les changements morphologiques caractéristiques mais restaient pavimenteuses en réponse à *H. pylori*, contrairement aux cellules transfectées avec le vecteur pEGFP (Figure 45A). Ceci suggère que l'activation de NF- κ B lors de l'infection pourrait être impliquée dans la régulation de la TEM. L'analyse de l'expression des gènes de la TEM dans les cellules surexprimant I κ B montrent que le transcrit *primiR-200b-200a-429* n'est plus augmenté par *H. pylori*, confirmant l'inactivité du promoteur dans ces conditions (Figure 44A), que ZEB1 n'est plus induit, et que l'augmentation de la vimentine est amoindrie, par rapport aux cellules transfectées

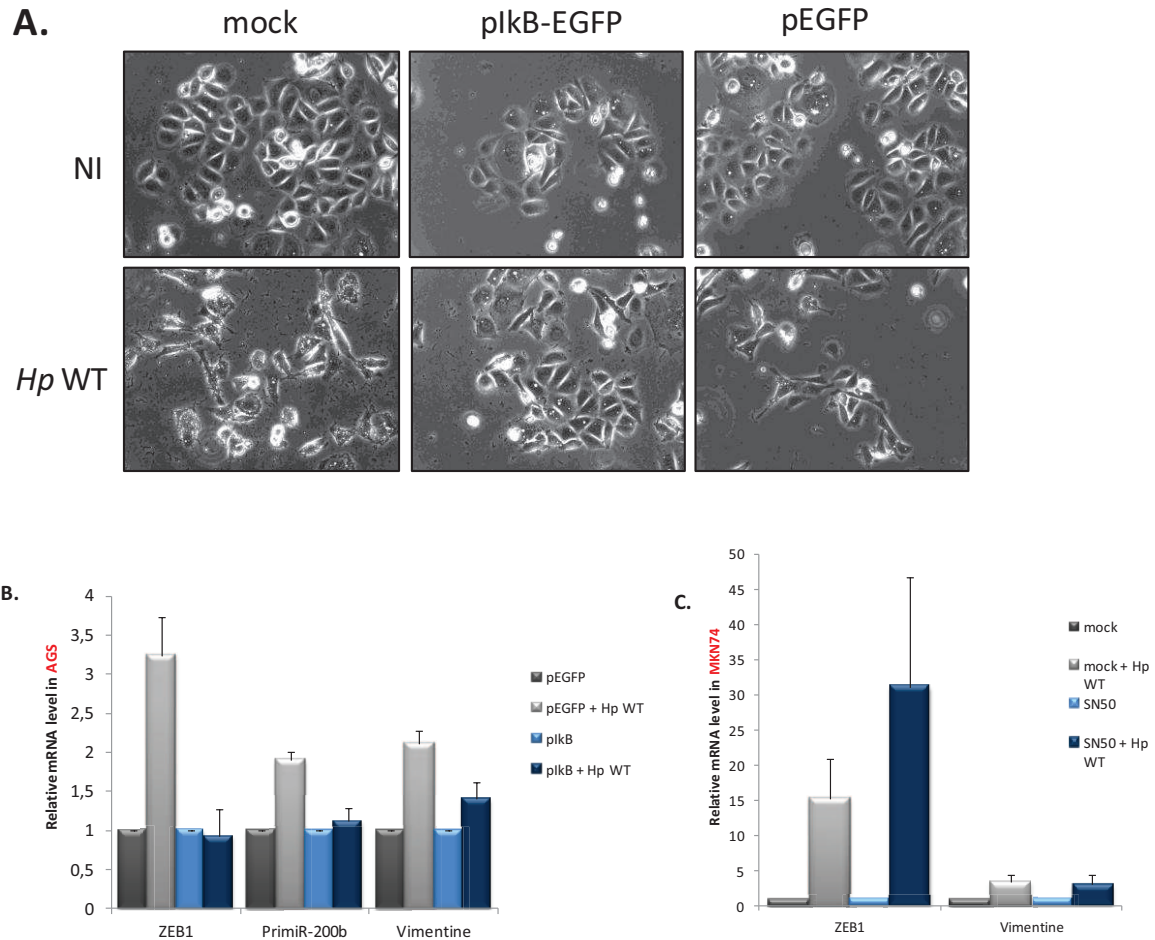


Figure 45 : Rôle de NF- κ B dans la TEM induite par *H. pylori* dans les AGS et les MKN74. A) Observation en microscopie optique en contraste de phase des cellules AGS transfectées avec pEGFP ou l'inhibiteur de NF- κ B, en co-culture avec la souche sauvage d'*H. pylori* (MOI 100, 24h). En présence de I κ B, la morphologie dite colibri des cellules AGS infectées est fortement atténuée, contrairement aux cellules infectées et transfectées avec le vecteur contrôle pEGFP. **B)** Mesure par RT-qPCR du niveau d'expression des ARNm de ZEB1, de la vimentine et du primiR-200b-200a-429 dans les cellules AGS transfectées par pEGFP ou par plkB. L'inhibition de l'activation de NF- κ B empêche la stimulation de ces trois marqueurs de TEM par *H. pylori*. **C)** Effet de l'inhibition de NF- κ B sur l'induction de ZEB1 et de la vimentine dans les MKN74 en réponse à l'infection. Les cellules ont été traitées par l'inhibiteur compétitif de NF- κ B SN50 à 17 μ M, 1 h avant d'ajouter les bactéries à MOI 100. L'utilisation de SN50 est sans effet sur la stimulation des gènes par la bactérie.

avec pEGFP et infectées (Figure 45B). Ces résultats montrent donc que NF- κ B, activé par l'infection, est impliqué de manière primordiale non seulement dans l'induction du gène maître de la TEM des AGS, ZEB1, mais également de celui de son régulateur post-transcriptionnel miR-200b, de manière à maintenir sous contrôle la transition morphologique des cellules.

Dans les cellules MKN74, le traitement par l'inhibiteur compétitif SN50 de NF κ B avant d'y ajouter *H. pylori* n'empêche pas l'activation de ZEB1 et de la vimentine au cours de l'infection (Figure 45C). Des expériences supplémentaires seraient nécessaires pour établir si nos moyens d'inactivation de NF κ B sont insuffisants dans cette lignée cellulaire ou si une autre voie de signalisation, prédominante par rapport à celle de NF- κ B, serait mise en jeu pour induire la TEM dans les cellules MKN74 en interaction avec la bactérie.

D. La régulation post-transcriptionnelle de ZEB1 par les miR-200 est efficace dans les cellules infectées

Enfin, nous nous sommes demandé si les miR-200b et -200c, augmentés au cours de l'infection mais apparemment incapables de contrecarrer la TEM dans les cellules AGS, étaient toujours fonctionnels dans ces cellules infectées. Pour cela, nous avons utilisé le vecteur rapporteur psiZEB1 contenant la région 3'NT de l'ARNm de ZEB1. Ce vecteur nous avait permis de montrer que les miR-200b/c exprimés à l'état basal étaient bien fonctionnels, puisqu'ils étaient capables d'inhiber à 80% l'activité luciférase du vecteur par rapport à un vecteur contrôle dépourvu de 3'NT dans les cellules non infectées (Figures 36E et 46). Dans les cellules AGS infectées pendant 24h et à MOI 100, nous n'observons pas de diminution supplémentaire de l'activité luciférase relative du vecteur psiZEB1 par rapport aux cellules non infectées (Figure 46A). Ceci suggère que les miR-200 des cellules infectées répriment aussi bien leur cible que dans les cellules non infectées, mais que le niveau supplémentaire produit en réponse à l'infection est inefficace à la réprimer davantage, peut-être parce que cette régulation a déjà atteint un niveau maximal avec le taux basal de ces miARN.

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons augmenté les niveaux de miR-200b et -200c endogènes avec des oligonucléotides qui les miment : il s'agit d'ARN double brin, dont la séquence du brin sens de 22 nucléotides est identique à celle du miR-200b ou -200c matures. Ils sont notés mim200b et mim200c. Un ARN double brin de séquence brouillée, noté mim-Sc, sert de témoin. Lorsque nous transfectons les cellules AGS avec un mélange de mim200b et mim200c, nous ne constatons aucun changement morphologique des cellules non infectées, qui restent cohésives et pavimenteuses, caractéristiques de cellules de type épithélial. Mais, contrairement à notre attente, en présence du pathogène, les AGS traitées avec les mimic-200 adoptent aussi le phénotype « colibri » typique de l'infection, tout comme les cellules traitées avec un mime contrôle

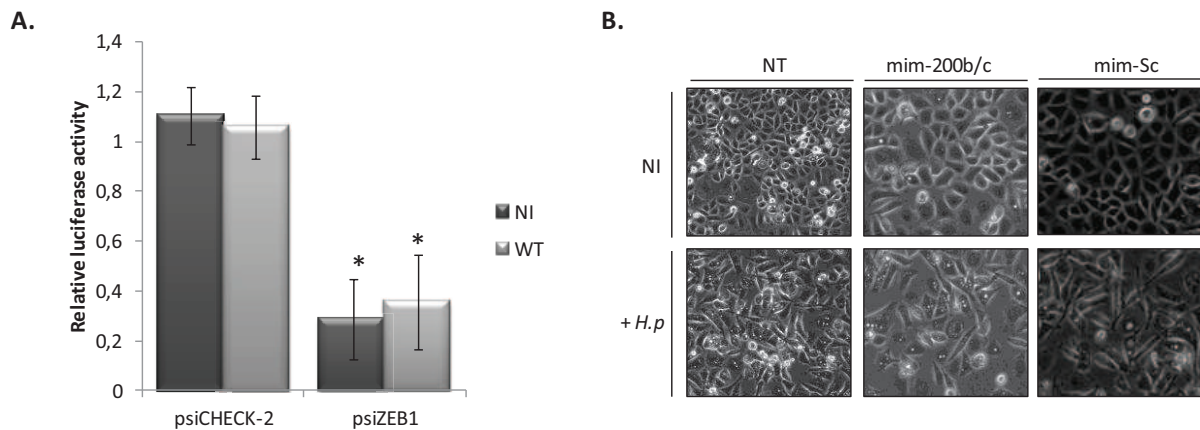


Figure 46 : La sur-expression des miR-200 est inefficace pour contrôler l'induction de la TEM dans les cellules AGS infectées. A) Répression post-transcriptionnelle de ZEB1 mesurée par l'activité luciférase relative produite par le vecteur rapporteur psiZEB1 et comparée à celle du vecteur contrôle psiCHECK2, dans des cellules AGS infectées (barres gris clair) ou non (barres gris foncé) par *H. pylori* de souche sauvage (MOI 100, 24h). Les barres représentent les activités luciférases relatives moyennes $\pm$ SD *Renilla/Firefly* produites par l'un ou l'autre des vecteurs transfectés la veille de l'infection, mesurées 24h post-infection. ZEB1 reste réprimé post-transcriptionnellement pendant l'infection et l'augmentation du niveau des miR-200 pendant l'infection est inefficace à réprimer davantage leur cible, l'ARNm de ZEB1. **B)** Microscopie optique en contraste de phase des cellules AGS traitées avec les oligonucléotides mim-200b/c +/- infection par *H. pylori* 26695 MOI 100 pendant 24h. La transfection de mim-200 n'empêche l'apparition du phénotype colibri dans les AGS lors de l'infection par la souche sauvage.

(Figure 46B). En effet, nous nous attendions à ce que les mim200 reproduisent l'effet des siZEB1 (Figure 40A). Ces résultats suggèrent que la surproduction de miR-200b/c au cours de l'infection n'aurait pas de fonction particulière, si ce n'est de garantir le maintien d'une concentration élevée de ces régulateurs dans une situation critique où les cellules sont en train de perdre leur identité épithéliale.

E. Discussion et conclusion

Les résultats décrits dans ce chapitre révèlent trois faits majeurs caractérisant l'action d' *H. pylori* sur la morphologie des CEG :

- a) la bactérie induit bien une TEM, dont l'un des gènes maîtres est ZEB1 ;
- b) malgré l'induction de marqueurs mésenchymateux, les cellules infectées continuent à exprimer des marqueurs épithéliaux, et notamment stimulent leur production de miR-200, sous l'influence de NF- κ B activé par l'infection ;
- c) l'activation de NF- κ B due à la translocation de CagA dans les cellules épithéliales, induit en parallèle les effecteurs de la TEM et ses régulateurs miR-200.

Les altérations que les souches virulentes d' *H. pylori* provoquent dans les CEG, et qui ont sans doute pu être révélées par cette lignée particulièrement sensible à la bactérie que constituent les cellules AGS, n'ont jamais été analysées sous l'angle de la TEM. Cette notion est cependant mentionnée dans certaines publications récentes. [304] Nous montrons ici qu' *H. pylori* via CagA induit ZEB1 et de nombreux autres marqueurs mésenchymateux identifiés en Figure 41, dans différentes lignées présentant divers degré de différenciation épithéliale. La participation de ZEB1 dans la transition morphologique des cellules AGS est primordiale, parce que la répression de ce gène suffit à empêcher les effets morphologiques d' *H. pylori* dans ces cellules. Il n'est cependant pas exclu que d'autres effecteurs de la TEM, comme Snail1/2 ou Twist, soient également importants, mais dans ce travail consacré principalement à ZEB1 en raison de sa connexion avec les miR-200, nous n'avons pas étudié les conséquences de leur inhibition.

L'implication directe de ZEB1 dans la TEM a été démontrée dans de nombreux travaux rapportant la répression transcriptionnelle de l'E-cadhérine, ZO-1 et l'induction de marqueurs mésenchymateux par l'expression ectopique de ZEB1 dans des cellules épithéliales [157, 320]. L'induction de ZEB1 par des pathogènes a été décrite dans le cadre de l'infection des cellules épithéliales gastriques par l'EBV [319], où elle est associée à une répression des miR-200b, -200a et de l'E-cadhérine dans la lignée MKN-74-EBV. Ces mêmes changements de l'expression des gènes surviennent dans des cancers gastriques associés à l'EBV, suggérant qu'ils aient participé à la carcinogénèse d'origine virale de la muqueuse gastrique. La différence entre les résultats de Shinozaki et les nôtres est l'échelle de temps : alors que Shinozaki *et al.* ont étudié les changements

de l'expression des gènes dans une lignée chroniquement infectée par EBV, nous analysons les effets aigus de l'infection sur une période de 24 h.

C'est dans ce cadre que nous observons une augmentation des miR-200b et -200c en réponse à *H. pylori*, due à une activation de leur biosynthèse comme en témoignent les augmentations du transcrit primaire et de l'activité du promoteur de miR-200b (du moins dans les cellules AGS). De manière originale, nous montrons que cette production de miARN est dépendante du facteur de transcription NF- κ B dans les cellules AGS. Considérant la localisation de son site de fixation sur le promoteur du miR-200, à cheval sur celui de ZEB1, il pourrait y avoir une compétition avec ZEB1, qui a un effet opposé à celui de NF- κ B, l'issue de la compétition entre ces deux facteurs dépendant sans doute de leur niveau relatif.

L'activation de la voie NF- κ B est l'une des plus importantes voies de transduction de signal impliquée à la fois dans des processus physiologiques et dans des conditions pathologiques. Elle intervient principalement dans l'immunité innée et la production de cytokines pro-inflammatoires par différents types cellulaires en réponse à des agressions, parmi lesquels les microbes [321]. En effet, en injectant CagA et le peptidoglycane via le SST4 dans le cytoplasme des cellules épithéliales gastriques, *H. pylori* active la voie ERK/NF- κ B, ce qui stimule entre autres la production de la chemokine IL-8, comme nous l'avons montré dans ce travail. Moins connue est l'action de NF- κ B dans la promotion et le maintien du phénotype invasif, promu par l'induction de la TEM dans des cellules épithéliales. En effet, Wirth *et al.* ont identifié NF- κ B comme le médiateur principal de la TEM dans un modèle de progression du cancer mammaire chez la souris [322] : l'inhibition de l'activité de NF- κ B réduit la formation de métastases dans le poumon et la taille de la tumeur primaire de cellules épithéliales transformées par l'oncogène Ras. La sous-unité RelB de NF- κ B promeut le phénotype invasif de tumeurs mammaires négative pour le récepteur aux oestrogènes [323]. L'activation de NF- κ B a été associée à l'induction de ZEB1 et ZEB2 dans la lignée épithéliale mammaire MCF-10A exprimant constitutivement la sous-unité p65 de NF- κ B ; dans cette même lignée la transfection transitoire de p65 stimule l'activité du promoteur de ZEB1 [324]. L'induction de ZEB1 et ZEB2 par NF- κ B peut également être observée en traitant les cellules MCF-10A avec IL-1 α ou le TNF α [324]. NF- κ B est aussi un médiateur important de l'expression de Snail1 au cours de la TEM de la lignée épithéliale mammaire MCF10A surexprimant de manière constitutive le récepteur de l'*insulin-like growth factor type I* (IGF-IR) [325], et de Twist dans des cellules cancéreuses traitées par des agents chimiothérapeutiques [326]. Il est connu depuis longtemps que NF- κ B se lie sur les promoteurs des gènes de la vimentine [327] et de la MMP-9 [328, 329].

De plus, la chemokine IL-8 elle-même peut participer à la mise en place et/ou le maintien de la TEM dans les cellules épithéliales, comme le réfèrent plusieurs équipes. Hwang *et al.*, 2011, ont analysé par microarray l'expression génique de colonies sphériques, appelées colosphères, isolées à partir de tumeur colorectales primaires et de

lignées tumorales coliques et montré que les colosphères présentait des caractéristiques de TEM avec l'expression de Snail1. La surexpression de Snail1 dans ces cellules induit la production accrue de l'IL-8, par fixation de Snail1 sur deux *E-boxes* localisées dans le promoteur de l'IL-8 [330]. Fernando *et al*, 2011, en étudiant le rôle des cytokines dans la TEM, ont découvert par microarray que l'IL-8 et la voie IL-8/IL-8R étaient fortement induites. Des expériences complémentaires d'inhibition de la voie IL-8 par utilisation d'anticorps bloquants le récepteur de l'IL-8 et de surexpression d'une IL-8 recombinante mettent en évidence l'importance de cette chemokine dans l'induction de la TEM dans une lignée cellulaire de cancer du sein [331].

Conformément à ces données de la littérature, nous montrons ici qu'en empêchant l'activation de NF- κ B, nous entravons la TEM, à la fois d'un point de vue morphologique (les cellules AGS infectées ne présentent plus le phénotype colibri) et d'un point de vue génique (l'induction de ZEB1 et la surexpression du pri-miR-200b sont toutes deux supprimées en réponse à l'infection). Le modèle de régulation que nous proposons et qui pour l'instant se limite aux cellules AGS, faute de preuves dans les 2 autres lignées de CEG, met en évidence l'induction parallèle de l'effecteur (ZEB1) et du régulateur miR-200 de la TEM. Ce schéma de régulation rappelle celui décrit par Taganov [257] dans la régulation de l'immunité innée des monocytes après sollicitation des TLR par des motifs associés aux pathogènes : l'activation de NF- κ B par la cascade de signalisation des TLR induit en parallèle les cytokines pro-inflammatoires et miR-146a, dont les cibles sont IRAK et TRAF6, des effecteurs de la cascade de signalisation entre le TLR4 et NF- κ B. La répression post-transcriptionnelle des cibles du mir-146a est destinée à éviter l'emballement de la production de cytokines pro-inflammatoires, qui pourrait provoquer un choc septique dans l'organisme. Le schéma similaire de régulation a été établi dans le cadre de l'inflammation pour miR-155 [256]. En ce qui concerne les miR-200 dans le cadre de la régulation de la TEM induite par *H. pylori*, leur surexpression constituerait une réponse des cellules épithéliales infectées destinée à limiter la dérive de la TEM promotrice d'invasion et de métastase. Comme dans le cas des miR-146 et -155 induits en réponse aux pathogènes dans les monocytes, la surexpression des miR-200 dans les cellules infectées survient dans un contexte inflammatoire que les cellules tentent de juguler en mettant en jeu des miARN comme un garde-fou, grâce à leur possibilité de réguler post-transcriptionnellement l'expression des gènes.

L'inhibition de l'activation de NF- κ B est actuellement reconnue comme une stratégie thérapeutique pour combattre les maladies inflammatoires [332], et également pour lutter contre la progression tumorale invasive et métastatique [333]. Les données de la littérature mentionnées ci-dessus rapportant le rôle de NF- κ B dans l'induction des effecteurs de la TEM, ajoutées à nos résultats sur les cellules épithéliales gastriques dans le contexte de l'infection par *H. pylori*, suggèrent que l'inhibition de l'activation de NF- κ B pourrait stopper la progression, l'invasion et la métastase des cancers suite à la dysrégulation du processus de la TEM. Cette stratégie pourrait être bénéfique également dans la prévention de carcinogenèse induite par l'infection chronique par *H. pylori*.

Néanmoins, la meilleure stratégie reste encore l'éradication de la bactérie, du moins avant le stade de la transformation métaplasique de la muqueuse gastrique.

Les résultats négatifs que nous avons obtenus en surexprimant I κ B dans la lignée MKN74 ou en les traitant avec SN50, suggèrent que le rôle de NF- κ B dans l'induction et la régulation de la TEM pourrait être plus complexe que dans les cellules AGS et, dans une muqueuse gastrique, pourrait sans doute faire intervenir d'autres facteurs ou mettre en jeu d'autres voies de transduction du signal. De multiples voies de signalisation sont capables d'induire la TEM telles que les voies *Wnt*/ β -caténine ou *Sonic Hedgehog*, ou encore celles initiées par l'EGF (*Epidermal Growth Factor*), l'HGF (*Hepatocyte Growth Factor*), le TNF α (*Tumor Necrosis Growth Factor*) ou par le TGF β (*Transforming Growth Factor*). Comme nous l'avons mentionné dans l'introduction, *H. pylori* interfère avec plusieurs de ces cascades de signalisation *via* CagA.

IV. Implication de la voie du TGFβ dans la TEM induite par *H. pylori* : une connexion possible entre la régulation du *cluster miR-371-372-373* et la TEM lors de l'infection

Nous venons de montrer dans les chapitres précédents le rôle des miR-200 dans la protection contre la transition épithélio-mésenchymateuse, un mécanisme carcinogène, des cellules épithéliales gastriques. Cependant, malgré leur surproduction lors de l'infection, ils sont incapables de jouer leur rôle de gardien du phénotype épithélial lorsque les cellules sont mises en présence d'*H. pylori*.

La TEM peut être induite par différents stimuli, parmi lesquels le TGFβ (*Transforming Growth Factor-β*) l'un des inducteurs principaux [334]. La fixation de TGFβ₁ sur les récepteurs membranaires à haute affinité TGFβR1 et TGFβR2 active une cascade de signalisation conduisant à la translocation des protéines SMAD dans le noyau (§ Introduction). Ces facteurs de transcription vont pouvoir à leur tour activer la synthèse de différents gènes effecteurs de la TEM. Des travaux récents étudiant le rôle de miARN ESCC dans la reprogrammation de fibroblastes en iPSC ont mis l'accent sur la participation de miR-372 dans la régulation de cette voie de signalisation [335], en identifiant par bioinformatique le TGFβR2 comme cible de miR-372. Ils ont en effet démontré que miR-372 ciblait directement la région 3'NT de l'ARNm du TGFβR2 et inhibait son expression, contribuant ainsi à la reprogrammation des fibroblastes en iPSCs et à leur transition mésenchymo-épithéliale (TME) en inhibant l'activation de la voie du TGFβ. De plus, ils montrent que la transfection de miR-372 dans une lignée de kératinocytes humains inhibe la TEM induite par le TGFβ, conformément à son action répressive de TGFβR2.

En chapitre II.A, nous montrons que miR-372 et miR-373, abondants dans les cellules AGS, étaient diminués lors de l'infection par *H. pylori*, en conséquence d'une répression très précoce du transcrit primaire du *cluster miR-371-372-373* sous la dépendance de l'effecteur bactérien CagA (publication Belair ci-jointe). Nous basant sur la publication de Suramanyan *et al* [335], nous nous sommes alors demandés si la diminution des miR-372 et -373 en réponse à *H. pylori* pouvait participer à l'induction de la TEM dans les cellules AGS en dé-réprimant TGFβR2, rendant ainsi les cellules sensibles au TGFβ, inducteur de TEM.

A. Le TGFβR2 est bien une cible de miR-372/373 dans les cellules AGS

Afin de déterminer si le TGFβR2 était bien une cible de miR-372/373 dans les cellules AGS, nous avons utilisé le vecteur rapporteur psiTGFβR2 (don du Dr. R Blelloch), contenant la région 3'NT de l'ARNm du TGFβR2 en aval du gène de la luciférase *Renilla*.

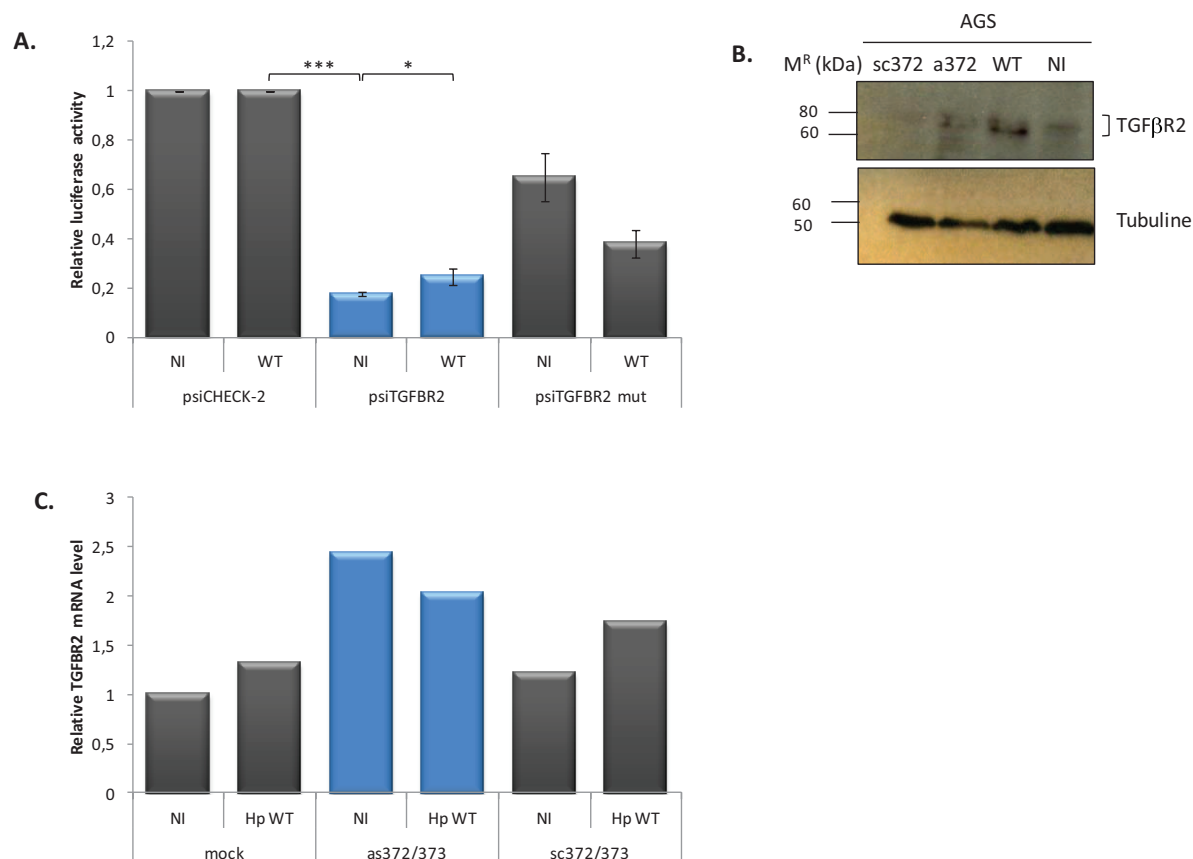


Figure 47 : Les miR-372/373 régulent TGFβR2 dans les AGS au cours de l'infection.

A) Les cellules AGS ont été transfectées avec les vecteurs rapporteurs psiCHECK2 (contrôle), psiTGFBR2 (comportant le 3'NT de TGFβR2 avec 6 sites des miR-372/373) ou psiTGFBR2 muté (comportant le 3'NT muté sur 3 des 6 sites de miR-372/373), puis infectées avec *H. pylori* 26695 de souche sauvage à MOI 100. L'activité luciférase relative est mesurée 24h post-infection. L'activité luciférase de psiTGFBR2 est réprimée à l'état basal par rapport au vecteur contrôle, et partiellement déréprimée lors de l'infection. Lorsque les sites des miARN sont mutés, l'activité luciférase est déréprimée, même dans les cellules non infectées. Les données sont représentatives d'expériences n=3, avec les p-valeurs suivantes, * = $p < 0.05$, *** = $p < 0.001$. **B)** Western blot de TGFβR2 dans les cellules AGS non infectées (NI), infectées par *H. pylori* souche sauvage (WT) à MOI100 pendant 24h, ou traitées par des oligonucléotides antisens anti-miR372/373 (a372, 100nM, pendant 2x2j) ou des contrôles (sc372, 100nM). TGFβR2 ne s'accumule que dans des conditions qui inhibent les miR-372/373. **C)** Mesure de l'expression du TGFβR2 par RT-qPCR de dans les cellules AGS traitées ou non avec les anti-miR372/373 ou les sc372/373 et infectées dans les mêmes conditions que (B). L'expression de TGFβR2 est stimulée dans les cellules infectées mock ou traitées aux sc372/373 par rapport aux cellules non infectées, ainsi que dans les cellules traitées aux antisens indépendamment de l'infection par rapport aux cellules traitées aux sc372/373. Les histogrammes représentent la valeur relative moyenne de TGFβR2 par rapport à HPRT1 et aux cellules mock non infectées (une expérience en doublet).

La région 3'NT de l'ARNm du TGF β R2 contient 6 sites potentiels de fixation pour le miR-372 ou miR-373, qui ont été identifiés par bioinformatique en recherchant des séquences complémentaires à la séquence graine du miR-372, identique à celle de miR-373. Après transfection transitoire des cellules AGS avec psiTGFBR2 ou le vecteur témoin vide psiCHECK-2, nous avons mesuré les activités luciférase *Renilla* normalisée par rapport à celle de la luciférase *firefly*, dont le gène est porté par le même vecteur. Ainsi dans les conditions basales, l'activité relative de luciférase produite par le vecteur psiTGFBR2 est fortement diminuée dans les cellules AGS par rapport à celle du vecteur contrôle vide (Figure 47A), en raison de l'abondance de miR-372/373, qui en se fixant sur les 6 sites de la région 3'NT de l'ARNm TGF β R2, inhibent post-transcriptionnellement la synthèse de luciférase *Renilla*. La mutation de 3 des 6 sites de fixation des miR-372/373 lève partiellement l'inhibition post-transcriptionnelle de psiTGFBR2. Ces résultats suggèrent que TGF β R2 est bien une cible des miR-372 et miR-373 exprimés dans les cellules AGS.

B. La diminution des miR-372/373 au cours de l'infection lève l'inhibition post-transcriptionnelle de TGF β R2 dans les cellules AGS

Afin de déterminer si la régulation post-transcriptionnelle de l'ARNm du TGF β R2 par miR-372-373 était effective lors de l'infection, nous avons transfecté transitoirement les vecteurs psiTGFBR2 sauvage ou muté dans les cellules AGS avant de les infecter avec la souche sauvage d'*H. pylori*. Dans ces conditions, nous notons que l'activité relative de luciférase produite par le vecteur psiTGFBR2 sauvage est augmentée dans les AGS infectées par rapport à celle des cellules non infectées, alors que les activités des vecteurs vides ou psiTGFBR2 muté restent inchangées (Figure 47A). Ces résultats sont en accord avec la diminution de miR-372/373 au cours de l'infection qui lève l'inhibition post-transcriptionnelle de psiTGFBR2 sauvage, mais non celle du vecteur muté où ces miARN ne peuvent pas se fixer.

Pour conforter cette hypothèse, nous avons vérifié la régulation positive sur le TGF β R2 en analysant son niveau protéique par western blot (Figure 47B). En effet, nous détectons l'apparition d'une bande correspondant à la taille de TGF β R2 dans les AGS cultivées en présence de la bactérie sauvage, ainsi que dans les cellules traitées avec les oligonucléotides antisens as372/373. Cette bande n'apparaît pas dans les cellules traitées aux oligonucléotides de séquence brouillée sc372/373. L'accumulation de la protéine TGF β R2 dans les cellules infectées ou traitées aux as372/373 s'accompagne dans les deux cas d'une augmentation de son ARNm : de 31% dans les cellules infectées par rapport aux cellules non infectées, et de 2,4 et 2 fois dans les cellules non infectées traitées aux as372/373 par rapport aux cellules non traitées ou traitées aux sc372/373, respectivement (Figure 47C). Ceci suggère que la levée de

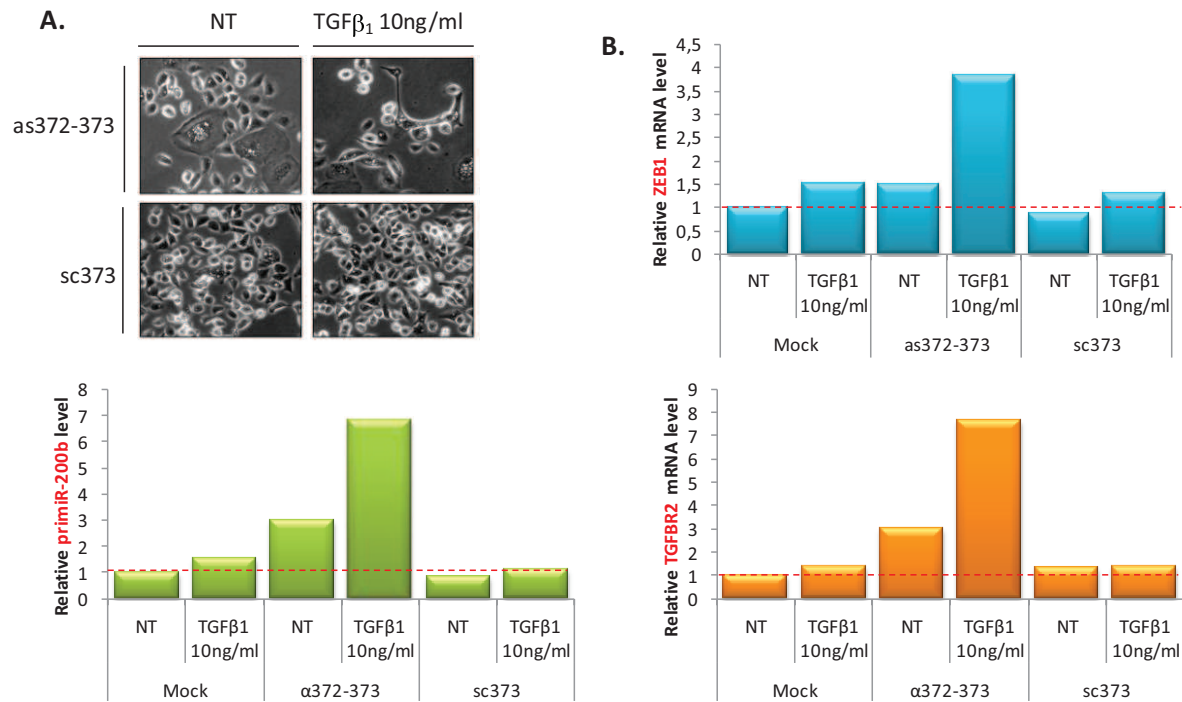


Figure 48: Induction d'une TEM dans les AGS après traitement par antimR-372/373 et TGFβ₁. **A)** Changements morphologiques dans les AGS après le traitement combiné antimR-372/373 (100nM) et TGFβ₁ (10 ng/mL) pendant 48 h : les cellules s'individualisent et s'allongent, selon une morphologie typique d'une TEM. **B)** Analyse par RT-qPCR de l'expression de ZEB1, du primiR-200b-200a-429 et du TRGβR2 dans les AGS traitées dans les mêmes conditions qu'en (A). On observe que TGFβ₁ stimule l'expression de ces trois gènes seulement après inhibition de miR-372/373 (as372-373).

l'inhibition post-transcriptionnelle de TGF β R2 par l'inhibition des miR-372/373 stabilise également son ARNm.

Ainsi, dans les conditions basales, les niveaux élevés de miR-372/373 répriment la traduction de l'ARNm du TGF β R2, et *H. pylori*, en réprimant le *cluster* miR-371-372-373, fait diminuer les niveaux de miR-372/373 matures et lève l'inhibition de la traduction de TGF β R2. La question qui se pose maintenant est de savoir si la dérépression de TGF β R2 est fonctionnelle et rend les cellules sensibles au TGF β .

C. TGF β ₁ induit une TEM dans les cellules AGS à condition d'inhiber miR-372/373

En tant qu'inducteur de la TEM, TGF β devrait pourvoir induire un phénotype mésenchymateux dans les cellules AGS exprimant TGF β R2. Afin de tester cette hypothèse, nous avons tout d'abord traité les cellules AGS avec les antimiR-372/373 afin d'inhiber ces miARN et lever l'inhibition du TGF β R2, puis avec TGF β ₁ (10ng/mL) pendant 48h. En effet, nous avons pu observer en microscopie optique que les AGS traitées à la fois avec les as372/373 et le TGF β ₁ adoptaient un phénotype de cellules allongées, dissociées les unes des autres, caractéristique de la TEM, contrairement aux cellules traitées avec les as372/373 seuls, ou avec le TGF β ₁ seuls, ou bien encore avec les oligonucléotides contrôles sc372/373 plus TGF β ₁ (Figure 48A).

Nous avons quantifié par RT-qPCR l'expression de TGFBR2, de ZEB1 et du pri-miR-200b-200a-429 dans les cellules traitées au TGF β ₁ dans les conditions où miR-372/373 étaient inhibés ou non. Les cellules AGS parentales ou traitées par les sc372/373 répondent au TGF β ₁ par une augmentation modeste (moins de 2 fois) de l'expression de ces gènes (Figure 48B). Mais après traitement aux antimiR-372/373, nous observons une augmentation de deux fois de leur expression en réponse au TGF β ₁, par rapport à celles traitées par les sc372/373. Tout comme dans les cellules infectées par *H. pylori*, la TEM induite par as372/373+TGF β ₁ est accompagnée d'une augmentation du pri-miR-200b-200a-429 de 2,3 fois, alors qu'il n'est pas affecté par le TGF β ₁ dans les cellules traitées aux sc372/373.

Ainsi, nous avons vérifié l'hypothèse que l'inhibition des miR-372/373 rendait les cellules AGS plus sensibles au TGF β ₁, qui deviennent capable d'y induire une TEM sur le plan morphologique et moléculaire. Nous retrouvons dans les cellules AGS doublement traitées aux as372/373 et au TGF β ₁ les mêmes caractéristiques de la TEM que celles de l'infection par *H. pylori* 26695 sauvage, à savoir l'allongement et la dispersion des cellules simultanées à l'augmentation des marqueurs mésenchymateux, mais également l'augmentation de l'expression des miR-200, qui là encore reste inefficace pour contrecarrer la TEM induite.

Afin d'évaluer l'importance du TGF β R2 dans l'induction de la TEM dans les cellules AGS en réponse à *H. pylori*, nous avons traité les cellules avec des siARN contre le TGF β R2 (siTGFBR2) ou avec les miR-372/373 synthétiques mim372/373, avant de les infecter avec *H. pylori* pendant 24h à MOI de 100. Cependant, en comparaison avec les cellules traitées avec des siARN contrôles et infectées, ni les siTGFBR2 ni les mim372/373 n'empêchent l'établissement du phénotype « colibri » par *H. pylori* (données non montrées). Ceci suggère que dans les cellules AGS, la voie du TGF β ne serait pas la voie principale d'induction de la TEM au cours de l'infection.

D. Discussion et conclusion

Conformément aux données rapportées par Supramanyan [335] dans des fibroblastes subissant la TME, nos résultats montrent que les niveaux élevés de miR-372 et -373 dans les cellules AGS inhibent post-transcriptionnellement le récepteur TGF β R2 à haute affinité pour le TGF β ₁, rendant ces cellules insensibles à cet inducteur puissant de TEM, dans les conditions basales. L'interaction des cellules AGS avec *H. pylori* conduit à une diminution précoce de la biosynthèse de ces miARN, mettant en jeu le facteur de virulence CagA : la conséquence de l'interférence de ce pathogène avec ce cluster de miARN est au moins double, d'une part l'arrêt de la progression dans le cycle cellulaire (Chap.II.A), d'autre part la sensibilité au TGF β ₁ montrée ici, qui pourrait ainsi participer à l'induction de la TEM.

La muqueuse gastrique infectée par *H. pylori* produit un ensemble de chemokines et de cytokines qui jouent un rôle majeur dans la réponse immunitaire contre le pathogène. Ces cytokines peuvent être produites par les monocytes attirées sur le site de l'infection par l'IL-8 produites par les cellules épithéliales. Beswick *et al.* [336] démontrent que les cellules épithéliales gastriques produisent aussi du TGF β ₁ et TGF β ₂ en réponse à des souches virulentes d'*H. pylori*, et que cette production inhibe la prolifération de lymphocyte T CD4⁺ en y induisant l'expression de TGF β R1 et TGF β R2. Les cellules AGS pourraient produire du TGF β dans les mêmes conditions et nos résultats suggèrent que cette production, associée à la dé-répression de TGFBR2 par la diminution de miR-372/373, restaurerait la voie autocrine du TGF β , contribuant ainsi à l'induction de la TEM dans les cellules AGS infectées. Cependant, la suppression de TGF β R2 n'empêche pas la TEM induite par *H. pylori*, suggérant que dans ces cellules, la voie du TGF β , si elle est impliquée, ne l'est pas de manière majeure et est probablement dominée par celle de NF- κ B, comme nous l'avons montré précédemment (Chap.III). Une fois encore, ce sont les cellules AGS qui nous ont permis d'explorer un nouveau mécanisme des actions pathogènes de la bactérie, et la dépendance de l'expression de TGF β R2 des niveaux de miR-372-373 qui ne sont exprimés que dans des cellules souches embryonnaires ou de certaines tumeurs, ne permet donc pas de généraliser ce

mécanisme aux cellules épithéliales gastriques plus différenciées. Nous n'avons pas encore approfondi cette voie de signalisation dans les autres CEG.

