



HAL
open science

Etude des interactions entre *Helicobacter pylori* et les cellules épithéliales gastriques

Pascale Mustapha

► **To cite this version:**

Pascale Mustapha. Etude des interactions entre *Helicobacter pylori* et les cellules épithéliales gastriques. Interactions cellulaires [q-bio.CB]. Université de Poitiers, 2011. Français. NNT: . tel-00742960v2

HAL Id: tel-00742960

<https://theses.hal.science/tel-00742960v2>

Submitted on 19 Apr 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE

Pour l'obtention du Grade de

Docteur de l'Université de Poitiers

Faculté de Médecine et de Pharmacie
(Diplôme National – Arrêté du 7 août 2006)

Ecole Doctorale : BioSanté N°524

Champs disciplinaire : Biologie, Médecine, Santé

Unité de Recherche : Laboratoire Inflammation Tissus Epithéliaux et Cytokines (EA-4331)

Présentée par

Pascale MUSTAPHA

Etude des interactions entre *Helicobacter pylori* et les cellules épithéliales gastriques

Directeur de thèse : **Christophe BURUCOA**

Co-directeur de thèse : **Charles BODET**

Soutenue le 21 Octobre 2011
Devant la commission d'examen

JURY

Ivo G. BONECA	Directeur INSERM, Institut Pasteur, Paris	Rapporteur
Dominique LAMARQUE	PU-PH, Hôpital Ambroise Paré, Paris	Rapporteur
Josette RAYMOND	MCU-PH, Hôpital Cochin, Paris	Examinatrice
Christine SILVAIN	PU-PH, Université de Poitiers	Examinatrice
Charles BODET	MCU, Université de Poitiers	Examinateur
Christophe BURUCOA	PU-PH, Université de Poitiers	Examinateur

Table des Matières

TABLE DES MATIERES.....	III
TABLE DES FIGURES	VII
ABREVIATIONS	1
PREFACE	3
LA THESE AU LITEC.....	5
PLAN DU MEMOIRE.....	6
L'APRES-THESE	7
PARTIE 1. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	9
CHAPITRE I. ANATOMIE DE L'ESTOMAC	11
I.1. Anatomie de l'estomac.....	11
I.2. Histologie de l'épithélium gastrique	12
I.3. Renouvellement tissulaire épithélial	14
I.4. « Sleeve » gastrectomie	17
CHAPITRE II. HELICOBACTER PYLORI ET PATHOLOGIES ASSOCIEES.....	19
II.1. Historique.....	19
II.2. Microbiologie de <i>H. pylori</i>	19
II.3. Diversité génétique et prévalence	19
II.4. Facteurs de virulence majeurs	20
II.4.a. L'îlot de pathogénicité <i>cag</i> (<i>cag PAI</i>) et ses constituants.....	20
II.4.b. Le peptidoglycane (PG).....	24
II.4.c. La cytotoxine vacuolisante A (<i>VacA</i>).....	25
II.4.d. Les Adhésines et protéines de la membrane externe (<i>OMP</i> , <i>Outer membrane proteins</i>).....	26
II.4.e. La Flagelline (<i>FlaA</i>).....	27
II.4.f. Le Lipopolysaccharide (<i>LPS</i>).....	28
II.4.g. L'uréase	28
II.5. Aspects cliniques des pathologies associées à <i>H. pylori</i>	28
II.5.a. Gastrites aiguë et chronique	29
II.5.b. Ulcères.....	30
II.5.c. Gastrite atrophique et métaplasie intestinale	30
II.5.d. Cancer gastrique	30
II.5.e. Lymphome du MALT.....	32
II.6. Déterminisme pathologique associé à <i>H. pylori</i>	33
II.6.a. Facteurs bactériens.....	33

II.6.b. Facteurs de l'hôte.....	33
II.6.c. Facteurs environnementaux.....	35
CHAPITRE III. L'INFLAMMATION LIEE A H. PYLORI.....	37
III.1. Généralités sur les chimiokines et cytokines.....	37
III.2. Réponse immunitaire innée au cours de l'infection par <i>H. pylori</i>	39
III.2.a. Activation des Toll-like Receptors (TLRs) et de Nod-1.....	39
III.2.b. Peptides antimicrobiens.....	43
III.2.c. Rôle des macrophages.....	44
III.3. Réponse immunitaire acquise au cours de l'infection à <i>H. pylori</i>	45
III.3.a. Réponses Th1/Th2.....	46
III.3.b. Réponse Th17.....	46
III.3.c. Réponse Treg.....	47
III.3.d. Les cellules B.....	48
PARTIE 2. MATERIEL ET METHODES.....	51
CHAPITRE IV. MATERIEL ET METHODES.....	53
IV.1. Microbiologie.....	53
IV.1.a. Souches de <i>H. pylori</i>	53
IV.1.b. Culture de <i>H. pylori</i>	53
IV.2. Biologie Cellulaire.....	55
IV.2.a. Isolement et expansion de cellules épithéliales gastriques humaines (CEGH) à partir d'estomacs humains issus de patients sains.....	55
IV.2.b. Infection des CEGHA par <i>H. pylori</i>	56
IV.2.c. Stimulation des CEGHA par l'acide lipoteichoïque (LTA) et blocage du Toll-Like Receptor 2 (TLR2).....	56
IV.2.d. Culture et expansion de la lignée cellulaire gastrique humaine AGS.....	56
IV.2.e. Culture et expansion de cellules gastriques à phénotype de cellules souches (CPS).....	56
IV.2.f. Culture des CPS sur les Fibroblastes Embryonnaires de souris (MEF, Murine Embryonic Fibroblasts).....	57
IV.3. Biologie Moléculaire.....	58
IV.3.a. Extraction d'ARN.....	58
IV.3.b. Transcription inverse et quantification des acides désoxyribonucléiques complémentaires.....	59
IV.3.c. Quantification de l'expression des ARNm par PCR quantitative.....	59
IV.3.d. Analyse de l'expression des ARNm des CPS par micro-arrays.....	60
IV.4. Biochimie des protéines.....	60
IV.4.a. Dosage ELISA.....	60
IV.4.b. Immunohistochimie.....	61
IV.5. Tests statistiques.....	62
PARTIE 3. RESULTATS ET DISCUSSION.....	63

CHAPITRE V. MODELE MURIN D'INFECTION PAR H. PYLORI	65
V.1. Colonisation des souris par les souches HP141WT et HP141 Δ cagA	65
V.2. Expression des peptides antimicrobiens S100A9 et mBD3	66
CHAPITRE VI. CULTURE PRIMAIRE DE CELLULES EPITHELIALES GASTRIQUES HUMAINES ET MODELE D'INFECTION PAR H. PYLORI	69
VI.1. Introduction	69
VI.2. Premières approches expérimentales	70
VI.3. Développement et mise au point du protocole de culture primaire des cellules épithéliales gastriques humaines	71
VI.3.a. Modèles de culture primaire de cellules épithéliales gastriques déjà mis en place	71
VI.3.b. Développement et mise au point du protocole expérimental	72
VI.4. Caractérisation de la nature des cellules obtenues en culture	76
VI.4.a. Caractérisation préliminaire	76
VI.4.b. Etude de l'expression de CK18, MUC1, MUC5AC et TFF-1 par immunocytochimie	77
VI.5. Stimulation avec <i>H. pylori</i>	80
VI.5.a. Changements morphologiques liés à la présence de <i>H. pylori</i>	80
VI.5.b. Détermination de la dose infectieuse et des temps de stimulation	81
VI.5.c. Comparaison des profils transcriptionnels après exposition à <i>H. pylori</i>	82
VI.5.d. Comparaison des profils protéiques des CEGHA après exposition à <i>H. pylori</i>	87
VI.6. Discussion	89
VI.7. Conclusion	96
CHAPITRE VII. CARACTERISATION DE CELLULES HUMAINES GASTRIQUES A PHENOTYPE DE CELLULES SOUCHES	97
VII.1. Introduction	97
VII.2. Structures sphériques obtenues en culture	97
VII.3. Culture des CPS sur les MEF	99
VII.4. Croissance sans ancrage	100
VII.5. Marquage à la phosphatase alcaline	100
VII.6. Expression génétique de Nanog, SOX2 et OCT4	101
VII.7. Analyse de l'expression des gènes de pluripotence dans les CPS par microarrays	101
VII.7.a. Classification génétique hiérarchique	102
VII.7.b. Quantification relative de l'expression génétique	103
VII.8. Conclusion	105
CONCLUSION GENERALE	107
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	111

Table des Figures

Figure 1. Anatomie de l'estomac.....	12
Figure 2. Composition cellulaire de l'épithélium gastrique.....	13
Figure 3. Représentation schématique des deux mécanismes majeurs de régénération et restitution épithéliales.....	15
Figure 4. Représentation schématique de la génération des différents types cellulaires à partir des cellules souches dans les glandes gastriques antrale et fundique.....	16
Figure 5. Génération hiérarchique chez la souris des différents types cellulaires matures constituant la glande gastrique fundique.....	17
Figure 6. Schéma illustratif de l'opération de sleeve gastrectomie et photo de l'estomac réséqué	18
Figure 7. <i>Helicobacter pylori</i>	20
Figure 8. Arrangement génétique de l'îlot de pathogénicité <i>cag</i> de <i>H. pylori</i> 26695	21
Figure 9. Architecture proposée du système de sécrétion de type IV de <i>H. pylori</i>	22
Figure 10. Assemblage et modèle d'interaction du système de sécrétion de type IV de <i>H. pylori</i>	23
Figure 11. Représentation schématique du rôle du système de sécrétion de type IV dans les changements morphologiques, la prolifération cellulaire et l'immunomodulation au cours de l'infection à <i>H. pylori</i>	25
Figure 12. Les différentes actions cellulaires de VacA au cours de l'infection chronique par <i>H. pylori</i>	26
Figure 13. Rôle de <i>H. pylori</i> dans le développement des pathologies gastro-duodénales.	29
Figure 14. Modèle de la génération du cancer épithélial gastrique par les cellules souches	32
Figure 15. Déterminisme pathologique lié à <i>H. pylori</i>	36
Figure 16. Reconnaissance des pathogènes par les TLRs	41
Figure 17. Mécanismes moléculaires de défense de l'hôte médiés par Nod1 contre <i>H. pylori</i>	43
Figure 18. Interaction entre les facteurs de virulence de <i>H. pylori</i> et la réponse de l'hôte	49
Figure 19. Taux d'implantation de <i>H. pylori</i> dans la muqueuse gastrique murine	66
Figure 20. Expression des ARNm de <i>S100A9</i> et <i>mBD3</i> dans la muqueuse gastrique murine après infection par <i>H. pylori</i>	68
Figure 21. Photos illustrant la dissection d'un morceau d'antra collecté après « sleeve » gastrique	75
Figure 22. Cellules épithéliales gastriques antrales et fundiques obtenues après 48h de mise en culture.....	76

Figure 23.	Caractérisation préliminaire des cellules gastriques primaires antrales après 72h de mise en culture.....	77
Figure 24.	Analyse par immunofluorescence de l'expression de marqueurs spécifiques des tissus épithéliaux gastriques dans les cellules primaires antrales et les cellules AGS.	79
Figure 25.	Modifications morphologiques des cellules épithéliales gastriques après 24h d'exposition à <i>H. pylori</i>	81
Figure 26.	Production d'IL-8, d'IL-6 et de hBD3 par les CEGHA après stimulation par <i>H. pylori</i>	82
Figure 27.	Profil d'expression des gènes associés à la réponse immunitaire par les CEGHA stimulés par <i>H. pylori</i> pendant 3h	84
Figure 28.	Profil d'expression des gènes associés à la réponse immunitaire par les CEGHA stimulés par <i>H. pylori</i> pendant 24h.....	86
Figure 29.	Production d'IL-8 et de CXCL1 par les CEGHA après stimulation avec <i>H. pylori</i>	88
Figure 30.	Production d'IL-6 et de TNF- α par les CEGHA du sujet A après stimulation avec <i>H. pylori</i>	88
Figure 31.	Production d'IL-8 et de CXCL1 par les CEGHA du Patient C après stimulation avec LTA-SA ou <i>H. pylori</i> B128 ou B128 + anti-hTLR2	89
Figure 32.	Structures sphériques cellulaires obtenues à partir de cultures vieillissantes de cellules épithéliales gastriques.....	98
Figure 33.	Structure sphérique constituée de cellules à phénotype cellule souche (CPS)	99
Figure 34.	Sphères obtenues sur MEF	100
Figure 35.	Classification hiérarchique des données d'analyse par microarrays des gènes de pluripotence dans les CPS et dans le stroma gastrique	103
Figure 36.	Expression relative (LOG) des gènes de pluripotence et d'indifférenciation dans les CPS, le stroma et les deux lignées ES H9P48 et CL01P32	104
Figure 37.	Expression relative (Log) des gènes corrélés au caractère souche dans les CPS, le stroma et les deux lignées ES H9P48 et CL01P32	105

Abréviations

ACTB : Actine β

ADN : Acide désoxyribonucéique

ARN : Acide ribonucléique

ARNm : Acide ribonucléique messenger

BabA : Blood group antigen binding adhesion

cagPAI : îlot de pathogénicité cag

CD : Cellule dendritique

CEGH : Cellules épithéliales gastriques humaines

CEGHA : Cellules épithéliales gastriques humaines antrales

CEGHF : Cellules épithéliales gastriques humaines fundiques

CK18 : Cytokératine 18

CPS : Cellules gastriques à phénotype de cellules souches

CTLA-4 : Cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4

DCLK1 : Doublecortin CaM kinase-like 1

DO : Densité optique

DupA : Duodenal ulcer promoting gene

EGF : Epidermal growth factor

EGFR : Epidermal growth factor receptor

ELISA : Enzyme-linked immunosorbent assay

ERK : Extracellular signaling regulating kinase

ES : Cellules souches embryonnaires

GAPDH : GlycérAldéhyde-Phospho-DésHydrogénase

hBD : Human β -défensin

HCl : Acide chlorhydrique

HGF : Hepatocyte growth factor

IFN : Interferon

IL : Interleukine

IMC : Indice de masse corporelle

iNOS : Inducible nitric oxyde synthase

iPs : Induced pluripotent stem cells

ISGF3 : IFN-stimulated gene factor 3

JNK : c-Jun-N terminal kinase

L-Arg : L-arginine

LB : Lymphocytes B

LGR5 : Leucin-rich orphan G protein-coupled receptor

LPS : Lipopolysaccharide

Abréviations

LT : Lymphocytes T

LTA-SA : Purified lipoteichoic acid from *Staphylococcus aureus*

MAPK : Mitogen-activating protein kinases

mBD : Murine β -defensins

MDCK : Madin-Darby Canine Kidney cells

MEF : Murine embryonic fibroblasts

MMP : Matrix metalloproteinase

MUC1 : Mucine 1

MUC5AC : Mucine 5AC

MUC6 : Mucine 6

MyD88 : Myeloid differentiation primary response gene

NAP : Neutrophil activating protein

NF- κ B : Nuclear Factor κ B

NK : Natural killer

Nod : Nucleotide oligomerization domain

OipA : Outer inflammatory protein

OMP : Outer membrane protein

ON : Oxyde nitrique

PAMP : Pathogen-associated molecular patterns

PCR : Polymerase Chain Reaction

PG : Peptidoglycane

PN : Polynucléaires

PRR : Pathogen-recognition receptors

RT-QPCR : Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction

SabA : Sialic acid binding adhesion

SHH : Sonic hedgehog

SPEM : Spasmolytic polypeptide-expressing metaplasia

SSTIV : Système de sécrétion de type IV

TFF1 : Trefoil factor 1

TGF : Transforming growth factor

Th : T helper

TLR : Toll-Like receptor

Treg : T regulatory

VacA : Vacuolating cytotoxin A

Préface

La thèse au LITEC

Cet ouvrage résume le travail de 3 années de thèse que j'ai effectué au sein du Laboratoire Inflammation, Tissus Epithéliaux et Cytokines (LITEC, EA-4331) de l'université de Poitiers en tant que doctorante.

Le projet scientifique de l'équipe s'articule autour de l'étude du rôle des cytokines dans les mécanismes inducteurs de l'inflammation et des interactions entre les cellules de l'inflammation et les tissus épithéliaux. L'objectif est de développer une approche intégrée, incluant le développement de modèles expérimentaux *in vitro* et *in vivo* et leur confrontation à des situations cliniques, en allant des aspects fondamentaux (source et action physiologique des cytokines) vers des aspects appliqués : rôle des cytokines dans les maladies inflammatoires de la peau ou de l'estomac (infection par *Helicobacter pylori*), la cicatrisation et les défenses antibactériennes et la valorisation scientifique potentielle associée.

Le présent projet de recherche a bénéficié d'une allocation de Recherche attribuée par la Région Poitou-Charentes. Il est centré sur l'étude des interactions entre *Helicobacter pylori* et les cellules épithéliales gastriques par analyse des profils responsables de la réponse inflammatoire. La réalisation de ce travail a été le fruit de plusieurs collaborations avec :

- Le Centre Hospitalier Universitaire de Poitiers
- La Polyclinique de Poitiers
- Le laboratoire de « Cellules souches leucémiques et thérapeutiques INSERM U935 » à Poitiers
- Le Laboratoire de « Biologie et Génétique de la paroi bactérienne » équipe INSERM AVENIR de l'Institut Pasteur à Paris

Ce projet a permis la mise en œuvre de diverses approches méthodologiques et comprend trois types d'études :

- Une étude *in vivo* sur un modèle d'infection par *Helicobacter. pylori* chez la souris
- Une étude *in vitro* sur des cultures primaires de cellules épithéliales gastriques infectées ou non par *H. pylori*
- Une caractérisation préliminaire de cellules gastriques à phénotype de cellules souches

L'étude *in vivo* sur un modèle d'infection par *H. pylori* chez la souris a permis de décrire un profil de la réponse antimicrobienne liée à cette bactérie et a fait objet d'une communication orale lors de la 17^{ème} réunion annuelle du Groupe Français d'étude sur *Helicobacter (GEFH)* à Poitiers en Janvier 2009.

La grande partie de mes travaux de thèse a été dédiée à l'établissement d'un protocole expérimental de culture primaire de cellules épithéliales gastriques humaines à partir d'estomacs obtenus après gastrectomie partielle chez des sujets atteints d'obésité morbide. L'objectif étant de développer un modèle d'infection par *H. pylori* afin d'établir un profil des médiateurs associés à la réponse inflammatoire déclenchée par cette

bactérie. Plusieurs étapes de mise au point du protocole expérimental d'isolement et de culture de ces cellules ainsi que la définition des conditions d'infection ont été nécessaires pour la réalisation de ce travail. Les résultats présentés constituent une première étape dans l'élaboration et la maturation de ce projet scientifique qui vise à apporter des éclairages nouveaux sur la physiopathologie liée à *H. pylori* en utilisant un nouvel et pertinent outil d'étude. Une partie des résultats obtenus a fait l'objet d'une communication orale lors de la 19^{ème} réunion annuelle du GEFH à Bordeaux en Janvier 2011, d'une présentation Poster au XXIV^{ème} séminaire international sur *Helicobacter* tenu à Dublin du 11 au 13 Septembre 2011 ainsi que d'une publication en cours de soumission.

Une attention particulière a également été apportée à la caractérisation de cellules gastriques à phénotype de cellules souches qui ont été obtenues grâce au modèle de culture primaire que nous avons développé. Ce travail fait partie d'une collaboration avec le laboratoire de « Cellules souches leucémiques et thérapeutiques INSERM U935 » à Poitiers. Des analyses complémentaires sont actuellement en cours au sein du laboratoire afin de confirmer les résultats obtenus.

Plan du mémoire

Ce travail porte sur l'étude des interactions entre *Helicobacter pylori* et les cellules épithéliales gastriques.

Dans une première partie, une analyse bibliographique décrit le contexte scientifique de l'étude. Sont décrits brièvement l'anatomie de l'estomac, sa constitution cellulaire, les processus de régénération et réparation tissulaire gastriques ainsi que l'opération de « sleeve gastrectomie ». Le deuxième chapitre rappelle les principales caractéristiques biochimiques et microbiologiques de *H. pylori*. Les principaux facteurs de virulence bactériens sont détaillés ainsi que les diverses pathologies associées à la bactérie. Une section est consacrée à l'analyse du déterminisme pathologique associé à l'infection par *H. pylori*. Le troisième chapitre porte sur l'inflammation liée à *H. pylori* et expose les réponses immunitaires innée et acquise mises en place au cours de l'infection par la bactérie.

La deuxième partie décrit les différentes approches expérimentales utilisées pour la réalisation de cette étude.

La troisième partie est dédiée à la description et à l'analyse des résultats obtenus dans les modèles *in vivo* et *in vitro* réalisés. Le chapitre cinq décrit la colonisation des souris par *H. pylori* ainsi que l'expression des peptides antimicrobiens dans la muqueuse murine infectée. Le chapitre 6 est consacré à la description des principales étapes de développement et mise au point du protocole expérimental de culture primaire de cellules épithéliales gastriques humaines à partir d'estomacs obtenus après sleeve gastrectomie effectuée chez des sujets obèses. Des caractérisations phénotypiques et immunocytochimiques de la nature des cellules ont été réalisées. La mise en place du modèle d'infection par *H. pylori* est également décrite. Les profils des médiateurs inflammatoires (cytokines, chimiokines, peptides antimicrobiens) établis après infection des cellules primaires par deux souches de *H. pylori* sont analysés et comparés aux données cliniques et *in vitro* de la littérature. Dans le dernier chapitre, la caractérisation

de cellules gastriques à phénotype de cellules souches est décrite. Une analyse phénotypique des structures cellulaires obtenues à partir du modèle de culture de cellules primaire a été réalisée. Plusieurs propriétés communes avec les cellules souches (croissance sans ancrage, marquage à la phosphatase alcaline) ont été examinées. L'analyse de l'expression de gènes de pluripotence dans ces cellules a été réalisée par RT-QPCR et microarrays.

Ce mémoire se clôt sur une synthèse du travail effectué et une ouverture sur les potentielles applications du modèle cellulaire mis en place.

L'après-thèse

Au cours de ma thèse, j'ai suivi plusieurs modules proposés aux doctorants par l'école doctorale Biosanté (N°524) à laquelle je suis affiliée.

Dans le cadre de mon allocation de Recherche, je me suis engagée à réaliser une action citoyenne visant à promouvoir et valoriser la Recherche et les études scientifiques auprès des collégiens et lycéens. J'ai participé à l'organisation d'un séminaire de vulgarisation scientifique au Lycée Jean Monnet de Cognac en Décembre 2009 où plusieurs doctorants ont pu présenter leurs projets. J'ai également animé une visite découverte scientifique au sein du LITEC pour les étudiants du Lycée M. Genevoix de Bressuire en Février 2010.

J'ai suivi plusieurs formations de Gestion de projet et de management qui m'ont permis de découvrir les outils de base de la gestion de projet et de sa valorisation. Leur application à ma thèse m'a beaucoup aidé dans l'avancement de mon projet.

J'ai participé aussi à l'école thématique en immunologie et infectiologie qui a eu lieu à l'île d'Oléron en Mai 2010. Ce séminaire résidentiel avait pour objectif de favoriser la rencontre et les échanges scientifiques entre des chercheurs et des doctorants issus de plusieurs universités et travaillants sur une même thématique.

Afin d'anticiper mon intégration professionnelle, j'ai participé en Juin 2009 aux Doctoriales® qui ont eu lieu à La Rochelle. Il s'agit d'un séminaire résidentiel, réunissant environ 80 doctorants multidisciplinaires des universités de Poitiers, La Rochelle et Limoges, qui vise à la préparation de l'insertion professionnelle des doctorants. J'ai été amenée à travailler en équipe sur un projet d'innovation avec l'aide de professionnels du monde socio-économique. J'ai participé aussi aux Ateliers Techniques de Recherche d'Emploi proposés par l'école doctorale aux doctorants en fin de thèse.

Finalement, j'ai eu l'occasion au cours de ma thèse de faire des vacances au sein des Facultés de Médecine Pharmacie et de Sciences Fondamentales de l'université de Poitiers. En Septembre 2011, je rejoins l'équipe pédagogique de la section CNU 64 de Biochimie de l'université de Poitiers en tant qu'attachée temporaire d'enseignement et de recherche (ATER) rattachée au LITEC pour un an.

Partie 1. Etude Bibliographique

Chapitre I. Anatomie de l'estomac

I.1. Anatomie de l'estomac

L'estomac est la portion du tube digestif en forme de poche, située entre l'œsophage et le duodénum. Chez l'adulte, il mesure 20 cm de long et se trouve en rapport avec le foie, la rate, le pancréas, le diaphragme et les intestins. L'estomac permet d'assurer une partie de la digestion par des fonctions mécaniques (brassage) et chimiques, et par mélange des aliments au suc gastrique. Le pH de l'estomac varie entre 1,5 et 5.

L'estomac se caractérise de face par une forme en J et présente deux sphincters : le sphincter œsophagien situé au niveau du cardia permettant la jonction avec l'œsophage et le sphincter pylorique situé au niveau du pylore permettant la sortie vers le duodénum (Figure 1). Il présente deux courbures. La petite courbure est courte, siège sur la face postérieure de l'estomac, et elle est la continuation vers le bas de la paroi postérieure de l'œsophage. Juste avant le sphincter pylorique, elle s'incurve vers la droite et le haut pour réaliser la forme de J. Là où l'œsophage rejoint l'estomac, la région antérieure forme un angle aigu vers le haut puis s'incurve vers le bas, formant la grande courbure, qui se dirige ensuite vers le sphincter pylorique. Grâce à sa musculature, l'estomac malaxe les aliments et les transforme en substance semi-fluide constituée d'aliments partiellement digérés, d'eau, de diverses enzymes de digestion et d'acide chlorhydrique (HCl), le chyme. Celui-ci est éjecté dans le duodénum par relâchement du pylore. Le pylore a pour fonction essentielle la formation d'un réservoir assurant la continence gastrique. Cette fonction disparaît en grande partie après les gastrectomies larges, qui enlèvent plus de la moitié de l'estomac. Les replis gastriques sont des plissements de la muqueuse permettant d'offrir une plus grande surface de contact avec les aliments. Ces replis agissent mécaniquement sur la dégradation des aliments au cours du processus de brassage assuré par les contractions musculaires.

L'estomac est composé de 3 régions : le fundus, le corps et l'antrum qui se distinguent par une composition cellulaire et fonctionnelle différentes (Helander, 1981). Sur le plan histologique, la paroi interne de l'estomac est constituée de différentes couches :

La muqueuse : c'est la première couche en contact avec le bol alimentaire. Elle est constituée par l'épithélium (composé de cellules épithéliales) et la lamina propria (composée de tissu conjonctif lâche) ainsi que d'une fine couche de muscle lisse la séparant de la sous-muqueuse. Elle est recouverte de mucus.

La sous-muqueuse : constituée d'une couche de tissu conjonctif fibreux et vascularisé assurant l'irrigation des cellules gastriques.

La couche musculaire elle-même constituée de 3 couches de fibres :

- *La couche musculaire oblique interne* : elle est responsable du mouvement de brassage mécanique des aliments. Cette couche est spécifique à l'estomac et n'est présente dans aucun autre organe du système digestif. La paroi musculaire interne de l'antrum est plus épaisse que celle du fundus assurant des contractions plus forcées.

- La couche musculaire circulaire qui est également plus forte au niveau de l'antré. Cette couche est concentrique à l'axe longitudinal de l'estomac.
- La couche musculaire longitudinale externe

La séreuse : elle est composée de plusieurs couches de tissu conjonctif en continuité avec le péritoine qui recouvre la totalité de la paroi externe l'estomac.

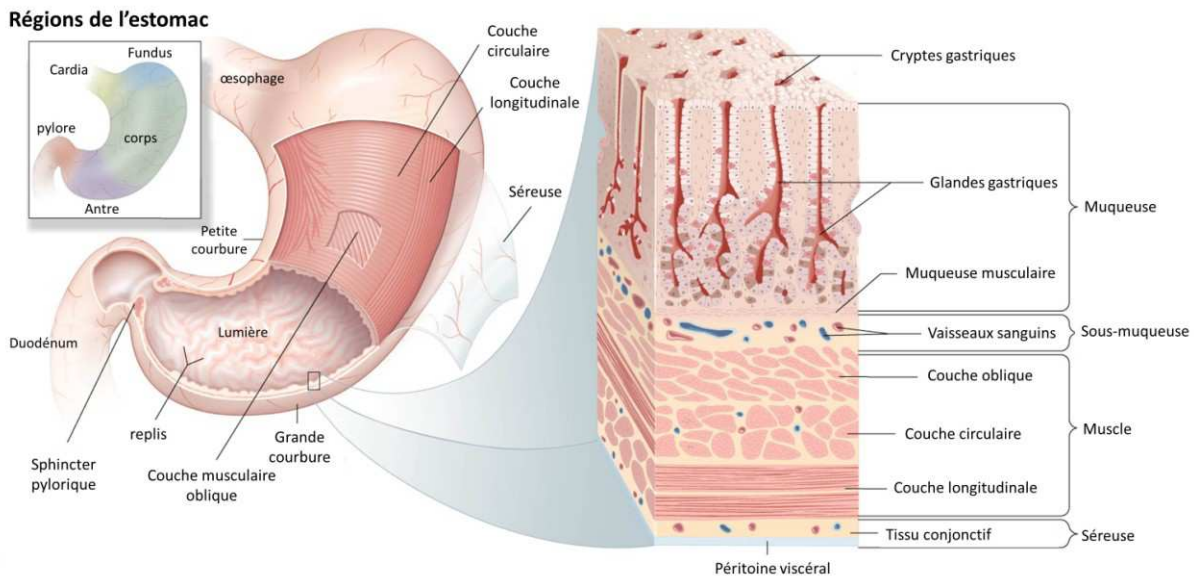


Figure 1. Anatomie de l'estomac

(modifiée d'après Encyclopedia Britannica, 2010)

L'estomac est constitué de 3 couches musculaires : une couche longitudinale externe, une couche intermédiaire circulaire et une couche interne oblique. La paroi interne de l'estomac est composée de 4 couches : la séreuse, le muscle, la sous-muqueuse et la muqueuse. La muqueuse est densément munie de glandes gastriques composées de cellules produisant les enzymes digestives, de l'acide chlorhydrique et du mucus.

I.2. Histologie de l'épithélium gastrique

Les glandes gastriques sont identifiées en fonction de leur localisation et sont enchâssées dans l'épithélium cylindrique sous forme d'invaginations tubulaires ou cryptes gastriques. Les unités antrales et fundiques sont très différentes sur le plan histologique. Les glandes fundiques constituent entre 70% et 80% du total des glandes présentes dans l'estomac et sont les plus complexes. Elles comprennent 5 types majeurs de cellules épithéliales matures (Figure 2) : les cellules à mucus (ou mucocytes), les cellules pariétales, les cellules principales, les cellules endocrines et les cellules régénératrices. Les glandes pyloriques, situées au niveau du pylore, ne présentent que 15% des glandes gastriques et sont essentiellement constituées de cellules endocrines, de cellules à mucus et de cellules régénératrices.

Les cellules à mucus (ou mucocytes) : ces cellules sécrètent un mucus riche en glycoprotéines : les mucines. Le mucus joue un rôle dans la lubrification et la protection de la muqueuse contre l'autodigestion en formant un film protecteur neutralisant l'acidité et empêchant la pepsine d'entrer en contact direct avec la paroi gastrique (Allen *et al.*, 2005).

Les mucines joueraient également un rôle dans la défense antimicrobienne contre le pathogène gastrique *Helicobacter pylori* (Kawakubo *et al.*, 2004; Fukuda *et al.*, 2006).

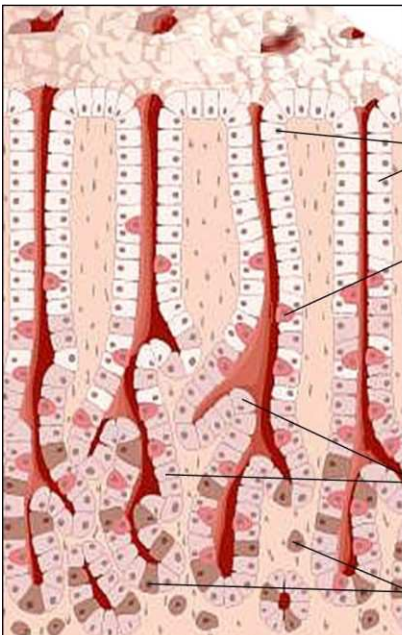
Les cellules pariétales qui produisent du HCl nécessaire à la conversion du pepsinogène en pepsine, à l'absorption du fer et à maintenir l'environnement gastrique suffisamment acide pour assurer la dénaturation et digestion des protéines issues de l'alimentation. Le HCl limite également le développement de microorganismes au niveau gastrique et joue un rôle dans l'équilibre des populations cellulaires. Les cellules pariétales produisent également une protéine particulière : le facteur intrinsèque, qui se lie sous forme de complexe à la vitamine B12 et qui est indispensable à l'absorption intestinale de cette vitamine.

Les cellules principales qui sécrètent deux molécules nécessaires à la digestion gastrique, le pepsinogène, précurseur de la pepsine et une lipase gastrique. Le pepsinogène est une proenzyme dénuée d'activité protéolytique et convertie en pepsine en présence d'acide. La pepsine est une protéase digestive assurant la dégradation des protéines en acides aminés (Dunn, 2001). La lipase est impliquée dans la dégradation des lipides en acides gras (Canaan *et al.*, 1999).

Les cellules endocrines principalement situées au niveau de l'antré, responsables de la sécrétion de gastrine, d'histamine, de somatostatine ainsi que d'autres hormones qui régulent les différents processus associés à la digestion.

Les cellules régénératrices (ou cellules souches) présentes au niveau des glandes antrales et fundiques, sont impliquées dans les processus de réparation tissulaire, de régénération et auto-renouvellement de l'épithélium gastrique.

Certains peptides et neuropeptides gastriques, en plus de leur rôle de régulateurs des fonctions gastriques, possèdent des propriétés de facteurs de croissance et interviennent à ce titre dans le processus de renouvellement des cellules épithéliales. C'est notamment le cas de la gastrine qui possède un effet prolifératif et de la somatostatine qui possède un effet antiprolifératif.



Type de cellule	Fonction	Localisation	
Mucocytes	Mucus	A N T R E	F O N D U S
Cellules endocrines	Hormones (Gastrine, Somatostatine, cholecystokinine...)		
Cellules régénératrices	Renouvellement tissulaire		
Cellules pariétales	HCl et facteur intrinsèque		
Cellules principales	Enzymes (lipase, pepsinogène)		

Figure 2. Composition cellulaire de l'épithélium gastrique

I.3. Renouvellement tissulaire épithélial

L'épithélium gastrique assure plusieurs fonctions physiologiques lui permettant de maintenir son intégrité fonctionnelle : la production de mucus et de peptides antimicrobiens, la régulation des réponses immunitaires et inflammatoires, la régénération (auto-renouvellement) et la réparation tissulaire.

Le maintien de l'intégrité tissulaire épithéliale est assuré par deux processus complémentaires (Figure 3) :

La régénération continue qui se fait via la prolifération et la différenciation des cellules souches progénitrices. Ce processus est responsable de l'auto-renouvellement de la muqueuse épithéliale et dure tout au long de la vie adulte. La régénération tissulaire à partir des cellules souches somatiques multipotentes est un mécanisme prédominant au niveau des muqueuses épithéliales (Alison *et al.*, 2006; Blanpain *et al.*, 2007). La différenciation des cellules souches progénitrices peut être dérégulée suite à certaines infections chroniques entraînant éventuellement des transformations néoplasiques malignes et des tumeurs.

La réparation tissulaire (restitution) qui permet la restitution rapide des lésions superficielles de la muqueuse. La ré-épithélialisation se fait par migration des cellules avoisinantes vers le site de la lésion. Ce processus commence quelques minutes après la lésion (Silen *et al.*, 1985; Hoffmann, 2005).

L'auto-renouvellement tissulaire de l'épithélium gastrique (antre et fundus) se fait par la prolifération et la différenciation de cellules souches somatiques multipotentes adultes présentes dans une zone germinative (isthme) à l'intérieur de chaque glande gastrique (Gordon *et al.*, 1994; Karam, 1999). Cette zone se présente sous forme de niche (ou microenvironnement protégé) le long de la membrane basale (Watt *et al.*, 2000; Fuchs *et al.*, 2004; Moore *et al.*, 2006). Les cellules souches somatiques multipotentes sont entourées par les fibroblastes subépithéliaux auxquels elles adhèrent fortement (Powell *et al.*, 1999; Powell *et al.*, 2005; Andoh *et al.*, 2007) (Figure 3). Les fibroblastes subépithéliaux secrètent une multitude de facteurs de croissance en particulier le Hépato-cy-te Growth Factor (HGF), le transforming growth factor β 1 (TGF- β 1) ainsi que des protéines morphogénétiques osseuses, des métalloprotéinases matricielles (MMPs), des inhibiteurs de métalloprotéinases (TIMPs) et du collagène de types I, III et IV (Wagner, 2007; Hoffmann, 2008).

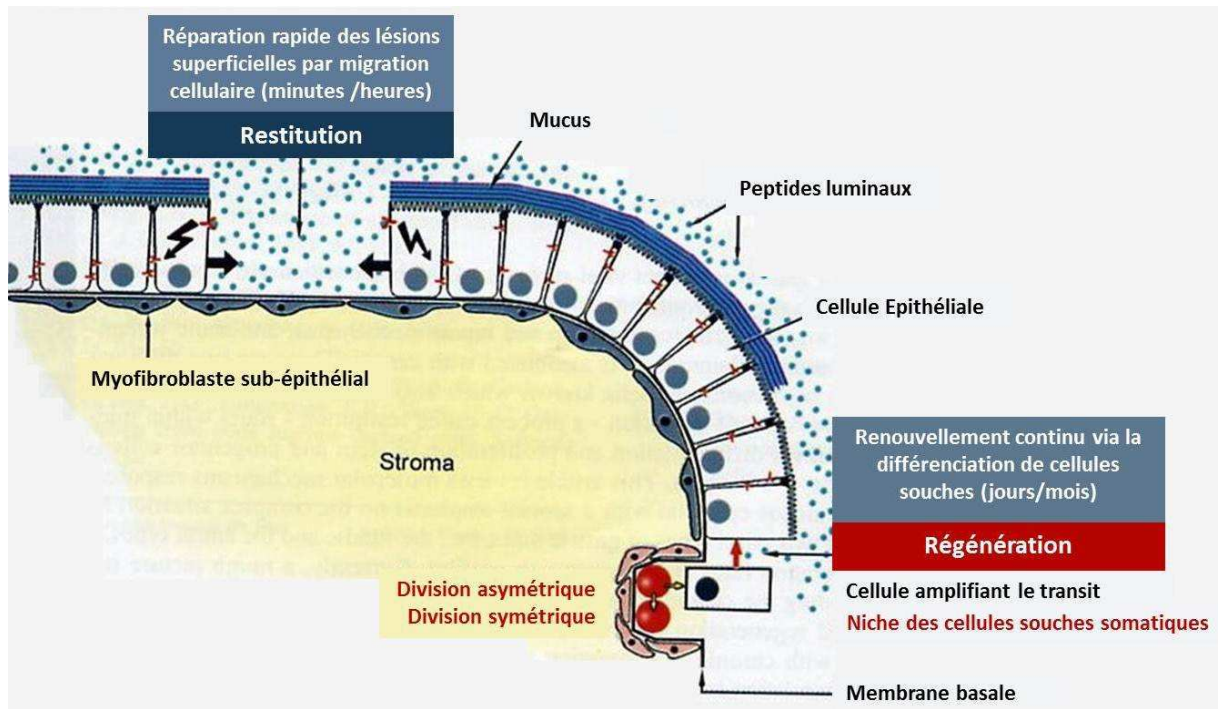


Figure 3. Représentation schématique des deux mécanismes majeurs de régénération et restitution épithéliales

La régénération se fait à partir des cellules souches et la réparation est réalisée par migration de cellules épithéliales avoisinantes (modifiée d'après Hoffmann, 2008).

La division des cellules souches peut être symétrique permettant la génération de deux cellules-filles souches (du même type) ou asymétrique permettant de générer une cellule souche et une cellule plus différenciée (Morrison *et al.*, 2006) (Figure 3). A partir de l'isthme, les cellules souches somatiques migrent d'une manière bidirectionnelle pour se différencier via des mécanismes de maturation assez complexes en mucocytes (de surface ou du collet), en cellules pariétales, principales ou endocrines (Quante *et al.*, 2009) (Figure 4).

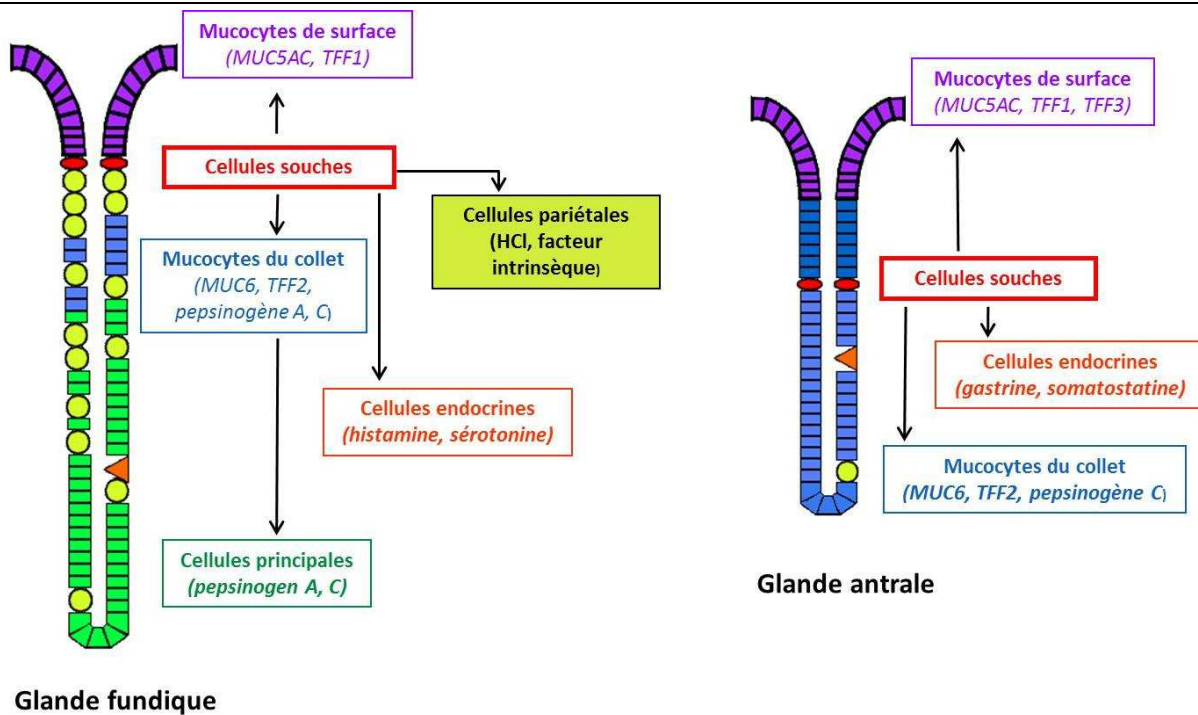


Figure 4. Représentation schématique de la génération des différents types cellulaires à partir des cellules souches dans les glandes gastriques antrale et fundique

(modifiée d'après Hoffmann, 2008)

La dynamique de régénération des différents types cellulaires gastriques a été étudiée intensément chez la souris. La génération hiérarchique des différentes lignées cellulaires épithéliales est réalisée à partir de plusieurs précurseurs et pré-précurseurs (Karam *et al.*, 1995; Karam, 1999) (Figure 5). A la différence de l'homme, chez qui les cellules pariétales sécrètent le facteur intrinsèque et le morphogène Sonic Hedgehog (SHH), la sécrétion de ces protéines se fait par les cellules principales chez la souris (Van den Brink *et al.*, 2001). La discrimination entre les lignées de cellules principales et celles des cellules pariétales semble plus précise chez l'homme que chez les rongeurs ; l'expression du facteur intrinsèque, du SHH et du pepsinogène A surviendrait probablement plus tardivement au cours de la différenciation (Hoffmann, 2008). La différence histologique marquée entre les glandes antrales et fundiques serait donc due à une régulation différente au niveau moléculaire des mécanismes de différenciation. Les processus de migration et maturation des cellules souches gastriques sont assez complexes; leur régulation est assurée par des voies de signalisation très spécifiques ainsi que par la sécrétion d'une multitude de facteurs (tels que PDX1, NOTCH1, NEUROD, TGF- α , TFF1...) indispensables à la différenciation épithéliale (Hoffmann, 2008).

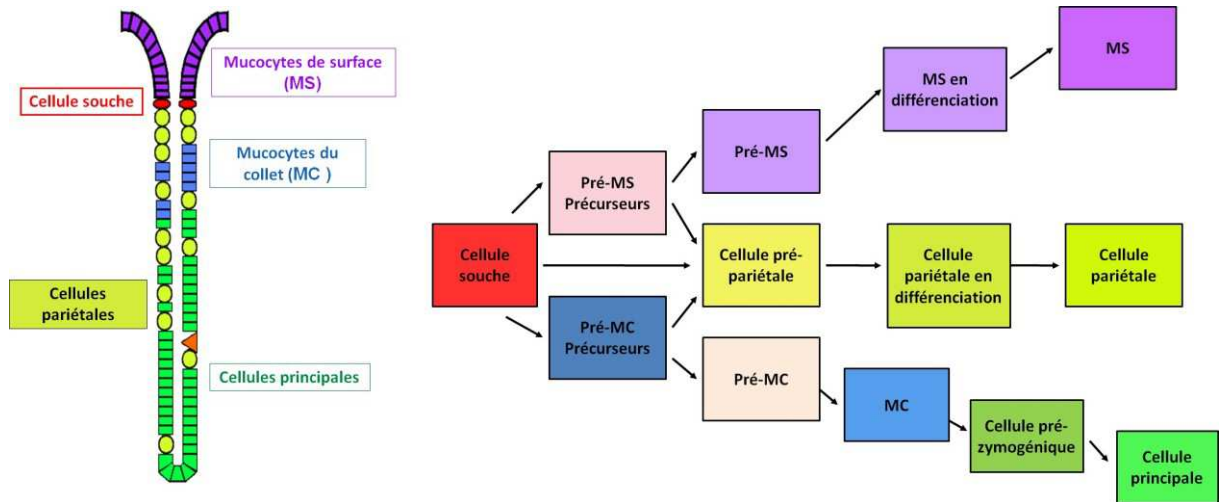


Figure 5. Génération hiérarchique chez la souris des différents types cellulaires matures constituant la glande gastrique fundique
 MS : mucocytes de surface ; MC : mucocytes du collet
 (modifiée d'après Hoffmann, 2008)

I.4. « Sleeve » gastrectomie

La « sleeve » gastrectomie (ou gastroplastie verticale calibrée avec résection gastrique) est une opération chirurgicale de l'appareil digestif qui s'effectue chez des sujets atteints d'obésité sévère (Indice de masse corporelle (IMC) supérieur à 35) ou morbide (IMC supérieur à 50). Cette intervention, mise au point récemment (2001) et basée sur l'ablation d'une majeure partie de l'estomac, possède un caractère restrictif provoquant une perte systématique de poids (de l'ordre de 60% de l'excès de poids) et diminue considérablement le taux de ghréline, hormone stimulante de l'appétit. La sleeve est proposée comme une procédure de remplacement de la gastroplastie et possède l'avantage de permettre la réalisation d'un by-pass gastrique (modification du circuit alimentaire), quand cela est nécessaire, dans de bonnes conditions de sécurité. La sleeve consiste en une résection verticale de plus des deux-tiers de l'estomac suivant la grande courbure (Figure 6). Les bords ouverts sont ensuite attachés ensemble avec des agrafes chirurgicales pour former un manchon ou tube avec une forme de banane (Karmali *et al.*, 2010). L'opération se fait sous cœlioscopie, nécessite une anesthésie générale et dure environ deux heures. Après résection de l'estomac, celui-ci est mis dans un sac et sorti du ventre du patient. La procédure est donc permanente et irréversible. Le tube gastrique résultant peut néanmoins dans de rares cas se rétrécir ou se dilater. L'intérêt porté à cette opération est qu'elle permet de collecter suffisamment de tissu biologique pour le développement de modèles cellulaires qui visent à améliorer les connaissances de la physiologie et des pathologies gastriques.

