



DAMGO. En revanche, chez des souris dépourvues de récepteurs μ -opioïdes, aucun de ces effecteurs n'induisait d'effet sur la NGI. Ainsi, les souris *knock-out* pour les récepteurs μ -opioïdes ne réduisaient pas leur apport alimentaire lorsqu'elles étaient soumises à un régime riche en protéines, contrairement aux souris sauvages qui le diminuaient de 20 %. Enfin, nous avons étudié la prise alimentaire des souris déficientes pour la NGI traitées avec un antagoniste des récepteurs μ -opioïdes ou chez lesquelles un dipeptide était infusé dans la veine porte. Tandis que les souris sauvages diminuaient leur prise alimentaire de 15 %, aucun effet n'était observé en l'absence de la néoglucogenèse intestinale [12].

Conclusion

Nous avons élucidé le mécanisme par lequel les protéines alimentaires exercent leur effet bien connu de satiété. Au cours de leur assimilation, les peptides libérés exercent un effet antagoniste sur les récepteurs μ -opioïdes des parois de la veine porte, qui se traduit par l'envoi d'un signal ner-

veux au niveau central. Un arc réflexe induit l'expression des gènes de la NGI et la libération de glucose dans le sang de la veine porte, ce qui induit alors une diminution de la sensation de faim (Figure 2). Il est intéressant de mentionner que cette séquence d'évènements requiert du temps. En effet, elle nécessite l'expression de certains gènes, et son effet peut ainsi perdurer après la fin du repas. C'est ce qui nous a permis de comprendre cette propriété unique des protéines qui diminuent la sensation de faim bien après le repas en cours, ce qui répond à la définition de la satiété. \diamond

Opioid receptors associated with portal vein regulate a gut-brain neural circuitry limiting food intake

LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

- Berthoud H. Anatomy and function of sensory hepatic nerves. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 2004 ; 280 : 827-35.
- Mithieux G. A novel function of intestinal gluconeogenesis: central signaling in glucose and energy homeostasis. *Nutrition* 2009 ; 25 : 881-4.
- Mithieux G, Misery P, Magnan C, et al. Portal sensing of intestinal gluconeogenesis is a mechanistic link in the diminution of food intake induced by diet protein. *Cell Metab* 2005 ; 2 : 321-9.
- Pillot B, Soty M, Gautier-Stein A, et al. Protein feeding promotes redistribution of endogenous glucose production to the kidney and potentiates its suppression by insulin. *Endocrinology* 2009 ; 150 : 616-24.
- Penhoat A, Mutel E, Amigo-Correig M, et al. Protein-induced satiety is abolished in the absence of intestinal gluconeogenesis. *Physiol Behav* 2011 ; 105 : 89-3.
- Troy S, Soty M, Ribeiro L, et al. Intestinal gluconeogenesis is a key factor for early metabolic changes after gastric bypass but not after gastric lap-band in mice. *Cell Metab* 2008 ; 8 : 201-11.
- Zioudrou C, Streety R, Klee W. Opioid peptides derived from food proteins. *J Biol Chem* 1979 ; 254 : 2446-9.
- Yeomans M, Gray R. Opioid peptides and the control of human ingestive behaviour. *Neurosci Biobehav Rev* 2002 ; 26 : 713-28.
- Glass M, Billington C, Levine A. Opioids and food intake: distributed functional neural pathways? *Neuropeptides* 1999 ; 33 : 360-8.
- Hedner T, Cassuto J. Opioids and opioid receptors in peripheral tissues. *Scand J Gastroenterol* 1987 ; 130 : 27-46.
- Reimer K, Hopp M, Zenz M, et al. Meeting the challenges of opioid induced constipation in chronic pain management. A novel approach. *Pharmacology* 2009 ; 83 : 10-7.
- Durauffourd C, De Vadder F, Goncalves D et al. Mu-opioid receptors and dietary protein stimulate a gut-brain neural circuitry limiting food intake. *Cell* 2012 ; 150 : 377-88.
- Lee VH. Membrane transporters. *Eur J Pharm Sci* 2000 ; 11 : S41-50.