Les voies de NF- κ B et du TGF β sont connectées par TAK1 (*TGF β -activated kinase 1*) [337], une kinase en amont de IKK (*I κ B kinase*), qui en phosphorylant I κ B permet l'activation de NF- κ B. Lamb *et al.* [338] montrent que TAK1 est essentiel pour l'activation de NF- κ B et que c'est CagA, par son interaction directe avec TAK1, qui stimule son activité. Cette activation directe par CagA court-circuiterait les récepteurs du TGF β , et expliquerait pourquoi dans les cellules AGS, la suppression de TGF β R2 n'empêche pas la TEM induite par *H. pylori*.

Le TGF- β a des effets nombreux et complexes sur les cellules. Il a été suggéré que pendant l'infection par *H. pylori*, son induction par les monocytes et par les cellules épithéliales constituerait un mécanisme par lequel la bactérie manipule les réponses immunitaires de l'hôte pour favoriser sa persistance dans la muqueuse [339, 340]. Un travail sur un modèle murin précise que le TGF β produit par l'infection par *H. pylori* conduit au développement d'un état de tolérance immunologique, dont les médiateurs sont les lymphocytes T régulateurs. Cette tolérance n'est effective que si l'infection survient à un jeune âge du sujet infecté, qu'elle protège alors de la transformation préneoplasique de la muqueuse gastrique infectée [341].

Conclusion générale et perspectives

Cette étude fonctionnelle des miARN régulés par *H. pylori* nous a conduit à reconsidérer les mécanismes de certains effets du pathogène sur les cellules épithéliales gastriques. Ces mécanismes avaient été établis principalement sur le modèle des cellules AGS, que nous avons utilisé également dans ce travail, avec encore deux autres lignées.

Premièrement, notre analyse globale du miRNome des AGS a révélé un profil particulier de miARN de cette lignée avec l'expression majoritaire du *miR-371-372-373*, caractéristique des cellules souches embryonnaires. Cette observation restreinte aux cellules AGS leur confère donc un statut de cellules souches/progénitrices à croissance rapide, ce que les nombreuses analyses de leur transcriptome n'avaient pas révélé. Le facteur de virulence CagA d'*H. pylori* interfère avec l'expression de ce *cluster*, de manière très précoce, après son interaction avec les cellules AGS, en réprimant la transcription de son transcrit primaire. La voie de signalisation mise en jeu par cet effecteur pour la répression du *cluster* n'est pas encore clairement établie, malgré les avancées auxquelles C. Belair avait déjà abouti sur la régulation du promoteur de ce *cluster* (Thèse de C. Belair, Bordeaux, 2010). La diminution du taux de miR-372 et -373 consécutive à la répression du *cluster* lors de l'infection s'est révélée déterminante pour l'arrêt du cycle provoqué par *H. pylori* et a permis de mettre en évidence un mécanisme insoupçonné de régulation du cycle cellulaire par le pathogène, notamment la dérégulation post-transcriptionnelle de *LATS2* [310]. De plus, la diminution du taux de miR-372 et -373 lors de l'infection a révélé une autre de leurs cibles, le récepteur du TGF β , TGF β R2, que nous avons été amenés à étudier dans le cadre de ce travail de thèse consacré à la TEM induite par *H. pylori*. En effet, nous avons montré que la diminution des miR-372/373 rétablissait la sensibilité des cellules AGS au TGF β ₁, qui y provoquait alors les mêmes caractéristiques morphologiques et géniques que l'infection. Cependant, cette voie de signalisation ne semble pas primordiale dans les cellules AGS au cours de l'infection.

Deuxièmement, les variations d'expression des miARN observées dans les cellules AGS en réponse à l'infection nous ont amené à étudier les miR-200 et leur cible ZEB1, et à considérer les manifestations morphologiques provoquées par les souches virulentes d'*H. pylori* dans les cellules AGS, le phénotype fibroblastique « colibri », comme une réelle TEM associée à l'induction d'un ensemble de facteurs de transcription et d'effecteurs mésenchymateux. De manière importante, ces caractéristiques géniques de TEM provoquées par la translocation de CagA dans les cellules peuvent aussi être mises en évidence dans d'autres lignées épithéliales gastriques, malgré des variantes dans les manifestations morphologiques (extrusion de la couche plutôt que phénotype fibroblastique) sans doute liées à leur degré de différenciation, comme l'avait évoqué Saito *et al.* [309] ZEB1, qui n'avait jamais été étudié dans le cadre de l'infection par *H. pylori*, s'est révélé être le gène maître de la TEM induite par le pathogène, du moins dans les cellules AGS. Son importance devra cependant être caractérisée davantage dans les autres lignées, ainsi que la/les cascade(s) de signalisation mis en jeu.

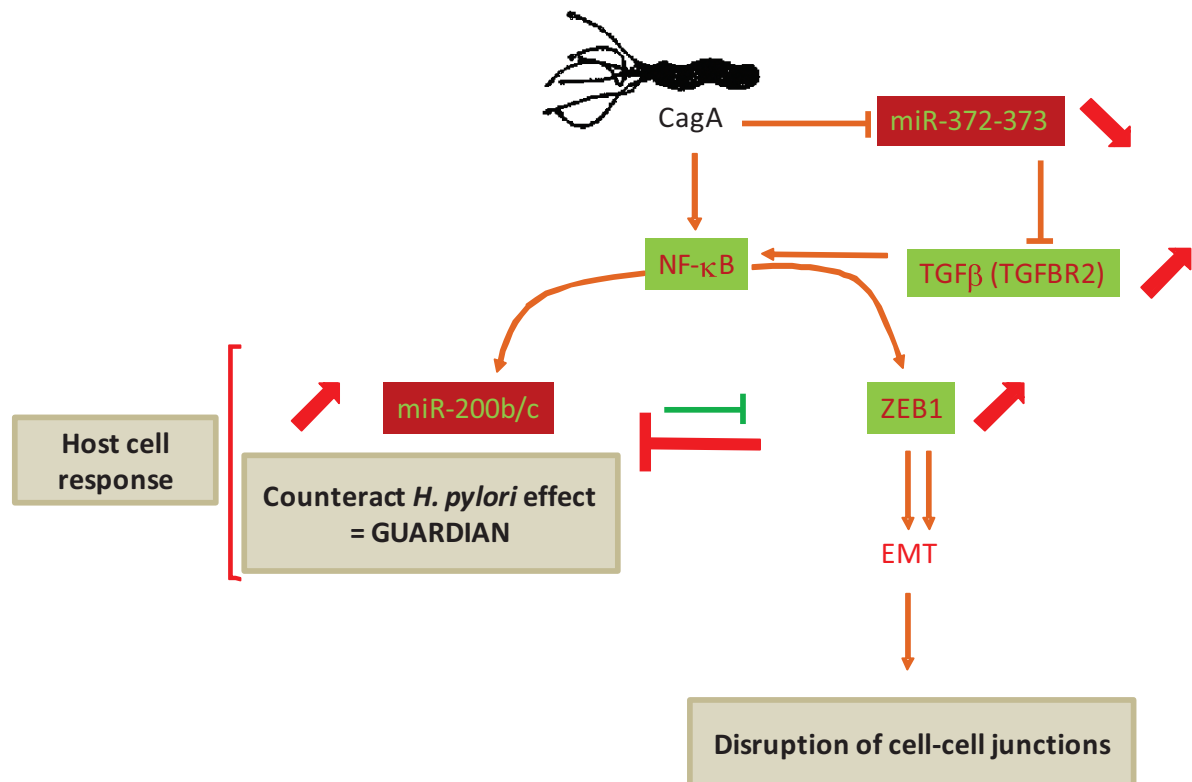


Figure 49 : Schéma général de la régulation de la TEM lors de l'infection des AGS par *H. pylori*.

Les relations entre ZEB1 et les miR-200 sont complexes, puisque les deux partenaires entrent dans une boucle de rétroaction négative réciproque, largement démontrée dans d'autres types de cellules épithéliales subissant une TEM. Nous avons montré ici que malgré l'induction de ZEB1, des marqueurs de la TEM et des changements morphologiques, les cellules infectées exprimaient encore davantage de miR-200, « gardiens » du phénotype épithélial. Nous avons mis longtemps à résoudre ce paradoxe, qui avait été révélé originellement par les résultats de l'analyse globale du miRNome des cellules AGS.

Troisièmement, c'est en analysant le promoteur du *cluster de miR-200b-200a-429* que nous avons pu apporter un élément de réponse à ce paradoxe. En effet, nous avons identifié, dans le promoteur de ce *cluster*, un site pour NF- κ B, à cheval sur l'une des boîtes E reconnues par ZEB1. Nous avons montré dans les cellules AGS que ce facteur de transcription, activé par l'infection, orchestre à la fois les réponses inflammatoires avec la production d'IL-8 et la TEM avec, non seulement la transcription de l'effecteur principal ZEB1, mais également celle de l'un de ses régulateurs post-transcriptionnels miR-200b. Cette double régulation est sans doute destinée à maintenir la TEM sous contrôle. Nous n'avons cependant pas pu démontrer aussi clairement l'importance de NF- κ B dans les réponses des autres lignées cellulaires, à la virulence de *H. pylori*, parce que nous n'avons pas réussi jusqu'à présent à entraver expérimentalement son activation par *H. pylori*. Nous envisageons d'approfondir la compétition qui pourrait exister entre NF- κ B et ZEB1 pour leurs fixations sur leurs sites imbriqués dans le promoteur du miR-200b par des expériences d'immunoprécipitation de chromatine (ChIP), avec l'aide de l'équipe du Pr. Mr. Teichmann, experte dans cette technique.

Ainsi, les résultats de notre étude fonctionnelle sur ces deux groupes de miARN, miR-372/373 et miR-200b/c permettent de répondre de manière positive à la question qui était à l'origine de ce travail, « Les miRNA interviennent-ils dans les réponses des cellules hôtes à l'infection par *H. pylori* ? ». En effet, alors qu'*H. pylori* interfère de manière précoce avec l'expression de miR-372/373, la surexpression des miR-200 est une réponse des cellules à l'infection. CagA est le médiateur de l'effet de la bactérie sur les miR-372/373 des cellules hôtes et, *via* NF- κ B de la réponse de celles-ci par la surexpression des miR-200b/c (Figure 49).

Ces résultats sont pour l'instant confinés à des modèles *in vitro* de cellules épithéliales gastriques dérivées de tumeurs. Malgré leurs limites en tant que représentation de la muqueuse gastrique saine, ce sont ces modèles qui permettent d'aborder des mécanismes à un niveau moléculaire, dans une population cellulaire homogène et de manière reproductible. Ce sont ces modèles également qui ont révélé les altérations de la morphologie cellulaire provoquées par l'infection. Il convient maintenant de confirmer leur signification dans le contexte d'une muqueuse gastrique entière au cours de l'infection et des étapes de sa transformation néoplasique. C'est pourquoi en collaboration avec le Dr. Christine Varon, INSERM U853, Bordeaux, nous

avons entrepris de rechercher l'induction de ZEB1 par histochimie sur du tissu gastrique humain infecté par *H. pylori*, selon le stade de la progression de la pathologie gastrique provoquée par la bactérie.

Enfin, une question qui s'est souvent posée dans ce projet de recherche est de savoir si *H. pylori* interférait avec la voie de biosynthèse des miARN comme il interfère avec des voies de signalisations cellulaires, par l'interaction directe de CagA avec une multitude d'effecteurs cytoplasmiques de ces voies. Nous montrons qu'il inhibe miR-372/373 en réprimant la transcription du *cluster miR-371-372-373*. Se pourrait-il qu'il interfère avec les miR-200 produits en excès en réponse à l'infection et cependant inefficaces à en contrecarrer les altérations morphologiques ? Nous envisageons d'analyser la possibilité qu'*H. pylori* interfère avec la disponibilité des miR-200 matures, peut-être en les séquestrant dans les *P-Bodies* ou dans un compartiment multivésiculaire.

Matériels & Méthodes

I. Culture in vitro des cellules épithéliales gastriques

Les lignées AGS (ATCC CRL-1739) et NCI-N87 (ATCC CRL-5822) sont cultivées en monocouche dans du milieu DMEM/HAM F12, la lignée MKN74 (HSRRB FC-2008-028) en milieu RPMI, les lignées HeLa et HEK293 en DMEM. Les milieux de cultures sont supplémentés en 10% de sérum de veau fœtal décomplémenté (SVF) et 2 mM de L-glutamine. Les cellules sont incubées à 37°C dans une atmosphère humide enrichie en 5% de CO₂. Lorsque le tapis cellulaire est confluent, les cellules sont détachées par une solution de trypsine-EDTA et 1/5-1/10 de la suspension cellulaire est ré-ensemencé dans un nouveau flacon de culture. Nous avons pris soin de ne pas sub-cultiver les lignées à plus de 10 passages depuis leur achat. Les stocks cellulaires sont conservés en suspension dans 90% SVF 10% Diméthyl sulfoxyde dans l'azote liquide. Tous les réactifs de cultures cellulaires sont achetés chez Invitrogen.

II. Culture des souches bactériennes

A. *Helicobacter pylori*

Pour ce travail de thèse, nous avons utilisé exclusivement la souche d'*Helicobacter pylori* 26695 (CIP 106780, Institut Pasteur, Paris, France), dont le génome est entièrement séquencé. Cette souche est *cagA*⁺ et *vacA*⁺. *H. pylori* est cultivée sur gélose Columbia (Oxoid) supplémentée de sang de cheval laqué (7% v/v) (Oxoid) et d'un cocktail d'antibiotiques : Vancomycine (10 mg/L), Trimethoprim (5 mg/L), et d'antifongiques : Cefsulodine (5 mg/L), Amphotéricine B (5mg/L) (Dent, Oxoid). Les géloses ensemencées sont incubées à 37°C dans une jarre Oxoid Anaero JarTM sous atmosphère microaérophile (5% d'O₂, 10% CO₂) générée par un sachet Oxoid CampyGenTM (Oxoid).

Nous avons produit des mutants isogéniques de cette souche délétés pour *cagA* (HpΔCagA) ou pour *cagE* (HpΔCagE). L'ADN chromosomique de la souche 26695 d'*H. pylori* a servi de matrice pour les différentes PCR conduisant à la formation d'une cassette de résistance à la kanamycine (*aphA3*). Les PCR ont été réalisées avec le kit « Expand High Fidelity Plus DNA Polymerase » (Roche), selon les recommandations de H. de Reuse, Institut Pasteur, Paris. La cassette de résistance va permettre de cibler le locus génomique contenant la séquence du gène d'intérêt, par recombinaison homologue. La cassette de résistance est construite selon un protocole de PCR trois temps :

1. La première PCR est réalisée dans le but d'obtenir trois fragments : un fragment homologue à la région amont de la séquence cible, un fragment homologue à la région aval de la séquence cible et un fragment correspondant à la séquence du gène *aphA3*. L'ADN génomique d'*H. pylori* 26695 a été utilisé pour amplifier les fragments de

500 paires de bases (pb) entourant la séquence cible avec les couples d'amorces A2/A1 et B1/B2 (Table 13).

Pour chaque couple, une amorce (A1 et B1) contient à son extrémité 5' une région de 17-18 pb homologue à l'extrémité du gène *aphA3* codant pour la kanamycine, lui-même amplifié à partir du plasmide pUC18K2 (don de H. De Reuse, Paris) avec les amorces K1h-K2h [342][341]. Le mélange réactionnel (50 µL) est constitué de 100 ng d'ADN génomique ou 1 ng de pUC18K2, de 0,2 mM de dNTP, du tampon « high fidelity » contenant le magnésium, de 3,75 unités d'enzyme « *Expand high fidelity PCR system* », des amorces A1-A2 (région amont), ou bien B1-B2 (région aval) ou encore K1h-K2h (gène *aphA3*) à 0,6 µM. Après une étape de dénaturation initiale de l'ADN de 2 min à 92°C, le programme PCR se poursuit par 15 s à 92°C (dénaturation), 30 s à 50°C (hybridation des amorces), 40 s à 68°C (élongation) pendant 30 cycles, pour finir par une élongation finale de 7 min à 68°C. La taille des fragments PCR est vérifiée par migration électrophorétique de 10 µL de produits PCR avec 2 µL de tampon 6X sur un gel d'agarose 2% w/v contenant 100 ng/mL de bromure d'éthidium. La migration se fait à 100V dans du tampon TBE 0,5X (Tris 44.5 mM pH = 8, 44.5 mM acide borique, 1 mM EDTA) et la distance de migration des différents fragments est comparée à celle d'un marqueur de taille, le 100 pb (Biolabs).

2. Après extraction sur gel de tous les produits PCR par le kit QIAquick gel extraction (Qiagen), la quantité de chacun des produits est déterminée par spectrophotométrie à 260nm en utilisant un spectrophotomètre Nanodrop®; en effet, une unité de DO à 260 nm correspond à 50ng/µL d'ADN. La deuxième PCR est réalisée avec des quantités équimolaires pour les trois fragments PCR, dans trois conditions, c'est-à-dire 100 ng, 50 ng, et 25 ng de produits PCR, et en utilisant les amorces externes A2 et B2 à 0,6 µM final chacune. La réaction et le programme PCR sont identiques à ceux de la première PCR. Une fois la PCR effectuée, 10 µL de chaque condition PCR est déposé sur un gel d'agarose 0,8% w/v contenant du bromure d'éthidium et la migration se fait dans du tampon TBE 0,5X à 100V. La distance de migration des fragments est comparée à celle d'un marqueur de taille de 1 kb (Biolabs).

3. Il est rare que la bande attendue soit unique ; dans ce cas, il faut la purifier à partir d'un gel d'agarose 0,8% w/v et réaliser une nouvelle PCR avec les amorces A2-B2, dans les mêmes conditions mentionnées plus haut, à partir de 1/50 du produit purifié. À l'issue de cette PCR, on obtient une bande unique de la taille attendue qui correspond à notre cassette de résistance. Cette bande est purifiée par le kit QIAquick PCR purification (Qiagen) et une estimation de la quantité de produits est mesurée par spectrophotométrie à 260 nm

Les mutants $\Delta cagA::aphA3$ et $\Delta cagE::aphA3$ sont obtenus par transformation de la souche 26695 *d'H. pylori*, naturellement compétente, avec la cassette de résistance construite auparavant. La souche 26695 est cultivée à partir d'un stock à -80°C sur une gélose Columbia non sélective pendant 24h. Elle est ensuite repiquée sous forme de *patch*, cultivée pendant 24h, puis à nouveau repiquée en *patch*. Après 5h de culture,

l'ADN des cassettes de résistance à la kanamycine est simplement déposé sur le tapis bactérien à différentes concentrations, de 0,5 à 1 µg de cassette kanamycine par 25 µL et par *patch*, ou 25 µL d'eau comme contrôle négatif de la transformation d'*H. pylori*. Les bactéries ainsi transformées sont incubées pendant 24h à 37°C puis repiquées sur un milieu Columbia supplémenté de kanamycine à 20 µg/mL pendant 48h minimum. L'obtention de colonies sur milieu sélectif est le signe de bactéries transformées par la cassette de résistance. Les différents clones obtenus sont vérifiés par PCR sur leur ADN génomique selon le programme de PCR ci-dessus afin de s'assurer que la cassette de résistance est présente au locus désiré. Pour cela les amorces CagA-Fwd/CagE-Fwd et K2h-Rev ont été utilisées (Table 13). L'amorce CagA/E-Fwd est localisée en amont de la séquence de 500 pb qui a servi pour la recombinaison homologue tandis que K2h est située dans la cassette de résistance.

B. *Escherichia coli*

Pour les clonages et l'amplification des vecteurs d'expression, nous avons utilisé la souche XL1-blue (*recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F' *proAB lacIqZΔM15 Tn10* (Tet^r)]) d'*Escherichia coli*. Elle est cultivée à 37°C, sur milieu solide ou liquide (sous agitation, 180rpm) Luria-Bertani (LB) supplémenté ou non d'ampicilline (50 µg/mL) pour les souches transformées par un vecteur.

Nous avons rendu les bactéries XL1-blue électro-compétentes par une méthode classique de lavages successifs à l'H₂O stérile à 4°C. XL1-blue est ensemencée sur LB-Agar contenant de la tétracycline (5µg/ml). Après 24h de culture à 37°C, une colonie est amplifiée dans 20 mL de LB à 37°C sous agitation durant la nuit. Le lendemain, 4x4mL de cette pré-culture sont ensemencés dans 4x250mL de LB dans des erlens de 1L et mis en culture sous agitation à 37°C. Lorsque la DO à 600nm atteint 0,5 (ce qui correspond à la phase exponentielle de croissance), les bactéries sont refroidies dans de la glace pendant 20 min, puis centrifugées à 3700 rpm pendant 15 min à 4°C. Le culot bactérien, maintenu au froid, est mis en suspension dans 4x500mL d'H₂O déminéralisée stérile froide, et la suspension bactérienne est centrifugée dans les mêmes conditions que précédemment. Les culots sont encore lavés 2 fois dans les mêmes conditions, mais avec 4x 250mL d'H₂O stérile à 4°C. Les culots finaux sont repris dans 4x4mL d'H₂O + 10% glycérol à 4°C et cumulés dans un tube de 50mL. Après une dernière centrifugation, le culot final est alors repris dans 2mL d'H₂O + 10% glycérol à 4°C et distribué dans des tubes congélation (50µl/tube), rapidement congelés en les plongeant dans de l'azote liquide. Les stocks d'XL1-blue électro-compétentes sont conservés à -80°C.

Pour transformer les XL1-blues avec un plasmide, nous avons décongelé dans la glace un tube de 50µl de bactéries électro-compétentes par plasmide. Puis nous les avons incubées avec l'ADN plasmidique (2µL de produit de ligation ou 10ng de vecteur) pendant 1 min dans de la glace. L'ensemble bactéries + ADN est ensuite placé dans une

cuvette d'électroporation (écart 2mm, VWR) préalablement refroidie. Les bactéries sont électroporées dans la cuvette pendant 5ms à 2500V dans un électroporateur ECM399 BTX (Genetronics), puis récupérées de la cuvette et incubées dans 250µL de milieu SOC pendant 1h sous agitation à 37°C. 10 à 30µL de la suspension bactérienne sont étalés sur milieu LB additionné de l'antibiotique adéquat avant d'être placés dans une étuve à 37°C. Après 24h de culture, les colonies sont analysées par PCR. Les clones positifs sont amplifiés en culture de 50 mL de LB sélectif et le plasmide est extrait à l'aide du kit Genelute (Sigma) selon le protocole du fabricant.

III. Co-culture des cellules épithéliales gastriques avec *H. pylori*

À J-1, les cellules eucaryotes sont mises en culture, en plaque de 6 ou 24 puits, à une concentration telle qu'à jour J (jour de l'infection), les cellules soient à 70-80% de confluence. Ainsi, les cellules AGS sontensemencées à 8.10^4 cellules/puits de plaque 24p, les cellules MKN74 ou NCI-N87 à 10^5 cellules /puits de plaque 24p. Un puits de culture supplémentaire est prévu pour le comptage des cellules. Le jour J avant l'infection, les cellules du puits de comptage sont détachées à la trypsine, mises en suspension et comptées sur une cellule de Malassez. Le nombre de cellules nous sert à déterminer le nombre de bactéries à ajouter sur la culture cellulaire selon la multiplicité d'infection (MOI) choisie. Dans notre étude, la majorité des infections est effectuée à MOI 100, soit 100 bactéries par cellule.

La ou les souches d'*H. pylori* sont mises en culture 48h (J-2) ante-infection, sur milieu Colombia, supplémenté ou non d'antibiotique de sélection, pendant 24h. Puis elles sont repiquées sur gélose dans les mêmes conditions et cultivées 24h supplémentaires (J-1). À jour J, 1/4 de la boîte de culture est délicatement grattée à l'aide d'un écouvillon et resuspendu dans 10 mL de milieu de culture cellulaire contenant 10% SVF décomplémenté. Il est impératif que le SVF soit décomplémenté afin de permettre à la bactérie de survivre dans le milieu. La concentration bactérienne de cette suspension est déterminée par la densité optique à 600nm, considérant qu'une unité de DO correspond à 1.10^9 bactérie/mL.

Connaissant la densité cellulaire dans les puits de culture et la concentration de la suspension bactérienne, le volume adéquat de bactéries pour obtenir la MOI désirée est ajouté sur les puits de cultures, desquels le milieu vient d'être changé avec du milieu de culture frais (500 µL/puits de plaque 24p). La co-culture est incubée pendant 24h à 37°C en atmosphère enrichie de 5% CO₂.

IV. Transfection des cellules épithéliales

Toutes les transfections des différents types cellulaires ont été réalisées à l'aide de la Lipofectamine 2000 (Invitrogen), selon les recommandations du fournisseur. La veille de la transfection, les cellules sont mises en culture à raison de $8 \cdot 10^4$ cellules/puits dans des plaques 24 puits. La quantité d'ADN plasmidique que nous avons transfectée est de 100ng/puits pour la plupart des vecteurs d'expression (dix fois moins que celle recommandée par le fabricant), à l'exception du vecteur pRLSV40 dont la quantité transfectée est 3 ng/puits, combinée à 2µl de Lipofectamine dans 100 µL de milieu de culture sans sérum. La quantité d'oligonucléotides à transférer est de 50 picomoles d'oligonucléotides antisens LNA (*Locked Nucleic Acid*)/DNA par puits ou 10 picomoles de siARN ou miARN synthétiques, combinée à 1µL de Lipofectamine dans 100 µL de milieu de culture sans sérum. Le complexe de transfection acide nucléique-Lipofectamine ainsi obtenu est rajouté dans le puits de culture contenant 400 µL de milieu de culture frais. La plupart du temps, les oligonucléotides n'ont été efficaces qu'après une deuxième transfection dans les mêmes conditions.

V. Clonages

A. Extraction d'ADN génomique

Pour extraire l'ADN génomique des cellules, nous avons utilisé le kit QIAamp® DNA mini kit de Qiagen, dont le principe est basé sur une purification de l'ADN par affinité avec une colonne de silice. Après avoir suivi les différentes étapes recommandées par le fabriquant pour l'extraction de $5 \cdot 10^6$ cellules au maximum, l'ADN est élué dans 200 µL d'eau. Sa concentration est déterminée à partir de son absorbance à 260nm (1 unité de DO = 50 ng/µL ADN).

B. Psi-ZEB1

Nous avons cloné la séquence 3' NT de *zeb1* en aval du gène de la luciférase *Renilla*, dans le vecteur psiCHECK™-2 (Promega) de 6.3 kb (don du Dr. Bruno Cardinaud, Bordeaux). L'amplification par PCR de cette région a été faite à partir de l'ADN génomique des cellules AGS, à l'aide des amorces ZEB1-3'UTR-fwd et ZEB1-3'UTR-rev (table 13). Ces amorces permettent d'introduire dans la séquence deux sites de

restriction pour les enzymes *XhoI* et *NotI*, présentes uniquement dans le multisite de clonage du vecteur. A part les amorces et la matrice, le mélange réactionnel de PCR est identique à celui que nous avons utilisé pour l'obtention de la cassette de résistance (cf. §II.A.1). Après avoir vérifié la taille du produit de PCR obtenu (taille attendue = 1242 pb) sur gel d'agarose 0.8% w/v TBE 0.5X, le produit de PCR est purifié à l'aide du kit « QIAquick PCR purification » de Qiagen et digéré par *XhoI* et *NotI* (Fermentas, 1 µL de chaque enzyme) dans un volume final de 20 µL contenant le tampon FastDigest® (Fermentas), pendant 1h à 37°C. Le produit digéré est purifié par un volume de phénol/chloroforme pH 8 : le mélange est agité vigoureusement et centrifugé pendant 5 min à 14 000 rpm à 4°C. La phase aqueuse supérieure contenant l'ADN est récupérée et l'ADN digéré est précipité par de 2,5 volumes d'éthanol absolu froid en présence de 1/10 de volume d'acétate de sodium 3M, pH 5.5, à -20°C toute la nuit ou à -80°C pendant 1h. Le précipité est centrifugé pendant 30 min à 14 000 rpm à 4°C, lavé 2 fois à l'éthanol 70%, séché à l'air et repris dans 20 µL H₂O de qualité « biologie moléculaire » pour être quantifié par spectrophotométrie à 260 nm.

En parallèle, 5 µg de plasmide psiCHECK-2 est digéré par les deux mêmes enzymes de restriction *XhoI* et *NotI* dans les mêmes conditions que pour le produit de PCR. Le vecteur digéré est mis à migré dans gel d'agarose 0.8% w/v TBE 0,5X, puis extrait à l'aide du kit « QIAquick gel extraction » (Qiagen). L'insert 3'NT ZEB1 doublement digéré est mélangé à 100 ng de vecteur digéré avec différents rapports molaires, 1 mole de vecteur pour 3 ou 5 moles d'inserts, et comme contrôle, le vecteur mélangé à de l'eau (sans insert). Le tout est incubé à 16°C toute une nuit avec 1 µL de T4 DNA ligase dans 20 µL de milieu réactionnel (Promega) contenant le tampon de la T4 DNA ligase. Le lendemain, 2 µL produits de ligation sont utilisés pour transformer les bactéries XL1-blue compétentes. Les clones positifs sélectionnés par PCR sur colonies sont amplifiés en culture liquide (LB + Ampicilline 50 µg/mL) afin de réaliser une préparation du vecteur psi-ZEB1 à l'aide du kit « Genelute Plasmid miniprep » (Sigma).

C. Promoteur du cluster *miR-200b-200a-429*

Nous avons entrepris le clonage du promoteur du cluster *miR-200b-200a-429* dans le vecteur rapporteur pGL3-basic (Promega) de 4,8 kb, dépourvu de promoteur en amont du gène de la luciférase *firefly*. Pour cela, la séquence du promoteur identifiée par Braken *et al.* [170] a été amplifiée par PCR à partir de l'ADN génomique des cellules AGS et des amorces prom200b-fwd et prom-200b-rev (Table 13), qui comportent les sites de restriction pour *KpnI* et *XhoI*. Le volume réactionnel (50 µL) de cette PCR contient 500 ng d'ADN génomique, 0.2 mM de dNTP, 10 pmoles d'amorces, 1 U de *Taq* polymérase (NEB), 5 µL de tampon 10X (NEB). Le programme PCR comprend une étape initiale à 95°C pendant 2 min, puis 30 cycles à 95°C pendant 30s de dénaturation, 60°C pendant 30s et 72°C pendant 30s et une élongation finale à 72°C pendant 2 min. Le produit PCR obtenu (taille attendue de 462 pb) est vérifié par migration

électrophorétique sur un gel d'agarose 1% w/v TBE 0.5X. L'amplicon est purifié sur une colonne du kit QIAquick PCR purification (Qiagen), puis digéré par *KpnI* et *XhoI* dans le tampon *Fast Digest* (Fermentas) pendant 1h à 37°C. Après digestion, les enzymes sont éliminées par extraction au phénol/chloroforme pH 8 et l'ADN est récupéré par précipitation à l'éthanol 100%, comme précédemment. Simultanément, 5 µg de vecteur pGL3-basic ont subi les mêmes doubles digestions, purification et précipitation que le produit de PCR. La réaction comporte 100 ng de vecteur doublement digéré, le produit PCR dans un rapport molaire 1:3 ou 1:5, 1 µL de T4 DNA ligase et le tampon de ligation (Promega). La ligation se déroule à 16°C pendant toute une nuit. Le lendemain, les produits de ligation sont utilisés pour transformer les bactéries XL1-blue compétentes. Les clones positifs sélectionnés par PCR sur colonies sont amplifiés pour réaliser une préparation du vecteur pGL3prom200b à l'aide du kit « Genelute Plasmid miniprep » (Sigma).

D. Mutagenèse dirigée

Nous avons muté la séquence correspondant au site de liaison de NF-κB sur le plasmide pGL3prom200b par mutagenèse dirigée. Cette méthode consiste à reproduire le vecteur par PCR à l'aide d'amorces portant la ou les mutations. Le mélange réactionnel de la PCR (50 µl) contient 10 ng de plasmide parental pGL3prom200b, 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 (Table 13), et 2,5 unités de *Pfu Turbo* DNA polymérase (Agilent Technologies). Après une étape initiale de dénaturation de 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 *DpnI* (Invitrogen) afin de dégrader le plasmide parental méthylé. 2 µl des produits de PCR sont utilisés pour transformer les bactéries électrocompétentes *E. coli* XL1 Blue. Les bactéries transformées sont étalées sur milieu LB solide supplémenté avec 50 µg/ml d'ampicilline et incubées une nuit à 37°C. Les clones positifs sont identifiés par PCR sur colonie et la mutation du site NF-κB sur le promoteur est vérifiée par séquençage. Les vecteurs mutés sont amplifiés et extraits comme précédemment.

Toutes les constructions ainsi obtenues ont été vérifiées par séquençage (société Eurofins ou plateforme de séquençage, Bordeaux 2).

VI. Analyse des ARN

A. Extraction des ARN totaux de cellules en culture

Après avoir rincé les tapis cellulaires avec du PBS froid, 500 µL de TRIzol® (Invitrogen) sont ajoutés dans chaque puits et laissés incuber pendant 5 min à température ambiante pour lyser les cellules. Les lysats sont refoulés plusieurs fois à la pipette pour compléter la lyse et casser l'ADN génomique, puis transvasées dans un tube Eppendorf de 1.5 mL. Après y avoir ajouté 100 µL de chloroforme/isoamylalcool (25 :1) et 4 µL de glycogène Glycoblue (Ambion) comme entraîneur, les tubes sont agités vigoureusement, puis centrifugés pendant 15 min à 14 000 rpm, à 4°C pour séparer la phase aqueuse contenant les ARN, la phase phénolique contenant les protéines et l'interphase contenant l'ADN. La phase aqueuse, supérieure, est récupérée (environ 300 µL) et précipitée avec 250 µL d'isopropanol, à -20°C pendant une nuit. Les ARN précipités sont récupérés par centrifugation pendant 30 min à 14000 rpm à 4°C. Le culot est lavé deux fois à l'éthanol 75%, séché à l'air et repris dans 30 µL d'eau de qualité « biologie moléculaire ». Les ARN sont dosés par mesure de l'absorbance à 260nm ($DO_{260} = 40 \text{ ng}/\mu\text{L ARN}$), leur pureté et intégrité sont vérifiées par le rapport DO_{260}/DO_{280} , qui doit être de l'ordre de 1,8, et par migration électrophorétique de 500 ng d'ARN totaux sur un gel d'agarose 1% w/v TBE 0.5X contenant 100 ng/mL de Bromure d'éthidium.

B. Northern blot

La séparation des ARN totaux selon leur taille est réalisée sur un gel de polyacrylamide 15% en condition dénaturante (urée 7M, TBE 1X). Le gel est coulé entre deux plaques de verre de 20 cm x 20 cm et d'une épaisseur de 1 mm. Les échantillons d'ARN totaux (20 µg/puit), préalablement dénaturés pendant 3 min à 65°C, sont déposés dans les puits en présence d'un volume égale de tampon de charge Gel Loading Buffer II (95% formamide, 18 mM EDTA, 0,025% SDS, xylène cyanol, bleu de bromophénol, Ambion). Un puits est réservé à un marqueur de taille (25 pb ladder, Promega) préalablement marqué au $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}] \text{ ATP}$ selon le protocole du marquage radioactif cis-dessous. La migration se fait à 20W limitants.

À la fin de l'électrophorèse, le gel est démoulé et les acides nucléiques du gel sont transférés sur une membrane de nylon Hybond-N (Amersham) pendant une nuit à 4°C dans un Transblotteur (Appellex) soumis à une tension de 8V. Après transfert, les ARN sont photopontés sur la membrane par rayonnement ultraviolet (UV Crosslinker, Qbiogene) à une longueur d'onde de 254 nm et une énergie de 1600 µJ/cm². Ceci permet de lier de façon irréversible les acides nucléiques à la membrane.

Les sondes des miARN sont produites au laboratoire en chimie LNA/DNA (Table 13). Elles présentent une extrémité 5' hydroxyl permettant leur marquage. 20 pmoles de sonde est marqué en 5' par du [γ - 32 P] ATP (10 mCi/mL, Perkin Elmer) grâce à la T4 polynucléotide kinase (PNK, Biolabs) dans le tampon PNK Reaction Buffer (70 mM Tris-HCl pH 7,4 à 20°C, 10 mM MgCl₂, 5 mM dithiothréitol). Le marquage se fait à 37°C pendant 30 minutes dans un volume final de 50 μ L. Afin d'éliminer l'ATP radioactif non incorporé, une étape de purification par filtration sur gel est réalisée à l'aide de colonnes Micro-spin G-25 (GE Healthcare).

Les membranes sont préhybridées pendant 1h à 42°C dans 20 mL de tampon 50% formamide, 0,5% SDS, 2X SSC et 5X Denhart, puis hybridées pendant la nuit dans les mêmes conditions, en présence de la sonde marquée préalablement dénaturée 1 min à 90°C. Après hybridation et afin d'éliminer les hybridations non spécifiques, les membranes sont lavées trois fois à 42°C dans une solution de 2X SSC (0,3 M NaCl, 0,03 M citrate de sodium trisodique, pH 7 à 20°C) contenant 0,1% SDS. Les membranes sont ensuite égouttées, mises sous film plastique et placées en cassette en présence d'un écran phosphore. L'exposition s'effectue entre quelques heures et plusieurs jours en fonction de l'activité détectée sur la membrane. La révélation et l'analyse des bandes radioactives sont réalisées par le PhosphorImager Pharos (Biorad).

C. RT-PCR quantitative

1. Dosage des miARN par sonde Taqman

Les RT-qPCR sur les miARN matures *hsa-miR-200b* (AB 001800) et *hsa-miR-200c* (AB 002300) sont réalisées à l'aide du kit Taqman® MicroRNA assays (Applied Biosystems). Les ARN totaux sont dilués afin d'obtenir une concentration de 100 ng/ μ L. La concentration de cette dilution est vérifiée par spectrophotométrie à 260 nm pour être la plus précise possible. Cette solution d'ARN est encore diluée 10 fois pour amener les ARN à une concentration finale de 10 ng/ μ L. À partir de cette dilution d'ARN, nous préparons un volume réactionnel de 15 μ L contenant 1 mM de dNTP, 50 U de Multiscribe™ reverse transcriptase, 1,5 μ L de tampon reverse transcription, 3,8 U de RNase inhibitor, 2 μ L d'ARN (soit 20 ng d'ARN) et 1,5 μ L d'amorces RT 5X. Etant donnée la courte taille des miARN, la réaction de transcription réverse utilise une amorce en forme de tige boucle dont l'extrémité 5' est spécifique d'un miARN donné, afin de produire un ADN complémentaire de miARN d'une taille de 100 bases. C'est pourquoi une RT pour chaque miARN dans chacune des conditions expérimentales doit être faite. La transcription réverse se déroule pendant 30 min à 16°C, puis 30 min à 42°C ; elle est inactivée à 85°C pendant 5 min. Les ADNc ainsi obtenus sont prêts à être utilisés en qPCR Taqman. La qPCR sur chaque produit de RT est réalisée en doublet et consiste en un mélange de 1,33 μ L d'ADNc (soit environ 2 ng d'ADNc), 10 μ L de PCR master mix 2X contenant le tampon, les dNTP et la Taq polymérase, 1 μ L d'amorces PCR et sonde

Taqman marquée au Fam40 spécifiques 20X, dans un volume final 20 μ L. La PCR en temps réel est réalisée dans l'appareil Rotorgene, Qiagen, avec le programme suivant : 1) 10 min à 95°C pour activer la Taq polymérase, 2) 40 cycles à 2 étapes avec une étape de 15 s à 95°C et d'une étape de 60 s à 60°C. L'intensité de la fluorescence est mesurée à la fin de chaque cycle. La variation de la quantité de microARN est déterminée par la méthode des $\Delta\Delta C_t$. Cette méthode ne permet pas de déterminer un nombre de copies, mais de visualiser une variation par rapport à une condition contrôle. Les gènes de références utilisés dans cette étude sont les gènes snARN_U6 (RNU6b, AB 001903) ou SNORD49A (RNU49, AB 001005).

2. Dosage des ARNm

Les RT-PCR quantitatives sont réalisées avec le kit Maxima™ (Fermentas) contenant du SYBRgreen. Ce fluorophore s'intercale régulièrement dans l'ADN double brin. La fluorescence est ainsi proportionnelle à la quantité d'ADN synthétisé et permet de quantifier l'ADN présent dans l'échantillon à chaque cycle d'amplification.

1 μ g d'ARN totaux cellulaires sont rétrotranscrits pendant 30 min à 37°C par la transcriptase reverse et le tampon Fermentas qui contient les dNTP, des hexanucléotides aléatoires et des oligodT, dans un volume final de 20 μ L. La RT est inactivée pendant 5 min à 85°C. 0,5 μ L de réaction RT sont amplifiés par PCR en temps réel, en présence des amorces spécifiques (0,6 μ M final) et du PCR master mix contenant du SYBRgreen (Fermentas). Le programme de PCR consiste en 40 répétitions d'un cycle à 3 étapes : dénaturation à 95°C, 15s, hybridation des amorces à 60°C pendant 30s et élongation de 30s à 72°C. L'intensité de la fluorescence est mesurée à la fin de chaque cycle.

A l'issue de la qPCR, une courbe de fusion est réalisée afin de déterminer le T_m des produits synthétisés ; cette courbe former un pic unique attestant de la spécificité de la PCR. Pour cela, la température augmente de 55°C à 95°C par palier de 0.5°C toutes les 10 s.