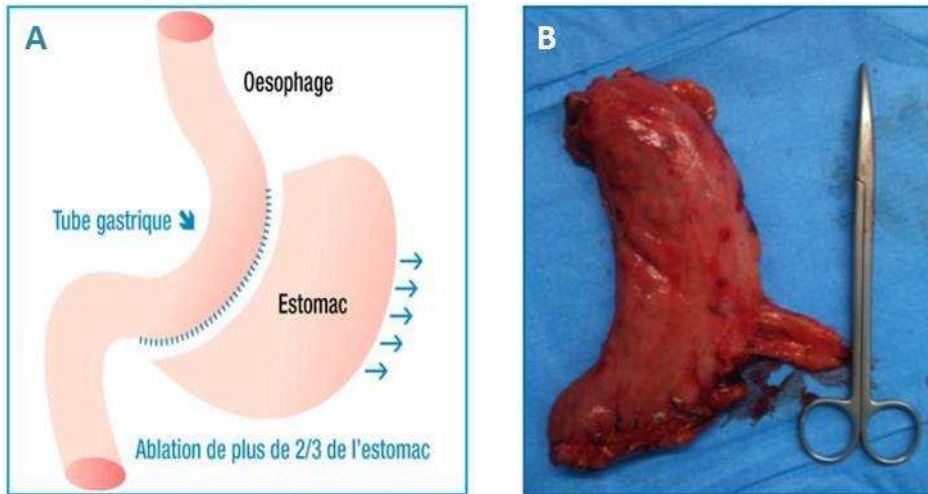


Figure 6. Schéma illustratif de l'opération de sleeve gastrectomie et photo de l'estomac réséqué
(A) Sleeve gastrectomie; (B) Estomac réséqué

Chapitre II. *Helicobacter pylori* et pathologies associées

II.1. Historique

Bien que de rares pathologistes aient reporté dès le 19^{ème} siècle la présence de bactéries spiralées dans l'estomac, *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) n'a pu être cultivé pour la première fois qu'en 1982 par Barry Marshall et Robin Warren (Marshall *et al.*, 1984). En 1994, *H. pylori* est classé carcinogène de type I par l'Organisation Mondiale de la Santé et aujourd'hui, il est considéré comme l'agent étiologique principal des cancers liés aux infections bactériennes (Parkin *et al.*, 2005). La découverte de *H. pylori* a valu le prix Nobel de médecine à ces deux chercheurs australiens et maintenant, il est clairement établi que toute colonisation de la muqueuse gastrique par *H. pylori* entraîne un état inflammatoire de gastrite, pouvant évoluer vers des formes plus sévères d'ulcération (ulcères gastriques et duodénaux) ou de transformation maligne (cancer gastrique et lymphome du MALT).

II.2. Microbiologie de *H. pylori*

H. pylori est un pathogène qui colonise sélectivement l'épithélium gastrique humain. C'est un bacille Gram-négatif spiralé mesurant 2 à 4 µm de long et 0,5 à 1 µm de large et qui peut également exister sous une autre forme ronde dite coccoïde viable mais non cultivable (Enroth *et al.*, 1999). *H. pylori* est une bactérie microaérophile, uréase, catalase et oxydase positive. Elle possède 3 à 5 flagelles polaires et engainés conférant une motilité et permettant un mouvement rapide dans la muqueuse gastrique visqueuse lui assurant ainsi une meilleure colonisation (O'Toole *et al.*, 2000) (Figure 7). *H. pylori* résiste à l'acidité gastrique en hydrolysant l'urée en ammoniac, grâce à son uréase. Elle est également capable de résister au stress oxydatif généré par la réponse immunitaire grâce à la catalase ainsi que d'autres éléments de défense tels que la superoxyde dismutase et l'alkylhydroperoxyde réductase (Kusters *et al.*, 2006).

II.3. Diversité génétique et prévalence

H. pylori compte parmi les espèces bactériennes présentant le plus grand polymorphisme génétique (Taylor *et al.*, 1992; Jiang *et al.*, 1996; Linz *et al.*, 2007). Cette diversité génétique permet à *H. pylori* d'adapter son génotype à celui de son hôte (Israel *et al.*, 2001b; Giannakis *et al.*, 2008) et est probablement à l'origine de la variabilité de son pouvoir pathogène.

L'infection par *H. pylori* est très répandue et touche environ 50% de la population mondiale. Sa prévalence est très élevée dans les pays en voie de développement où elle peut atteindre 90% alors qu'elle ne peut pas dépasser 20% dans les pays industrialisés (Krejs, 2010). L'augmentation du niveau de vie, l'amélioration des conditions d'hygiène et l'importante utilisation des antibiotiques sont parmi les facteurs qui contribuent vraisemblablement à la diminution de la prévalence de *H. pylori* dans les pays industrialisés.

L'homme est le réservoir exclusif de cette bactérie et la transmission se fait par voie interhumaine (oro-orale ou féco-orale), familiale et très probablement dès l'enfance (Megraud, 2003). L'éradication de *H. pylori* est réalisée via une trithérapie de 7 à 10 jours associant deux antibiotiques et un inhibiteur de la pompe à protons. L'augmentation des résistances aux antibiotiques conduit à des échecs d'éradication ce qui rend le traitement de plus en plus difficile.

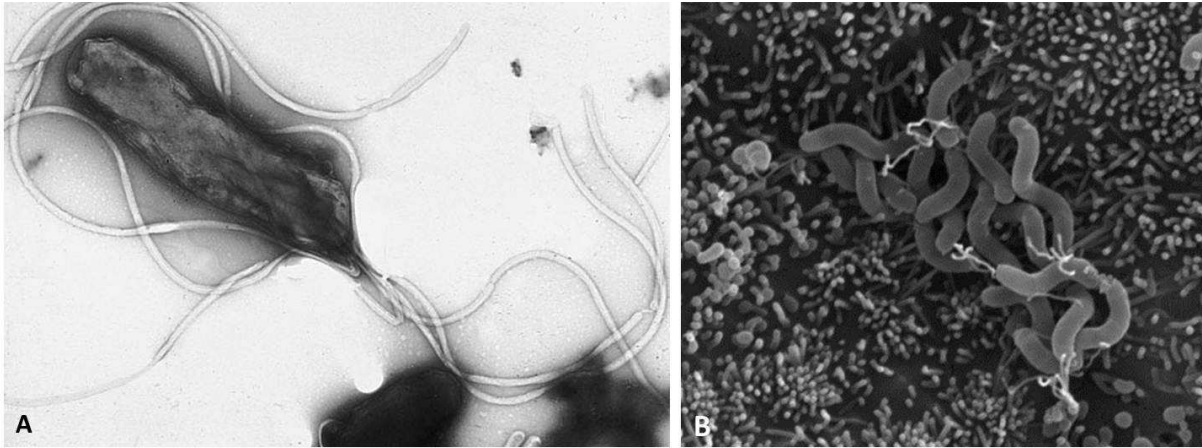


Figure 7. *Helicobacter pylori*

Photos de *H. pylori* prises en microscopie électronique. A. Une bactérie *H. pylori* ; B. Amas de *H. pylori* au niveau des cellules épithéliales gastriques (Tan et al., 2009)

II.4. Facteurs de virulence majeurs

H. pylori possède une multitude de facteurs de virulence codés par des gènes dont le polymorphisme est à la base d'un déterminisme pathologique plus ou moins sévère. Ces facteurs de pathogénicité peuvent déclencher et moduler la nature de la réponse inflammatoire et altérer l'intégrité de la muqueuse gastrique conférant à cette bactérie un caractère carcinogène et pro-inflammatoire. *H. pylori* colonise très efficacement la muqueuse grâce à sa motilité, son chimiotactisme, sa résistance à l'acidité gastrique et sa capacité d'adhésion aux cellules épithéliales. La persistance de l'infection par *H. pylori* est rendue possible par des stratégies d'échappement aux défenses immunitaires incluant des mécanismes enzymatiques, des capacités à faire varier les motifs antigéniques présents à sa surface et le relargage d'antigènes immuno-dominants servant de leures aux anticorps.

II.4.a. L'îlot de pathogénicité *cag* (*cag* PAI) et ses constituants

L'îlot de pathogénicité *cag* (*cag* PAI) est un fragment d'ADN de 37 kb composé d'environ 29 gènes (Covacci et al., 1999). Cet îlot code un système de sécrétion de type IV (SSTIV) ainsi que des protéines de la famille Cag. Le SSTIV permet la translocation de la protéine CagA, du peptidoglycane (PG) ainsi que d'autres éléments à l'intérieur de la cellule épithéliale (Covacci et al., 1993; Censini et al., 1996; Akopyants et al., 1998; Asahi et al., 2000; Christie et al., 2000; Covacci et al., 2000; Odenbreit et al., 2000; Fischer et al., 2001). Associé aux pathologies cliniques les plus sévères, *cag* PAI est un facteur de virulence déterminant de *H. pylori*. Les souches comportant cet îlot augmentent le risque de développement de gastrite atrophique et de cancer gastrique par rapport aux souches

qui en sont naturellement dépourvues (Kuipers *et al.*, 1995a; Peek *et al.*, 1995; Parsonnet *et al.*, 1997; Rudi *et al.*, 1997; Torres *et al.*, 1998).

L'îlot *cag* PAI code pour des protéines (Vir) qui possèdent des séquences similaires à celles de *Agrobacterium tumefaciens*. Ces protéines sont nécessaires pour l'induction de la sécrétion de l'interleukine 8 (IL-8) par les cellules épithéliales infectées par *H. pylori* (Censini *et al.*, 1996; Akopyants *et al.*, 1998; Audibert *et al.*, 2001). L'ordre génétique dans *cag* PAI est en général conservé (Figure 8) mais quelques variations de cet arrangement existent chez certaines populations. Des souches isolées chez des sujets amérindiens par exemple, possèdent une duplication du gène *cagA* (forme non fonctionnelle) et le *cagB* inséré entre *cagP* et *cagQ* (Mane *et al.*, 2010).

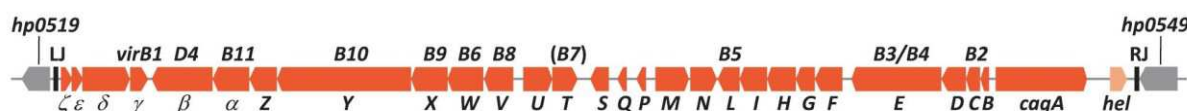


Figure 8. Arrangement génétique de l'îlot de pathogénicité *cag* de *H. pylori* 26695
Insertion de *cagPAI* dans un locus chromosomique flanqué par le gène *hp0519*. Les jonctions gauches (*LJ*) et droite (*RJ*) du *cag* PAI représentent une répétition directe de 31 pb.
(Tomb *et al.*, 1997; Fischer, 2011)

Le système de sécrétion de type IV (SSTIV)

Le SSTIV appartient à une famille de transporteurs responsables du transfert de diverses macromolécules (protéines, ADN, complexes protéiques) à travers la membrane cellulaire (Fronzes *et al.*, 2009). Le SSTIV possède une structure similaire à une seringue et permet l'injection ou la translocation de facteurs de virulence bactériens à l'intérieur de la cellule hôte (Terradot *et al.*, 2011). L'appareil consiste en une douzaine de protéines (VirB 1-11 et VirD4) assemblées pour former 3 sous-parties interconnectées : un complexe cytoplasmique/intracellulaire, un canal couvrant la double membrane et un pilus externe (Figure 9). Les protéines constitutives du SSTIV peuvent former des complexes homo ou hétérotypiques (Busler *et al.*, 2006) dont plusieurs sont indispensables au bon fonctionnement de la machinerie du système. Parmi les protéines essentielles pour la translocation de CagA et/ou l'induction de l'IL-8 au cours de l'infection on peut citer les protéines Cag δ , CagZ, CagS et CagM (Cendron *et al.*, 2011).

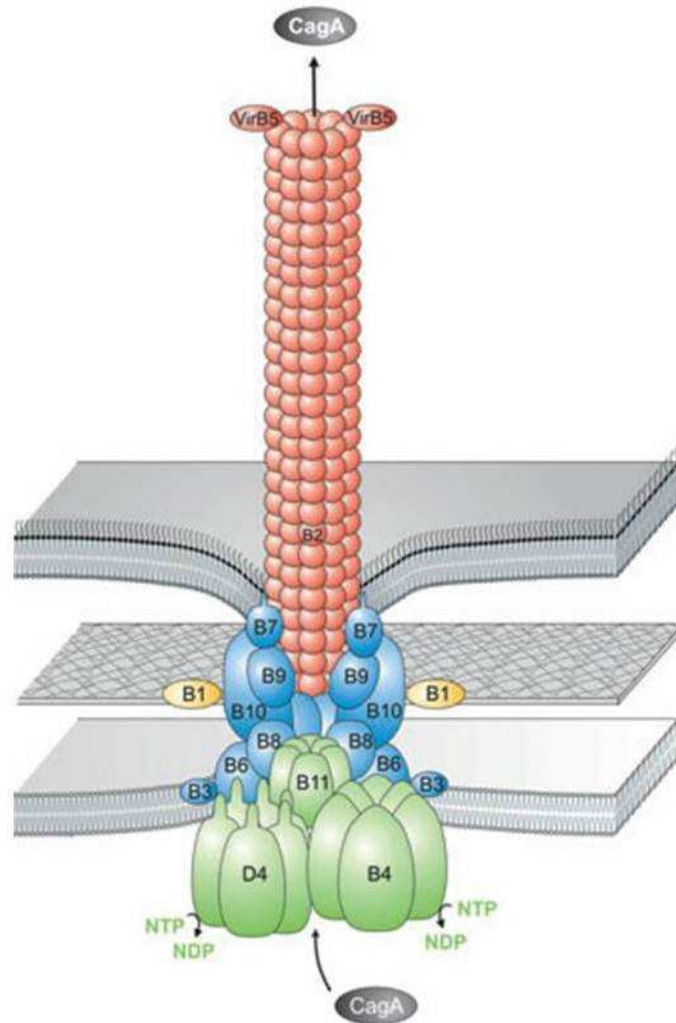


Figure 9. Architecture proposée du système de sécrétion de type IV de *H. pylori*. Le SSTIV permet la translocation de CagA et du peptidoglycane à l'intérieur de la cellule hôte (modifié d'après Tegtmeyer, 2011)

La protéine CagM

CagM est une protéine de 43,7 kDa codée par *cagM*. Les analyses de mutagenèse systématique des gènes appartenant au *cag* PAI ont montré que les mutants $\Delta cagM$ ne peuvent pas accomplir une translocation efficace de CagA ni du PG (Segal *et al.*, 1997; Fischer *et al.*, 2001; Viala *et al.*, 2004) ce qui indique un rôle essentiel de *cagM* dans la virulence de *H. pylori*. Des études récentes avec des mutants $\Delta cagM$, $\Delta cagE$ et $\Delta cagA$ montrent une implication de ces gènes dans la répression du gène codant la sous-unité catalytique de la pompe H/K-ATPase gastrique humaine (Cendron *et al.*, 2011). En général, cet effet est stimulé par le système Cag-SSTIV fonctionnel qui permet à *H. pylori* d'inhiber la sécrétion acide par les cellules pariétales et d'induire des épisodes d'hypochlorhydrie qui facilitent la colonisation bactérienne. Un modèle suggérant l'association de CagM avec les protéines CagX et CagT sous forme d'un complexe ternaire stable au niveau de la membrane externe du SSTIV a été récemment proposé (Kutter *et al.*, 2008; Pinto-Santini *et al.*, 2009; Fischer, 2011) (Figure 10).

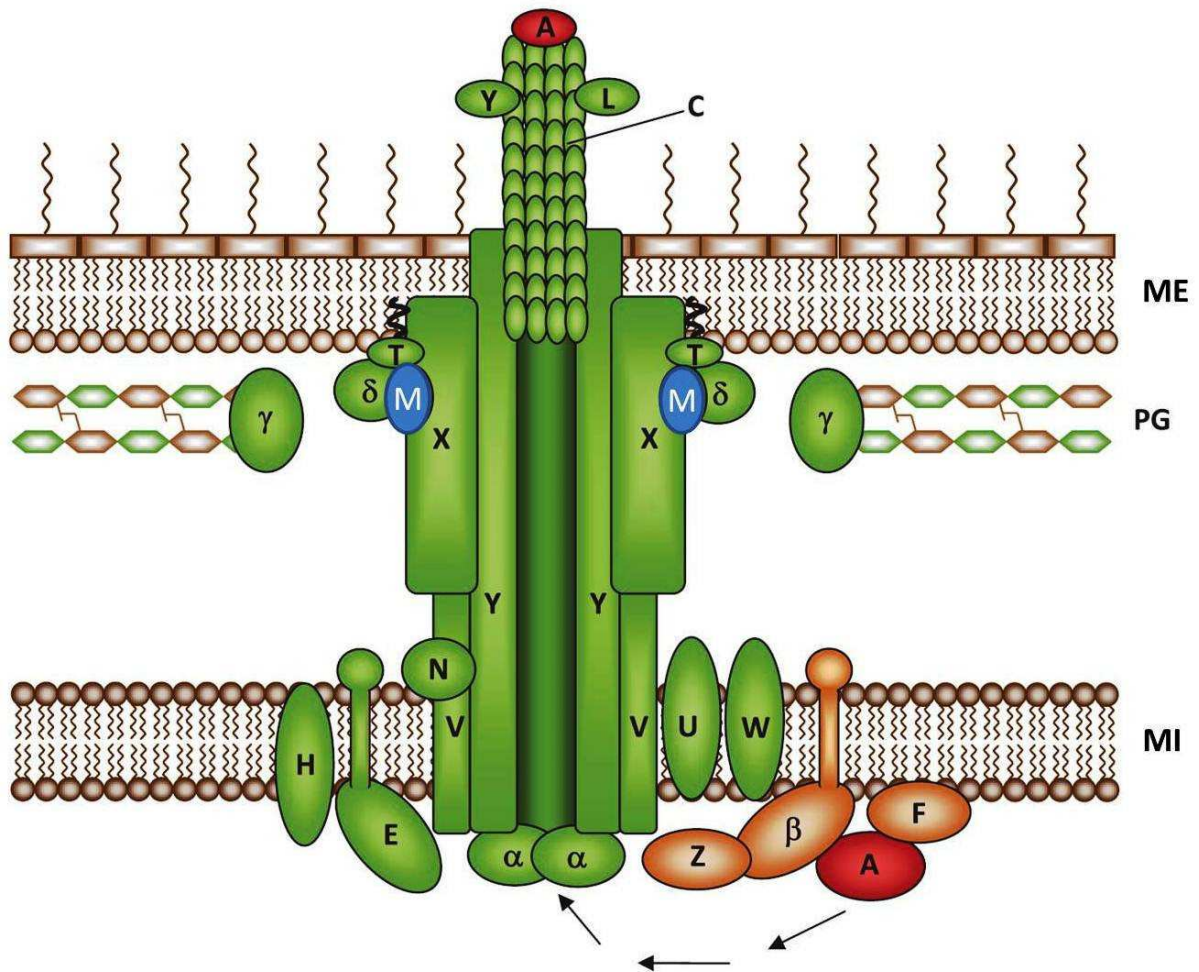


Figure 10. Assemblage et modèle d'interaction du système de sécrétion de type IV de *H. pylori*

Les protéines Cag sont désignées par leurs lettres respectives. Les composants essentiels au fonctionnement de l'appareil sont indiqués en verts et bleu, les facteurs de translocation en orange et la protéine effectrice CagA en rouge. ME, membrane externe bactérienne; PG, couche de peptidoglycane; MI, membrane interne bactérienne (modifiée d'après Fischer, 2011).

La protéine CagA

Les souches de *H. pylori* sont souvent classées en souches *cagA+* ou *cagA-*, en fonction de la production ou non de la protéine bactérienne CagA codée par le gène *cagA* présent à l'extrémité de l'îlot *cag* (Covacci *et al.*, 1993). Cette protéine de 120 à 240 kDa est injectée à l'intérieur de la cellule épithéliale par le SSTIV. Une fois injectée, elle est phosphorylée par les kinases de la famille Abl et Src au niveau de la tyrosine des motifs glutamate-proline-isoleucine-tyrosine-alanine (EPIYA) ce qui va entraîner des altérations morphologiques cellulaires nommés « becs de colibris » (Segal *et al.*, 1999; Asahi *et al.*, 2000; Odenbreit *et al.*, 2000; Stein *et al.*, 2000; Stein *et al.*, 2002). La protéine CagA phosphorylée interagit avec plusieurs effecteurs à l'intérieur de la cellule hôte. Son association avec la tyrosine phosphatase SHP-2 induit l'activation des Extracellular Signalling regulating kinase (ERK) 1 et 2 (Higashi *et al.*, 2002). Le taux de CagA phosphorylée est régulé négativement par sa propre interaction avec l'extrémité C-

terminale de la kinase Src (Tsutsumi *et al.*, 2003). CagA perturbe également le cycle de la cellule épithéliale par l'activation du facteur de transcription AP-1 (Naumann *et al.*, 1999) qui est à l'origine de l'expression des proto-oncogènes tels que c-fos et c-jun (Meyer-ter-Vehn *et al.*, 2000). La protéine CagA non phosphorylée peut aussi avoir des effets pathogènes à l'intérieur de la cellule. Sa simple translocation entraîne l'activation aberrante de la β -caténine, des altérations au niveau des jonctions cellulaires apicales et une perte de polarité cellulaire (Amieva *et al.*, 2003; Bagnoli *et al.*, 2005; Franco *et al.*, 2005; Suzuki *et al.*, 2005; Saadat *et al.*, 2007).

II.4.b. Le peptidoglycane (PG)

Le peptidoglycane (PG) forme la paroi des bactéries Gram négatives et Gram positives. C'est une macromolécule très complexe essentielle au maintien de l'intégrité de la bactérie et à la résistance à la pression osmotique. Le PG est composé d'une partie peptidique (acide N-acétyl-muramique) et d'une partie saccharidique (N-acétyl-D-glucosamine) liés par des liaisons β (1-4). La complexité de cette molécule est la résultante de l'action de plusieurs types d'enzymes, glycosyltransférases, hydrolases et peptidases, qui façonnent sa structure tridimensionnelle (Holtje, 1998; Boneca, 2005). Le PG présente plusieurs fonctions biologiques et ses dérivés constitués de petits fragments de PG (muropeptides) sont impliqués dans plusieurs mécanismes cellulaires tels que l'activation des macrophages (Pabst *et al.*, 1980) et l'induction de cytokines (Gold *et al.*, 1985; Dokter *et al.*, 1994; Chamaillard *et al.*, 2003; Girardin *et al.*, 2003) et de peptides antimicrobiens (Dunn *et al.*, 1985). Au cours de l'infection par *H. pylori*, le PG est un acteur fort de l'induction de la réponse immunitaire innée et de l'inflammation. La translocation du PG de *H. pylori* à l'intérieur de la cellule épithéliale dépend de la présence chez la bactérie d'un SSTIV fonctionnel (Viala *et al.*, 2004). L'interaction du PG injecté avec la protéine intracellulaire motifs-reconnaissante Nod-1 (Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 1), détectrice spécifique du PG, induit l'activation d'une réponse inflammatoire Nuclear Factor- κ B (NF- κ B)-dépendante entraînant la sécrétion de l'IL-8 (Viala *et al.*, 2004) et de la β -défensine 2 (Boughan *et al.*, 2006; Grubman *et al.*, 2010).

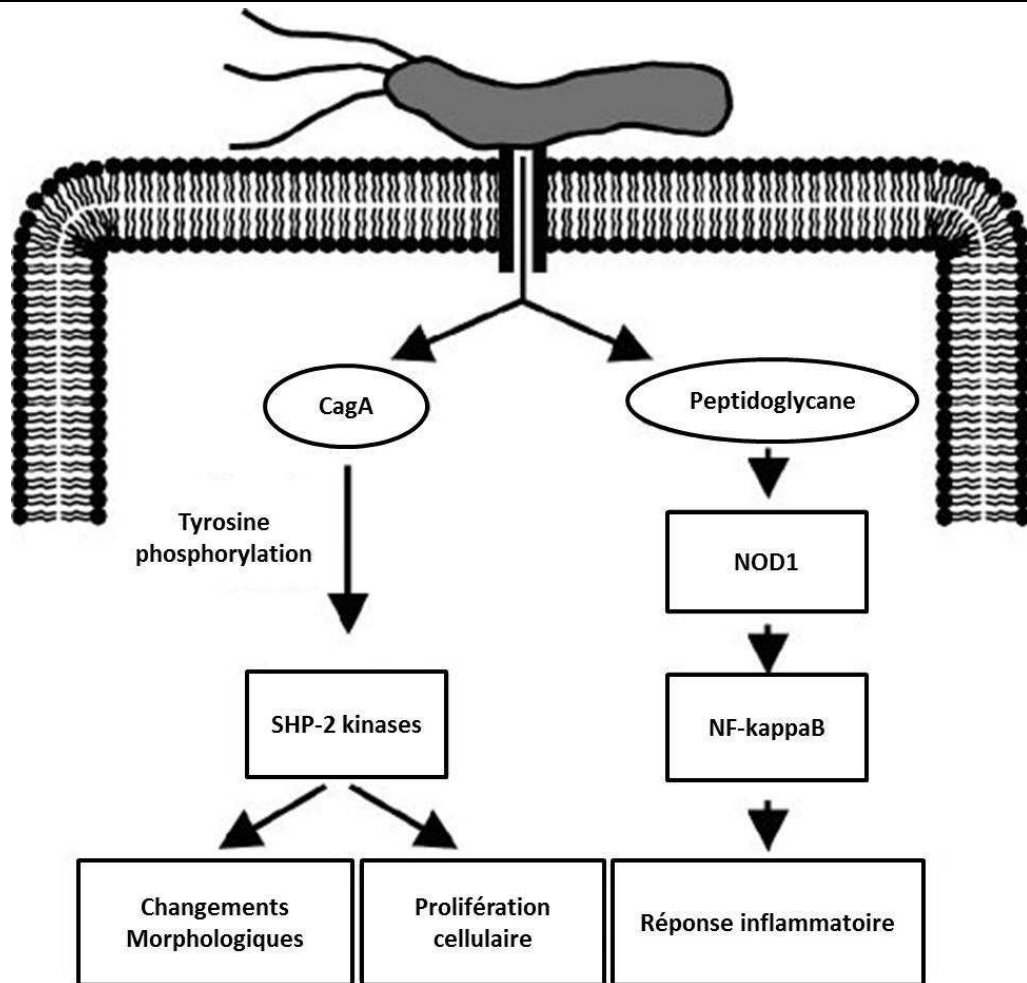


Figure 11. Représentation schématique du rôle du système de sécrétion de type IV dans les changements morphologiques, la prolifération cellulaire et l'immunomodulation au cours de l'infection à *H. pylori* (modifiée d'après Kusters, 2006)

II.4.c. La cytotoxine vacuolisante A (VacA)

La cytotoxine vacuolisante VacA est codée par le gène *vacA* présent chez toutes les souches de *H. pylori*. Cette protéine hautement immunogène induit *in vitro* une vacuolisation intracellulaire (Hotchin *et al.*, 2000) et est capable d'immunosuppression en bloquant l'activation des lymphocytes T ce qui contribue à la persistance et à la longévité de l'infection (Boncristiano *et al.*, 2003; Gebert *et al.*, 2003; Sundrud *et al.*, 2004). La séquence de *vacA* présente du polymorphisme au niveau de deux régions, la région centrale (allèles *m1* et *m2*) et la région codant la séquence signal (allèles *s1* et *s2*). Les souches associant les allèles *s1/m1* présentent une forte activité cytotoxique alors que celles de génotype *s2/m2* n'ont pas d'activité cytotoxique (Cover *et al.*, 1992; Atherton *et al.*, 1995; Atherton *et al.*, 1997; Miehleke *et al.*, 2000; Rhead *et al.*, 2007). VacA altère la structure de la cellule épithéliale, agit sur le cycle cellulaire et joue un rôle dans la modulation de la réponse inflammatoire (Cover *et al.*, 2005). Elle peut s'accumuler au niveau de la membrane interne des mitochondries induisant une diminution du potentiel transmembranaire mitochondrial, une libération du cytochrome c, l'activation des

caspases 8 et 9 et l'induction de l'apoptose (Figure 12) (Peek *et al.*, 1999; Galmiche *et al.*, 2000; Cover *et al.*, 2003; Willhite *et al.*, 2003; Manente *et al.*, 2008).

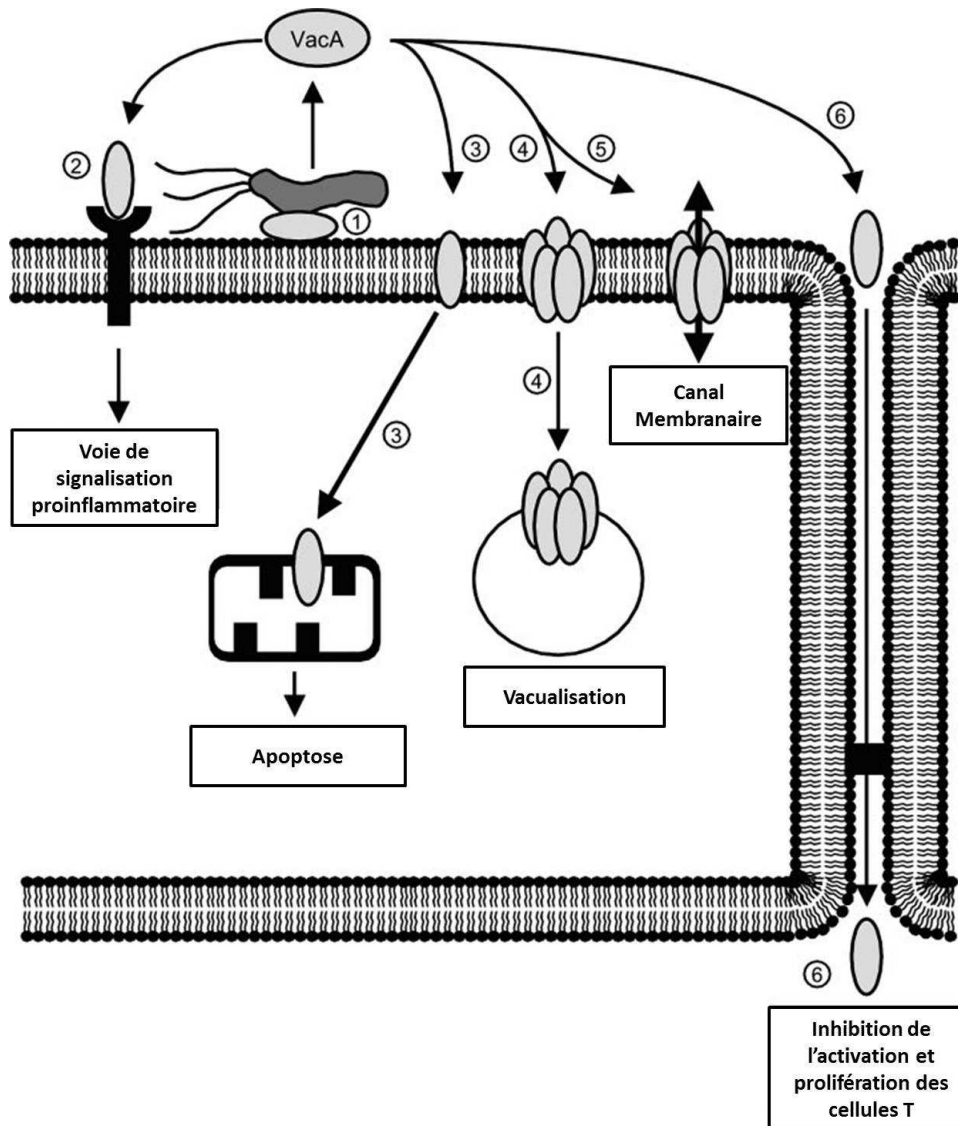


Figure 12. Les différentes actions cellulaires de VacA au cours de l'infection chronique par *H. pylori*

(1) Attachement de VacA à la surface de la cellule épithéliale, (2) Fixation de VacA sur son récepteur et initiation de la réponse inflammatoire, (3) Accumulation de vacA à la membrane mitochondriale et induction de l'apoptose, (4) Induction de la vacuolisation, (5) Formation d'un canal membranaire constitué de plusieurs molécules VacA entraînant une libération des nutriments hors de la cellule épithéliale, (6) Vac A traversant les jonctions serrées intercellulaires et inhibition de l'activation et prolifération des lymphocytes T.

(modifiée d'après Kusters, 2006)

II.4.d. Les Adhésines et protéines de la membrane externe (OMP, Outer membrane proteins)

L'adhérence de *H. pylori* à l'épithélium gastrique facilite la colonisation, la persistance de l'infection et la délivrance des facteurs de virulence à l'intérieur des cellules épithéliales. Environ 4% du génome de *H. pylori* code pour des protéines de la membrane

externe dont l'expression est fortement associée aux pathologies gastroduodénales ce qui augmente le risque du cancer (Dossumbekova *et al.*, 2006).

BabA (Blood group antigen binding adhesin)

BabA est une adhésine codée par le gène *babA2* qui se lie à l'antigène de groupe sanguin Lewis^b fucosylé situé à la surface des cellules épithéliales (Boren *et al.*, 1993; Ilver *et al.*, 1998). La présence de *BabA2* est associée à l'ulcère duodéal et au cancer gastrique (Gerhard *et al.*, 1999).

SabA (Sialic acid binding adhesion)

SabA est une adhésine qui se lie à la structure sialylée de l'antigène Lewis^x exprimé à la surface des cellules épithéliales. Elle est associée au risque de développement de cancer gastrique mais pas au risque d'ulcère duodéal (Yamaoka *et al.*, 2006). L'expression de l'antigène sialylé Lewis^x est induite durant l'inflammation gastrique chronique, ce qui indique que *H. pylori* peut moduler les motifs de glycosylation des cellules de l'hôte pour améliorer l'adhérence et la colonisation (Mahdavi *et al.*, 2002). SabA est régulée par variation de phase de façon à ce que son expression soit rapidement induite ou désactivée pour s'adapter aux changements de la niche gastrique (Yamaoka *et al.*, 2006).

OipA (Outer inflammatory protein)

OipA est une protéine membranaire inflammatoire de la famille OMP (Yamaoka *et al.*, 2000). La présence chez *H. pylori* du gène *oipA* fonctionnel est fortement associée aux ulcères duodénaux, au cancer gastrique et à des infiltrations accrues de polynucléaires neutrophiles (Yamaoka *et al.*, 2006; Franco *et al.*, 2008). L'expression de OipA est associée à une production élevée d'IL-8 *in vitro* (Yamaoka *et al.*, 2004). OipA joue un rôle dans l'induction de l'inflammation gastrique et la production des cytokines inflammatoires IL-1, IL-17 et TNF α chez les gerbilles de Mongolie (Sugimoto *et al.*, 2009). Elle contribue également à l'induction de la métalloprotéase matricielle MMP-1 (matrix metalloproteinase 1) fortement associée au cancer gastrique (Wu *et al.*, 2006).

DupA (Duodenal ulcer promoting gene)

Le gène *dupA* est situé dans la zone de plasticité du génome de *H. pylori* et semble être un marqueur de virulence. *In vitro*, DupA augmente la production d'IL-8 (Lu *et al.*, 2005). L'association entre la présence de *dupA* et le risque élevé de développement d'ulcère duodéal et/ou cancer gastrique est très variable d'une population à l'autre (Wroblewski *et al.*, 2010).

II.4.e. La Flagelline (FlaA)

H. pylori possède 3 à 5 flagelles unipolaires, engainés par une double couche phospholipidique. La rotation des flagelles assure la propulsion de la bactérie à travers le mucus gastrique très visqueux lui conférant ainsi la capacité de se mouvoir facilement dans la muqueuse. La rotation flagellaire est assurée par la protéine flagellaire motrice MotB codée par le gène *motB* (Ottemann *et al.*, 2002). Les filaments flagellaires sont constitués d'un co-polymère de flagellines FlaA (sous-unité majeure) et FlaB (sous-unité

mineure) (Leying *et al.*, 1992; Suerbaum *et al.*, 1993). La présence d'une forme tronquée de FlaA due à une mutation du gène *flaA* diminue *in vitro* la mobilité de *H. pylori* (Josenhans *et al.*, 1995). *In vivo*, la présence de FlaA est indispensable pour la persistance de l'infection chez les rongeurs et porcelets gnotobiotiques (Eaton *et al.*, 1996; Kavermann *et al.*, 2003). Contrairement à la flagelline des *Salmonelles* et autres pathogènes Gram-négatifs, FlaA de *H. pylori* possède une très faible capacité pour activer le Toll-like receptor 5 (TLR5), ce qui permet à *H. pylori* d'échapper à la réponse immunitaire et de persister dans la muqueuse gastrique (Lee *et al.*, 2003; Gewirtz *et al.*, 2004; Andersen-Nissen *et al.*, 2005). La motilité de *H. pylori* est indispensable pour assurer une meilleure colonisation gastrique et contribue à la pathogenèse liée à la bactérie.

II.4.f. Le Lipopolysaccharide (LPS)

La majorité des souches de *H. pylori* expriment le LPS qui contient des antigènes oligosaccharidiques fucosylés structuralement similaires aux antigènes du groupe sanguin humain. Ces antigènes bactériens (Lewis) présentent des variations antigéniques permettant à *H. pylori* d'échapper à la réponse immunitaire (Kusters *et al.*, 2006). Le LPS de *H. pylori* a été décrit comme faible activateur de la réponse immunitaire innée comparé à celui d'autres bactéries Gram-négatif (Muotiala *et al.*, 1992; Bliss *et al.*, 1998). Mais très récemment, il a été montré que le LPS de *H. pylori* pourrait être un ligand du TLR2 dont l'activation induit, via une cascade de voies de signalisation, l'activation de NF- κ B et l'induction de chimiokines (Smith *et al.*, 2011).

II.4.g. L'uréase

L'uréase est une métallo-enzyme présente dans la majorité des souches de *H. pylori*. Cette enzyme catalyse l'hydrolyse de l'urée en ammoniac ce qui permet à *H. pylori* de résister à l'acidité gastrique (Suerbaum *et al.*, 1999). L'uréase est un déterminant essentiel de la colonisation et de la persistance de la bactérie. L'ammoniac produit sous l'action de l'uréase est cytotoxique et peut aussi générer des dommages cellulaires (Kuwahara *et al.*, 2000). Les gènes codant pour l'uréase sont organisés en deux opérons *ureAB* et *ureIEFGH*. Le gène *ureAB* code pour les sous-unités structurales de l'enzyme et le gène *ureIEFGH* code pour les protéines accessoires qui activent l'enzyme par incorporation des ions nickels (Suerbaum *et al.*, 1999). L'activité enzymatique de l'uréase dépend indirectement du gène *ureI* codant pour une porine membranaire qui forme un canal dont l'ouverture est contrôlée par le pH externe. Un pH acide induit l'ouverture du canal permettant le passage de l'urée hydrolysée par l'uréase dans le cytoplasme bactérien. L'augmentation du pH provoque la fermeture du pore et empêche le passage de l'urée (Weeks *et al.*, 2000; Toledo *et al.*, 2002). L'inhibition de *UreI* pourrait être une cible pour l'éradication de *H. pylori* (Weeks *et al.*, 2000).

II.5. Aspects cliniques des pathologies associées à *H. pylori*

L'infection par *H. pylori* provoque systématiquement une gastrite aiguë majoritairement asymptomatique mais pouvant évoluer vers des pathologies plus sévères telles que les ulcères gastriques et duodénaux (10 à 20%), le cancer gastrique (1 à 2%) et

le lymphome du MALT. *H. pylori* est actuellement la seule bactérie responsable d'un cancer chez l'homme. L'adénocarcinome gastrique est la conséquence d'une évolution lente et prolongée de la gastrite chronique vers une atrophie de la muqueuse puis le développement sur cette atrophie de métaplasies suivies de dysplasies pour aboutir au cancer (Figure 13).

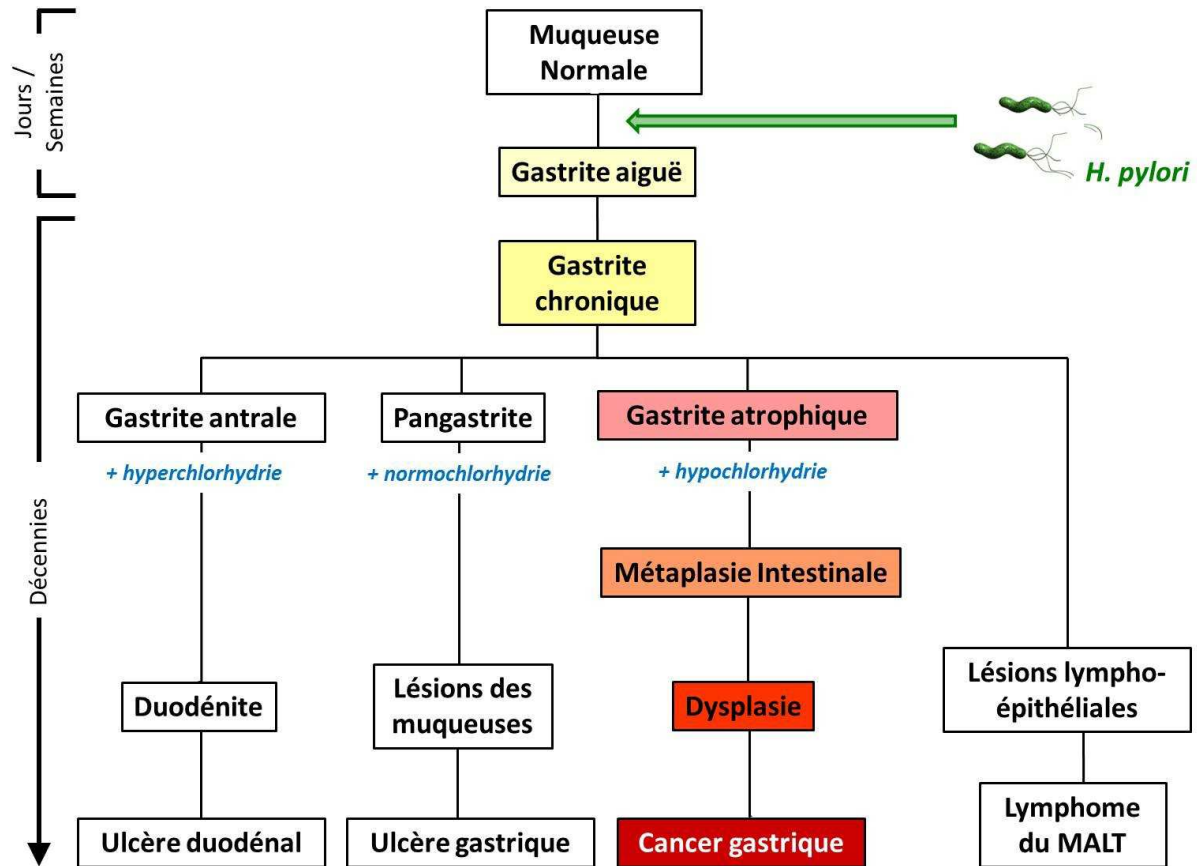


Figure 13. Rôle de *H. pylori* dans le développement des pathologies gastro-duodénales
(Basé sur la cascade proposée par Correa, 1996)

II.5.a. Gastrites aiguë et chronique

L'infection par *H. pylori* induit une infiltration massive de polynucléaires neutrophiles au niveau de la muqueuse gastrique. La phagocytose des bactéries provoque la libération de substances toxiques induisant des lésions (Graham *et al.*, 2004). Cet état inflammatoire ainsi que la persistance de la bactérie sont des étapes clé dans le passage de la gastrite aiguë vers une gastrite chronique (Kusters *et al.*, 2006). A ce stade, une forte corrélation existe entre le niveau de sécrétion d'acide, la distribution de la gastrite et l'évolution vers l'ulcère ou le cancer (Kusters *et al.*, 2006). La gastrite touchant l'ensemble de l'estomac est généralement associée à une hypochlorhydrie pouvant évoluer vers une atrophie puis un cancer gastrique (Atherton, 2006).

II.5.b. Ulcères

Les ulcères gastriques et duodénaux se caractérisent par des lésions d'au moins 0,5 cm de diamètre pénétrant jusqu'à la couche musculaire. Ces deux types d'ulcères sont fortement associés à *H. pylori* et se développent dans les sites où l'inflammation est la plus sévère (Kusters *et al.*, 2006).

L'ulcère gastrique est localisé vers l'antra, plus précisément dans la région de transition entre le corps de l'estomac et l'antra. L'ulcère gastrique résulte d'une pangastrite associée à une normochlorhydrie ou une hypochlorhydrie (Atherton, 2006).

L'ulcère duodéal est localisé au niveau du bulbe duodéal qui le plus exposé à l'acidité gastrique. La gastrite à prédominance antrale associée à une hyperchlorhydrie entraîne le développement de l'ulcère duodéal (Atherton, 2006). Les patients atteints d'ulcère duodéal présentent des scores d'inflammation très élevés, des niveaux élevés de gastrine et d'acidité (el-Omar *et al.*, 1995). La combinaison de ces facteurs physiopathologiques ainsi qu'un défaut de rétrocontrôle de la sécrétion acide contribuent fortement au développement de l'ulcère duodéal qui finalement est la résultante directe de l'inflammation et indirecte de *H. pylori*. Les sujets qui développent des ulcères duodénaux sont protégés du risque de développement du cancer gastrique.

L'éradication de *H. pylori* constitue la base du traitement antiulcéreux (Treiber *et al.*, 1998) et l'effet de l'éradication de *H. pylori* sur la cicatrisation des ulcères est différent selon qu'il s'agit d'un ulcère duodéal ou d'un ulcère gastrique. Une analyse incluant 57 essais a montré que l'éradication seule permettait un taux de cicatrisation plus élevé des ulcères duodénaux que des ulcères gastriques (Ford *et al.*, 2004). L'éradication de la bactérie avait un effet bénéfique majeur dans la prévention de la récurrence des ulcères qu'ils soient duodénaux ou gastriques.

II.5.c. Gastrite atrophique et métaplasie intestinale

L'inflammation chronique induite par *H. pylori* peut entraîner une destruction des glandes gastriques et une perte de l'architecture normale de la muqueuse gastrique ce qui provoque la mise en place d'un épithélium de type intestinal. Cet état de gastrite atrophique et métaplasie intestinale a lieu chez 50% des patients infectés par *H. pylori* et aux endroits où l'inflammation est la plus sévère (Kuipers *et al.*, 1995b). Le risque de développement de gastrite atrophique dépend de la distribution de l'inflammation chronique active. Les patients chez qui la production d'acide est diminuée montrent une progression plus rapide vers l'atrophie (Kuipers *et al.*, 1996). Les régions de métaplasie intestinale s'amplifient au cours du temps et augmentent considérablement le risque de cancer gastrique en fonction de la sévérité de l'atrophie (El-Omar *et al.*, 1997).