NOUVELLE

Structure et mode d'injection de l'oncoprotéine CagA d'*Helicobacter pylori*

Burcu Kaplan-Türköz, Laurent Terradot

CagA, la conspiratrice de la carcinogénèse bactérienne

Helicobacter pylori colonise l'estomac de plus de la moitié de la population mondiale et si la grande majorité des personnes infectées ne montrent aucun symptôme, 20 % d'entre elles développent un ulcère gastrique. Plus grave, chez 3 % des patients, la bactérie peut causer des adénocarcinomes ou des

lymphomes de type MALT (*mucosa-associated lymphoid tissue*) et font d'*H. pylori* la seule bactérie carcinogène de classe 1 (OMS, 1994). La protéine CagA (pour *cytotoxin associated gene A*) est une protéine d'environ 130 kDa produite par certaines souches d'*H. pylori* [1]. Les souches dites *cagA*-positives sont plus fréquemment associées aux cancers que les souches dites *cagA*-négatives.

Institut de biologie et chimie des protéines, université Lyon 1, France ; CNRS, UMR 5086 - bases moléculaires et structurales des systèmes infectieux ; 7, passage du Vercors, 69367 Lyon, France. laurent.terrardot@ibcp.fr

Lorsque CagA est surexprimée dans des souris transgéniques, la protéine provoque l'apparition de tumeurs gastriques et de leucémies [2], démontrant un lien direct entre la protéine bactérienne et l'apparition de cancers. Les souches *cagA*-positives portent également une batterie de gènes qui codent pour un appareil de sécrétion de type IV (T4SS) [11]. Cet appareil s'apparente