La variation de la quantité d'ARNm est déterminée par la méthode des $\Delta\Delta C_t$. Les gènes de références utilisés dans cette méthode sont RPL13a, HPRT1, P0. Dans les conditions de co-culture des cellules humaines avec *H. pylori*, les ARN totaux contiennent à la fois les ARN totaux eucaryotes (60%) et les ARN totaux procaryotes (40%). C'est pourquoi les courbes de fluorescence des gènes de référence des échantillons infectés sont décalées de l'ordre d'un C_t vers la droite par rapport à celles des échantillons non infectés.

VII. Analyse des protéines

A. ELISA

Le dosage de l'interleukine 8 (IL-8) sécrétée dans le milieu de culture, est réalisé par un test ELISA « sandwich » (DuoSet® ELISA Development System, R&D Systems), selon les instructions données par le fournisseur, dans une microplaque (Nunc™) incubée pendant une nuit avec un anticorps monoclonal dirigés contre l'IL-8 humaine, afin d'en recouvrir le fond des puits. Les surnageants de culture cellulaire à tester, purs ou dilués au 1/10, sont incubés dans ces puits recouverts d'anticorps. Après 4 lavages, les puits sont ensuite incubés avec des anticorps monoclonaux anti-IL-8 couplés à la peroxydase (*Horseradish peroxydase*). Après 4 lavages, le substrat 3,3', 5,5'-tetramethylbenzidine est ajouté dans chaque puits et forme alors un produit coloré en présence de la peroxydase. La réaction est arrêtée avec l'acide phosphorique 1M et la DO est mesurée à 450 nm sur un lecteur de plaque Berthold. La quantité d'IL-8 produite par les surnageants de culture est déterminée par comparaison de la DO de l'échantillon avec celles d'une gamme étalon constituée de quantités croissantes connues d'IL-8 (de 125 à 2000 pg/mL).

B. Extraction et dosages de protéines

Les tapis cellulaires sont détachés par trypsination, et les cellules dissociées sont mises en suspension dans du milieu de culture froid, dont le sérum permet l'inactivation de la trypsine, et lavées dans le PBS par centrifugation à 1500 rpm pendant 2 min. Les culots cellulaires sont lysés dans un volume (20 à 30 µL) de solution de lyse ProteoJET™ (Fermentas) en présence d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Fermentas), pendant 10 min et sous agitation à 4°C. Le lysat cellulaire est ensuite centrifugé pendant 15 min à 16000g et 4°C. Le surnageant contenant les protéines totales est récupéré, tandis que le culot composé de débris cellulaires et de l'ADN génomique est jeté. Les protéines de ce surnageant sont alors dosées par méthode colorimétrique de Bradford (Bradford, 1976).

Pour le dosage des protéines par la méthode de Bradford, 2 µL d'échantillon à doser dilué au cinquième sont mélangés avec 18 µL d'H₂O et 1 mL de réactif de Bradford (Biorad) dilué au 1/5. Une courbe étalon est obtenue dans les mêmes conditions avec des quantités connues d'albumine de sérum bovin (BSA). Après incubation 5 min à température ambiante, la DO à 600nm des échantillons est mesurée et la concentration des protéines est déterminée à partir de la gamme étalon de BSA.

C. Western blot

La séparation des protéines totales est réalisée sur un gel SDS-PAGE en fonction de leur poids moléculaire. Le gel est composé d'un gel de concentration à 5% acrylamide, TRIS-HCl à pH 6.8, suivi d'un gel de résolution à 7%, TRIS-HCl à pH 8.8. Les gels sont coulés entre deux plaques de verre de 8 cm x 8 cm et d'une épaisseur de 1 mm. Les échantillons protéiques (50 µg/puit) préalablement dénaturés dans le tampon de Laemmli pendant 5 min à 95°C, sont déposés dans les puits. Un puits est réservé à un marqueur de taille (Novex® Sharp standard pre-stained, Invitrogen). La migration se fait dans le tampon 25 mM Tris-(hydroxyméthyl)-aminométhane, 192 mM glycine, 0.1% Sodium-dodecyl-sulfate, à 100V dans le gel de concentration, puis à 150V dans le gel de résolution pendant 1h30.

Après migration, les gels sont démoulés et les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose (Whatman ® 10401197) pendant 1h par transfert liquide dans un transbloteur (Biorad), sous une tension de 100V limitant, 350 mA maximum. Après transfert, la membrane est colorée au rouge Ponceau S (0.2% w/v ponceau S, 5% v/v acide acétique, qsp 250 mL H₂O) afin de vérifier la présence des protéines sur la membrane. Le gel est lui aussi coloré à l'aide du bleu de Coomassie (0.5% w/v Coomassie brillant blue R 250, 10% d'acide acétique, 50% d'éthanol 100%, qsp 500 mL H₂O) afin de vérifier la présence résiduelle de protéines dans le gel.

La membrane est pré-incubée pendant une heure à température ambiante dans une solution de PBS contenant 5% de lait écrémé et 0.2% Tween 20, pour saturer la membrane en protéines. La membrane est ensuite incubée pendant la nuit à 4°C sous agitation dans une solution de PBS 5% lait 0.2% Tween 20 dans laquelle est dilué l'anticorps primaire (1/5000 pour αLATS2 (xxx), 1/500 pour αZEB1 (Bethyl), 1/1000 pour αNF-κB, αTGFβR2, αTGFβR1 (Santa Cruz), αTubuline (Sigma)). Le lendemain, la membrane est lavée 3 fois dans du PBS, 5% lait, 0.2% Tween 20 pendant 10 min, puis incubée pendant 2h à température ambiante avec l'anticorps secondaire anti-IgG couplé à la peroxydase (αsouris, αlapin), dilué au 1/10000 dans du PBS 5% lait 0.2% Tween 20. Après 3 lavages de 10 min au PBS 5% lait 0.2% tween 20 et un lavage de 5 min au PBS 0.1% tween 20, la membrane est incubée pendant 5 min dans le substrat de la peroxydase produisant de la chemoluminescence (*Immobilon Chemiluminescent substrate*, Millipore). Enfin, la membrane est déposée sur un film d'autoradiographie *High performance* (Amersham) durant quelques secondes, puis le film est développé.

D. Mesure de l'activité luciférase

L'activité des luciférases est mesurée grâce au kit Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega). Les tapis cellulaires sont lavés par le PBS et lysés dans le puits avec

100 μ L de tampon de lyse fourni par le kit dilué au 1/5 (Passive lysis Buffer 5X). L'activité luciférase *firefly* est mesurée sur 20 μ L de lysat cellulaire ajoutés dans 100 μ L de substrat luciférine pendant 12s à température ambiante dans un luminomètre (Lumat LB9501, Berthold). Après cette première lecture, 100 μ L d'une solution contenant l'inhibiteur de la luciférase *firefly* (StopGlow) et le substrat de la luciférase *Renilla* sont ajoutés dans le premier mélange, et la lumière émise correspondant à l'activité de la luciférase *Renilla* est mesurée dans les mêmes conditions que pour la luciférase *firefly*.

E. Marquage des cellules par immunofluorescence

Les cellules ont été cultivées sur une lamelle couvre-objet en verre de 12-mm de diamètre avant d'être infectées ou non par *H. pylori*. La couche cellulaire est rincée avec du PBS contenant 1mM CaCl_2 et 1mM MgCl_2 , fixée avec 3% de paraformaldéhyde et perméabilisée avec 0.1% Triton X-100 dans le PBS+Ca+Mg. Les lamelles sont incubées avec l'anticorps anti-ZEB1 (Bethyl) dilué au 1/400 dans du PBS+Ca+Mg additionné de 10% de BSA pendant une nuit à 4°C. Après 4 lavages avec du PBS+Ca+Mg, elles sont incubées avec un anticorps secondaire anti-IgG de lapin couplé à l'Alexafluor 488 pendant 30 min à température ambiante. Les lamelles sont lavées 4 fois au PBS pendant 3 min à chaque lavage; le 2ème bain de lavage contient du DAPI (1 μ g/mL). Les lamelles sont montées sur des lames à l'aide de Slowfade (Invitrogen), puis observées en épifluorescence (microscope Axiovert Zeiss, objectif 40X à immersion).

Procaryotes		
Nom	Séquences	Tm (°C)
CagA-A1	GTT-AGT-CAC-CCG-GGT-ACG-TGT-CTT-TGA-ACA-TTC-TTA-TT	108
CagA-A2	CAA-GCA-AAA-ACA-AAC-CCA-AGC-TGA-TCA-GAG	86
CagA-B1	TAC-CTG-GAG-GGA-ATA-ATG-GGA-TTA-AGG-AAT-ACC-AAA-AAC	108
CagA-B2	CTT-AGG-ATC-GTA-AAA-TTG-CGA-GGT-ATT-TTT-G	84
CagA-Fwd	CGA-CGC-TTT-TGT-TTG-GTA-AC	58
CagE-A1	GTT-AGT-CAC-CCG-GGT-ACC-CCT-CTC-TTT-ATA-GAT-ATA-CC	112
CagE-A2	GAA-AAA-AAC-ACT-CCC-AAT-GGG-CTT-GTT-TAT	82
CagE-B1	TAC-CTG-GAG-GGA-ATA-ATG-CAA-AGC-ATC-ACT-GAT-CTT-TTG	110
CagE-B2	GAA-AAA-CTA-TCC-AAA-ATC-GTC-AAG-ACA-TCA	80
CagE-Fwd	GTA-ATA-AAA-AAC-TGA-GAG-GC	54
Kh1-Fwd	GTA-CCC-GGG-TGA-CTA-ACT-AGG	66
Kh2-Rev	CAT-TAT-TCC-CTC-CAG-GTA-CTA	60
Eucaryotes		
Nom	Séquences	TM (°C)
ZEB1-3'UTR-Fwd	AAA- <u>ACT</u> -CGA-GCA-AAA-TAA-ATC-CGG-GTG-TGC*	60
ZEB1-3'UTR-Rev	AAA-AGC-GGC-CGC-TAC-AGT-ATT-ATA-CAC-TAC-AC**	60
Prom-200b-Fwd	AAA-AGG-TAC-CAG-GGG-TGG-AGA-GGC-GAG-AGT***	60
Prom-200b-Rev	AAA- <u>ACT</u> -CGA-GCC-TGG-CAC-AGG-AAG-TCA-GTT*	60
P200bmutNFkB-F	GCC-TAT-GGG-AGC-CCA-AAA-GAC-ACA-CCT-GTC-GGG-GGC-CA	68
P200bmutNFkB-R	CCC-GAC-AGG-TGT-GTC-TTT-TGG-GCT-CCC-ATA-GGC-CGG-GC	69
ZEB1-Fwd	AAG-AAA-GTG-TTA-CAG-ATG-CAG-CTG	60
ZEB1-Rev	CCC-TGG-TAA-CAC-TGT-CTG-GTC	60
ZEB2-Fwd	CAA-GAG-GCG-CAA-ACA-AGC	60
ZEB2-Rev	GGT-TGG-CAA-TAC-CGT-CAT-CC	60
Vimentine-Fwd	AGA-TGG-CCC-TTG-ACA-TTG-AG	60
Vimentine-Rev	CCA-GAG-GGA-GTG-AAT-CCA-GA	60
Twist-Fwd	TCC-GCG-TCC-CAC-TAC-CA	56
Twist-Rev	TTC-TCT-GGA-AAC-AAT-GAC-ATC-TAG-GT	56
TGFBR2-Fwd	CCA-GAA-CCA-AGC-AGA-GAA-GG	60
TGFBR2-Rev	TAG-CTG-GCT-GTG-AGA-CAT-GG	60
Snail1-Fwd	GCT-GCA-GGA-CTC-TAA-TCC-AGA	58
Snail1-Rev	ATC-TCC-GGA-GGT-GGG-ATC	58
Slug-Fwd	TGG-TTG-CTT-CAA-GGA-CAC-AT	58
Slug-Rev	GTT-GCA-GTG-AGG-GCA-AGA-A	58
primiR-200b-Fwd	GCG-GTG-ATG-ATT-AAC-CCA-AC	60
primiR-200b-Rev	GTG-GCC-ACA-GGT-CAA-GAA-AT	60
Cdh1-Fwd	TGA-GTG-TCC-CCC-GGT-ATC-TTC	60
Cdh1-Rev	CAG-TAT-CAG-CCG-CTT-TCA-GAT-TTT	60
Fw-P0	GCG-ACC-TGG-AAG-TCC-AAC-T	60

Rev-P0	CCA-TCA-GCA-CCA-CAG-CCT-TC	60
HPRT1-Fw	TGA-CAC-TGG-CAA-AAC-AAT-GCA	60
HPRT1-Rev	GGT-CCT-TTT-CAC-CAG-CAA-GCT	60
RPL13a-Fwd	CCT-GGA-GGA-GAA-GAG-GAA-AGA-GA	60
RPL13a-Rev	TTG-AGG-ACC-TCT-GTG-TAT-TTG-TCA-A	60
Sondes		
Nom	Séquences	Chimie
miR-200b	GT CATCAT TACCAGGCAGT ATTA	LNA/DNA
miR-200c	TC CATCAT TACCCGGCAGT ATTA	LNA/DNA
Sc200	CT ACCTTAAT CGCCGG AATTTA	LNA/DNA
miR-372	AC GCTCAA ATGTCGCAGC ACTTT	LNA/DNA
miR-373	AC ACCCCAA AA T CG AAGCACTTC	LNA/DNA
Sc372-373	CAC GTACA TAG TGCACCGATCTT	LNA/DNA
U6	CACGA ATT TGC GTGTCATCCTT	LNA/DNA
Amorces commerciales		
Nom	Références	fournisseur
Hs-BMP1-1-SG	QT00000819	QIAGEN
Hs-MMP9-1-SG	QT00040040	QIAGEN
Hs-SNAI3-1-SG	QT00213045	QIAGEN
Hs-ITGA5-1-SG	QT00080871	QIAGEN
Hs-KRT7-3-SG	QT01672951	QIAGEN
Hs-SPP1-1-SG	QT01008798	QIAGEN
<i>hsa-miR-200b</i>	AB 001800 Taqman	Applied Biosystems
<i>hsa-miR-200c</i>	AB 002300 Taqman	Applied Biosystems
RNU6b	AB 001903 Taqman	Applied Biosystems
RNU49	AB 001005 Taqman	Applied Biosystems

Table 13 : Liste des Amorces et sondes utilisées pour les expériences de RT-qPCR, de Northern blot, de clonage et d'obtention des mutants d'*H. pylori*. Les nucléotides soulignés correspondent aux séquences de site de restriction ; * : *XhoI*, ** : *NotI*, *** : *KpnI*.

Annexes

Annexe 1: “*Helicobacter pylori* interferes with an embryonic stem cell miRNA cluster to block cell cycle progression”, Belair C., Baud J. *et al*, 2011, Silence.

This Provisional PDF corresponds to the article as it appeared upon acceptance. Fully formatted PDF and full text (HTML) versions will be made available soon.

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

Silence 2011, **2**:7 doi:10.1186/1758-907X-2-7

Cedric Belair (cedric.belair@inserm.fr)
Jessica Baud (jessica.baud@inserm.fr)
Sandrine Chabas (sandrine.chabas@inserm.fr)
Cynthia M Sharma (cynthia.sharma@uni-wuerzburg.de)
Joerg Vogel (joerg.vogel@uni-wuerzburg.de)
Cathy Staedel (cathy.staedel@inserm.fr)
Fabien Darfeuille (fabien.darfeuille@inserm.fr)

ISSN 1758-907X

Article type Research

Submission date 7 July 2011

Acceptance date 25 October 2011

Publication date 25 October 2011

Article URL <http://www.silencejournal.com/content/2/1/7>

This peer-reviewed article was published immediately upon acceptance. It can be downloaded, printed and distributed freely for any purposes (see copyright notice below).

Articles in *Silence* are listed in PubMed and archived at PubMed Central.

For information about publishing your research in *Silence* or any BioMed Central journal, go to

<http://www.silencejournal.com/authors/instructions/>

For information about other BioMed Central publications go to

<http://www.biomedcentral.com/>

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

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

¹Univ. Bordeaux, ARNA Laboratory, F-33000, Bordeaux, France

²INSERM, U869, ARNA Laboratory, F-33000, Bordeaux, France

³Institute for Molecular Infection Biology, Research Centre of Infectious Diseases, University of Würzburg, Würzburg, Germany

*Corresponding authors

Email addresses:

CB: cedric.belair@inserm.fr

JB: jessica.baud@inserm.fr

SC: sandrine.chabas@inserm.fr

CMS: cynthia.sharma@uni-wuerzburg.de

JV: joerg.vogel@uni-wuerzburg.de

CS: cathy.staedel@inserm.fr

FD: fabien.darfeuille@inserm.fr

Abstract

Background: MicroRNAs, post-transcriptional regulators of eukaryotic gene expression, are implicated in host defense against pathogens. Viruses and bacteria have evolved strategies that suppress microRNA functions, resulting in a sustainable infection. In this work we report that *Helicobacter pylori*, a human stomach-colonizing bacterium responsible for severe gastric inflammatory diseases and gastric cancers, downregulates an embryonic stem cell microRNA cluster in proliferating gastric epithelial cells to achieve cell cycle arrest.

Results: Using a deep sequencing approach in the AGS cell line, a widely used cell culture model to recapitulate early events of *H. pylori* infection of gastric mucosa, we reveal that hsa-miR-372 is the most abundant microRNA expressed in this cell line, where, together with hsa-miR-373, it promotes cell proliferation by silencing large tumor suppressor homolog 2 (LATS2) gene expression. Shortly after *H. pylori* infection, miR-372 and miR-373 synthesis is highly inhibited, leading to the post-transcriptional release of LATS2 expression and thus, to a cell cycle arrest at the G1/S transition. This downregulation of a specific cell-cycle-regulating microRNA is dependent on the translocation of the bacterial effector CagA into the host cells, a mechanism highly associated with the development of severe atrophic gastritis and intestinal-type gastric carcinoma.

Conclusions:

These data constitute a novel example of host-pathogen interplay involving microRNAs, and unveil the couple LATS2/miR-372 and miR-373 as an unexpected mechanism in infection-induced cell cycle arrest in proliferating gastric cells, which may be relevant in inhibition of gastric epithelium renewal, a major host defense mechanism against bacterial infections.

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

Background

MicroRNAs (miRNAs) are small endogenous non-coding RNAs that have recently emerged along 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 deregulated 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 downregulate gene expression and therefore inhibit viral replication. Recently, evidence has been found to show 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. A number of pathogen-derived RNA silencing suppressors have been described in eukaryotes, such as the p19 protein of the tomato bushy stunt virus, which selectively sequesters short double-stranded RNA (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 in 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 nuclear factor (NF)κB activation. In turn, they target the TLR signaling cascades and thus, moderate the life-threatening overproduction of inflammatory cytokines through a negative feedback loop. Recently, the *let-7* family has been identified as a new actor of the innate response [14]. Indeed, during *Salmonella* infection of murine

macrophages, TLR4 signaling triggered by bacterial lipopolysaccharide (LPS) leads to the repression of *let-7* family and results in the expression of its targets, the proinflammatory interleukin (IL)-6 and the anti-inflammatory IL-10, thus modulating tightly the immune response [14, 15].

However, the epithelial barrier constitutes the first line of defense against pathogens. In contrast to results obtained in immune cells, miR-155 and miR-146 were not found upregulated in mouse lungs, among the numbers of miRNAs rapidly induced after bacterial LPS exposure, suggesting that epithelial cells may express a different set of miRNAs than immune cells in response to pathogens [16]. The importance of miRNAs in epithelial defense against pathogens was highlighted in biliary epithelial cells infected with the protozoan parasite *Cryptosporidium parvum*, an infection model in which *let-7i* and miR-513 contribute to the epithelial immune response. Indeed, upon *C. parvum* infection, these miRNAs are downregulated, in a MyD88/NFkB-dependent manner for *let-7i*, leading to the upregulation of TLR4 and B7-H1 expression, respectively [17-19].

Helicobacter pylori is a Gram-negative microaerophilic bacterium which chronically infects the gastric mucosa of about half of the world population, and constitutes the primary etiological cause of gastritis, peptic ulcer and gastric cancers [20]. The most virulent strains, associated with a higher risk of gastric adenocarcinomas [21], harbor in their genome a cluster of 31 genes called the *cag* pathogenicity island (*cagPAI*), which encode a type IV secretion system (T4SS) and the CagA toxin. This T4SS interacts with host cell surface and injects the CagA protein into the cell cytoplasm [22]. The translocated CagA interferes then with intracellular signaling pathways, which subsequently alters cell-to-cell adhesion, cell polarity and proliferation [23-25]. A functional T4SS is also essential for the induction of innate immune response, characterized by NFkB activation and IL-8 production in gastric epithelial cells [26].

The extent to which miRNAs contribute to the gastric epithelial cell response to *H. pylori* infection has been little explored to date [27]. So far, only two miRNAs, miR-21 and miR-155, have been reported upregulated in both *H. pylori*-infected human gastric mucosa and *in vitro* cell culture [28, 29]. 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 [30]. First, we employed a deep-sequencing approach to identify the AGS miRNAs profile in basal and infection conditions. Surprisingly, the most abundant one, miR-372, belongs to a miRNA 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 and miR-373 is associated with the upregulation of their target, the cell cycle regulator large tumor suppressor homolog 2 (LATS2), leading to the inhibition of cell cycle progression in *H. pylori*-infected cells.

Results

AGS cell line expresses a particular set of miRNAs

The AGS cell line is widely used in *in vitro* experiments to recapitulate early events of *H. pylori* infection occurring within actively replicating gastric mucosa [31, 32]. 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. A total of 44,012 sequences were analyzed, resulting in 25,348 (57.6%) sequences matching with mature human miRNA sequences of the miRBase 14.0 [see Additional file 1, 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 (Figure 1A), their genomic organization in clusters (Figure 1B) or their function previously assigned to them in other studies [see Additional file 1, Table S2]. We decided to restrict our analysis to the 38 most abundant miRNAs (>100 reads, Figure 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 (Figure 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 members of these families in AGS cells [see Additional file 1, Table S1].

The expression of some of these miRNAs was confirmed by quantitative real time PCR (RT-qPCR) (Figure 1C) and northern blot (data not shown). As expected, all tested miRNAs present in our miRNA sequencing library were also detected by these techniques. However, two miRNAs, miR-155 and miR-146a, reported to be present in AGS cells [33] and absent from our library were weakly detected by RT-qPCR (close to the detection threshold; data not shown), suggesting that our library might lack some miRNAs 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 besides containing ubiquitous miRNAs such as miR-16, miR-21, miR-17 and miR-92, resides in the outstanding abundance of miR-372, which was present in the range of 10^6 copies/ng total RNA or 10^4 copies per cell (see Methods). Intriguingly, miR-372 is an embryonic stem-cell-specific miRNA [34], also found highly expressed in placenta [35]. It belongs to a cluster located on the chromosomal region 19q13.42, which comprises four miRNAs, all of them highly expressed in AGS cells: miR-371-5p, miR-371-3p, miR-372 and miR-373 (Figure 1A, black bars). miR-372 or miR-373 expression is considered as a rare event in tumors, and has only been found in testicular germ cell tumors [36], esophageal tumors [37] and thyroid adenomas [38].

In testicular and esophageal tumors, in which they are abundant, miR-372 and miR-373 have been reported to act as oncogenes repressing LATS2, a serine-threonine kinase involved in cell cycle regulation [36, 37]. On 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 (Figure 2B, upper panel). It appears that the LATS2 level was inversely correlated to the expression of miR-372 and miR-373 in these cell lines (Figure 2B, lower panel). These results suggest that LATS2 could be repressed at the post-transcriptional level by miR-372 and miR-373 in AGS cells. To validate this hypothesis, we transfected into AGS cells the luciferase sensor pGL3-LATS2, containing the 3' untranslated region (UTR) of LATS2, which harbors two miR-372 and miR-373 pairing sites [36] downstream to the firefly luciferase coding sequence (Figure 2A). As expected from cells expressing high miR-372 and miR-373 levels, we observed a 60% inhibition of luciferase expression, as compared to the control pGL3 reporter (Figure 2C). No such inhibition was observed when the

pGL3-LATS2 vector was transfected in MKN-74 cells, which express very low miR-372 and miR-373 levels [see Additional File 2, Figure S1]. This repression was dependent on the two miR-372 and miR-373 binding sites located in the LATS2 3'UTR, as no significant inhibition was observed in AGS cells transfected with the pGL3-LATS2mut vector mutated for these sites [see Additional File 2, Figure S1]. To confirm the role of miR-372 and miR-373 in this repression, we designed antisense oligonucleotides (as372, as373) and their scrambled controls (sc372, sc373) in order to block these miRNAs. The levels of detectable miR-372 or miR-373 were each specifically decreased by 90% by as372/as373, as verified by RT-qPCR and northern blot analysis [see Additional File 3, Figure S2A,B]. This decrease leads to an accumulation of LATS2 protein in as372-373-treated cells, compared to sc372-373-treated cells [see Additional File 3, Figure S2D]. 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 derepressed and almost reached the levels of that of the control vector (Figure 2C), contrarily to the cells treated with sc372-373, which did not affect the basal miR-372 or miR-373 levels. Altogether, these results indicate that LATS2 is indeed a direct target of miR-372 and miR-373 in AGS cells.

Inhibition of LATS2 by miR-372 and miR-373 confers a growth advantage to cells [36, 37]. To confirm that LATS2 is a functional target of miR-372 and miR-373 in AGS cells, we analyzed cell cycle progression of either as372-373-treated or LATS2-transfected cells using the 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) incorporation method, which measures the rate of DNA synthesis occurring in the S phase of the cell cycle. The as372-373-treated AGS cells presented a significantly delay of about 50% in S phase progression compared to sc372-373 treated cells (Figure 2D). Similarly, overexpression of LATS2 [see Additional File 3, Figure S2D] by transfecting the pCMVmyc-LATS2 vector, which allows the expression of the human LATS2 cDNA, resulted in a similar inhibition of BrdU incorporation see Additional File 3, Figure S2E]. The delays in cell cycle progression exhibited by either as372-373-transfected or LATS2-transfected cells resulted in decreased cell proliferation rates of AGS cells [see Additional File 3, Figure S2C,E], whereas the growth of MKN-74 cells, which expressed LATS2 in basal conditions, was not inhibited by the ectopic expression of LATS2 [see Additional File 3, Figure S2E]. Altogether, these results indicate that

LATS2 is a functional target of miR-372 and miR-373 in AGS cells and that the high expression of miR-372 and miR-373 confers to them a growth advantage through the inhibition of LATS2 expression.

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

To analyze miRNA changes in AGS cells upon *H. pylori* infection, a cDNA library of AGS cells cocultured with the bacteria for 5 h was generated and also submitted to '454' pyrosequencing. In all, 43,863 sequences were analyzed, resulting in 17,778 (40.6%) sequences matching with mature human miRNA sequences of the miRBase 14.0 [see Additional File 1, Table S1]. The pyrosequencing data were analyzed by a two-dimensional scatter plot, which compares the number of reads for a same miRNA from uninfected and infected AGS cells (Figure 3A). The majority of miRNAs appear along the trend line, indicating that they were unaffected by the infection. The miRNAs affected by *H. pylori* appear either above (downregulated) or below (upregulated) the trend line. Interestingly, miR-372, which is the most abundant miRNA expressed in AGS cells, was also the most significantly repressed upon infection (Figure 3A, Fisher's exact test, P value = 5.1×10^{-13}). Other members of the miR-371-372-373 cluster, miR-373 and miR-371-5p, also appeared significantly downregulated upon infection (Figure 3A, P values = 8.3×10^{-8} and 0.009, respectively). These results suggest that this cluster is highly repressed upon infection and prompted us to further analyze its regulation upon *H. pylori* infection. With this aim, AGS cells were cultured in the presence of the *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 downregulated (up to 50%) upon infection, as shown by RT-qPCR and northern blot analysis (Figure 3B,C, 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 upregulated upon infection, in concordance with prior observations [29]. We also found miRNA levels unchanged upon infection, such as miR-93 and miR-320 (Figure 3B). Downregulation of miR-372 and miR-373 upon infection was also shown by northern blot analysis (Figure 3C), which in addition revealed that miRNA precursors (pre-miRNA) were even more strongly repressed

than the mature forms (Figure 3C, upper part of the blot for miR-373). These findings suggest 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 (Figure 3D,E). Indeed, the pri-miRNA was rapidly downregulated upon *H. pylori* infection, as soon as 2 h post-infection at MOI 100 (Figure 3D), and in a MOI-dependent manner (Figure 3E). Altogether, these results show that the miR-371-372-373 cluster was strongly decreased at the pri-miRNA level shortly upon *H. pylori* infection.

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

To assess whether the downregulation of the miR-371-372-373 cluster was related to a functional *H. pylori* *cagPAI*, we compared the effect of wild-type 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 [26, 39], these mutants like wild-type *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 AGS cells infected with wild-type *H. pylori* [see Additional File 4, Figure S3A]. Moreover, these mutants were impaired in their proinflammatory effects on AGS cells, as measured by NF κ B activation and IL-8 secretion [see Additional File 4, Figure S3B,C]. Interestingly, both mutants have a very weak effect on the miR-371-372-373 cluster (Figure 4A). Indeed, when AGS cells were cocultivated with the Δ CagA or Δ CagE mutants, which are, respectively, unable to produce the CagA virulence factor or to inject it into the host cell cytoplasm, the pri-miRNA was not repressed, compared to cells infected with wild-type *H. pylori*. These data show that the downregulation of the miR-371-372-373 cluster upon *H. pylori* infection is mediated by the translocation of CagA into AGS cells.

To evaluate the effects of the downregulation of miR-372 and miR-373, we analyzed the regulation of their common target, LATS2, in AGS cells upon *H. pylori* infection. We observed that LATS2 mRNA (Figure 4B) and protein levels (Figure 4C) were inversely correlated to those of miR-372 and miR-373 upon *H. pylori* infection. Indeed, LATS2 protein was drastically upregulated in infected AGS cells and, likewise, its mRNA level was also raised up to twofold upon infection. Moreover, similarly to the pri-miR-371-372-373 repression, LATS2 accumulation was dependent

on CagA, 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 wild-type *H. pylori* (Figure 4B,C).

To confirm that LATS2 synthesis was derepressed at the post-transcriptional level after miR-372 and miR-373 downregulation in AGS cells infected with wild-type *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 senses changes in the miR-372 and miR-373 levels and allows a direct observation of LATS2 post-transcriptional regulation in living cells. Indeed, as372-373-treated cells, in which miR-372 and miR-373 levels were decreased, turn fluorescent, whereas sc372-373 did not [see Additional File 5, Figure S4]. As depicted in Figure 4D (panel c), green fluorescence appeared only upon infection with wild-type *H. pylori*, mainly in cells exhibiting the hummingbird phenotype (Figure 4D, panels c and d), whereas uninfected cells (Figure 4D, panels a and b) or cells infected with the Δ CagA or Δ CagE mutant strains (Figure 4D, panels 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, the P12 type I strain was able to switch on the fluorescence of the reporter cells as the 26695 strain did, whereas type II strains, such as SS1 and X47-2AL, did not [see Additional File 6, Figure S5B]. We were also able to correlate this post-transcriptional activation with a concomitant downregulation of the pri-miR371-372-373 transcript level [see Additional File 6, Figure S5A]. These data confirm that the CagA-dependent accumulation of LATS2 protein involves a post-transcriptional release of its expression mediated by the downregulation of miR-372 and miR-373.

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

To assess whether LATS2 upregulation was functionally relevant, we analyzed cell cycle progression of AGS cells upon infection. In agreement with previous observations [31], AGS cells infected for 24 h with wild-type *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 [see Additional File 7,

Figure S6]. Accordingly, measuring BrdU incorporation 24 h post infection, we observed an 80% reduction of AGS cells in S phase, which reflects a cell cycle arrest at the G1/S transition (Figure 5A). As already shown by Murata-Kamiya and colleagues [24], this reduction was dependent on CagA, as cells infected with the Δ CagA or Δ CagE mutants did not show such inhibition of cell cycle progression (Figure 5A [see Additional File 7, Figure S6]). To ascertain that the inhibition of G1/S transition was due to the downregulation of miR-372 and miR-373, we treated AGS cells with synthetic miR-372 and miR-373 prior to infection, in order to dampen their downregulation upon infection. In this case, the proportion of infected cells in S phase remained as high as in untreated and uninfected cells (Figure 5B), indicating that wild-type *H. pylori* became unable to arrest AGS cell cycle progression. Conversely, blocking miR-372 and miR-373 with as372-373 prior to infection facilitated the infection-induced inhibition of DNA synthesis, which then reached its maximum (Figure 5B). In addition, silencing LATS2 with siRNA against LATS2 mRNA reduced the efficiency of *H. pylori* to block AGS cell cycle (Figure 5C), confirming the LATS2 involvement in the inhibition of cell cycle progression in infected AGS cells.

The effects of these experimental manipulations of miR-372 and miR-373 and their common target LATS2 on the efficiency by which wild-type *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. Altogether, these results reveal an unexpected mechanism involved in the cell cycle arrest upon infection: the CagA-dependent derepression of LATS2 by the downregulation of miR-372 and miR-373.

Discussion

Recent data have highlighted the importance of miRNA in epithelial defense against pathogens such as *Cryptosporidium parvum* [18, 19] or *Toxoplasma gondii* [40]. 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 [41], 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 downregulates 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 [29, 42, 43]. However, we were surprised to discover that the most abundant of this repertoire, miR-372, belongs to a specific cluster encoding three other miRNAs, miR-371-5p, miR-371-3p and miR-373, expressed notably in human embryonic stem cells [34, 44]. Interestingly these miRNAs were also mentioned in a miRNA profiling study in normal human tissues [35], in which they were found highly and specifically expressed in placenta, but also faintly detectable in the 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 and miR-373 were initially discovered as novel oncogenes participating in the development of human testicular germ cell tumors by targeting the cell cycle inhibitor LATS2 [36]. 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 [43] and the miR-221-222 cluster [42]. 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 [42, 43]. 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 ([42, 43]; Cedric Belair and Cathy Staedel, unpublished results). 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 overexpression. Indeed, miR-372 and miR-373 belong to the miR-106b family which includes miR-93, miR-17-5p and miR-20a [45]. 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 [45]. In testicular germ cell tumors, which retained functional, wild-type p53, miR-372 and miR-373 act as oncogenes, silencing LATS2

and thus allowing cell proliferation [36]. Indeed, LATS2 is a serine/threonine kinase involved in a positive feedback loop with p53 [46] that can induce G1/S arrest by inhibiting cyclin E/cyclin-dependent kinase 2 (CDK2) kinase activity [47]. Interestingly, AGS cells express low wild-type p53 [48] and high p21^{cip1/waf1} levels in basal growth conditions ([49]; Cedric Belair and Cathy Staedel, unpublished results). Thereby, as in the testicular germ cell tumors, abundant miR-372 and miR-373 in AGS cells, that totally silence LATS2, may participate in 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 and miR-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 [36], have also been found to be repressed upon differentiation of embryonic stem cells in specific culture conditions [34]. In fact, *H. pylori*, via its major virulence factor CagA, can induce an intestinal transdifferentiation program in gastric epithelial cells that have undergone a cell cycle arrest [24]. 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 [24, 49]. Therefore, one could imagine that the observed repression of miR-372 and miR-373 in AGS cells could be a consequence of a block in cell division. However, at 2 h post infection, when cell proliferation has not been stopped yet, the pri-miR-371-372-373 was already downregulated 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 extracellular signal-regulated kinase (ERK), the phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/Akt and notably the Src kinase, the activation of which occurs at this very initial stage of infection [50].

The cell cycle arrest at the G1/S transition in AGS cells is mediated by the regulation of the couple miR-372-373/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 derepression of LATS2 synthesis. While several cell cycle regulators have been studied in this context, such as p21^{cip1/waf1} [31, 49, 51], or p27^{kip1} [52, 53], our data indicate that an additional pathway can occur in AGS cells. Indeed, *H. pylori* is much less efficient in blocking cell proliferation when the level of LATS2 is maintained at a low level either by miR-372 and miR-373 mimics or by specific anti-LATS2 siRNAs. However, because the 3'UTR of p21^{cip1/waf1} has also been proposed to be targeted by miR-372 and miR-373 [54], we certainly cannot exclude that its induction also participates in this cell cycle arrest [24, 49]. However, the block at the G1/S transition in AGS cells requires the derepression of LATS2 synthesis via the repression of miR-372 and miR-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 downregulation of the miRNA cluster.

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 [55], the perturbations of cell cycle progression elicited by *H. pylori* in gastric epithelial cells gave rise to many studies, some of which having precisely used AGS cells as a model system of an actively replicating gastric mucosa [31, 51, 56]. The miRNA content in AGS cells is characterized by its relative high abundance in embryonic stem cell miRNA [see Additional File 1, 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. miR-373 expression has already been detected in stomach [33]. 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 [57]. Iwai and colleagues have shown that *Shigella flexneri* blocks cell cycle of intestinal progenitors through the injection of its bacterial effector IpaB [58]. 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* interferes with the gastric epithelium self-renewal repressing this specific embryonic miRNA cluster in gastric progenitors, an additional mechanism that Mimuro and coworkers did not observe [57].

Conclusions

The role of miRNAs in severe pathologies, such as cancer, is now clearly established and extensively studied. Our work uncovers the unexpected pair of miR-372 and miR-373 as a novel example of miRNAs dysregulated in gastric cancer. Repressing LATS2 synthesis, through miR-372 and miR-373 overexpression, could represent an alternative pathway to the downregulation of p21^{cip1/waf1} or p27^{kip1} in the sequence of events leading to the malignant transformation of cells. We unveil LATS2/miR-372 and miR-373 as a novel mechanism in CagA-induced cell cycle arrest in proliferating gastric cells. Our findings enrich the library of cellular signaling perturbed by the Cag toxin with the miRNA pathway. Further studies will bring out the bacterial silencing repressor potential of CagA. Finally, our data are the first findings described so far showing a human pathogenic bacterium able to interfere with the biogenesis of a miRNAs cluster through the injection of its CagA toxin. However it is likely that it will be not the only one, as injection of toxin through a secretion system in order to interfere with host cell signaling pathways is a common virulence mechanism used by human pathogenic Gram-negative bacteria.

Methods

Cell culture

All the tissue culture reagents were purchased from Invitrogen (Paisley, UK). The AGS gastric epithelial cell line (ATCC CRL 1739, Manassas, VA, USA) 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, Osaka, Japan) in RPMI medium and the cervix cancer cell line (HeLa) in DMEM. All media were supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), 2 mM L-glutamine and 1% non-essential amino acids. Cells were grown at 37 °C in a humidified 5% CO₂ atmosphere.

H. 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, Basingstoke, UK), 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, Basingstoke, UK). After 24 h incubation, the bacteria were expanded onto fresh plates and grown for an additional 24 h. 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 Δ *cagA* and Δ *cagE* were constructed as previously described [59]. 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. [see Additional File 1, Table S4 for primers].

Coculture of AGS cells with *H. pylori*

Before coculture, the culture medium was replaced with fresh and the bacterial suspension was added to AGS cells at 60% to 70% confluence at the indicated MOI. The cocultures were incubated at 37 °C, in a humidified 5% CO₂ atmosphere.

RNA extraction

Total RNA was extracted using Trizol reagent (Invitrogen, Paisley, UK), according to the manufacturer's protocol. RNA concentrations were determined by a NanoDrop spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Inc., Waltham, MA, USA). RNA quality was analyzed on a 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA).

454 miRNA libraries

Libraries for '454' pyrosequencing of cDNA were constructed by Vertis Biotechnology AG, Freising, Germany (<http://www.vertis-biotech.com/>) as described previously for eukaryotic microRNA in brain [60] and murine macrophages [14]. Specifically, total RNA was prepared from AGS cells either grown in basal conditions or cocultured for

5 h with *H. pylori* 26695 strain at MOI 240, 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 to 29 nucleotides 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 RNA samples were poly(A)-tailed using poly(A) polymerase followed by ligation of a RNA adapter to the 5'-phosphate of the small RNAs. First-strand cDNA synthesis was then performed using an oligo(dT)-adapter primer and M-MLV 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 using a high fidelity DNA polymerase. The primers used for PCR amplification were designed for amplicon sequencing according to the instructions of 454 Live Sciences and contain barcode sequences, which are attached to the 5'-ends of the cDNAs during PCR amplification. The following adapter sequences flank the cDNA inserts: 5'-end (54 bases) (5'-**CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG**-NNNNNN-GACCTTGGCTGTCACTCA-3) and 3'-end (84 bases) (5'-**CCTATCCCCTGTGTGCCTTGGCAGTCTCAG**-ATCAGGCAGAGGACGAGACATCGCCCCGC(dT25)-3'). The 454 adapter sequences are in bold.

The combined length of the flanking sequences was 104 bases. Therefore, PCR products containing miRNA sequences of 19 to 29 nucleotides must have a total length of about 120 to 135 bp. PAGE analysis of the PCR-amplified cDNAs revealed that the cDNAs were of the expected size. The 120 to 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 µl water. Concentration of the samples was about 10 ng/µl. The resulting cDNA libraries were sequenced on a Roche GS20 454 sequencer at the MPI for Molecular Genetics in Berlin, Germany.

miRNA sequencing analysis

The 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 semiglobally 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 [see Additional File 1, Table S1 for results].

Quantitative RT-PCR

TaqMan microRNA assays (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) 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 [see Additional File 1, Table S4] and expressed as copies per cell on the basis of our determination of $1 \mu\text{g RNA}/10^5$ AGS cells. LATS2 mRNA and pri-miR-371-372-373 levels were determined by RT-qPCR using PerfeCta SYBR Green SuperMix (Quanta BioSciences, Gaithersburg, MD, USA). cDNA was synthesized with Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen, Paisley, UK) using oligo(dT)₂₀ primer according to the manufacturer's protocol [see Additional File 1, Table S4 for qPCR primers]. miRNAs levels were normalized to U6 small nuclear RNA (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, Chalfont St. Giles, UK). Membranes were incubated with 5'-³²P-radiolabeled locked nucleic acid (LNA)/DNA probes in 50% formamide, 5 × SSPE (Saline-Sodium Phosphate-EDTA), 5 × Denhardt solution, 0.5% SDS, 20 µg/ml salmon sperm DNA, at 42 °C overnight in a hybridization oven. After two washes for 5 min each in 2 × SSC (Saline-Sodium Citrate), 0.1% SDS at 42 °C, the blots were analyzed and quantified by phosphorimaging (Molecular Imager PharosFX^{plus}, BioRad, Hercules, CA, USA) [see Additional File 1, Table S4 for probe sequences].