II.5.d. Cancer gastrique

Environ 1 million de cas de cancer gastrique sont diagnostiqués par an, classant ce cancer 4^{ème} à l'échelon mondial. En France, le cancer gastrique est la troisième cause de mortalité par le cancer digestif (Ferlay *et al.*, 2010). L'association entre *H. pylori* et le cancer gastrique est clairement établie (Forman *et al.*, 1991; Nomura *et al.*, 1991; Parsonnet *et al.*, 1991; Munoz, 1994; Lin *et al.*, 1995; Aromaa *et al.*, 1996; Webb *et al.*,

1996; Siman *et al.*, 1997; Wald *et al.*, 1997; Watanabe *et al.*, 1997; Hansen *et al.*, 1999; Limburg *et al.*, 2001). Sur le plan histologique, le carcinome gastrique se présente sous deux formes : le cancer gastrique diffus composé de cellules néoplasiques individuelles infiltrantes qui ne forment pas de structures glandulaires et l'adénocarcinome de type intestinal qui progresse à travers une série d'étapes histologiques (Correa, 1996; Wroblewski *et al.*, 2010). Ce dernier est initié par la transition d'une muqueuse normale vers une gastrite chronique superficielle suivie d'une atrophie gastrique et d'une métaplasie intestinale pour enfin engendrer une dysplasie et un adénocarcinome (Sipponen *et al.*, 2000).

Le rôle de *H. pylori* dans la genèse de l'adénocarcinome gastrique a été clairement démontré par la mise en évidence de mécanismes cellulaires de carcinogenèse par la bactérie. Le stress oxydatif généré au cours de l'infection peut contribuer à un dysfonctionnement cellulaire et *H. pylori* induit des dommages oxydatifs directs au niveau de l'ADN (Baik *et al.*, 1996; Farinati *et al.*, 1998; Obst *et al.*, 2000). La génération d'espèces oxygénées réactives dans l'épithélium gastrique est associée à la présence de facteurs de virulence tels que la protéine CagA et l'îlot *cag* ce qui suggère leur forte contribution au processus de carcinogenèse (Ding *et al.*, 2007). La fréquence des polymorphismes génétiques plus ou moins virulents des gènes *cagA* et *vacA* dans les différentes populations du globe est bien corrélée avec le taux d'incidence de cancers (Rhead *et al.*, 2007; Basso *et al.*, 2008; Jung *et al.*, 2009; Jang *et al.*, 2010). Plusieurs polymorphismes de l'hôte tels que celui de l'interleukine 1 peuvent accroître la réponse inflammatoire à la bactérie favorisant l'évolution vers le cancer (El-Omar *et al.*, 2000). Ces polymorphismes sont détaillés dans la section II.6.b.

Le développement de la gastrite et du cancer gastrique suite à l'infection par *H. pylori* a été modélisé et étudié chez les rongeurs. Les gerbilles de Mongolie développent des duodénites, des ulcères et un cancer gastrique après infection par *H. pylori* mimant très étroitement l'infection chez l'homme (Honda *et al.*, 1998a; Honda *et al.*, 1998a; Watanabe *et al.*, 1998). Chez la souris, le développement de gastrite atrophique et de métaplasies en réponse à l'infection par *H. pylori* (souche SS1) et *H. felis* est observé. En revanche, la progression vers la dysplasie et le cancer gastrique a été démontrée avec l'infection par *H. felis* (Wang *et al.*, 1998; Fox *et al.*, 2002; Cai *et al.*, 2005). Plusieurs voies relient l'inflammation au cancer mais dont les mécanismes moléculaires ne sont pas entièrement élucidés. Le stress oxydatif généré par les macrophages et les leucocytes au cours de l'inflammation peut endommager fortement les cellules et leur prolifération. L'apoptose et la sécrétion abondante de cytokines sont également des acteurs majeurs dans le développement du cancer (Allavena *et al.*, 2008).

Cellules souches et cancer

La théorie du cancer généré à partir des cellules souches est aujourd'hui un paradigme suggérant que la majorité des cancers sont liés à une transformation de cellules souches aberrantes ayant perdu la capacité de différenciation normale. Des travaux publiés sur les dix dernières années lient la carcinogenèse à l'accumulation d'altérations génétiques des cellules souches somatiques ou de leurs progéniteurs qui se transforment en cellules cancéreuses malignes en réponse aux processus d'inflammation

chronique (Yen *et al.*, 2006; Morrison *et al.*, 2008; Quante *et al.*, 2009; Rosen *et al.*, 2009). La métaplasie intestinale et la métaplasie spasmodique (SPEM, spasmodic polypeptide-expressing metaplasia) résultent respectivement du remodelage de l'épithélium gastrique en un épithélium intestinal et d'une antralisation des unités fundiques (Yuasa, 2003; Fox *et al.*, 2007). Ces deux phénomènes sont fortement associés à une inflammation chronique de la muqueuse gastrique suite à l'infection par *H. pylori* et cette inflammation chronique joue un rôle central dans la pathogenèse du cancer gastrique (Correa *et al.*, 2007). Les tumeurs forment des unités morphologiques et fonctionnelles hétérogènes. Une partie de ces unités est constituée de cellules souches cancéreuses (Reya *et al.*, 2001) qui, une fois transplantées dans un tissu hôte approprié, ont la capacité de reconstituer la tumeur (Huntly *et al.*, 2005). De plus, il a été montré que les premières étapes de la carcinogenèse gastrique résultent de l'expansion d'un clone muté dans sa propre niche (succession de la niche) suivie d'une colonisation de l'ensemble de l'unité gastrique par les mutants descendants de ce clone (conversion monoclonale) (McDonald *et al.*, 2008). La propagation de la mutation se fait par une fissure glandulaire où un bourgeon apparaît dans la niche des cellules souches et le bourgeonnement s'expand jusqu'à la formation d'une nouvelle glande (McDonald *et al.*, 2008). L'origine précise des cellules souches cancéreuses n'est pas tout à fait établie. Elles peuvent être issues d'une transformation des cellules souches normales, ou d'une migration de cellules souches hématopoïétiques qui ont été décrites comme cellules fondatrices du cancer gastrique (Figure 14) (Houghton *et al.*, 2004; Houghton *et al.*, 2007).

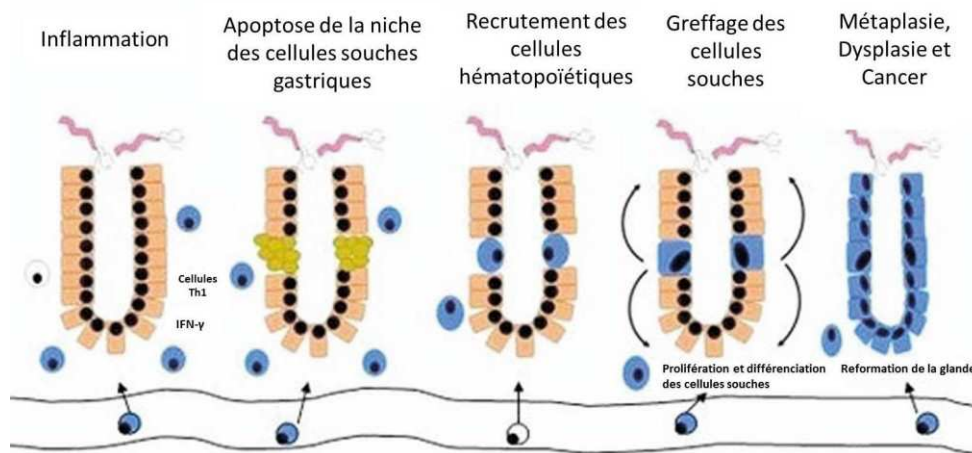


Figure 14. Modèle de la génération du cancer épithélial gastrique par les cellules souches
(modifiée d'après Houghton *et al.*, 2005)

II.5.e. Lymphome du MALT

Le lymphome du MALT se caractérise par une infiltration massive de cellules lymphoïdes dans la *lamina propria* entraînant une destruction des glandes gastriques et la formation de lésions lympho-épithéliales (Capelle *et al.*, 2008). L'association entre le lymphome du MALT et la présence de *H. pylori* est bien établie puisqu'environ 90 % des sujets atteints de lymphome du MALT sont infectés par *H. pylori* (Eidt *et al.*, 1994; Kusters *et al.*, 2006). Des études prospectives ont montré que l'éradication de *H. pylori* permet la

régression du lymphome du MALT de bas grade chez 60 à 90% des patients (Montalban *et al.*, 2006). Une analyse poolée à partir de 34 études incluant 1271 patients a montré une régression des lésions chez 77,8 % des patients ayant un lymphome gastrique du MALT dont l'infection avait été traitée avec succès (Zullo *et al.*, 2009).

II.6. Déterminisme pathologique associé à *H. pylori*

L'évolution d'une infection asymptomatique à *H. pylori* et d'une inflammation chronique vers des pathologies gastroduodénales plus sévères est la conséquence d'une interaction complexe entre les facteurs de virulence et la diversité génétique de la souche bactérienne, les polymorphismes génétiques et les prédispositions de l'hôte et les facteurs environnementaux. Le déterminisme pathologique associé à *H. pylori* est donc dépendant des facteurs bactériens, de l'hôte et de l'environnement (Figure 15).

II.6.a. Facteurs bactériens

Les facteurs de virulence bactériens jouent un rôle déterminant dans l'issue de l'infection et ceci est dû à la vaste hétérogénéité génétique présente chez *H. pylori*. Les polymorphismes génétiques touchant VacA et CagA, parmi d'autres, influent sur l'évolution clinique de la pathologie. Les souches associant les allèles *s1/m1* de VacA présentent une forte activité cytotoxique et sont associés aux lésions graves (Tee *et al.*, 1995). La présence de CagA est également associée au développement d'ulcère duodéal et d'adénocarcinome gastrique (Parsonnet *et al.*, 1997).

II.6.b. Facteurs de l'hôte

Les facteurs de virulence bactériens ne sont pas les déterminants absolus de l'évolution de l'infection vers des stades pathologiques sévères. Les polymorphismes génétiques de l'hôte touchant les gènes impliqués dans la réponse inflammatoire sont associés à une prédisposition au cancer gastrique et sont aussi impliqués dans le déterminisme pathologique.

IL1- β

La progression vers la carcinogenèse dépend de la nature de la réponse inflammatoire de l'hôte et d'une diminution de la sécrétion gastrique d'acide. La cytokine pro-inflammatoire IL1- β est une molécule qui interagit avec ces 2 paramètres. Son expression est augmentée dans la muqueuse gastrique infectée par *H. pylori* (Noach *et al.*, 1994). Les sujets ayant des polymorphismes d'expression élevée de l'IL1- β ont un risque plus élevé de développer une hypochlorhydrie, une atrophie gastrique et un adénocarcinome gastrique (El-Omar *et al.*, 2000). De plus, l'IL-1 β semble moduler la sécrétion acide dans la muqueuse enflammée en la diminuant (Takashima *et al.*, 2001). L'augmentation d'expression d'IL-1 β est également fortement associée à l'intensité de l'inflammation et de l'atrophie gastriques (Hwang *et al.*, 2002). L'induction de l'IL-1- β pro-inflammatoire au cours de l'infection par *H. pylori* associée à sa capacité d'inhibition de sécrétion acide et sa régulation par des promoteurs ayant des polymorphismes particuliers mettent en avant le rôle critique que joue cette cytokine dans le développement de cancer gastrique.

TNF α

Le Tumor necrosis factor α (TNF α) est aussi une cytokine pro-inflammatoire inhibant la sécrétion acide et surexprimée au cours de l'infection par *H. pylori* (Crabtree *et al.*, 1991). Des polymorphismes génétiques de cette cytokine sont associés au risque élevé de développement de cancer gastrique (El-Omar *et al.*, 2003). La contribution du TNF α au développement du cancer gastrique se fait probablement par des mécanismes de signalisation impliquant la voie de la β -caténine (Oguma *et al.*, 2008).

IL-10

Les polymorphismes réduisant l'expression des cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10 sont associés à un risque plus élevé de développement de cancer gastrique. Les effets combinatoires des polymorphismes touchant les gènes de l'IL-1 β , du TNF- α et de l'IL-10 sur le développement de cancer ont également été mis en évidence (El-Omar *et al.*, 2003).

IL-8

Les polymorphismes génétiques touchant les gènes de la réponse immunitaire innée sont aussi liés à un plus grand risque de développement de cancer gastrique, tels que les polymorphismes de l'IL-8 ou ceux du TLR-4 (Wroblewski *et al.*, 2010).

COX2

H. pylori active les enzymes pro-inflammatoires de la famille cyclo-oxygénases (COX). Les cyclo-oxygénases catalysent des étapes clés dans la conversion de l'acide arachidonique en endoperoxide (PGH₂), substrat de nombreuses prostaglandines synthases qui catalysent la formation de prostaglandines (Gupta *et al.*, 2001). Les prostaglandines régulent une multitude de processus physiologiques, y compris l'immunité et le développement (Gupta *et al.*, 2001). L'expression de COX2 est inductible et stimulée par plusieurs facteurs de croissance et cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF α , l'IFN- γ et l'IL-1 (Williams *et al.*, 1997). L'expression de COX2 est augmentée *in vitro* (Romano *et al.*, 1998; Juttner *et al.*, 2003) en présence de *H. pylori* et dans la muqueuse gastrique des sujets infectés (Sawaoka *et al.*, 1998; Fu *et al.*, 1999). COX2 est également surexprimé au cours des lésions malignes (Ristimaki *et al.*, 1997; Sung *et al.*, 2000). La capacité des produits de COX2 à provoquer la néoplasie est démontrée. Ces molécules stimulent la prolifération cellulaire en inhibant l'apoptose ce qui induit une rétention des cellules mutées, stimulent l'angiogenèse et la transformation cellulaire (Ohnishi *et al.*, 2008; Ogiwara *et al.*, 2009).

Sécrétion Acide

La pompe H⁺/K⁺ ATPase est la pompe à proton gastrique primaire localisée dans des tubulo-vésicules dans le cytoplasme des cellules pariétales non stimulées. Après stimulation, la pompe H⁺/K⁺ ATPase est recrutée vers la membrane apicale pour médier la sécrétion acide (Forte *et al.*, 1996). *H. pylori* peut inhiber ou stimuler la sécrétion d'acide en fonction du contexte de l'infection. L'infection aiguë est souvent associée à une hypochlorhydrie résultant d'une surproduction de la cytokine pro-inflammatoire IL-1 β et de l'inhibition du promoteur de la sous-unité α de la pompe H⁺/K⁺ ATPase (Schubert *et al.*,

2008). VacA induit aussi une hypochlorhydrie via la protéolyse de l'ezrine ce qui perturbe les interactions entre le cytosquelette et la membrane apicale, celles-ci étant nécessaires pour la translocation de la pompe H⁺/K⁺ ATPase afin d'assurer la sécrétion acide (Wang *et al.*, 2008). *H. pylori* peut également diminuer la sécrétion acide en réprimant l'expression de la sous-unité α du gène codant l' H⁺/K⁺ ATPase via l'activation et la translocation médiée par ERK1 et 2 de NF- κ B dans le noyau (Saha *et al.*, 2008). L'infection chronique par *H. pylori* peut induire une hypochlorhydrie ou une hyperchlorhydrie selon la distribution et sévérité de la gastrite. La gastrite touchant l'ensemble de l'estomac est généralement associée à une hypochlorhydrie pouvant évoluer vers un cancer gastrique. A l'inverse, la gastrite à prédominance antrale provoque une hyperchlorhydrie qui peut conduire au développement d'un ulcère duodénal (Atherton, 2006).

II.6.c. Facteurs environnementaux

La consommation excessive de sel semble être associée à un risque plus élevé de développement de cancer gastrique (Wroblewski *et al.*, 2010). Des travaux effectués chez les gerbilles de Mongolie montrent un effet synergique entre un régime alimentaire riche en sel et le développement de lésions malignes et du cancer gastrique d'une part (Kato *et al.*, 2006; Gamboa-Dominguez *et al.*, 2007) et l'augmentation de l'expression des cytokines pro-inflammatoires IL-1, IL-6 et TNF α d'autre part (Sun *et al.*, 2006). Les mécanismes via lesquels le sel augmenterait le risque de développement de cancer ne sont pas entièrement élucidés. Il diminuerait probablement le seuil pour la transformation maligne au niveau de l'épithélium gastrique et permettrait l'accès d'éléments carcinogènes dans le tissu gastrique par altération de la muqueuse. La production de cytokines en réponse à un régime riche en sel pourrait également contribuer au processus de carcinogenèse. Une possibilité soulevée récemment est la modulation de l'expression génique de *H. pylori* par le sel. Des études récentes montrent en effet une augmentation de l'expression de CagA en fonction de la concentration saline (Loh *et al.*, 2007; Gancz *et al.*, 2008).

Le tabagisme augmente aussi le risque de développement de cancer gastrique. Les antioxydants naturels joueraient au contraire un rôle protecteur (Wroblewski *et al.*, 2010). Aujourd'hui il est clairement établi que les effets combinatoires de plusieurs facteurs environnementaux augmentent les risques de développement du cancer gastrique chez les sujets infectés par *H. pylori*.

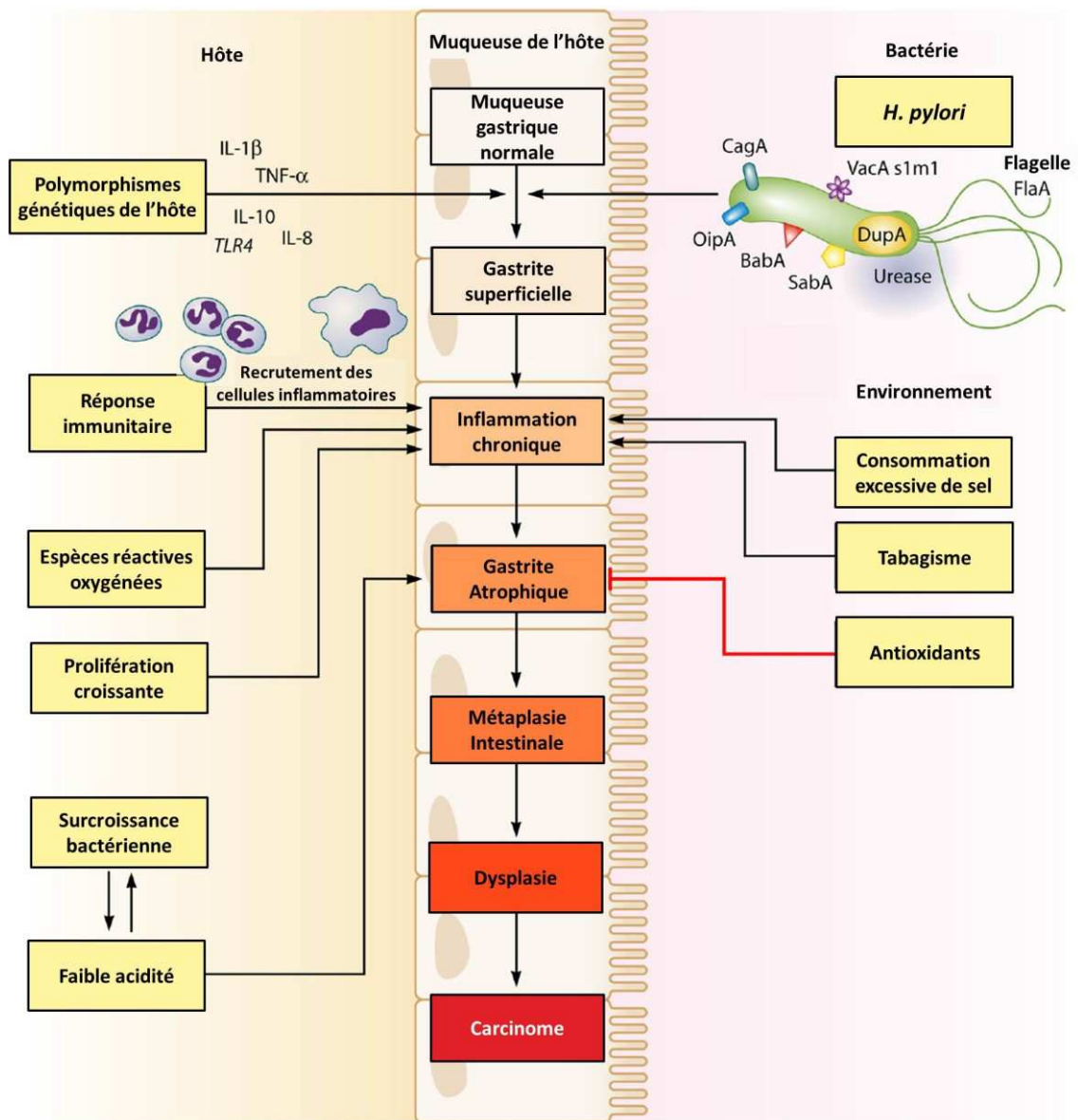


Figure 15. Déterminisme pathologique lié à *H. pylori*

L'évolution vers le cancer gastrique est la conséquence d'une interaction complexe entre les facteurs bactériens, de l'hôte et environnementaux (modifiée d'après Wroblewski et al., 2010).

Chapitre III. L'inflammation liée à *H. pylori*

H. pylori est un pathogène qui réside au niveau de la couche de mucus recouvrant la muqueuse gastrique. En revanche, plusieurs études ont démontré sa capacité à envahir les cellules épithéliales *in vitro* (Amieva *et al.*, 2002; Chu *et al.*, 2010) et *in vivo* chez l'homme et les singes (Semino-Mora *et al.*, 2003) ainsi que chez les souris ayant développé une gastrite atrophique (Oh *et al.*, 2005). *H. pylori* peut entrer en contact direct avec les cellules immunitaires de la lamina propria dans la majorité des cas de gastrite et de cancer gastrique (Moese *et al.*, 2007). L'infection par *H. pylori* induit chez l'hôte, l'activation des réponses immunitaires innée et acquise. Plusieurs chimiokines, cytokines et peptides antimicrobiens sont impliqués dans la modulation de ces réponses.

III.1. Généralités sur les chimiokines et cytokines

Les chimiokines sont des petites protéines (de 8 à 17 kDa) ayant pour fonction principale de stimuler et d'orienter la migration des leucocytes vers les sites d'inflammation. Elles sont produites d'une manière constitutive par plusieurs cellules ou en réponse à des infections bactériennes ou virales. Les chimiokines jouent un rôle dans plusieurs processus physiologiques et pathologiques tels que le développement embryonnaire ou l'inflammation (Rollins, 1997). Environ 50 chimiokines ont été identifiées chez l'homme et elles sont classées en 4 groupes basés sur la conservation d'un motif N-terminal impliquant des cystéines: les chimiokines CXC (CXC ligands : CXCL), les chimiokines CC (CCL), les chimiokines CX3C (CX3CL) et les chimiokines C (XCL) où le X représente un acide aminé autre qu'une cystéine (Zlotnik *et al.*, 2000). Potentiellement, toutes les cellules immunitaires expriment des récepteurs pour au moins une chimiokine. Le niveau d'expression élevé des récepteurs permet d'établir des gradients de concentration vers lesquels migrent les leucocytes (Zlotnik *et al.*, 2000).

Les chimiokines CXCL1, CXCL2 et CXCL3 sont membres de la famille de l'Interleukine 8 (IL-8, également connue sous le nom de CXCL8) et participent activement au recrutement des cellules immunitaires vers le site inflammatoire (Luster, 1998). Au cours de l'infection par *H. pylori*, l'expression de CXCL1 est augmentée dans la muqueuse gastrique des patients infectés (Shimoyama *et al.*, 1997; Shimoyama *et al.*, 1998; Yamaoka *et al.*, 1998; Eck *et al.*, 2000). *H. pylori* induit aussi l'expression de CXCL1 dans les cellules AGS et KATO-3 (Sieveking *et al.*, 2004).

CXCL5 (aussi connue sous le nom de « Epithelial-derived neutrophil-activating peptide 78) est une chimiokine activatrice des polynucléaires neutrophiles (PN) équivalent à l'IL-8 même si elle semble moins active dans le relargage de granules des PN. Elle joue un rôle dans la mise en place d'un gradient chimiotactique au cours de l'inflammation (Walz *et al.*, 1991; Walz *et al.*, 1997). L'expression de CXCL5 est augmentée dans la muqueuse gastrique des patients infectés par *H. pylori* et est également associée à une infiltration de neutrophiles dans la muqueuse (Shimoyama *et al.*, 1998). L'expression de l'ARNm de CXCL5 a également été observée *in vitro* par les cellules AGS stimulées par *H. pylori* (Rieder *et al.*, 2001).

L'Interleukine 8 (IL-8 ou CXCL8) a été identifiée comme un facteur chimiotactique induisant la migration de PN, de basophiles et de Lymphocytes T (LT) (Baggiolini *et al.*, 1989). L'expression de l'IL-8 est régulée par le facteur de transcription NF- κ B. La production de l'IL-8 au cours de l'infection par *H. pylori* se fait essentiellement par les cellules épithéliales gastriques (Crabtree *et al.*, 1994a; Crabtree *et al.*, 1994b; Crabtree *et al.*, 1994c; Noach *et al.*, 1994; Fan *et al.*, 1995; Sharma *et al.*, 1995; Jung *et al.*, 1997; Katagiri *et al.*, 1997; Ogura *et al.*, 1998; Nakachi *et al.*, 2000). Cette chimiokine joue un rôle majeur dans le recrutement des cellules immunitaires vers le site de l'inflammation déclenchant une production abondante de médiateurs inflammatoires.

CCL20 est une chimiokine qui participe au recrutement des cellules dendritiques (CDs) et de LT mémoires sur les sites inflammatoires (Dieu *et al.*, 1998). Elle possède une activité antibactérienne contre *E. coli* et *S. aureus* (Hoover *et al.*, 2002). L'expression de CCL20 est augmentée au niveau de la muqueuse gastrique infectée par *H. pylori* (Wen *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2007; Yoshida *et al.*, 2009). *In vitro*, l'exposition de la lignée cellulaire gastrique AZ-521 à *H. pylori* provoque l'induction *cag*-dépendante de CCL20 (Yoshida *et al.*, 2009).

Les cytokines sont des médiateurs inflammatoires pléiotropiques qui sont impliquées dans un vaste réseau d'interactions et qui présentent des effets régulateurs positifs ou négatifs sur des cibles cellulaires. L'IL-1 et le TNF- α ont été identifiés comme les premières cytokines pro-inflammatoires. Pour contrebalancer l'effet de ces médiateurs, des cytokines anti-inflammatoires telles l'IL-4, sont capables de réprimer certaines activités pro-inflammatoires. Une production abondante de cytokines pro-inflammatoires, telles que l'IL-1 β , le TNF α et l'IL-6, a lieu au cours de l'infection par *H. pylori*.

Le Tumor Necrosis Factor α (TNF- α) est une cytokine multifonctionnelle qui régule l'inflammation, la réponse immunitaire et l'apoptose (Locksley *et al.*, 2001). Le TNF- α membranaire participe aux effets cytotoxiques et inflammatoires au cours des contacts cellulaires. Il est produit par de nombreux types cellulaires dont les cellules immunitaires (LT, LB, basophiles, éosinophiles, DC, PN et mastocytes), les cellules tumorales et les cellules non immunitaires (astrocytes, fibroblastes, kératinocytes...) (Bazzoni *et al.*, 1996) L'expression du TNF α est induite par l'IL-17 dans les cellules épithéliales et les fibroblastes et par le LPS et l'IL-17 dans les monocytes/macrophages (Bazzoni *et al.*, 1996). La réponse inflammatoire induite par le TNF- α peut augmenter la production de cytokines telles l'IL-1, l'IL-4, l'IL-6, l'IL-18, et l'IFN- γ , ainsi que d'autres molécules telles les radicaux oxygénés libres ou les prostaglandines (Schottelius *et al.*, 2004). Le TNF- α joue aussi un rôle important dans la régulation de la réponse immunitaire de type Th1 (Schottelius *et al.*, 2004). L'expression du TNF- α est augmentée lors de la stimulation des cellules AGS (Kim *et al.*, 2007) et KATO III (Nakachi *et al.*, 2000) par *H. pylori* ainsi que dans la muqueuse gastrique des patients infectés (Crabtree *et al.*, 1991; Fan *et al.*, 1993; Noach *et al.*, 1994; Yamaoka *et al.*, 1996; Ierardi *et al.*, 2003).

L'IL-6 est une cytokine appartenant à une famille de protéines qui possèdent des activités pro- ou anti-inflammatoires et qui activent l'expression de gènes cibles impliqués dans la différenciation, la survie, l'apoptose et la prolifération. L'IL-6 est produite par les LT et LB, les monocytes/macrophages, les fibroblastes, les cellules endothéliales et les

kératinocytes (Naka *et al.*, 2002). Elle est surexprimée dans la muqueuse gastrique des patients infectés par *H. pylori* (Crabtree *et al.*, 1991; Gionchetti *et al.*, 1994; Yamaoka *et al.*, 1996; Yamaoka *et al.*, 1997; Ando *et al.*, 1998; Furukawa *et al.*, 1998; Yamaoka *et al.*, 2001).

L'IL-1 β est surtout produite par les monocytes/macrophages, les DC, les LB et les cellules Natural killer (NK) (Dinarello, 2009). Cette cytokine est produite dans la muqueuse épithéliale gastrique des patients infectés par *H. pylori* (Noach *et al.*, 1994; Lindholm *et al.*, 1998; El-Omar *et al.*, 2000). De plus, la stimulation des cellules AGS avec *H. pylori* provoque une surexpression de l'ARNm codant l'IL-1 β (Kim *et al.*, 2007).

III.2. Réponse immunitaire innée au cours de l'infection par *H. pylori*

La réponse immunitaire innée est la première ligne de défense contre les pathogènes. L'activation non-spécifique des cellules épithéliales par plusieurs composants des microorganismes (LPS, flagelline et PG) entraîne d'importants effets antimicrobiens et induit une inflammation et des lésions cellulaires via la production abondante de médiateurs pro-inflammatoires tels que des cytokines, des espèces réactives oxygénées ou encore de l'oxyde nitrique (ON) (Wroblewski *et al.*, 2010). La colonisation de la muqueuse gastrique par *H. pylori* déclenche chez l'hôte l'activation des mécanismes de défense innée, notamment en activant les voies de signalisation des TLRs (Toll-like receptors) et des protéines cytoplasmique Nod1 et Nod2 (Nucleotide-binding oligomerization domain protein 1 and 2), stimulant ainsi l'expression de facteurs pro-inflammatoires et antimicrobiens par les cellules épithéliales (Jung *et al.*, 1997; George *et al.*, 2003; Robinson *et al.*, 2007; Kawai *et al.*, 2009; Kumar *et al.*, 2009).

III.2.a. Activation des Toll-like Receptors (TLRs) et de Nod-1

TLRs

Les TLRs sont des protéines membranaires appartenant à la famille des récepteurs de reconnaissance de pathogènes (PRR, pathogen-recognition receptors) qui se fixent spécifiquement à certains motifs moléculaires des microorganismes, les PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) (Kawai *et al.*, 2011). Jusqu'à présent, dix TLRs fonctionnels ont été identifiés chez l'homme. Parmi les PAMPs reconnus par les TLRs, on peut citer les lipoprotéines (reconnues par les TLR1, TLR2 et TLR6), l'ARN double-brin (TLR3), le LPS (TLR4), la flagelline (TLR5), l'ARN simple-brin (TLR7 et TLR8) et l'ADN (TLR9) (Akira *et al.*, 2006). La reconnaissance des PAMPs par les TLRs induit le recrutement d'un ensemble de molécules adaptatrices telles que MyD88 et TRIF et l'initiation d'un ensemble de cascades de signalisation qui entraînent la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, de l'interféron (IFN) de type I, de chimiokines et de peptides antimicrobiens (Kawai *et al.*, 2010). Ces réponses conduisent au recrutement des neutrophiles et à l'activation des macrophages qui provoquent ainsi une élimination directe des pathogènes par phagocytose (Kawai *et al.*, 2011). L'activation des voies de signalisation médiées par les TLRs entraîne la maturation des CD8 et NK et contribue à l'induction de la réponse immunitaire acquise (Kawai *et al.*, 2011). Les TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, et TLR6, impliqués dans la reconnaissance des composants microbiens

membranaires, sont exprimés à la surface des cellules immunitaires (telles que les cellules B, les cellules NK, les CD4 et les macrophages) et à la surface des cellules non-immunitaires (telles que les fibroblastes, les cellules épithéliales et endothéliales). Les TLR3, TLR7, TLR8 et TLR9 reconnaissant les acides nucléiques sont localisés dans des vésicules intracellulaires (Blasius *et al.*, 2010; Kawai *et al.*, 2011).

Les cellules épithéliales gastriques expriment les TLR2, TLR4, TLR5 et TLR9 (Smith *et al.*, 2003; Ishihara *et al.*, 2004; Schmausser *et al.*, 2004; Schmausser *et al.*, 2005). Les données évoquant la contribution des TLR2, TLR4 et TLR5 dans la reconnaissance de *H. pylori* par les cellules épithéliales gastriques sont contradictoires. L'investigation autour du rôle du TLR4, principal détecteur des bactéries Gram-négatif, après infection par *H. pylori* montre que ce récepteur n'est pas impliqué dans la réponse cellulaire associée à la bactérie (Maeda *et al.*, 2001; Backhed *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 2003). A l'inverse, Ishihara *et al.* lui ont attribué en 2004 un rôle dans la reconnaissance du LPS de *H. pylori* (Ishihara *et al.*, 2004).

Les données concernant les TLR2 et TLR5 sont également partagées (Lee *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 2003; Gewirtz *et al.*, 2004; Ding *et al.*, 2005; Torok *et al.*, 2005; Kumar Pachathundikandi *et al.*, 2011; Smith *et al.*, 2011). Une étude très récente réalisée sur des cellules HEK293 transfectées avec les TLR2 et TLR5 montrent une augmentation de l'expression de ces deux TLRs après infection par *H. pylori* ainsi que l'induction via ces deux récepteurs d'une cascade de signalisation activant NF- κ B et provoquant la sécrétion d'IL-8 et de TNF- α indépendamment de *cag* (Kumar Pachathundikandi *et al.*, 2011). Une étude similaire a également démontré une augmentation de la sécrétion de l'IL-8 dans les cellules HEK293 (transfectées avec TLR2 et TLR5) exposées à *H. pylori* via des mécanismes dépendants de TLR2 et TLR5 (Torok *et al.*, 2005). D'autre part, Smith *et al.* ont identifié récemment la protéine Tribbles 3 comme régulateur de l'induction de NF- κ B médiée par la reconnaissance du LPS par le TLR2 durant l'infection avec *H. pylori* (Smith *et al.*, 2011).

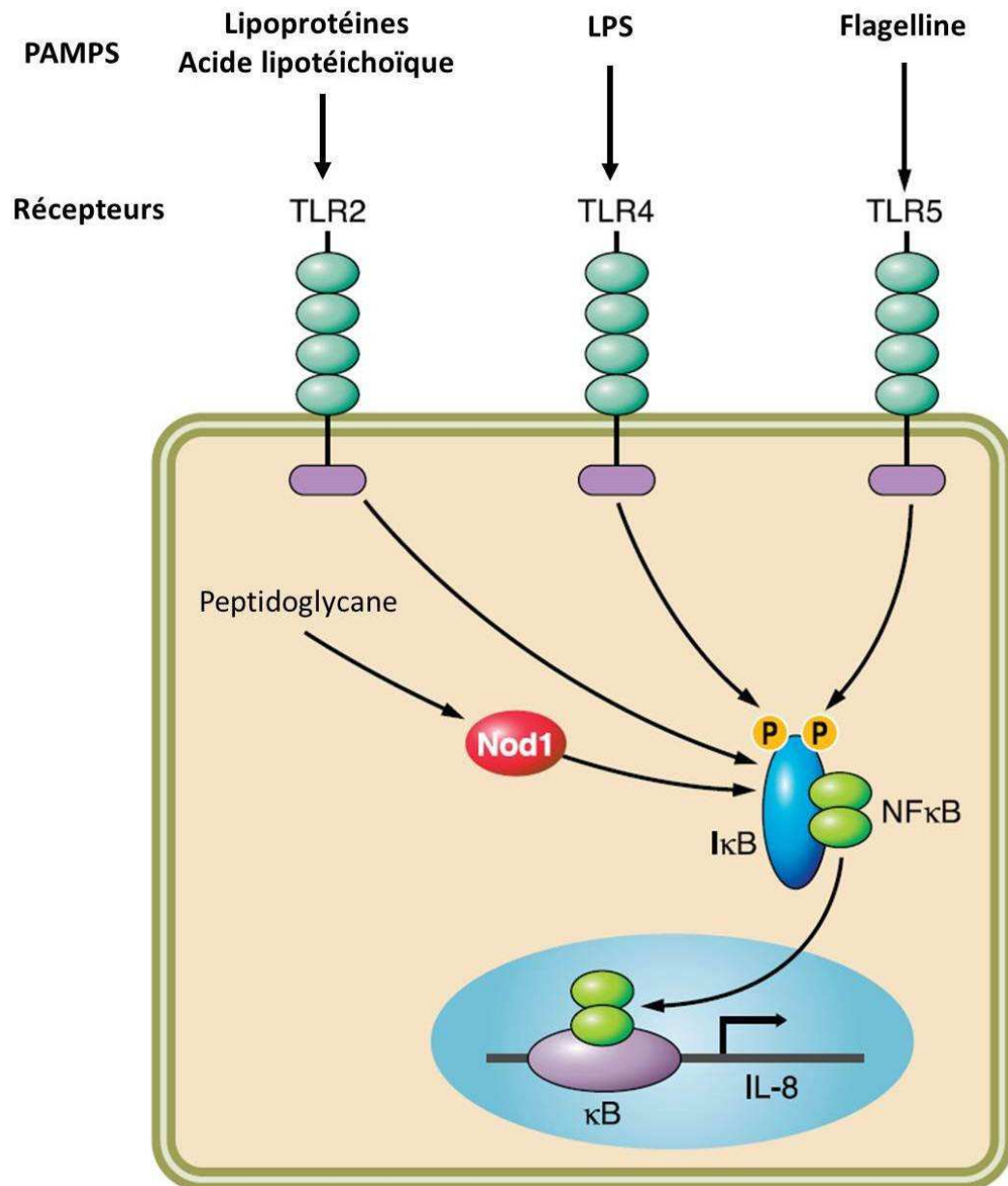


Figure 16. Reconnaissance des pathogènes par les TLRs

L'activation des TLRs et des récepteurs intracellulaires (Nod1) par les motifs moléculaires spécifiques des microorganismes (PAMPs) cible plusieurs voies de signalisation intracellulaires qui induisent au final l'activation de NF- κ B et la production d'effecteurs inflammatoires et immunitaires tels que l'IL-8 (modifiée d'après Peek et al., 2010)

Nod1

Nod1 est un PRR exprimé dans les cellules présentatrices d'antigènes et dans les cellules épithéliales exposées aux microorganismes (Strober *et al.*, 2006). Elle reconnaît spécifiquement le PG des bactéries Gram-négatif et participe activement à l'induction des mécanismes de défense antimicrobienne de l'hôte, notamment contre *Shigella*, *Escherichia coli*, et *H. pylori* (Kim *et al.*, 2004; Fukazawa *et al.*, 2008). La reconnaissance du PG de *H. pylori*, injecté dans la cellule épithéliale via le SSTIV, par Nod1 induit la production de chimiokines (Viala *et al.*, 2004) et de peptides antimicrobiens (Boughan *et al.*, 2006). Au

niveau moléculaire, deux mécanismes de défense antimicrobienne médiés par Nod1 au cours de l'infection par *H. pylori* ont été décrits.

Le premier mécanisme est basé sur la production de défensines par les cellules épithéliales. Grubman et son équipe ont montré que la régulation de l'expression génétique de hBD2 dans les cellules épithéliales gastriques est Nod1/cagPAI-dépendante et que hBD2 exerce une action antimicrobienne directe sur *H. pylori* (Grubman *et al.*, 2010). Les auteurs suggèrent que l'induction de hBD2 par Nod1 suite à l'infection par une souche de *H. pylori* cag PAI-positif pourrait être médiée par l'activation de NF- κ B ou celle d'AP1 par les Mitogen-Activating Protein Kinases (MAPKs). Ils ont également démontré que *H. pylori* induit l'activation de la voie de ERK, appartenant à la famille des MAPKs, via Nod1 d'une manière dépendante de cag PAI (Grubman *et al.*, 2010). Boughan *et al.*, ont précédemment reporté une diminution de l'activité du promoteur de hBD2 suite à l'exposition à *H. pylori* dans des cellules transfectées avec Nod1 (Boughan *et al.*, 2006). Ils ont également montré une diminution de l'expression de l'homologue murin de hBD2 dans la muqueuse gastrique de souris Nod-1 déficientes suggérant l'implication de Nod-1 dans l'expression de hBD2 médiée par NF- κ B. Une hypothèse postulant que la modulation de l'expression de hBD2 au cours de l'infection par *H. pylori* résulte d'une synergie ou d'une interaction entre les voies de signalisation ERK et c-Jun N-terminal kinase (JNK) et l'activation de NF- κ B via Nod1 a été établie. L'epidermal growth factor receptor (EGFR) est le candidat potentiel initiant l'activation de la voie ERK (Boughan *et al.*, 2006). Toutes ces données soulignent la nécessité de la présence de cag PAI pour l'activation de Nod1 (Viala *et al.*, 2004) et l'expression de hBD2 dépend de ces deux paramètres. L'élimination directe de *H. pylori* par hBD2 met en évidence le rôle majeur de Nod1 au cours de la réponse innée, en tant que régulateur des mécanismes de détection microbienne de l'hôte.

Un second rôle a été attribué à Nod1 par Watanabe *et al.* au cours de l'infection par *H. pylori*. Il est basé sur la production d'IFN de type 1 et l'activation de la voie de signalisation du « facteur génétique 3 stimulé par l'IFN », (IFN-stimulated gene factor 3, ISGF3) entraînant la génération d'une réponse Th1 protectrice. Par ailleurs, cette étude a montré que l'activation de NF- κ B induite par l'infection par *H. pylori* est indépendante de Nod1 (Watanabe *et al.*, 2010a). L'équipe de Hirata *et al.* a montré que *H. pylori* pouvait activer NF- κ B dans les lignées épithéliales par des mécanismes dépendants de MyD88 et non pas de Nod1 (Hirata *et al.*, 2006). L'équipe de Viala *et al.* a aussi reporté une production de chimiokines indépendante de la translocation nucléaire de la sous-unité p65 de NF- κ B par des cellules épithéliales gastriques primaires infectées par *H. pylori* (Viala *et al.*, 2004). L'augmentation du taux de colonisation dans les estomacs des souris déficientes en Nod1 par rapport aux souris contrôles est plutôt corrélée à une diminution de production de cytokines et chimiokines associées à ISGF3 telles que l'IFN- β , l'IP-10, et l'IFN- γ qu'à une diminution de cytokines associées à NF- κ B telles que le TNF (Watanabe *et al.*, 2010a). Les auteurs suggèrent que l'activation de l'IFN de type 1 et de ISGF3 par Nod1 jouerait un rôle protecteur contre l'infection par *H. pylori* (Watanabe *et al.*, 2010b).

D'un autre côté, il a été montré que la reconnaissance du PG par Nod1 et son activation sont essentielles dans l'induction des réponses immunitaires spécifiques T-helper Th1, Th2 et Th17 au cours de l'infection par *H. pylori*, soulignant l'implication de ce récepteur dans la défense immunitaire de l'hôte (Fritz *et al.*, 2007).

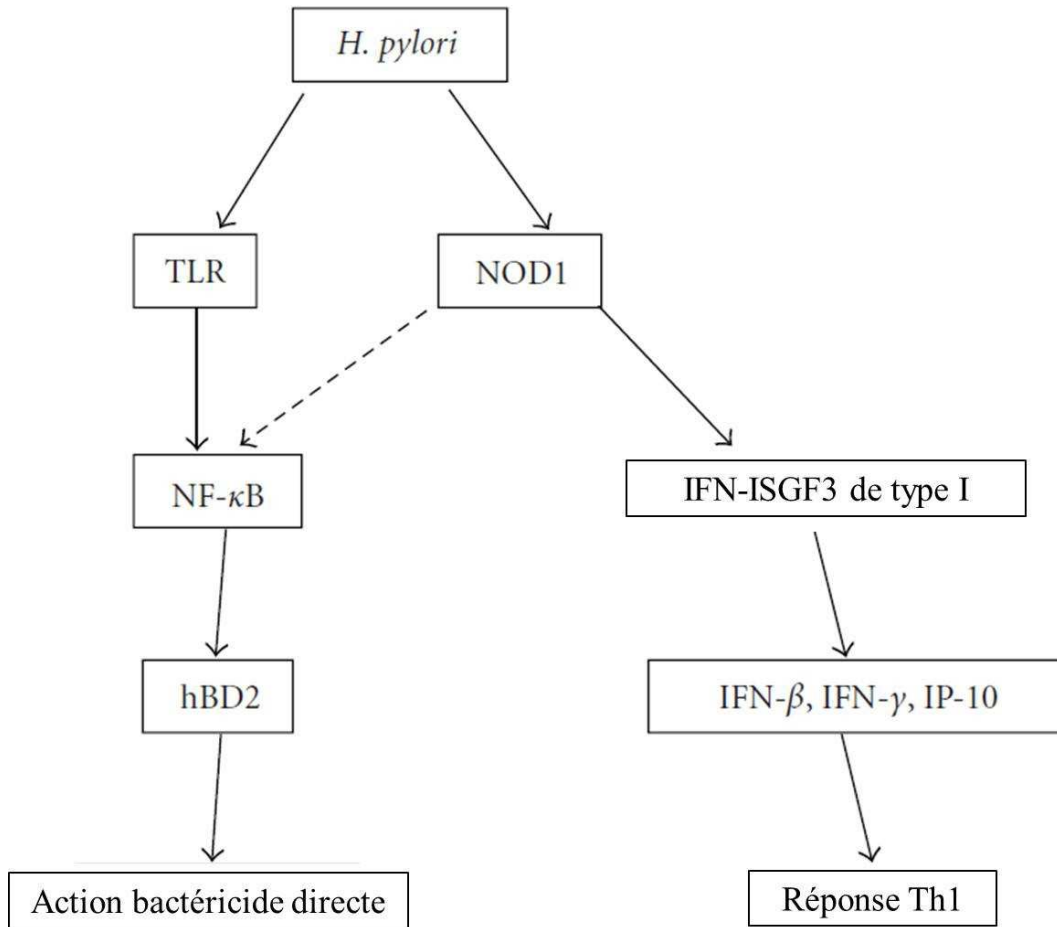


Figure 17. Mécanismes moléculaires de défense de l'hôte médiés par Nod1 contre *H. pylori*

L'infection des cellules épithéliales gastriques par H. pylori active les voies de signalisation de l'IFN de type I générant ainsi une réponse protectrice de type Th1. H. pylori induit la production de hBD-2 par les cellules épithéliales via l'activation des TLRs (modifiée d'après Watanabe et al., 2010a)

III.2.b. Peptides antimicrobiens

Les défensines sont des peptides identifiés par leur activité antimicrobienne contre des bactéries à Gram positif et à Gram négatif, des champignons et des virus (Jager *et al.*, 2010). Une caractéristique commune et fondamentale à ces peptides est la présence de 3 ponts disulfures intramoléculaires. Les β -défensines sont majoritairement produites par les cellules épithéliales et 4 sous-types, désignés hBD1, hBD2, hBD3 et hBD4 ont été identifiés dans la muqueuse humaine (Jager *et al.*, 2010). Les propriétés biochimiques des défensines humaines comprennent une masse moléculaire allant de 3 à 6 kDa et une charge cationique permettant à ces molécules de se fixer sur les groupes phospholipidiques chargés négativement présents à la surface microbienne. Le mécanisme d'action précis des défensines n'est pas entièrement élucidé mais il est clairement admis que leur action n'est pas uniforme (Jager *et al.*, 2010).