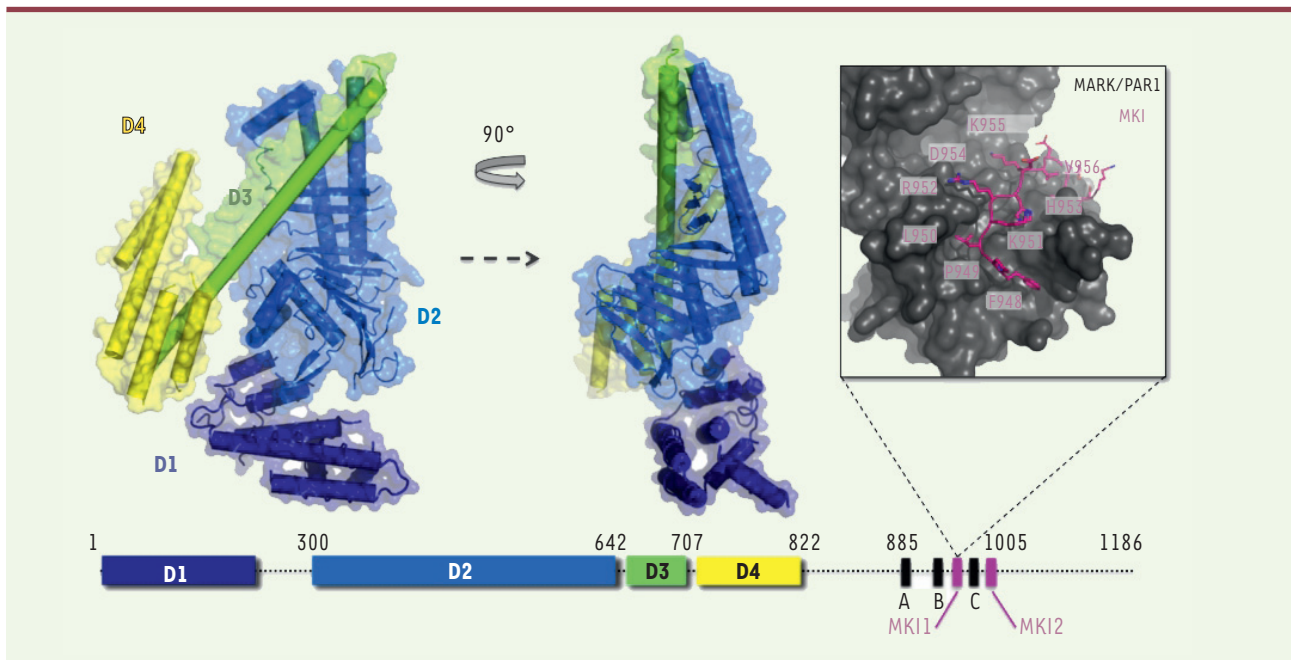


Figure 1. Structure de CagA. Structure cristalline de CagA (résidus 1 à 884) représentée en rubans et tubes (hélices) colorée selon les domaines : D1 (bleu foncé), D2 (bleu clair), D3 (vert) et D4 (jaune). À droite le complexe de la kinase MARK/PAR1 (gris) et du motif MKI de CagA (résidus 948-961) [4].

à une seringue moléculaire qui injecte l'oncoprotéine CagA dans les cellules épithéliales. Lors de l'infection, CagA est retrouvée à la pointe de la seringue moléculaire (*pilus* du T4SS). Cet appendice s'attache aux adhésions focales des cellules et utilise l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ comme récepteur. Une fois injectée, CagA reste à la surface interne de la membrane plasmique où elle interagit avec une pléthore de protéines humaines (revue dans [3]). Ainsi, CagA se lie à la kinase MARK1 (*MAP/microtubule affinity-regulating kinase 1*) par l'intermédiaire de motifs (appelés MKI) situés dans la portion carboxy-terminale (Figure 1). Ces séquences mimant le substrat naturel de la kinase et inhibent son activité, ce qui dérègle la polarité des cellules [4]. La partie carboxy-terminale de CagA peut être phosphorylée (CagA-P) par des kinases de la famille Src sur les tyrosines contenues dans des motifs EPIYA. CagA-P interagit avec les domaines SH2 de nombreuses protéines et en particulier avec ceux de la phosphatase SHP-2. La phosphatase est activée et déphosphoryle les protéines des voies de signalisation, ce

qui engendre prolifération et migration cellulaires.

Vers la détermination de la structure de CagA

Malgré l'importance médicale de CagA et l'abondance des études sur ses fonctions, la structure tridimensionnelle de cette protéine restait un mystère. La difficulté principale était d'obtenir un fragment stable de la protéine à partir de son expression recombinante dans *Escherichia coli*. Nous avons tout d'abord généré une librairie de clones par une approche à haut débit (ESPRIT) en espérant isoler un fragment du domaine carboxy-terminal, dont les fonctions étaient le mieux cernées. Si cette démarche n'a pas permis d'obtenir de structure, elle a apporté des informations déterminantes [5]. CagA est en fait constituée d'une partie carboxy-terminale non structurée lorsqu'elle est isolée, et d'un large fragment amino-terminal structuré et contenant des éléments de structure secondaire (Figure 1). Ce travail a très récemment abouti à la détermination

de la structure du fragment de CagA (résidus 1 à 884 sur 1186 au total) par cristallographie aux rayons X à une résolution de 3,6 Å [6].

CagA, une structure unique

La structure de CagA₁₋₈₈₄ est modulaire en forme de croissant de lune (Figure 1). Elle contient quatre domaines qui interagissent entre eux assez faiblement et de nombreuses zones restent mal définies. Le premier domaine (D1) est hélical, mais la densité électronique mal définie dans cette région n'a pas permis d'établir sa séquence exacte. Le cœur de la protéine est le domaine D2, formé d'un long feuillet bêta incurvé (*single layer beta sheet*-SLB) soutenu sur sa face convexe par un petit domaine globulaire (D2') et par trois hélices formant une épingle. D2 est prolongé par une longue hélice alpha amphipatique (D3) qui sépare D2 du domaine carboxy-terminal D4. Ce dernier est constitué de cinq hélices dont les trois premières forment un bouquet avec l'extrémité de D3. Ainsi, le dernier résidu apparent est Gln822, suggérant que la portion restante est