Western blot

Cells were harvested in ice-cold Ham's medium and washed with ice cold phosphate-buffered saline (PBS). The cell pellets were lysed in ProteoJET Mammalian Cell lysis reagent (Fermentas, St. Leon-Rot, Germany) supplemented with 5 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and 1 × ProteoBlock Protease inhibitor cocktail (Fermentas, St. Leon-Rot, Germany). 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, Taipei City, Taiwan) and anti-α-tubulin (clone B-5-1-2, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) antibodies were used at a 1:500 and 1:30,000 dilutions, respectively.

Cell transfections

All transfections were performed using Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Paisley, UK) according to the manufacturer's protocol [see Additional File 1, Table S4 for oligonucleotide sequences]. Double-stranded mimic 372-373 were generated by incubating equimolar amounts of complementary, heat-denatured single RNA strands in 60 mM KCl, 6 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (Hepes) pH 7.5, 0.2 mM MgCl₂ buffer, for 20 min at room temperature. Anti-human LATS2 siRNA (siLATS2) and control siRNA were purchased from Qiagen (Courtaboeuf, France). 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, 20 nM siLATS2 or 20 nM control siRNA. pCMVmyc-LATS2 (generous gift of Professor H Nojima, Osaka, Japan) or the empty vector pcDNA3 (Invitrogen, Paisley, UK) were transfected as indicated in the figure legends. NFκB activation was monitored using

the BD Mercury firefly luciferase reporters (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) according to the manufacturer's instructions. Briefly, 48 h before infection, cells were transfected with either 1 µg NFκB-luc or TAL (luciferase without promoter) vectors, together with 10 ng of pRL-SV40 control vector (Promega, Madison, WI, USA). LATS2 translation efficiency was assessed with the luciferase sensors pGL3-LATS2 or its mutant pGL3-LATS2mut [34] (generous gifts of Professor R Agami, The Netherlands Cancer Institute, Amsterdam, The Netherlands). Each plasmid was transfected at 100 ng in the presence of 10 ng pRL-SV40 control vector (Promega, Madison, WI, USA). At the second transfection round with as372-373 or sc372-373, the oligonucleotides were mixed with 100 ng pGL3-LATS2 or pGL3 plasmids, and 10 ng pRL-SV40 control vector. Firefly and *Renilla* luciferases were measured 48 h post transfection using the Dual Luciferase Assay (Promega, Madison, WI, USA). Firefly luciferase activities were normalized for transfection efficiency by *Renilla* luciferase.

Construction of the LATS2 reporter AGS cell line

The LATS2 3'UTR sequence was obtained by PCR using pGL3-LATS2 as template [see Additional File 1, Table S4 for primers]. The PCR product was cloned into the pEGFP-C1 vector (Clontech, Saint-Germain-en-Laye, France) downstream to the *egfp* gene. Stable LATS2 reporter AGS cells were obtained after selection with 400 µg/ml geneticin (Invitrogen, Paisley, UK) of AGS cells transfected with the pEGFP-3'UTR-LATS2 vector.

Cell cycle analysis by flow cytometry

After coculture with *H. pylori*, adherent and floating cells were collected together, washed once in ice-cold PBS and fixed in 70% ice-cold ethanol for 24 h. Fixed cells were stained in a 0.5 mg/ml propidium iodide, 0.1% (w/v) RNase A, 0.1% (w/v) bovine serum albumin (BSA)/PBS solution and analyzed for DNA content by flow cytometry (FACS Canto cytometer, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA).

BrdU incorporation

AGS cells were transfected twice with as372-373, sc372-373 or mimic 372-373 before coculture with *H. pylori*. Cells were pulse labeled with 10 nM BrdU for 1 h before the end of the coculture. Cells were harvested and BrdU incorporation was detected by immunofluorescent staining using the fluorescein isothiocyanate (FITC)

BrdU Flow kit (Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) and quantified by flow cytometry (FACS Canto cytometer, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA).

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

CB carried out the cell and *Helicobacter pylori* cultures, transfections and miRNA and target analyses. JB carried out the *H. pylori* cultures, generated the mutants, and participated to the miRNA and target analyses. SC designed and purified the oligonucleotides and performed the northern blots. The '454' high-throughput pyrosequencing was performed and analyzed by CMS under JV's supervision. CS and FD conceived the study, supervised CB and JB's work. FD, CB and CS wrote the manuscript. All authors read and approved the manuscript.

Acknowledgments

We thank Dr Philippe Lehours for providing the AGS cell line, Professor Thomas Meyer for the P12 strain, Dr Reuven Agami for the pGL3-LATS2, pGL3-LATS2mut and pGL3 vectors, Dr Cecile Duplaa for the pEGFP-C1 vector and Professor H Nojima for the pCMVmyc-LATS2 vector. We are very grateful to Professor 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. 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.

References

1. Kim VN: **Cell cycle micromanagement in embryonic stem cells.** *Nat Genet* 2008, **40**:1391-1392.
2. Wang Y, Blelloch R: **Cell cycle regulation by MicroRNAs in embryonic stem cells.** *Cancer Res* 2009, **69**:4093-4096.

3. Croce CM: **Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer.** *Nat Rev Genet* 2009, **10**:704-714.
4. Kato M, Slack FJ: **microRNAs: small molecules with big roles - *C. elegans* to human cancer.** *Biol Cell* 2008, **100**:71-81.
5. Baulcombe D: **RNA silencing in plants.** *Nature* 2004, **431**:356-363.
6. Lecellier CH, Dunoyer P, Arar K, Lehmann-Che J, Eyquem S, Himber C, Saib A, Voinnet O: **A cellular microRNA mediates antiviral defense in human cells.** *Science* 2005, **308**:557-560.
7. Navarro L, Dunoyer P, Jay F, Arnold B, Dharmasiri N, Estelle M, Voinnet O, Jones JD: **A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling.** *Science* 2006, **312**:436-439.
8. Ye K, Malinina L, Patel DJ: **Recognition of small interfering RNA by a viral suppressor of RNA silencing.** *Nature* 2003, **426**:874-878.
9. Navarro L, Jay F, Nomura K, He SY, Voinnet O: **Suppression of the microRNA pathway by bacterial effector proteins.** *Science* 2008, **321**:964-967.
10. Parameswaran P, Sklan E, Wilkins C, Burgon T, Samuel MA, Lu R, Ansel KM, Heissmeyer V, Einav S, Jackson W, Doukas T, Paranjape S, Polacek C, dos Santos FB, Jalili R, Babrzadeh F, Gharizadeh B, Grimm D, Kay M, Koike S, Sarnow P, Ronaghi M, Ding SW, Harris E, Chow M, Diamond MS, Kirkegaard K, Glenn JS, Fire AZ: **Six RNA viruses and forty-one hosts: viral small RNAs and modulation of small RNA repertoires in vertebrate and invertebrate systems.** *PLoS Pathog* 2010, **6**:e1000764.
11. O'Connell RM, Taganov KD, Boldin MP, Cheng G, Baltimore D: **MicroRNA-155 is induced during the macrophage inflammatory response.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007, **104**:1604-1609.
12. Taganov KD, Boldin MP, Baltimore D: **MicroRNAs and immunity: tiny players in a big field.** *Immunity* 2007, **26**:133-137.
13. Taganov KD, Boldin MP, Chang KJ, Baltimore D: **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* 2006, **103**:12481-12486.

14. Schulte LN, Eulalio A, Mollenkopf HJ, Reinhardt R, Vogel J: **Analysis of the host microRNA response to *Salmonella* uncovers the control of major cytokines by the let-7 family.** *EMBO J* 2011, **30**:1977-1989.
15. Voinnet O: **Micro-balancing innate immunity to *Salmonella*.** *EMBO J* 2011, **30**:1877-1879.
16. Moschos SA, Williams AE, Perry MM, Birrell MA, Belvisi MG, Lindsay MA: **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* 2007, **8**:240.
17. Chen XM, Splinter PL, O'Hara SP, LaRusso NF: **A cellular micro-RNA, let-7i, regulates Toll-like receptor 4 expression and contributes to cholangiocyte immune responses against *Cryptosporidium parvum* infection.** *J Biol Chem* 2007, **282**:28929-28938.
18. O'Hara SP, Splinter PL, Gajdos GB, Trussoni CE, Fernandez-Zapico ME, Chen XM, LaRusso NF: **NFkappaB p50-CCAAT/enhancer-binding protein beta (C/EBPbeta)-mediated transcriptional repression of microRNA let-7i following microbial infection.** *J Biol Chem* 2010, **285**:216-225.
19. Zhou R, Hu G, Liu J, Gong AY, Drescher KM, Chen XM: **NF-kappaB p65-dependent transactivation of miRNA genes following *Cryptosporidium parvum* infection stimulates epithelial cell immune responses.** *PLoS Pathog* 2009, **5**:e1000681.
20. Cover TL, Blaser MJ: ***Helicobacter pylori* in health and disease.** *Gastroenterology* 2009, **136**:1863-1873.
21. Hatakeyama M: **Oncogenic mechanisms of the *Helicobacter pylori* CagA protein.** *Nat Rev Cancer* 2004, **4**:688-694.
22. Kwok T, Zabler D, Urman S, Rohde M, Hartig R, Wessler S, Misselwitz R, Berger J, Sewald N, Konig W, Backert S: ***Helicobacter* exploits integrin for type IV secretion and kinase activation.** *Nature* 2007, **449**:862-866.
23. Mimuro H, Berg DE, Sasakawa C: **Control of epithelial cell structure and developmental fate: lessons from *Helicobacter pylori*.** *Bioessays* 2008, **30**:515-520.
24. Murata-Kamiya N, Kurashima Y, Teishikata Y, Yamahashi Y, Saito Y, Higashi H, Aburatani H, Akiyama T, Peek RM, Jr., Azuma T, Hatakeyama M:

- 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.
25. Wessler S, Backert S: **Molecular mechanisms of epithelial-barrier disruption by *Helicobacter pylori*.** *Trends Microbiol* 2008, **16**:397-405.
 26. Viala J, Chaput C, Boneca IG, Cardona A, Girardin SE, Moran AP, Athman R, Mémet S, Huerre MR, Coyle AJ, DiStefano PS, Sansonetti PJ, Labigne A, Bertin J, Philpott DJ, Ferrero RL: **Nod1 responds to peptidoglycan delivered by the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island.** *Nat Immunol* 2004, **5**:1166-1174.
 27. Belair C, Darfeuille F, Staedel C: ***Helicobacter pylori* and gastric cancer: possible role of microRNAs in this intimate relationship.** *Clin Microbiol Infect* 2009, **15**:806-812.
 28. Fassi Fehri L, Koch M, Belogolova E, Khalil H, Bolz C, Kalali B, Mollenkopf HJ, Beigier-Bompadre M, Karlas A, Schneider T, Churin Y, Gerhard M, Meyer TF: ***Helicobacter pylori* induces miR-155 in T cells in a cAMP-Foxp3-dependent manner.** *PLoS One* 2010, **5**:e9500.
 29. Zhang Z, Li Z, Gao C, Chen P, Chen J, Liu W, Xiao S, Lu H: **miR-21 plays a pivotal role in gastric cancer pathogenesis and progression.** *Lab Invest* 2008, **88**:1358-1366.
 30. Barranco SC, Townsend CM, Jr., Casartelli C, Macik BG, Burger NL, Boerwinkle WR, Gourley WK: **Establishment and characterization of an *in vitro* model system for human adenocarcinoma of the stomach.** *Cancer Res* 1983, **43**:1703-1709.
 31. Peek RM, Jr., Blaser MJ, Mays DJ, Forsyth MH, Cover TL, Song SY, Krishna U, Pietenpol JA: ***Helicobacter pylori* strain-specific genotypes and modulation of the gastric epithelial cell cycle.** *Cancer Res* 1999, **59**:6124-6131.
 32. Selbach M, Moese S, Meyer TF, Backert S: **Functional analysis of the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island reveals both VirD4-CagA-dependent and VirD4-CagA-independent mechanisms.** *Infect Immun* 2002, **70**:665-671.
 33. Xiao B, Liu Z, Li BS, Tang B, Li W, Guo G, Shi Y, Wang F, Wu Y, Tong WD, Guo H, Mao XH, Zou QM: **Induction of microRNA-155 during *Helicobacter***

- pylori* infection and its negative regulatory role in the inflammatory response.** *J Infect Dis* 2009, **200**:916-925.
34. Suh MR, Lee Y, Kim JY, Kim SK, Moon SH, Lee JY, Cha KY, Chung HM, Yoon HS, Moon SY, Kim VN, Kim KS: **Human embryonic stem cells express a unique set of microRNAs.** *Dev Biol* 2004, **270**:488-498.
 35. Liang Y, Ridzon D, Wong L, Chen C: **Characterization of microRNA expression profiles in normal human tissues.** *BMC Genomics* 2007, **8**:166.
 36. Voorhoeve PM, le Sage C, Schrier M, Gillis AJ, Stoop H, Nagel R, Liu YP, van Duijse J, Drost J, Griekspoor A, Zlotorynski E, Yabuta N, De Vita G, Nojima H, Looijenga LH, Agami R: **A genetic screen implicates miRNA-372 and miRNA-373 as oncogenes in testicular germ cell tumors.** *Cell* 2006, **124**:1169-1181.
 37. Lee KH, Goan YG, Hsiao M, Lee CH, Jian SH, Lin JT, Chen YL, Lu PJ: **MicroRNA-373 (miR-373) post-transcriptionally regulates large tumor suppressor, homolog 2 (LATS2) and stimulates proliferation in human esophageal cancer.** *Exp Cell Res* 2009, **315**:2529-2538.
 38. Rippe V, Dittberner L, Lorenz VN, Drieschner N, Nimzyk R, Sendt W, Junker K, Belge G, Bullerdiek J: **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* 2010, **5**:e9485.
 39. Fischer W, Puls J, Buhrdorf R, Gebert B, Odenbreit S, Haas R: **Systematic mutagenesis of the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island: essential genes for CagA translocation in host cells and induction of interleukin-8.** *Mol Microbiol* 2001, **42**:1337-1348.
 40. Zeiner GM, Norman KL, Thomson JM, Hammond SM, Boothroyd JC: ***Toxoplasma gondii* infection specifically increases the levels of key host microRNAs.** *PLoS One* 2010, **5**:e8742.
 41. O'Connell RM, Rao DS, Chaudhuri AA, Baltimore D: **Physiological and pathological roles for microRNAs in the immune system.** *Nat Rev Immunol* 2010, **10**:111-122.
 42. Kim YK, Yu J, Han TS, Park SY, Namkoong B, Kim DH, Hur K, Yoo MW, Lee HJ, Yang HK, Kim VN: **Functional links between clustered microRNAs:**

- suppression of cell-cycle inhibitors by microRNA clusters in gastric cancer.** *Nucleic Acids Res* 2009, **37**:1672-1681.
43. Petrocca F, Visone R, Onelli MR, Shah MH, Nicoloso MS, de Martino I, Iliopoulos D, Piloizzi E, Liu CG, Negrini M, Cavazzini L, Volinia S, Alder H, Ruco LP, Baldassarre G, Croce CM, Vecchione A: **E2F1-regulated microRNAs impair TGFbeta-dependent cell-cycle arrest and apoptosis in gastric cancer.** *Cancer Cell* 2008, **13**:272-286.
44. Li SS, Yu SL, Kao LP, Tsai ZY, Singh S, Chen BZ, Ho BC, Liu YH, Yang PC: **Target identification of microRNAs expressed highly in human embryonic stem cells.** *J Cell Biochem* 2009, **106**:1020-1030.
45. Borgdorff V, Lleonart ME, Bishop CL, Fessart D, Bergin AH, Overhoff MG, Beach DH: **Multiple microRNAs rescue from Ras-induced senescence by inhibiting p21(Waf1/Cip1).** *Oncogene* 2010, **29**:2262-2271.
46. Aylon Y, Michael D, Shmueli A, Yabuta N, Nojima H, Oren M: **A positive feedback loop between the p53 and Lats2 tumor suppressors prevents tetraploidization.** *Genes Dev* 2006, **20**:2687-2700.
47. Li Y, Pei J, Xia H, Ke H, Wang H, Tao W: **Lats2, a putative tumor suppressor, inhibits G1/S transition.** *Oncogene* 2003, **22**:4398-4405.
48. Chen G, Sordillo EM, Ramey WG, Reidy J, Holt PR, Krajewski S, Reed JC, Blaser MJ, Moss SF: **Apoptosis in gastric epithelial cells is induced by *Helicobacter pylori* and accompanied by increased expression of BAK.** *Biochem Biophys Res Commun* 1997, **239**:626-632.
49. Yokoyama K, Higashi H, Ishikawa S, Fujii Y, Kondo S, Kato H, Azuma T, Wada A, Hirayama T, Aburatani H, Hatakeyama M: **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* 2005, **102**:9661-9666.
50. Backert S, Tegtmeyer N, Selbach M: **The versatility of *Helicobacter pylori* CagA effector protein functions: the master key hypothesis.** *Helicobacter* 2010, **15**:163-176.
51. Ahmed A, Smoot D, Littleton G, Tackey R, Walters CS, Kashanchi F, Allen CR, Ashktorab H: ***Helicobacter pylori* inhibits gastric cell cycle progression.** *Microbes Infect* 2000, **2**:1159-1169.

52. Kuzushita N, Rogers AB, Monti NA, Whary MT, Park MJ, Aswad BI, Shirin H, Koff A, Eguchi H, Moss SF: **p27kip1 deficiency confers susceptibility to gastric carcinogenesis in *Helicobacter pylori*-infected mice.** *Gastroenterology* 2005, **129**:1544-1556.
53. Shirin H, Sordillo EM, Kolevska TK, Hibshoosh H, Kawabata Y, Oh SH, Kuebler JF, Delohery T, Weghorst CM, Weinstein IB, Moss SF: **Chronic *Helicobacter pylori* infection induces an apoptosis-resistant phenotype associated with decreased expression of p27(kip1).** *Infect Immun* 2000, **68**:5321-5328.
54. Wu S, Huang S, Ding J, Zhao Y, Liang L, Liu T, Zhan R, He X: **Multiple microRNAs modulate p21Cip1/Waf1 expression by directly targeting its 3' untranslated region.** *Oncogene* 2010, **29**:2302-2308.
55. Blaser MJ, Perez-Perez GI, Kleanthous H, Cover TL, Peek RM, Chyou PH, Stemmermann GN, Nomura A: **Infection with *Helicobacter pylori* strains possessing cagA is associated with an increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach.** *Cancer Res* 1995, **55**:2111-2115.
56. Ding SZ, Smith MF, Jr., Goldberg JB: ***Helicobacter pylori* and mitogen-activated protein kinases regulate the cell cycle, proliferation and apoptosis in gastric epithelial cells.** *J Gastroenterol Hepatol* 2008, **23**:e67-78.
57. Kim M, Ashida H, Ogawa M, Yoshikawa Y, Mimuro H, Sasakawa C: **Bacterial interactions with the host epithelium.** *Cell Host Microbe* 2010, **8**:20-35.
58. Iwai H, Kim M, Yoshikawa Y, Ashida H, Ogawa M, Fujita Y, Muller D, Kirikae T, Jackson PK, Kotani S, Sasakawa C: **A bacterial effector targets Mad2L2, an APC inhibitor, to modulate host cell cycling.** *Cell* 2007, **130**:611-623.
59. Schauer K, Gouget B, Carriere M, Labigne A, de Reuse H: **Novel nickel transport mechanism across the bacterial outer membrane energized by the TonB/ExbB/ExbD machinery.** *Mol Microbiol* 2007, **63**:1054-1068.
60. Berezikov E, Thuemmler F, van Laake LW, Kondova I, Bontrop R, Cuppen E, Plasterk RH: **Diversity of microRNAs in human and chimpanzee brain.** *Nat Genet* 2006, **38**:1375-1377.

Figure legends

Figure 1. Micro RNA (miRNA) expression profile in AGS cells. (A) miRNA content of AGS cells was determined by high-throughput '454' pyrosequencing [see Additional File 1, 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 quantitative real time PCR (RT-qPCR). Bars indicate the relative expression of each miRNA normalized to U6 small nuclear RNA (snRNA) (RNU6B). Data are mean $\pm$ SD of three independent experiments.

Figure 2. miR-372 and miR-373-mediated regulation of large tumor suppressor homolog 2 (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 and miR-373 target sequences [36]. 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 by <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 small nuclear RNA (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. * P < 0.05; ** P < 0.01. (D) The DNA synthesis rate was measured by 5-bromo-2'-deoxyuridine (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 or transfected with the pCMVmyc-LATS2 vector. Bars represent the relative BrdU incorporation compared to

that of untreated cells. Data are mean $\pm$ SD of three independent experiments. $**P < 0.01$.

Figure 3. *Helicobacter pylori*-induced downregulation of mature miR-371, miR-372 and miR-373 levels in AGS cells. (A) Micro RNAs (miRNAs) content of AGS cells cocultured with *H. pylori* was determined by high-throughput '454' pyrosequencing. The graph represents the miRNAs content in reads of uninfected AGS cells (y axis) versus infected cells (x axis). miR-372, miR-373 and miR-371-5p are shown (empty plots). The trend line is represented, $R^2 = 0.9556$ [see Additional File 1, Table S1 for total number of reads of each miRNA and Fisher's exact test P values]. (B) 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 quantitative real time PCR (RT-qPCR) in AGS cells 24 h post infection at multiplicity of infection (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. $**P < 0.01$; $***P < 0.001$. (C) 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. (D,E) Expression of the primary miR-371-372-373 cluster transcript after different time of infection (MOI 100) (D), and different MOI (6 h post infection) (E). Bars indicate the relative primary polycistronic miRNA transcript (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 primary (pri-)miR-371-372-373 and upregulation of large tumor suppressor homolog 2 (LATS2) expression. (A,B) Expression of the primary miR-371-372-373 cluster transcript (A) or LATS2 mRNA (B) was determined by quantitative real time PCR (RT-qPCR) in uninfected AGS cells or cells infected for 24 h at multiplicity of infection (MOI) 100 with either *Helicobacter pylori* 26695 or its Δ CagA or Δ CagE isogenic mutants. Bars indicate the relative pri-micro RNA (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. $**P < 0.01$; $***P < 0.001$. (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)** Enhanced green fluorescent protein (EGFP) fluorescence of LATS2 reporter cells infected or not with wild-type *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 *Helicobacter pylori*-induced cell cycle arrest in AGS cells. **(A)** DNA synthesis rate of uninfected AGS cells or cells infected for 24 h with wild-type *H. pylori* or its isogenic mutants Δ CagA and Δ CagE. **(B,C)** DNA synthesis rate of parental AGS cells (mock), or treated cells infected with or without wild-type *H. pylori* for 24 h. Previously, cells were transfected 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) (B), or treated with 20 nM of anti-large tumor suppressor homolog 2 (LATS2) siRNA or control siRNA (C). DNA synthesis level was measured by 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) pulse labeling. Bars represent the relative BrdU incorporation level compared to that of uninfected (A) or uninfected parental (B,C) AGS cells. Data are mean $\pm$ SD of two independent experiments. * $P < 0.05$.

Additional files

Additional file 1

Title: Tables S1-4.

Description: Table S1: 454 results of the micro RNA (miRNA) content in AGS cells in basal conditions and upon *Helicobacter pylori* infection (MirBase 14.0). miRNAs studied in this paper are represented in bold. P values are calculated using Fisher's exact test. Table S2: miRNAs listed in regards of their known function. miRNAs counting more than 100 reads ($>0.4\%$ reads) correspond to those in Figure 1. Table S3: *H. pylori* strains used in this study. Table S4: Oligonucleotides used in this study. Sequences are given in the 5' to 3' direction. For locked nucleic acid (LNA) oligonucleotides small letters indicate DNA, whereas capital letters indicate LNA. Antisense miRNA is abbreviated as number of the miRNA. Sequences homologous

to the *aphA-3'* kanamycin resistance cassette gene are shown in italics, lower case letters

Additional file 2

Title: Figure S1.

Description: Large tumor suppressor homolog 2 (LATS2) translation efficiency in AGS (high miR-372 and miR-373) and MKN-74 (low miR-372 and miR-373) cells. AGS or MKN-74 cells were plated at $0.7 \cdot 10^5$ or 10^5 cells/well, respectively, in a 24-well plate and transfected the following day with 100 ng/well pGL3, pGL3-LATS2 or pGL3-LATS2mut vectors [36], each mixed with 10 ng 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 in triplicate. * $P < 0.05$; *** $P < 0.001$.

Additional file 3

Title: Figure S2.

Description: Effect of antisense oligonucleotides treatment on micro RNA (miRNA) expression (**A,B**), large tumor suppressor homolog 2 (LATS2) expression (**D**) and cell growth rate (**C,E**). (A) Endogenous expression of miR-372, miR-373 and miR-200b was determined 48 h post transfection by quantitative real time PCR (RT-qPCR) in untreated cells (mock) or cells treated twice with 100 nM of locked nucleic acid (LNA)/DNA antisense (as372-373) or scramble (sc372-373) oligonucleotides [see Additional File 1, Table S4 for sequences]. Bars indicate relative miRNA expression normalized to U6 small nuclear RNA (snRNA) (RNU6b). Data are mean $\pm$ SD of two 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 six-well plate and counted at day 2 and day 3 after plating. The results are expressed as the relative increase in cell numbers between day 2 and day 3, normalized to that of untreated AGS cells. Data are mean $\pm$ SD of three independent experiments in duplicate. (D) LATS2 immunoblot of AGS cells transfected with a pCMVmycLATS2

expression vector, or with as 372-373 or sc372-373 oligonucleotides. A total of 10^6 AGS cells were plated in 6 cm diameter plates and transfected the following day with 1 μ g pCMVmycLATS2. Oligonucleotide treatments were performed as above. Protein lysates were prepared 48 h post transfection and submitted to SDS-PAGE. α -Tubulin was used as a loading control. A representative immunoblot is shown. (E) Effect of ectopic expression of LATS2 on AGS or MKN74 growth rate. Black bars, cells transfected with pCMVmycLATS2; grey bars, cells transfected with pcDNA3. Cells were plated at a density of 10^3 cells/well in a 96-well plate containing 22 ng/well plasmid. Cell viability was determined at day 2 and day 3 after plating by optical density later using the Celltiter Proliferation Assay (Promega). The results are expressed as the relative increase in optical density between day 2 and day 3, normalized to that of pcDNA3-transfected cells. Data are mean $\pm$ SD of two independent experiments performed in triplicate.

Additional file 4

Title: Figure S3.

Description: *Helicobacter pylori*-induced morphological changes **(A)** and proinflammatory responses **(B,C)** in AGS cells. (A) Morphology of uninfected AGS cells or cells infected for 24 h with *H. pylori* 26695 wild-type strain or its isogenic mutants *H. pylori* Δ CagA and Δ CagE at multiplicity of infection (MOI) 100 was visualized by phase contrast microscopy. Uninfected AGS cells display an epithelial morphology. Coculture with *H. pylori* 26695 wild-type strain causes cell elongation, so called 'hummingbird' phenotype, and vacuoles. The 'hummingbird' phenotype is CagA dependent, as cells cocultured 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) Proinflammatory responses of AGS cells infected for 24 h with *H. pylori* 26695 wild-type strain or its isogenic mutants Δ CagA and Δ CagE at MOI 100 were analyzed by nuclear factor (NF) κ B activation (B) and interleukin 8 (IL-8) secretion (C). As previously described [26], NF κ B activation and IL-8 secretion were both CagA and Type IV Secretion System 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 (luciferase without promoter) activity.

Data represent the mean $\pm$ SD of two independent experiments. 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 four independent experiments.

Additional file 5

Title: Figure S4.

Description: Enhanced green fluorescent protein (EGFP) fluorescence of large tumor suppressor homolog 2 (LATS2) reporter-AGS cells transfected with as372-373 or sc372-373. Cells were transfected twice with 100 nM antisense or scramble oligonucleotides and observed 24 h after the last transfection on an inverted microscope (Zeiss) in phase contrast (right panels) or epifluorescence (left panels).

Additional file 6

Title: Figure S5.

Description: *Helicobacter pylori* strain-specific repression of primary (pri-)miR-371-372-373 and upregulation of the enhanced green fluorescent protein (EGFP)-3' untranslated region (UTR) large tumor suppressor homolog 2 (LATS2) reporter gene. AGS cells were infected with *H. pylori* type I strains (P12) or type II strain (SS1, X47) at a multiplicity of infection (MOI) 100 for 24 h. **(A)** Expression of the pri-miR-371-372-373 was determined by quantitative real time PCR (RT-qPCR) in non-infected cells (NI) or cells infected with the different *H. pylori* strains. Bars indicate relative pri-micro RNA (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).

Additional file 7

Title: Figure S6.

Description: CagA-dependent accumulation of *Helicobacter pylori*-infected AGS cells in G0/G1 phase. Cellular DNA contents of uninfected AGS cells or cells infected for 24 h with wild-type, Δ CagA or Δ CagE *H. pylori* were stained by iodide propidium and analyzed by flow cytometry.

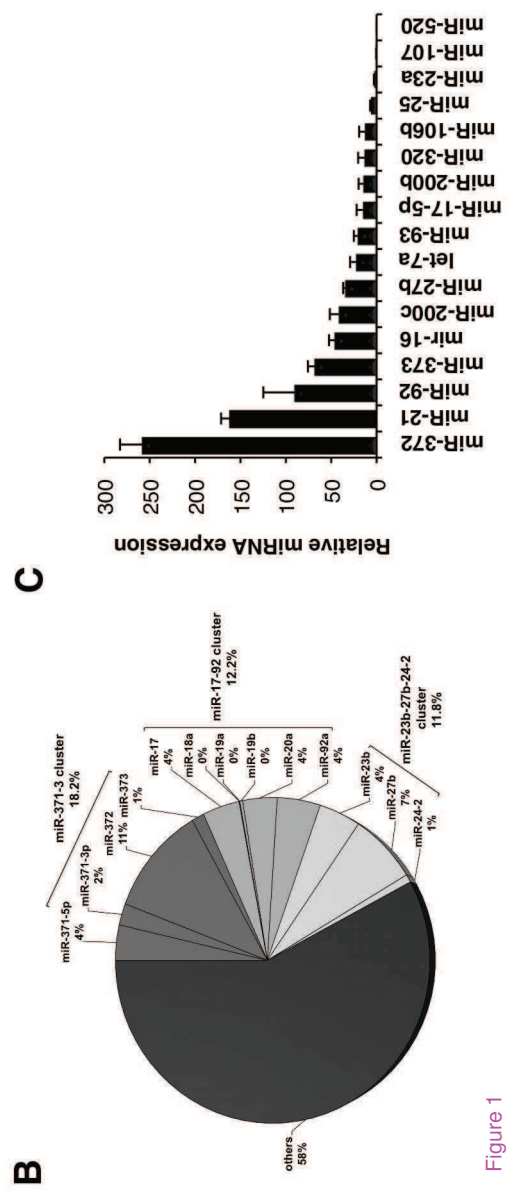
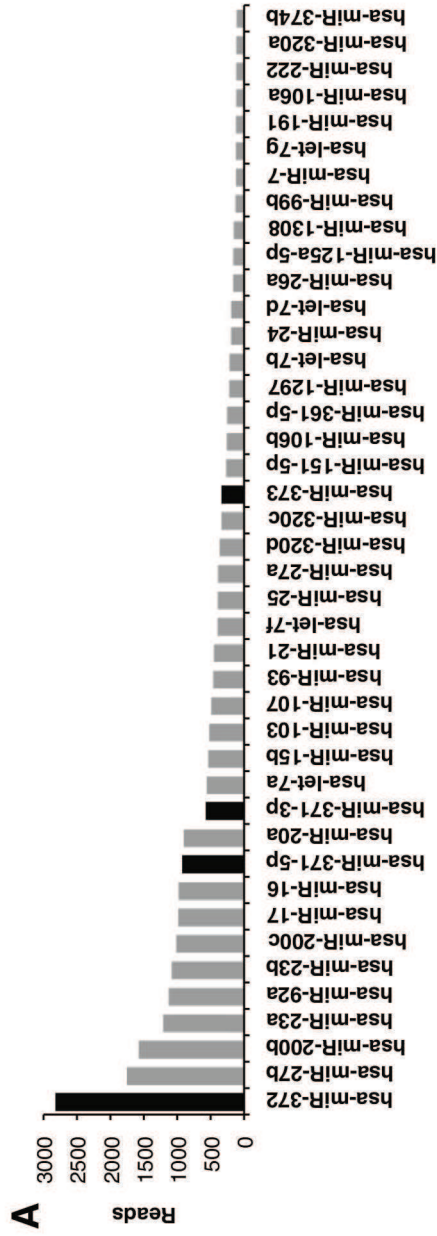


Figure 1

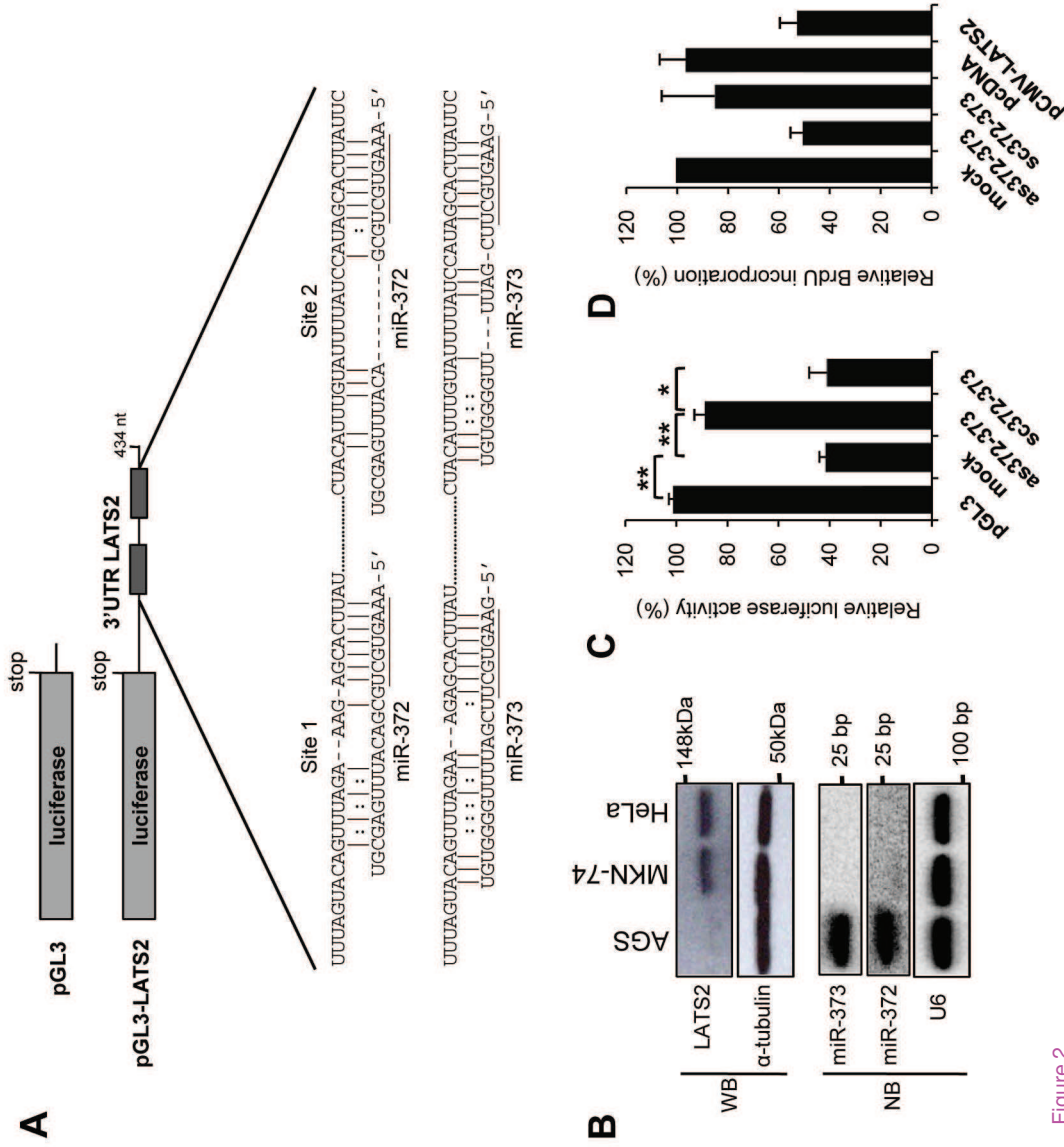


Figure 2

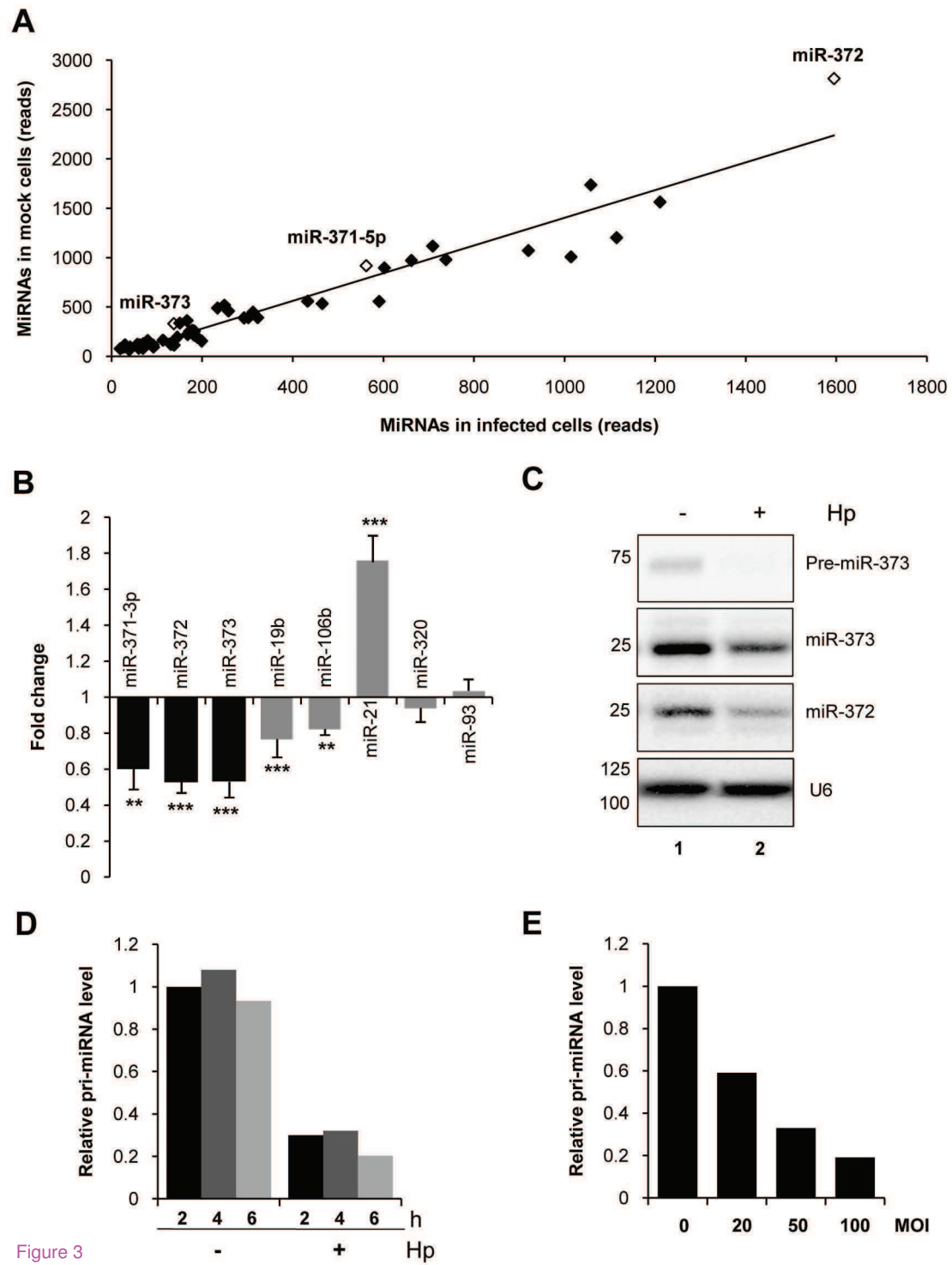


Figure 3

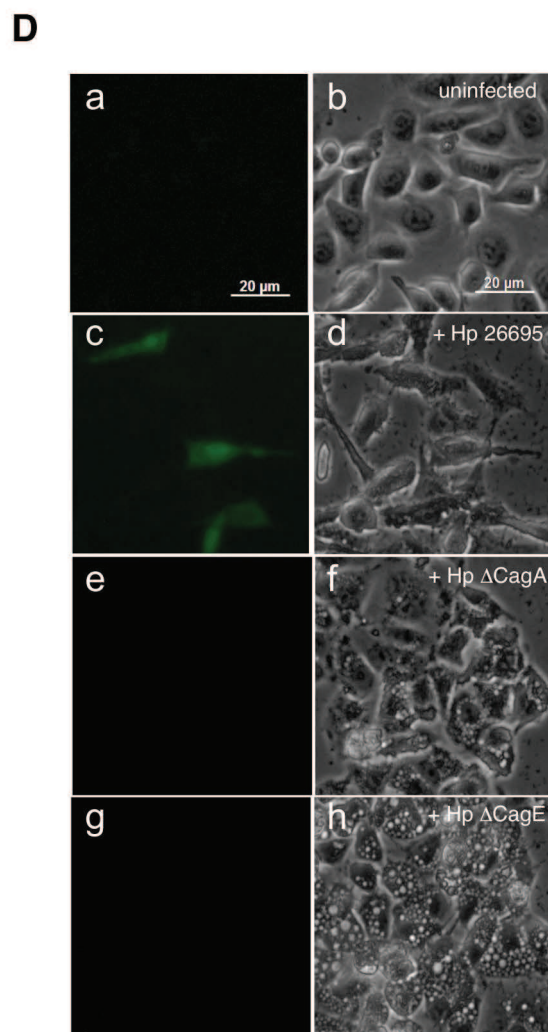
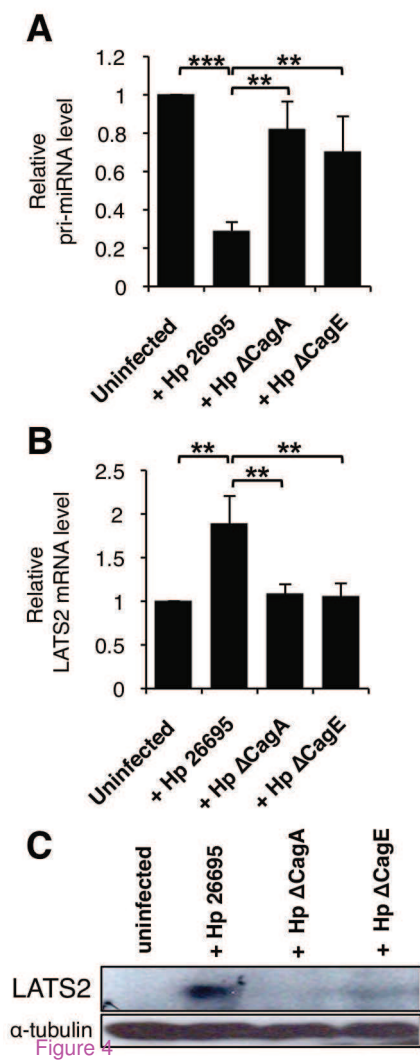