Les peptides antimicrobiens, y compris les défensines, sont produits en tant qu'éléments de la défense innée en réponse à l'infection par *H. pylori*. Des niveaux élevés de hBD2, et des α -défensines 1, 2 et 3 sont produits dans la muqueuse gastrique de sujets infectés par *H. pylori* (Isomoto *et al.*, 2004) et une expression élevée de hBD2, hBD3 (George *et al.*, 2003) et du peptide antimicrobien cationique humain 18 (LL-37) (Hase *et al.*, 2003) a été montré dans des cellules épithéliales gastriques infectées par *H. pylori*. Des études *in vivo* dans un modèle de Macaques Rhésus, ont également montré une forte induction *cag* PAI-dépendante d'un panel de peptides antimicrobiens de la famille de BD2 (Hornsby *et al.*, 2008).

III.2.c. Rôle des macrophages

Les monocytes et macrophages sont des coordinateurs importants des réponses immunitaires contre les pathogènes. Les macrophages sont les effecteurs essentiels dans la réponse innée contre *H. pylori* (Wroblewski *et al.*, 2010).

Production d'oxyde nitrique

Les macrophages produisent de l'ON à partir de la L-Arginine (L-Arg) via l'enzyme inductible Oxyde Nitrique Synthase (iNOS). L'expression de cette enzyme est induite par *H. pylori* dans les macrophages *in vivo* (Mannick *et al.*, 1996; Fu *et al.*, 1999) et *in vitro* (Wilson *et al.*, 1996; Gobert *et al.*, 2001; Gobert *et al.*, 2002; Bussiere *et al.*, 2005). Des cocultures *H. pylori*-macrophages montrent que *H. pylori* peut être éliminé par les macrophages et que cette défense dépend de l'ON (Gobert *et al.*, 2001; Bussiere *et al.*, 2005). D'autre part, *H. pylori* possède une arginase capable d'entrer en compétition avec les macrophages pour le substrat de l'iNOS, la L-Arg. La production d'ON est ainsi diminuée entraînant la survie et la persistance de *H. pylori* (Gobert *et al.*, 2001). De plus, cette compétition peut réguler négativement la synthèse d'iNOS puisque sa translation est fortement dépendante de la disponibilité de la L-Arg dans le macrophage (Chaturvedi *et al.*, 2007). L'arginase bactérienne est également impliquée dans la génération d'urée à partir de la L-Arg. L'hydrolyse de l'urée par l'uréase bactérienne entraîne la production d'ammoniac qui va tamponner l'environnement proche de la bactérie et lui permettre de survivre à l'acidité gastrique. D'autres mécanismes biochimiques médiés par *H. pylori* ont également lieu afin de limiter la production d'ON par les macrophages, ce qui lui permet de persister et d'augmenter le risque de développement de transformation néoplasique (Wroblewski *et al.*, 2010).

Apoptose et phagocytose

Les réponses inflammatoires de l'hôte sont augmentées par l'activation des macrophages dont l'apoptose peut avoir des conséquences délétères. Les cellules apoptotiques stimulent l'infiltration des neutrophiles qui englobent les débris, entraînant la potentialisation de l'inflammation et l'augmentation du stress oxydatif par la production d'oxy-radicaux par les neutrophiles. La déplétion des macrophages fragilise la défense de l'hôte. La génération de polyamines ainsi que la production de H₂O₂ sont aussi directement associées à l'apoptose des macrophages (Chaturvedi *et al.*, 2004; Wroblewski *et al.*, 2010).

H. pylori peut échapper à la phagocytose par les macrophages entraînant un échec de la réponse immunitaire innée contre cette bactérie (Allen *et al.*, 2000; Zheng *et al.*, 2003). Les phagosomes sont des vésicules sécrétées par les macrophages et capables d'internaliser *H. pylori*. Les phagosomes peuvent fusionner entre eux et former des mégasomes contenant un grand nombre de bactéries vivantes. Les souches *cag* PAI-positives capables de produire une protéine VacA fonctionnelle peuvent interrompre la maturation des phagosomes ainsi que leur fusion avec les lysosomes empêchant ainsi l'élimination des bactéries (Zheng *et al.*, 2003).

Rôle dans l'activation des cellules T et implication des cellules dendritiques (CDs)

Les macrophages et les cellules dendritiques (CDs) sont à cheval entre les réponses immunitaires innée et acquise. Au cours de l'infection par *H. pylori*, les macrophages et les CDs activent la mise en place de la réponse immunitaire acquise en produisant plusieurs facteurs (tels que l'IL-12) (Haeberle *et al.*, 1997; Meyer *et al.*, 2000; Meyer *et al.*, 2003) qui stimulent les cellules Th1, induisant ainsi la production de cytokines pro-inflammatoires notamment l'IFN- γ (Haeberle *et al.*, 1997; Meyer *et al.*, 2000; Meyer *et al.*, 2003). Les macrophages sont aussi impliqués dans l'amplification de la réponse inflammatoire par la production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1, le TNF- α et l'IL-6 (Harris *et al.*, 1998; Gobert *et al.*, 2004; Lytton *et al.*, 2005). Les altérations des jonctions cellulaires apicales par *H. pylori* facilitent les interactions de la bactérie avec les CDs (Amieva *et al.*, 2003; Fedwick *et al.*, 2005). Après l'activation des TLRs, les CDs activent les cellules T par différents mécanismes induisant ainsi la polarisation des réponses immunitaires en T helper 1 (Th1) ou Th2/T régulateur (Treg) par la génération d'IL-12 ou d'IL-10 respectivement (Banchereau *et al.*, 2000). L'identification d'un nouveau récepteur de *H. pylori*, le Dendritic cell-specific ICAM-3-grabbing nonintegrin (DC-SIGN) permettrait de mieux comprendre la régulation de la balance Th1/Th2 en faveur d'une persistance de l'infection (Appelmelk *et al.*, 2003). L'expression de l'antigène Lewis par le LPS de *H. pylori* peut bloquer la réponse Th1 par fixation au DC-SIGN des CDs induisant ainsi une forme d'immunosuppression (Appelmelk *et al.*, 2003).

III.3. Réponse immunitaire acquise au cours de l'infection à *H. pylori*

La réponse immunitaire acquise est une réponse prédéterminée à un stimulus immunologique précédemment identifié par l'organisme. La réponse acquise est spécifique à un pathogène particulier et nécessite une mémoire immune. La distinction entre les réponses immunitaires innée et acquise est souvent embrouillée du fait de l'étroite interaction entre les voies qui entraînent l'activation et le recrutement des lymphocytes et le développement des réponses cellulaires spécifiques T-helper (Th).

Les cellules Th CD4+ peuvent être divisées en deux sous-populations majeures. D'une part, les cellules Th1 impliqués dans l'immunité protectrice contre les parasites intracellulaires. Ces cellules produisent un ensemble de cytokines telles que l'IFN- γ et l'IL-2. D'autre part, les cellules Th2 qui produisent majoritairement les cytokines IL-4, IL-5 et IL-10 et qui sont associées à l'immunité humorale (Farrar *et al.*, 2002; Murphy *et al.*, 2002). Une nouvelle population de cellules T CD4+, les Th17, distincte des Th1 et Th2 a été récemment décrite (Harrington *et al.*, 2005). Ces cellules sont activées par l'IL-23 et

produisent l'IL-17, l'IL-21 et l'IL-22 (Khader *et al.*, 2009). Le rôle des cellules Th17 versus les cellules Th1 au cours de l'infection par *H. pylori* est aujourd'hui sujet d'investigations intenses.

III.3.a. Réponses Th1/Th2

La réponse T cellulaire à *H. pylori* est prédominée par une réponse de type Th1 caractérisée par une production abondante d'IFN- γ et des cytokines telles que le TNF- α , l'IL-2 et l'IL-12 (Fan *et al.*, 1994; Karttunen *et al.*, 1995; D'Elcios *et al.*, 1997; Bamford *et al.*, 1998). Une faible production des cytokines Th2 (IL-4 et IL-5) est observée au cours de l'infection par *H. pylori* (D'Elcios *et al.*, 1997). Les patients infectés par *H. pylori* possèdent des taux élevés de cellules T productrices d'IFN- γ et les clones T spécifiques de *H. pylori* présentent un profil Th1 chez les sujets atteints d'ulcère gastro-duodéal. La sévérité de la gastrite est fortement corrélée avec l'expression de TNF- α et d'IFN- γ chez les sujets infectés par *H. pylori* (Lehmann *et al.*, 2002). La production d'IL-12 par les macrophages, les CD4⁺ et les monocytes est cruciale pour l'induction de la réponse Th1 (Haeberle *et al.*, 1997; Meyer *et al.*, 2000; Guiney *et al.*, 2003; Meyer *et al.*, 2003; Hafsi *et al.*, 2004; Kranzer *et al.*, 2004) et le rôle des cellules épithéliales gastriques dans l'activation des cellules Th CD4⁺ est primordial (Ye *et al.*, 1997). Plusieurs facteurs de virulence bactériens sont impliqués dans la polarisation des cellules Th1, notamment la protéine activatrice des neutrophiles (NAP) de *H. pylori* qui stimule la sécrétion de l'IL-12 et de l'IL-23 par les neutrophiles et les monocytes (Amedei *et al.*, 2006). Des travaux dans des modèles murins d'infection ont montré que l'activation insuffisante de la réponse Th1 est associée à une colonisation bactérienne plus exacerbée. Cela suggère que le développement d'une très forte réponse Th1 aurait un effet protecteur et pourrait atténuer la colonisation de *H. pylori* (Eaton *et al.*, 2001a; Eaton *et al.*, 2001b; Akhiani *et al.*, 2002).

H. pylori utilise une diversité de mécanismes pour réguler négativement l'induction des cellules T. Plusieurs protéines de *H. pylori*, notamment CagA sont capables d'interrompre le cycle cellulaire des lymphocytes T (Knipp *et al.*, 1996; Paziak-Domanska *et al.*, 2000; Gerhard *et al.*, 2005). VacA peut bloquer l'activation des réponses T (Boncristiano *et al.*, 2003; Gebert *et al.*, 2003). *In vivo*, l'expression de la molécule co-stimulatoire B7-H1 par les cellules épithéliales gastriques est induite au cours de l'infection par *H. pylori*. Cette molécule peut interagir avec les cellules T et supprimer leur activation (Das *et al.*, 2006).

III.3.b. Réponse Th17

Les cellules Th17 sont caractérisées par la production d'un ensemble de cytokines dont l'IL-17A, l'IL-17F, l'IL-22, et l'IL-26 (Wilson *et al.*, 2007; Kabir, 2011). L'IL-17 induit l'expression d'une variété de gènes codant pour des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6, le TNF- α , l'IL-1 β (Iwakura *et al.*, 2006), pour des chimiokines telles que le CXCL1, le CXCL5, le CXCL8 (IL-8), le CXCL10, le CCL2, le CCL20 (Weaver *et al.*, 2007; Shen *et al.*, 2008), pour des peptides antimicrobiens tels que les β -defensins et la famille des S100 (Ganz, 1999; Kao *et al.*, 2004; Liang *et al.*, 2006) ainsi que pour des substances de remodelage tissulaire telles que les métalloprotéases matricielles (MMP1, MMP3 et MMP13).

L'IL-17 joue un rôle essentiel dans le chimiotactisme, le recrutement et l'infiltration des neutrophiles au cours de l'infection par *H. pylori* (Mizuno *et al.*, 2005; Algood *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2010). La production de cette cytokine est augmentée dans la muqueuse gastrique des sujets infectés par *H. pylori* (Luzza *et al.*, 2000; Mizuno *et al.*, 2005; Caruso *et al.*, 2007; Caruso *et al.*, 2008). L'infection expérimentale de souris et de Gerbilles de Mongolie par *H. pylori* induit une forte induction de l'IL-17 ainsi qu'une infiltration massive de cellules inflammatoires (Algood *et al.*, 2007; Shiomi *et al.*, 2008; Sugimoto *et al.*, 2009; Shi *et al.*, 2010). L'analyse fonctionnelle des voies intracellulaires impliquées dans l'induction de la synthèse de l'IL-8 par l'IL-17 montre que cette dernière est médiée par la voie des MAPK ERK 1 et 2 (Sebkova *et al.*, 2004).

Quelques études ont suggéré des effets anti-inflammatoires de l'IL17A au cours de l'infection par *H. pylori* par la suppression de la différenciation des cellules Th1 (Algood *et al.*, 2009; Otani *et al.*, 2009). Cependant, la réponse cellulaire Th17 semble précéder et moduler la réponse Th1 chez les souris infectées par *H. pylori* (Shi *et al.*, 2010). L'immunisation des souris avec des lysats de *H. pylori* induit l'expression de l'IL-17 dans la muqueuse gastrique ainsi que dans les cellules T CD4+ isolées de la rate et co-cultivées avec des CD8/macrophages stimulés par *H. pylori*. Cette augmentation du taux de l'IL-17 est associée à une plus forte inflammation et une moindre colonisation bactérienne de la muqueuse gastrique (DeLyria *et al.*, 2009). Ces données suggèrent qu'une déficience de la réponse IL-17/Th17 peut contribuer à la persistance chronique de *H. pylori*.

III.3.c. Réponse Treg

Les Treg sont une population de cellules T impliqués essentiellement dans les mécanismes d'allergie et d'auto-immunité et régulent aussi certains processus immunitaires au cours des infections. Les Treg sont majoritairement des cellules CD4+ et peuvent être divisés en plusieurs sous-types en fonction de leur mode d'action. Au cours de l'infection par *H. pylori*, les Treg semblent avoir un rôle d'immunosuppression contribuant au maintien de la pathologie. Les cellules T mémoires issues de sujets infectés par *H. pylori* présentent une plus faible prolifération ainsi qu'une plus faible production d'IFN- γ après co-culture avec des CD8 stimulés par *H. pylori*, par rapport aux cellules T issues de sujets sains (Lundgren *et al.*, 2003). Cette déficience est entièrement supprimée par la déplétion des cellules T régulatrices CD4+ CD25^{high} ce qui indique que les réponses Treg spécifiques de *H. pylori* peuvent supprimer les réponses cellulaires T mémoires contribuant ainsi à la persistance de l'infection (Lundgren *et al.*, 2003). Les sujets infectés par *H. pylori* présentent des niveaux élevés de cellules T CD4+ CD25^{high} dans les muqueuses gastrique et duodénale exprimant le gène *FOXP3* impliqué dans le développement des Treg, ainsi que des niveaux élevés de la protéine antigénique cytotoxique associée aux lymphocytes T (CTLA-4, cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4) (Lundgren *et al.*, 2005). La déplétion des cellules Treg Foxp3⁺ renforce l'inflammation et augmente la sévérité de la gastrite et les taux de cytokines chez la souris (Rad *et al.*, 2006). Ces observations, associées à l'expression élevée de *FOXP3* dans les lymphocytes gastriques des sujets infectés par *H. pylori*, suggèrent que l'induction d'une réponse Treg contribue à l'établissement d'un équilibre entre l'hôte et la bactérie,

permettant simultanément la survie de *H. pylori* et la prévention du risque d'inflammation destructrice (Rad *et al.*, 2006).

III.3.d. Les cellules B

Les cellules B sont des lymphocytes fortement impliqués dans l'immunité humorale et qui produisent les anticorps (Vaughan *et al.*, 2011). Ces cellules semblent jouer un rôle important au cours de la pathogenèse liée à *H. pylori*. Dans les souris déficientes en cellules B et infectées par *H. pylori*, une réduction de l'ordre de deux log de la colonisation a été reportée et a été associée à une inflammation gastrique plus sévère ainsi qu'à une infiltration de cellules T CD4+ (Akhiani *et al.*, 2004). Les niveaux d'immunoglobulines A et G dans le sérum et dans la muqueuse gastrique infectée semblent être impliqués dans l'immuno-protection. Certaines études suggèrent que les réponses cellulaires de type B médiant la sécrétion d'anticorps peuvent être contreproductives (Akhiani *et al.*, 2004; Akhiani *et al.*, 2005). Les splénocytes de souris naïves exposés à *H. pylori* sont protégés contre l'apoptose spontanée, prolifèrent en réponse à de faibles doses infectieuses de *H. pylori* et les cellules actives dans la réponse sont dérivées de populations de cellules B (Bussiere *et al.*, 2006). De plus, l'infection chronique par *H. pylori* protège les cellules B spléniques contre l'apoptose. Ceci indique qu'une activation/survie des cellules B pourrait avoir des conséquences sur l'évolution du lymphome de MALT qui se développe à partir des cellules B activés (Bussiere *et al.*, 2006). Enfin, les cellules B sont capables de produire des anticorps auto-réactifs qui peuvent être pathogènes (Yamanishi *et al.*, 2006).

Les interactions complexes entre *H. pylori* et les cellules immunitaires durant l'infection sont résumés dans la Figure 18.

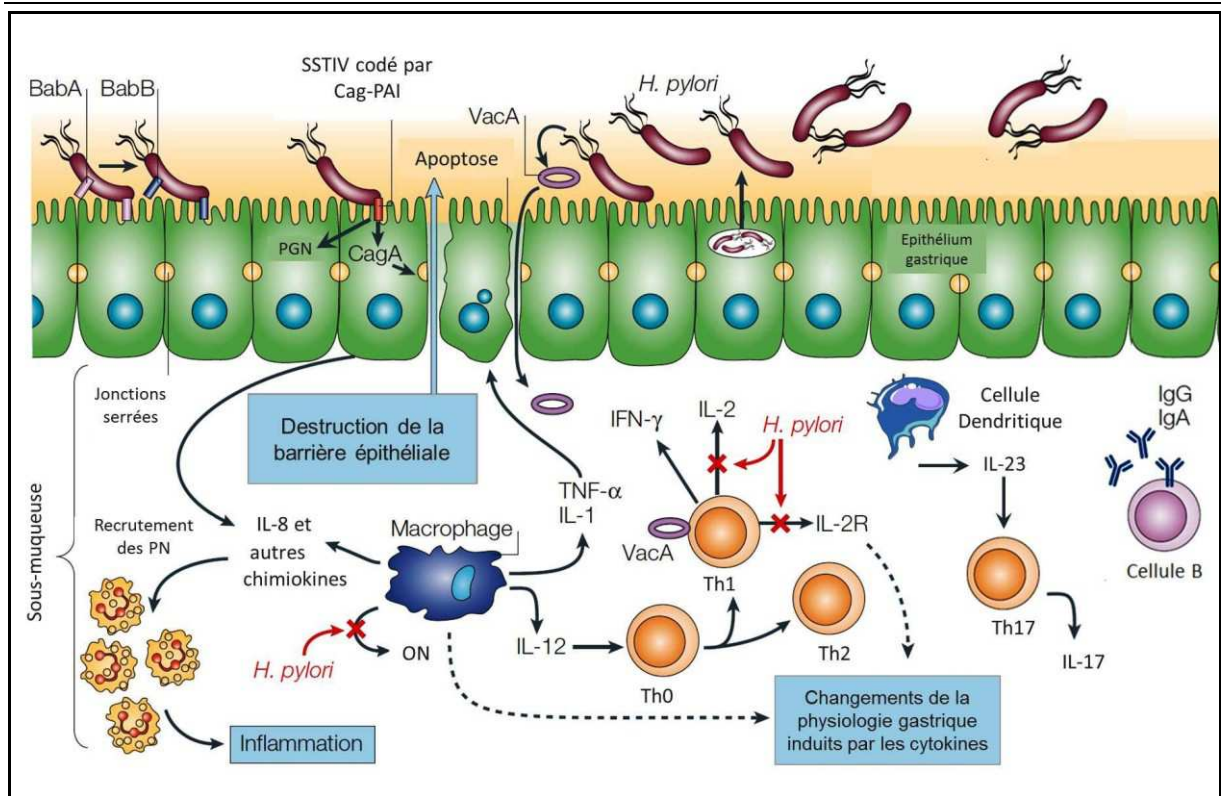


Figure 18. Interaction entre les facteurs de virulence de *H. pylori* et la réponse de l'hôte

H. pylori adhère aux cellules épithéliales gastriques grâce à BabA et autres adhésines. Le système de sécrétion de type IV permet la translocation dans la cellule épithéliale de CagA induisant la production d'IL-8 et d'autres chimiokines. Ces chimiokines recrutent les polynucléaires neutrophiles provoquant une inflammation. Le SSTIV permet aussi la translocation du Peptidoglycane reconnu spécifiquement par Nod1. CagA détruit la barrière épithéliale et entraîne des altérations morphologiques cellulaires. L'altération des jonctions permet le passage de la protéine apoptotique VacA dans la sous-muqueuse. La phase chronique de gastrite associe la réponse lymphocytaire à la réponse innée initiale. Les cytokines produites par les macrophages notamment l'IL-12 active les cellules recrutées telles que les cellules Th0, Th1, Th2 et les cellules B induisant une réponse Th1 prédominante. Une induction des Th17 produisant l'IL-17 est également observée. Cette voie est induite par l'activation des cellules dendritiques et la sécrétion d'IL-23. Les cytokines altèrent aussi la sécrétion de mucus et induisent des altérations de sécrétion acide. *H. pylori* inhibe la réponse immunitaire en bloquant la production d'oxyde nitrique par les macrophages (modifiée d'après Monack 2004).

Partie 2. Matériel et Méthodes

Chapitre IV. Matériel et Méthodes

IV.1. Microbiologie

IV.1.a. Souches de *H. pylori*

Les souches de *H. pylori* utilisées pour l'infection des souris C57BL/6 sont les souches HP141WT et HP141 Δ cagA. HP141WT est une souche sauvage isolée et caractérisée au Centre Hospitalier Universitaire de Poitiers en 1997 chez une patiente de 22 ans souffrant de gastrite. Cette souche est sensible à la Kanamycine et possède un gène *cagA* fonctionnel. HP141 Δ cagA est le mutant isogénique de la souche HP141WT. Cette souche est mutée pour le gène *cagA* par insertion d'une cassette de résistance à la Kanamycine. Une PCR contrôle a été réalisée afin de vérifier cette mutation (Ayraud *et al.*, 2002).

Les souches de *H. pylori* utilisées pour l'infection des cellules épithéliales gastriques sont les souches B128 et B128 Δ cagM. La souche B128 (*cagA*, *vacA* : *s1/m2*) est une souche isolée chez un patient souffrant de gastrite (Peek *et al.*, 1998; Israel *et al.*, 2001a). Cette souche adaptée au modèle de Gerbille de Mongolie, possède un îlot *cag* entièrement fonctionnel. B128 Δ cagM est le mutant isogénique de la souche B128. Cette souche est mutée pour le gène *cagM* par transformation naturelle, échanges alléliques et insertion d'une cassette de résistance au Chloramphénicol. La mutation a été vérifiée par une PCR contrôle (Akopyants *et al.*, 1998; Israel *et al.*, 2001a). La souche de *H. pylori* X47 est une souche naturellement résistante à la streptomycine isolée à partir d'un chat domestique et adaptée à la souris (Ermak *et al.*, 1998). Cette souche ne possède pas l'îlot *cag* PAI et a été utilisée lors des expériences préliminaires d'établissement de la dose infectieuse.

Les souches B128, B128 Δ cagM et X47 ont été fournies par le Dr. Ivo BONECA (Laboratoire de Biologie et Génétique de la paroi bactérienne, équipe INSERM AVENIR, Institut Pasteur, Paris).

IV.1.b. Culture de *H. pylori*

Les milieux de culture

Milieu de Skirrow : ce milieu sélectif est utilisé pour la culture de *H. pylori*, il est composé d'une base Columbia (Oxoid, France) contenant 23 g de peptones, 1g/l d'amidon, 5g/l de NaCl (Sigma-Aldrich, France) et de 10g/l d'agar (Oxoid), supplémentée avec 5% de sang de mouton (Eurobio, France) et un mélange d'antibiotiques TVPA (Triméthoprim 5 mg/l, Vancomycine 10 mg/l, Polymyxine B 50 mg/l, Amphotéricine B 2 mg/L (Oxoid).

Milieu de Skirrow modifié : ce milieu est utilisé pour l'isolement de *H. pylori* à partir de broyat d'estomac. Il est composé d'une base Columbia (Oxoid) à 10 % de sang de mouton supplémentée de Bacitracine (200 mg/l) et d'Amphotéricine B (2 mg/l).

Bouillon Brucella : ce milieu est utilisé pour la congélation des souches, la préparation des suspensions bactériennes et la culture en milieu liquide. Il contient : 28 g de Brucella Broth (DIFCO, Becton Dickinson, France) constitué d'une digestion

pancréatique de caséine à 10 g/l et de peptamine à 10 g/l, de dextrose à 1 g/l, d'extrait de levure à 2 g/l, du NaCl à 5 g/l et du bisulfite de sodium à 0,1 g/l. Pour la culture en milieu liquide, ce milieu est additionné de 5% de sérum de veau fœtal (SVF, Eurobio, France).

Conditions de culture

Les cultures de *H. pylori* sont réalisées en jarre dans une étuve à 37°C sous atmosphère microaérophile établie à l'aide des sachets CampyGen (Oxoid). La durée de culture classique est de 48h. Pour l'isolement de *H. pylori* à partir de biopsies murines et humaines, l'incubation dure entre 5 et 7 jours.

Préparation de l'inoculum infectieux

Pour l'infection murine, 10^8 UFC/ml de *H. pylori* HP141WT ou de HP141 Δ cagA en suspension sont préparées en Bouillon Brucella à partir de cultures sur milieu de Skirrow n'excédant pas 48h.

Pour l'infection cellulaire, les suspensions bactériennes de *H. pylori* B128 et B128 Δ cagM sont préparées dans le milieu de culture des cellules gastriques (Ham's F12, DMEM v/v (Gibco BRL, Invitrogen Life Technologies Cergy Pontoise, France)) à partir de cultures bactériennes réalisées sur du milieu Skirrow n'excédant pas 24h. Les doses infectieuses de *H. pylori* utilisées sont de 10 et 100 bactéries/cellule. Le comptage des cellules viables de *H. pylori* dans l'inoculum infectieux ont été effectués par des mesures spectrophotométriques, des mesures au néphélémètre ainsi que des dilutions en série. Les suspensions sont étalées sur milieu gélosé et incubées pendant 3 à 5 jours à 37 °C et dénombrées par la suite.

Culture de *H. pylori* à partir des biopsies murines

L'euthanasie des souris est réalisée par dislocation cervicale. L'estomac est prélevé dans des conditions d'asepsies maximales sous hotte à flux laminaire puis ouvert dans le sens longitudinal. Le bol alimentaire est éliminé, et l'estomac est ensuite coupé longitudinalement en deux lambeaux. Le premier lambeau a servi à la culture de *H. pylori*, il est broyé dans 1 ml de Bouillon Brucelle à l'aide d'un piston en téflon. Deux dilutions successives au 1/10^{ème} et au 1/100^{ème} sont effectuées puis 100 μ l de chaque suspension sont étalés sur des milieux de Skirrow modifiés. Les boîtes sont placées dans une enceinte à 37°C et le dénombrement des bactéries émergentes est réalisé après 7 jours de culture. Afin de vérifier la nature des bactéries issues des estomacs de souris, des tests biochimiques indicateurs de la présence d'uréase, de catalase et d'oxydase ainsi qu'un Gram sont réalisés. Le 2^{ème} lambeau est immédiatement congelé et conservé en azote liquide avant de réaliser une extraction d'ARN.

Culture de *H. pylori* à partir de biopsies gastriques humaines

Un diagnostic de la présence de *H. pylori* ainsi qu'un traitement préalable en cas de positivité du diagnostic sont effectués chez les patients hospitalisés avant de procéder à l'opération de gastrectomie. Afin de contrôler l'absence de *H. pylori* dans les échantillons reçus, une culture bactérienne est réalisée de façon systématique à partir de biopsies antrales et fundiques issues de tous les prélèvements. Brièvement, la biopsie est divisée en deux fragments d'environ 5mm. Un des fragments est mis en présence de 20 μ l de

milieu urée/indole (Biorad, Marnes-la-Coquette, France). Le virage de couleur du milieu du jaune au rose après environ 10 min d'incubation témoigne de l'activité uréasique de *H. pylori*. Le deuxième fragment est dilacéré au scalpel puis étalé sur gélose Skirrow à l'aide d'une pipette Pasteur. La gélose est incubée dans des jarres à 37°C en microaérophilie. La croissance de *H. pylori* se fait au bout de 3 à 4 jours.

Infection murine

Les souris utilisées sont des C57BL/6J, femelles, âgées de 6 semaines (Charles River, L'Arbresle, France) et certifiées exemptes de bactéries spiralées au niveau gastrique. Les souris sont mises à jeun pendant 18h puis infectées directement en intra-gastrique avec 1 ml d'une suspension bactérienne de *H. pylori* HP141WT ou HP141Δ*cagA* à 10⁸ UFC/ml à l'aide d'une sonde de gavage reliée à une seringue. Un groupe constitué de 5 souris non gavées est utilisé comme contrôle. Les souris sont gardées de 3 à 180 jours par groupe dans des cages placées dans des armoires compartimentées et ventilées.

IV.2. Biologie Cellulaire

IV.2.a. Isolement et expansion de cellules épithéliales gastriques humaines (CEGH) à partir d'estomacs humains issus de patients sains

Les cellules épithéliales gastriques sont issues d'estomacs humains provenant de déchets opératoires générés lors de réductions gastriques (Service de Chirurgie Viscérale, CHU de Poitiers et Polyclinique de Poitiers). Les pièces d'estomac sont transportées en milieu DMEM (Gibco BRL, Invitrogen Life Technologies) contenant, 100 U/ml de pénicilline (Gibco BRL, Invitrogen Life Technologies), 100 µg/ml de Streptomycine (Gibco BRL, Invitrogen Life Technologies) et 5 µg/ml d'Amphotéricine B (Sigma-Aldrich). Le morceau d'estomac est rincé abondamment avec du sérum physiologique afin d'éliminer toutes les traces de sang et de mucus. Il est découpé longitudinalement suivant le sillon chirurgical, ouvert et étalé. La graisse, la couche musculaire et la sous-muqueuse sont éliminées mécaniquement. L'épithélium gastrique est rincé de nouveau dans du sérum physiologique puis découpé en fins lambeaux de quelques millimètres. Une première digestion enzymatique est réalisée avec 0,5 mg/ml de Collagénase B (Roche diagnostics, Meylan, France), 2,5 mg/ml de Pronase (Roche Diagnostics) et 3U/ml de Dispase (Sigma-Aldrich) pendant 40 minutes à 37°C. Le surnageant est éliminé et les cellules sont dissociées grâce à deux digestions successives dans une solution contenant de la trypsine 1X et 0,05% d'acide Tétracétique Diamine Ethylène (EDTA) (Gibco BRL, Invitrogen Life Technologies) pendant 15 min à 37°C. La suspension cellulaire est ensuite filtrée à travers un tamis de 250 µm en présence de DMEM complété avec 10% de sérum de veau foetal (Sigma-Aldrich). Après centrifugation (400g, 5 min), le culot cellulaire est repris dans du milieu DMEM, lavé 2 fois par centrifugation, puis à nouveau repris dans du DMEM. La suspension cellulaire est alors à nouveau filtrée à travers un tamis de 100 µm. Après centrifugation, le culot cellulaire est repris dans le milieu de culture constitué de Ham's F12 et de DMEM (v/v) complété avec 10% de Sérum de Veau Foetal (Sigma-Aldrich), 0,5 ng/ml de EGF («Epidermal Growth Factor», BRL, Invitrogen Life Technologies) et 15 ng/ml de HGF («Hepatocyte Growth Factor», Miltenyi Biotec SAS,

Paris, France). Les cellules sont ensuite comptées en présence de bleu Trypan et la concentration cellulaire est ajustée à 4.10^5 cellules/ml dans des plaques de culture 24 puits « pré-coatées » au collagène de type I (BD Biocoat, Becton Dickinson, Le Pont-De-Claix, France) puis mises en culture à 37°C sous une atmosphère contenant 5% de CO₂. Le milieu de culture est changé après 24 h puis est renouvelé tous les 2 jours. La culture primaire des CEGH est poursuivie pendant 4 jours jusqu'à l'obtention d'un tapis cellulaire avoisinant 80% de confluence avant d'être infectée par une suspension bactérienne.

IV.2.b. Infection des CEGHA par *H. pylori*

La monocouche de CEGH est lavée en milieu Ham's F12/DMEM seul puis gardée dans ce milieu dépourvu de facteurs de croissance pendant 12h avant d'être mise en contact avec une suspension de *H. pylori* (souches B128 et B128 Δ cagM) à une dose infectieuse allant de 10 ou 100 bactéries/cellule pendant 3h ou 24h sous atmosphère humide à 37°C contenant 5% de CO₂. Les surnageants de culture sont ensuite récupérés, centrifugés (400 g, 5 min, 20°C) puis congelés à -80°C avant de réaliser un dosage protéique. Pour l'extraction des ARN totaux, la monocouche de CEGH est lavée deux fois avec un milieu PBS puis lysée en présence de 100 μ l de tampon RA1 et 2 μ l de TCEP (Tris 2-Carboxylethyl Phosphine Hydrochloride) selon les instructions données par le fournisseur (kit Macherey Nagel RNA XS, Hoerd, France). Le lysat cellulaire est congelé à -80°C avant de procéder à l'extraction des ARN.

IV.2.c. Stimulation des CEGHA par l'acide lipoteichoïque (LTA) et blocage du Toll-Like Receptor 2 (TLR2)

La monocouche de CEGH est mise en présence soit de 1 μ g/ml d'acide lipoteichoïque purifié à partir de *Staphylococcus aureus* (Invivogen, San Diego, Etats-Unis) soit avec une suspension de *H. pylori* (souche B128 à la dose infectieuse de 100 bactéries/cellule) avec ou sans 5 μ g/ml de l'anticorps monoclonal neutralisant du TLR2 (Anti-hTLR2-IgA) (Invivogen) pendant 24h sous atmosphère humide à 37°C contenant 5% de CO₂. Les surnageants de culture sont ensuite récupérés, centrifugés (400 g, 5 min, 20°C) puis congelés à -80°C avant de réaliser un dosage protéique.

IV.2.d. Culture et expansion de la lignée cellulaire gastrique humaine AGS

Les cellules AGS sont cultivées dans des flasques de 25 ml en présence de DMEM supplémenté de 10% de SVF (v/v) (Sigma-Aldrich), 50 U/ml de pénicilline (Gibco BRL, Invitrogen Life Technologies) et 50 mg/ml de streptomycine (Gibco BRL, Invitrogen Life Technologies). Les cultures sont maintenues à 37°C sous une atmosphère contenant 5% de CO₂ pendant 3 jours. A confluence, les AGS sont trypsinées, comptées au bleu de trypan etensemencées dans des plaques de culture de 24 puits à une densité de 4.10^5 cellules/puits avant d'entamer les marquages immunochimiques.

IV.2.e. Culture et expansion de cellules gastriques à phénotype de cellules souches (CPS)

Les cellules gastriques à phénotype de cellules souches (CPS) sont obtenues à partir de cultures vieillissantes de cellules épithéliales gastriques. En effet, le maintien en

culture pendant 3 à 4 semaines des primo-cultures de cellules épithéliales gastriques comme décrit ci-dessus permet d'observer d'une part la dégénérescence des cellules épithéliales et d'autre part une prolifération de cellules de type fibroblastique sur lesquelles est observé le développement de structures tridimensionnelles en forme de sphères, les CPS. L'expansion et le maintien des cultures de CPS sont réalisés dans des plaques 6 puits dans un milieu constitué d'un mélange de Ham's F12/DMEM (v/v) complétement avec 10% de SVF à 37°C sous une atmosphère contenant 5% de CO₂.

IV.2.f. Culture des CPS sur les Fibroblastes Embryonnaires de souris (MEF, Murine Embryonic Fibroblasts)

Les MEF sont des Fibroblastes Embryonnaires de souris dont l'activité mitotique est stoppée par traitement à la mitomycine. Ils sont utilisés préférentiellement comme cellules nourricières qui soutiennent l'auto-renouvellement des cellules souches embryonnaires et permettent leur maintien dans un état indifférencié (Thomson *et al.*, 1998; Reubinoff *et al.*, 2000; Xu *et al.*, 2001).

Traitement des MEF à la mitomycine, conservation et remise en culture

Les MEF sont cultivés dans des plaques de culture préalablement recouvertes de gélatine (Sigma Aldrich) dans du DMEM (Gibco BRL, Invitrogen Life Technologies) complétement avec 10% de Sérum de Veau Foetal (Stemcell Technologies, Grenoble, France) qui empêche la différenciation des cellules souches et 10⁻⁴ M de β-mercapto-éthanol. A confluence, les cellules sont traitées à la mitomycine 1X (Sigma Aldrich) qui est un agent alkylant induisant la formation d'adduits d'ADN, pendant 3 heures. Les MEF sont ensuite remises en suspension grâce à une solution de 0,25% de trypsine 0,05% d'EDTA (Gibco BRL, Invitrogen Life Technologies) puis centrifugées 10min à 400g. Les cellules sont congelées à -80°C dans un milieu contenant 10% de diméthylsulfoxyde. Les MEF sont décongelées et remises en culture (7.10⁴ cellules/cm²) dans un milieu contenant du DMEM-10% SVF en plaque 6 puits pour la réalisation de la coculture avec les CPS.

Culture des CPS sur MEF

Les sphères de CPS sont décrochées de leur matrice sous-jacente à l'aide d'une pipette spécifique au prélèvement (Stem cell cutting tool, VitroLife, Etats-Unis). Cet instrument permet le découpage précis de chaque sphère ; il est muni d'une poire permettant la récupération individuelle des sphères par aspiration. Les sphères sont dissociées dans 50 µl d'un milieu tamponné contenant 0,25% de trypsine et 0,05% d'EDTA (Gibco BRL, Invitrogen Life Technologies) pendant 10 min à 37°C. Après addition de deux volumes de Ham's F12/DMEM (v/v), 10% SVF, la suspension cellulaire est centrifugée à 400g pendant 10min et déposée sur le lit de MEF.

Test de croissance sans ancrage

Une solution d'agarose à 0,5% est préparée dans du milieu de culture constitué d'un mélange de Ham's F12/DMEM (v/v) complétement avec 10% de Sérum de Veau Foetal. Elle est coulée en fine couche dans des plaques de culture 6 puits et gardée à 37°C pendant 10 min jusqu'à gélification. Les boules prélevées sont dissociées dans 50 µl de

trypsine-0,05% EDTA (Gibco BRL, Invitrogen Life Technologies) pendant 10 min à 37°C. Après centrifugation (6min, 600g), les cellules sont resuspendues dans 200 µl de milieu de culture (Ham's F12/DMEM complétement avec 10% de Sérum de Veau Foetal) et déposées sur la fine couche d'agarose. Après 3 jours d'incubation à 37°C, du milieu de culture (Ham's F12/DMEM complétement avec 10% de Sérum de Veau Foetal) est ajouté. Les colonies sont comptées après 7 à 10 jours de culture.

IV.3. Biologie Moléculaire

IV.3.a. Extraction d'ARN

L'extraction des ARN totaux est réalisée à l'aide de kits commerciaux suivant les protocoles donnés par les fournisseurs avec quelques modifications. Les kits sont le MagNa pure Compact (Roche) utilisé pour l'extraction d'ARN à partir des tissus murins congelés, le Nucleo-Spin XS (Macherey-Nagel, Hoerd, France) utilisé pour l'extraction de l'ARN des cellules épithéliales gastriques humaines (CEGH), et le kit Arcturus Picopure RNA Isolation kit (Applied Biosciences) utilisé pour l'extraction de l'ARN des CPS.

Les tissus murins congelés sont broyés en présence d'azote liquide à l'aide d'un pilon dans un mortier préalablement refroidi sur un lit de carboglace. Le broyat est transféré dans 350 µl de tampon de lyse puis homogénéisé pendant 30 min à température ambiante. La suspension est ensuite centrifugée 5 min à 10 000g, le surnageant est prélevé et déposé dans des tubes d'extraction. L'extraction d'ARN est réalisée à l'aide de l'extracteur automatique MagNa Pure Compact (Roche Applied Science, Allemagne). Le principe de cette technique repose sur l'affinité des acides nucléiques (ARN et ADN) pour la silice présente sur des billes magnétiques. L'ADN est dégradé par un traitement à la DNase I et les ARN sont élués avec 50 µl d'eau « RNase-free, DNase free » (Gibco BRL) additionnée de 40 U de RNaseout® (Invitrogen) pour éviter leur dégradation.

Les lysats de CEGH sont décongelés lentement sur glace. Est ensuite ajoutée une solution contenant 4ng/µl d'ARN « Carrier » permettant de précipiter de petites quantités d'acides nucléiques. La suspension est alors filtrée sur une première colonne «Nucleospin® filter column» permettant d'éliminer les gros débris cellulaires, puis les acides nucléiques sont précipités en présence d'éthanol à 70% (v/v) avant d'être retenus sur une colonne de silice «Nucleospin® RNA XS column». La membrane de silice est dessalée et l'ADN est dégradé par digestion enzymatique pendant 15 min à température ambiante. La membrane est lavée et les ARN sont élués dans 10 µl d'eau «RNase-free, DNase free» (Gibco BRL) additionnée de 40 U de RNaseout® (Invitrogen).

Les acides nucléiques sont extraits des CPS après une lyse dans un tampon d'extraction de 30 min à 42°C. Ils sont précipités en présence d'éthanol à 70 % (v/v) puis fixés sur les colonnes «Arcturus Purification Columns » préalablement conditionnées avec 250 µl de tampon de conditionnement. La membrane est lavée et les ARN sont élués dans 12 µl d'eau «RNase-free, DNase free» (Gibco BRL) additionnée de 40 U de RNaseout® (Invitrogen).

La quantité d'ARN est déterminée en mesurant la densité optique (DO) à 260 nm à l'aide d'un Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, Cergy Pontoise, France). Une lecture complémentaire à 280 nm permet de vérifier la contamination protéique en calculant le

ratio 260/280 nm. Tous les échantillons utilisés pour l'analyse quantitative des ARNm possédaient un ratio supérieur ou égal à 1,8. La qualité des ARN est analysée par électrophorèse sur un gel d'agarose à 0,8% (p/v) contenant 0,5 µg/ml de GelRed® (Fluoroprobes, Interchim, Montluçon, France).

IV.3.b. Transcription inverse et quantification des acides désoxyribonucléiques complémentaires

L'étape de transcription inverse est réalisée avec 2 à 4 µg d'ARN totaux en présence de 10 mM de désoxyribonucléotides triphosphate (dNTP) (Invitrogen Life Technologies) et de 1,6 µg d'hexamères nucléotidiques générés de façon aléatoire (Invitrogen) suivant les instructions données par le fournisseur (kit Superscript®II). Le mélange est incubé 5 min à 65°C puis refroidi 2 min à 4°C avant l'addition d'un tampon «First Strand Buffer» (Invitrogen) et de 10 mM de dithiothréitol (Invitrogen). La suspension est portée à 25°C pendant 2 min avant l'addition de 5U de transcriptase inverse suivie d'une incubation de 8 min à 25°C puis 60 min à 42°C et enfin 15 min à 70°C. La transcription inverse des ARN totaux issus des CPS est réalisée avec 100 ng d'ARN totaux en utilisant le kit Superscript®III, (Invitrogen) suivant les instructions du fournisseur.

IV.3.c. Quantification de l'expression des ARNm par PCR quantitative

Cette technique permet d'amplifier des fragments d'ADN de façon exponentielle et de les quantifier grâce au « SYBR Green® », une molécule de cyanine assymétrique qui se fixe dans le petit sillon des ADN double brin. Lors de sa fixation, le SYBR Green émet une fluorescence à 525 nm. La PCR est réalisée dans des plaques 96 puits (LightCycler 480, multiwell plate 96, Roche, Applied Sciences, Mannheim, Allemagne) à l'aide du kit «LightCycler 480 SYBR GREEN I Master» (Roche, Applied Science) contenant de la Taq polymérase, du MgCl₂, et des dNTP, auxquels sont ajoutés 1 µM de chaque amorce et 12,5 ng d'ADNc. La ADN polymérase est activée par incubation du mélange pendant 5 min à 95°C, puis 40 (45 pour les CPS) cycles d'amplification comprenant 20 s à 95°C, 15 s à 64°C, 20 s à 72°C pour les ADNc des CEGH, ou 20 s à 95°C, 15 s à 60°C et 20 s à 72°C pour les ADNc issus de tissus murins ou 10 s à 95°C, 20 s à 65°C et 20 s à 72°C pour l'amplification des ADNc des CPS, sont réalisés. La quantification des produits de PCR est réalisée par une mesure de l'intensité de fluorescence à la fin de chaque cycle de PCR. La température est enfin portée de 60 à 95°C et une mesure de la fluorescence est réalisée tous les 0,5°C afin d'obtenir une courbe de fusion du produit final de PCR permettant d'apprécier la qualité et la spécificité de l'amplicon. La température de fusion est obtenue au maximum de la dérivée négative de la fluorescence en fonction de la température.

Une quantification relative par la méthode du $\Delta\Delta Ct$ est réalisée en utilisant des gènes de référence tels que celui codant la GlycérAldéhyde-Phospho-DésHydrogénase (GAPDH), enzyme constitutivement exprimée et intervenant dans la glycolyse. En effet, l'expression du gène d'intérêt dans l'échantillon est exprimée par rapport au gène de référence : $Ct \text{ gène cible} - Ct \text{ GAPDH} = \Delta Ct \text{ échantillon}$. Puis, cette valeur ΔCt échantillon est comparée à celle obtenue pour l'échantillon « calibre » ($\Delta Ct \text{ calibre}$) qui correspond dans nos études aux échantillons dits « contrôle » : $\Delta Ct \text{ échantillon} - \Delta Ct \text{ contrôle} = \Delta\Delta Ct$. Cette valeur est ensuite élevée à la puissance 2 : $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (ceci n'est possible

que si l'on a préalablement vérifié que l'efficacité de PCR obtenue avec chaque couple d'amorces permet d'obtenir un doublement de la quantité d'ADN à chaque cycle); la valeur obtenue rend compte du facteur d'augmentation ou de diminution de la quantité d'ARN messenger codant le gène cible présent dans l'échantillon par rapport à l'échantillon «contrôle».