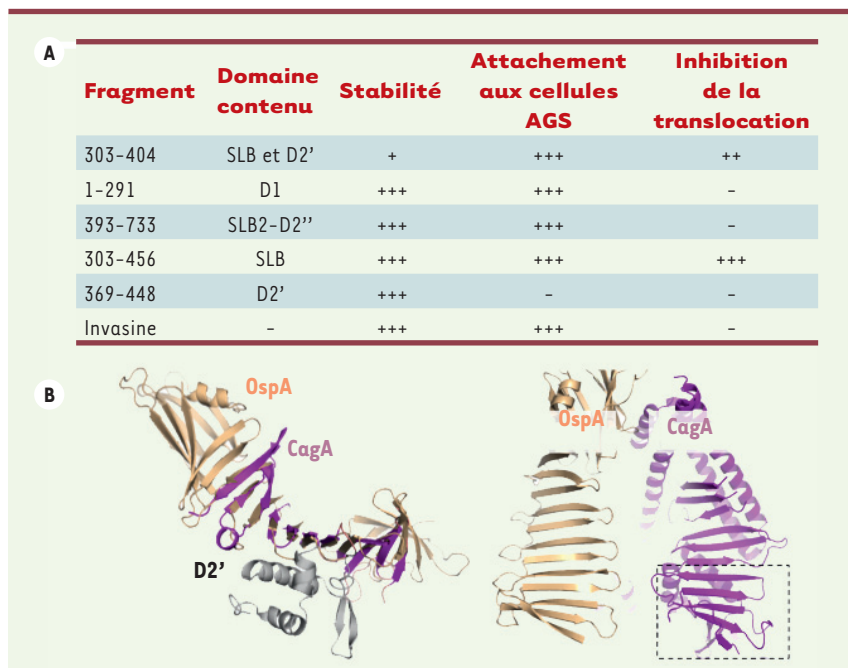


Figure 2. Analyse fonctionnelle de CagA. Tableau récapitulatif des essais d'inhibition de la translocation de CagA sur des cellules AGS. Comparaison de la structure de CagA (magenta) et de OspA (beige). Le domaine d'interaction de CagA avec l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ est indiqué par un rectangle en pointillés.

non structurée dans le cristal. L'analyse des résidus exposés et conservés dans les différents variants de CagA disponibles indique plusieurs régions d'intérêt. Ainsi, le bouquet d'hélices (D3 et D4) ressemble au domaine de liaison de l'actine F (*F-actin binding domain*) retrouvé dans plusieurs protéines du cytosquelette ou des adhésions focales, telles que la kinase des adhésions focales (FAK), la vinculine ou l' α -caténine. Le domaine D2'' est assez conservé et contient deux résidus responsables de l'attachement de la protéine à la phosphatidylsérine [7]. Il est probable que cette région soit impliquée dans le maintien de CagA à la surface interne de la membrane plasmique de la cellule hôte.

Mode d'attachement de CagA sur l'intégrine $\alpha 5\beta 1$

En collaboration avec le groupe du Pr Haas, nous avons précédemment montré que CagA interagissait avec l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ [8]. Cependant la zone d'interaction était mal définie et le

rôle de l'interaction n'avait pas pu être déterminé. Nous avons donc réalisé une série de mutants de délétion de CagA et testé l'interaction de ceux-ci avec $\alpha 5\beta 1$ par le système double hybride chez la levure. Les résultats indiquent que la région nécessaire à l'interaction contient les acides aminés 303 à 404, ce qui correspond à la moitié proximale de D2 dans la structure de CagA₁₋₈₈₄ (Figure 2). Des essais de compétition ont été réalisés à partir de différents fragments de CagA correspondant à différents domaines de CagA (Figure 2). Des cellules AGS (adénocarcinomes gastriques) ont été incubées avec ces fragments purifiés, puis mis en culture en présence d'*H. pylori*. Nous avons ensuite évalué l'attachement des fragments sur les cellules et détecté l'injection de la protéine CagA par les bactéries. Nous avons observé que les fragments, à l'exception de D2', s'attachaient sur la cellule. De manière remarquable, les fragments 303-456 et 303-404 étaient capables d'inhiber complètement l'in-