Figure 4

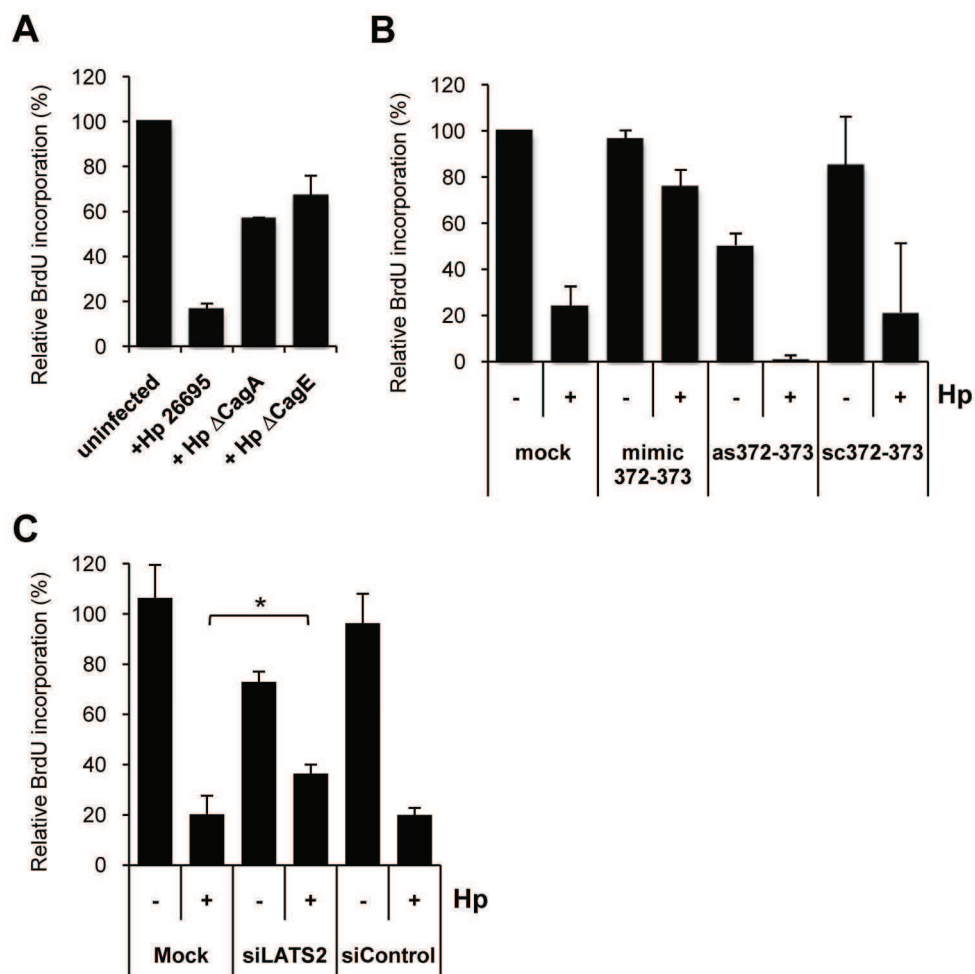


Figure 5

Additional files provided with this submission:

Additional file 1: suppl1.pdf, 423K

<http://www.silencejournal.com/imedia/2543116586187674/supp1.pdf>

Additional file 2: suppl2.pdf, 2462K

<http://www.silencejournal.com/imedia/1546103053618767/supp2.pdf>

Additional file 3: suppl3.pdf, 1211K

<http://www.silencejournal.com/imedia/2447993361876747/supp3.pdf>

Additional file 4: suppl4.pdf, 4804K

<http://www.silencejournal.com/imedia/4001149361876848/supp4.pdf>

Additional file 5: suppl5.pdf, 1151K

<http://www.silencejournal.com/imedia/1152748728618767/supp5.pdf>

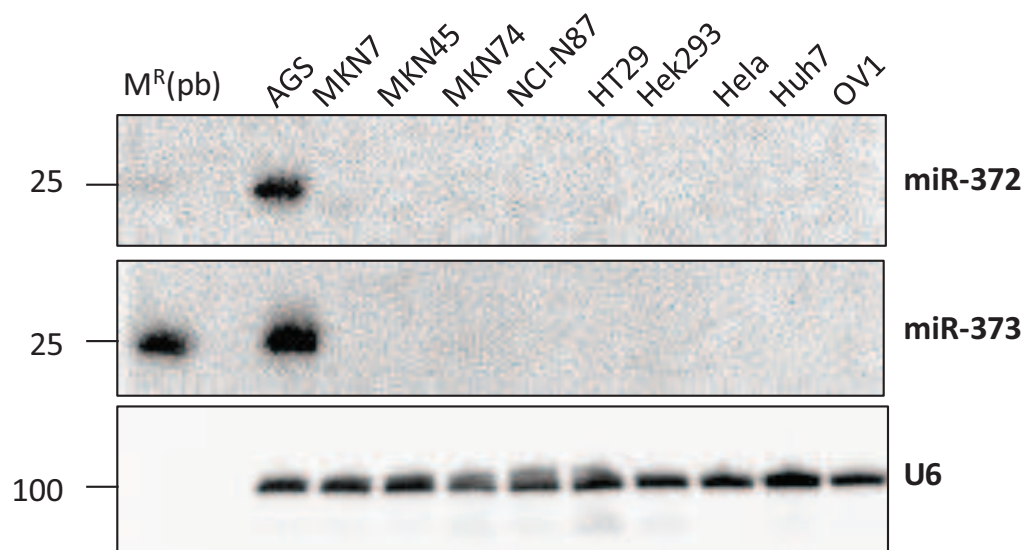
Additional file 6: suppl6.pdf, 4319K

<http://www.silencejournal.com/imedia/1770657346618767/supp6.pdf>

Additional file 7: suppl7.pdf, 2759K

<http://www.silencejournal.com/imedia/2090798910618768/supp7.pdf>

Annexe 2 : Analyse par *Northern blot* de l'expression des miR-372/373 dans différentes lignées cellulaires.



Annexe 3: “Rnd3/RhoE is down-regulated in hepatocellular carcinoma and controls cellular invasion”, Grise F., Sena S., Bidaud-Meynard A., Baud J. *et al*, 2011, Hepathology, en revision.



**Rnd3/RhoE is down-regulated in hepatocellular carcinoma
and controls cellular invasion**

Journal:	<i>Hepatology</i>
Manuscript ID:	Draft
Wiley - Manuscript type:	Original
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Grise, Florence; INSERM, U1053 Sena, Sandra; INSERM, U1053 Bidaud-Meynard, Aurélien; INSERM, U1053 Baud, Jessica; INSERM, U869 Hiriart, Jean-Baptiste; INSERM, U1053 Makki, Kassem; INSERM, U1053 Dugot-Senant, Nathalie; INSERM, U1053 Staedel, Cathy; INSERM, U869 Bioulac-Sage, Paulette; CHU Bordeaux, Service d'Anatomie Pathologique Hôpital Pellegrin; Université Bordeaux 2, Inserm U889 Zucman-Rossi, Jessica; INSERM, U674 Rosenbaum, Jean; Université Bordeaux 2, INSERM U889 Moreau, Violaine; INSERM, U1053
Keywords:	GTPases, liver cancer, epithelial-mesenchymal transition, E-cadherin, cell-cell adhesion

SCHOLARONE™
Manuscripts

TITLE PAGE

Rnd3/RhoE is down-regulated in hepatocellular carcinoma and controls cellular invasion

Florence Grise^{1,2,#}, Sandra Sena^{1,2,#}, Aurélien Bidaud-Meynard^{1,2}, Jessica Baud^{2,3}, Jean-Baptiste Hiriart^{1,2}, Kassem Makki^{1,2,7}, Nathalie Dugot-Senant⁴, Cathy Staedel^{2,3}, Paulette Bioulac-Sage^{1,2,5}, Jessica Zucman-Rossi⁶, Jean Rosenbaum^{1,2,5} and Violaine Moreau^{1,2}

¹ INSERM, U1053, F-33076 Bordeaux, France; ² Université Bordeaux Segalen, F-33076 Bordeaux, France; ³ INSERM, U869, F-33076 Bordeaux, France ; ⁴ IFR66, Université Bordeaux Segalen, Bordeaux, France, ⁵ Centre Hospitalier Universitaire, Groupement des Spécialités Digestives, Bordeaux, France; ⁶ INSERM, U674, Paris, France; Université Paris Descartes, Paris, France.

⁷ Current address: CNRS UMR8199, Université Lille 2, Lille, France.

Equal contribution

Florence Grise (griseflo@yahoo.fr); Sandra Sena (senasandra@hotmail.com); Aurélien Bidaud-Meynard (pabidaud@etud.u-bordeaux2.fr); Jessica Baud (jessica.baud@inserm.fr); Jean-Baptiste Hiriart (hisaishi@hotmail.fr); Kassem Makki (kassem.makki@good.ibl.fr); Nathalie Dugot-Senant (nathalie.senant@inserm.fr); Cathy Staedel (cathy.staedel@inserm.fr); Paulette Bioulac-Sage (paulette.bioulac-sage@chu-bordeaux.fr); Jessica Zucman-Rossi (jessica@inserm-u674.net); Jean Rosenbaum (jean.rosenbaum@inserm.fr); Violaine Moreau (violaine.moreau@inserm.fr)

Keywords: GTPase, liver cancer, epithelial-mesenchymal transition, E-cadherin

FOOTNOTE PAGE

Corresponding author: Violaine Moreau, INSERM U1053, Université Bordeaux Segalen, 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux, France : Tel : +33 5 5757 1272 ; e-mail : violaine.moreau@inserm.fr

Abbreviations: HCC, Hepatocellular carcinoma; EMT, Epithelial-mesenchymal transition; ECM, extracellular matrix; MMP, matrix metalloproteinases.

Financial Support: This work was supported by grants from La Ligue contre le Cancer (comité de la Dordogne), Association pour la Recherche sur le Cancer (grant 5077), Association Française pour l'Etude du Foie and SCHERING-PLOUGH laboratory (V. Moreau); La Ligue Nationale contre le Cancer "Equipe labellisée" (J. Rosenbaum); INCa-ARC-ANRS (PAIR-CHC "No-FLiC") and BioIntelligence (OSEO) (J. Zucman-Rossi). S. Sena was supported by a postdoctoral fellowship from the Fondation pour la Recherche Médicale.

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

ABSTRACT

We performed a review of public microarray data that revealed a significant down-regulation of Rnd3 expression in hepatocellular carcinoma as compared to non-tumor liver. Rnd3/RhoE is an atypical RhoGTPase family member, as it is always under its active GTP-bound conformation and not sensitive to classical regulators. Rnd3 down-regulation was validated by quantitative real time PCR in a hundred independent tumors. Moreover, Rnd3 down-expression was confirmed using immunohistochemistry on tumor sections and Western blot on human tumor and cell line extracts. Rnd3 expression was significantly lower in invasive tumors with satellite nodules. Overexpression and silencing of Rnd3 in Hep3B cells led to decreased and increased 3D cell motility, respectively. The siRNA-mediated down-regulation of Rnd3 expression induced loss of E-cadherin at cell-cell junctions that was linked to epithelial-mesenchymal transition through the up-regulation of the zinc finger E-box binding homeobox protein ZEB2 and the down-regulation of miR-200b and miR-200c. Rnd3 knockdown mediated tumor hepatocyte invasion in a matrix metalloproteinase-independent, and Rac1- and Cdc42-dependent manner. *Conclusion:* Rnd3 down-regulation provides an invasive advantage to tumor hepatocytes suggesting that *RND3* might represent a metastasis suppressor gene in hepatocellular carcinoma.

Hepatocellular carcinoma (HCC) is the main primary malignancy of the liver worldwide (1). Its overall poor prognosis is due to high rates of postoperative recurrence and metastasis incidence. Intrahepatic metastases, especially venous metastases, are hallmark features of HCC progression. The escape of carcinoma cells from the tumor may be influenced by a permissive liver microenvironment and a gain of invasive abilities of tumor cells. Many data suggest that the latter involves dedifferentiation of epithelial cells which occurs by loss of cell polarity and cell-cell contacts and the concomitant acquisition of migratory and invasive features, referred to as the epithelial–mesenchymal transition (EMT) (2). Although recent evidences suggest that hepatocellular EMT plays a pivotal role in the dissemination of malignant hepatocytes during HCC progression, the underlying molecular mechanisms remain to be characterized (3, 4).

Rho GTPases, including RhoA, Rac1 and Cdc42 are the main regulators of the actin cytoskeleton, and therefore general modulators of cellular processes important for tumor biology. Moreover, deregulated Rho GTPase signaling was reported to play an important role in the initiation and the progression of HCC (5, 6). Rnd3/RhoE is an atypical member of the Rho GTPase family, as it is devoid of GTPase activity. The best-characterized function of Rnd3 is the inhibition of RhoA activity and the subsequent down-regulation of ROCK–mediated actomyosin contractility (7, 8). Through its role as a negative regulator of the Rho/ROCK pathway, Rnd3 was involved in tumor cell migration and invasion (9-11) and myoblast fusion (12). More recently, Rnd3 was shown to inhibit cell cycle progression, apparently independently of cytoskeleton remodeling (8). Thus, Rnd3 has been implicated in different steps of cancer development such as regulation of cell proliferation and apoptosis (13-15), cell transformation (13) or cell migration and invasion.

Our re-analysis of five transcriptomic studies revealed an alteration of Rnd3 mRNA expression in HCC compared to non-tumor liver tissues (5), with four out of five showing a down-expression (16-19), and a single one, based on only four cases, an over-expression

(20). Here, we confirm that Rnd3 is down-regulated in most human HCC and HCC-related cell lines and we provide evidence that Rnd3 down-regulation increases HCC invasion and thus may favor HCC progression.

MATERIALS AND METHODS

Liver Samples. Samples came from resected or explanted livers with HCC of patients treated in Bordeaux from 1992-2005. Fragments of fresh tumor and non-tumor liver tissues (taken at a distance of at least 2 cm from the tumor) were immediately snap-frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. RNA or proteins were extracted as described (21). HCCs used as the Affymetrix hybridization set (57 HCCs) and the qRT-PCR validation set (63 HCCs) were described (21). The characteristics of HCCs used for the immunoblot analysis (27 HCCs) are indicated in supplementary Table 1.

siRNA and miRNA transfection. siRNAs (10 nM) or miRNAs (25 nM) were introduced into cells using Lipofectamine™ RNAiMAX (Invitrogen) according to the manufacturer’s protocol. Experiments were performed 72 hours after transfection.

Small hairpin lentiviral vector construction and establishment of stable cell lines.

To induce a stable suppression of endogenous Rnd3 expression, we generated a Hep3B cell line with conditional, doxycycline-dependent, expression of Rnd3 shRNA. The Rnd3 shRNA was constructed using the following oligonucleotides 5'-AGCTTCCTAGTAGAGCTCTCCAATCACATTCAAGAGATGTGATTGGAGAGCTCTACTATTTTTGGAAG-3' (sense) and 5'TCGACTTCCAAAAATAGTAGAGCTCTCCAATCACATCTCTTGAATGTGATTGGAGAGCTCTA

CTAGGA-3' (anti-sense). Bold letters correspond to oligonucleotides 593-613 of the human Rnd3 cDNA sequence. Hep3B cells conditionally expressing the control ShRNA targeting the firefly luciferase (shGL2) or the Rnd3 shRNA were obtained using the method described previously (22), except that lentiviral particles were transduced at a multiplicity of infection of 5.

Construction of a cell line overexpressing Rnd3. A myc-tagged Rnd3 cDNA was placed under the control of the MND promoter in a lentiviral vector, and VSV-G pseudotyped lentiviral particles were produced as previously described (23). Finally, Hep3B cells were transduced with lentiviral particles at a multiplicity of infection of 5.

Matrigel invasion assays. BioCoat Matrigel invasion chambers (Becton Dickinson) were used according to the manufacturer's protocol. Briefly, cells were trypsinized, washed, resuspended in serum-free medium (DMEM Glutamax) supplemented with 0.1% BSA and 5×10^4 cells were placed in the top portion of the invasion chamber. The lower portion of the chamber contained 5% FBS as a chemo-attractant. After 20 hours, cells that migrated to the bottom chamber were fixed in 3% PFA, stained with phalloidin-Alexa546 and Hoechst, photographed, and counted. For assays in which cells were exposed to drugs, both the top and bottom chambers contained either 10 μ M GM6001 or 5 μ M EHT1864 or EHT4063 throughout the assay. To analyze morphology of invading cells, cells were plated on top of a thick layer of Matrigel (BD Biosciences) added to the upper chamber of a Transwell plate, as described previously (24).

Statistical Analysis. Statistical analysis was performed with GraphPad Prism software. Differences between means were assessed with the Mann-Whitney or Student's *t* test. When comparing multiple means, we used an analysis of variance (ANOVA). Correlations between

the mRNA level of expression and qualitative variables were calculated with the nonparametric Kruskal-Wallis test. The Pearson test was used to compare quantitative values of expression. *P* values less than 0.05 were considered significant.

Materials and Methods. See the Supporting Materials and Methods for details regarding antibodies and reagents, siRNA and miRNA sequences, and cell culture, immunohistochemistry, immunofluorescence and RT-PCR procedures.

RESULTS

Rnd3 is down-regulated in HCC and HCC cell lines

To investigate the expression levels of Rnd3 in HCC, we reanalyzed the Affymetrix GeneChip™ arrays of our own series of 57 HCCs and 5 samples of pooled non-tumor tissues (21). A highly significant down-regulation of Rnd3 mRNA was observed when HCCs were compared to non-tumor tissues (Fig. S1A). Quantitative RT-PCR results on the same sample set correlated very well with the array data (Fig. S1B; Pearson $r=0.7915$; $P<0.0001$). These data, in addition to qRT-PCR analysis on a second independent set of 63 tumors, demonstrated that Rnd3 mRNA expression was significantly lower in HCC than in cirrhotic livers, benign hepatocellular adenomas and non-tumor livers (Fig. 1A-B). The mean level of Rnd3 mRNA expression in malignant specimens was about 2-fold lower than that in benign tissue. Rnd3 expression level was not correlated to HCC etiology, i.e. virus- or alcohol-related HCC (Fig. S1C-E). However, Rnd3 mRNA expression was significantly lower in tumors with satellite nodules, indicative of local invasion of HCC ($P=0.03$, Fig. 1C).

The expression of Rnd3 protein was analyzed by Western blot on a subset of 27 HCC samples (Fig. 2A and S1F). 23/27 cases HCCs (85%) showed a decreased Rnd3 expression

when compared to the peri-tumor tissue. The mean tumor/non-tumor ratio was 0.68 ± 0.08 ($P=0.0005$). Using immunohistochemistry, Rnd3 expression in the peri-tumor tissue varied from faint to intense and was predominantly localized to the cytoplasm of hepatocytes (Fig. 2B). In contrast, low or no expression was observed in tumor samples (Fig. 2B). Rnd3 protein expression was also determined in normal primary human hepatocytes, and in the tumor cell lines Huh6, Huh7, SNU398, SNU475, Hep3B and HepG2. Results showed that Rnd3 expression was reduced in all tumor cell lines tested as compared to primary hepatocytes (Fig. 2C).

Rnd3 regulates invasion of HCC cells

Since Rnd3 expression showed a strong correlation with the presence of satellite nodules in HCC, we analyzed the impact of changes in Rnd3 expression level on cell invasion in the Hep3B HCC cell line. Lentiviral transduction led to a 6-fold overexpression of Rnd3, which was associated with a 4.5-fold reduction in cell ability to invade Matrigel (Fig. 3A). On the other hand, transient Rnd3 knockdown using two different siRNAs led to decreased expression of Rnd3 protein by 95% (S1) or 75% (S3) (Fig. 3B), and resulted in a significant increase in invasion (Fig. 3B). The increase was more drastic with S1 than S3 in agreement with their silencing efficacy. Thus, our results demonstrate that Rnd3 expression levels regulate HCC cell invasion properties.

Rnd3 depletion induces down-regulation of E-cadherin

Because loss of the cell junction protein E-cadherin is associated with HCC cell invasiveness (25, 26), we evaluated E-cadherin expression in Rnd3-depleted cells. Rnd3 silencing in Hep3B (Fig. 4A, B) and Huh7 (Fig. S2A) cells using both siRNAs led to a significant decrease in E-cadherin mRNA expression whereas a significant down-regulation of E-cadherin protein was only observed with S1. Immunofluorescence analyses confirmed that E-cadherin

expression was strongly reduced at cell-cell contacts in Rnd3 silenced cells (Fig. S2B). These results suggest that Rnd3 depletion affected the integrity of adherens junctions. We then sought to analyze E-cadherin protein levels in the 27 HCCs previously used for measuring Rnd3 expression. E-cadherin expression was down-regulated in 16/27 HCCs as compared to peri-tumor tissue (Fig. S3). Interestingly, Rnd3 expression was significantly correlated with E-cadherin expression in patient samples (Fig. 4C; Pearson $r=0.6190$; $P=0.0006$).

Rnd3 knockdown leads to a partial EMT

As loss of E-cadherin expression and increased invasiveness are hallmarks of EMT, we further analyzed the expression of mesenchymal markers such as vimentin and the transcription factors Snail1, Slug, zinc finger E-box binding homeobox 1 (ZEB1) and Smad-interacting protein 1 (SIP1)/ZEB2, described as transcriptional repressors of E-cadherin (27). Quantitative RT-PCR analysis revealed that Rnd3 silencing induced the mRNA expression of ZEB2, but not of ZEB1 or other EMT markers (Fig. 5A and S4). As ZEB1/2 expression is under the control of the miR-200 family that targets their 3' untranslated regions (28), we monitored miR-200b and miR-200c expression in Rnd3-silenced Hep3B cells. The expression of both miRNAs was significantly decreased upon Rnd3 silencing (Fig. 5B). Moreover, forced overexpression of miR-200b or/and miR-200c in hepatoma cells down-regulated ZEB1 and ZEB2 expression leading to E-cadherin upregulation and increased cell-cell contacts (Fig. S5). Thus, Rnd3 knockdown induced a decrease in expression of the guardians of the epithelial phenotype miR-200 and an increase in that of the EMT promoter ZEB2, leading to E-cadherin repression.

Rnd3 depletion favors HCC cell invasion through an amoeboid (filopodal)-like mechanism

In a three-dimensional environment, individual cancer cells use a broad spectrum of

1
2
3 migration and invasion mechanisms, which are dictated by the extracellular matrix (ECM)
4
5 together with specific cell determinants. These include amoeboid and mesenchymal modes
6
7 of movement, which are distinguished by their different usage of Rho GTPase signaling
8
9 pathways and distinct requirements for extracellular proteolysis (29). Amoeboid cells show
10
11 high levels of actomyosin contractility involving signaling through RhoA/ROCK, and their
12
13 movement is associated with deformation of the cell body through the ECM without
14
15 proteolysis. In the mesenchymal-type movement, cells have an elongated morphology with
16
17 Rac/Cdc42-induced protrusions at the leading edge, and this movement requires ECM
18
19 proteolysis. We first attempted to discriminate between the two modes of invasion through
20
21 the inhibition of matrix metalloproteinases (MMP), whose activity is only required for the
22
23 mesenchymal movement. The broad-spectrum MMP inhibitor, GM6001 did not decrease the
24
25 invasion induced by Rnd3 depletion, suggesting that Rnd3-silenced cells invade the ECM
26
27 without degrading it (Fig. 6A). Second, we analyzed the morphology of cells invading a thick
28
29 Matrigel matrix (24). Although both control and Rnd3-silenced cells showed a rounded
30
31 morphology, Rnd3-silenced cells were observed as isolated cells in the matrix and developed
32
33 actin-based protrusions such as filopodia (Fig. 6B-C). Finally, to analyze the involvement of
34
35 RhoGTPases in invasion induced by Rnd3 loss, Hep3B cells were transfected with GTPase-
36
37 specific siRNAs in addition to Rnd3 siRNA, and invasion assays were performed in Matrigel-
38
39 coated transwells. The invasion of Rnd3-silenced cells was strongly inhibited by Rac1 or
40
41 Cdc42, but not by RhoA knockdown (Fig. 6D). Rac1 requirement was also demonstrated
42
43 using the pharmacological Rac1 inhibitor EHT1864 (30) (Fig. 6E). Collectively, our data show
44
45 that Rnd3 knockdown induces HCC cell invasion via a Rac1/Cdc42-dependent and MMP-
46
47 independent mechanism, thus suggesting an amoeboid filopodal-like mechanism (31).
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

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

DISCUSSION

We report that Rnd3 is down-regulated in a majority of HCC cell lines and tissues. Previously, Rnd3 expression was also reported low in biopsies from prostate and gastric cancers (15, 32) and was suggested to act as a tumor suppressor in these cancers. However, Rnd3 expression is not systematically decreased in tumors, since it was found high in non-small cell lung (33, 34) and pancreatic cancers (35). Thus, despite its ubiquitous expression in normal tissues (36), Rnd3 regulation and biological impact may be significantly different in various tumors.

Rnd3 belongs to the Rnd sub-family of the Rho GTPase family. As Rnd proteins are not regulated by the typical GTP/GDP cycle, they are thought to be regulated primarily at their transcriptional level. Here, using qRT-PCR, immunoblot analysis and immunohistochemistry, we showed down-regulation of Rnd3 mRNA and protein in HCC. The mechanism for Rnd3 down-regulation is still unclear. Although Rnd3 was reported to be a direct transcriptional target of p53 (37), no correlation with p53 mutations could be established in our HCC samples (data not shown). Recently, it was reported that the microRNA miR-200b directly reduced the expression of Rnd3 in Hela cells (38). However, the relevance of this regulation in HCC remains to be evaluated (39). In addition, it was described that Rnd3 is regulated by histone deacetylation in gastric cancer cells (32) raising the hypothesis that it may also be regulated at the epigenetic level in hepatic tumors.

Rnd3 has been involved in diverse cellular functions including actin cytoskeleton remodeling and cell cycle progression (8). Because of the striking down-regulation of Rnd3 in HCC and of its biological functions, we hypothesized that the low expression of Rnd3 would give an advantage to liver tumor cells and contribute to the development of HCC. Indeed, over-expression and silencing of Rnd3 decreased and increased, respectively, 3D cell motility. This is consistent with findings in normal (9) and transformed fibroblasts (40) showing a reduced

1
2
3 invasion following over-expression of Rnd3. These results are however in sharp contrast with
4
5 the reported implication of Rnd3 in the acquisition of an invasive phenotype of melanoma
6
7 cells. Indeed, Rnd3 is over-expressed in melanoma cell lines and its down-regulation reduced
8
9 cell invasion ability (11). This could reflect the plasticity of cancer cells and the different
10
11 implication of Rnd3 in various tumors.
12
13

14 Characterization of invasion of HCC cells induced by Rnd3 knockdown revealed the absence
15
16 of matrix metalloproteinase activity requirement, suggesting an amoeboid-like movement.
17
18 However, we demonstrated that this movement occurs in a RhoA-independent manner. As
19
20 Rnd3 was mainly described as a RhoA pathway antagonist, this may represent a novel RhoA-
21
22 independent role of Rnd3. We further characterized cell invasion induced by Rnd3 silencing
23
24 as a Cdc42- and Rac1-dependent movement, with a round morphology and the presence of
25
26 actin-rich filopodia. Thus, according to the multiscale tuning model from Friedl and Wolf
27
28 (31), we assume that the loss of Rnd3 induced an amoeboid filopodal-like mode of
29
30 movement facilitated by the loss of strong adhesive cell-cell interactions, itself linked to the
31
32 repression of E-cadherin expression. Remarkably, Rnd3 down-regulation strongly correlated
33
34 with E-cadherin down-expression in HCC samples, and low levels of Rnd3 also correlated
35
36 with the presence of satellite nodules, suggesting that our observation may be relevant for
37
38 HCC progression. Although no publication has reported an effect of Rnd3 on E-cadherin
39
40 expression yet, our data agree with others showing a role of Rnd3 on the expression of M-
41
42 cadherin (12), and more generally on the assembly of adherens and tight junctions (41).
43
44 Consistent with this, depletion of Rnd3 in A431 squamous cell carcinoma cells led to loss of
45
46 cell-cell cohesion and defective collective cell invasion (42). We found that the repression of
47
48 E-cadherin occurs at the mRNA level through the up-regulation of the EMT transcription
49
50 repressor ZEB2. We demonstrate for the first time that Rnd3 regulates the miR-200/ZEB/E-
51
52 cadherin pathway. ZEB1 and ZEB2 are master regulators of the mesenchymal phenotype
53
54 that repress the transcription of genes containing E-box elements in their promoters,
55
56
57
58
59
60

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

including E-cadherin (43). The miR-200 family has been shown to target ZEB1 and ZEB2 through their 3' untranslated regions. In addition, ZEB1 and ZEB2 directly repress miR-200 miRNA expression, demonstrating a double-negative feedback loop between ZEB1/ZEB2 and the miR-200 family during EMT and tumorigenesis (28). Here, we demonstrated that Rnd3 knockdown induces a decrease of miR-200b and miR-200c and an increase of ZEB2 expression resulting in decreased E-cadherin expression and the acquisition of mesenchymal features (Fig. 7). These results are also in agreement with the previously reported role of ZEB2 in HCC cell invasion (44). The mechanisms by which Rnd3 silencing alters the miR-200/ZEB balance remain to be characterized (Fig. 7). In addition, Rnd3 silencing induced only a partial EMT since we did not find an up-regulation of vimentin and MMP members, shown to be under the control of Snail and ZEB2 in liver tumor cells (44). As E-cadherin loss and the dissolution of the E-cadherin-mediated adherens junction represent key preliminary steps in EMT, Rnd3 may participate in the establishment of an invasive phenotype of liver tumor cells. In conclusion, our results suggest that *RND3* is a potential metastasis suppressor gene in HCC. The targeting of its regulatory pathway with specific inhibitors may consequently offer a new therapeutic avenue in the management of cancer progression.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr. C. Perret (Cochin Institute, Paris) for Huh6 cell line, Dr. L. Désiré (Exonhit Therapeutics, Paris) for EHT1864 and EHT4063 components and C. Gauthier-Rouvière for discussions. We also acknowledge V. Guyonnet-Duperat and V. Pitard from the vectorology and flow cytometry core facilities, respectively (SFR TransBioMed, Bordeaux). We thank S. Lorient for her help with immunohistochemistry analyses. We are grateful to Drs. E. Chevet and F. Saltel (INSERM U1053, Bordeaux) for critical reading of the manuscript.

REFERENCES

1. Yang JD, Roberts LR. Hepatocellular carcinoma: A global view. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2010;7:448-458.

2. Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 2009;139:871-890.

3. Ding W, You H, Dang H, LeBlanc F, Galicia V, Lu SC, Stiles B, et al. Epithelial-to-mesenchymal transition of murine liver tumor cells promotes invasion. *Hepatology* 2010;52:945-953.

4. Chen L, Chan TH, Yuan YF, Hu L, Huang J, Ma S, Wang J, et al. CHD1L promotes hepatocellular carcinoma progression and metastasis in mice and is associated with these processes in human patients. *J Clin Invest* 2010;120:1178-1191.

5. Grise F, Bidaud A, Moreau V. Rho GTPases in hepatocellular carcinoma. *Biochim Biophys Acta* 2009;1795:137-151.

6. Wong CC, Wong CM, Au SL, Ng IO. RhoGTPases and Rho-effectors in hepatocellular carcinoma metastasis: ROCK N'Rho move it. *Liver Int* 2010;30:642-656.

7. Riento K, Guasch RM, Garg R, Jin B, Ridley AJ. RhoE binds to ROCK I and inhibits downstream signaling. *Mol Cell Biol* 2003;23:4219-4229.

8. Riou P, Villalonga P, Ridley AJ. Rnd proteins: multifunctional regulators of the cytoskeleton and cell cycle progression. *Bioessays* 2010;32:986-992.

9. Gadea G, de Toledo M, Anguille C, Roux P. Loss of p53 promotes RhoA-ROCK-dependent cell migration and invasion in 3D matrices. *J Cell Biol* 2007;178:23-30.

10. Guasch RM, Scambler P, Jones GE, Ridley AJ. RhoE regulates actin cytoskeleton organization and cell migration. *Mol Cell Biol* 1998;18:4761-4771.

11. Klein RM, Aplin AE. Rnd3 regulation of the actin cytoskeleton promotes melanoma migration and invasive outgrowth in three dimensions. *Cancer Res* 2009;69:2224-2233.

12. Fortier M, Comunale F, Kucharczak J, Blangy A, Charrasse S, Gauthier-Rouviere C. RhoE controls myoblast alignment prior fusion through RhoA and ROCK. *Cell Death Differ* 2008;15:1221-1231.

13. Villalonga P, Guasch RM, Riento K, Ridley AJ. RhoE inhibits cell cycle progression and Ras-induced transformation. *Mol Cell Biol* 2004;24:7829-7840.

14. Poch E, Minambres R, Mocholi E, Ivorra C, Perez-Arago A, Guerri C, Perez-Roger I, et al. RhoE interferes with Rb inactivation and regulates the proliferation and survival of the U87 human glioblastoma cell line. *Exp Cell Res* 2007;313:719-731.

15. Bektic J, Pfeil K, Berger AP, Ramoner R, Pelzer A, Schafer G, Kofler K, et al. Small G-protein RhoE is underexpressed in prostate cancer and induces cell cycle arrest and apoptosis. *Prostate* 2005;64:332-340.

16. Chen X, Cheung ST, So S, Fan ST, Barry C, Higgins J, Lai KM, et al. Gene expression patterns in human liver cancers. *Mol Biol Cell* 2002;13:1929-1939.

17. Goldenberg D, Ayesh S, Schneider T, Pappo O, Jurim O, Eid A, Fellig Y, et al. Analysis of differentially expressed genes in hepatocellular carcinoma using cDNA arrays. *Mol Carcinog* 2002;33:113-124.

18. Hanafusa T, Yumoto Y, Nouse K, Nakatsukasa H, Onishi T, Fujikawa T, Taniyama M, et al. Reduced expression of insulin-like growth factor binding protein-3 and its promoter hypermethylation in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett* 2002;176:149-158.

19. Neo SY, Leow CK, Vega VB, Long PM, Islam AF, Lai PB, Liu ET, et al. Identification of discriminators of hepatoma by gene expression profiling using a minimal dataset approach. *Hepatology* 2004;39:944-953.

20. Xu XR, Huang J, Xu ZG, Qian BZ, Zhu ZD, Yan Q, Cai T, et al. Insight into hepatocellular carcinogenesis at transcriptome level by comparing gene expression profiles of hepatocellular carcinoma with those of corresponding noncancerous liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:15089-15094.

21. Boyault S, Rickman DS, de Reynies A, Balabaud C, Rebouissou S, Jeannot E, Herault A, et al. Transcriptome classification of HCC is related to gene alterations and to new therapeutic targets. *Hepatology* 2007;45:42-52.
22. Haurie V, Menard L, Nicou A, Touriol C, Metzler P, Fernandez J, Taras D, et al. Adenosine triphosphatase pontin is overexpressed in hepatocellular carcinoma and coregulated with reptin through a new posttranslational mechanism. *Hepatology* 2009;50:1871-1883.
23. Rousseau B, Menard L, Haurie V, Taras D, Blanc JF, Moreau-Gaudry F, Metzler P, et al. Overexpression and role of the ATPase and putative DNA helicase RuvB-like 2 in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2007;46:1108-1118.
24. Vinot S, Anguille C, de Toledo M, Gadea G, Roux P. Analysis of cell migration and its regulation by Rho GTPases and p53 in a three-dimensional environment. *Methods Enzymol* 2008;439:413-424.
25. Endo K, Ueda T, Ueyama J, Ohta T, Terada T. Immunoreactive E-cadherin, alpha-catenin, beta-catenin, and gamma-catenin proteins in hepatocellular carcinoma: relationships with tumor grade, clinicopathologic parameters, and patients' survival. *Hum Pathol* 2000;31:558-565.
26. Zhai B, Yan HX, Liu SQ, Chen L, Wu MC, Wang HY. Reduced expression of E-cadherin/catenin complex in hepatocellular carcinomas. *World J Gastroenterol* 2008;14:5665-5673.
27. Moreno-Bueno G, Peinado H, Molina P, Olmeda D, Cubillo E, Santos V, Palacios J, et al. The morphological and molecular features of the epithelial-to-mesenchymal transition. *Nat Protoc* 2009;4:1591-1613.
28. Brabletz S, Brabletz T. The ZEB/miR-200 feedback loop--a motor of cellular plasticity in development and cancer? *EMBO Rep* 2010;11:670-677.
29. Friedl P, Wolf K. Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat Rev Cancer* 2003;3:362-374.
30. Shutes A, Onesto C, Picard V, Leblond B, Schweighoffer F, Der CJ. Specificity and mechanism of action of EHT 1864, a novel small molecule inhibitor of Rac family small GTPases. *J Biol Chem* 2007;282:35666-35678.
31. Friedl P, Wolf K. Plasticity of cell migration: a multiscale tuning model. *J Cell Biol* 2010;188:11-19.
32. Chen J, Zhou H, Li Q, Qiu M, Li Z, Tang Q, Liu M, et al. Epigenetic modification of RhoE expression in gastric cancer cells. *Oncol Rep* 2011;25:173-180.
33. Zhang C, Zhou F, Li N, Shi S, Feng X, Chen Z, Hang J, et al. Overexpression of RhoE Has a Prognostic Value in Non-Small Cell Lung Cancer. *Ann Surg Oncol* 2007;14:2628-2635.
34. Cuiyan Z, Jie H, Fang Z, Kezhi Z, Junting W, Susheng S, Xiaoli F, et al. Overexpression of RhoE in Non-small Cell Lung Cancer (NSCLC) is associated with smoking and correlates with DNA copy number changes. *Cancer Biol Ther* 2007;6:335-342.
35. Gress TM, Muller-Pillasch F, Geng M, Zimmerhackl F, Zehetner G, Friess H, Buchler M, et al. A pancreatic cancer-specific expression profile. *Oncogene* 1996;13:1819-1830.
36. Foster R, Hu KQ, Lu Y, Nolan KM, Thissen J, Settleman J. Identification of a novel human Rho protein with unusual properties: GTPase deficiency and in vivo farnesylation. *Mol Cell Biol* 1996;16:2689-2699.
37. Ongusaha PP, Kim HG, Boswell SA, Ridley AJ, Der CJ, Dotto GP, Kim YB, et al. RhoE is a pro-survival p53 target gene that inhibits ROCK I-mediated apoptosis in response to genotoxic stress. *Curr Biol* 2006;16:2466-2472.
38. Xia W, Li J, Chen L, Huang B, Li S, Yang G, Ding H, et al. MicroRNA-200b regulates cyclin D1 expression and promotes S-phase entry by targeting RND3 in HeLa cells. *Mol Cell Biochem* 2010;344:261-266.
39. Law PT, Wong N. Emerging roles of microRNA in the intracellular signaling networks of hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 2011;26:437-449.
40. Belgiovine C, Frapolli R, Bonezzi K, Chiodi I, Favero F, Mello-Grand M, Dei Tos AP, et al. Reduced expression of the ROCK inhibitor Rnd3 is associated with increased invasiveness and metastatic potential in mesenchymal tumor cells. *PLoS One* 2010;5:e14154.

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

41. Rubenstein NM, Chan JF, Kim JY, Hansen SH, Firestone GL. Rnd3/RhoE induces tight junction formation in mammary epithelial tumor cells. *Exp Cell Res* 2005;305:74-82.

42. Hidalgo-Carcedo C, Hooper S, Chaudhry SI, Williamson P, Harrington K, Leitingner B, Sahai E. Collective cell migration requires suppression of actomyosin at cell-cell contacts mediated by DDR1 and the cell polarity regulators Par3 and Par6. *Nat Cell Biol* 2011;13:49-58.

43. Peinado H, Olmeda D, Cano A. Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat Rev Cancer* 2007;7:415-428.

44. Miyoshi A, Kitajima Y, Sumi K, Sato K, Hagiwara A, Koga Y, Miyazaki K. Snail and SIP1 increase cancer invasion by upregulating MMP family in hepatocellular carcinoma cells. *Br J Cancer* 2004;90:1265-1273.