IV.3.d. Analyse de l'expression des ARNm des CPS par micro-arrays

Les ARN totaux congelés à -80°C sont envoyés au CHU de Poitiers dans le service d'hématologie et oncologie biologique (Dr. Jean-Claude CHOMEL). L'analyse de l'expression des gènes de pluripotence est réalisée par la technique de « microarrays » grâce à une carte microfluidique dédiée (« TaqMan® Human Stem Cell Pluripotency Array », Applied Biosystems). Cette carte est composée de 4 rangées identiques de 96 gènes (90 gènes cibles et 6 gènes contrôles). Les gènes cibles comprennent des gènes exprimés dans les cellules non-différenciées, des gènes impliqués dans le maintien de la pluripotence, des gènes à caractère souche et des gènes de marqueurs de différenciation. Brièvement, une transcription inverse de 2 µg d'ARN totaux est réalisée avec le kit High Capacity RNA-to-cDNA (Applied Biosystems) selon les instructions données par le fournisseur. Chaque piste de la carte microfluidique est chargée avec 100 µl d'un mélange contenant l'ADNc et 50 µl de 2X TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems). La PCR quantitative est réalisée sur l'ABI PRISM 7900HT (Applied Biosystems). L'expérience est réalisée en duplicates et les gènes cibles non amplifiés sont exclus. L'analyse des données d'amplification est réalisée avec le logiciel StatMiner 3.0 software (Integromics, Madrid, Espagne). La quantification relative des gènes cibles est déterminée par la méthode $2^{-\Delta\Delta Ct}$ en utilisant le gène de ménage le plus stable (GAPDH) comme contrôle et l'expression est normalisée par rapport à la lignée H1 « Embryonic stem cell line » (H1-ES). Les profils des clustering genes sont déterminés en utilisant des algorithmes hiérarchiques du logiciel StatMiner.

IV.4. Biochimie des protéines

IV.4.a. Dosage ELISA

Le dosage ELISA permet de doser des protéines dans des lysats ou des surnageants de culture. Lors d'un dosage immunoenzymatique de type «sandwich», deux anticorps (Ac) reconnaissant spécifiquement la molécule à doser sont utilisés. L'Ac de fixation permet la capture de l'antigène. L'anticorps de révélation souvent couplé à la peroxydase catalysera une réaction colorée. Les niveaux d'expression des protéines humaines sont déterminés grâce à des kits de paires d'Ac selon les indications données par les fournisseurs (Peprotech ; Rocky Hill, NJ, Etats-Unis pour hBD2, hBD3, CXCL8 et R&D systems Europe ; Lille, France pour CXCL1 et TNF α).

IV.4.b. Immunohistochimie

Etude de l'expression de la cytokératine 18 (CK18), la mucine 1 (MUC1), la mucine 5AC (MUC5AC), le trefoil facteur (TFF-1/pS2)

Les CEGH sont cultivées en plaques 24 puits pendant 4 jours. Après action de la trypsine, les CEGH sont déposées sur des lames de verre ($5 \cdot 10^4$ cellules/lame, Superfrost®, Thermo Scientific) par cyto centrifugation (250g, 6min) et congelées à -80°C jusqu'à la réalisation du marquage. Après décongélation, les CEGH sont fixées dans un bain contenant 4% de paraformaldéhyde en tampon phosphate, pH 7,4 (Sigma-Aldrich), pendant 20 min à température ambiante. Après 3 lavages en PBS, les sites non spécifiques sont saturés pendant 30 min à température ambiante avec un tampon PBS contenant soit 5% de sérum d'âne (Sigma-Aldrich) pour le marquage de la CK18 soit 5% de sérum de chèvre (Sigma-Aldrich) pour le marquage de MUC1, MUC5A et TFF-1.

La solution de saturation est aspirée et les Ac spécifiques de chaque antigène recherché sont ensuite déposés et incubés 2h à température ambiante en chambre humide. L'Ac primaire monoclonal murin anti-Cytokératine 18 humaine (CK18, sc-58727, Santa Cruz Biotechnology) est dilué à $1 \mu\text{g/ml}$ dans une solution de PBS contenant 1% de sérum d'âne, les Ac primaires polyclonaux de lapin anti-Mucin 1, anti-Mucin 5AC et anti-pS2 humains (MUC1, sc-15333 ; MUC5AC, sc-20118 ; TFF-1/pS2, sc-28925, Santa Cruz Biotechnology) sont dilués à $2 \mu\text{g/ml}$ dans une solution de PBS contenant 1% sérum de chèvre. Après un premier lavage rapide dans un tampon PBS contenant de 0,05% Tween, les CEGH sont lavés dans trois bains successifs de tampon PBS, 5 min à température ambiante, puis incubés avec l'Ac secondaire d'âne anti-IgG de souris couplé à l'Alexa®-fluor 488 (Invitrogen) ou l'Ac secondaire de chèvre anti-IgG de lapin couplé à la Rhodamine-RedX® (Jackson Immunoresearch) pendant 45 min à l'obscurité, à température ambiante et en chambre humide. Après un lavage rapide dans un tampon PBS contenant de 0,05% Tween, les cellules sont lavées 3 fois dans des bains de PBS avant d'être montées entre lames et lamelles avec un milieu de montage contenant du DAPI (UltraCruz Hard-set Mounting Medium, Santa Cruz Biotechnology), une molécule possédant une forte affinité pour l'ADN et permettant de visualiser les noyaux après une excitation par les UV. Les lames sont ensuite observées au microscope confocal Olympus Fluoview™ FV1000 (Olympus) à l'objectif x40.

Protocole de marquage à la phosphatase alcaline

Les cultures de fibroblastes et de CPS en plaques 6 puits sont fixés au méthanol pendant 2 min à -20°C . Les cellules sont ensuite lavées pendant 10 min avec une solution tamponnée au pH 9,5 et constituée de Tris-HCl (0.16 g/ml), de NaCl (100 mM), et de MgCl_2 (10 mM) puis incubées dans une solution constituée de 5 ml de tampon A, $16,5 \mu\text{l}$ de solution aqueuse 1 composée de 25mg/ml de 5-Bromo-4-Chloro-3-Indoyl Phosphate (Sigma-Aldrich) et $16,5 \mu\text{l}$ de solution 2 composée de 10 mg de Nitro-Blue Tetrazolium (Sigma-Aldrich) dissouts dans $500 \mu\text{l}$ de Di-Méthyl Formamide (Sigma-Aldrich) pendant 10 min. Les cellules sont ensuite rincées à l'eau distillée et les noyaux marqués sont observés au microscope OLYMPUS CK X41.

IV.5. Tests statistiques

Les données présentées correspondent à la moyenne des données obtenues pour les expériences réalisées avec une erreur type SEM (Standard Error of the Mean). L'analyse statistique de la significativité est calculée en utilisant un t-test de student non paramétrique et non apparié (Mann-Whitney) ou un test de Kruskal-Wallis pour une analyse de variance non-paramétrique suivie d'un test de Dunn pour une comparaison entre groupes. Un résultat est dit généralement significatif lorsqu'il n'y a pas plus de 5 chances sur 100 que ce même résultat ait été produit par les fluctuations du hasard ; ce qui correspond à une probabilité p de 5 % soit $p = 0,05$. Le logiciel REST a permis d'analyser la différence d'expression des gènes entre deux conditions en utilisant les données d'amplification en temps réel obtenues en QRT-PCR. Ce test statistique permet de déterminer si la variation d'expression des échantillons est significative après normalisation sur des gènes de ménage. Pour tous les tests statistiques utilisés les valeurs significatives sont représentées par *.

Partie 3. Résultats et Discussion

Chapitre V. Modèle murin d'infection par *H. pylori*

La première partie de mes travaux de thèse a été dédiée à l'étude cinétique de la modulation de la réponse antimicrobienne liée à *H. pylori* dans un modèle murin. Le but étant de mettre en évidence le rôle de la protéine CagA dans l'induction de l'expression de peptides antimicrobiens chez les souris infectées par *H. pylori*.

L'infection des souris C57BL/6J a été réalisée avec une souche humaine de *H. pylori* HP141WT qui présente un *cag* PAI fonctionnel ou avec son mutant isogénique HP141 Δ *cagA*. La cinétique d'infection a duré entre 3 et 180 jours. Après sacrifice des souris et prélèvement des estomacs, une évaluation de la densité bactérienne des souches implantées et une étude de l'expression des gènes codant pour les différents médiateurs de la réponse antimicrobienne ont été réalisées.

V.1. Colonisation des souris par les souches HP141WT et HP141 Δ *cagA*

Deux lots constitués chacun de 6 souris femelles C57BL/6 ont été infectés par une suspension bactérienne de *H. pylori* HP141WT ou HP141 Δ *cagA* à 10^8 UFC/ml. Le dénombrement bactérien dans les biopsies gastriques murines après 3 à 180 jours infection ne montre aucune différence du taux d'implantation entre les deux souches à 3 et 30 jours. En revanche, après 180 jours d'infection, le taux d'implantation est significativement plus élevé chez les souris infectées par la souche HP141 Δ *cagA* (* $p < 0,001$) (Figure 19) et atteint $4,22 \cdot 10^4$ UFC/ml contre $2,53 \cdot 10^3$ UFC/ml pour les souris infectées par la souche HP141WT.

Au cours de ce protocole, 60% des souris gavées avec la souche HP141WT et 60% des souris gavées avec la souche HP141 Δ *cagA* ont été efficacement colonisées. *H. pylori* n'a jamais été isolée chez les souris témoins.

L'évaluation du taux d'implantation bactérienne dans la muqueuse murine a montré que les souris infectées par la souche HP141 Δ *cagA* étaient plus colonisées que les souris infectées par la souche sauvage. Ce résultat est cohérent avec des études antérieures effectuées sur un modèle de gerbille qui démontrent une densité de colonisation plus élevée chez les gerbilles infectées par des souches de *H. pylori* délétées de manière isogénique des gènes *cagA* ou *cagY* par rapport aux animaux infectés par la souche sauvage (Rieder *et al.*, 2005). De plus, Hornsby *et al.*, ont également observé une densité de colonisation plus élevée chez des Rhésus macaques infectés par une souche de *H. pylori* entièrement délétée de *cag* PAI par rapport aux macaques infectés par la souche sauvage (Hornsby *et al.*, 2008). Le rôle de la protéine CagA dans la colonisation bactérienne et l'induction de l'inflammation n'est toujours pas entièrement élucidé (Eaton *et al.*, 2001a; Akanuma *et al.*, 2002). Toutefois, il a été récemment démontré que la voie de signalisation Nod1 régule l'induction des β -défensines au cours de l'infection par *H. pylori* et ceci de façon *cag* PAI-dépendante, ce qui suggère une implication de cette voie dans la colonisation et l'implantation de la bactérie via la régulation de la production d'effecteurs antimicrobiens (Semple *et al.*, 2006). Par conséquent, il est possible que la souche HP141WT ait induit une plus forte réponse antimicrobienne que la souche HP141 Δ *cagA*

ce qui a conduit à une diminution du taux de colonisation gastrique chez les animaux infectés par cette souche.

L'échec de colonisation gastrique par *H. pylori* pour environ 40% des souris infectées peut également être lié à la réponse innée de l'hôte.

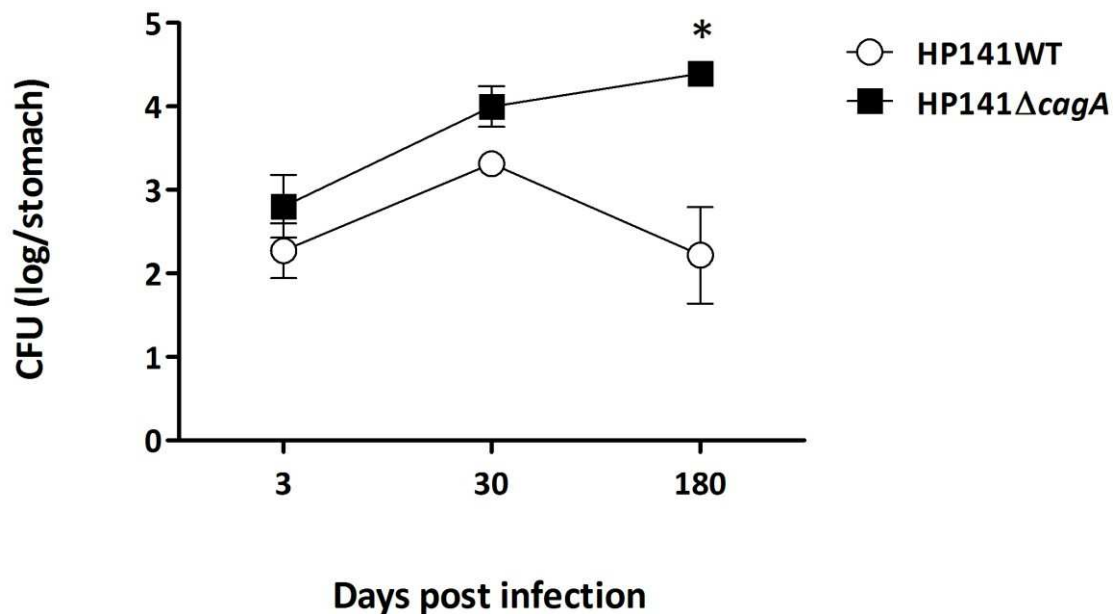


Figure 19. Taux d'implantation de *H. pylori* dans la muqueuse gastrique murine
Implantation des souches HP141WT et HP141ΔcagA chez les souris C57BL/6 après 3, 30 et 180 jours
d'infection (moyenne ± erreur standard du log UFC/estomac). * $p < 0,001$

V.2. Expression des peptides antimicrobiens S100A9 et mBD3

L'expression relative des ARNm des peptides antimicrobiens S100A9 and mBD3 par rapport aux témoins a été réalisée par RT-PCR chez les souris infectées et colonisées par HP141WT ou HP141ΔcagA ainsi que chez les souris infectées mais non colonisées par HP141WT ou HP141ΔcagA (Figure 20). La première observation qui à noter est que la présence de la protéine CagA fonctionnelle ne semble pas être déterminante dans la production de peptides antimicrobiens par la muqueuse gastrique murine. En effet, aucune différence significative de production de S100A9 ou de mBD3 n'est observée entre les souris infectées par HP141WT et celles infectées par la souche HP141ΔcagA tout au long de la cinétique. Dans ce modèle, la souche HP141ΔcagA est délétée du gène *cagA* et non pas de l'ensemble de l'îlot *cag* PAI, ce qui suggère que d'autres éléments majeurs de cet îlot tel que le système de sécrétion de type IV qui permet la translocation du peptidoglycane et l'activation de la voie de signalisation Nod-1 pourraient être impliqués dans l'induction des molécules de défense de l'hôte (Boughan *et al.*, 2006; Semple *et al.*, 2006; Grubman *et al.*, 2010).

En revanche, une augmentation significative de l'expression de S100A9 est observée chez les souris infectées mais non colonisées comparativement aux souris infectées et colonisées par HP141WT ou HP141ΔcagA après 30 jours d'infection (* $p < 0.05$)

(Figure 20). L'expression relative du transcrite de *mBD3* chez les souris infectées non colonisées est, par rapport aux souris colonisées par HP141WT ou HP141 Δ *cagA*, plus élevée après 3 jours d'infection mais la différence n'est pas statistiquement significative.

L'augmentation du taux d'expression de *S100A9* observée chez les souris infectées non colonisées pourrait apporter un nouvel éclairage sur les fonctions biologiques de ce peptide. En fait, *S100A9* est une protéine cationique de faible poids moléculaire connue pour être impliquée dans la génération d'un gradient chimiotactique pour le recrutement des neutrophiles au cours de l'inflammation, mais présente aussi des propriétés bactériostatiques (Steinbakk *et al.*, 1990; Leach *et al.*, 2008). Une étude récente a montré que *S100A9* est essentiel pour la résistance des kératinocytes à l'invasion par *Listeria monocytogenes* et *Salmonella Typhimurium* (Zaia *et al.*, 2009). En outre, le complexe hétérodimérique *S1008/S100A9* dit calprotectine, peut inhiber la croissance de diverses espèces bactériennes et fongiques, et à ce jour, son activité microbicide a été décrite contre *Esherishia coli*, *Klebsiella spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis*, *Capnocytophaga sputigena* et *Borrelia burgdorferi*, ainsi que contre la levure *Candida albicans* (Miyasaki *et al.*, 1993; Murthy *et al.*, 1993; Brandtzaeg *et al.*, 1995; Lusitani *et al.*, 2003). La chélation et la séquestration de l'ion zinc Zn^{2+} , la déplétion du taux d'acide arachidonique ou la lyse de la membrane cellulaire bactérienne sont parmi les mécanismes d'activité antimicrobienne qui ont été proposées pour le complexe calprotectine (Sohnle *et al.*, 2000; Nacken *et al.*, 2005; Leach *et al.*, 2008). En ce qui concerne *H. pylori*, une étude récente a montré que *S100A9* est fortement exprimé dans la muqueuse gastrique des enfants infectés par *H. pylori* (Leach *et al.*, 2008). Les auteurs ont suggéré une éventuelle propriété bactériostatique de ce peptide contre *H. pylori*.

D'un autre côté, il est maintenant communément admis que hBD2 est fortement induit au cours de l'infection par *H. pylori* et qu'il possède une activité antimicrobienne directe contre cette bactérie, ce qui renforce du rôle des β -défensines dans la défense antimicrobienne (Wehkamp *et al.*, 2003; Hornsby *et al.*, 2008; Grubman *et al.*, 2010). Le système de défense de l'hôte contre les infections bactériennes implique un large éventail de composants essentiels, notamment les β -défensines et les protéines de la famille *S100*.

Dans ce modèle, nous supposons que la production accrue de *S100A9* dans la muqueuse gastrique pourrait être impliquée dans l'échec de l'implantation et de la colonisation de *H. pylori*. Cette hypothèse concorde avec certaines propriétés antimicrobiennes précédemment décrites liées à ce peptide. Une meilleure compréhension des fonctions et des mécanismes de régulation de *S100A9* et du complexe *S100A8/S100A9* dans la muqueuse gastrique au cours de l'infection par *H. pylori* sont encore nécessaires.

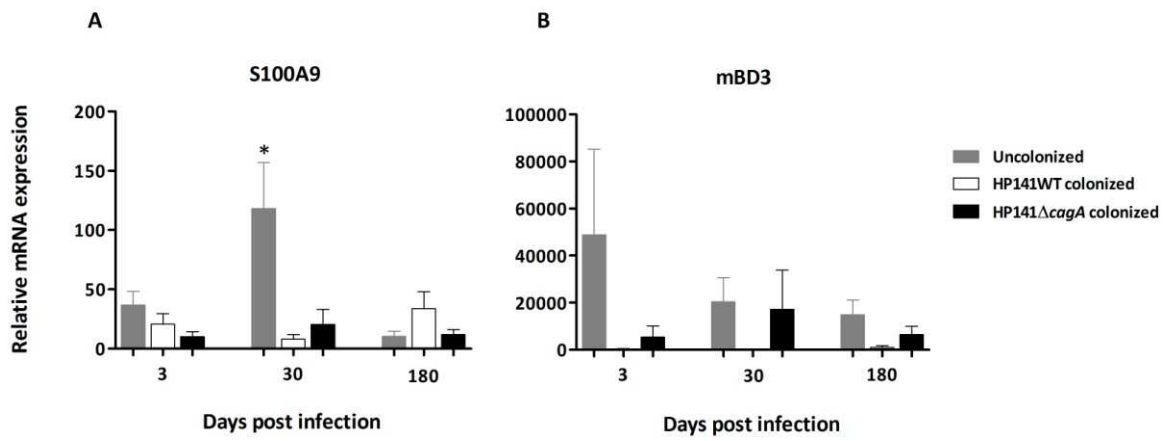


Figure 20. Expression des ARNm de *S100A9* et *mBD3* dans la muqueuse gastrique murine après infection par *H. pylori*

Analyse par RT-PCR quantitative (moyenne \pm erreur standard) de l'expression relative de l'ARNm de *S100A9* (A) et de *mBD3* (B) dans la muqueuse gastrique murine après 3, 30 et 180 jours d'infection par les souches HP141WT ou HP141 Δ cagA. * $p < 0,05$

Chapitre VI. Culture primaire de cellules épithéliales gastriques humaines et modèle d'infection par *H. pylori*

VI.1. Introduction

La première infection expérimentale par *H. pylori* a été réalisée chez l'homme par manque de modèle animal de laboratoire (Marshall *et al.*, 1985). Depuis, plusieurs modèles animaux ont été développés pour étudier l'infection par cette bactérie (O'Rourke *et al.*, 2003) mais tous présentent certaines limites. Le modèle le plus prometteur est peut-être le modèle de la gerbille de Mongolie qui permet de générer un état pathologique proche de celui observé chez l'homme. Néanmoins, ce modèle ne permet pas d'explorer l'implication fonctionnelle des facteurs de l'hôte dans la maladie du fait qu'il manque des outils génétiques, immunologiques et moléculaires destinés à une telle étude. Dans les modèles murins, où existent ces outils, l'infection par *H. pylori* ne provoque pas d'ulcères ou d'adénocarcinome gastrique. L'infection à long terme des souris BALB/c par d'autres souches de *Helicobacter* comme *H. felis* et *H. heilmannii*, et dans une moindre mesure avec une souche de *H. pylori* adaptée à la souris (SS1), peut conduire au développement du lymphome de MALT. *H. felis* peut accélérer le développement d'adénocarcinome gastrique chez des souris transgéniques exprimant des niveaux hormonaux élevés de gastrine (Wang *et al.*, 2000). Cependant, ces souches ne possèdent pas l'îlot de pathogénicité *cag* et quand elles sont adaptées à la souris, elles encourent des mutations au niveau de ce locus, ce qui rend difficile l'étude de l'implication de ce facteur de virulence déterminant dans la physiopathologie de *H. pylori* dans les modèles murins (Philpott *et al.*, 2002).

Ainsi, pour étudier les interactions médiées par *cagPAI* entre *H. pylori* et les cellules de l'hôte, plusieurs modèles cellulaires, majoritairement issus d'adénocarcinome gastrique (AGS, KATO-3, MKN...), ont été développés.

Bien que ces modèles aient clarifié plusieurs aspects des modifications déclenchées par *H. pylori* au niveau cellulaire telles que les altérations de voies de signalisation et la mise en place de la réponse inflammatoire, il s'est avéré plus tard que ces lignées possèdent elles-mêmes des altérations dans leurs voies de signalisation et ont perdu certains éléments déterminants dans la réponse cellulaire gastrique liée à *H. pylori*. La lignée AGS, par exemple, ne produit ni le TLR2 ni le MD2 qui est un cofacteur indispensable à la reconnaissance du LPS par le TLR4 (Smith *et al.*, 2003). Ces lignées sont donc limitées pour étudier les interactions entre *H. pylori* et l'hôte. D'autre part, aucune des lignées disponibles ne forme un épithélium polarisé. L'adaptation de *H. pylori* au modèle cellulaire canin rénal polarisé (Madin-Darby Canine Kidney cells, MDCK) a révélé de nouveaux aspects biologiques de *H. pylori* telles sa capacité à exister dans des vacuoles à l'intérieur des cellules (Amieva *et al.*, 2002) et ses effets sur les jonctions cellulaires (Amieva *et al.*, 2003). L'analyse des interactions de *H. pylori* avec des cellules immunitaires (macrophages) *in vitro* a également révélé de nouveaux effets immunomodulateurs de *H. pylori* (Gobert *et al.*, 2001).

Plusieurs tentatives de développement de modèles de culture primaires de cellules épithéliales gastriques fonctionnelles sont décrites dans la littérature. L'objectif étant de disposer d'un modèle plus pertinent pour mieux définir et caractériser le processus physiopathologique lié à l'infection par *H. pylori*. Ces essais ont été réalisés à partir de biopsies (Smoot *et al.*, 2000), de donneurs d'organes (Campos *et al.*, 1990) ou de tissu fœtal (Basque *et al.*, 1999). Ces modèles, qui seront détaillés plus loin dans l'ouvrage, sont restés très limités en termes de rendement et n'ont pas été utilisés pour l'étude de la réponse inflammatoire liée à *H. pylori*.

Il est évident que la culture cellulaire primaire ne peut pas mimer toutes les interactions complexes entre les différents types de cellules présentes dans l'estomac, mais la nécessité de développer un modèle qui soit plus représentatif de la physiologie gastrique normale est d'une importance majeure pour l'étude des interactions avec *H. pylori* et les mécanismes physiologiques et immunorégulateurs qui en découlent.

L'objectif majeur de mon travail a été d'établir un protocole de culture primaire de cellules épithéliales gastriques humaines à partir de morceaux d'estomacs provenant de déchets opératoires générés lors de « sleeves » gastriques. L'obtention de ces cellules a été difficile et de nombreuses tentatives ont été nécessaires pour définir les conditions expérimentales nous permettant de les isoler et de les maintenir en culture. Mais nous avons finalement réussi à mettre au point une méthode d'isolement et de culture de cellules épithéliales gastriques humaines normales et à développer un nouveau modèle d'infection par *H. pylori*. La réalisation de ce projet a été le fruit d'une étroite collaboration entre le laboratoire LITEC et les services de chirurgie viscérale du CHU et de la Polyclinique de Poitiers.

VI.2. Premières approches expérimentales

Etant donné que l'infection et le développement de la gastrite liés à *H. pylori* se font principalement dans la région de l'antrum, et que la composition cellulaire diffère selon la localisation gastrique (antrum ou fundus), nous avons choisi de collecter l'antrum et le fundus et de réaliser les expérimentations séparément sur chaque localisation.

Avant de commencer les essais de culture primaire de cellules épithéliales gastriques, nous avons voulu, dans un premier temps, examiner l'effet de *H. pylori* sur l'induction de l'expression de médiateurs inflammatoires directement sur les pièces d'estomac récupérées. En effet, pouvoir étudier les interactions de *H. pylori* avec un tissu entier comportant tous les types cellulaires organisés était particulièrement intéressant. Pour cela, des morceaux de taille identique d'antrum et de fundus ont été découpés à l'aide d'un emporte-pièce et placés en présence de la bactérie. Les souches de *H. pylori* utilisées sont la HP141WT et la HP141Δ*cagA*. Plusieurs paramètres ont été testés au cours de cette première approche : un paramètre cinétique, la dose infectieuse, la forme de la souche (bacillaire/coccoïde), les milieux de culture et la taille des fragments découpés. A la fin de la stimulation, les morceaux d'estomacs et les surnageants de culture ont été récupérés et congelés à -80°C. L'extraction d'ARN et le dosage ELISA ont été réalisés. Les cytokines dosées sont l'IL-6, l'IL-8, l'IL-1β, le TNF-α, l'IL-17, l'IL-18, l'OSM et les peptides antimicrobiens BD2 et BD3. Les résultats obtenus au cours de cette approche étaient non

reproductibles et très variables d'un patient à l'autre avec parfois des contrôles non stimulés avec *H. pylori* exprimant des taux plus importants d'IL-8 et d'IL-6 que ceux des échantillons stimulés. Aucune tendance n'a donc pu être dégagée au cours de ces travaux. Ceci pouvant être partiellement expliqué par le fort stress lésionnel que subit l'estomac au cours de la « sleeve » ainsi qu'au cours de sa fragmentation mécanique et la forte réponse inflammatoire qui en découle empêcherait de voir l'effet bactérien. Cette approche fut rapidement abandonnée pour essayer de développer un modèle de culture primaire de cellules épithéliales gastriques humaines (CEGH) pour l'étude des interactions gastriques avec *H. pylori*.

VI.3. Développement et mise au point du protocole de culture primaire des cellules épithéliales gastriques humaines

VI.3.a. Modèles de culture primaire de cellules épithéliales gastriques déjà mis en place

La culture primaire des CEGH n'est jusqu'à présent pas entièrement maîtrisée malgré les tentatives de plusieurs équipes et ce modèle a été peu utilisé pour étudier les interactions avec *H. pylori*. Ceci est peut être lié aux difficultés d'isolement et d'expansion de ces cellules ainsi qu'à la disponibilité de matériel ou tissu de départ en quantité suffisante. Les modèles de culture primaire de CEGH déjà mis en place avant notre travail n'ont pas été très nombreux. Cependant, l'étude des données de la littérature sur ce sujet, permet de les classer en 3 approches expérimentales différentes.

A partir de donneurs d'organes

Les premiers essais de culture primaire de CEGH ont été les travaux de Campos *et al* en 1990. L'isolement des cellules épithéliales gastriques était effectué à partir de donneurs d'organes par des digestions enzymatiques séquentielles (Collagénases I et IV) et l'utilisation d'un procédé de tri cellulaire (élutriation) permettant la séparation des cellules selon leur taille, densité et vitesse de sédimentation. Ce modèle a servi dans un premier temps à l'étude de la sécrétion de la gastrine (Campos *et al.*, 1990) et des effets de la cholécystokinine sur la sécrétion de somatostatine par ces cellules (Buchan *et al.*, 1990). Dans un deuxième temps, le modèle a été repris pour étudier l'effet de *H. pylori* sur la sécrétion de gastrine (Richter-Dahlfors *et al.*, 1998) ainsi que les caractéristiques d'attachement de *H. pylori* aux cellules cultivées (Heczko *et al.*, 2000). Des modifications membranaires ont été observées chez les bactéries adhérentes aux CEGH ainsi qu'une sécrétion de vésicules membranaires par *H. pylori* (Heczko *et al.*, 2000). L'effet de l'infection par *H. pylori* sur les jonctions cellulaires a également été examiné (Conlin *et al.*, 2004). *H. pylori* induit l'expression de certaines protéines de régulation de l'adhésion bactérienne aux cellules épithéliales telles que les annexines II et IV ainsi que la séquestration dans des vésicules des protéines d'adhésion cellulaires E-cadhérine et IQGAP-1 (Conlin *et al.*, 2004). Peu de données concernant la culture en elle-même (prolifération des cellules, nombre de passages possible, durée de vie des cellules...) ont été fournies.

A partir de fœtus

L'équipe de Ménard *et al.* a développé en 1999 un modèle de culture primaire de cellules épithéliales gastriques à partir de fœtus (obtenus par avortement légal) en utilisant un produit non-enzymatique qui permet la récupération des cellules gastriques sous forme de feuillets intacts ou de gros agrégats : Le MatriSpere commercialisé par Collaborative Biomedical Products (Bedford, Massachusetts, Etats-Unis) (Basque *et al.*, 1999). La finalité des travaux utilisant cette technique a été l'étude de la synthèse et de la sécrétion du pepsinogène et de la lipase gastrique par ces cellules (Basque *et al.*, 2000). D'autres études ont porté sur les effets de facteurs de croissance (EGF, TGF- α , HGF) sur la prolifération et la régénération cellulaire (Tetreault *et al.*, 2005).

A partir de biopsies gastriques

Plus récemment, l'équipe de Smoot *et al.*, a développé un protocole de culture primaire de cellules épithéliales à partir de biopsies gastriques par digestions enzymatiques successives en utilisant un mélange de Collagénase, Dispase et Pronase (Smoot *et al.*, 2000). Des travaux plus anciens basés également sur des digestions enzymatiques successives de biopsies gastriques ont servi à étudier l'adhérence de *H. pylori* aux cellules épithéliales gastriques. Ces études ont montré que *H. pylori* peut adhérer spécifiquement aux cellules primaires gastriques en stimulant la polymérisation de l'actine (Clyne *et al.*, 1993; Smoot *et al.*, 1993). L'étude de l'effet de VacA sur ces cellules montre une vacuolisation plus importante dans les cellules primaires que celle observée avec les cellules AGS et HeLa (Smoot *et al.*, 1996). Des travaux plus récents ont étudié la translocation de CagA et sa phosphorylation dans des cellules épithéliales gastriques primaires ainsi que l'induction CagA-dépendante de réarrangements cyto-squelettiques et des altérations dans les jonctions cellulaires (Lai *et al.*, 2006). Néanmoins, ces résultats étaient partiels et ont dû être complétés par des études parallèles sur le modèle AGS vu le faible rendement cellulaire obtenu.

Toutes ces tentatives de culture primaire de cellules épithéliales gastriques ont bien évidemment apporté des éclairages sur le fonctionnement des cellules épithéliales gastriques humaines normales mais présentent beaucoup de limites en termes de quantité de cellules et de disponibilité de matériel. A ce jour, aucun de ces modèles n'a été repris pour étudier et établir le profil inflammatoire induit par *H. pylori*.

L'isolement de cellules épithéliales gastriques primaires humaines (CEGH) directement à partir d'estomac est une approche originale qui a permis le développement d'un nouveau modèle cellulaire qui servira à l'étude des interactions avec *H. pylori* ainsi qu'à une meilleure compréhension de la physiologie gastrique

VI.3.b. Développement et mise au point du protocole expérimental

Les CEGH étant des cellules très fragiles et nécessitant des conditions particulières de culture, les étapes de mise au point et d'optimisation du protocole expérimental ont été longues et difficiles. Une série d'expériences préliminaires a également été réalisée pour mettre au point le modèle, les conditions d'infection et les analyses qu'elles soient transcriptionnelles ou protéiques.

La dissociation cellulaire

Les fragments d'estomac obtenus après « sleeve » sont particulièrement sanglants et visqueux dû au stress opérationnel et à la forte sécrétion de mucus. Des lavages abondants en sérum physiologique ont donc été nécessaires pour éliminer tout le sang et le mucus (Figure 21C).

La surface de l'épithélium gastrique est tapissée d'invaginations ou cryptes gastriques (Figure 21A). La première étape du processus de dissociation a consisté en l'élimination des épaisses couches séreuse et musculaire (Figure 21D). La sous-muqueuse, fine couche blanche très vascularisée située en dessous de l'épithélium est également éliminée (Figure 21 E-F-G). L'épithélium gastrique a été découpé mécaniquement en de très fins morceaux et une digestion enzymatique à 37°C avec un mélange de Collégénase B, de Pronase et de Dispase est réalisée pendant 1 heure (Figure 21H). La Collagénase B est une enzyme protéolytique qui dégrade spécifiquement le collagène et certains éléments de la matrice extracellulaire composant les tissus. La Dispase est une enzyme protéolytique qui dégrade spécifiquement le collagène de type IV. La Pronase est constituée d'un mélange de protéases non spécifiques qui dégradent les protéines et peptides en acides aminés. Le surnageant était collecté, centrifugé (400g, 5min) et le culot mis en culture dans des plaques pré-coatées au collagène pour permettre l'adhésion et la prolifération. Aucune cellule n'a été obtenue à l'aide de ce procédé.

Introduction de la trypsine

Après plusieurs essais sans résultats, le surnageant de la première digestion a été éliminé et le tissu a été digéré à la trypsine pendant 15 minutes à 37°C. L'introduction de la trypsine 0,05 % EDTA fut déterminante parce qu'elle a permis un premier isolement de cellules épithéliales. Ces cellules se structuraient sous forme d'îlots et leur prolifération dépendait fortement de l'abondance et du contact entre ces cellules qui semblent s'auto-stimuler. L'introduction de deux étapes successives de digestion à la trypsine a permis l'obtention d'un meilleur rendement cellulaire.

Milieux de culture

Plusieurs milieux de culture et combinaisons de milieux de culture ont été testés pour la culture des cellules épithéliales gastriques. Les milieux testés ont été le RPMI, le DMEM, le Ham's F12 et le K-SFM (Serum Free Keratinocyte Medium). Le mélange équivolumique de DMEM/Ham's F12 supplémenté de 10% de sérum de vœu fœtal a permis la meilleure expansion cellulaire.

Facteurs de croissance et introduction du Hepatocyte Growth Factor

Le milieu de culture des cellules épithéliales gastriques fut au début supplémenté avec 10 % de sérum de vœu fœtal et 0,25 ng/ml d'EGF La prolifération des îlots cellulaires n'était pas optimale. L'introduction de 30 ng/ml de HGF (Takahashi *et al.*, 1995) ainsi que l'augmentation de la concentration d'EGF à 0,5 ng/ ml a permis une meilleure la prolifération des cellules épithéliales gastriques.

Optimisation des digestions enzymatiques

La concentration des mélanges enzymatiques ainsi que la durée des digestions sont également des paramètres très importants à contrôler. Après plusieurs essais, la durée de la première digestion enzymatique a été fixée à 40 minutes à 37°C avec un mélange enzymatique constitué de 0,5 mg/ml de Collagénase B, 2,5 mg/ml de Pronase et 3U/ml de Dispase.

Optimisation des étapes de filtrations et lavages

Les étapes de filtration entre les différentes digestions enzymatiques jouent un rôle essentiel dans l'élimination du collagène dissous et du mucus très visqueux qui empêchent l'adhésion des cellules. Les lavages du culot cellulaire avant mise en culture permettent aussi l'élimination des débris et du collagène dissous.

Mise en culture

La présence de Collagène I est indispensable pour l'adhésion des cellules.

Autres approches

Plusieurs étapes de dissociation mécanique ont également été testées sur le dissociateur tissulaire automatique GentleMACS (Miltenyi Biotec, France) sans donner de résultats ; probablement à cause de la très forte action mécanique de cet automate qui a dû endommager les cellules. Des gradients de Ficoll et Percoll ont été testés pour éliminer le collagène et les débris cellulaires. L'utilisation d'un gradient de Percoll préformé a permis l'obtention de cellules épithéliales avec un rendement similaire à celui du protocole classique. Cependant, cette étape a été abandonnée afin de limiter au maximum tout stress supplémentaire pouvant altérer la prolifération des cellules.

Les CEGH obtenues à partir de l'antré (CEGHA) ou du fundus (CEGHF) possèdent une morphologie similaire comme le montre la Figure 22.

Le protocole expérimental détaillé de la culture primaire des CEGH est étayé dans la section IV.2.a de la partie 2 (Matériel et Méthodes) du présent ouvrage.

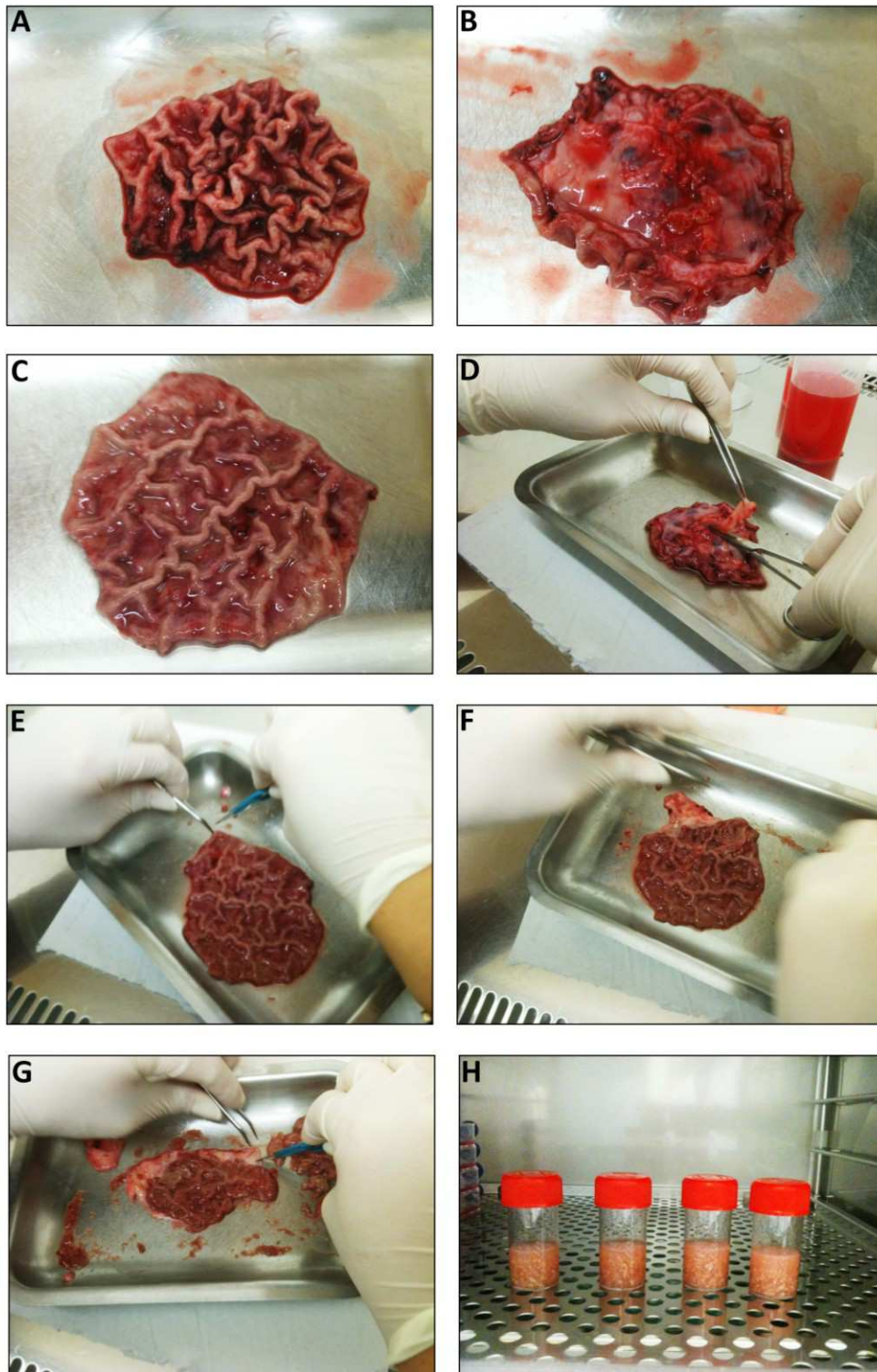


Figure 21. Photos illustrant la dissection d'un morceau d'antre collecté après « sleeve » gastrique

A. Antre ouvert, face intérieure; B. Face extérieure; C. Après quelques rinçages au sérum physiologique; D. Élimination du muscle et graisse; E, F, G. Élimination de la sous muqueuse et récupération de la couche épithéliale; H. Première digestion enzymatique après dissociation mécanique de l'épithélium.

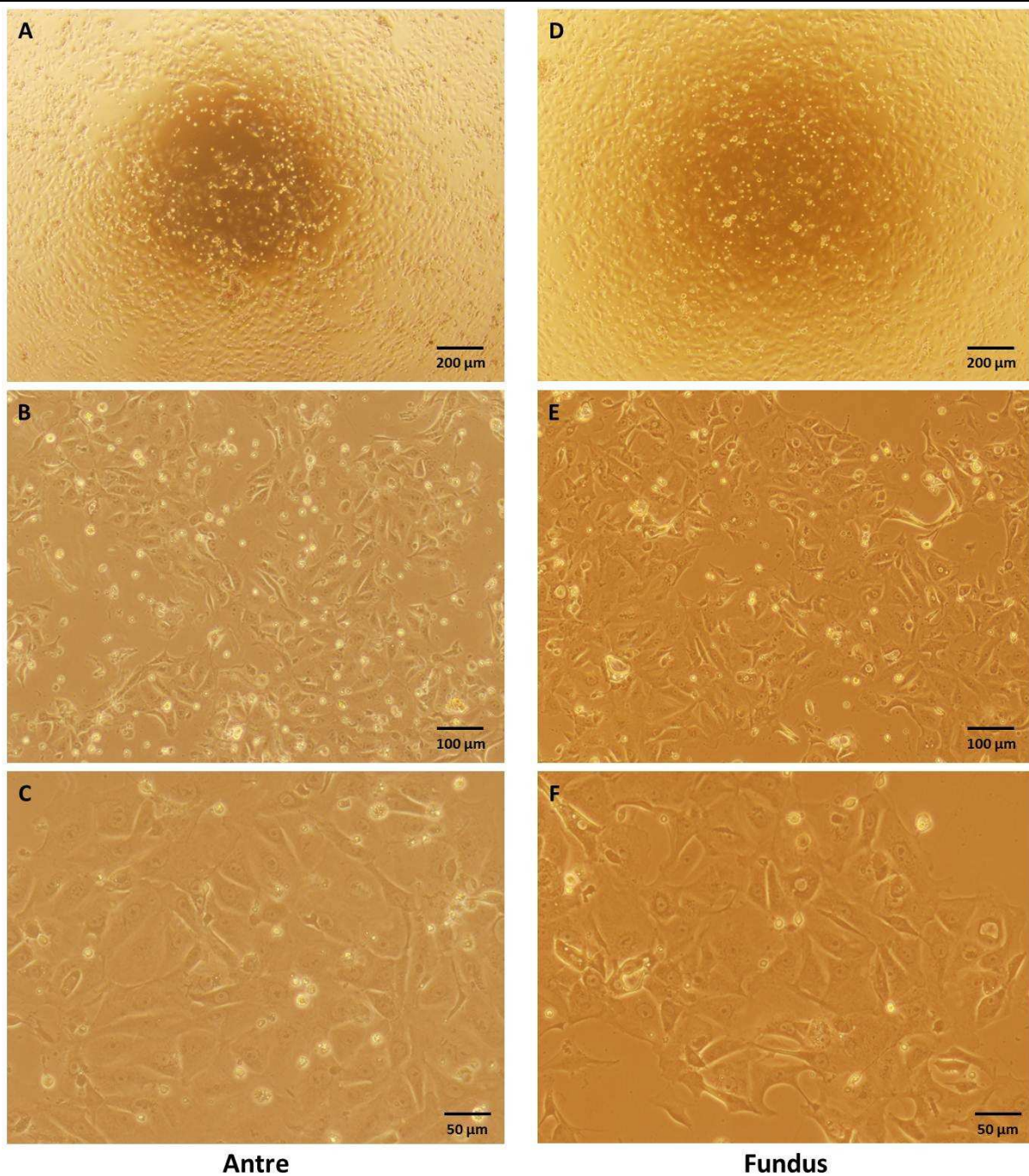


Figure 22. Cellules épithéliales gastriques antrales et fundiques obtenues après 48h de mise en culture
A,D Gx40 ; B,E Gx100 ; C,F Gx200

VI.4. Caractérisation de la nature des cellules obtenues en culture

VI.4.a. Caractérisation préliminaire

Le protocole expérimental mis au point a permis l'isolement de cellules gastriques de nature épithéliale, et plus précisément de mucocytes. La confirmation préliminaire du caractère épithélial des cellules obtenues en culture a été réalisée à l'aide d'une série de marquages immunocytochimiques qui ont visé à mettre en évidence la présence de

certain marqueurs spécifiques de la cellule épithéliale, ainsi que des protéines de la famille des mucines.

La première série de marquage a été réalisée par le service d'anatomopathologie du CHU de Poitiers. Il s'agit d'une coloration classique à l'hématoxyline-Eosine (Figure 23A) pour mettre en évidence les cellules (noyau et cytoplasme), un marquage KL1 (Figure 23B) pour mettre en évidence la présence des cytokératines spécifiques des tissus épithéliaux et d'un marquage à l'acide périodique de Schiff (Figure 23C) qui marque spécifiquement les glycoprotéines présentes dans les cellules à mucus.

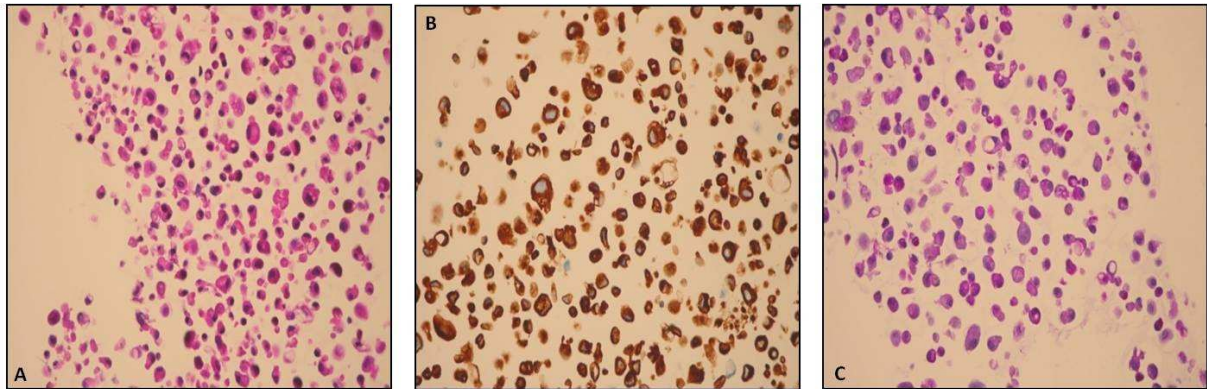


Figure 23. Caractérisation préliminaire des cellules gastriques primaires antrales après 72h de mise en culture

A. Coloration à l'hématoxyline -Eosine Gx40; B. Marquage KL1 (cytokératines) Gx40 ; C. Marquage PAS (Periodic Acid Schiff) Gx40

VI.4.b. Etude de l'expression de CK18, MUC1, MUC5AC et TFF-1 par immunocytochimie

La Cytokératine 18 (CK18) est une protéine cytoplasmique qui constitue les filaments intermédiaires au niveau des tissus épithéliaux monostratifiés. Il s'agit d'une cytokératine acide de type I exprimée spécifiquement dans les tissus épithéliaux glandulaires des voies respiratoires, digestives et urogénitales. Elle est également présente dans certaines cellules endocrines, exocrines et mésothéliales. Les cytokératines sont des marqueurs très utiles qui jouent un rôle critique dans la différenciation tissulaire et le maintien de l'intégrité structurale des tissus épithéliaux.