jection de CagA par la bactérie. Ces résultats montrent que l'interaction de CagA avec l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ se fait par l'intermédiaire des cinq premiers feuillets β de la SLB. Dans le même essai, la protéine invasive de *Listeria* n'a pas d'effet sur l'injection de CagA. L'invasine interagit également avec $\beta 1$, mais par l'intermédiaire de résidus mimant structurellement les motifs RGD des fibronectines, un partenaire naturel des intégrines. Nos résultats indiquent donc que l'interaction de CagA avec $\alpha 5\beta 1$ se fait par un nouveau mécanisme, indépendant du motif RGD. De manière inattendue, la zone d'interaction de CagA ressemble à la protéine OspA (*outer surface protein A*) produite par la bactérie *Borrelia burgdorferi* (Figure 2), l'agent responsable de la maladie de Lyme. Cette bactérie infecte les macrophages et les cellules dendritiques. La protéine OspA joue un rôle prépondérant dans l'infection en interagissant avec l'intégrine $\alpha_M\beta 2$ [9]. Les modes d'attachement de CagA sur $\beta 1$ et de OspA sur $\beta 2$ pourraient être structurellement similaires.

Conclusion

La structure de CagA représente une étape majeure de la compréhension des mécanismes de l'oncogenèse par *H. pylori*. L'équipe du Pr Hatakeyama a également réussi à déterminer la structure de CagA et identifier les domaines d'interaction entre les domaines amino- et carboxy-terminaux de la protéine [10]. La recherche visant à appréhender les détails moléculaires et structuraux du mode d'action de CagA entre donc dans une nouvelle ère et, si nous sommes encore loin de comprendre les détails moléculaires du mode d'action de la toxine, ces structures permettront de nouvelles études plus ciblées. En outre, le fait de pouvoir bloquer la translocation de la protéine est une avancée prometteuse dans la recherche de nouveaux inhibiteurs. \diamond

Structure and mode of injection of the oncoprotein CagA of *Helicobacter pylori*

REMERCIEMENTS

Ce projet a été financé par le programme ATIP-Avenir CNRS-Ligue contre le cancer 2009.

LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

1. Covacci A, Censini S, Bugnoli M, et al. Molecular characterization of the 128-kDa immunodominant antigen of *Helicobacter pylori* associated with cytotoxicity and duodenal ulcer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90 : 5791-5.
2. Ohnishi N, Yuasa H, Tanaka S, et al. Transgenic expression of *Helicobacter pylori* CagA induces gastrointestinal and hematopoietic neoplasms in mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105 : 1003-8.
3. Backert S, Clyne M, Tegtmeyer N. Molecular mechanisms of gastric epithelial cell adhesion and injection of CagA by *Helicobacter pylori*. *Cell Commun Signal* 2011; 9 : 28.
4. Nescic D, Miller MC, Quinkert ZT, et al. *Helicobacter pylori* CagA inhibits PARI-MARK family kinases by mimicking host substrates. *Nat Struct Mol Biol* 2010; 17 : 130-2.
5. Angelini A, Tosi T, Mas P, et al. Expression of *Helicobacter pylori* CagA domains by library-based construct screening. *FEBS J* 2009; 276 : 816-24.
6. Kaplan-Turkoz B, Jimenez-Soto LF, Dian C, et al. Structural insights into *Helicobacter pylori* oncoprotein CagA interaction with beta1 integrin. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; 109 : 14640-5.
7. Murata-Kamiya N, Kikuchi K, Hayashi T, et al. *Helicobacter pylori* exploits host membrane phosphatidylserine for delivery, localization, and pathophysiological action of the CagA oncoprotein. *Cell Host Microbe* 2010; 7 : 399-411.
8. Jimenez-Soto LF, Kutter S, Sewald X, et al. *Helicobacter pylori* type IV secretion apparatus exploits beta1 integrin in a novel RGD-independent manner. *PLoS Pathog* 2009; 5 : e1000684.
9. Pulzova L, Kovac A, Mucha R, et al. OspA-CD40 dyad: ligand-receptor interaction in the translocation of neuroinvasive *Borrelia* across the blood-brain barrier. *Sci Rep* 2011; 1 : 86.
10. Hayashi T, Senda M, Morohashi H, et al. Tertiary structure-function analysis reveals the pathogenic signaling potentiation mechanism of *Helicobacter pylori* oncogenic effector CagA. *Cell Host Microbe* 2012; 12 : 20-33.
11. Foulongne V, Michaux-Charachon S, O'Callaghan D, Ramuz M. Systèmes de sécrétion des protéines de type IV et virulence bactérienne. *Med Sci (Paris)* 2002; 18 : 439-47.