For Peer Review

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Rnd3 mRNA is down-regulated in HCC. (A) Quantitative RT-PCR analysis of Rnd3 mRNA expression in non-tumor (NTL, n=28) and tumor (HCC, n=120) samples. (B-C) Correlations between Rnd3 mRNA levels and clinico-pathological features of HCC. (B) Rnd3 mRNA expression in normal (NL, n=6), cirrhotic (Cirr, n=9), hepatocellular carcinoma (HCC, n=120) and hepatocellular adenoma (HCA, n=42) tissues. (C) Rnd3 mRNA expression in HCC presenting (Yes, n=19) or not (No, n=32) satellite nodules. *P* values from the Mann Whitney test are indicated.

Figure 2: Rnd3 protein is down-regulated in HCC patient samples and cell lines.

(A) *Left panel*, representative results from Western blots of Rnd3 protein in HCC extracts. Four samples of matched HCCs (T) and non-tumor livers (NT). *Right panel*, quantitation on 27 matched human samples. *P* value from the paired Student's *t*-test is indicated. (B) Immunohistochemistry of Rnd3 in HCC versus cirrhotic tissue. Tissues were stained with anti-Rnd3 antibody. Control shows a serial section incubated with non immune immunoglobulin G. (C) Western blot analysis of Rnd3 expression in 7 tumor cell lines compared to primary human hepatocytes cultured in DMEM or Williams' media (HPM and HPW, respectively). Quantification of Rnd3 protein levels normalized using β -actin. Each bar represents the mean $\pm$ s.e. (*n* =3).

Figure 3: Rnd3 modulation alters cell invasion. (A) Rnd3 over-expression inhibits Hep3B invasion. Hep3B WT cells and Hep3B cells transduced with lentiviral particles expressing myc-tagged Rnd3 were lysed and analyzed by immunoblot using Rnd3 antibody. *Upper panel*, representative Western blot. Myc-tagged Rnd3 is indicated (arrow). *Middle panel*, quantification of Rnd3 protein levels normalized to GAPDH. *Lower panel*,

quantification of invasion using *in vitro* Matrigel assays. *** $P<0.001$. (B) Hep3B cells were transfected or not (NT) with siRNAs targeting Rnd3 (S1 or S3) or control siRNA (siCtrl). After 72 hours, protein extracts were analyzed by immunoblotting using Rnd3 and β -actin antibodies (*Upper panel*). *Middle panel*, quantification of Rnd3 protein levels normalized to β -actin. *** $P<0.001$ versus siCtrl. Lower panel, after 48 hours, cells were seeded in a Matrigel-coated chamber and invasion was assessed. * $P=0.0221$ and ** $P=0.0057$ when compared with siCtrl. Each graph shows the quantification of three independent experiments.

Figure 4: Rnd3 knockdown induces E-cadherin down-regulation. (A) Hep3B cells were transfected with siRNAs targeting (S1 or S3) or not (siCtrl) Rnd3. After 72 hours, E-cadherin and Rnd3 mRNA expressions were analyzed by qRT-PCR. Each bar represents the mean $\pm$ s.e. of three independent experiments. * $P<0.05$; *** $P<0.001$ by ANOVA when compared with siCtrl condition. (B) Cells were transfected as described in (A). Protein extracts were analyzed by immunoblotting using E-cadherin, Rnd3 and GAPDH antibodies. Quantification of E-cadherin protein levels normalized using GAPDH is represented in the bar graph. Each bar represents the mean $\pm$ s.e (n=3). *** $P=0.0012$ by ANOVA when compared with siCtrl. (C) Rnd3 and E-cadherin protein levels in matched HCC (T) and non-tumor (NT) livers were assessed using immunoblotting. The correlation of the levels in 27 matched human samples is shown. Statistical analysis was performed with the Pearson test.

Figure 5: Silencing of Rnd3 affects the ZEB1/2-miR200 pathway. Hep3B-KRAB-shRnd3 and Hep3B-KRAB-shGL2 cells were treated (+Dox) or not with doxycycline (30 ng/ml) for 5 days to silence or not Rnd3 (Fig. S4A-B). ZEB1 and ZEB2 mRNA (A) and miR-200b and miR-200c (B) expressions were analyzed by qRT-PCR. Each bar represents the mean $\pm$ s.e. of four independent experiments. *** $P=0.0004$; ** $P=0.0023$, * $P=0.0299$ by ANOVA when compared with control.

Figure 6: Rnd3 depletion favors HCC cell invasion through an amoeboid (filopodal)-like mechanism. (A) Invasion induced by Rnd3 loss is MMP-independent. Hep3B cells transfected with Rnd3 siRNA were assayed in a Matrigel-coated chamber to monitor invasion in the presence of GM6001. The graph shows the quantification of cell invasion of 3 independent experiments. (B) Rnd3-KD cells develop filopodia-like protrusions (arrows) during invasion into Matrigel. Hep3B cells transfected with siRNA S1, with or without rescue-Rnd3 cDNA, were embedded in thick Matrigel matrix and stained for actin. Bar, 50 μm (top panel) and 25 μm (bottom panel). (C) Optical sections (0.33 μm) were taken from the top to the bottom of the cell by confocal microscopy and the Z-projection of confocal sections shows filopodial-like protrusions over the cell (arrows). Bar, 10 μm . (D) Rnd3 depletion-induced cell invasion occurs in a Rac1- and Cdc42-dependent manner. Hep3B cells, either transfected or co-transfected 72h with indicated siRNAs, were assayed for protein knockdown using immunoblotting and for invasion in a Matrigel-coated chamber. siRNA designed against RhoA, Rac1, Cdc42 or Rnd3 downregulated their respective target protein. GAPDH was used as loading control. The graph shows the quantification of cell invasion of four independent experiments. $P < 0.005$ by ANOVA. (E) Hep3B cells transfected with siRNAs targeting or not Rnd3 were assessed in invasion assays in the presence of Rac1 inhibitor (EHT1864) or control compound (EHT4063). $*P = 0.031$ in Student's t-test.

Figure 7: Schematic representation of Rnd3 involvement in HCC towards cell invasion. Rnd3 down-regulation may participate in the establishment of EMT through the miR-200/ZEB/E-Cadherin pathway and the induction of cell invasiveness.

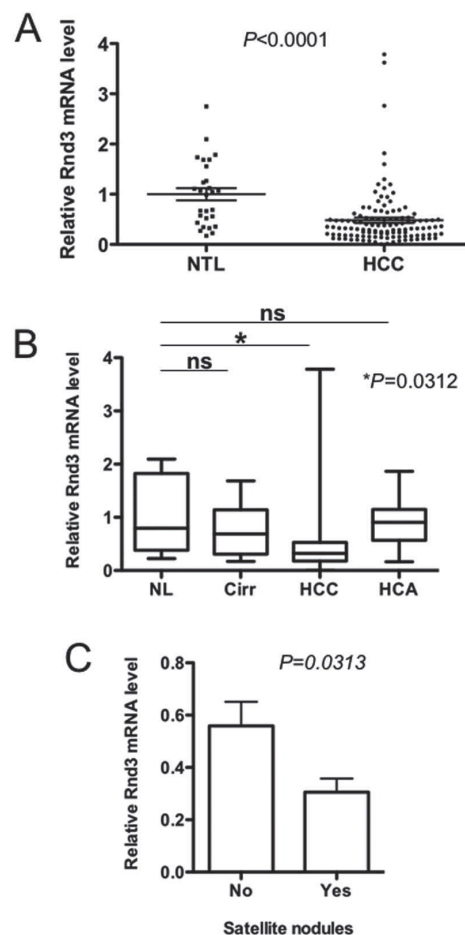


Figure 1
Grise, Sena et al.

Figure 1: Rnd3 mRNA is down-regulated in HCC. (A) Quantitative RT-PCR analysis of Rnd3 mRNA expression in non-tumor (NTL, n=28) and tumor (HCC, n=120) samples. (B-C) Correlations between Rnd3 mRNA levels and clinico-pathological features of HCC. (B) Rnd3 mRNA expression in normal (NL, n=6), cirrhotic (Cirr, n=9), hepatocellular carcinoma (HCC, n=120) and hepatocellular adenoma (HCA, n=42) tissues. (C) Rnd3 mRNA expression in HCC presenting (Yes, n=19) or not (No, n=32) satellite nodules. P values from the Mann Whitney test are indicated.

264x352mm (300 x 300 DPI)

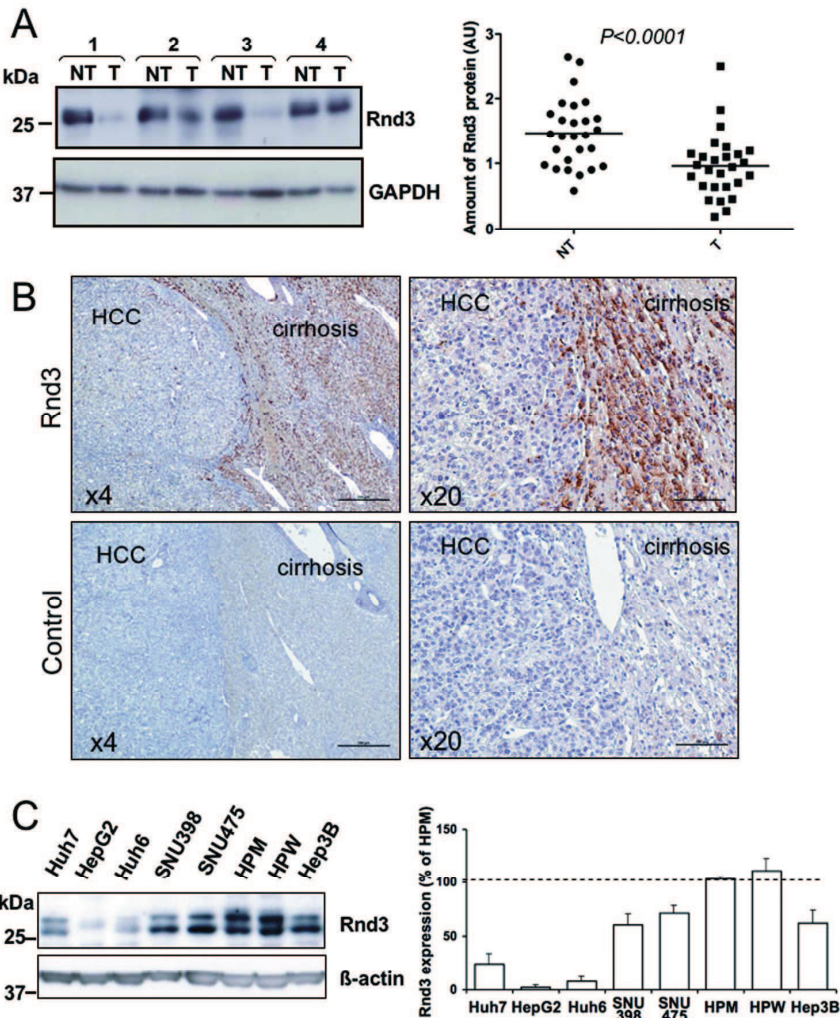


Figure 2
Grise, Sena et al.

Figure 2: Rnd3 protein is down-regulated in HCC patient samples and cell lines. (A) Left panel, representative results from Western blots of Rnd3 protein in HCC extracts. Four samples of matched HCCs (T) and non-tumor livers (NT). Right panel, quantitation on 27 matched human samples. P value from the paired Student's t-test is indicated. (B) Immunohistochemistry of Rnd3 in HCC versus cirrhotic tissue. Tissues were stained with anti-Rnd3 antibody. Control shows a serial section incubated with non immune immunoglobulin G. (C) Western blot analysis of Rnd3 expression in 7 tumor cell lines compared to primary human hepatocytes cultured in DMEM or Williams' media (HPM and HPW, respectively). Quantification of Rnd3 protein levels normalized using β -actin. Each bar represents the mean $\pm$ s.e. (n =3).

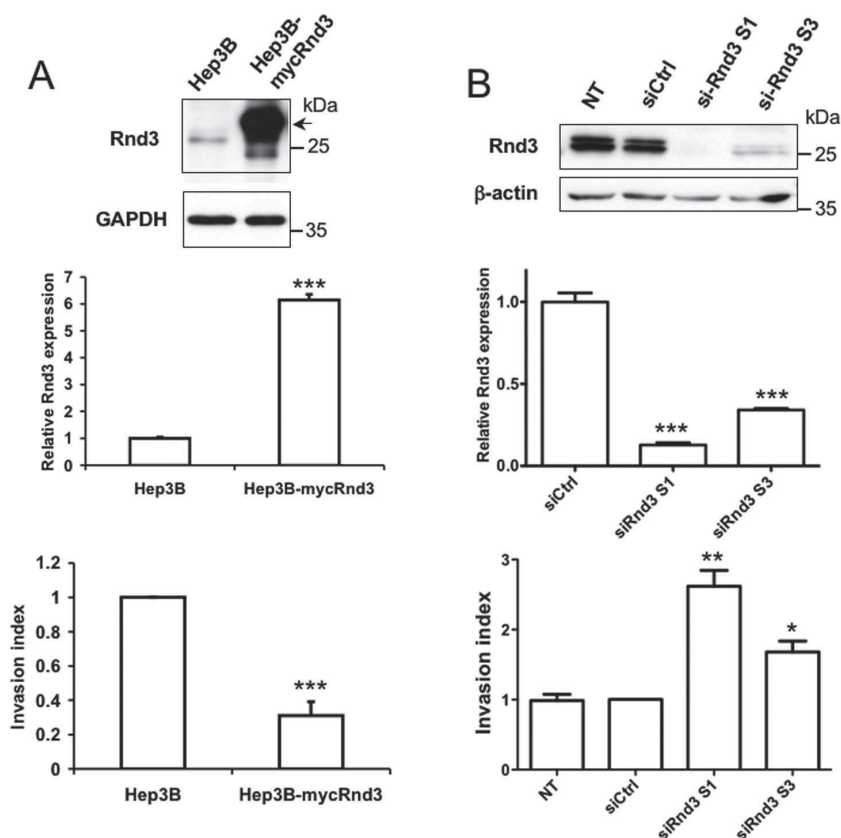


Figure 3
Grise, Sena et al.

Figure 3: Rnd3 modulation alters cell invasion. (A) Rnd3 over-expression inhibits Hep3B invasion. Hep3B WT cells and Hep3B cells transduced with lentiviral particles expressing myc-tagged Rnd3 were lysed and analyzed by immunoblot using Rnd3 antibody. Upper panel, representative Western blot. Myc-tagged Rnd3 is indicated (arrow). Middle panel, quantification of Rnd3 protein levels normalized to GAPDH. Lower panel, quantification of invasion using in vitro Matrigel assays. *** $P < 0.001$. (B) Hep3B cells were transfected or not (NT) with siRNAs targeting Rnd3 (S1 or S3) or control siRNA (siCtrl). After 72 hours, protein extracts were analyzed by immunoblotting using Rnd3 and β -actin antibodies (Upper panel). Middle panel, quantification of Rnd3 protein levels normalized to β -actin. *** $P < 0.001$ versus siCtrl. Lower panel, after 48 hours, cells were seeded in a Matrigel-coated chamber and invasion was assessed. * $P = 0.0221$ and ** $P = 0.0057$ when compared with siCtrl. Each graph shows the quantification of three independent experiments.

264x352mm (300 x 300 DPI)

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

For Peer Review

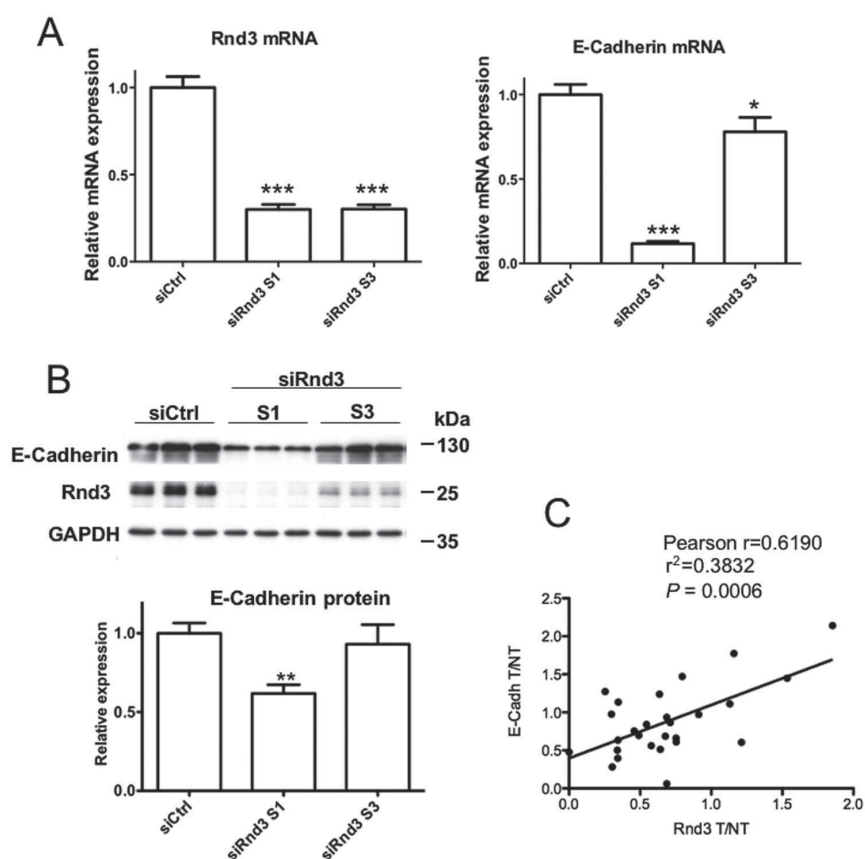


Figure 4
Grise, Sena et al.

Figure 4: Rnd3 knockdown induces E-cadherin down-regulation. (A) Hep3B cells were transfected with siRNAs targeting (S1 or S3) or not (siCtrl) Rnd3. After 72 hours, E-cadherin and Rnd3 mRNA expressions were analyzed by qRT-PCR. Each bar represents the mean $\pm$ s.e. of three independent experiments. * $P<0.05$; *** $P<0.001$ by ANOVA when compared with siCtrl condition. (B) Cells were transfected as described in (A). Protein extracts were analyzed by immunoblotting using E-cadherin, Rnd3 and GAPDH antibodies. Quantification of E-cadherin protein levels normalized using GAPDH is represented in the bar graph. Each bar represents the mean $\pm$ s.e (n=3). *** $P=0.0012$ by ANOVA when compared with siCtrl. (C) Rnd3 and E-cadherin protein levels in matched HCC (T) and non-tumor (NT) livers were assessed using immunoblotting. The correlation of the levels in 27 matched human samples is shown. Statistical analysis was performed with the Pearson test.

264x352mm (300 x 300 DPI)

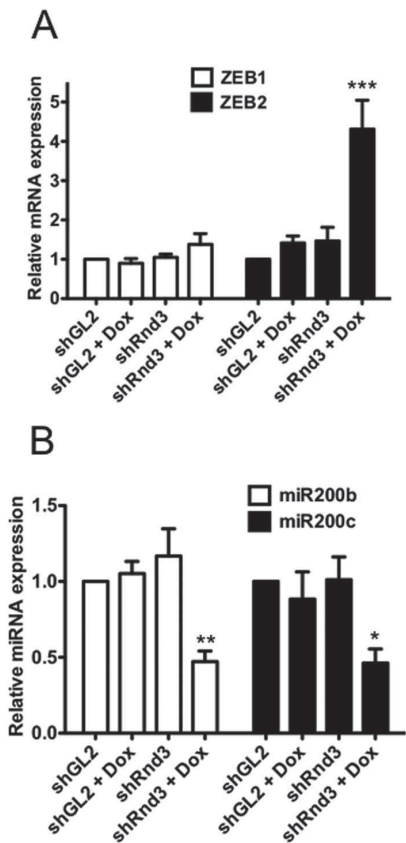


Figure 5
Grise, Sena et al.

Figure 5: Silencing of Rnd3 affects the ZEB1/2-miR200 pathway. Hep3B-KRAB-shRnd3 and Hep3B-KRAB-shGL2 cells were treated (+Dox) or not with doxycycline (30 ng/ml) for 5 days to silence or not Rnd3 (Fig. S4A-B). ZEB1 and ZEB2 mRNA (A) and miR-200b and miR-200c (B) expressions were analyzed by qRT-PCR. Each bar represents the mean±s.e. of four independent experiments. ***P=0.0004; **P=0.0023, *P=0.0299 by ANOVA when compared with control.

264x352mm (300 x 300 DPI)

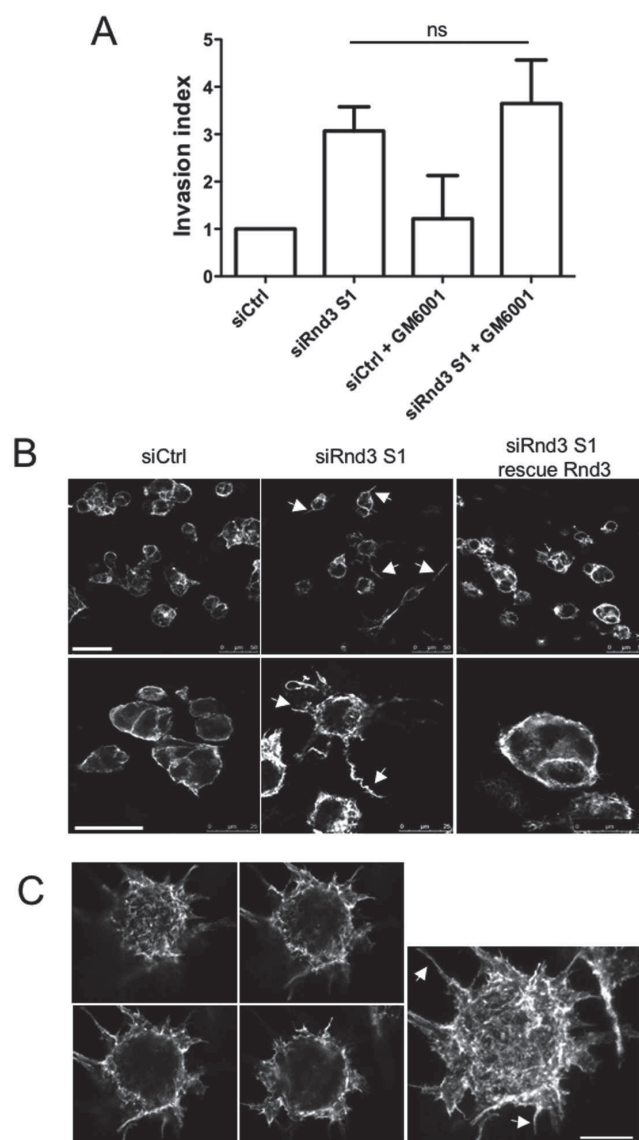


Figure 6
Grise, Sena et al.

Figure 6: Rnd3 depletion favors HCC cell invasion through an amoeboid (filopodal)-like mechanism. (A) Invasion induced by Rnd3 loss is MMP-independent. Hep3B cells transfected with Rnd3 siRNA were assayed in a Matrigel-coated chamber to monitor invasion in the presence of GM6001. The graph shows the quantification of cell invasion of 3 independent experiments. (B) Rnd3-KD cells develop filopodia-like protrusions (arrows) during invasion into Matrigel. Hep3B cells transfected with siRNA S1, with or without rescue-Rnd3 cDNA, were embedded in thick Matrigel matrix and stained for actin. Bar, 50 μ m (top panel) and 25 μ m (bottom panel). (C) Optical sections (0.33 μ m) were taken from the top to the bottom of the cell by confocal microscopy and the Z-projection of confocal sections shows filopodial-like protrusions over the cell (arrows). Bar, 10 μ m.

264x352mm (300 x 300 DPI)

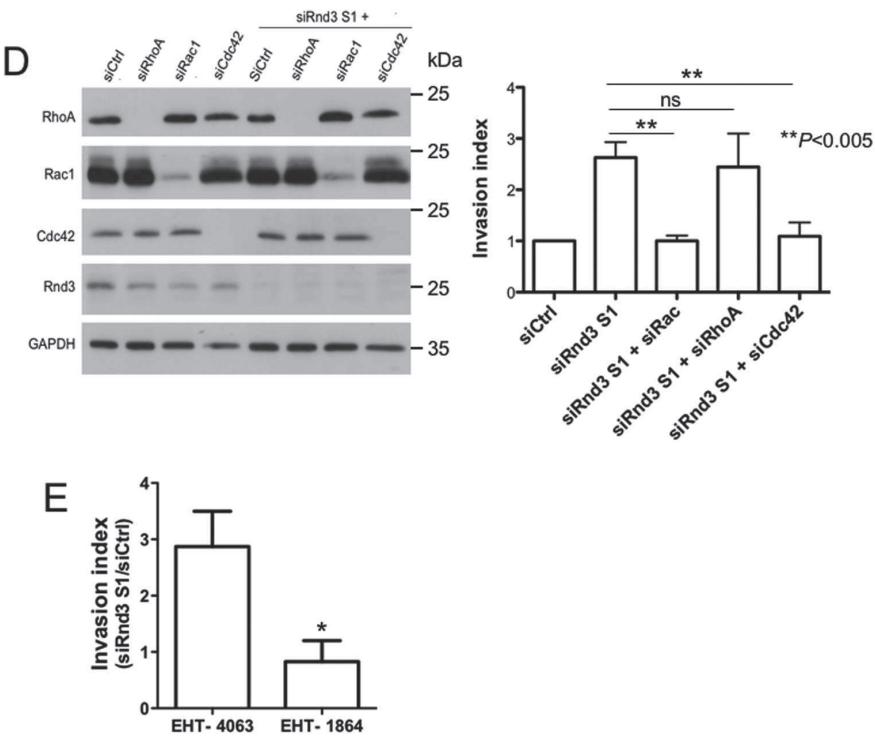


Figure 6
Grise, Sena et al.

(D) Rnd3 depletion-induced cell invasion occurs in a Rac1- and Cdc42-dependent manner. Hep3B cells, either transfected or co-transfected 72h with indicated siRNAs, were assayed for protein knockdown using immunoblotting and for invasion in a Matrigel-coated chamber. siRNA designed against RhoA, Rac1, Cdc42 or Rnd3 downregulated their respective target protein. GAPDH was used as loading control. The graph shows the quantification of cell invasion of four independent experiments. $P<0.005$ by ANOVA. (E) Hep3B cells transfected with siRNAs targeting or not Rnd3 were assessed in invasion assays in the presence of Rac1 inhibitor (EHT1864) or control compound (EHT4063). $*P=0.031$ in Student's t-test.

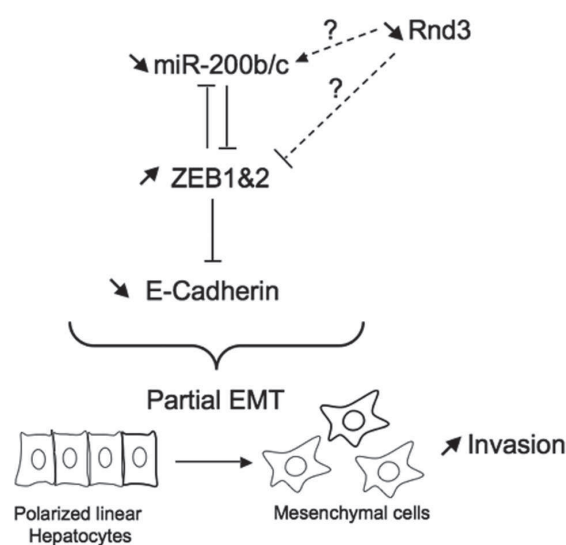


Figure 7
Grise, Sena et al.

Figure 7: Schematic representation of Rnd3 involvement in HCC towards cell invasion. Rnd3 down-regulation may participate in the establishment of EMT through the miR-200/ZEB/E-Cadherin pathway and the induction of cell invasiveness.
264x352mm (300 x 300 DPI)

Supplemental data

Supplemental Materials and Methods

Cell lines and primary hepatocyte culture. HCC Hep3B, Huh7, SNU398 and SNU475 cell lines were purchased from American Type Culture Collection. Hepatoblastoma cell line Huh6 was generously provided by C. Perret (Cochin Institute, Paris). All cell lines were maintained at 37°C in a humidified 5% CO₂ atmosphere in appropriate medium supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), 100 U/mL penicillin, and 100 µg/mL streptomycin. HepG2, Huh7 and Hep3B cell lines were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM: 4.5 g/l glucose, glutamax, pyruvate). SNU398 and SNU475 cells were cultured in RPMI 1640 (4.5 g/l glucose) supplemented with L-glutamine. Huh6 cells were cultured in DMEM (1 g/l glucose) with L-glutamine and pyruvate. Fresh primary human hepatocytes were from Biopredic SA (Rennes, France) and were grown following the provider's instructions.

Antibodies and reagents. Monoclonal anti-RhoE/Rnd3 (clone 4) and anti-Rac (clone 23A8) antibodies were purchased from Upstate Biotechnology. Anti-β-actin antibodies were from Sigma-Aldrich, anti-E-cadherin (clone 36) and anti-Cdc42 from BD Transduction Laboratories, monoclonal anti-RhoA (clone 26C4), polyclonal anti-GAPDH and anti-Rnd3 antibodies from Santa Cruz Biotechnology. Alexa-Fluor-546-phalloidin and Alexa-Fluor-488-labelled secondary antibodies were purchased from Molecular Probes. The Rac inhibitor EHT1864 and control EHT4063 were obtained from Exonhit Therapeutics (Paris). The MMP inhibitor GM6001 was from Calbiochem.

siRNA and miRNA. siRNAs were chemically synthesized (Qiagen). Antisense-strand siRNAs targeted against human Rnd3 were based on published sequences (S1: 5'-TAGTAGAGCTCTCCAATCACA-3' and S3: 5'-CAGAACGTGAAATGCAAGATA-3') (1, 2). siRNA

sequences targeting RhoA and Cdc42 were published elsewhere (3). For Rac1, we designed and used 5'-AAGGAGATTGGTGCTGTAAAA-3'. As control, we used the AllStars negative-control siRNA from Qiagen. The miRNA mimic sequences were: miR-200b sense, 5'-UAAUACUGCCUGGUAUAUGAUGA-3'; miR-200b antisense, 5'-UCAUCAUUACCAGGCAGUAUUA-3'; miR-200c sense, 5'-UAAUACUGCCGGGUAUAUGGA-3'; miR-200c antisense, 5'-UCCAUCAUUACCCGGCAGUAUUA-3'; miR-scramble sense, 5'-UAAAUUCGCGCGGAUUAAGGUAG-3'; miR-scramble antisense, 5'-CUACCUUAAUCCGCCGGAUUUA-3'. Double-stranded miR-200b and miR-200c mimics, or miR-scramble 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.

Immunohistochemistry. Four samples of HCC were evaluated by immunohistochemistry, together with two normal liver samples. Formalin-fixed, paraffin-embedded sections were used. Following dewaxing and dehydration, sections were submitted to antigen retrieval with a steam cooker in a citrate buffer (0.01 M, pH 6) for 10 minutes and then permeabilized with methanol for 1 hour. The immunostaining procedure was carried out in an Autostainer (Dako). Endogenous peroxidase was inhibited with 3% H₂O₂ in methanol, and nonspecific sites were saturated with 3% BSA. The sections were then incubated with polyclonal anti-Rnd3 antibodies (Santa Cruz Biotechnology) or with non-immune immunoglobulin G (Sigma) as control. After washing, the signal was amplified with the Envision reagent coupled to horseradish peroxidase (Dako). The staining was revealed with diaminobenzidine.

Real-time PCR. Quantitative RT-PCR of 120 HCCs (57 from the "microarray" series and 63 new samples) and 28 nontumor liver samples was performed in duplicate, using TaqMan[®] Low Density Array and the ABI PRISM[®] 7900HT System (Applied Biosystems) as described

previously (Boyault et al., 2007). For other analyses, RNA was collected from cultured cells using the Trizol reagent (Invitrogen), according to manufacturer's protocol. cDNA was synthesized from 2µg of total RNA with Maxima® First Stand cDNA Synthesis Kit (Fermentas) using a mix of oligo(dT)₁₈ and random hexamer primers. Aliquots of cDNA (2 to 30ng according to target mRNA) were then subjected to PCR amplification on a StepOnePlus Real-Time PCR system (Applied Biosystems) with specific forward and reverse oligonucleotide primers. The SYBR® Green SuperMix for iQ™ (Quanta Biosciences, Inc.) was used with the following PCR amplification cycles: initial denaturation, 95°C for 10 minutes, followed by 40 cycles with denaturation, 95°C for 15 seconds and annealing-extension, 60°C for 1 minute. A dissociation curve was generated to verify that a single product was amplified. Gene expression results were first normalized to internal control r18S. Relative levels of expression were calculated using the comparative ($2^{-\Delta\Delta CT}$) method (StepOne™ Software v2.0.2). All primers used for qRT-PCR are listed in supplemental Table 2.

TaqMan® microRNA assays (Applied Biosystems) were used to quantify the expression of mature miR-200b (AB 001800), miR-200c (AB 002300). Real-time RT-qPCR was performed in triplicate on 20 ng total RNA according to the manufacturer's instructions. MiRNAs levels were normalized to U6 snRNA (RNU6b, AB 001093) or to SNORD49A (RNU49, AB 001005). Relative expressions were calculated using the comparative Ct method.

Immunofluorescence microscopy. Glass coverslips plated cells were fixed in -20°C methanol and prepared for immunofluorescence microscopy as previously described (4). Fluorescent images were recorded on an Axioplan2 microscope with AxioCam and AxioVision 40 V4.6.1.0 using a 63X oil-immersion lens (Zeiss). Confocal images were captured on a Leica SP5 confocal microscope. The images were processed using Adobe Photoshop 5.5 (Adobe Systems). All images of one experiment were processed with the same parameters.

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

Supplemental Figures

Figure S1: Rnd3 mRNA is down-regulated in HCC (continued). (A) Microarray data revealed the down-regulation of Rnd3 mRNA in HCC. Data extracted from Boyault et al., 2007 transcriptomic analysis comparing non-tumorous liver (n=5, pools of 3) and HCC (n=57) human samples. Probe set #212724 corresponds to Rnd3. *** $P=0.0009$ in Mann Whitney test. (B) Correlations between microarray data and qRT-PCR data performed on the same samples. Statistical analysis was performed with the Pearson correlation test. (C-E) Correlations between the Rnd3 mRNA levels analyzed by qRT-PCR and clinicopathological features of HCC. The Rnd3 mRNA level was measured by quantitative RT-PCR. The gene expression results were first normalized to internal control ribosomal 18S in all samples. Then, the results for HCC samples were expressed as a ratio with respect to the mean expression level in a pool of 15 non-tumor samples. P values from the Mann Whitney test are indicated. (C) Rnd3 expression according to the HBV status (HBV-infected, n=21; non HBV-infected, n=99). (D) Rnd3 expression according to the HCV status (HCV-infected, n=13; non HCV-infected, n=107). (E) Rnd3 expression according to the alcohol consumption status (alcohol, n=18; non alcohol, n=102). (F) Rnd3 protein levels in matched HCC (T) and non-tumoral (NT) livers were assessed using immunoblotting. Fold changes in Rnd3 expression (T/NT) are shown for 27 patient samples. Of the 27 cases, 23 HCCs (about 85%) showed a decreased Rnd3 expression in the tumor tissue when compared to the peri-tumoral tissue (***) $P=0.00048$).

Figure S2: Rnd3 knockdown induces E-cadherin down-regulation in HCC cells. (A) Huh7 cells were transfected with two different Rnd3 siRNAs (S1 or S3) or with control siRNA (siCtrl). After 72 or 96 hours, protein extracts were analyzed by immunoblotting using anti-E-Cadherin, Rnd3 and GAPDH antibodies. (B) Rnd3 knockdown induces E-cadherin loss at cell-cell junctions. S1-transfected Hep3B cells (72 hours post-transfection) were stained with anti-E-cadherin antibodies (red) and DAPI (blue). Bar, 25 μ m.

Figure S3. E-cadherin and Rnd3 are down-regulated in the same HCC samples.

Rnd3 and E-cadherin protein levels in matched HCC (T) and non-tumoral (NT) livers were assessed using immunoblotting. Quantitation on 27 matched human samples reveals that in 78% (18/23) of samples where Rnd3 is downregulated, E-cadherin is also reduced in the tumor tissue.

Figure S4: Silencing of Rnd3 affects the ZEB1/2-miR200 pathway (continued). (A)

Hep3B-KRAB-shRnd3 and Hep3B-KRAB-shGL2 cells were treated (+Dox) or not (-Dox) with doxycycline (30 ng/ml) for 5 days. Protein extracts were analyzed by immunoblotting using Rnd3 and GAPDH antibodies. In contrast to controls, treatment with doxycycline in Hep3B-KRAB-shRnd3 cells led to Rnd3 knockdown. (B-C) Cells were treated as described in (A). After 5 days of Dox treatment, Rnd3, E-cadherin, vimentin, Snail1 and Slug mRNA expressions were analyzed by qRT-PCR. Each bar represents the mean $\pm$ s.e. of three independent experiments. * $P=0.0126$, ** $P=0.0025$ by ANOVA when compared with control.

Figure S5: The miR-200/ZEB/E-Cadherin pathway is intact in Huh7 hepatoma

cells. (A) Huh7 cells were transfected with miR-200b and/or miR-200c mimics or a miRNA control (miR-Scr). After 72 hours, cells were photographed. Forced over-expression of miR-200b or/and miR200c increased cell-cell contacts. (B) Cells were transfected as described in (A). After 72 hours, E-cadherin, ZEB1 and ZEB2 mRNA expressions were analyzed by qRT-PCR. Forced over-expression of miR-200b or/and miR200c in Huh7 cells downregulated ZEB1 and ZEB2 expression leading to E-Cadherin upregulation.

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

Supplemental Table 1. Characteristics of Patients and Tumors used for protein level analysis (n=27)

Clinical Characteristics	Value
Age (mean ± standard deviation)	64.9 ± 10.9 years
Gender (male)	81.5%
HBV infection	11.1%
HCV infection	37%
Alcohol	40.7%
Metabolic syndrome	14.8%
Tumor characteristics	
Diameter (mean ± standard deviation)	6.1 ± 4.5 cm
Intact capsule	33.3%
Satellite nodule	37%
Vascular invasion	63%

Supplemental Table 2. qRT-PCR primers used in this study

			Accession
Primer name	Primer sequence (5' to 3')	Target	number
r18S-for	GTAACCCGTTGAACCCATT	rRNA18S	X03205
r18S-rev	CCATCCAATCGGTAGTAGCG	rRNA18S	X03205
Rnd3-for	GCCAGCCAGAAATTATCCAGC	Rnd3	NM_005168
Rnd3-rev	CTTGCGAAGACATGGAGC	Rnd3	NM_005168
E-Cadh-for	TGAGTGTCCCCCGGTATCTTC	E-cadherin	NM_004360

E-Cadh-rev	CAGTATCAGCCGCTTTCAGATTTT	E-cadherin	NM_004360
Vim-for	CGAGGAGAGCAGGATTTCTC	Vimentin	NM_003380.3
Vim-rev	GGTATCAACCAGAGGGAGTGA	Vimentin	NM_003380.3
Snail1-for	GCTGCAGGACTCTAATCCAGA	Snail1	NM_005985.3
Snail1-rev	ATCTCCGGAGGTGGGATG	Snail1	NM_005985.3
Slug-for	TGGTTGCTTCAAGGACACAT	Slug (Snail2)	NM_003068.3
Slug-rev	GTTGCAGTGAGGGCAAGAA	Slug (Snail2)	NM_003068.3
ZEB1-for	AAGAAAGTGTTACAGATGCAGCTG	ZEB1	NM_001174094.1
ZEB1-rev	CCCTGGTAACACTGTCTGGTC	ZEB1	NM_001174094.1
ZEB2-for	CAAGAGGCGCAAACAAGC	SIP1/ZEB2	NM_014795.3
ZEB2-rev	GGTTGGCAATACCGTCATCC	SIP1/ZEB2	NM_014795.3

REFERENCES

1. Fortier M, Comunale F, Kucharczak J, Blangy A, Charrasse S, Gauthier-Rouviere C. RhoE controls myoblast alignment prior fusion through RhoA and ROCK. *Cell Death Differ* 2008;15:1221-1231.
2. Ongusaha PP, Kim HG, Boswell SA, Ridley AJ, Der CJ, Dotto GP, Kim YB, et al. RhoE is a pro-survival p53 target gene that inhibits ROCK I-mediated apoptosis in response to genotoxic stress. *Curr Biol* 2006;16:2466-2472.
3. Tatin F, Grise F, Reuzeau E, Genot E, Moreau V. Sodium fluoride induces podosome formation in endothelial cells. *Biol Cell* 2010;102:489-498.
4. Moreau V, Tatin F, Varon C, Genot E. Actin can reorganize into podosomes in aortic endothelial cells, a process controlled by Cdc42 and RhoA. *Mol Cell Biol* 2003;23:6809-6822.