Les mucines sont une famille de protéines, fortement glycosylées entrant dans la composition de nombreux mucus. Elles ont des fonctions importantes de protection des épithéliums des voies aériennes et digestives.

La mucine 1 (MUC1) est associée à la membrane plasmique et est présente à la surface apicale des cellules épithéliales pulmonaires, gastriques et intestinale (Gendler *et al.*, 1990). Elle possède des fonctions protectives contre les pathogènes.

La mucine 5AC (MUC5AC) est exprimée sur les cellules à mucus présentes à la surface du fundus et de l'antra (Guyonnet Duperat *et al.*, 1995). La sécrétion de MUC5AC est induite au cours de l'inflammation sous l'action des cytokines pro-inflammatoires IL-6 et TNF- α .

Le Trefoil Factor 1 (TFF-1) (également nommé pS2) est exprimé sous forme de dimère spécifiquement dans la muqueuse gastro-intestinale. Sa fonction n'est pas entièrement définie mais il semble jouer un rôle protecteur et stabilisant de la muqueuse et est impliqué dans la régénération tissulaire (Gott *et al.*, 1996).

L'étude par immunofluorescence de l'expression de la CK18 dans les cellules épithéliales gastriques humaines antrales (CEGHA) après 72h de mise en culture a montré une expression cytoplasmique de cette protéine dans quasiment toutes les cellules (Figure 24). Ces cellules expriment notamment les mucines MUC1, MUC5AC et le TFF-1 (Figure 24). Les noyaux sont marqués en bleu à l'aide d'une coloration au DAPI. Par ailleurs, comme le montre également la Figure 24, les AGS expriment la CK18, ainsi que les mucines MUC1, MUC5AC et le TFF-1. Ces données confirment la nature épithéliale des cellules primaires obtenues en culture et montrent qu'il s'agit principalement de cellules à mucus.

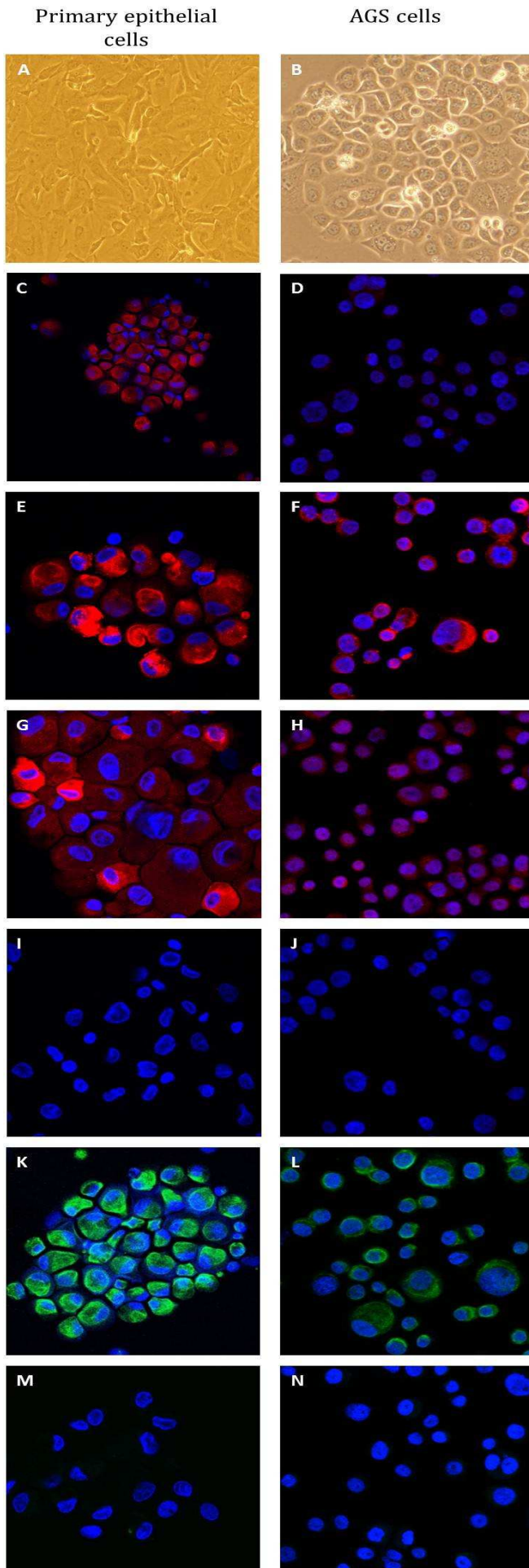


Figure 24. Analyse par immunofluorescence de l'expression de marqueurs spécifiques des tissus épithéliaux gastriques dans les cellules primaires antrales et les cellules AGS.

Etude de l'expression de la CK18, MUC1, MUC5AC et TFF-1 dans les CEGHA et les cellules AGS à l'aide d'anticorps spécifiques. Mucin 1 (C) et (D); Mucin 5AC (E) et (F); Trefoil Factor 1 (G) et (H); CK18 (K) et (L). (I) et (J) sont les contrôles respectifs Rhodamine-RedX® negative controls; (M) et (N) sont les contrôles respectifs Alexa®fluor 488 negative controls (magnification originale x100)

VI.5. Stimulation avec *H. pylori*

VI.5.a. Changements morphologiques liés à la présence de *H. pylori*

Les expériences de stimulation avec *H. pylori* ont été réalisées parallèlement sur les cellules antrales et fundiques. En revanche, vu la similarité des réponses obtenues, seuls les résultats obtenus avec les CEGHA sont présentés.

La stimulation cellulaire avec les souches de *H. pylori* B128 et B128 $\Delta cagM$ à une dose infectieuse de 100 bactéries/cellule a induit de fortes modifications morphologiques altérant la structure et l'aspect des cellules en culture (Figure 25). Ces changements sont très similaires, indépendamment de la souche utilisée. Nous avons observé la formation de vacuoles à l'intérieur des cellules, probablement dues à la présence de la cytotoxine vacuolisante VacA, ainsi que des allongements cellulaires. Ces observations concordent avec les données de la littérature qui décrivent un phénomène similaire dans les lignées cellulaires AGS et MKN28 exposées à *H. pylori* (Segal *et al.*, 1996; Segal *et al.*, 1999; Cover *et al.*, 2005; Argent *et al.*, 2008). Les protrusions cellulaires allongées dites en bec de colibri (Segal *et al.*, 1996; Segal *et al.*, 1999) sont provoquées par la translocation et phosphorylation de CagA dans le cytosol (Selbach *et al.*, 2002a; Stein *et al.*, 2002) et l'interaction de CagA phosphorylée avec SHP-2 phosphatase (Higashi *et al.*, 2002). Une étude récente a montré une vacuolisation plus importante dans les cellules stimulées par des souches de *H. pylori* mutées pour les gènes *cagA* et *cagE*, et un phénotype en bec de colibri plus exacerbé dans les cellules stimulées par des souches mutées pour *VacA* (Argent *et al.*, 2008). Les auteurs proposent une modulation entre les effets induits par CagA et VacA sur les cellules épithéliales permettant potentiellement une interaction de *H. pylori* avec les cellules épithéliales sans provoquer de dommages cellulaires excessifs (Argent *et al.*, 2008).

Dans notre modèle, les changements morphologiques similaires provoqués par les deux souches de *H. pylori* ne nous permettent pas de conclure quant au rôle de *cag* dans ce processus physiopathologique. La dose infectieuse étant très élevée, elle empêche probablement de voir les effets de *cag* sur le phénotype cellulaire. Une exposition moins longue des cellules avec *H. pylori* à des doses infectieuses plus faible permettrait de mieux discerner les altérations morphologiques cellulaires induites par chaque souche.

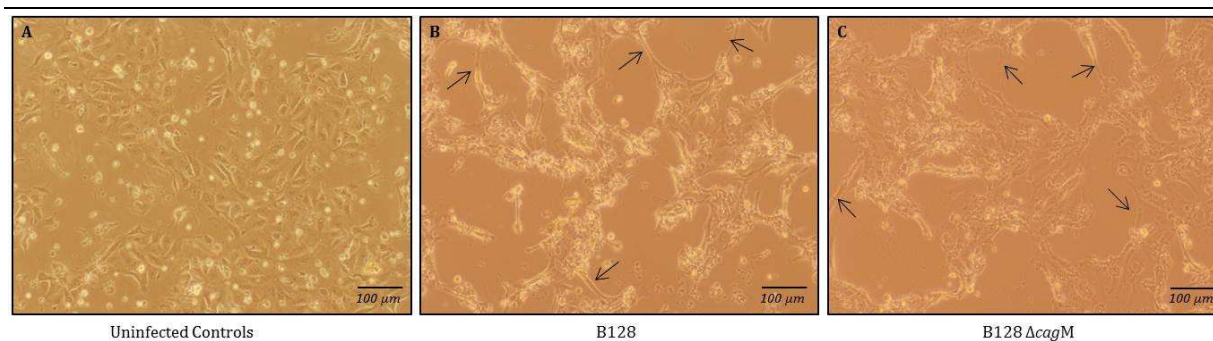


Figure 25. Modifications morphologiques des cellules épithéliales gastriques après 24h d'exposition à *H. pylori*

Les CEGHA sont stimulées ou non avec *H. pylori* B128 et B128 Δ cagM à la dose infectieuse de 100 bactéries/cellule. A : CEGHA non stimulées, B : CEGHA stimulées avec B128, C : CEGHA stimulées avec B128 Δ cagM (Gx100)

VI.5.b. Détermination de la dose infectieuse et des temps de stimulation

Dans l'objectif d'établir un profil transcriptionnel et protéique des médiateurs inflammatoires induits au cours de l'infection par *H. pylori*, nous avons réalisé une stimulation des CEGHA (80% confluence) avec des souches de *H. pylori* après 72h de mise en culture. Une série d'expériences préliminaires nous a permis d'établir une cinétique d'infection et de déterminer les doses infectieuses qui seront utilisées au cours de l'étude.

La détermination des doses infectieuses a été réalisée après analyse de la production protéique d'IL-8, d'IL-6 et de hBD3 par des CEGHA stimulées pendant 24h avec les souches X47 et B128 à des doses allant de 1 jusqu'à 500 bactéries/cellule. Une partie de ces résultats est présentée dans la figure 25. L'infection des CEGHA par la souche X47 induit une production dose-dépendante d'IL-8, d'IL-6 et de hBD3 (Figure 26A). Par ailleurs, la stimulation des CEGHA avec la souche B128 induit une production dose-dépendante d'IL-8 et d'IL-6 mais qui atteint un seuil à partir de la dose infectieuse de 100 bactéries/cellule (Figure 26B). En revanche, la production de hBD3 continue de croître avec l'augmentation de la dose infectieuse (Figure 26B). En revanche, nous avons observé une forte diminution de la production de ce peptide par les CEGHA après leur stimulation par la souche B128 à la dose infectieuse de 500 bactéries/cellule par rapport à la dose infectieuse de 100 bactéries/cellule (données non présentées). Cette diminution est très probablement liée à la cytotoxicité induite par cette forte dose infectieuse.

Il semble que ces souches induisent l'IL-8, l'IL-6 et la hBD3 quasiment au même taux alors qu'elles ne présentent pas les mêmes caractéristiques en termes de facteurs de virulence, la souche X47 étant naturellement dépourvue de l'îlot de pathogénicité *cag*. Il serait intéressant de réaliser une comparaison plus approfondie des profils et taux d'expression des médiateurs inflammatoires entre ces deux souches.

Nous avons choisi de stimuler les CEGHA avec les deux souches de *H. pylori* B128 et son mutant isogénique B128 Δ cagM afin d'examiner l'effet de la présence d'un SSTIV fonctionnel sur les profils inflammatoires induits. Nous avons également défini des conditions de stimulation à deux doses : une dose faible de 10 bactéries/cellule et une dose forte de 100 bactéries/cellule afin de comparer l'intensité de la réponse induite.

Une cinétique d'infection de 3, 6, et 24h a également été réalisée afin de suivre la variation d'induction des médiateurs inflammatoires au cours du temps.

Nous avons choisi de comparer le profil transcriptionnel (RT-QPCR) des médiateurs inflammatoires après 3h et 24h de stimulation. Le dosage protéique (ELISA) de ces médiateurs est réalisé après 24h de stimulation.

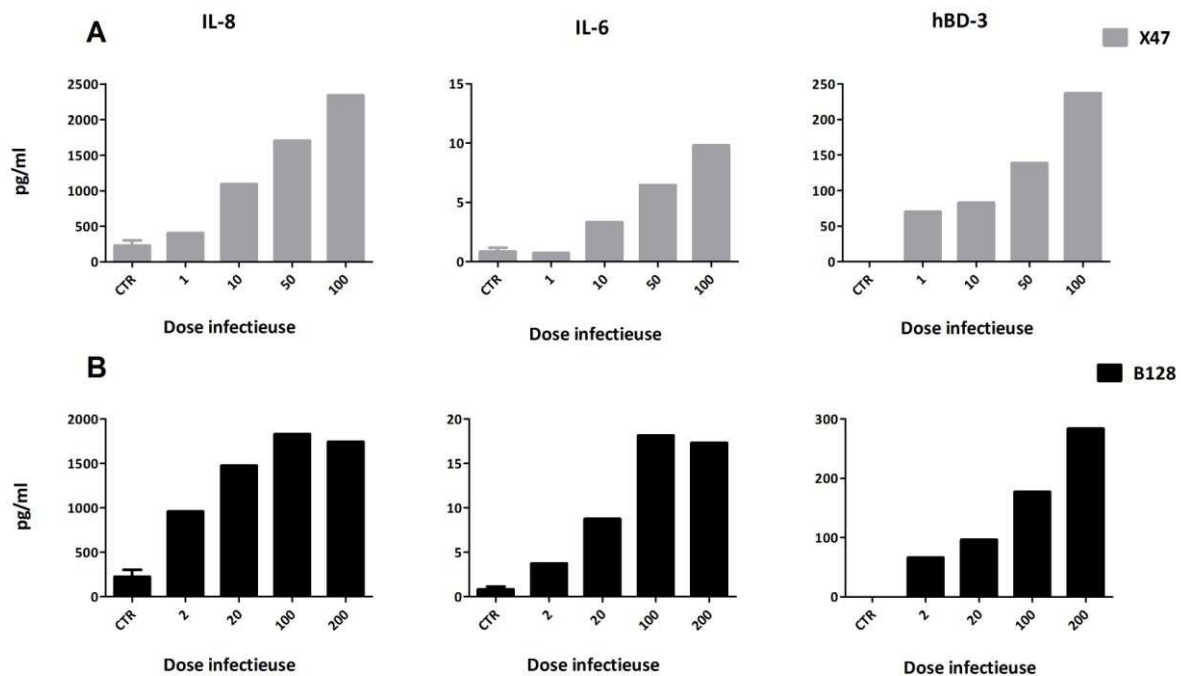


Figure 26. Production d'IL-8, d'IL-6 et de hBD3 par les CEGHA après stimulation par *H. pylori*

Les CEGHA ont été stimulées pendant 24h avec les souches de *H. pylori* X47 et B128 aux doses infectieuses 10 et 100 bactéries/cellule et la concentration d'IL-8, d'IL-6 et de hBD-3 dans les surnageants a été mesurée par dosage ELISA (n=1).

VI.5.c. Comparaison des profils transcriptionnels après exposition à *H. pylori*

Les résultats de RT-QPCR et dosages ELISA présentés correspondent à des analyses réalisées sur des cultures primaires de CEGHA issues de 3 sujets *H. pylori* négatifs:

Patient A Homme, 63 ans

Patient C, Femme, 35 ans

Patient D, Femme, 26 ans

Le patient B, Homme de 41 ans, a été exclu de cette étude puisqu'il était *H. pylori*-positif.

Une induction *cagM* et dose-dépendante en début d'infection

L'analyse de l'expression d'un panel de gènes codant des médiateurs inflammatoires et peptides antimicrobiens après 3h de stimulation des CEGHA avec *H. pylori* a été réalisée par RT-PCR quantitative. Les gènes analysés sont ceux codant pour

l'IL-8, le CXCL1, le CXCL2, le CXCL3, le CXCL5, l'IL-6, le TNF- α , l'IL-1 β , le COX2, le CCL20, le S100A7, le S100A8, le S100A9, la hBD1, la hBD2 et la hBD3.

La stimulation des CEGHA avec la souche de *H. pylori* B128 pendant 3h induit de manière dose-dépendante l'expression relative des ARNm codant pour les médiateurs inflammatoires IL-8, CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CCL20 et TNF- α par rapport aux contrôles non stimulés (Figure 27). Lors de la stimulation par la souche B128 à la dose infectieuse de 100 bactéries/cellule, l'expression des ARNm codant pour CCL20 est environ 4 fois plus élevée, 3 fois plus élevée pour l'IL-8, TNF- α , CXCL1, CXCL3 et 2 fois plus élevée pour CXCL2 et CXCL5 par rapport à la dose infectieuse de 10 bactéries/cellule de la même souche. La variation de l'expression relative du transcrite codant pour COX2 est négligeable et aucune expression de l'ARNm codant l'IL-6 ou l'IL-1 β n'a été observée. L'expression des ARNm codant les cytokines et chimiokines proinflammatoires IL-8, TNF α , CXCL5, CXCL1, CXCL2, CXCL3 et CCL20 par par les CEGHA stimulées avec la souche B128 Δ *cagM* est environ doublée à la dose infectieuse de 100 bactéries/cellule par rapport à la dose de 10 bactéries/cellule (Figure 27). L'expression des médiateurs cités ci-dessus est *cagM*-dépendante puisqu'ils sont tous plus fortement induits par la souche B128 que par son mutant isogénique indépendamment de la dose infectieuse.

L'analyse de l'expression des médiateurs impliqués dans la réponse antimicrobienne notamment hBD1, hBD2, hBD3, S100A7, S100A8 et S100A9 après stimulation des CEGHA par les souches B128 et B128 Δ *cagM* ne montre aucune induction de l'expression des ARNm codant pour les membres de la famille S100 ni de hBD1 (Données non présentées). Parmi les β -défensines analysées, on observe une induction dose et *cagM*-dépendante de l'expression de l'ARNm codant pour hBD2 après stimulation des CEGHA par *H. pylori* (Figure 27). La hBD3 n'est pas induite par *H. pylori* en phase précoce d'infection, et ce indépendamment de la souche (Figure 27).

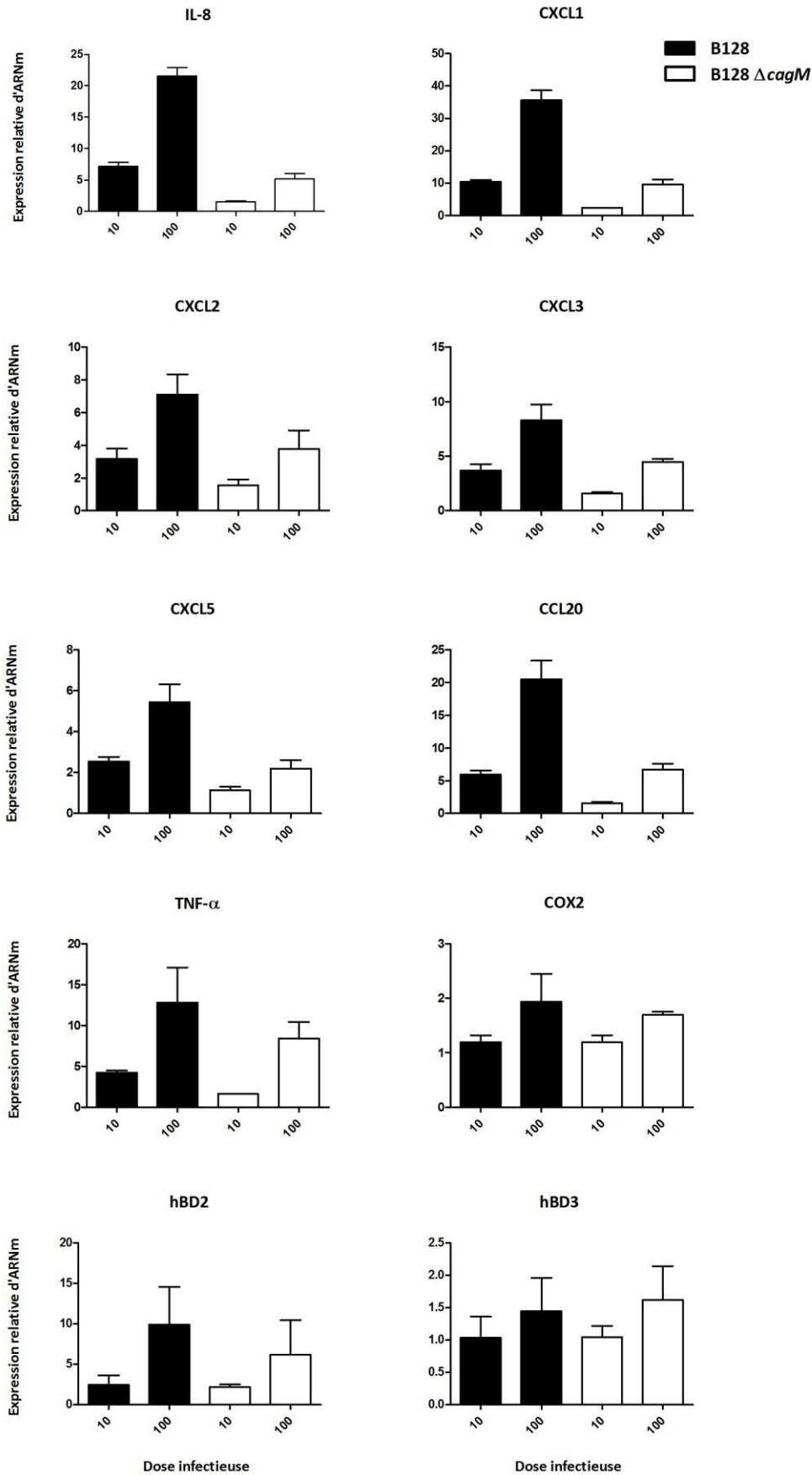


Figure 27. Profil d'expression des gènes associés à la réponse immunitaire par les CEGHA stimulés par *H. pylori* pendant 3h. Les CEGHA ont été stimulées pendant 3h avec les souches de *H. pylori* B128 et B128 $\Delta cagM$ aux doses infectieuses 10 et 100 bactéries/cellule. Les niveaux d'expression relative des ARNm ont été déterminés par RT-PCR quantitative. Les résultats obtenus ont été normalisés par rapport à deux gènes contrôles et exprimés en facteur de modulation par rapport aux cellules non stimulées (moyenne \pm erreur standard) (n=3).

Induction tardive de l'expression de certains médiateurs

Le profil des gènes codant les médiateurs inflammatoires et peptides antimicrobiens cités- ci-dessus après 24h de stimulation des CEGHA avec *H. pylori* est plus hétérogène.

La stimulation des CEGHA avec la souche de *H. pylori* B128 induit de manière dose-dépendante l'expression relative des ARNm codant pour les médiateurs inflammatoires IL-8, CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CCL20, TNF- α et COX2 par rapport aux contrôles non stimulés (Figure 28). Aucune expression de l'ARNm codant l'IL-6 ou l'IL-1 β n'a été observée. L'expression des ARNm codant les cytokines et chimiokines pro-inflammatoires IL-8, CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CCL20, TNF- α et COX2 par les CEGHA stimulées avec la souche B128 Δ cagM est dose dépendante (Figure 28).

L'induction de l'expression de ces médiateurs ne semble pas dépendre de *cagM* à l'exception de COX2 qui est beaucoup plus fortement induit par les CEGHA stimulées par la souche B128 à la dose infectieuse de 100 bactéries/cellules par rapport à la souche B128 Δ cagM à la même dose (Figure 28). L'expression de ce médiateur (quasiment non détecté à 3h) par les CEGHA est plus tardive au cours de l'infection par *H. pylori* (Figure 28). De plus, l'expression des ARNm codant CXCL5 et CXCL2 est augmentée à 24h par rapport à leur expression à 3h et ceci est observé avec les deux souches de *H. pylori* (Figure 28). L'induction de ces médiateurs après 24h de stimulation des CEGHA est indépendante de *cagM*. L'expression de l'ARNm des autres médiateurs, notamment l'IL-8, le CXCL1, le CXCL3, le TNF α , et le CCL20, après 24h de stimulation avec *H. pylori* est légèrement modifiée par rapport au temps précoce de 3h (Figure 28).

L'analyse de l'expression de hBD1, hBD2, hBD3, S100A7, S100A8 et S100A9 a été également réalisée à 24h d'infection et aucune induction des ARNm codant pour les membres de la famille des S100 ni de hBD1 n'a été mise en évidence (données non présentées). L'expression de l'ARNm codant hBD2 et hBD3 par les CEGHA stimulées par *H. pylori* est fortement dose et *cagM*-dépendante (Figure 28). L'expression de l'ARNm codant hBD2 est plus importante après 24h de stimulation. Ceci a été observé avec les 2 souches de *H. pylori* (Figure 28). La défensine hBD3 semble avoir une expression plus tardive lors de l'infection par *H. pylori* puisque son expression n'est quasiment pas détectée au temps précoce d'infection.

La comparaison de l'expression des médiateurs inflammatoires au cours du temps a permis de mettre en évidence l'induction plus tardive de certains gènes (tels que COX2) ainsi que l'expression de certains médiateurs non détectés à 3 h (tels que hBD3). En revanche, une grande variabilité (écartypes) dans les résultats est notée à 24h par rapport au temps plus précoce (3h). L'augmentation de l'effectif dans les prochaines expériences d'infection permettra une meilleure analyse de cette réponse.

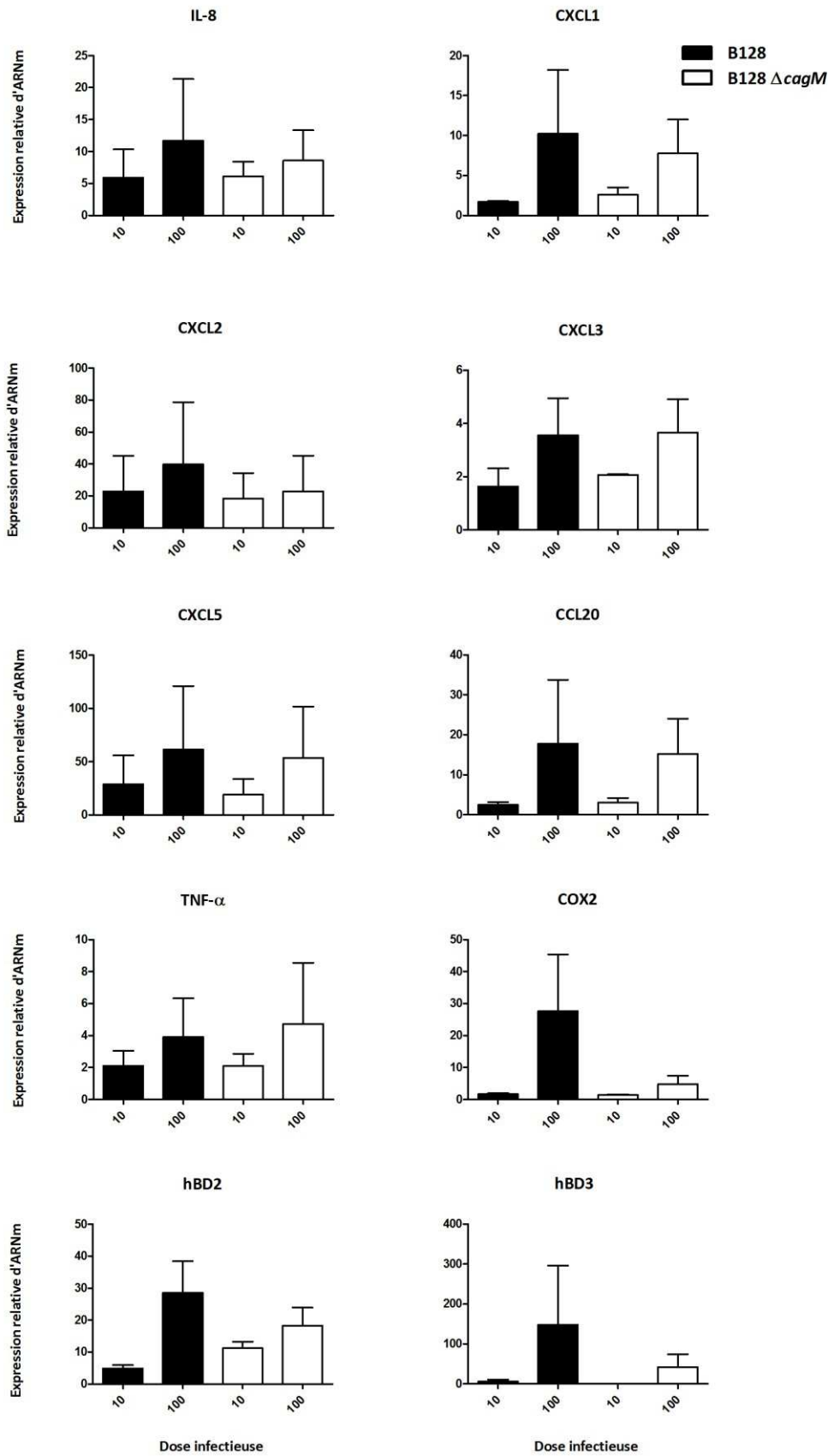


Figure 28. Profil d'expression des gènes associés à la réponse immunitaire par les CEGHA stimulés par *H. pylori* pendant 24h. Les CEGHA ont été stimulées pendant 24h avec les souches de *H. pylori* B128 et B128 Δ cagM aux doses infectieuses 10 et 100 bactéries/cellule. Les niveaux d'expression relative des ARNm ont été déterminés par RT-PCR quantitative. Les résultats obtenus ont été normalisés par rapport à deux gènes contrôles et exprimés en facteur de modulation par rapport aux cellules non stimulées (moyenne \pm erreur standard) (n=3).

VI.5.d. Comparaison des profils protéiques des CEGHA après exposition à *H. pylori*

La production des protéines inflammatoires par les CEGHA après 24 heures d'exposition à *H. pylori* a été analysée par dosage ELISA. Les chimiokines et cytokines dosées sont l'IL-8, le CXCL1, l'IL-6, l'IL-1 β et le TNF- α . Les peptides antimicrobiens dosés sont la hBD2 et la hBD3.

Une forte production dose-dépendante de l'IL-8 est observée après 24h de stimulation des CEGHA avec *H. pylori* par rapport aux contrôles non stimulés (Figure 29). L'induction de l'IL-8 au cours de l'infection par *H. pylori* est précoce et cagM-dépendante, comme le montre les résultats de RT-QPCR à 3h. Les niveaux protéiques d'IL-8 observés après 24h de stimulation des CEGHA avec les deux souches de *H. pylori* résultent d'une accumulation de la production de ce médiateur au cours du temps, et qui atteint un niveau similaire indépendamment de la virulence de la souche.

Une production de la chimiokine CXCL1 a également été observée après stimulation des CEGHA avec *H. pylori* (Figure 29). La production dose-dépendante de l'IL-8 et de CXCL1 par les CEGHA stimulées avec *H. pylori* est plus marquée avec la souche B128 Δ cagM. En effet, cette production est multipliée d'un facteur de 3,5 pour l'IL-8 et 4,6 pour CXCL1 avec l'augmentation de la dose infectieuse de la souche B128 Δ cagM d'un facteur de 10, alors qu'elle n'augmente que d'un facteur de 1,9 pour l'IL-8 et 1,4 pour CXCL-1 avec la souche B128 (Figure 29).

La production des chimiokines IL-8 et CXCL1 au cours de l'infection par *H. pylori* ne dépendrait pas uniquement de CagM mais résulterait de l'interaction complexe entre plusieurs voies de signalisation inflammatoires médiées par d'autres facteurs de virulence de la bactérie.

Seules les CEGHA issues du sujet A et stimulées par *H. pylori* ont présenté une production d'IL-6 et de TNF- α (Figure 30). Les CEGHA stimulées avec la souche B128 produisent ces deux médiateurs au même taux indépendamment de la dose infectieuse. En revanche, la production de ces médiateurs est fortement dose-dépendante après stimulation des cellules avec la souche B128 Δ cagM (Figure 30). L'IL-1 β n'a jamais été détectée dans les surnageants de culture dans toutes nos expériences et d'une façon surprenante, aucune expression protéique de hBD2 ni de hBD3 n'a été détectée chez ces 3 sujets.

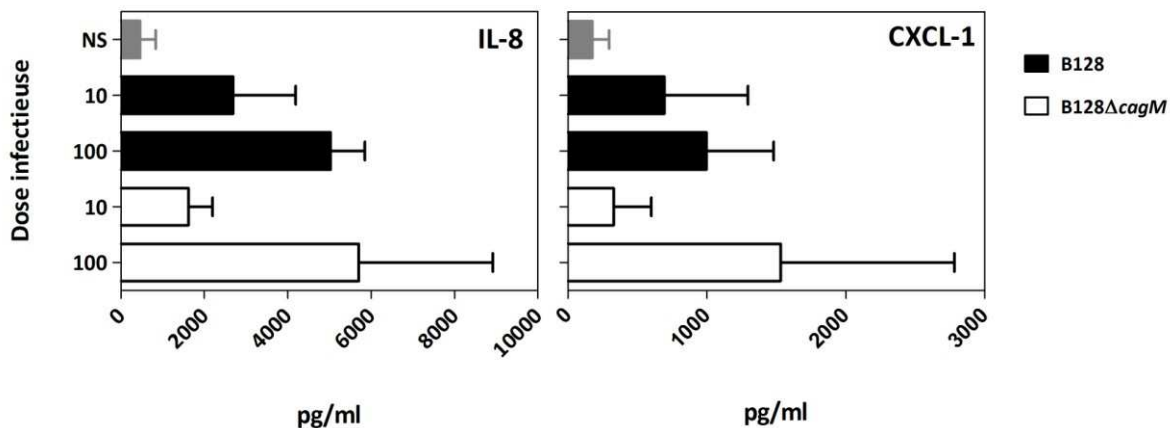


Figure 29. Production d'IL-8 et de CXCL1 par les CEGHA après stimulation avec *H. pylori*

Les CEGHA ont été stimulées pendant 24h avec les souches de *H. pylori* B128 et B128ΔcagM aux doses infectieuses de 10 et 100 bactéries/cellule. La concentration d'IL-8 et CXCL1 dans les surnageants a été mesurée par dosage ELISA (moyenne ± erreur standard) (n=3).

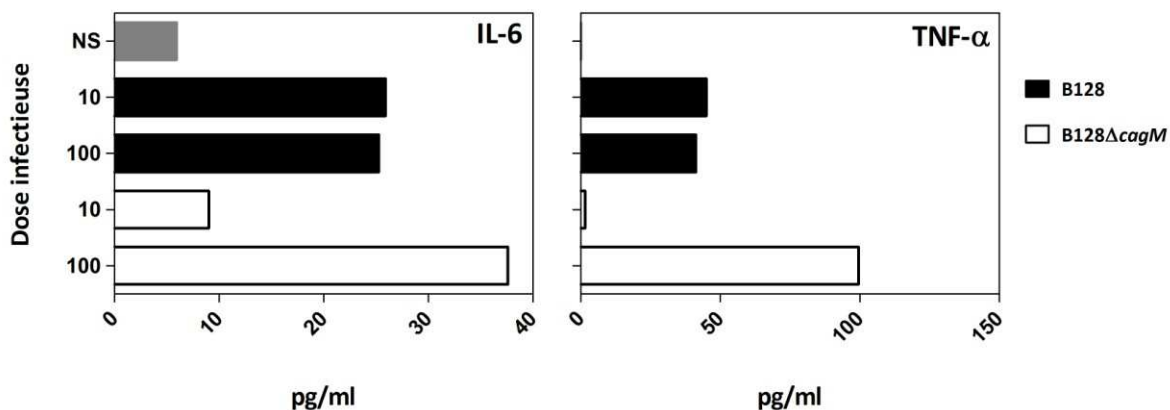


Figure 30. Production d'IL-6 et de TNF-α par les CEGHA du sujet A après stimulation avec *H. pylori*

Les CEGHA ont été stimulées pendant 24h avec les souches de *H. pylori* B128 et B128 ΔcagM aux doses infectieuses de 10 et 100 bactéries/cellule. La concentration d'IL-6 et de TNF-α dans les surnageants a été mesurée par dosage ELISA (n=1).

Expression et blocage du TLR2 dans les CEGHA

Dans une série d'expériences préliminaires, nous avons voulu vérifier la présence de certains TLRs au niveau des CEGHA par RT-PCR quantitative. Et en effet, nous avons détecté l'expression des gènes codant pour le TLR2, TLR3 et TLR4 dans nos cellules (Données non montrées).

La stimulation des CEGHA avec l'acide lipoteichoïque purifié à partir de *Staphylococcus aureus* (LTA-SA) montre une forte production d'IL-8 et de CXCL1 (Figure 31). L'acide lipoteichoïc (LTA) est un composant des bactéries Gram-positives qui possède des effets immunostimulants. Le LTA possède des propriétés biochimiques et

physiologiques similaires au LPS des bactéries Gram-négative. C'est une molécule amphiphile formée d'un polymère hydrophile de polyphosphates lié à un glycolipide neutre. Le LTA stimule les cellules immunitaires à produire le TNF- α ainsi que d'autres cytokines inflammatoires par l'activation de la voie du TLR2 (Schwandner *et al.*, 1999).

Le blocage de l'activité du TLR2 avec un anticorps neutralisant anti-hTLR2 en présence de *H. pylori* B128 montre une diminution de production d'IL-8 et de CXCL1 (Figure 31). Ce résultat préliminaire prouve d'une part que ces cellules répondent à des ligands spécifiques du TLR2 et d'autre part une implication du TLR2 dans l'induction de certains médiateurs inflammatoires au cours de l'infection par *H. pylori*. L'analyse de l'expression d'autres TLRs au niveau des CEGHA est actuellement en cours. Et d'autres expériences complémentaires sont nécessaires pour valider ce résultat.

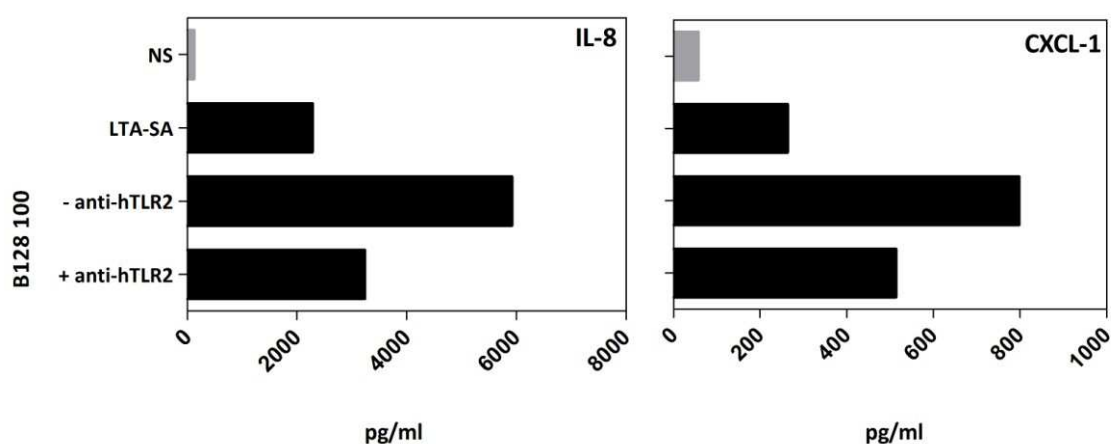


Figure 31. Production d'IL-8 et de CXCL1 par les CEGHA du Patient C après stimulation avec LTA-SA ou *H. pylori* B128 ou B128 + anti-hTLR2

Les CEGHA ont été stimulées pendant 24h avec un ligand spécifique du TLR2, le LTA-SA ou avec la souche de *H. pylori* B128 à la dose infectieuse de 100 bactéries/cellule avec ou sans anticorps neutralisant anti-hTLR2-IgA. La concentration d'IL-8 et de CXCL1 dans les surnageants a été mesurée par dosage ELISA (n=1).

VI.6. Discussion

Le développement de modèles de culture primaires de cellules épithéliales gastriques fonctionnelles présente de nombreux intérêts. Il permet d'une part d'étudier les caractéristiques de ces cellules et d'autre part de développer des modèles d'infection bactériens qui permettent de mieux caractériser certains processus physiopathologiques liés aux infections gastriques. Plusieurs essais de culture de CEGH primaires ont été réalisés à partir de divers modèles (biopsies gastriques, tissu fœtal, donneurs d'organes). En revanche, la culture primaire de cellules épithéliales étant difficile et jusqu'à présent pas entièrement maîtrisée, ces modèles sont restés limités et n'ont pas permis d'effectuer des analyses plus poussées, notamment pour l'étude de la réponse inflammatoire déclenchée par *H. pylori*. Nous avons réussi au cours de ce travail à développer un modèle de culture primaire de CEGH à partir de morceaux d'estomacs générés lors de « sleeves » gastriques. Les CEGH primaires obtenues ont servi pour le développement et la mise en

place d'un modèle d'infection avec *H. pylori* afin d'étudier les interactions de ces cellules avec la bactérie. Bien que plusieurs modèles cellulaires, majoritairement issus d'adénocarcinome gastrique (AGS, KATO-3, MKN...), ont été développés et ont pu clarifier plusieurs aspects des modifications cellulaires déclenchées par *H. pylori*, ils présentent plusieurs limites, et notamment une physiologie altérée compte tenu de leur origine tumorale. Le principal avantage de notre modèle est qu'il permet de travailler avec des CEGH primaires « saines » dont la réponse vis-à-vis de l'infection par *H. pylori* est très proche de celle observée chez l'homme. Le modèle d'infection établi a permis de dégager dans un premier temps certains aspects de la réponse inflammatoire des CEGH primaires après infection avec *H. pylori*. Il permettra ultérieurement, l'étude de plusieurs autres aspects de l'infection avec ce pathogène.

Les cellules épithéliales gastriques sont la source majeure de production d'IL-8 au cours de l'infection par *H. pylori* (Crabtree *et al.*, 1994a; Crabtree *et al.*, 1994b; Crabtree *et al.*, 1994c; Noach *et al.*, 1994; Fan *et al.*, 1995; Sharma *et al.*, 1995; Jung *et al.*, 1997; Katagiri *et al.*, 1997; Ogura *et al.*, 1998; Nakachi *et al.*, 2000). La production de ce facteur chimiotactique induit l'activation et le recrutement des neutrophiles vers le site de l'inflammation déclenchant ainsi une production accrue de cytokines pro-inflammatoires et de peptides antimicrobiens. Cette chimiokine joue donc un rôle majeur dans la mobilisation des mécanismes de défense contre *H. pylori*.

La régulation de l'expression de l'IL-8 ainsi que de plusieurs cytokines et médiateurs inflammatoires au cours de l'infection par *H. pylori* se fait essentiellement suite à l'activation des voies de signalisation cellulaires NF- κ B, AP-1 et MAP kinases (Keates *et al.*, 1997a; Backert *et al.*, 2010). L'induction de l'expression de l'IL-8 au cours de l'infection par *H. pylori* a longtemps été décrite comme étant directement liée à la translocation de la protéine CagA dans la cellule épithéliale via le SSTIV. Plusieurs études ont décrit une production de l'IL-8 cagA-dépendante dans les lignées cellulaires AGS, KATO-3, MKN28 et ST-42 après 24h de stimulation avec *H. pylori* (Crabtree *et al.*, 1994a; Crabtree *et al.*, 1995; Sharma *et al.*, 1995). Au niveau transcriptionnel, l'induction de ce médiateur a été décrite comme étant dépendante de CagA et ceci à des temps précoces (3h) (Crabtree *et al.*, 1994a; Crabtree *et al.*, 1995) et tardifs (24h) de stimulation (Sharma *et al.*, 1995). Plus récemment, il a été montré que CagA peut activer NF- κ B via la voie ERK et induire la sécrétion de l'IL-8 par des cellules épithéliales gastriques exposées à *H. pylori* pendant 36 à 48h (Brandt *et al.*, 2005). La transfection des cellules AGS avec CagA induit également une augmentation de la production de l'IL-8 (Kim *et al.*, 2006).

Certes, la protéine CagA joue un rôle déterminant dans la sécrétion de l'IL-8 au cours de l'infection par *H. pylori*, mais elle n'est pas indispensable à l'induction de cette chimiokine puisque des souches de *H. pylori* CagA-déficientes sont capables d'induire la sécrétion de l'IL-8 par plusieurs lignées cellulaires à des taux similaires de ceux des souches sauvages (Crabtree *et al.*, 1995; Sharma *et al.*, 1995; Censini *et al.*, 1996). La mutagenèse systématique de certains gènes de l'îlot cag a également confirmé que CagA n'est pas indispensable à la production de l'IL-8 par les cellules épithéliales (Fischer *et al.*, 2001). De plus, la mutation de *cagA* n'affecte pas la capacité de la souche à induire l'activation de NF- κ B dans les cellules HEK293 (Viala *et al.*, 2004).

En effet, c'est la présence d'un SSTIV fonctionnel qui est indispensable à l'induction de l'expression de l'IL-8 et d'autres cytokines pro-inflammatoires au cours de l'infection par *H. pylori* (Backert *et al.*, 2010), soit par l'activation de NF- κ B (Crabtree *et al.*, 1999; Fischer *et al.*, 2001; Nozawa *et al.*, 2002; Selbach *et al.*, 2002b; Viala *et al.*, 2004) ou celle de AP-1 (Keates *et al.*, 1999; Naumann *et al.*, 1999; Meyer-ter-Vehn *et al.*, 2000; Yamaoka *et al.*, 2004; Allison *et al.*, 2009). Plusieurs mécanismes d'activation de NF- κ B *cag*-dépendants mais aussi *CagA*-indépendants ont été proposés, impliquant au moins six voies de signalisation différentes (Backert *et al.*, 2010). Parmi ceux-ci, il a été montré récemment, que le PG est la molécule activatrice de NF- κ B. La reconnaissance par Nod1 du PG injecté dans la cellule épithéliale par le SSTIV induit l'activation de NF- κ B et la production d'IL-8 (Viala *et al.*, 2004).

Le gène *cagM* est un élément de l'îlot *cag* dont le produit est essentiel pour le bon fonctionnement du SSTIV notamment au cours de la translocation de *CagA* et du PG dans la cellule épithéliale, mais également dans l'induction de l'IL-8 (Segal *et al.*, 1997; Fischer *et al.*, 2001; Viala *et al.*, 2004; Cendron *et al.*, 2011). La mutation de ce gène abroge l'induction de l'activité Luciferase de NF- κ B dans les AGS et les HEK293 (Fischer *et al.*, 2001; Viala *et al.*, 2004).