NOUVELLE

Résistance des cellules de LLC à l'apoptose

Le rôle déterminant des cellules stromales dans le maintien du potentiel redox

Wan Zhang¹, Li Feng², Hélène Pelicano², Peng Huang²

> La leucémie lymphoïde chronique (LLC) est la forme la plus fréquente des hémopathies lymphoïdes dans le monde occidental [1, 2]. Elle reste incurable en dépit de la mise au point régulière de nouvelles thérapies. Les traitements actuels utilisent des agents alkylants (chlorambucil, cyclophosphamide), une polychimiothérapie de type CHOP (vincristine, cyclophosphamide, adriamycine, prednisone), des antimétabolites qui affectent en premier lieu la synthèse de l'ADN (fludarabine, cladribine) et un anticorps monoclonal (rituximab) dirigé contre l'antigène de membrane CD20 [3, 4].

Physiopathologie de la LLC et rôle du microenvironnement

La LLC résulte de l'accumulation progressive de lymphocytes B CD5⁺ (LLC-B). Les cellules LLC-B se caractérisent par

un faible index de prolifération et leur résistance à l'apoptose en raison de la surexpression de Bcl2 (*B-cell lymphoma 2*), Mcl-1 (*myeloid cell factor 1*) et Bag-1, et de la faible expression de protéines pro-apoptotiques comme Bax (*Bcl-2-associated X protein*) [5-7]. Les cellules LLC-B ont un métabolisme plus actif que les cellules saines, ce qui entraîne une production plus importante de radicaux libres et une dépendance vis-à-vis des antioxydants cellulaires comme le glutathion (GSH) pour maintenir leur balance redox intracellulaire [8, 9]. De plus, l'interaction des cellules LLC-B avec les cellules accessoires (cellules stromales, cellules *nurse-like*) dans la moelle osseuse ou les ganglions est aussi importante pour leur survie [10, 11]. En effet, les cellules leucémiques expriment à leur surface le récepteur de chémokines CXCR4

(CD184), dont le ligand CXCL12 (*SDF-1, stromal cell-derived factor-1*), sécrété par les cellules stromales de la moelle et les cellules *nurse-like* dérivées des monocytes, permet aux cellules LLC-B d'échapper à l'apoptose par activation des voies MAP (*mitogen activated protein*) kinase [12-14].

La résistance des cellules LLC-B à l'apoptose *in vivo* contraste avec leur hypersensibilité à l'apoptose *in vitro*. Ceci suggère la perte dans ces cellules de facteurs nécessaires à leur survie. En outre, les cellules LLC-B dépendent du GSH (glutathion réduit) pour leur survie *in vivo* et, quand elles sont cultivées *in vitro*, la concentration de GSH décline rapidement [15, 16]. La localisation médullaire initiale de la maladie et l'induction d'un retard de cette apoptose lorsque les lymphocytes sont cultivés en présence de cellules stromales [17]

¹The first affiliated hospital of Nanchang university, 17 Yongwaizheng street, Nanchang, Jiangxi, 330006 Chine ;

²Department of molecular pathology, the university of Texas, M.D. Anderson cancer center, Houston, TX 77030, États-Unis. phuang@mdanderson.org