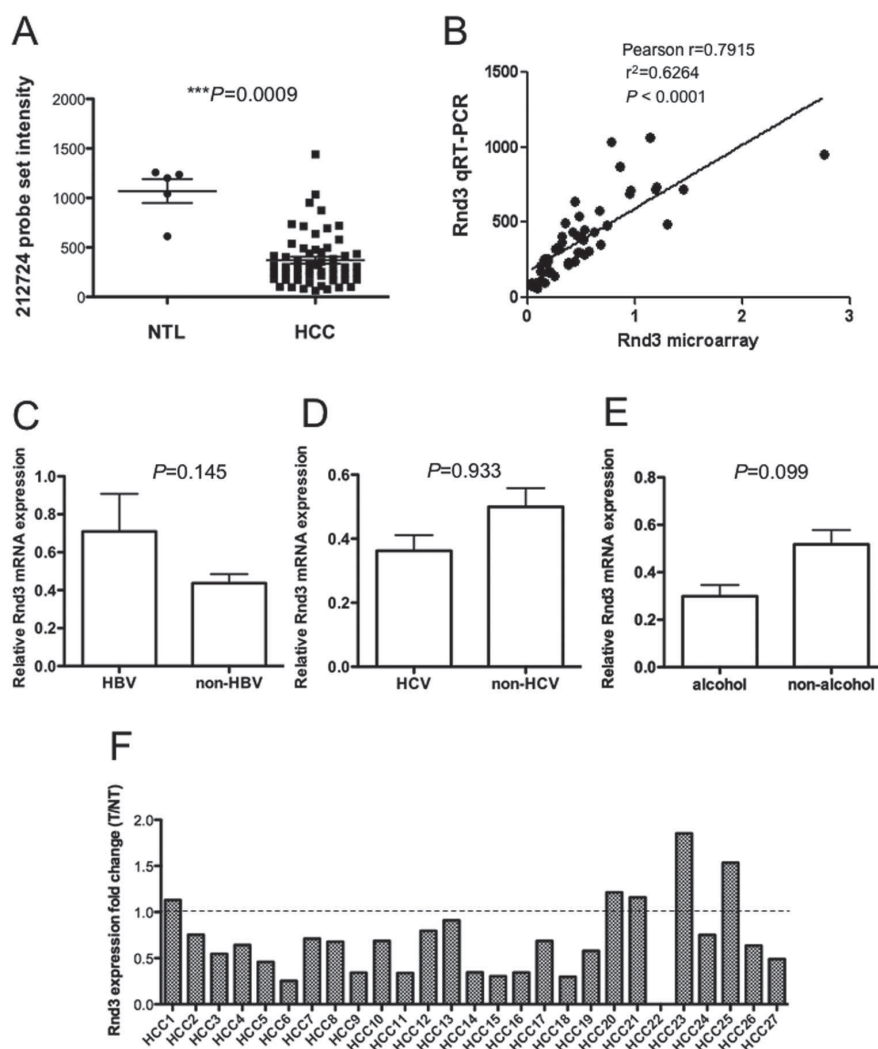


Figure S1
Grise, Sena et al.

Figure S1: Rnd3 mRNA is down-regulated in HCC (continued). (A) Microarray data revealed the down-regulation of Rnd3 mRNA in HCC. Data extracted from Boyault et al., 2007 transcriptomic analysis comparing non-tumorous liver (n=5, pools of 3) and HCC (n=57) human samples. Probe set #212724 corresponds to Rnd3. *** $P=0.0009$ in Mann Whitney test. (B) Correlations between microarray data and qRT-PCR data performed on the same samples. Statistical analysis was performed with the Pearson correlation test. (C-E) Correlations between the Rnd3 mRNA levels analyzed by qRT-PCR and clinicopathological features of HCC. The Rnd3 mRNA level was measured by quantitative RT-PCR. The gene expression results were first normalized to internal control ribosomal 18S in all samples. Then, the results for HCC samples were expressed as a ratio with respect to the mean expression level in a pool of 15 non-tumor samples. P values from the Mann Whitney test are indicated. (C) Rnd3 expression according to the HBV status (HBV-infected, n=21; non HBV-infected, n=99). (D) Rnd3 expression according to the HCV status (HCV-infected, n=13; non HCV-infected, n=107). (E) Rnd3 expression according to the alcohol consumption status

(alcohol, n=18; non alcohol, n=102). (F) Rnd3 protein levels in matched HCC (T) and non-tumoral (NT) livers were assessed using immunoblotting. Fold changes in Rnd3 expression (T/NT) are shown for 27 patient samples. Of the 27 cases, 23 HCCs (about 85%) showed a decreased Rnd3 expression in the tumor tissue when compared to the peri-tumoral tissue (**P=0.00048).
264x352mm (300 x 300 DPI)

For Peer Review

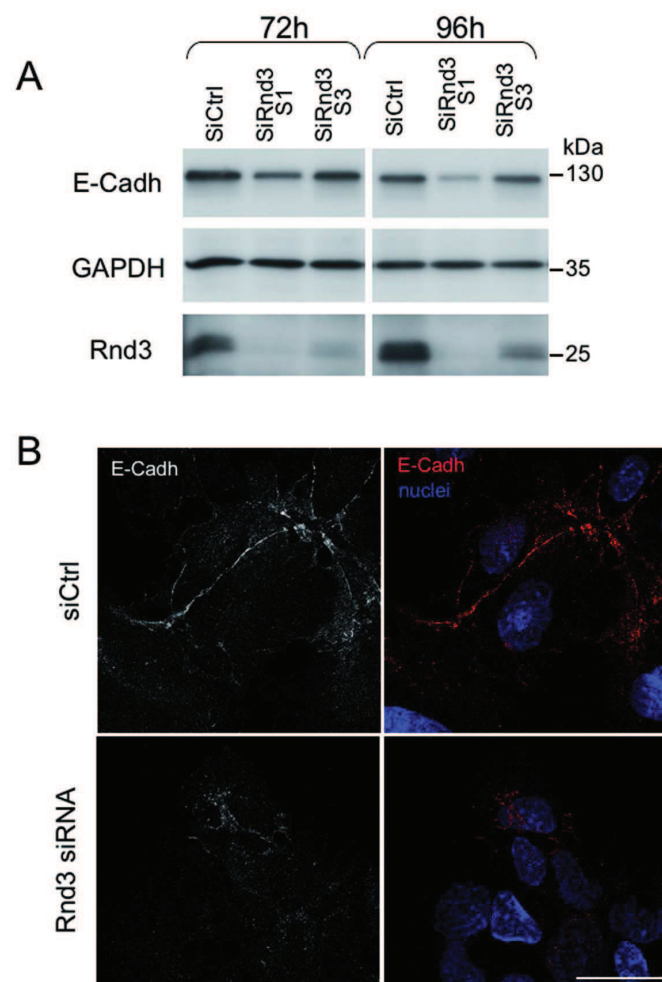


Figure S2
Grise, Sena et al.

Figure S2: Rnd3 knockdown induces E-cadherin down-regulation in HCC cells. (A) Huh7 cells were transfected with two different Rnd3 siRNAs (S1 or S3) or with control siRNA (siCtrl). After 72 or 96 hours, protein extracts were analyzed by immunoblotting using anti-E-Cadherin, Rnd3 and GAPDH antibodies. (B) Rnd3 knockdown induces E-cadherin loss at cell-cell junctions. S1-transfected Hep3B cells (72 hours post-transfection) were stained with anti-E-cadherin antibodies (red) and DAPI (blue). Bar, 25 μ m.
264x352mm (300 x 300 DPI)

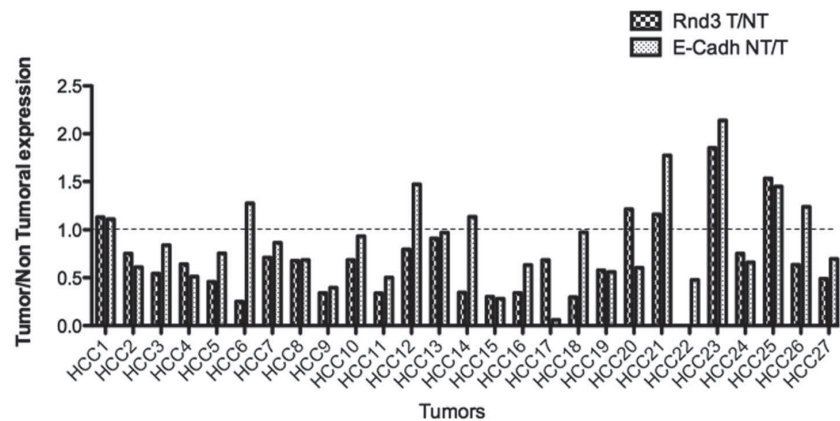


Figure S3
Grise, Sena et al.

Figure S3. E-cadherin and Rnd3 are down-regulated in the same HCC samples. Rnd3 and E-cadherin protein levels in matched HCC (T) and non-tumoral (NT) livers were assessed using immunoblotting. Quantitation on 27 matched human samples reveals that in 78% (18/23) of samples where Rnd3 is downregulated, E-cadherin is also reduced in the tumor tissue.

264x352mm (300 x 300 DPI)

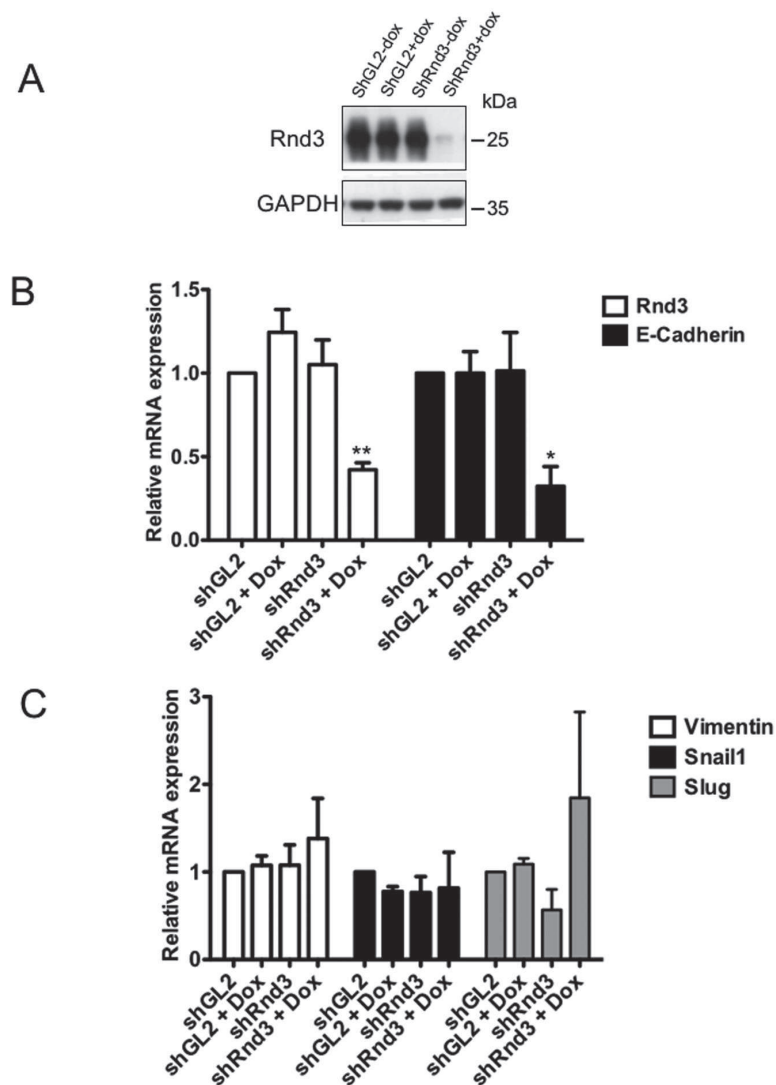


Figure S4
Grise, Sena et al.

Figure S4: Silencing of Rnd3 affects the ZEB1/2-miR200 pathway (continued). (A) Hep3B-KRAB-shRnd3 and Hep3B-KRAB-shGL2 cells were treated (+Dox) or not (-Dox) with doxycycline (30 ng/ml) for 5 days. Protein extracts were analyzed by immunoblotting using Rnd3 and GAPDH antibodies. In contrast to controls, treatment with doxycycline in Hep3B-KRAB-shRnd3 cells led to Rnd3 knockdown. (B-C) Cells were treated as described in (A). After 5 days of Dox treatment, Rnd3, E-cadherin, vimentin, Snail1 and Slug mRNA expressions were analyzed by qRT-PCR. Each bar represents the mean $\pm$ s.e. of three independent experiments. * $P=0.0126$, ** $P=0.0025$ by ANOVA when compared with control.

264x352mm (300 x 300 DPI)

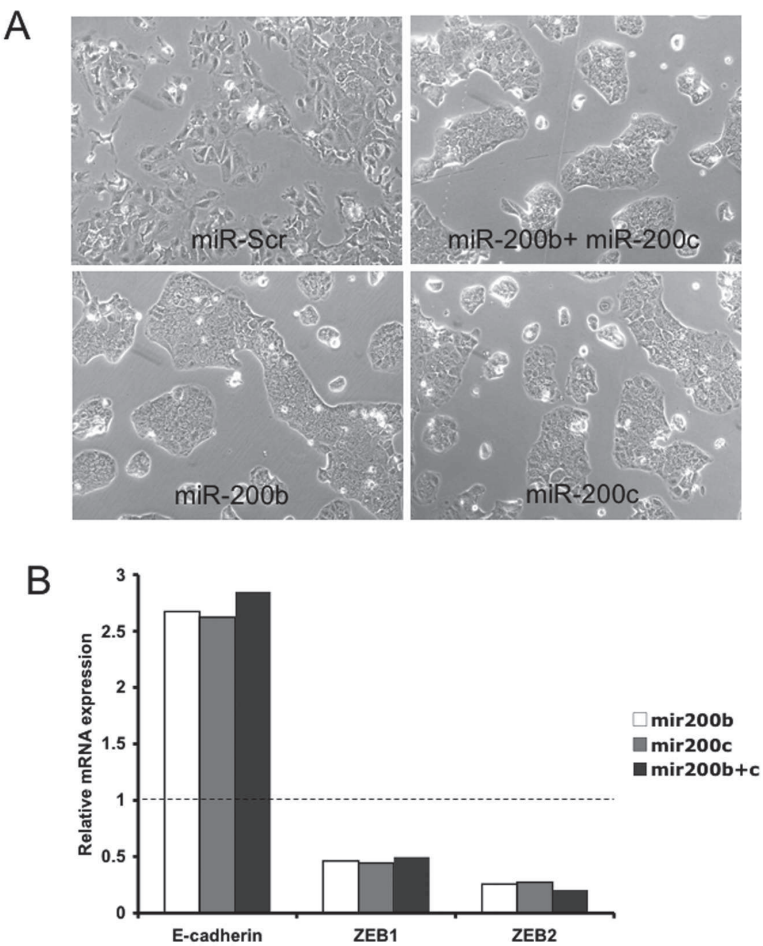


Figure S5
Grise, Sena et al.

Figure S5: The miR-200/ZEB/E-Cadherin pathway is intact in Huh7 hepatoma cells. (A) Huh7 cells were transfected with miR-200b and/or miR-200c mimics or a miRNA control (miR-Scr). After 72 hours, cells were photographed. Forced over-expression of miR-200b or/and miR200c increased cell-cell contacts. (B) Cells were transfected as described in (A). After 72 hours, E-cadherin, ZEB1 and ZEB2 mRNA expressions were analyzed by qRT-PCR. Forced over-expression of miR-200b or/and miR200c in Huh7 cells downregulated ZEB1 and ZEB2 expression leading to E-Cadherin upregulation.

264x352mm (300 x 300 DPI)

Annexe 4 : Curriculum vitae

JESSICA BAUD EPOUSE MASSIERE

1 rue Saint Jean d'Estampes
33640 Ayguemorte les graves
☎ : 06.61.88.62.11
Mail : jessica.baud@free.fr
Née le 19/09/1983

FORMATION :

- 2008-2011 : **DOCTORAT SCIENCE DE LA VIE ET DE LA SANTE**, spécialité Génétique, Université Victor Segalen Bordeaux 2, France. Mention très honorable avec félicitations du jury
- 2006-2008 : **MASTER DE RECHERCHE**, spécialité Génétique, Université Victor Segalen Bordeaux 2, France. Mention Bien, rang 1/18.
- 2003-2006 : **LICENCE**, biologie cellulaire et physiologie, Université Victor Segalen Bordeaux 2, France. Mention Assez Bien, rang 4/80.
- 2001-2003 : **PCEM1**, Université Victor Segalen Bordeaux 2, France.
- 2001 : **Baccalauréat Scientifique**, spécialité Biologie.

EXPERIENCES PROFESSIONNELLES

Doctorat :

- 2008-2011 : INSERM U869, « **La transition épithélio-mésenchymateuse dans les cellules épithéliales gastriques : rôle des microARN régulés par *Helicobacter pylori*** », Université Bordeaux 2.
Activités : Analyse de l'expression des miARN dans des lignées cellulaires humaines en co-culture avec le pathogène *H. pylori* et détermination des voies de signalisation impliquées.
Durée : 3 ans.
- 2009 : **Encadrement stagiaire**, niveau Master 2 spécialité génétique
Activités : Mise au point d'un protocole de RT-PCR pour détecter et quantifier un précurseur de microARN.
Durée : 1 mois.

Stages de Master :

- 2008 : INSERM U869, « **Construction d'outils génétiques pour l'étude de petits ARN régulateurs chez *Helicobacter pylori*** », Université Bordeaux 2.
Activités : Obtention de souches d'*H. pylori* mutées dans un gène codant pour un petit ARN régulateur et analyse de la fonction du gène délété.
Durée : 6 mois.
- 2007 : Laboratoire de génétique moléculaire, CHU Bordeaux, « **Prédiction d'anomalies d'épissage (*PTCH*) et identification de grands réarrangements génomiques (*SUFU*) dans le syndrome de Gorlin** »
Activités : Recherche de mutations dans les gènes *SUFU* et *PATCH* chez des patients suspectés d'être atteints du syndrome de Gorlin par PCR multiplex
Durée : 2 mois.

COMPETENCES :

Biologie moléculaire :

Extraction d'ADN génomique, plasmidique et d'ARN totaux.
Clonage, mutagénèse dirigée, PCR, RT-PCR, PCR quantitative, séquençage.
Création de mutants bactériens

Biologie cellulaire :

Culture de lignées cellulaires eucaryotes (humaines) et procaryotes (*E. coli* et *H. pylori*).

Transfection des cellules en culture (antisens, mimic, siARN, inhibiteur).
Biochimie : Northern blot, Western blot, Chromatine ImmunoPrécipitation, test ELISA.
Qualité : Maîtrise des règles d'hygiène et sécurité, sécurité microbiologique.
Informatique :
Bureautique (Word, Excel, Power point).

COMMUNICATIONS ORALES ET AFFICHEES :

- **J. Baud** *et al.*, 6th microsyposium on small RNA, Vienna, Mai 2011.
- **J. Baud** *et al.*, GEFH, Bordeaux, janvier 2011
- Cedric Belair, **Jessica Baud**, Sandrine Chabas, Cynthia Sharma, Jörg Vogel, Fabien Darfeuille and Cathy Staedel, LE CONGRÈS « Autour de la Cellule Souche », Mars 2010.
- **Jessica Baud**, Cedric Belair, Sandrine Chabas, Cynthia Sharma, , Jörg Vogel, Fabien Darfeuille and Cathy Staedel, Journée IFR66, Décembre 2009-2010, 1^{er} prix poster.
- **J. Baud** *et al.*, Doc's 66 meeting, Juin 2008-2010, 3^{èmes} prix poster et communication orale. Cedric Belair, **Jessica Baud**, Sandrine Chabas, Cynthia Sharma, Jörg Hackermüller, Jörg Vogel, Fabien Darfeuille and Cathy Staedel, XXIIIème Colloque du "GBD", Nice, Octobre 2009.

PUBLICATIONS :

- Cedric Belair, **Jessica Baud**, Sandrine Chabas, Cynthia Sharma, Jörg Hackermüller, Jörg Vogel, Fabien Darfeuille and Cathy Staedel "***Helicobacter pylori* interferes with an embryonic stem cell miRNA cluster to block cell cycle progression**", Silence, 2-7, 2011.
- Florence Grise, Sandra Sena, Aurélien Bidaud-Meynard, **Jessica Baud**, Jean-Baptiste Hiriart, Kassem Makki, Nathalie Dugot-Senant, Cathy Staedel, Paulette Bioulac-Sage, Jessica Zucman-Rossi, Jean Rosenbaum and Violaine Moreau "**Rnd3/RhoE is down-regulated in hepatocellular carcinoma and controls cellular invasion**", Hepathology, accepté le 19 décembre 2011.

DIVERS :

Permis B, voiture
Pratiques sportives :
Zumba, Badminton, vélo
Langues :
Anglais (lu, parlé, écrit)
Espagnol (niveau scolaire)
Centres d'intérêts :
Lecture, cinéma

RECOMMANDATIONS :

M. Fabien Darfeuille
U869 INSERM, Université
Bordeaux Segalen, Bât 3a,
1^{er} étage
146 rue Léo Saignat
33076 BORDEAUX
France

Mme Cathy Staedel
U869 INSERM, Université
Bordeaux Segalen, Bât 3a,
1^{er} étage
146 rue Léo Saignat
33076 BORDEAUX
France

Mme Violaine Moreau
Inserm - U1053 - GREF -
Groupe de Recherche pour
l'Etude du Foie
Université Bordeaux
Segalen
146 rue Léo Saignat
33076 BORDEAUX
France

Bibliographie

1. Bik, E.M., et al., *Molecular analysis of the bacterial microbiota in the human stomach*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(3): p. 732-7.
2. Kidd, M. and I.M. Modlin, *A century of Helicobacter pylori: paradigms lost-paradigms regained*. Digestion, 1998. **59**(1): p. 1-15.
3. Marshall, B.J. and J.R. Warren, *Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration*. Lancet, 1984. **1**(8390): p. 1311-5.
4. Goodwin, C.S., et al., *Cellular fatty acid composition of Campylobacter pylori from primates and ferrets compared with those of other campylobacters*. J Clin Microbiol, 1989. **27**(5): p. 938-43.
5. Marshall, B.J., J.R. Warren, and C.S. Goodwin, *Duodenal ulcer relapse after eradication of Campylobacter pylori*. Lancet, 1989. **1**(8642): p. 836-7.
6. Cover, T.L. and M.J. Blaser, *Helicobacter pylori in health and disease*. Gastroenterology, 2009. **136**(6): p. 1863-73.
7. Blaser, M.J., *Who are we? Indigenous microbes and the ecology of human diseases*. EMBO Rep, 2006. **7**(10): p. 956-60.
8. Herrera, V. and J. Parsonnet, *Helicobacter pylori and gastric adenocarcinoma*. Clin Microbiol Infect, 2009. **15**(11): p. 971-6.
9. De Vries, A.C. and E.J. Kuipers, *Review article: Helicobacter pylori eradication for the prevention of gastric cancer*. Aliment Pharmacol Ther, 2007. **26 Suppl 2**: p. 25-35.
10. Konturek, S.J., et al., *Helicobacter pylori and its involvement in gastritis and peptic ulcer formation*. J Physiol Pharmacol, 2006. **57 Suppl 3**: p. 29-50.
11. Machida-Montani, A., et al., *Association of Helicobacter pylori infection and environmental factors in non-cardia gastric cancer in Japan*. Gastric Cancer, 2004. **7**(1): p. 46-53.
12. Ricci, V., M. Romano, and P. Boquet, *Molecular cross-talk between Helicobacter pylori and human gastric mucosa*. World J Gastroenterol, 2011. **17**(11): p. 1383-99.
13. Shi, Y., et al., *Helicobacter pylori-induced Th17 responses modulate Th1 cell responses, benefit bacterial growth, and contribute to pathology in mice*. J Immunol, 2010. **184**(9): p. 5121-9.
14. Zhang, B., et al., *The prevalence of Th17 cells in patients with gastric cancer*. Biochem Biophys Res Commun, 2008. **374**(3): p. 533-7.
15. Holcombe, C., *Helicobacter pylori: the African enigma*. Gut, 1992. **33**(4): p. 429-31.
16. El-Omar, E.M., et al., *Increased risk of noncardia gastric cancer associated with proinflammatory cytokine gene polymorphisms*. Gastroenterology, 2003. **124**(5): p. 1193-201.
17. Machado, J.C., et al., *Interleukin 1B and interleukin 1RN polymorphisms are associated with increased risk of gastric carcinoma*. Gastroenterology, 2001. **121**(4): p. 823-9.
18. Rad, R., et al., *Cytokine gene polymorphisms influence mucosal cytokine expression, gastric inflammation, and host specific colonisation during Helicobacter pylori infection*. Gut, 2004. **53**(8): p. 1082-9.
19. Ohyauchi, M., et al., *The polymorphism interleukin 8 -251 A/T influences the susceptibility of Helicobacter pylori related gastric diseases in the Japanese population*. Gut, 2005. **54**(3): p. 330-5.

20. Hold, G.L., et al., *A functional polymorphism of toll-like receptor 4 gene increases risk of gastric carcinoma and its precursors*. Gastroenterology, 2007. **132**(3): p. 905-12.
21. Campbell, B.J., et al., *The versatile epsilon-proteobacteria: key players in sulphidic habitats*. Nat Rev Microbiol, 2006. **4**(6): p. 458-68.
22. Quante, M. and T.C. Wang, *Stem cells in gastroenterology and hepatology*. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2009. **6**(12): p. 724-37.
23. Oh, J.D., S.M. Karam, and J.I. Gordon, *Intracellular Helicobacter pylori in gastric epithelial progenitors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(14): p. 5186-91.
24. Amieva, M.R., et al., *Helicobacter pylori enter and survive within multivesicular vacuoles of epithelial cells*. Cell Microbiol, 2002. **4**(10): p. 677-90.
25. Howitt, M.R., et al., *ChePep controls Helicobacter pylori Infection of the gastric glands and chemotaxis in the Epsilonproteobacteria*. MBio, 2011. **2**(4).
26. Wilson, K.T. and J.E. Crabtree, *Immunology of Helicobacter pylori: insights into the failure of the immune response and perspectives on vaccine studies*. Gastroenterology, 2007. **133**(1): p. 288-308.
27. Blaser, M.J. and D.E. Berg, *Helicobacter pylori genetic diversity and risk of human disease*. J Clin Invest, 2001. **107**(7): p. 767-73.
28. Censini, S., et al., *cag, a pathogenicity island of Helicobacter pylori, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(25): p. 14648-53.
29. Suerbaum, S. and C. Josenhans, *Helicobacter pylori evolution and phenotypic diversification in a changing host*. Nat Rev Microbiol, 2007. **5**(6): p. 441-52.
30. Achtman, M., et al., *Recombination and clonal groupings within Helicobacter pylori from different geographical regions*. Mol Microbiol, 1999. **32**(3): p. 459-70.
31. Alm, R.A. and T.J. Trust, *Analysis of the genetic diversity of Helicobacter pylori: the tale of two genomes*. J Mol Med (Berl), 1999. **77**(12): p. 834-46.
32. Maeda, S., et al., *Major virulence factors, VacA and CagA, are commonly positive in Helicobacter pylori isolates in Japan*. Gut, 1998. **42**(3): p. 338-43.
33. van Doorn, L.J., et al., *Clinical relevance of the cagA, vacA, and iceA status of Helicobacter pylori*. Gastroenterology, 1998. **115**(1): p. 58-66.
34. Israel, D.A., et al., *Helicobacter pylori strain-specific differences in genetic content, identified by microarray, influence host inflammatory responses*. J Clin Invest, 2001. **107**(5): p. 611-20.
35. Salama, N., et al., *A whole-genome microarray reveals genetic diversity among Helicobacter pylori strains*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(26): p. 14668-73.
36. Blaser, M.J., et al., *Infection with Helicobacter pylori strains possessing cagA is associated with an increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach*. Cancer Res, 1995. **55**(10): p. 2111-5.
37. Covacci, A., et al., *Molecular characterization of the 128-kDa immunodominant antigen of Helicobacter pylori associated with cytotoxicity and duodenal ulcer*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(12): p. 5791-5.
38. Tummuru, M.K., T.L. Cover, and M.J. Blaser, *Cloning and expression of a high-molecular-mass major antigen of Helicobacter pylori: evidence of linkage to cytotoxin production*. Infect Immun, 1993. **61**(5): p. 1799-809.
39. Backert, S., N. Tegtmeyer, and M. Selbach, *The versatility of Helicobacter pylori CagA effector protein functions: The master key hypothesis*. Helicobacter, 2010. **15**(3): p. 163-76.

40. Hatakeyama, M., *SagA of CagA in Helicobacter pylori pathogenesis*. Curr Opin Microbiol, 2008. **11**(1): p. 30-7.
41. Jones, K.R., et al., *Polymorphism in the CagA EPIYA motif impacts development of gastric cancer*. J Clin Microbiol, 2009. **47**(4): p. 959-68.
42. Furuta, Y., et al., *Evolution of cagA oncogene of Helicobacter pylori through recombination*. PLoS One, 2011. **6**(8): p. e23499.
43. Backert, S. and M. Selbach, *Role of type IV secretion in Helicobacter pylori pathogenesis*. Cell Microbiol, 2008. **10**(8): p. 1573-81.
44. Christie, P.J. and J.P. Vogel, *Bacterial type IV secretion: conjugation systems adapted to deliver effector molecules to host cells*. Trends Microbiol, 2000. **8**(8): p. 354-60.
45. Tanaka, J., et al., *Structural definition on the surface of Helicobacter pylori type IV secretion apparatus*. Cell Microbiol, 2003. **5**(6): p. 395-404.
46. Kwok, T., et al., *Helicobacter exploits integrin for type IV secretion and kinase activation*. Nature, 2007. **449**(7164): p. 862-6.
47. Murata-Kamiya, N., et al., *Helicobacter pylori exploits host membrane phosphatidylserine for delivery, localization, and pathophysiological action of the CagA oncoprotein*. Cell Host Microbe, 2010. **7**(5): p. 399-411.
48. Higashi, H., et al., *Biological activity of the Helicobacter pylori virulence factor CagA is determined by variation in the tyrosine phosphorylation sites*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(22): p. 14428-33.
49. Tammer, I., et al., *Activation of Abl by Helicobacter pylori: a novel kinase for CagA and crucial mediator of host cell scattering*. Gastroenterology, 2007. **132**(4): p. 1309-19.
50. Higashi, H., et al., *SHP-2 tyrosine phosphatase as an intracellular target of Helicobacter pylori CagA protein*. Science, 2002. **295**(5555): p. 683-6.
51. Ren, S., et al., *Structural basis and functional consequence of Helicobacter pylori CagA multimerization in cells*. J Biol Chem, 2006. **281**(43): p. 32344-52.
52. Botham, C.M., A.M. Wandler, and K. Guillemin, *A transgenic Drosophila model demonstrates that the Helicobacter pylori CagA protein functions as a eukaryotic Gab adaptor*. PLoS Pathog, 2008. **4**(5): p. e1000064.
53. Hatakeyama, M., *Helicobacter pylori CagA--a potential bacterial oncoprotein that functionally mimics the mammalian Gab family of adaptor proteins*. Microbes Infect, 2003. **5**(2): p. 143-50.
54. Mimuro, H., et al., *Grb2 is a key mediator of helicobacter pylori CagA protein activities*. Mol Cell, 2002. **10**(4): p. 745-55.
55. Murata-Kamiya, N., *Pathophysiological functions of the CagA oncoprotein during infection by Helicobacter pylori*. Microbes Infect, 2011. **13**(10): p. 799-807.
56. Nesic, D., et al., *Helicobacter pylori CagA inhibits PAR1-MARK family kinases by mimicking host substrates*. Nat Struct Mol Biol, 2010. **17**(1): p. 130-2.
57. Suzuki, M., et al., *Helicobacter pylori CagA phosphorylation-independent function in epithelial proliferation and inflammation*. Cell Host Microbe, 2009. **5**(1): p. 23-34.
58. Mimuro, H., D.E. Berg, and C. Sasakawa, *Control of epithelial cell structure and developmental fate: lessons from Helicobacter pylori*. Bioessays, 2008. **30**(6): p. 515-20.
59. Lu, H., et al., *Role of partitioning-defective 1/microtubule affinity-regulating kinases in the morphogenetic activity of Helicobacter pylori CagA*. J Biol Chem, 2009. **284**(34): p. 23024-36.

60. Murata-Kamiya, N., 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**(32): p. 4617-26.
61. Oliveira, M.J., et al., *CagA associates with c-Met, E-cadherin, and p120-catenin in a multiproteic complex that suppresses Helicobacter pylori-induced cell-invasive phenotype*. *J Infect Dis*, 2009. **200**(5): p. 745-55.
62. Ding, S.Z., J.B. Goldberg, and M. Hatakeyama, *Helicobacter pylori infection, oncogenic pathways and epigenetic mechanisms in gastric carcinogenesis*. *Future Oncol*, 2010. **6**(5): p. 851-62.
63. Brandt, S., et al., *NF-kappaB activation and potentiation of proinflammatory responses by the Helicobacter pylori CagA protein*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(26): p. 9300-5.
64. Takeshima, E., et al., *NF-kappaB activation by Helicobacter pylori requires Akt-mediated phosphorylation of p65*. *BMC Microbiol*, 2009. **9**: p. 36.
65. Mahdavi, J., et al., *Helicobacter pylori SabA adhesin in persistent infection and chronic inflammation*. *Science*, 2002. **297**(5581): p. 573-8.
66. Jung, S.W., et al., *homb status of Helicobacter pylori as a novel marker to distinguish gastric cancer from duodenal ulcer*. *J Clin Microbiol*, 2009. **47**(10): p. 3241-5.
67. Mizushima, T., et al., *Clinical relevance of the babA2 genotype of Helicobacter pylori in Japanese clinical isolates*. *J Clin Microbiol*, 2001. **39**(7): p. 2463-5.
68. Dossumbekova, A., et al., *Helicobacter pylori HopH (OipA) and bacterial pathogenicity: genetic and functional genomic analysis of hopH gene polymorphisms*. *J Infect Dis*, 2006. **194**(10): p. 1346-55.
69. Polk, D.B. and R.M. Peek, Jr., *Helicobacter pylori: gastric cancer and beyond*. *Nat Rev Cancer*, 2010. **10**(6): p. 403-14.
70. Montecucco, C. and M. de Bernard, *Molecular and cellular mechanisms of action of the vacuolating cytotoxin (VacA) and neutrophil-activating protein (HP-NAP) virulence factors of Helicobacter pylori*. *Microbes Infect*, 2003. **5**(8): p. 715-21.
71. Jones, K.R., et al., *Polymorphisms in the intermediate region of VacA impact Helicobacter pylori-induced disease development*. *J Clin Microbiol*, 2010 **49**(1): p. 101-10.
72. Sewald, X., W. Fischer, and R. Haas, *Sticky socks: Helicobacter pylori VacA takes shape*. *Trends Microbiol*, 2008. **16**(3): p. 89-92.
73. Gupta, V.R., B.A. Wilson, and S.R. Blanke, *Sphingomyelin is important for the cellular entry and intracellular localization of Helicobacter pylori VacA*. *Cell Microbiol*, 2010. **12**(10): p. 1517-33.
74. Mashima, H., et al., *Involvement of vesicle-associated membrane protein 7 in human gastric epithelial cell vacuolation induced by Helicobacter pylori-produced VacA*. *Infect Immun*, 2008. **76**(6): p. 2296-303.
75. Papini, E., M. Zoratti, and T.L. Cover, *In search of the Helicobacter pylori VacA mechanism of action*. *Toxicon*, 2001. **39**(11): p. 1757-67.
76. Hisatsune, J., et al., *Molecular characterization of Helicobacter pylori VacA induction of IL-8 in U937 cells reveals a prominent role for p38MAPK in activating transcription factor-2, cAMP response element binding protein, and NF-kappaB activation*. *J Immunol*, 2008. **180**(7): p. 5017-27.
77. Hisatsune, J., et al., *Helicobacter pylori VacA enhances prostaglandin E2 production through induction of cyclooxygenase 2 expression via a p38 mitogen-activated*

- protein kinase/activating transcription factor 2 cascade in AZ-521 cells. Infect Immun*, 2007. **75**(9): p. 4472-81.
78. Wang, F., et al., *Helicobacter pylori VacA disrupts apical membrane-cytoskeletal interactions in gastric parietal cells. J Biol Chem*, 2008. **283**(39): p. 26714-25.
 79. Nagy, T.A., et al., *Helicobacter pylori regulates cellular migration and apoptosis by activation of phosphatidylinositol 3-kinase signaling. J Infect Dis*, 2009. **199**(5): p. 641-51.
 80. Tabassam, F.H., D.Y. Graham, and Y. Yamaoka, *Helicobacter pylori activate epidermal growth factor receptor- and phosphatidylinositol 3-OH kinase-dependent Akt and glycogen synthase kinase 3beta phosphorylation. Cell Microbiol*, 2009. **11**(1): p. 70-82.
 81. Jones, K.R., J.M. Whitmire, and D.S. Merrell, *A Tale of Two Toxins: Helicobacter Pylori CagA and VacA Modulate Host Pathways that Impact Disease. Front Microbiol*, 2010. **1**: p. 115.
 82. Yokoyama, K., et al., *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*, 2005. **102**(27): p. 9661-6.
 83. Akada, J.K., et al., *Helicobacter pylori CagA inhibits endocytosis of cytotoxin VacA in host cells. Dis Model Mech*, 2010. **3**(9-10): p. 605-17.
 84. Oldani, A., et al., *Helicobacter pylori counteracts the apoptotic action of its VacA toxin by injecting the CagA protein into gastric epithelial cells. PLoS Pathog*, 2009. **5**(10): p. e1000603.
 85. Argent, R.H., et al., *Differences in Helicobacter pylori CagA tyrosine phosphorylation motif patterns between western and East Asian strains, and influences on interleukin-8 secretion. J Med Microbiol*, 2008. **57**(Pt 9): p. 1062-7.
 86. Tegtmeyer, N., et al., *Importance of EGF receptor, HER2/Neu and Erk1/2 kinase signalling for host cell elongation and scattering induced by the Helicobacter pylori CagA protein: antagonistic effects of the vacuolating cytotoxin VacA. Cell Microbiol*, 2009. **11**(3): p. 488-505.
 87. Jang, S., et al., *Epidemiological link between gastric disease and polymorphisms in VacA and CagA. J Clin Microbiol*. **48**(2): p. 559-67.
 88. Lytton, S.D., et al., *Production of ammonium by Helicobacter pylori mediates occludin processing and disruption of tight junctions in Caco-2 cells. Microbiology*, 2005. **151**(Pt 10): p. 3267-76.
 89. Lamb, A. and L.F. Chen, *The many roads traveled by Helicobacter pylori to NFkappaB activation. Gut Microbes*. **1**(2): p. 109-113.
 90. Watanabe, T., et al., *NOD1 contributes to mouse host defense against Helicobacter pylori via induction of type I IFN and activation of the ISGF3 signaling pathway. J Clin Invest*. **120**(5): p. 1645-62.
 91. Gwack, J., et al., *CagA-producing Helicobacter pylori and increased risk of gastric cancer: a nested case-control study in Korea. Br J Cancer*, 2006. **95**(5): p. 639-41.
 92. Franco, M., et al., *Gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma and Helicobacter pylori: scratch and win. Scand J Gastroenterol*, 2005. **40**(1): p. 115-9.
 93. Franco, A.T., et al., *Regulation of gastric carcinogenesis by Helicobacter pylori virulence factors. Cancer Res*, 2008. **68**(2): p. 379-87.
 94. Hatakeyama, M., *Helicobacter pylori CagA -- a bacterial intruder conspiring gastric carcinogenesis. Int J Cancer*, 2006. **119**(6): p. 1217-23.

95. Lee, I.O., et al., *Helicobacter pylori CagA phosphorylation status determines the gp130-activated SHP2/ERK and JAK/STAT signal transduction pathways in gastric epithelial cells*. J Biol Chem, 2010. **285**(21): p. 16042-50.
96. Cheng, X.X., et al., *Frequent translocalization of beta-catenin in gastric cancers and its relevance to tumor progression*. Oncol Rep, 2004. **11**(6): p. 1201-7.
97. Oguma, K., et al., *Activated macrophages promote Wnt signalling through tumour necrosis factor-alpha in gastric tumour cells*. EMBO J, 2008. **27**(12): p. 1671-81.
98. Busiello, I., et al., *Helicobacter pylori gamma-glutamyltranspeptidase upregulates COX-2 and EGF-related peptide expression in human gastric cells*. Cell Microbiol, 2004. **6**(3): p. 255-67.
99. Caruso, R., et al., *IL-21 is highly produced in Helicobacter pylori-infected gastric mucosa and promotes gelatinases synthesis*. J Immunol, 2007. **178**(9): p. 5957-65.
100. Mimuro, H., et al., *Helicobacter pylori dampens gut epithelial self-renewal by inhibiting apoptosis, a bacterial strategy to enhance colonization of the stomach*. Cell Host Microbe, 2007. **2**(4): p. 250-63.
101. Houghton, J., et al., *Gastric cancer originating from bone marrow-derived cells*. Science, 2004. **306**(5701): p. 1568-71.
102. Giannakis, M., et al., *Helicobacter pylori evolution during progression from chronic atrophic gastritis to gastric cancer and its impact on gastric stem cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(11): p. 4358-63.
103. Sagaert, X., et al., *Gastric MALT lymphoma: a model of chronic inflammation-induced tumor development*. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2010. **7**(6): p. 336-46.
104. Mueller, A., et al., *The role of antigenic drive and tumor-infiltrating accessory cells in the pathogenesis of helicobacter-induced mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma*. Am J Pathol, 2005. **167**(3): p. 797-812.
105. Fukui, T., et al., *Immunogenetic analysis of gastric MALT lymphoma-like lesions induced by Helicobacter pylori infection in neonatally thymectomized mice*. Lab Invest, 2004. **84**(4): p. 485-92.
106. Fox, J.G., et al., *Host and microbial constituents influence Helicobacter pylori-induced cancer in a murine model of hypergastrinemia*. Gastroenterology, 2003. **124**(7): p. 1879-90.
107. Wang, T.C., et al., *Synergistic interaction between hypergastrinemia and Helicobacter infection in a mouse model of gastric cancer*. Gastroenterology, 2000. **118**(1): p. 36-47.
108. Ohnishi, N., et al., *Transgenic expression of Helicobacter pylori CagA induces gastrointestinal and hematopoietic neoplasms in mouse*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(3): p. 1003-8.
109. Yan, J., Y.H. Luo, and Y.F. Mao, *Establishment of Helicobacter pylori infection model in Mongolian gerbils*. World J Gastroenterol, 2004. **10**(6): p. 852-5.
110. Rieder, G., J.L. Merchant, and R. Haas, *Helicobacter pylori cag-type IV secretion system facilitates corpus colonization to induce precancerous conditions in Mongolian gerbils*. Gastroenterology, 2005. **128**(5): p. 1229-42.
111. Schreiber, S., et al., *The spatial orientation of Helicobacter pylori in the gastric mucus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(14): p. 5024-9.
112. O'Callaghan, D. and A. Vergunst, *Non-mammalian animal models to study infectious disease: worms or fly fishing?* Curr Opin Microbiol, 2010. **13**(1): p. 79-85.