L'exposition des CEGHA à *H. pylori* B128 (*CagA*+, *VacA*+) ou à son mutant isogénique B128 Δ *cagM* entraîne une induction précoce dose et *cagM*-dépendante de l'expression de l'IL-8. Après 24h d'exposition, la production de ce médiateur semble ne plus dépendre de *cagM*. Il semble que *cagM* joue un rôle plus déterminant en phase précoce au cours de l'infection par *H. pylori*. La production d'IL-8 par les cellules épithéliales gastriques stimulées par la souche B128 Δ *cagM* pourrait être due à d'autres facteurs de virulence de *H. pylori*.

Une hypothèse alternative est que le SSTIV favorise les interactions intimes entre la bactérie et les cellules épithéliales de l'hôte ce qui facilite l'endocytose de certains produits de *H. pylori*. De ce fait, en l'absence d'un îlot *cag* fonctionnel, la translocation du PG pourrait toujours se faire mais avec une moindre efficacité, déclenchant ainsi la sécrétion de l'IL-8. Cette hypothèse fut établie par Viala *et al.* pour expliquer la détection de PG marqué radioactivement à l'intérieur des cellules AGS stimulées par des mutants *cagM* de *H. pylori* (Viala *et al.*, 2004).

De plus, il semble que *H. pylori* puisse assurer la translocation du PG à l'intérieur de la cellule hôte via des vésicules de la membrane externe qui sont constamment libérés par la bactérie (Kaparakis *et al.*, 2010). L'activation de Nod1 par le PG délivré par ces vésicules pourrait aussi être à l'origine de la production d'IL-8 par les cellules épithéliales gastriques infectées par *H. pylori*. Ceci peut donc en partie aussi expliquer la production de ce médiateur par les CEGHA stimulées avec la souche B128 Δ *cagM*.

D'autre part et malgré les données contradictoires sur ce sujet (Maeda *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 2003; Gewirtz *et al.*, 2004; Andersen-Nissen *et al.*, 2005), l'implication des TLR2 et TLR5 dans la reconnaissance de *H. pylori* jouerait un rôle dans l'activation de certaines voies de signalisation inflammatoires.

Les TLRs possèdent des fonctions fondamentales de reconnaissance de composants microbiens, tels que les lipoprotéines (TLR2) et la flagelline (TLR5) au cours

la réponse innée de l'hôte (Akira *et al.*, 2006). Des travaux très récents réalisés sur des cellules HEK293 transfectées avec les TLR2 et TLR5 montrent une augmentation de l'expression de ces deux TLRs après infection par *H. pylori* ainsi que l'induction par le biais de ces deux récepteurs d'une cascade de signalisation activant NF- κ B. Ceci a pour conséquence la sécrétion d'IL-8 et de TNF- α par ces cellules d'une façon indépendante de *cag* (Kumar Pachathundikandi *et al.*, 2011). Une étude similaire a également démontré une augmentation de la sécrétion de l'IL-8 dans les cellules HEK293 (transfectées avec TLR2 et TLR5) exposées à *H. pylori* par des mécanismes dépendants de TLR2 et TLR5 (Torok *et al.*, 2005).

Contrairement aux AGS, HEK293 et autres lignées cellulaires qui n'expriment pas le TLR2 les CEGHA expriment les gènes codant pour le TLR2. Dans notre étude, le blocage de l'activité du TLR2 avec un anticorps neutralisant anti-hTLR2, a provoqué une diminution de moitié de la production de l'IL-8 et du CXCL1 dans les CEGHA stimulées par *H. pylori*. Ce résultat préliminaire prouve une implication du TLR2 probablement via le LPS dans l'induction de certains médiateurs inflammatoires au cours de l'infection par *H. pylori*. Et très récemment, il a été montré que le LPS de *H. pylori* est un ligand classique du TLR2 qui, une fois activé, induit une cascade de voies de signalisation amenant à l'activation de NF- κ B et l'induction de chimiokines (Smith *et al.*, 2011). Ceci pourrait expliquer l'induction de l'IL-8 par les CEGHA après stimulation par la souche B128 Δ *cagM*.

Finalement, la sécrétion d'IL-8 au cours de l'infection par *H. pylori* serait également induite par d'autres facteurs de virulence de la bactérie tels que l'uréase. En effet, l'interaction de l'uréase avec le récepteur de surface CD74 peut activer NF- κ B et induire aussi une production d'IL-8 (Beswick *et al.*, 2006).

En résumé, les niveaux d'expression de l'IL-8 observés après 24h de stimulation dans les surnageants de CEGHA exposées à B128 Δ *cagM* pourraient être dus à l'activation de NF- κ B via le TLR2, à la translocation progressive de fragments de PG via le SSTIV ou aux vésicules de la membrane externe de *H. pylori* ou à d'autres facteurs de virulence bactériens tels que l'uréase.

Plusieurs autres chimiokines, notamment la CXCL5, la CXCL1, la CXCL2, la CXCL3 et la CCL20 sont également produites au cours de l'infection par *H. pylori*.

Les chimiokines CXCL1, CXCL2 et CXCL3 sont membres de la famille de l'IL-8 et participent activement au recrutement des cellules immunitaires vers le site inflammatoire (Luster, 1998). Au cours de l'infection par *H. pylori*, l'expression de CXCL1 aux niveaux transcriptionnel et protéique est augmentée dans la muqueuse gastrique des patients infectés (Shimoyama *et al.*, 1997; Shimoyama *et al.*, 1998; Yamaoka *et al.*, 1998; Eck *et al.*, 2000). *H. pylori* induit aussi l'expression de CXCL1 dans les cellules AGS et KATO-3 (Sieveking *et al.*, 2004). Dans notre modèle, l'exposition des CEGHA à *H. pylori* montre une induction précoce dose et *cagM*-dépendante de l'expression des gènes codant pour CXCL1, CXCL2, CXCL3. Ce résultat est concordant avec quelques données cliniques qui montrent une expression de CXCL1 dans les biopsies gastriques fortement associée à *CagA* et à l'infiltration des cellules mononuclées et des neutrophiles au niveau de la muqueuse (Shimoyama *et al.*, 1998; Yamaoka *et al.*, 1998; Eck *et al.*, 2000). Par ailleurs, l'expression et la production de ce médiateur n'est plus dépendante de *cagM* après 24h d'exposition à ce pathogène. La protéine CagM jouerait donc un rôle plus déterminant

dans l'induction des chimiokines CXCL1, CXCL2 et CXCL3 en phase précoce d'infection par *H. pylori*.

CXCL5 est une chimiokine activatrice des polynucléaires neutrophiles (PN) équivalent à l'IL-8 même si elle semble moins active dans le relargage de granules des PN. Elle joue un rôle dans la mise en place d'un gradient chimiotactique au cours de l'inflammation (Walz *et al.*, 1991; Walz *et al.*, 1997). L'augmentation de l'expression de l'ARNm de CXCL5 est associée à une infiltration de neutrophiles dans la muqueuse gastrique antrale de patients infectés (Shimoyama *et al.*, 1998). L'association entre l'augmentation de l'expression de ce médiateur inflammatoire et le phénotype CagA+ dans les biopsies gastriques antrales est controversée (Bliss *et al.*, 1998; Shimoyama *et al.*, 1998; Rieder *et al.*, 2001). *In vitro*, une induction de l'expression de l'ARNm de CXCL5 est observée dans un modèle de cellules AGS stimulées par *H. pylori* (Rieder *et al.*, 2001). Dans notre étude, l'exposition des CEGHA à *H. pylori* induit de manière précoce et dose-dépendante l'expression de CXCL5. Cette induction est plus marquée après 24h de stimulation et semble être indépendante de *cagM*. L'induction tardive de CXCL5 par rapport à celle de l'IL-8 a également été observée dans les cellules AGS (Rieder *et al.*, 2001), dans les monocytes (Schnyder-Candrian *et al.*, 1997) et dans la lignée intestinale épithéliale humaine Caco-2 (Keates *et al.*, 1997b). La différence de cinétique d'induction entre l'IL-8 et la CXCL5 pourrait s'expliquer par la différence des sites d'activation des promoteurs de chacun de ces gènes. En effet, l'induction de l'expression de CXCL5 ne dépend pas que de l'activation de NF- κ B mais aussi de celle d'AP-2 (Corbett *et al.*, 1994).

Parallèlement aux autres chimiokines, l'expression de CCL20 augmente en phase précoce d'infection par *H. pylori* de manière dose et *cagM*-dépendante. CCL20 est une chimiokine qui participe au recrutement des CD4 et de LT mémoires sur les sites inflammatoires (Dieu *et al.*, 1998). Elle possède une activité antibactérienne contre *E. coli* et *S. aureus* (Hoover *et al.*, 2002). Une attention particulière a été accordée récemment à cette chimiokine dont l'expression est augmentée au niveau de la muqueuse gastrique infectée par *H. pylori* (Wen *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2007; Yoshida *et al.*, 2009). L'exposition de la lignée cellulaire gastrique AZ-521 à *H. pylori* provoque l'induction *cagM*-dépendante de CCL20 (Yoshida *et al.*, 2009). L'expression de cette chimiokine est également augmentée en présence de l'IL-1 β et du TNF- α dans un modèle de culture primaire de CEGH stimulées avec *H. pylori* (Wu *et al.*, 2007). L'activité chimiotactique de recrutement des LT et DCs de CCL20 se fait par l'interaction avec son récepteur CCR6 (Dieu *et al.*, 1998). L'expression de CCR6 au niveau des LT infiltrant la muqueuse gastrique infectée par *H. pylori* (Wu *et al.*, 2007; Yoshida *et al.*, 2009) révèle une possible implication de cette chimiokine dans l'attraction des cellules immunitaires vers les sites enflammés de la muqueuse gastrique au cours de l'infection par *H. pylori* (Tsai *et al.*, 2010).

La défense innée mise en place en réponse à l'infection par *H. pylori* implique la participation d'autres facteurs, notamment les peptides antimicrobiens. Les β -défensines sont des peptides antimicrobiens sécrétés au niveau des muqueuses et fortement impliqués dans l'immunité innée. L'analyse de l'expression de hBD1, hBD2 et hBD3 dans notre modèle cellulaire après exposition à *H. pylori* montre une induction dose et *cagM*-dépendante de l'ARNm codant pour les défensines hBD2 et hBD3. Par ailleurs, aucune induction de l'expression de hBD1 n'a été observée. Ce peptide exprimé constitutivement

dans plusieurs tissus, notamment dans l'épithélium gastrique (Zhao *et al.*, 1996) possède une expression modulée au cours de l'infection par *H. pylori* dans les lignées AGS, MKN7 et MKN45 et dans les biopsies de patients infectés (Bajaj-Elliott *et al.*, 2002). Une activité bactéricide modeste contre *H. pylori* a été attribuée à hBD1 (George *et al.*, 2003). *H. pylori* peut probablement être peu sensible à la présence constitutive de hBD1, ou même posséder une résistance naturelle vis-à-vis de ce peptide.

hBD2 est très fortement induite dans les tissus épithéliaux gastriques et intestinaux après infection bactérienne ou stimulation avec l'IL-1 (O'Neil *et al.*, 1999; Wada *et al.*, 1999; O'Neil *et al.*, 2000; Bajaj-Elliott *et al.*, 2002). L'évaluation du potentiel antimicrobien de hBD2 a révélé une activité hautement bactéricide de ce peptide sur *H. pylori* (Hamanaka *et al.*, 2001). L'expression de l'ARNm codant hBD3 a été observée dans les tissus épithéliaux et non-épithéliaux (Garcia *et al.*, 2001; Harder *et al.*, 2001) notamment dans l'épithélium gastrique et son expression est augmentée suite à l'infection par *H. pylori* (George *et al.*, 2003). Dans notre modèle, nous avons observé une induction plus tardive de l'expression du gène codant pour hBD3 par rapport à celui codant pour hBD2 lors de la stimulation avec *H. pylori*. Les données de littérature concernant la cinétique d'induction de l'expression de ces 2 peptides concordent avec nos observations. En effet, l'induction de hBD2 est plus précoce avec une réponse maximale après 6h d'infection alors que l'expression de hBD3 est maximale après 12h d'infection (Bajaj-Elliott *et al.*, 2002). Ceci suggère une régulation différentielle de l'expression de ces 2 peptides dans l'épithélium gastrique au cours de l'infection. En effet, il a été montré récemment que l'expression de hBD2 et pas celle de hBD3 est médiée par Nod1 au cours de l'infection par *H. pylori* d'une façon *cag*-dépendante (Boughan *et al.*, 2006). De plus, Nod1 régule l'éradication directe de la bactérie par hBD2 (Grubman *et al.*, 2010).

L'induction de l'expression des gènes codant pour les peptides de la famille S100 au cours de l'infection des CEGHA par *H. pylori* n'a pas été observée. Ces peptides, auxquels ont été attribués des propriétés antimicrobiennes et antifongiques (Steinbakk *et al.*, 1990; Miyasaki *et al.*, 1993; Murthy *et al.*, 1993; Brandtzaeg *et al.*, 1995; Sohnle *et al.*, 2000; Lusitani *et al.*, 2003; Glaser *et al.*, 2005; Schroder *et al.*, 2006; Zaia *et al.*, 2009) pourraient avoir une activité microbicide contre *H. pylori*. Il a même été montré récemment que S100A9 est fortement exprimé dans la muqueuse gastrique inflammée des enfants infectés par cette bactérie (Leach *et al.*, 2008). Une éventuelle propriété bactériostatique de ce peptide contre *H. pylori* par un mécanisme de séquestration du zinc a été proposée. Le rôle et l'implication des peptides de cette famille au cours de l'infection par *H. pylori* restent à confirmer.

La réponse inflammatoire liée à *H. pylori* est également caractérisée aussi par une production abondante de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 β , le TNF- α et l'IL-6.

Le TNF- α est induit en phase précoce au cours de l'inflammation (Schottelius *et al.*, 2004) et son expression semble être *CagA* et *VacA*-dépendante au cours de l'infection par *H. pylori* (Crabtree, 1996). Ces données concordent avec les observations que nous avons obtenus dans notre modèle de culture et dans lequel l'induction de l'expression de l'ARNm du TNF- α par les CEGHA exposées à *H. pylori* est précoce, dose et *cag*-dépendante. L'expression de cette cytokine multifonctionnelle qui régule l'inflammation, la réponse immunitaire et l'apoptose (Locksley *et al.*, 2001) est augmentée lors de la stimulation des

cellules AGS (Kim *et al.*, 2007) et KATO III (Nakachi *et al.*, 2000) par *H. pylori*. Ces résultats sont également retrouvés au niveau des muqueuses gastriques des patients infectés (Crabtree *et al.*, 1991; Fan *et al.*, 1993; Noach *et al.*, 1994; Yamaoka *et al.*, 1996; Ierardi *et al.*, 2003). Les cellules épithéliales gastriques produisent du TNF- α au cours de l'infection par *H. pylori*. Cependant, ce sont les monocytes/macrophages qui en sont les principales sources pendant la réponse inflammatoire (Schottelius *et al.*, 2004). Le TNF- α initie l'apoptose des cellules épithéliales au cours de l'infection par *H. pylori* (Monack *et al.*, 2004) par l'activation de la voie NF- κ B (Schottelius *et al.*, 2004). Cette cytokine augmente également la production d'autres cytokines telles l'IL-1, l'IL-1Ra, l'IL-2, l'IL-4, l'IL-6, l'IL-18 et l'IFN γ (Schottelius *et al.*, 2004) et joue un rôle important dans la régulation de la réponse immunitaire Th1, ceci par l'induction de la synthèse d'IL-12 et d'IL-18 par les macrophages conduisant à une différenciation des LT naïfs en LTh1 produisant de l'IFN- γ (Schottelius *et al.*, 2004). Dans notre modèle, la production du TNF- α n'a été détectée que chez un seul patient contrairement à l'ARNm de ce médiateur détecté chez tous les patients.

La cytokine pro-inflammatoire IL-6 est surexprimée dans la muqueuse gastrique des patients infectés par *H. pylori* (Crabtree *et al.*, 1991; Gionchetti *et al.*, 1994; Yamaoka *et al.*, 1996; Yamaoka *et al.*, 1997; Ando *et al.*, 1998; Furukawa *et al.*, 1998; Yamaoka *et al.*, 2001). Cette cytokine n'est pas induite dans les AGS ou MKN45 après exposition à *H. pylori* (Crawford *et al.*, 2003; Hwang *et al.*, 2003). Par ailleurs, la stimulation des MKN28 avec *H. pylori* provoque une induction de l'IL-6 qui est augmentée en présence de l'îlot de *cag* et de OipA (Lu *et al.*, 2005). L'IL-6 est produite par les LT et LB et les monocytes/macrophages (Naka *et al.*, 2002) et la régulation de son expression se fait via plusieurs voies de signalisation tels AP-1, CRE et NF- κ B. L'IL-1 β est également produite dans la muqueuse épithéliale gastrique des patients infectés par *H. pylori* (Noach *et al.*, 1994; Lindholm *et al.*, 1998; El-Omar *et al.*, 2000). La stimulation des cellules AGS avec *H. pylori* provoque une surexpression de l'ARNm de l'IL-1 β avec une réponse maximale après 24h d'exposition (Kim *et al.*, 2007). L'IL-1 β est surtout produite par les monocytes/macrophages, les CD4 et les LB (Dinarello, 2009). Les deux cytokines pro-inflammatoires IL-6 et IL-1 β sont également produites par les CD4 co-cultivées avec *H. pylori* (Hafsi *et al.*, 2004; Kranzer *et al.*, 2005) et sont fortement impliquées dans le processus inflammatoire lié à *H. pylori*. La non-détection de l'expression de ces deux médiateurs dans notre modèle de culture suggère que leur expression est plus exclusivement liée aux infiltrats immunitaires.

COX2 est une enzyme impliquée dans la production de prostaglandines au cours de l'inflammation (Gupta *et al.*, 2001). Son expression est augmentée dans les cellules épithéliales gastriques exposées à *H. pylori* (Romano *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 2001; Juttner *et al.*, 2003) et dans la muqueuse gastrique des patients infectés (Sawaoka *et al.*, 1998; Fu *et al.*, 1999; McCarthy *et al.*, 1999; Jackson *et al.*, 2000). Au cours de notre étude, l'induction de l'ARNm de *COX2* par les CEGHA exposées à *H. pylori* est tardive et *cag*-dépendante. Cette induction tardive concorde avec d'autres études réalisées sur des cellules AGS (Kim *et al.*, 2001) ou MKN-28 (Romano *et al.*, 1998). Par ailleurs, le rôle de l'îlot *cag* dans l'induction de *COX2* est controversé (Romano *et al.*, 1998; Juttner *et al.*, 2003; Chang *et al.*, 2004) et l'implication de NF- κ B dans la régulation de l'expression de

cette enzyme est également contestée (Kim *et al.*, 2001; Juttner *et al.*, 2003; Chang *et al.*, 2004). Il est probable que l'activation du TLR2 par *H. pylori* induise l'expression de *COX2* via l'activation de NF- κ B (Chang *et al.*, 2004). Une autre étude suggère une régulation de l'expression de *COX2* par la voie de signalisation MEK/ERK1/-2 activée par des facteurs de virulence de *H. pylori* autres que l'îlot *cag* (Juttner *et al.*, 2003).

VI.7. Conclusion

Ce travail a permis d'établir un protocole de culture primaire de cellules épithéliales gastriques humaines à partir de tissu gastrique sain. Cette approche a également permis la mise au point d'un modèle d'infection par *H. pylori* afin de caractériser la réponse inflammatoire des cellules épithéliales gastriques en réponse à ce pathogène. Les résultats présentés sont la première étape dans l'élaboration et la maturation de ce projet scientifique qui vise à apporter des éclairages nouveaux sur la physiopathologie liée à *H. pylori* en utilisant un outil d'étude très pertinent.

L'induction *cagPAI*-dépendante d'un panel de chimiokines, cytokines et peptides antimicrobiens par les CEGHA suite à l'exposition à *H. pylori* confirme l'implication ce facteur de virulence dans la réponse inflammatoire précoce. La régulation de l'induction et l'expression de chacun de ces médiateurs par *cag PAI* est différentielle en fonction du temps, et il est probable que les éléments de *cag PAI* tels que *cagM* jouent un rôle déterminant en phase précoce d'infection pour déclencher le processus inflammatoire. D'autres facteurs de virulence de *H. pylori* tels que les adhésines, *VacA*, l'uréase ou la flagelline participent aussi activement à l'inflammation par le biais de diverses voies de signalisation. L'induction et la production des médiateurs inflammatoires par les cellules épithéliales gastriques exposées à *H. pylori* se fait via des interactions complexes entre plusieurs cascades de signalisation impliquant plusieurs acteurs cellulaires, immunitaires et bactériens créant ainsi un scénario inflammatoire déroutant.

L'avantage majeur de ce modèle est qu'il est plus représentatif de la physiologie cellulaire normale, contrairement aux lignées cellulaires dérivées d'adénocarcinomes qui reflètent une biologie (tumorale) altérée. Des travaux supplémentaires sont nécessaires pour déterminer le rôle de *cag PAI* dans la modulation de la réponse immunitaire et les voies de signalisation impliquées. Une identification plus approfondie du rôle respectif de chacune de ces cytokines dans l'inflammation gastrique et l'identification précise des cellules productrices dans le contexte inflammatoire chronique reste nécessaire.

Chapitre VII. Caractérisation de cellules humaines gastriques à phénotype de cellules souches

VII.1. Introduction

Les cellules gastriques à phénotype de cellules souches (CPS) sont obtenues à partir de cultures vieillissantes de cellules épithéliales gastriques. Le maintien en culture pendant 3 à 4 semaines des primo-cultures de cellules gastriques a permis d'observer d'une part la dégénérescence des cellules épithéliales et d'autre part une prolifération de cellules de type fibroblastique sur lesquelles se développent des structures tridimensionnelles en forme de sphères, les CPS. Cette appellation a été choisie du fait que ces structures possèdent des propriétés similaires à celles des cellules souches indifférenciées. En effet, nos travaux de caractérisation ont permis de mettre en évidence la présence de certains marqueurs spécifiques aux cellules souches dans ces structures. Les résultats présentés dans cette partie sont préliminaires et constituent une première étape de caractérisation. La détermination de la nature de ces cellules et l'examen de leur potentiel de régénération sont actuellement en cours.

Ce travail a été réalisé en collaboration avec l'équipe INSERM U935 « Cellules souches leucémiques et thérapeutiques » à Poitiers. Nous remercions particulièrement le Pr. Ali TURHAN pour sa précieuse contribution à ce projet.

VII.2. Structures sphériques obtenues en culture

Les CPS obtenues en culture s'organisent à la surface du tapis de fibroblastes de manière progressive et prolifèrent en adoptant une structure tridimensionnelle sphérique de taille variable (Figures 32 et 33). Ces sphères sont constituées d'un amas de cellules capables de former de grosses structures en quelques jours. Au bout d'un mois maximum d'entretien en culture, les sphères finissent par perdre leur structure tridimensionnelle et s'aplatissent en fusionnant avec les fibroblastes leur servant de matrice. Cet état cellulaire pourrait être associé à une phase de nécrose ou à une étape de maturation de ces structures. L'apparition des CPS est quasi-systématique et a été observée dans la plupart des cultures vieillissantes.

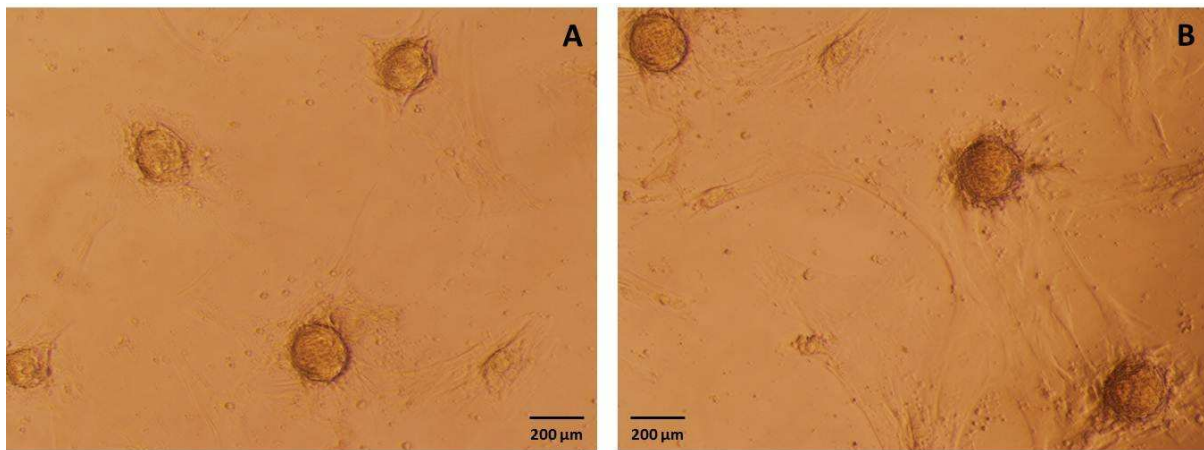


Figure 32. Structures sphériques cellulaires obtenues à partir de cultures vieillissantes de cellules épithéliales gastriques
Gx40

A l'exception d'un article récent, l'isolement, la caractérisation et la différenciation de cellules souches gastriques humaines n'ont jamais été décrites. En 2007, l'équipe de Yang *et al.*, décrit l'obtention d'une lignée cellulaire gastrique possédant un phénotype de cellules souches à partir d'une biopsie gastrique humaine (Yang *et al.*, 2007). La culture et l'expansion d'un clone cellulaire, le KMU-GI2, contenant majoritairement des cellules épithéliales non différenciées, a donné naissance à une population hétérogène de cellules après plusieurs passages. Des clones issus d'une cellule de départ ont montré un potentiel de différenciation spontanée important et ont été capables de générer en culture plusieurs types cellulaires morphologiquement différents (épithélial, glial...). La caractérisation détaillée du KMU-GI2 a permis de mettre en évidence la présence de certains marqueurs tels que OCT4 ainsi que des propriétés spécifiques aux cellules souches adultes telles que la déficience de communication jonctionnelle intracellulaire GAP et la capacité de croissance sans ancrage (Yang *et al.*, 2007). Ces propriétés sont communes aux cellules souches somatiques adultes (Chang *et al.*, 1987; Chang *et al.*, 2001; Matic *et al.*, 2002; Lin *et al.*, 2005; Tai *et al.*, 2005).

Chez la souris, seuls quelques marqueurs spécifiques des cellules souches somatiques gastriques adultes ont été identifiés récemment: Le DCLK1 (Doublecortin CaM kinase-like) (Giannakis *et al.*, 2006), la villine (Qiao *et al.*, 2007) et le LGR5 (Leucin-rich orphan G protein-coupled receptor) (Barker *et al.*, 2007; Barker *et al.*, 2010). D'autres marqueurs potentiels, peu explorés jusqu'à présent, ont également été identifiés tels que Prom1/CD133 (Prominin-1), CD44 (Cluster of differentiation 44) et TFF2 (Trefoil family factor-2) (Qiao *et al.*, 2011). Ces marqueurs n'ont pas été identifiés chez l'homme.

Nous avons réalisé une série d'expériences préliminaires pour étudier les propriétés des CPS afin de mieux caractériser leur nature.

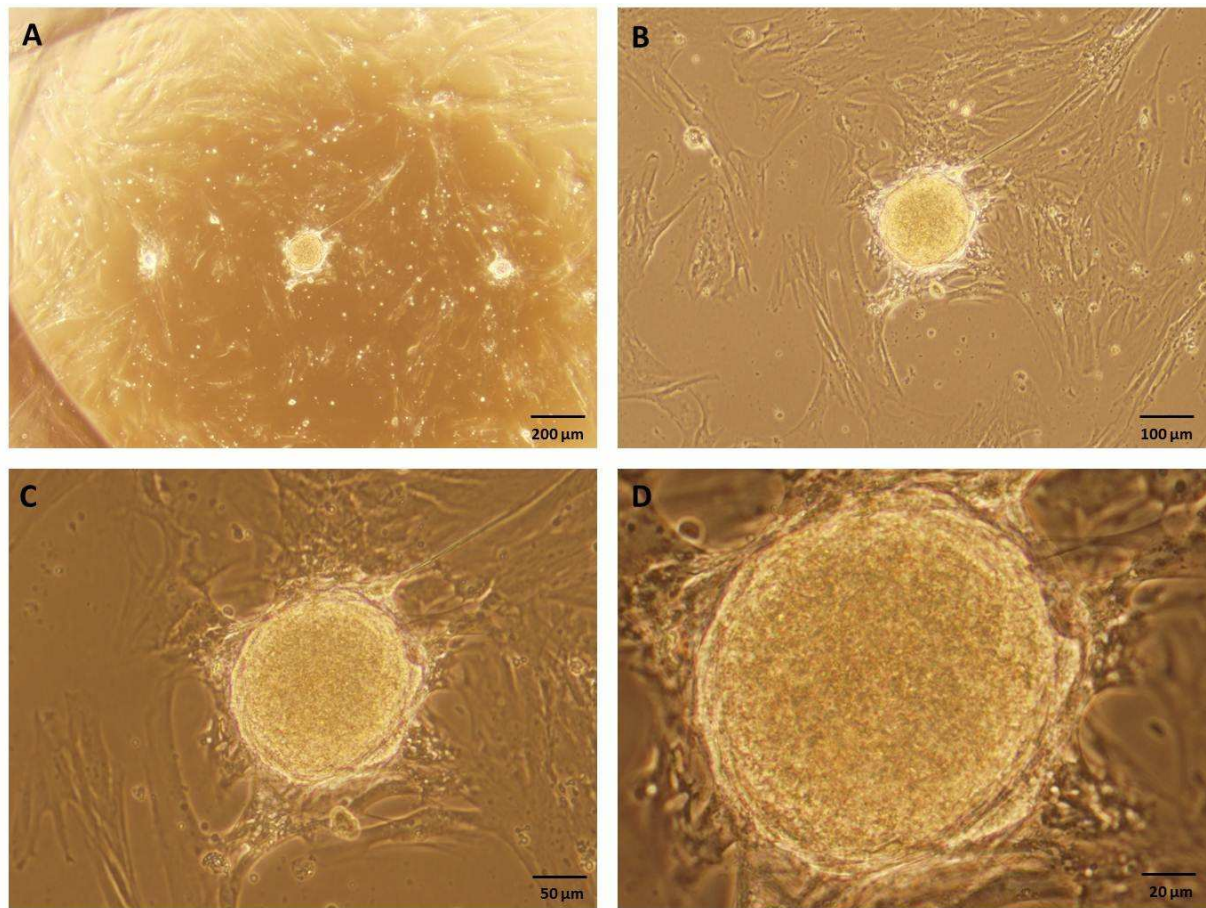


Figure 33. Structure sphérique constituée de cellules à phénotype cellule souche (CPS)
(A) Gx40 ; (B) Gx100 ; (C) Gx200 ; (D) Gx400

VII.3. Culture des CPS sur les MEF

Les MEF sont des fibroblastes embryonnaires de souris dont l'activité mitotique est stoppée par traitement à la mitomycine. Ils sont utilisés préférentiellement comme cellules nourricières qui soutiennent l'auto-renouvellement des cellules souches embryonnaires et permettant leur maintien dans un état indifférencié (Thomson *et al.*, 1998; Reubinoff *et al.*, 2000; Xu *et al.*, 2001). Ce modèle est donc communément utilisé pour la culture et l'expansion des cellules souches embryonnaires. Nous avons dans un premier temps analysé le potentiel des CPS à pousser sur les MEF afin d'examiner leur comportement. En effet, les CPS possèdent la capacité de pousser sur la matrice constituée de MEF et de reformer les mêmes structures observées sur le stroma fibroblastique d'origine. Néanmoins, la taille des sphères formées sur MEF est plus petite. Par ailleurs, comme sur le stroma d'origine, les CPS ont perdu leur structure tridimensionnelle et se sont aplaties au bout de 3 passages sur MEF (Figure 34).

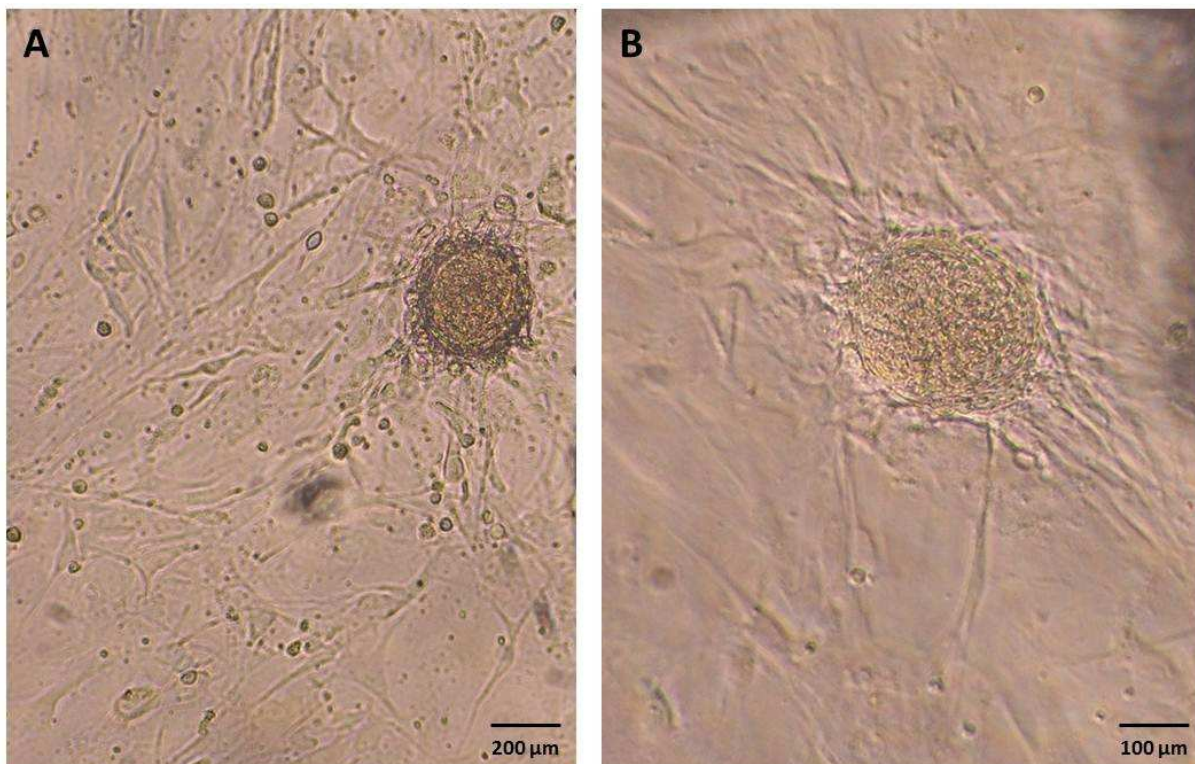


Figure 34. Sphères obtenues sur MEF

(A) Gx100 ; (B) Gx200. Une colonie de CPS est prélevée, dissociée et déposée sur MEF. L'apparition des sphères est observée au bout de 3 jours de culture dans un milieu spécifique aux cellules souches permettant leur maintien dans un état indifférencié.

VII.4. Croissance sans ancrage

La culture d'une colonie de CPS dissociée (sous l'action de la trypsine) sur une fine couche d'agarose à 0.5% (p/v) montre l'apparition de quelques colonies ou amas cellulaires à la surface de l'agarose. Cette propriété de croissance cellulaire sans ancrage est spécifique des cellules tumorales (Chang *et al.*, 2001; Lin *et al.*, 2005) et a également été observée dans les cellules gastriques KMU-G12 à caractère cellules souches isolées en 2007 (Yang *et al.*, 2007).

VII.5. Marquage à la phosphatase alcaline

La phosphatase alcaline est une enzyme hydrolytique catalysant les réactions de phosphorylation des nucléotides, protéines et alcaloïdes (Kim *et al.*, 1991). L'activité phosphatase alcaline est un marqueur des cellules souches pluripotentes indifférenciées (De Vos *et al.*, 2009).

Un marquage biochimique à la phosphatase alcaline a été réalisé sur les CPS ; la majorité des sphères, mais pas toutes, ont été visiblement marqués en noir ce qui indique la présence d'une forte activité phosphatase alcaline qui pourrait être modulée suivant l'état de maturation des structures cellulaires.

VII.6. Expression génétique de Nanog, SOX2 et OCT4

Nous avons ensuite recherché une éventuelle expression dans les CPS de quelques gènes de pluripotence exprimés exclusivement dans les cellules souches par PCR quantitative. Ces gènes sont *OCT4*, *Nanog* et *SOX2*. Une forte expression de l'ARNm des gènes codant pour ces 3 marqueurs a été détectée dans les CPS cultivées sur MEF et dans les CPS cultivées sur le stroma d'origine par rapport au témoin (extrait d'ADNc d'une culture primaire de kératinocytes humains) (Tableau 1). L'expression génétique de ces marqueurs dans les CPS indique qu'elles possèdent des caractères de pluripotence. Cette expérience a été réalisée une seule fois. Des tests supplémentaires, notamment en utilisant plusieurs échantillons d'origines différentes sont en cours pour confirmer cette hypothèse.

Expression relative d'ARNm	MEF	Stroma
Nanog	10	42
SOX2	154	251
OCT4	302	96

Tableau 1. Expression relative des transcrits des gènes codant pour *Nanog*, *SOX2* et *OCT4* dans les CPS

Expression relative de l'ARN des gènes codant pour Nanog, SOX2 et OCT4 dans les CPS cultivés sur MEF (MEF) et ceux cultivés sur le stroma fibroblastique humain normal (Stroma). L'expression des gènes est normalisée par rapport au gène de ménage GAPDH et le témoin négatif utilisé est un extrait d'ADNc issu d'une culture primaire de kératinocytes humains (n=1).

La capacité des CPS à pousser sans ancrage, l'activité phosphatase alcaline associée et l'expression de gènes de pluripotence dans les CPS révèle des propriétés cellulaires particulières de ces cellules. L'hypothèse qu'il s'agisse de « cellules indifférenciées » ou de « cellules souches adultes » a été soulevée et des expériences complémentaires notamment l'analyse par microarrays de l'expression des gènes de pluripotence et de différenciation cellulaire ont été entamées.

VII.7. Analyse de l'expression des gènes de pluripotence dans les CPS par microarrays

L'expression de marqueurs spécifiques aux cellules souches dans les CPS a été analysée par microarrays ciblant 90 gènes humains de pluripotence (Adewumi *et al.*, 2007) dont la liste est fournie dans le tableau 2. Ce travail a été réalisé par le Dr. Jean-Claude CHOMEL de l'équipe INSERM U935 à Poitiers.

Les types cellulaires étudiés sont le stroma gastrique (stroma) constitué des fibroblastes gastriques et les CPS. Les lignées de cellules souches embryonnaires (ES)

utilisées sont H1 p52, H9 p48 et CL01 p32. La quantification relative des gènes est réalisée par rapport au gène de ménage le plus stable, l'actine- β (ACTB) en utilisant la lignée ES H1 p52 comme référence. Cette expérience a été réalisée une seule fois et aucun test statistique n'a été effectué. Des expériences supplémentaires sont donc nécessaires pour confirmer l'état de différenciation des structures étudiées.

Tableau 2. Liste par fonction des gènes composant les microarrays

Category	Number of genes	Human Gene symbols
Expression in undifferentiated cells	6	NANOG,POU5F1,TDGF1,DNMT3B, GABRB3 and GDF3
Maintenance of pluripotency	3	NANOG, POU5F1 and SOX2
Correlation to stemness	33	BRIX,CD9,COMMD3,CRABP2,EBAF, FGF4,FGF5,FOXD3, GAL,GBX2,GRB7, IFITM1,IFITM2,IL6ST,IMP2,KIT,LEFTB, LIFR,LIN28,NODAL,NOG,NR5A2,NR6A1, PODXL,PTEN, REST,SEMA3A,SFRP2,TERT,TFCP2L1,UTF1,Xist and ZFP42
Differentiation markers	50	ACTC,AFP,CD34,CDH5,CDX2,CGB,COL1A1,COL2A1,DDX4, DES,EOMES,FLT1,FN1,FOXA2,GATA4,GATA6,GCG,GCM1, GFAP,HBB,HBZ,HLXB9,IAPP, INS,IPF1,ISL1,KRT1,LAMA1, LAMB1, LAMC1,MYF5,MYOD1,NES,NEUROD1, NPPA, OLIG2,PAX4,PAX6,PECAM1,PTF1A,RUNX2,SERPINA1, SOX17,SST,SYCP3,SYP,T,TAT,TH and WT1
Controls	6	ACTB,RAF1,CTNNB1,GAPD,EEF1A1,18S

VII.7.a. Classification génétique hiérarchique

La classification hiérarchique des gènes de pluripotence exprimés différemment dans les CPS, dans le stroma gastrique et dans les deux lignées ES CL01P32 et H9 p48 par rapport aux gènes exprimés dans la lignée ES H1 p52 est illustrée dans la Figure 35.

L'expression génétique dans les lignées ES CL01P32 et H9 p48 est très proche. Une différence d'expression génétique entre les CPS et le stroma est observée. Sur cette échelle de TLDA (TaqMan Low Density Array), le profil génétique des CPS semble positionné entre celui du stroma et celui des cellules ES. Les CPS semblent présenter un phénotype intermédiaire entre celui des cellules souches embryonnaires (lignées ES) et celui des cellules différenciées (stroma).

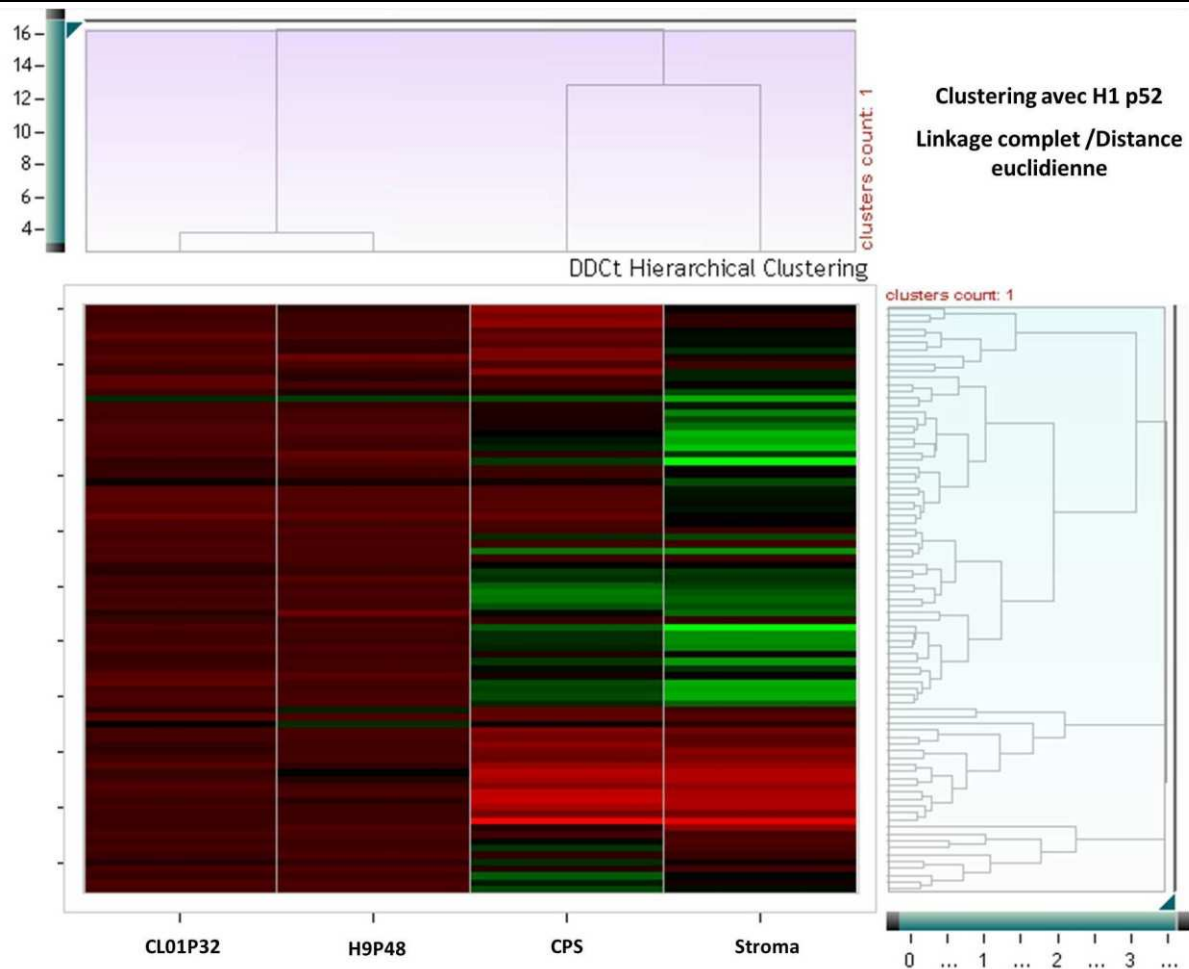


Figure 35. Classification hiérarchique des données d'analyse par microarrays des gènes de pluripotence dans les CPS et dans le stroma gastrique. Les échantillons ayant des motifs d'expression génétique similaires sont groupés ensemble comme l'indique le dendrogramme. La classification hiérarchique des gènes exprimés différemment dans le stroma gastrique et dans les CPS par rapport aux gènes exprimés dans la lignée ES H1 p52 est illustrée. La couleur rouge indique une surexpression et la couleur verte indique une sous-expression par rapport à la lignée de référence.

VII.7.b. Quantification relative de l'expression génétique

Gènes de pluripotence et d'indifférenciation

La quantification relative de l'expression des gènes de pluripotence dans les CPS et dans le stroma est réalisée en utilisant la lignée ES H1 p52 comme référence et par rapport au gène de ménage *ATCB*.

Parmi les gènes de maintien de pluripotence et ceux exprimés dans les cellules indifférenciées, nous observons que les CPS expriment l'ARNm de *OCT4* au même niveau que les cellules souches des lignées ES et avec une différence d'environ 30 fois plus par rapport au stroma (Figure 36). Une remarquable différence d'expression des gènes de pluripotence *SOX2* et *Nanog* est observée entre les CPS et le stroma qui expriment ces gènes plus faiblement (4 LOG de différence par rapport à la référence pour le stroma contre 1 LOG pour les CPS). Cette même observation est notée avec le gène d'indifférenciation *TDGF1*. La différence d'expression des gènes de pluripotence *OCT4*,

Nanog et *SOX2* dans les CPS par rapport aux lignées de référence est relativement faible. Ceci indique que ces cellules possèdent un caractère de pluripotence assez affirmé. Les CPS ne sont pas complètement indifférenciées (elles expriment plus faiblement les gènes d'indifférenciation *DNMT38*, *GABRB3* et *GDF3*) mais il semble quand même qu'elles aient gardé un certain caractère de pluripotence.