113. Basque, J.R. and D. Menard, *Establishment of culture systems of human gastric epithelium for the study of pepsinogen and gastric lipase synthesis and secretion*. Microsc Res Tech, 2000. **48**(5): p. 293-302.
114. Smoot, D.T., et al., *A method for establishing primary cultures of human gastric epithelial cells*. Methods Cell Sci, 2000. **22**(2-3): p. 133-6.
115. Barranco, S.C., et al., *Establishment and characterization of an in vitro model system for human adenocarcinoma of the stomach*. Cancer Res, 1983. **43**(4): p. 1703-9.
116. Chailler, P. and D. Menard, *Establishment of human gastric epithelial (HGE) cell lines exhibiting barrier function, progenitor, and prezymogenic characteristics*. J Cell Physiol, 2005. **202**(1): p. 263-74.
117. Ricci, V., et al., *Effect of Helicobacter pylori on gastric epithelial cell migration and proliferation in vitro: role of VacA and CagA*. Infect Immun, 1996. **64**(7): p. 2829-33.
118. Peek, R.M., Jr., et al., *Helicobacter pylori cagA+ strains and dissociation of gastric epithelial cell proliferation from apoptosis*. J Natl Cancer Inst, 1997. **89**(12): p. 863-8.
119. Thiery, J.P. and J.P. Sleeman, *Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. **7**(2): p. 131-42.
120. Kalluri, R. and R.A. Weinberg, *The basics of epithelial-mesenchymal transition*. J Clin Invest, 2009. **119**(6): p. 1420-8.
121. Thiery, J.P., et al., *Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease*. Cell, 2009. **139**(5): p. 871-90.
122. Lee, J.M., et al., *The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease*. J Cell Biol, 2006. **172**(7): p. 973-81.
123. Acloque, H., et al., *Epithelial-mesenchymal transitions: the importance of changing cell state in development and disease*. J Clin Invest, 2009. **119**(6): p. 1438-49.
124. Barrallo-Gimeno, A. and M.A. Nieto, *The Snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer*. Development, 2005. **132**(14): p. 3151-61.
125. Cano, A., et al., *The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression*. Nat Cell Biol, 2000. **2**(2): p. 76-83.
126. Peinado, H., D. Olmeda, and A. Cano, *Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype?* Nat Rev Cancer, 2007. **7**(6): p. 415-28.
127. Peinado, H., F. Portillo, and A. Cano, *Transcriptional regulation of cadherins during development and carcinogenesis*. Int J Dev Biol, 2004. **48**(5-6): p. 365-75.
128. Carver, E.A., et al., *The mouse snail gene encodes a key regulator of the epithelial-mesenchymal transition*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(23): p. 8184-8.
129. Martinez-Morales, P.L., et al., *FGF and retinoic acid activity gradients control the timing of neural crest cell emigration in the trunk*. J Cell Biol, 2011. **194**(3): p. 489-503.
130. Carmona-Fontaine, C., et al., *Contact inhibition of locomotion in vivo controls neural crest directional migration*. Nature, 2008. **456**(7224): p. 957-61.
131. De Calisto, J., et al., *Essential role of non-canonical Wnt signalling in neural crest migration*. Development, 2005. **132**(11): p. 2587-2597.
132. Savagner, P., ed. *Rise and Fall of Epithelial Phenotype: Concepts of Epithelial-Mesenchymal Transition*. Kindle Edition ed. 2005, Springer. 248 pages.

133. Tanimizu, N. and A. Miyajima, *Molecular mechanism of liver development and regeneration*. Int Rev Cytol, 2007. **259**: p. 1-48.
134. Johansson, K.A. and A. Grapin-Botton, *Development and diseases of the pancreas*. Clin Genet, 2002. **62**(1): p. 14-23.
135. Ahmed, S., C.C. Liu, and A. Nawshad, *Mechanisms of palatal epithelial seam disintegration by transforming growth factor (TGF) beta3*. Dev Biol, 2007. **309**(2): p. 193-207.
136. Dudas, M., et al., *Palatal fusion - where do the midline cells go? A review on cleft palate, a major human birth defect*. Acta Histochem, 2007. **109**(1): p. 1-14.
137. Nakajima, Y., et al., *Mechanisms involved in valvuloseptal endocardial cushion formation in early cardiogenesis: roles of transforming growth factor (TGF)-beta and bone morphogenetic protein (BMP)*. Anat Rec, 2000. **258**(2): p. 119-27.
138. Mercado-Pimentel, M.E. and R.B. Runyan, *Multiple Transforming Growth Factor- β Isoforms and Receptors Function during Epithelial-Mesenchymal Cell Transformation in the Embryonic Heart*. Cells Tissues Organs, 2007. **185**(1-3): p. 146-156.
139. Rivera-Feliciano, J., et al., *Development of heart valves requires Gata4 expression in endothelial-derived cells*. Development, 2006. **133**(18): p. 3607-18.
140. Timmerman, L.A., et al., *Notch promotes epithelial-mesenchymal transition during cardiac development and oncogenic transformation*. Genes & Development, 2004. **18**(1): p. 99-115.
141. Ahmed, N., et al., *Molecular pathways regulating EGF-induced epithelial-mesenchymal transition in human ovarian surface epithelium*. Am J Physiol Cell Physiol, 2006. **290**(6): p. C1532-42.
142. Arnoux, V., et al., *Erk5 controls Slug expression and keratinocyte activation during wound healing*. Mol Biol Cell, 2008. **19**(11): p. 4738-49.
143. Iwano, M., et al., *Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis*. J Clin Invest, 2002. **110**(3): p. 341-50.
144. Kim, K.K., et al., *Alveolar epithelial cell mesenchymal transition develops in vivo during pulmonary fibrosis and is regulated by the extracellular matrix*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(35): p. 13180-5.
145. Mani, S.A., et al., *The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells*. Cell, 2008. **133**(4): p. 704-15.
146. Thompson, E.W., D.F. Newgreen, and D. Tarin, *Carcinoma invasion and metastasis: a role for epithelial-mesenchymal transition?* Cancer Res, 2005. **65**(14): p. 5991-5; discussion 5995.
147. Moody, S.E., et al., *The transcriptional repressor Snail promotes mammary tumor recurrence*. Cancer Cell, 2005. **8**(3): p. 197-209.
148. Tarin, D., E.W. Thompson, and D.F. Newgreen, *The fallacy of epithelial mesenchymal transition in neoplasia*. Cancer Res, 2005. **65**(14): p. 5996-6000; discussion 6000-1.
149. Brabletz, T., et al., *Invasion and metastasis in colorectal cancer: epithelial-mesenchymal transition, mesenchymal-epithelial transition, stem cells and beta-catenin*. Cells Tissues Organs, 2005. **179**(1-2): p. 56-65.
150. Rosivatz, E., et al., *Expression and nuclear localization of Snail, an E-cadherin repressor, in adenocarcinomas of the upper gastrointestinal tract*. Virchows Arch, 2006. **448**(3): p. 277-87.

151. Brabletz, T., et al., *Variable beta-catenin expression in colorectal cancers indicates tumor progression driven by the tumor environment*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(18): p. 10356-61.
152. Nieto, M.A., *The snail superfamily of zinc-finger transcription factors*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002. **3**(3): p. 155-66.
153. Massari, M.E. and C. Murre, *Helix-loop-helix proteins: regulators of transcription in eucaryotic organisms*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(2): p. 429-40.
154. Postigo, A.A., et al., *Regulation of Smad signaling through a differential recruitment of coactivators and corepressors by ZEB proteins*. EMBO J, 2003. **22**(10): p. 2453-62.
155. Van de Putte, T., et al., *Mice lacking ZFH1B, the gene that codes for Smad-interacting protein-1, reveal a role for multiple neural crest cell defects in the etiology of Hirschsprung disease-mental retardation syndrome*. Am J Hum Genet, 2003. **72**(2): p. 465-70.
156. Moreno-Bueno, G., F. Portillo, and A. Cano, *Transcriptional regulation of cell polarity in EMT and cancer*. Oncogene, 2008. **27**(55): p. 6958-69.
157. Spaderna, S., et al., *The transcriptional repressor ZEB1 promotes metastasis and loss of cell polarity in cancer*. Cancer Res, 2008. **68**(2): p. 537-44.
158. Radisky, D.C., et al., *Rac1b and reactive oxygen species mediate MMP-3-induced EMT and genomic instability*. Nature, 2005. **436**(7047): p. 123-7.
159. Billottet, C., et al., *Modulation of several waves of gene expression during FGF-1 induced epithelial-mesenchymal transition of carcinoma cells*. J Cell Biochem, 2008. **104**(3): p. 826-39.
160. Zhang, K., et al., *Slug enhances invasion ability of pancreatic cancer cells through upregulation of matrix metalloproteinase-9 and actin cytoskeleton remodeling*. Lab Invest, 2011. **91**(3): p. 426-38.
161. Said, N.A. and E.D. Williams, *Growth factors in induction of epithelial-mesenchymal transition and metastasis*. Cells Tissues Organs, 2011. **193**(1-2): p. 85-97.
162. Wendt, M.K., M. Tian, and W.P. Schiemann, *Deconstructing the mechanisms and consequences of TGF-beta-induced EMT during cancer progression*. Cell Tissue Res, 2011.
163. Parvani, J.G., M.A. Taylor, and W.P. Schiemann, *Noncanonical TGF-beta signaling during mammary tumorigenesis*. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2011. **16**(2): p. 127-46.
164. Wendt, M.K., J.A. Smith, and W.P. Schiemann, *p130Cas is required for mammary tumor growth and transforming growth factor-beta-mediated metastasis through regulation of Smad2/3 activity*. J Biol Chem, 2009. **284**(49): p. 34145-56.
165. Thuault, S., et al., *Transforming growth factor-beta employs HMGA2 to elicit epithelial-mesenchymal transition*. J Cell Biol, 2006. **174**(2): p. 175-83.
166. Verschuere, K., et al., *SIP1, a novel zinc finger/homeodomain repressor, interacts with Smad proteins and binds to 5'-CACCT sequences in candidate target genes*. J Biol Chem, 1999. **274**(29): p. 20489-98.
167. Taube, J.H., et al., *Core epithelial-to-mesenchymal transition interactome gene-expression signature is associated with claudin-low and metaplastic breast cancer subtypes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(35): p. 15449-54.
168. Cano, A. and M.A. Nieto, *Non-coding RNAs take centre stage in epithelial-to-mesenchymal transition*. Trends Cell Biol, 2008. **18**(8): p. 357-9.

169. Beltran, M., et al., *A natural antisense transcript regulates Zeb2/Sip1 gene expression during Snail1-induced epithelial-mesenchymal transition*. Genes Dev, 2008. **22**(6): p. 756-69.
170. Bracken, C.P., et al., *A double-negative feedback loop between ZEB1-SIP1 and the microRNA-200 family regulates epithelial-mesenchymal transition*. Cancer Res, 2008. **68**(19): p. 7846-54.
171. Christoffersen, N.R., et al., *miR-200b mediates post-transcriptional repression of ZFX1B*. RNA, 2007. **13**(8): p. 1172-8.
172. Gregory, P.A., et al., *The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1*. Nat Cell Biol, 2008. **10**(5): p. 593-601.
173. Korpai, M., et al., *The miR-200 family inhibits epithelial-mesenchymal transition and cancer cell migration by direct targeting of E-cadherin transcriptional repressors ZEB1 and ZEB2*. J Biol Chem, 2008. **283**(22): p. 14910-4.
174. Park, S.M., et al., *The miR-200 family determines the epithelial phenotype of cancer cells by targeting the E-cadherin repressors ZEB1 and ZEB2*. Genes Dev, 2008. **22**(7): p. 894-907.
175. Lee, R.C., R.L. Feinbaum, and V. Ambros, *The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14*. Cell, 1993. **75**(5): p. 843-54.
176. Reinhart, B.J., et al., *The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in Caenorhabditis elegans*. Nature, 2000. **403**(6772): p. 901-6.
177. Chapman, E.J. and J.C. Carrington, *Specialization and evolution of endogenous small RNA pathways*. Nat Rev Genet, 2007. **8**(11): p. 884-96.
178. Millar, A.A. and P.M. Waterhouse, *Plant and animal microRNAs: similarities and differences*. Funct Integr Genomics, 2005. **5**(3): p. 129-35.
179. Molnar, A., et al., *miRNAs control gene expression in the single-cell alga Chlamydomonas reinhardtii*. Nature, 2007. **447**(7148): p. 1126-9.
180. Kloosterman, W.P. and R.H. Plasterk, *The diverse functions of microRNAs in animal development and disease*. Dev Cell, 2006. **11**(4): p. 441-50.
181. Krol, J., I. Loedige, and W. Filipowicz, *The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay*. Nat Rev Genet, 2010. **11**(9): p. 597-610.
182. Friedman, R.C., et al., *Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs*. Genome Res, 2009. **19**(1): p. 92-105.
183. Berezikov, E., et al., *Mammalian mirtron genes*. Mol Cell, 2007. **28**(2): p. 328-36.
184. Ruby, J.G., C.H. Jan, and D.P. Bartel, *Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing*. Nature, 2007. **448**(7149): p. 83-6.
185. Babiarz, J.E., et al., *Mouse ES cells express endogenous shRNAs, siRNAs, and other Microprocessor-independent, Dicer-dependent small RNAs*. Genes Dev, 2008. **22**(20): p. 2773-85.
186. Ender, C., et al., *A human snoRNA with microRNA-like functions*. Mol Cell, 2008. **32**(4): p. 519-28.
187. Winter, J. and S. Diederichs, *MicroRNA biogenesis and cancer*. Methods Mol Biol, 2011. **676**: p. 3-22.
188. Lee, Y., et al., *MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II*. EMBO J, 2004. **23**(20): p. 4051-60.
189. Borchert, G.M., W. Lanier, and B.L. Davidson, *RNA polymerase III transcribes human microRNAs*. Nat Struct Mol Biol, 2006. **13**(12): p. 1097-101.

190. Kim, V.N., *MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2005. **6**(5): p. 376-85.
191. Kim, V.N., J. Han, and M.C. Siomi, *Biogenesis of small RNAs in animals*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2009. **10**(2): p. 126-39.
192. Seitz, H. and P.D. Zamore, *Rethinking the microprocessor*. Cell, 2006. **125**(5): p. 827-9.
193. Kim, Y.K. and V.N. Kim, *Processing of intronic microRNAs*. EMBO J, 2007. **26**(3): p. 775-83.
194. Lund, E., et al., *Nuclear export of microRNA precursors*. Science, 2004. **303**(5654): p. 95-8.
195. Khvorovova, A., A. Reynolds, and S.D. Jayasena, *Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias*. Cell, 2003. **115**(2): p. 209-16.
196. Hammond, S.M., et al., *Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi*. Science, 2001. **293**(5532): p. 1146-50.
197. Hutvagner, G. and P.D. Zamore, *A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex*. Science, 2002. **297**(5589): p. 2056-60.
198. Martinez, J., et al., *Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi*. Cell, 2002. **110**(5): p. 563-74.
199. Mourelatos, Z., et al., *miRNPs: a novel class of ribonucleoproteins containing numerous microRNAs*. Genes Dev, 2002. **16**(6): p. 720-8.
200. Tomari, Y. and P.D. Zamore, *Perspective: machines for RNAi*. Genes Dev, 2005. **19**(5): p. 517-29.
201. Pillai, R.S., C.G. Artus, and W. Filipowicz, *Tethering of human Ago proteins to mRNA mimics the miRNA-mediated repression of protein synthesis*. RNA, 2004. **10**(10): p. 1518-25.
202. Peters, L. and G. Meister, *Argonaute proteins: mediators of RNA silencing*. Mol Cell, 2007. **26**(5): p. 611-23.
203. Lytle, J.R., T.A. Yario, and J.A. Steitz, *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, 2007. **104**(23): p. 9667-72.
204. Ambros, V., *The functions of animal microRNAs*. Nature, 2004. **431**(7006): p. 350-5.
205. Bartel, D.P., *MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function*. Cell, 2004. **116**(2): p. 281-97.
206. Mello, C.C. and D. Conte, Jr., *Revealing the world of RNA interference*. Nature, 2004. **431**(7006): p. 338-42.
207. Song, J.J., et al., *Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity*. Science, 2004. **305**(5689): p. 1434-7.
208. Filipowicz, W., S.N. Bhattacharyya, and N. Sonenberg, *Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight?* Nat Rev Genet, 2008. **9**(2): p. 102-14.
209. Grimson, A., et al., *MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing*. Mol Cell, 2007. **27**(1): p. 91-105.
210. Doench, J.G. and P.A. Sharp, *Specificity of microRNA target selection in translational repression*. Genes Dev, 2004. **18**(5): p. 504-11.
211. Lewis, B.P., C.B. Burge, and D.P. Bartel, *Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets*. Cell, 2005. **120**(1): p. 15-20.

212. Brodersen, P. and O. Voinnet, *Revisiting the principles of microRNA target recognition and mode of action*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2009. **10**(2): p. 141-8.
213. Meister, G., *miRNAs get an early start on translational silencing*. Cell, 2007. **131**(1): p. 25-8.
214. Tay, Y., et al., *MicroRNAs to Nanog, Oct4 and Sox2 coding regions modulate embryonic stem cell differentiation*. Nature, 2008. **455**(7216): p. 1124-8.
215. Elbashir, S.M., et al., *Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells*. Nature, 2001. **411**(6836): p. 494-8.
216. Liu, J., et al., *Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi*. Science, 2004. **305**(5689): p. 1437-41.
217. Meister, G., et al., *Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs*. Mol Cell, 2004. **15**(2): p. 185-97.
218. Gingras, A.C., B. Raught, and N. Sonenberg, *eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation*. Annu Rev Biochem, 1999. **68**: p. 913-63.
219. Humphreys, D.T., et al., *MicroRNAs control translation initiation by inhibiting eukaryotic initiation factor 4E/cap and poly(A) tail function*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(47): p. 16961-6.
220. Pillai, R.S., et al., *Inhibition of translational initiation by Let-7 MicroRNA in human cells*. Science, 2005. **309**(5740): p. 1573-6.
221. Wang, B., et al., *Recapitulation of short RNA-directed translational gene silencing in vitro*. Mol Cell, 2006. **22**(4): p. 553-60.
222. Mathonnet, G., et al., *MicroRNA inhibition of translation initiation in vitro by targeting the cap-binding complex eIF4F*. Science, 2007. **317**(5845): p. 1764-7.
223. Ding, L. and M. Han, *GW182 family proteins are crucial for microRNA-mediated gene silencing*. Trends in Cell Biology, 2007. **17**(8): p. 411-416.
224. Gebauer, F. and M.W. Hentze, *Molecular mechanisms of translational control*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2004. **5**(10): p. 827-35.
225. Richter, J.D. and N. Sonenberg, *Regulation of cap-dependent translation by eIF4E inhibitory proteins*. Nature, 2005. **433**(7025): p. 477-80.
226. Carmell, M.A., et al., *The Argonaute family: tentacles that reach into RNAi, developmental control, stem cell maintenance, and tumorigenesis*. Genes Dev, 2002. **16**(21): p. 2733-42.
227. Parker, J.S., S.M. Roe, and D. Barford, *Crystal structure of a PIWI protein suggests mechanisms for siRNA recognition and slicer activity*. EMBO J, 2004. **23**(24): p. 4727-37.
228. Yuan, Y.R., et al., *Crystal structure of A. aeolicus argonaute, a site-specific DNA-guided endoribonuclease, provides insights into RISC-mediated mRNA cleavage*. Mol Cell, 2005. **19**(3): p. 405-19.
229. Kiriakidou, M., et al., *An mRNA m7G cap binding-like motif within human Ago2 represses translation*. Cell, 2007. **129**(6): p. 1141-51.
230. Wakiyama, M., et al., *Let-7 microRNA-mediated mRNA deadenylation and translational repression in a mammalian cell-free system*. Genes Dev, 2007. **21**(15): p. 1857-62.
231. Jakymiw, A., et al., *The role of GW/P-bodies in RNA processing and silencing*. J Cell Sci, 2007. **120**(Pt 8): p. 1317-23.
232. Liu, J., et al., *A role for the P-body component GW182 in microRNA function*. Nat Cell Biol, 2005. **7**(12): p. 1261-6.

233. Meister, G., et al., *Identification of novel argonaute-associated proteins*. Curr Biol, 2005. **15**(23): p. 2149-55.
234. Fabian, M.R., N. Sonenberg, and W. Filipowicz, *Regulation of mRNA Translation and Stability by microRNAs*. Annual Review of Biochemistry, 2010. **79**(1): p. 351-379.
235. Sheth, U. and R. Parker, *Decapping and decay of messenger RNA occur in cytoplasmic processing bodies*. Science, 2003. **300**(5620): p. 805-8.
236. Sen, G.L. and H.M. Blau, *Argonaute 2/RISC resides in sites of mammalian mRNA decay known as cytoplasmic bodies*. Nat Cell Biol, 2005. **7**(6): p. 633-6.
237. Bhattacharyya, S.N., et al., *Stress-induced reversal of microRNA repression and mRNA P-body localization in human cells*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 2006. **71**: p. 513-21.
238. Maroney, P.A., et al., *Evidence that microRNAs are associated with translating messenger RNAs in human cells*. Nat Struct Mol Biol, 2006. **13**(12): p. 1102-7.
239. Nottrott, S., M.J. Simard, and J.D. Richter, *Human let-7a miRNA blocks protein production on actively translating polyribosomes*. Nat Struct Mol Biol, 2006. **13**(12): p. 1108-14.
240. Olsen, P.H. and V. Ambros, *The lin-4 regulatory RNA controls developmental timing in Caenorhabditis elegans by blocking LIN-14 protein synthesis after the initiation of translation*. Dev Biol, 1999. **216**(2): p. 671-80.
241. Petersen, C.P., et al., *Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells*. Mol Cell, 2006. **21**(4): p. 533-42.
242. Seggerson, K., L. Tang, and E.G. Moss, *Two genetic circuits repress the Caenorhabditis elegans heterochronic gene lin-28 after translation initiation*. Dev Biol, 2002. **243**(2): p. 215-25.
243. Zeng, Y., E.J. Wagner, and B.R. Cullen, *Both natural and designed micro RNAs can inhibit the expression of cognate mRNAs when expressed in human cells*. Mol Cell, 2002. **9**(6): p. 1327-33.
244. Llave, C., et al., *Cleavage of Scarecrow-like mRNA targets directed by a class of Arabidopsis miRNA*. Science, 2002. **297**(5589): p. 2053-6.
245. Brennecke, J., et al., *bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene hid in Drosophila*. Cell, 2003. **113**(1): p. 25-36.
246. Schmitter, D., et al., *Effects of Dicer and Argonaute down-regulation on mRNA levels in human HEK293 cells*. Nucleic Acids Res, 2006. **34**(17): p. 4801-15.
247. Vasudevan, S., Y. Tong, and J.A. Steitz, *Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation*. Science, 2007. **318**(5858): p. 1931-4.
248. Vasudevan, S. and J.A. Steitz, *AU-rich-element-mediated upregulation of translation by FXR1 and Argonaute 2*. Cell, 2007. **128**(6): p. 1105-18.
249. Huang, Y., et al., *Biological functions of microRNAs: a review*. J Physiol Biochem, 2011. **67**(1): p. 129-39.
250. Lecellier, C.H., et al., *A cellular microRNA mediates antiviral defense in human cells*. Science, 2005. **308**(5721): p. 557-60.
251. Huang, J., et al., *Cellular microRNAs contribute to HIV-1 latency in resting primary CD4+ T lymphocytes*. Nat Med, 2007. **13**(10): p. 1241-7.
252. Jopling, C.L., et al., *Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA*. Science, 2005. **309**(5740): p. 1577-81.

253. Pedersen, I.M., et al., *Interferon modulation of cellular microRNAs as an antiviral mechanism*. Nature, 2007. **449**(7164): p. 919-22.
254. Farazi, T.A., et al., *miRNAs in human cancer*. J Pathol, 2011. **223**(2): p. 102-15.
255. Baltimore, D., et al., *MicroRNAs: new regulators of immune cell development and function*. Nat Immunol, 2008. **9**(8): p. 839-45.
256. O'Connell, R.M., et al., *MicroRNA-155 is induced during the macrophage inflammatory response*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(5): p. 1604-9.
257. Taganov, K.D., et al., *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, 2006. **103**(33): p. 12481-6.
258. Akao, Y., Y. Nakagawa, and T. Naoe, *MicroRNAs 143 and 145 are possible common onco-microRNAs in human cancers*. Oncol Rep, 2006. **16**(4): p. 845-50.
259. Iorio, M.V., et al., *MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer*. Cancer Res, 2005. **65**(16): p. 7065-70.
260. Pekarsky, Y., et al., *Tcl1 expression in chronic lymphocytic leukemia is regulated by miR-29 and miR-181*. Cancer Res, 2006. **66**(24): p. 11590-3.
261. Costinean, S., et al., *Pre-B cell proliferation and lymphoblastic leukemia/high-grade lymphoma in E(mu)-miR155 transgenic mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(18): p. 7024-9.
262. Ma, L., et al., *miR-9, a MYC/MYCN-activated microRNA, regulates E-cadherin and cancer metastasis*. Nat Cell Biol, 2010. **12**(3): p. 247-56.
263. Wang, Z., et al., *Suppression of p21 by c-Myc through members of miR-17 family at the post-transcriptional level*. Int J Oncol, 2010. **37**(5): p. 1315-21.
264. Wang, J., et al., *MicroRNA expression and its implication for the diagnosis and therapeutic strategies of gastric cancer*. Cancer Lett, 2010. **297**(2): p. 137-43.
265. Du, Y., et al., *Down-regulation of miR-141 in gastric cancer and its involvement in cell growth*. J Gastroenterol, 2009. **44**(6): p. 556-61.
266. Zhang, Z., et al., *miR-21 plays a pivotal role in gastric cancer pathogenesis and progression*. Lab Invest, 2008. **88**(12): p. 1358-66.
267. Petrocca, F., et al., *E2F1-regulated microRNAs impair TGFbeta-dependent cell-cycle arrest and apoptosis in gastric cancer*. Cancer Cell, 2008. **13**(3): p. 272-86.
268. Kim, M.S., et al., *Somatic mutations and losses of expression of microRNA regulation-related genes AGO2 and TNRC6A in gastric and colorectal cancers*. J Pathol, 2010. **221**(2): p. 139-46.
269. Matsushima, K., et al., *MicroRNA signatures in Helicobacter pylori-infected gastric mucosa*. Int J Cancer, 2011. **128**(2): p. 361-70.
270. Chen, X.M., et al., *A cellular micro-RNA, let-7i, regulates Toll-like receptor 4 expression and contributes to cholangiocyte immune responses against Cryptosporidium parvum infection*. J Biol Chem, 2007. **282**(39): p. 28929-38.
271. Roush, S. and F.J. Slack, *The let-7 family of microRNAs*. Trends Cell Biol, 2008. **18**(10): p. 505-16.
272. Ando, T., et al., *DNA methylation of microRNA genes in gastric mucosae of gastric cancer patients: its possible involvement in the formation of epigenetic field defect*. Int J Cancer, 2009. **124**(10): p. 2367-74.
273. Siomi, H. and M.C. Siomi, *Posttranscriptional regulation of microRNA biogenesis in animals*. Mol Cell, 2010. **38**(3): p. 323-32.
274. Hwang, H.W., E.A. Wentzel, and J.T. Mendell, *A hexanucleotide element directs microRNA nuclear import*. Science, 2007. **315**(5808): p. 97-100.

275. Ramachandran, V. and X. Chen, *Degradation of microRNAs by a family of exoribonucleases in Arabidopsis*. Science, 2008. **321**(5895): p. 1490-2.
276. Chatterjee, S. and H. Grosshans, *Active turnover modulates mature microRNA activity in Caenorhabditis elegans*. Nature, 2009. **461**(7263): p. 546-9.
277. Gibbings, D.J., et al., *Multivesicular bodies associate with components of miRNA effector complexes and modulate miRNA activity*. Nat Cell Biol, 2009. **11**(9): p. 1143-9.
278. Gregory, R.I., et al., *The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs*. Nature, 2004. **432**(7014): p. 235-40.
279. Han, J., et al., *Posttranscriptional crossregulation between Drosha and DGCR8*. Cell, 2009. **136**(1): p. 75-84.
280. Triboulet, R., et al., *Post-transcriptional control of DGCR8 expression by the Microprocessor*. RNA, 2009. **15**(6): p. 1005-11.
281. Suzuki, H.I., et al., *Modulation of microRNA processing by p53*. Nature, 2009. **460**(7254): p. 529-33.
282. Heo, I., et al., *TUT4 in concert with Lin28 suppresses microRNA biogenesis through pre-microRNA uridylation*. Cell, 2009. **138**(4): p. 696-708.
283. Davis, B.N., et al., *SMAD proteins control DROSHA-mediated microRNA maturation*. Nature, 2008. **454**(7200): p. 56-61.
284. Han, L., et al., *DNA methylation regulates MicroRNA expression*. Cancer Biol Ther, 2007. **6**(8): p. 1284-8.
285. Burk, 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**(6): p. 582-9.
286. Hurteau, G.J., et al., *Overexpression of the microRNA hsa-miR-200c leads to reduced expression of transcription factor 8 and increased expression of E-cadherin*. Cancer Res, 2007. **67**(17): p. 7972-6.
287. Korpai, M., et al., *The miR-200 Family Inhibits Epithelial-Mesenchymal Transition and Cancer Cell Migration by Direct Targeting of E-cadherin Transcriptional Repressors ZEB1 and ZEB2*. Journal of Biological Chemistry, 2008. **283**(22): p. 14910-14914.
288. Adam, L., et al., *miR-200 expression regulates epithelial-to-mesenchymal transition in bladder cancer cells and reverses resistance to epidermal growth factor receptor therapy*. Clin Cancer Res, 2009. **15**(16): p. 5060-72.
289. Hyun, S., et al., *Conserved MicroRNA miR-8/miR-200 and its target USH/FOG2 control growth by regulating PI3K*. Cell, 2009. **139**(6): p. 1096-108.
290. Shimono, Y., et al., *Downregulation of miRNA-200c links breast cancer stem cells with normal stem cells*. Cell, 2009. **138**(3): p. 592-603.
291. Wellner, U., et al., *The EMT-activator ZEB1 promotes tumorigenicity by repressing stemness-inhibiting microRNAs*. Nat Cell Biol, 2009. **11**(12): p. 1487-95.
292. Sossey-Alaoui, K., K. Bialkowska, and E.F. Plow, *The miR200 family of microRNAs regulates WAVE3-dependent cancer cell invasion*. J Biol Chem, 2009. **284**(48): p. 33019-29.
293. Xia, H., et al., *miR-200a-mediated downregulation of ZEB2 and CTNNB1 differentially inhibits nasopharyngeal carcinoma cell growth, migration and invasion*. Biochem Biophys Res Commun, 2010. **391**(1): p. 535-41.
294. Cochrane, D.R., et al., *Loss of miR-200c: A Marker of Aggressiveness and Chemoresistance in Female Reproductive Cancers*. J Oncol, 2010. **2010**: p. 821717.

295. Uhlmann, S., et al., *miR-200bc/429 cluster targets PLCgamma1 and differentially regulates proliferation and EGF-driven invasion than miR-200a/141 in breast cancer*. *Oncogene*, 2010. **29**(30): p. 4297-306.
296. Schickel, R., et al., *miR-200c regulates induction of apoptosis through CD95 by targeting FAP-1*. *Mol Cell*, 2010. **38**(6): p. 908-15.
297. Xia, W., et al., *MicroRNA-200b regulates cyclin D1 expression and promotes S-phase entry by targeting RND3 in HeLa cells*. *Mol Cell Biochem*, 2010. **344**(1-2): p. 261-6.
298. Zhu, W., et al., *miR-200bc/429 cluster modulates multidrug resistance of human cancer cell lines by targeting BCL2 and XIAP*. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*: p. 1-9.
299. Iliopoulos, D., et al., *Loss of miR-200 Inhibition of Suz12 Leads to Polycomb-Mediated Repression Required for the Formation and Maintenance of Cancer Stem Cells*. *Molecular Cell*, 2010. **39**(5): p. 761-772.
300. Gregory, P.A., et al., *An autocrine TGF-beta/ZEB/miR-200 signaling network regulates establishment and maintenance of epithelial-mesenchymal transition*. *Mol Biol Cell*, 2011. **22**(10): p. 1686-98.
301. Brabletz, S. and T. Brabletz, *The ZEB/miR-200 feedback loop--a motor of cellular plasticity in development and cancer?* *EMBO Rep*, 2010. **11**(9): p. 670-7.
302. Fischer, W. and R. Haas, *The RecA protein of Helicobacter pylori requires a posttranslational modification for full activity*. *J Bacteriol*, 2004. **186**(3): p. 777-84.
303. Menard, R., P.J. Sansonetti, and C. Parsot, *Nonpolar mutagenesis of the ipa genes defines IpaB, IpaC, and IpaD as effectors of Shigella flexneri entry into epithelial cells*. *J Bacteriol*, 1993. **175**(18): p. 5899-906.
304. Saito, Y., et al., *Conversion of Helicobacter pylori CagA from senescence inducer to oncogenic driver through polarity-dependent regulation of p21*. *J Exp Med*, 2010. **207**(10): p. 2157-74.
305. Guillemin, K., et al., *Cag pathogenicity island-specific responses of gastric epithelial cells to Helicobacter pylori infection*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2002. **99**(23): p. 15136-15141.
306. Hofman, V.J., et al., *Gene expression profiling in human gastric mucosa infected with Helicobacter pylori*. *Mod Pathol*, 2007. **20**(9): p. 974-989.
307. Sohn, S.-H. and Y.-C. Lee, *The genome-wide expression profile of gastric epithelial cells infected by naturally occurring cagA isogenic strains of Helicobacter pylori*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2011. **32**(3): p. 382-389.
308. Fassi Fehri, L., et al., *Helicobacter pylori induces miR-155 in T cells in a cAMP-Foxp3-dependent manner*. *PLoS One*, 2010. **5**(3): p. e9500.
309. Saito, Y., et al., *Dysfunctional Gastric Emptying With Down-regulation of Muscle-Specific MicroRNAs in Helicobacter pylori-Infected Mice*. *Gastroenterology*, 2011. **140**(1): p. 189-198.
310. Belair, C., et al., *Helicobacter pylori interferes with an embryonic stem cell miRNA cluster to block cell cycle progression*. *Silence*, 2011. **2**(1): p. 7.
311. Judson, R.L., et al., *Embryonic stem cell-specific microRNAs promote induced pluripotency*. *Nat Biotech*, 2009. **27**(5): p. 459-461.
312. Qi, J., et al., *microRNAs regulate human embryonic stem cell division*. *Cell Cycle*, 2009. **8**(22): p. 3729-3741.
313. Wang, Y., et al., *Embryonic stem cell-specific microRNAs regulate the G1-S transition and promote rapid proliferation*. *Nat Genet*, 2008. **40**(12): p. 1478-1483.

314. Lee, K.-H., et al., *MicroRNA-373 (miR-373) post-transcriptionally regulates large tumor suppressor, homolog 2 (LATS2) and stimulates proliferation in human esophageal cancer*. Experimental Cell Research, 2009. **315**(15): p. 2529-2538.
315. Rippe, V., et al., *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, 2010. **5**(3): p. e9485.
316. Voorhoeve, P.M., et al., *A Genetic Screen Implicates miRNA-372 and miRNA-373 As Oncogenes in Testicular Germ Cell Tumors*. Cell, 2006. **124**(6): p. 1169-1181.
317. Kim, Y.-K., et al., *Functional links between clustered microRNAs: suppression of cell-cycle inhibitors by microRNA clusters in gastric cancer*. Nucleic Acids Research, 2009. **37**(5): p. 1672-1681.
318. Cabral, M.M., et al., *Gastric epithelial cell proliferation and cagA status in Helicobacter pylori gastritis at different gastric sites*. Scand J Gastroenterol, 2007. **42**(5): p. 545-54.
319. Shinozaki, A., et al., *Downregulation of MicroRNA-200 in EBV-Associated Gastric Carcinoma*. Cancer Research, 2010. **70**(11): p. 4719-4727.
320. Eger, A., et al., *DeltaEF1 is a transcriptional repressor of E-cadherin and regulates epithelial plasticity in breast cancer cells*. Oncogene, 2005. **24**(14): p. 2375-85.
321. Sarkar, F.H., et al., *NF- κ B Signaling Pathway and Its Therapeutic Implications in Human Diseases*. International Reviews of Immunology, 2008. **27**(5): p. 293-319.
322. Huber, M.A., et al., *NF- κ B is essential for epithelial-mesenchymal transition and metastasis in a model of breast cancer progression*. The Journal of Clinical Investigation, 2004. **114**(4): p. 569-581.
323. Wang, X., et al., *Oestrogen signalling inhibits invasive phenotype by repressing RelB and its target BCL2*. Nat Cell Biol, 2007. **9**(4): p. 470-478.
324. Chua, H.L., et al., *NF-kappaB represses E-cadherin expression and enhances epithelial to mesenchymal transition of mammary epithelial cells: potential involvement of ZEB-1 and ZEB-2*. Oncogene, 2007. **26**(5): p. 711-24.
325. Kim, H.-J., et al., *Constitutively Active Type I Insulin-Like Growth Factor Receptor Causes Transformation and Xenograft Growth of Immortalized Mammary Epithelial Cells and Is Accompanied by an Epithelial-to-Mesenchymal Transition Mediated by NF- κ B and Snail*. Mol. Cell. Biol., 2007. **27**(8): p. 3165-3175.
326. Pham, C.G., et al., *Upregulation of Twist-1 by NF- κ B Blocks Cytotoxicity Induced by Chemotherapeutic Drugs*. Mol. Cell. Biol., 2007. **27**(11): p. 3920-3935.
327. Lilienbaum, A. and D. Paulin, *Activation of the human vimentin gene by the Tax human T-cell leukemia virus. I. Mechanisms of regulation by the NF-kappa B transcription factor*. Journal of Biological Chemistry, 1993. **268**(3): p. 2180-8.
328. Farina, A.R., et al., *Transcriptional Up-Regulation of Matrix Metalloproteinase-9 Expression during Spontaneous Epithelial to Neuroblast Phenotype Conversion by SK-N-SH Neuroblastoma Cells, Involved in Enhanced Invasivity, Depends upon GT-Box and Nuclear Factor κ B Elements*. Cell Growth Differ, 1999. **10**(5): p. 353-367.
329. Himelstein, B.P., et al., *Transcriptional activation of the matrix metalloproteinase-9 gene in an H-ras and v-myc transformed rat embryo cell line*. Oncogene, 1997. **14**(16): p. 1995-8.
330. Hwang, W.L., et al., *SNAIL regulates interleukin-8 expression, stem cell-like activity, and tumorigenicity of human colorectal carcinoma cells*. Gastroenterology, 2011. **141**(1): p. 279-91, 291 e1-5.

331. Fernando, R.I., et al., *IL-8 signaling plays a critical role in the epithelial-mesenchymal transition of human carcinoma cells*. Cancer Res, 2011. **71**(15): p. 5296-306.
332. Yamamoto, Y. and R.B. Gaynor, *Therapeutic potential of inhibition of the NF- κ B pathway in the treatment of inflammation and cancer*. The Journal of Clinical Investigation, 2001. **107**(2): p. 135-142.
333. Bharti, A.C. and B.B. Aggarwal, *Nuclear factor-kappa B and cancer: its role in prevention and therapy*. Biochemical Pharmacology, 2002. **64**(5-6): p. 883-888.
334. Xu, J., S. Lamouille, and R. Derynck, *TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition*. Cell Res, 2009. **19**(2): p. 156-72.
335. Subramanyam, D., et al., *Multiple targets of miR-302 and miR-372 promote reprogramming of human fibroblasts to induced pluripotent stem cells*. Nat Biotech, 2011. **29**(5): p. 443-448.
336. Beswick, E.J., et al., *Role of Gastric Epithelial Cell-Derived Transforming Growth Factor {beta} in Reduced CD4+ T Cell Proliferation and Development of Regulatory T Cells during Helicobacter pylori Infection*. Infect. Immun., 2011. **79**(7): p. 2737-2745.
337. Yamaguchi, K., et al., *Identification of a member of the MAPKKK family as a potential mediator of TGF-beta signal transduction*. Science, 1995. **270**(5244): p. 2008-11.
338. Lamb, A., et al., *Helicobacter pylori CagA activates NF-[kappa]B by targeting TAK1 for TRAF6-mediated Lys 63 ubiquitination*. EMBO Rep, 2009. **10**(11): p. 1242-1249.
339. Jo, Y., et al., *Suppressed Gastric Mucosal TGF-beta1 Increases Susceptibility to H. pylori-Induced Gastric Inflammation and Ulceration: A Stupid Host Defense Response*. Gut Liver, 2010. **4**(1): p. 43-53.
340. Kandulski, A., et al., *Naturally Occurring Regulatory T cells (CD4+, CD25high, FOXP3+) in the Antrum and Cardia are Associated with Higher H. pylori Colonization and Increased Gene Expression of TGF- β 1*. Helicobacter, 2008. **13**(4): p. 295-303.
341. Arnold, I.C., et al., *Tolerance Rather Than Immunity Protects From Helicobacter pylori-Induced Gastric Preneoplasia*. Gastroenterology, 2011. **140**(1): p. 199-209.e8.
342. Ménard, *nonpolar mutagenesis of the ipa genes defines IpaB, IpaC, and IpaD as effectors of shigella flexneri entry into epithelial cells*. journal of bacteriology, 1993.