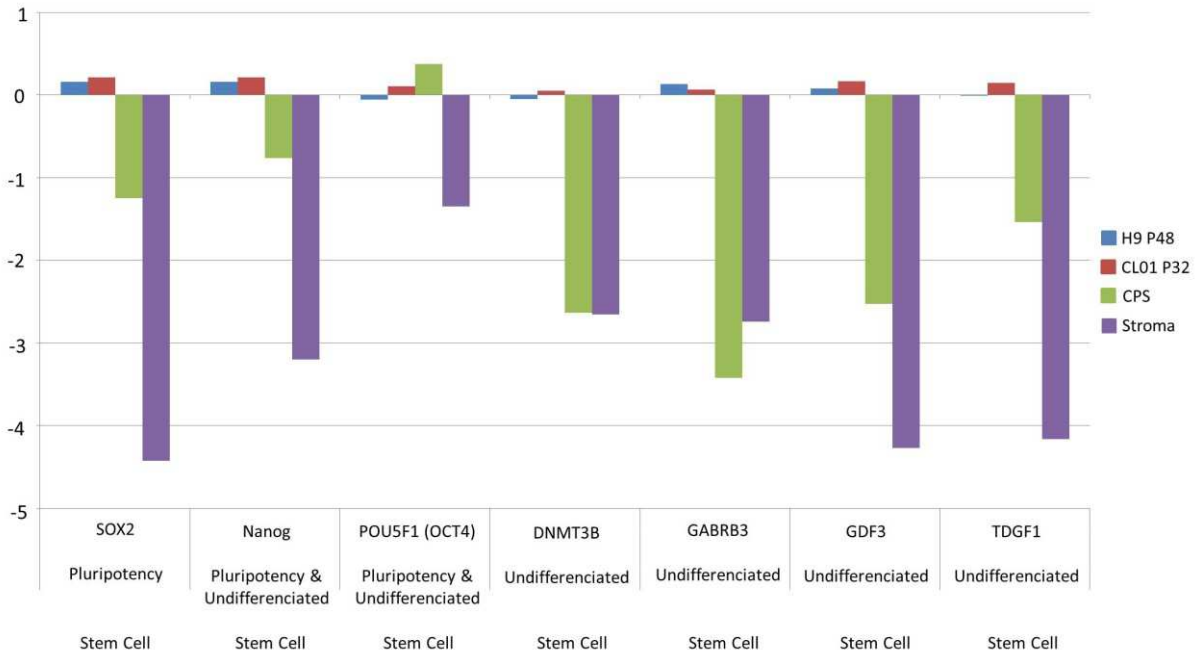


Figure 36. Expression relative (LOG) des gènes de pluripotence et d'indifférenciation dans les CPS, le stroma et les deux lignées ES H9P48 et CL01P32. La quantification relative des gènes est réalisée par rapport au gène de ménage *ATCB* en utilisant la lignée ES H1P52 comme référence.

Gènes corrélés au caractère souche (Correlation to stemness)

Concernant les gènes corrélés au caractère souche, nous remarquons que les CPS et le stroma se comportent différemment des lignées ES. Ce qui indique que les CPS ne possèdent pas les mêmes caractères souches des lignées ES (Figure 37). Une différence d'expression assez importante entre les CPS et le stroma est notée pour les gènes corrélés au caractère souche *FOXD3*, *LIFR*, *LIN28*, *NODAL*, *NR5A2*, *TERT*, *UTF1* (Figure 37). Ces gènes sont plus exprimés dans les CPS. Ceci indique que les CPS n'ont pas le caractère entièrement différencié du stroma.

Les CPS ne sont donc pas des cellules souches. Il ne s'agit pas non plus de cellules différenciées. Ces structure semblent posséder des caractères de pluripotence qui les rapproche des lignées ES testées. Nous n'avons pas interprété les données d'expression relative des gènes de différenciation ectodermique, endodermique, mésodermique et trophoblastique parce que les résultats obtenus sont préliminaires, n'ont pas été validé statistiquement et nécessitent des investigations plus poussées pour approfondir l'analyse.

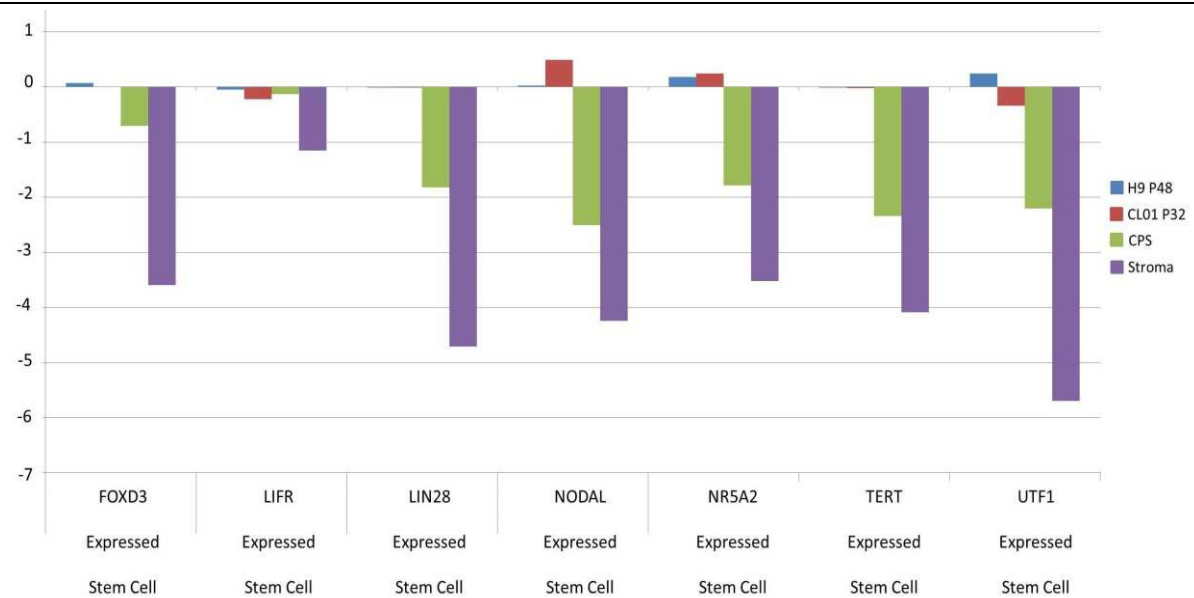


Figure 37. Expression relative (Log) des gènes corrélés au caractère souche dans les CPS, le stroma et les deux lignées ES H9P48 et CL01P32

La quantification relative des gènes est réalisée par rapport au gène de ménage ATCB en utilisant la lignée ES H1P52 comme référence

VII.8. Conclusion

L'épithélium gastrique (dérivé de l'endoderme) comprend des glandes gastriques composées de plusieurs types de cellules épithéliales (cellules endocrines, cellules pariétales, cellules principales, mucocytes). L'existence de cellules souches résidentes dans les glandes gastriques capables de générer tous les types cellulaires composant l'épithélium gastrique a été démontrée chez la souris (Bjerknes *et al.*, 2002). Il a été également montré récemment qu'il existe des sous-populations multiples de cellules souches gastriques impliquées dans l'auto-renouvellement. Ces sous-populations possèdent des caractéristiques différentes; elles peuvent avoir des cycles de division rapides ou être quiescentes (Qiao *et al.*, 2011).

En dehors des cellules épithéliales gastriques primaires, la méthode de culture que nous avons établie a permis l'isolement d'une population cellulaire ayant des propriétés assez particulières qui se rapprochent des propriétés des cellules souches. L'apparition des CPS sur le tapis de fibroblastes n'est pas fortuite puisque dans l'estomac, les cellules souches somatiques multipotentes sont entourées par les fibroblastes subépithéliaux auxquels elles adhèrent fermement (Powell *et al.*, 1999; Powell *et al.*, 2005; Andoh *et al.*, 2007) et ces fibroblastes sont la source de facteurs permettant la croissance, prolifération et différenciation des cellules souches (Wagner, 2007; Hoffmann, 2008). De plus, les CPS peuvent pousser sans ancrage, propriété qu'elles partagent avec les cellules tumorales (Chang *et al.*, 2001; Lin *et al.*, 2005). Elles présentent aussi une activité phosphatase alcaline qui est un marqueur des cellules souches indifférenciées.

L'expression des gènes *OCT4*, *Nanog* et *SOX2* plaide également en faveur d'un phénotype de pluripotence associé à ces cellules. *OCT4* (ou *POU5F1*) est un facteur de transcription découvert dans les années 90. C'est un marqueur de pluripotence présent

dans les cellules souches adultes, dans les lignées cellulaires ainsi que dans les cellules tumorales (Tai *et al.*, 2005; Zangrossi *et al.*, 2007). Néanmoins, son expression n'est pas suffisante pour conclure à un caractère pluripotent puisque sa présence a été également détectée dans des tissus différenciés (Zangrossi *et al.*, 2007). *Nanog* et *SOX2* sont des facteurs de transcription impliqués dans le maintien de la pluripotence des cellules souches embryonnaires. *SOX2* régule l'expression de *OCT4* dans les cellules souches pluripotentes induites (iPs, induced pluripotent stem cells) (Masui *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2008) et induit l'expression du pepsinogène A dans les cellules gastriques (Tani *et al.*, 2007). *Nanog* agit en synergie avec *OCT4* et *SOX2* et ces 3 facteurs sont indispensables pour l'établissement de l'identité des cellules souches embryonnaires (Chambers *et al.*, 2003; Mitsui *et al.*, 2003; Yates *et al.*, 2005).

L'analyse par microarrays de l'expression des gènes de pluripotence, d'indifférenciation et de caractère souche, révèle la présence d'un caractère de pluripotence assez affirmé dans les CPS. Néanmoins, ces cellules ne sont pas complètement indifférenciées. Elles semblent être dans un état de maturation intermédiaire entre les cellules souches et les cellules différenciées. Ces cellules pourraient possiblement correspondre à des cellules souches différenciées. Il s'agit probablement de progéniteurs engagés dans des voies de différenciation.

Des analyses complémentaires sont actuellement en cours au laboratoire afin de confirmer les résultats obtenus. La recherche des marqueurs de pluripotence au niveau protéique est envisagée. La recherche dans les CPS de l'expression des homologues humains des marqueurs spécifiques caractérisant les cellules souches gastriques murines (ou leurs progéniteurs) tels que LGR5, la villine et le DCLK1 (Giannakis *et al.*, 2006; Barker *et al.*, 2007; Qiao *et al.*, 2007) permettrait d'attribuer une nature plus précise à ces cellules. La capacité des CPS à former des corps embryoides (EB) est en cours d'analyse. Les corps embryoides sont des agrégats cellulaires tridimensionnels obtenus par la différenciation initiée des cellules souches embryonnaires (Itskovitz-Eldor *et al.*, 2000; Khoo *et al.*, 2005).

L'isolement, la caractérisation et la différenciation de cellules souches gastriques à partir d'estomac humain sain n'ont jamais été réalisées. Ces résultats constituent donc une première et quoique préliminaires, ils sont très prometteurs et offrent plusieurs pistes d'exploitation, notamment pour évaluer la capacité de différenciation des CPS mais aussi pour explorer l'hypothèse du cancer gastrique généré par les cellules souches décrit dans l'introduction de cet ouvrage (chapitre 2.)

Conclusion générale

L'étude *in vivo* sur un modèle d'infection par *H. pylori* chez la souris a permis de décrire un profil de la réponse antimicrobienne liée à cette bactérie. Une production accrue de S100A9 observée dans la muqueuse gastrique murine pourrait être impliquée dans l'échec d'implantation et de colonisation de *H. pylori*. En surmontant les contraintes liées au modèle animal d'infection par *H. pylori*, des études de la fonction et les mécanismes de régulation de S100A9 et du complexe S100A8/S100A9 dans la muqueuse gastrique au cours de l'infection par *H. pylori* sont nécessaires.

Mes travaux de thèse ont permis d'établir un protocole de culture primaire de cellules épithéliales gastriques humaines à partir de tissu gastrique sain. La mise au point d'un modèle d'infection par *H. pylori* a permis de dégager plusieurs aspects sur le comportement des cellules épithéliales primaires humaines vis-à-vis de cette bactérie. L'induction *cag*-dépendante d'un panel de chimiokines, cytokines et peptides antimicrobiens par les CEGHA suite à l'exposition à *H. pylori* confirme l'implication de ce facteur de virulence dans la mise en place de la réponse inflammatoire précoce. En revanche, l'infection par le mutant isogénique B128 Δ *cagM* qui a également induit une forte réponse inflammatoire, suggère que *cag* ne semble pas être indispensable au déclenchement de la réponse inflammatoire au cours de l'infection par *H. pylori*. Ce travail devra être complété par l'établissement des profils d'expression des TLRs par les CEGH ainsi que celui des médiateurs inflammatoires par plusieurs approches méthodologiques (FACS, Luminex) ce qui permettra également l'analyse de l'activation des voies de signalisation cellulaire au cours de l'inflammation. L'étude de la réponse inflammatoire liée à *H. pylori* devra être poursuivie en se focalisant sur d'autres facteurs de virulence de *H. pylori* tels que les adhésines, VacA, l'uréase ou la flagelline qui participent aussi activement à l'inflammation par le biais de diverses voies de signalisation. Le rôle du peptidoglycane, sa translocation dans la cellule épithéliale et l'induction de cascades inflammatoires pourraient également être investigués en utilisant des souches de *H. pylori* mutées pour les voies de synthèse du peptidoglycane. Il serait également pertinent d'étudier la capacité d'adhésion, de multiplication ainsi que de la survie de *H. pylori* dans des vésicules intracellulaire dans le modèle mis en place.

Une limite à ce modèle est que la réponse étudiée est celle des cellules épithéliales provenant de sujets atteints d'obésité morbide qui possède quelques origines génétiques. L'étude de la variabilité interindividuelle de la réponse inflammatoire serait possible en augmentant le nombre des effectifs inclus.

Les résultats concernant l'isolement et la caractérisation d'une population cellulaire gastrique ayant un phénotype de cellules souches sont très novateurs. Ces cellules, les CPS, partagent des propriétés communes avec les cellules souches telles que la croissance sans ancrage, l'activité phosphatase alcaline et l'expression de gènes de pluripotence. Ces résultats, quoique préliminaires, laissent penser qu'il pourrait possiblement s'agir de progéniteurs gastriques. Des analyses complémentaires sont actuellement en cours au laboratoire afin de confirmer ces résultats. Il serait également très intéressant ultérieurement d'évaluer et d'exploiter leur capacité de différenciation vers un phénotype épithélial.

Références Bibliographiques

- [1] Adewumi, O., B. Aflatoonian, *et al.* (2007). "Characterization of human embryonic stem cell lines by the International Stem Cell Initiative." *Nat Biotechnol* **25**(7): 803-816.
- [2] Akanuma, M., S. Maeda, *et al.* (2002). "The evaluation of putative virulence factors of *Helicobacter pylori* for gastroduodenal disease by use of a short-term Mongolian gerbil infection model." *J Infect Dis* **185**(3): 341-347.
- [3] Akhiani, A. A., J. Pappo, *et al.* (2002). "Protection against *Helicobacter pylori* infection following immunization is IL-12-dependent and mediated by Th1 cells." *J Immunol* **169**(12): 6977-6984.
- [4] Akhiani, A. A., K. Schon, *et al.* (2004). "Helicobacter pylori-specific antibodies impair the development of gastritis, facilitate bacterial colonization, and counteract resistance against infection." *J Immunol* **172**(8): 5024-5033.
- [5] Akhiani, A. A., A. Stensson, *et al.* (2005). "IgA antibodies impair resistance against *Helicobacter pylori* infection: studies on immune evasion in IL-10-deficient mice." *J Immunol* **174**(12): 8144-8153.
- [6] Akira, S., S. Uematsu, *et al.* (2006). "Pathogen recognition and innate immunity." *Cell* **124**(4): 783-801.
- [7] Akopyants, N. S., S. W. Clifton, *et al.* (1998). "Analyses of the *cag* pathogenicity island of *Helicobacter pylori*." *Mol Microbiol* **28**(1): 37-53.
- [8] Algood, H. M., J. Gallo-Romero, *et al.* (2007). "Host response to *Helicobacter pylori* infection before initiation of the adaptive immune response." *FEMS Immunol Med Microbiol* **51**(3): 577-586.
- [9] Algood, H. M. S., S. S. Allen, *et al.* (2009). "Regulation of Gastric B Cell Recruitment Is Dependent on IL-17 Receptor A Signaling in a Model of Chronic Bacterial Infection." *The Journal of Immunology* **183**(9): 5837-5846.
- [10] Alison, M. R., M. Brittan, *et al.* (2006). "Markers of adult tissue-based stem cells." *Handb Exp Pharmacol*(174): 185-227.
- [11] Allavena, P., C. Garlanda, *et al.* (2008). "Pathways connecting inflammation and cancer." *Curr Opin Genet Dev* **18**(1): 3-10.
- [12] Allen, A. and G. Flemstrom (2005). "Gastroduodenal mucus bicarbonate barrier: protection against acid and pepsin." *Am J Physiol Cell Physiol* **288**(1): C1-19.
- [13] Allen, L. A., L. S. Schlesinger, *et al.* (2000). "Virulent strains of *Helicobacter pylori* demonstrate delayed phagocytosis and stimulate homotypic phagosome fusion in macrophages." *J Exp Med* **191**(1): 115-128.
- [14] Allison, C. C., T. A. Kufer, *et al.* (2009). "Helicobacter pylori induces MAPK phosphorylation and AP-1 activation via a NOD1-dependent mechanism." *J Immunol* **183**(12): 8099-8109.

- [15] Amedei, A., A. Cappon, *et al.* (2006). "The neutrophil-activating protein of *Helicobacter pylori* promotes Th1 immune responses." *J Clin Invest* **116**(4): 1092-1101.
- [16] Amieva, M. R., N. R. Salama, *et al.* (2002). "Helicobacter pylori enter and survive within multivesicular vacuoles of epithelial cells." *Cell Microbiol* **4**(10): 677-690.
- [17] Amieva, M. R., R. Vogelmann, *et al.* (2003). "Disruption of the epithelial apical-junctional complex by *Helicobacter pylori* CagA." *Science* **300**(5624): 1430-1434.
- [18] Andersen-Nissen, E., K. D. Smith, *et al.* (2005). "Evasion of Toll-like receptor 5 by flagellated bacteria." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(26): 9247-9252.
- [19] Ando, T., K. Kusugami, *et al.* (1998). "Differential normalization of mucosal interleukin-8 and interleukin-6 activity after *Helicobacter pylori* eradication." *Infect Immun* **66**(10): 4742-4747.
- [20] Andoh, A., S. Bamba, *et al.* (2007). "Role of intestinal subepithelial myofibroblasts in inflammation and regenerative response in the gut." *Pharmacol Ther* **114**(1): 94-106.
- [21] Appelmek, B. J., I. van Die, *et al.* (2003). "Cutting edge: carbohydrate profiling identifies new pathogens that interact with dendritic cell-specific ICAM-3-grabbing nonintegrin on dendritic cells." *J Immunol* **170**(4): 1635-1639.
- [22] Argent, R. H., R. J. Thomas, *et al.* (2008). "Functional association between the *Helicobacter pylori* virulence factors VacA and CagA." *J Med Microbiol* **57**(Pt 2): 145-150.
- [23] Aromaa, A., T. U. Kosunen, *et al.* (1996). "Circulating anti-*Helicobacter pylori* immunoglobulin A antibodies and low serum pepsinogen I level are associated with increased risk of gastric cancer." *Am J Epidemiol* **144**(2): 142-149.
- [24] Asahi, M., T. Azuma, *et al.* (2000). "Helicobacter pylori CagA protein can be tyrosine phosphorylated in gastric epithelial cells." *J Exp Med* **191**(4): 593-602.
- [25] Atherton, J. C. (2006). "The pathogenesis of *Helicobacter pylori*-induced gastroduodenal diseases." *Annu Rev Pathol* **1**: 63-96.
- [26] Atherton, J. C., P. Cao, *et al.* (1995). "Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. Association of specific vacA types with cytotoxin production and peptic ulceration." *J Biol Chem* **270**(30): 17771-17777.
- [27] Atherton, J. C., R. M. Peek, Jr., *et al.* (1997). "Clinical and pathological importance of heterogeneity in vacA, the vacuolating cytotoxin gene of *Helicobacter pylori*." *Gastroenterology* **112**(1): 92-99.
- [28] Audibert, C., C. Burucoa, *et al.* (2001). "implication of the structure of the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island in induction of interleukin-8 secretion." *Infect Immun* **69**(3): 1625-1629.
- [29] Ayraud, S., B. Janvier, *et al.* (2002). "Experimental colonization of mice by fresh clinical isolates of *Helicobacter pylori* is not influenced by the cagA status and the vacA genotype." *FEMS Immunol Med Microbiol* **34**(3): 169-172.
- [30] Backert, S. and M. Naumann (2010). "What a disorder: proinflammatory signaling pathways induced by *Helicobacter pylori*." *Trends Microbiol* **18**(11): 479-486.

- [31] Backhed, F., B. Rokbi, *et al.* (2003). "Gastric mucosal recognition of *Helicobacter pylori* is independent of Toll-like receptor 4." *J Infect Dis* **187**(5): 829-836.
- [32] Baggiolini, M., A. Walz, *et al.* (1989). "Neutrophil-activating peptide-1/interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils." *J Clin Invest* **84**(4): 1045-1049.
- [33] Bagnoli, F., L. Buti, *et al.* (2005). "*Helicobacter pylori* CagA induces a transition from polarized to invasive phenotypes in MDCK cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(45): 16339-16344.
- [34] Baik, S. C., H. S. Youn, *et al.* (1996). "Increased oxidative DNA damage in *Helicobacter pylori*-infected human gastric mucosa." *Cancer Res* **56**(6): 1279-1282.
- [35] Bajaj-Elliott, M., P. Fedeli, *et al.* (2002). "Modulation of host antimicrobial peptide (beta-defensins 1 and 2) expression during gastritis." *Gut* **51**(3): 356-361.
- [36] Bamford, K. B., X. Fan, *et al.* (1998). "Lymphocytes in the human gastric mucosa during *Helicobacter pylori* have a T helper cell 1 phenotype." *Gastroenterology* **114**(3): 482-492.
- [37] Banchereau, J., F. Briere, *et al.* (2000). "Immunobiology of dendritic cells." *Annu Rev Immunol* **18**: 767-811.
- [38] Barker, N., M. Huch, *et al.* (2010). "Lgr5(+ve) stem cells drive self-renewal in the stomach and build long-lived gastric units in vitro." *Cell Stem Cell* **6**(1): 25-36.
- [39] Barker, N., J. H. van Es, *et al.* (2007). "Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5." *Nature* **449**(7165): 1003-1007.
- [40] Bartman, A. E., M. P. Buisine, *et al.* (1998). "The MUC6 secretory mucin gene is expressed in a wide variety of epithelial tissues." *J Pathol* **186**(4): 398-405.
- [41] Basque, J. R., P. Chailier, *et al.* (1999). "A new primary culture system representative of the human gastric epithelium." *Exp Cell Res* **253**(2): 493-502.
- [42] Basque, J. R. and D. Menard (2000). "Establishment of culture systems of human gastric epithelium for the study of pepsinogen and gastric lipase synthesis and secretion." *Microsc Res Tech* **48**(5): 293-302.
- [43] Basso, D., C. F. Zambon, *et al.* (2008). "Clinical relevance of *Helicobacter pylori* cagA and vacA gene polymorphisms." *Gastroenterology* **135**(1): 91-99.
- [44] Bazzoni, F. and B. Beutler (1996). "The tumor necrosis factor ligand and receptor families." *N Engl J Med* **334**(26): 1717-1725.
- [45] Beswick, E. J., I. V. Pinchuk, *et al.* (2006). "The *Helicobacter pylori* urease B subunit binds to CD74 on gastric epithelial cells and induces NF-kappaB activation and interleukin-8 production." *Infect Immun* **74**(2): 1148-1155.
- [46] Bjerknes, M. and H. Cheng (2002). "Multipotential stem cells in adult mouse gastric epithelium." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **283**(3): G767-777.
- [47] Blanpain, C., V. Horsley, *et al.* (2007). "Epithelial stem cells: turning over new leaves." *Cell* **128**(3): 445-458.
- [48] Blasius, A. L. and B. Beutler (2010). "Intracellular toll-like receptors." *Immunity* **32**(3): 305-315.

- [49] Bliss, C. M., Jr., D. T. Golenbock, *et al.* (1998). "Helicobacter pylori lipopolysaccharide binds to CD14 and stimulates release of interleukin-8, epithelial neutrophil-activating peptide 78, and monocyte chemotactic protein 1 by human monocytes." *Infect Immun* **66**(11): 5357-5363.
- [50] Boncristiano, M., S. R. Paccani, *et al.* (2003). "The Helicobacter pylori vacuolating toxin inhibits T cell activation by two independent mechanisms." *J Exp Med* **198**(12): 1887-1897.
- [51] Boneca, I. G. (2005). "The role of peptidoglycan in pathogenesis." *Curr Opin Microbiol* **8**(1): 46-53.
- [52] Boren, T., P. Falk, *et al.* (1993). "Attachment of Helicobacter pylori to human gastric epithelium mediated by blood group antigens." *Science* **262**(5141): 1892-1895.
- [53] Boughan, P. K., R. H. Argent, *et al.* (2006). "Nucleotide-binding oligomerization domain-1 and epidermal growth factor receptor: critical regulators of beta-defensins during Helicobacter pylori infection." *J Biol Chem* **281**(17): 11637-11648.
- [54] Brandt, S., T. Kwok, *et al.* (2005). "NF-kappaB activation and potentiation of proinflammatory responses by the Helicobacter pylori CagA protein." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(26): 9300-9305.
- [55] Brandtzaeg, P., T. O. Gabrielsen, *et al.* (1995). "The leucocyte protein L1 (calprotectin): a putative nonspecific defence factor at epithelial surfaces." *Adv Exp Med Biol* **371A**: 201-206.
- [56] Buchan, A. M., S. B. Curtis, *et al.* (1990). "Release of somatostatin immunoreactivity from human antral D cells in culture." *Gastroenterology* **99**(3): 690-696.
- [57] Busler, V. J., V. J. Torres, *et al.* (2006). "Protein-protein interactions among Helicobacter pylori cag proteins." *J Bacteriol* **188**(13): 4787-4800.
- [58] Bussiere, F. I., R. Chaturvedi, *et al.* (2006). "Low multiplicity of infection of Helicobacter pylori suppresses apoptosis of B lymphocytes." *Cancer Res* **66**(13): 6834-6842.
- [59] Bussiere, F. I., R. Chaturvedi, *et al.* (2005). "Spermine causes loss of innate immune response to Helicobacter pylori by inhibition of inducible nitric-oxide synthase translation." *J Biol Chem* **280**(4): 2409-2412.
- [60] Cai, X., J. Carlson, *et al.* (2005). "Helicobacter felis eradication restores normal architecture and inhibits gastric cancer progression in C57BL/6 mice." *Gastroenterology* **128**(7): 1937-1952.
- [61] Campos, R. V., A. M. Buchan, *et al.* (1990). "Gastrin secretion from human antral G cells in culture." *Gastroenterology* **99**(1): 36-44.
- [62] Cnaan, S., A. Roussel, *et al.* (1999). "Gastric lipase: crystal structure and activity." *Biochim Biophys Acta* **1441**(2-3): 197-204.
- [63] Capelle, L. G., A. C. de Vries, *et al.* (2008). "Gastric MALT lymphoma: epidemiology and high adenocarcinoma risk in a nation-wide study." *Eur J Cancer* **44**(16): 2470-2476.
- [64] Caruso, R., D. Fina, *et al.* (2008). "IL-23-mediated regulation of IL-17 production in Helicobacter pylori-infected gastric mucosa." *European Journal of Immunology* **38**(2): 470-478.

- [65] Caruso, R., F. Pallone, *et al.* (2007). "Emerging role of IL-23/IL-17 axis in H pylori-associated pathology." *World J Gastroenterol* **13**(42): 5547-5551.
- [66] Cendron, L. and G. Zanotti (2011). "Structural and functional aspects of unique type IV secretory components in the *Helicobacter pylori* cag-pathogenicity island." *FEBS J* **278**(8): 1223-1231.
- [67] Censini, S., C. Lange, *et al.* (1996). "cag, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(25): 14648-14653.
- [68] Chamailard, M., M. Hashimoto, *et al.* (2003). "An essential role for NOD1 in host recognition of bacterial peptidoglycan containing diaminopimelic acid." *Nat Immunol* **4**(7): 702-707.
- [69] Chambers, I., D. Colby, *et al.* (2003). "Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells." *Cell* **113**(5): 643-655.
- [70] Chang, C. C., W. Sun, *et al.* (2001). "A human breast epithelial cell type with stem cell characteristics as target cells for carcinogenesis." *Radiat Res* **155**(1 Pt 2): 201-207.
- [71] Chang, C. C., J. E. Trosko, *et al.* (1987). "Contact insensitivity of a subpopulation of normal human fetal kidney epithelial cells and of human carcinoma cell lines." *Cancer Res* **47**(6): 1634-1645.
- [72] Chang, Y. J., M. S. Wu, *et al.* (2004). "Induction of cyclooxygenase-2 overexpression in human gastric epithelial cells by *Helicobacter pylori* involves TLR2/TLR9 and c-Src-dependent nuclear factor-kappaB activation." *Mol Pharmacol* **66**(6): 1465-1477.
- [73] Chaturvedi, R., M. Asim, *et al.* (2007). "L-arginine availability regulates inducible nitric oxide synthase-dependent host defense against *Helicobacter pylori*." *Infect Immun* **75**(9): 4305-4315.
- [74] Chaturvedi, R., Y. Cheng, *et al.* (2004). "Induction of polyamine oxidase 1 by *Helicobacter pylori* causes macrophage apoptosis by hydrogen peroxide release and mitochondrial membrane depolarization." *J Biol Chem* **279**(38): 40161-40173.
- [75] Christie, P. J. and J. P. Vogel (2000). "Bacterial type IV secretion: conjugation systems adapted to deliver effector molecules to host cells." *Trends Microbiol* **8**(8): 354-360.
- [76] Chu, Y. T., Y. H. Wang, *et al.* (2010). "Invasion and multiplication of *Helicobacter pylori* in gastric epithelial cells and implications for antibiotic resistance." *Infect Immun* **78**(10): 4157-4165.
- [77] Clyne, M. and B. Drumm (1993). "Adherence of *Helicobacter pylori* to primary human gastrointestinal cells." *Infect Immun* **61**(10): 4051-4057.
- [78] Conlin, V. S., S. B. Curtis, *et al.* (2004). "*Helicobacter pylori* infection targets adherens junction regulatory proteins and results in increased rates of migration in human gastric epithelial cells." *Infect Immun* **72**(9): 5181-5192.
- [79] Corbett, M. S., I. Schmitt, *et al.* (1994). "Characterization of the gene for human neutrophil-activating peptide 78 (ENA-78)." *Biochem Biophys Res Commun* **205**(1): 612-617.
- [80] Correa, P. (1996). "*Helicobacter pylori* and gastric cancer: state of the art." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **5**(6): 477-481.

- [81] Correa, P. and J. Houghton (2007). "Carcinogenesis of *Helicobacter pylori*." *Gastroenterology* **133**(2): 659-672.
- [82] Covacci, A., S. Censini, *et al.* (1993). "Molecular characterization of the 128-kDa immunodominant antigen of *Helicobacter pylori* associated with cytotoxicity and duodenal ulcer." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(12): 5791-5795.
- [83] Covacci, A. and R. Rappuoli (2000). "Tyrosine-phosphorylated bacterial proteins: Trojan horses for the host cell." *J Exp Med* **191**(4): 587-592.
- [84] Covacci, A., J. L. Telford, *et al.* (1999). "*Helicobacter pylori* virulence and genetic geography." *Science* **284**(5418): 1328-1333.
- [85] Cover, T. L. and S. R. Blanke (2005). "*Helicobacter pylori* VacA, a paradigm for toxin multifunctionality." *Nat Rev Microbiol* **3**(4): 320-332.
- [86] Cover, T. L. and M. J. Blaser (1992). "Purification and characterization of the vacuolating toxin from *Helicobacter pylori*." *J Biol Chem* **267**(15): 10570-10575.
- [87] Cover, T. L., U. S. Krishna, *et al.* (2003). "Induction of gastric epithelial cell apoptosis by *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin." *Cancer Res* **63**(5): 951-957.
- [88] Crabtree, J. E. (1996). "Gastric mucosal inflammatory responses to *Helicobacter pylori*." *Aliment Pharmacol Ther* **10 Suppl 1**: 29-37.
- [89] Crabtree, J. E., A. Covacci, *et al.* (1995). "*Helicobacter pylori* induced interleukin-8 expression in gastric epithelial cells is associated with CagA positive phenotype." *J Clin Pathol* **48**(1): 41-45.
- [90] a. Crabtree, J. E., S. M. Farmery, *et al.* (1994). "CagA/cytotoxic strains of *Helicobacter pylori* and interleukin-8 in gastric epithelial cell lines." *J Clin Pathol* **47**(10): 945-950.
- [91] Crabtree, J. E., D. Kersulyte, *et al.* (1999). "Modulation of *Helicobacter pylori* induced interleukin-8 synthesis in gastric epithelial cells mediated by cag PAI encoded VirD4 homologue." *J Clin Pathol* **52**(9): 653-657.
- [92] b. Crabtree, J. E. and I. J. Lindley (1994). "Mucosal interleukin-8 and *Helicobacter pylori*-associated gastroduodenal disease." *Eur J Gastroenterol Hepatol* **6 Suppl 1**: S33-38.
- [93] Crabtree, J. E., T. M. Shallcross, *et al.* (1991). "Mucosal tumour necrosis factor alpha and interleukin-6 in patients with *Helicobacter pylori* associated gastritis." *Gut* **32**(12): 1473-1477.
- [94] c. Crabtree, J. E., J. I. Wyatt, *et al.* (1994). "Interleukin-8 expression in *Helicobacter pylori* infected, normal, and neoplastic gastroduodenal mucosa." *J Clin Pathol* **47**(1): 61-66.
- [95] Crawford, H. C., U. S. Krishna, *et al.* (2003). "*Helicobacter pylori* strain-selective induction of matrix metalloproteinase-7 in vitro and within gastric mucosa." *Gastroenterology* **125**(4): 1125-1136.
- [96] D'Elia, M. M., M. Manghetti, *et al.* (1997). "T helper 1 effector cells specific for *Helicobacter pylori* in the gastric antrum of patients with peptic ulcer disease." *J Immunol* **158**(2): 962-967.

- [97] Das, S., G. Suarez, *et al.* (2006). "Expression of B7-H1 on gastric epithelial cells: its potential role in regulating T cells during *Helicobacter pylori* infection." *J Immunol* **176**(5): 3000-3009.
- [98] De Vos, J., S. Assou, *et al.* (2009). "[Human embryonic stem cells: from the human embryo transgressed to the regenerative medicine of tomorrow]." *Gynecol Obstet Fertil* **37**(7-8): 620-626.
- [99] DeLyria, E. S., R. W. Redline, *et al.* (2009). "Vaccination of mice against *H pylori* induces a strong Th-17 response and immunity that is neutrophil dependent." *Gastroenterology* **136**(1): 247-256.
- [100] Dieu, M. C., B. Vanbervliet, *et al.* (1998). "Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites." *J Exp Med* **188**(2): 373-386.
- [101] Dinarello, C. A. (2009). "Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family." *Annu Rev Immunol* **27**: 519-550.
- [102] Ding, S. Z., Y. Minohara, *et al.* (2007). "*Helicobacter pylori* infection induces oxidative stress and programmed cell death in human gastric epithelial cells." *Infect Immun* **75**(8): 4030-4039.
- [103] Ding, S. Z., A. M. Torok, *et al.* (2005). "Toll-like receptor 2-mediated gene expression in epithelial cells during *Helicobacter pylori* infection." *Helicobacter* **10**(3): 193-204.
- [104] Dokter, W. H., A. J. Dijkstra, *et al.* (1994). "G(Anh)MTetra, a natural bacterial cell wall breakdown product, induces interleukin-1 beta and interleukin-6 expression in human monocytes. A study of the molecular mechanisms involved in inflammatory cytokine expression." *J Biol Chem* **269**(6): 4201-4206.
- [105] Dossumentkova, A., C. Prinz, *et al.* (2006). "*Helicobacter pylori* outer membrane proteins and gastric inflammation." *Gut* **55**(9): 1360-1361; author reply 1361.
- [106] Dunn, B. M. (2001). "Overview of pepsin-like aspartic peptidases." *Curr Protoc Protein Sci* **Chapter 21**: Unit 21 23.
- [107] Dunn, P. E., W. Dai, *et al.* (1985). "Soluble peptidoglycan fragments stimulate antibacterial protein synthesis by fat body from larvae of *Manduca sexta*." *Dev Comp Immunol* **9**(3): 559-568.
- [108] a. Eaton, K. A., D. Kersulyte, *et al.* (2001). "Role of *Helicobacter pylori* cag region genes in colonization and gastritis in two animal models." *Infect Immun* **69**(5): 2902-2908.
- [109] b. Eaton, K. A., M. Mefford, *et al.* (2001). "The role of T cell subsets and cytokines in the pathogenesis of *Helicobacter pylori* gastritis in mice." *J Immunol* **166**(12): 7456-7461.
- [110] c. Eaton, K. A. and M. E. Mefford (2001). "Cure of *Helicobacter pylori* infection and resolution of gastritis by adoptive transfer of splenocytes in mice." *Infect Immun* **69**(2): 1025-1031.
- [111] Eaton, K. A., S. Suerbaum, *et al.* (1996). "Colonization of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori* deficient in two flagellin genes." *Infect Immun* **64**(7): 2445-2448.

- [112] Eck, M., B. Schmausser, *et al.* (2000). "CXC chemokines Gro(alpha)/IL-8 and IP-10/MIG in *Helicobacter pylori* gastritis." *Clin Exp Immunol* **122**(2): 192-199.
- [113] Eidt, S., M. Stolte, *et al.* (1994). "*Helicobacter pylori* gastritis and primary gastric non-Hodgkin's lymphomas." *J Clin Pathol* **47**(5): 436-439.
- [114] El-Omar, E. M., M. Carrington, *et al.* (2000). "Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer." *Nature* **404**(6776): 398-402.
- [115] El-Omar, E. M., K. Oien, *et al.* (1997). "*Helicobacter pylori* infection and chronic gastric acid hyposecretion." *Gastroenterology* **113**(1): 15-24.
- [116] el-Omar, E. M., I. D. Penman, *et al.* (1995). "*Helicobacter pylori* infection and abnormalities of acid secretion in patients with duodenal ulcer disease." *Gastroenterology* **109**(3): 681-691.
- [117] El-Omar, E. M., C. S. Rabkin, *et al.* (2003). "Increased risk of noncardia gastric cancer associated with proinflammatory cytokine gene polymorphisms." *Gastroenterology* **124**(5): 1193-1201.
- [118] Enroth, H., K. Wreiber, *et al.* (1999). "In vitro aging of *Helicobacter pylori*: changes in morphology, intracellular composition and surface properties." *Helicobacter* **4**(1): 7-16.
- [119] Ermak, T. H., P. J. Giannasca, *et al.* (1998). "Immunization of mice with urease vaccine affords protection against *Helicobacter pylori* infection in the absence of antibodies and is mediated by MHC class II-restricted responses." *J Exp Med* **188**(12): 2277-2288.
- [120] Fan, X. G., A. Chua, *et al.* (1995). "Increased gastric production of interleukin-8 and tumour necrosis factor in patients with *Helicobacter pylori* infection." *J Clin Pathol* **48**(2): 133-136.
- [121] Fan, X. J., A. Chua, *et al.* (1993). "Interferon-gamma and tumour necrosis factor production in patients with *Helicobacter pylori* infection." *Ir J Med Sci* **162**(10): 408-411.
- [122] Fan, X. J., A. Chua, *et al.* (1994). "Gastric T lymphocyte responses to *Helicobacter pylori* in patients with H pylori colonisation." *Gut* **35**(10): 1379-1384.
- [123] Farinati, F., R. Cardin, *et al.* (1998). "Oxidative DNA damage accumulation in gastric carcinogenesis." *Gut* **42**(3): 351-356.
- [124] Farrar, J. D., H. Asnagli, *et al.* (2002). "T helper subset development: roles of instruction, selection, and transcription." *J Clin Invest* **109**(4): 431-435.
- [125] Fedwick, J. P., T. K. Lapointe, *et al.* (2005). "*Helicobacter pylori* activates myosin light-chain kinase to disrupt claudin-4 and claudin-5 and increase epithelial permeability." *Infect Immun* **73**(12): 7844-7852.
- [126] Ferlay, J., D. M. Parkin, *et al.* (2010). "Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008." *Eur J Cancer* **46**(4): 765-781.
- [127] Fischer, W. (2011). "Assembly and molecular mode of action of the *Helicobacter pylori* Cag type IV secretion apparatus." *FEBS J* **278**(8): 1203-1212.

- [128] Fischer, W., J. Puls, *et al.* (2001). "Systematic mutagenesis of the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island: essential genes for CagA translocation in host cells and induction of interleukin-8." *Mol Microbiol* **42**(5): 1337-1348.
- [129] Ford, A. C., B. C. Delaney, *et al.* (2004). "Eradication therapy in *Helicobacter pylori* positive peptic ulcer disease: systematic review and economic analysis." *Am J Gastroenterol* **99**(9): 1833-1855.
- [130] Forman, D., D. G. Newell, *et al.* (1991). "Association between infection with *Helicobacter pylori* and risk of gastric cancer: evidence from a prospective investigation." *Bmj* **302**(6788): 1302-1305.
- [131] Forte, J. G. and X. Yao (1996). "The membrane-recruitment-and-recycling hypothesis of gastric HCl secretion." *Trends Cell Biol* **6**(2): 45-48.
- [132] Fox, J. G., B. J. Sheppard, *et al.* (2002). "Germ-line p53-targeted disruption inhibits *Helicobacter*-induced premalignant lesions and invasive gastric carcinoma through down-regulation of Th1 proinflammatory responses." *Cancer Res* **62**(3): 696-702.
- [133] Fox, J. G. and T. C. Wang (2007). "Inflammation, atrophy, and gastric cancer." *J Clin Invest* **117**(1): 60-69.
- [134] Franco, A. T., D. A. Israel, *et al.* (2005). "Activation of beta-catenin by carcinogenic *Helicobacter pylori*." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(30): 10646-10651.
- [135] Franco, A. T., E. Johnston, *et al.* (2008). "Regulation of gastric carcinogenesis by *Helicobacter pylori* virulence factors." *Cancer Res* **68**(2): 379-387.
- [136] Fritz, J. H., L. Le Bourhis, *et al.* (2007). "Nod1-mediated innate immune recognition of peptidoglycan contributes to the onset of adaptive immunity." *Immunity* **26**(4): 445-459.
- [137] Fronzes, R., P. J. Christie, *et al.* (2009). "The structural biology of type IV secretion systems." *Nat Rev Microbiol* **7**(10): 703-714.
- [138] Fu, S., K. S. Ramanujam, *et al.* (1999). "Increased expression and cellular localization of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase 2 in *Helicobacter pylori* gastritis." *Gastroenterology* **116**(6): 1319-1329.
- [139] Fuchs, E., T. Tumbar, *et al.* (2004). "Socializing with the neighbors: stem cells and their niche." *Cell* **116**(6): 769-778.
- [140] Fukazawa, A., C. Alonso, *et al.* (2008). "GEF-H1 mediated control of NOD1 dependent NF-kappaB activation by *Shigella* effectors." *PLoS Pathog* **4**(11): e1000228.
- [141] Fukuda, M., M. Kawakubo, *et al.* (2006). "Assay of human gastric mucin as a natural antibiotic against *Helicobacter pylori*." *Methods Enzymol* **415**: 164-179.
- [142] Furukawa, K., T. Takahashi, *et al.* (1998). "Enhanced mucosal expression of interleukin-6 mRNA but not of interleukin-8 mRNA at the margin of gastric ulcer in *Helicobacter pylori*-positive gastritis." *J Gastroenterol* **33**(5): 625-633.
- [143] Galmiche, A., J. Rassow, *et al.* (2000). "The N-terminal 34 kDa fragment of *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin targets mitochondria and induces cytochrome c release." *EMBO J* **19**(23): 6361-6370.

- [144] Gamboa-Dominguez, A., T. Ubbelohde, *et al.* (2007). "Salt and stress synergize *H. pylori*-induced gastric lesions, cell proliferation, and p21 expression in Mongolian gerbils." *Dig Dis Sci* **52**(6): 1517-1526.
- [145] Gancz, H., K. R. Jones, *et al.* (2008). "Sodium chloride affects *Helicobacter pylori* growth and gene expression." *J Bacteriol* **190**(11): 4100-4105.
- [146] Ganz, T. (1999). "Defensins and host defense." *Science* **286**(5439): 420-421.
- [147] Garcia, J. R., F. Jaumann, *et al.* (2001). "Identification of a novel, multifunctional beta-defensin (human beta-defensin 3) with specific antimicrobial activity. Its interaction with plasma membranes of *Xenopus* oocytes and the induction of macrophage chemoattraction." *Cell Tissue Res* **306**(2): 257-264.
- [148] Gebert, B., W. Fischer, *et al.* (2003). "*Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin inhibits T lymphocyte activation." *Science* **301**(5636): 1099-1102.
- [149] Gendler, S. J., C. A. Lancaster, *et al.* (1990). "Molecular cloning and expression of human tumor-associated polymorphic epithelial mucin." *J Biol Chem* **265**(25): 15286-15293.
- [150] George, J. T., P. K. Boughan, *et al.* (2003). "Host anti-microbial response to *Helicobacter pylori* infection." *Mol Immunol* **40**(7): 451-456.
- [151] Gerhard, M., N. Lehn, *et al.* (1999). "Clinical relevance of the *Helicobacter pylori* gene for blood-group antigen-binding adhesin." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(22): 12778-12783.
- [152] Gerhard, M., C. Schmees, *et al.* (2005). "A secreted low-molecular-weight protein from *Helicobacter pylori* induces cell-cycle arrest of T cells." *Gastroenterology* **128**(5): 1327-1339.
- [153] Gewirtz, A. T., Y. Yu, *et al.* (2004). "*Helicobacter pylori* flagellin evades toll-like receptor 5-mediated innate immunity." *J Infect Dis* **189**(10): 1914-1920.
- [154] Giannakis, M., S. L. Chen, *et al.* (2008). "*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* **105**(11): 4358-4363.
- [155] Giannakis, M., T. S. Stappenbeck, *et al.* (2006). "Molecular properties of adult mouse gastric and intestinal epithelial progenitors in their niches." *J Biol Chem* **281**(16): 11292-11300.
- [156] Gionchetti, P., D. Vaira, *et al.* (1994). "Enhanced mucosal interleukin-6 and -8 in *Helicobacter pylori*-positive dyspeptic patients." *Am J Gastroenterol* **89**(6): 883-887.
- [157] Girardin, S. E., I. G. Boneca, *et al.* (2003). "Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection." *J Biol Chem* **278**(11): 8869-8872.
- [158] Glaser, R., J. Harder, *et al.* (2005). "Antimicrobial psoriasin (S100A7) protects human skin from *Escherichia coli* infection." *Nat Immunol* **6**(1): 57-64.
- [159] Gobert, A. P., J. C. Bambou, *et al.* (2004). "*Helicobacter pylori* heat shock protein 60 mediates interleukin-6 production by macrophages via a toll-like receptor (TLR)-2-, TLR-4-, and myeloid differentiation factor 88-independent mechanism." *J Biol Chem* **279**(1): 245-250.

- [160] Gobert, A. P., D. J. McGee, *et al.* (2001). "Helicobacter pylori arginase inhibits nitric oxide production by eukaryotic cells: a strategy for bacterial survival." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(24): 13844-13849.
- [161] Gobert, A. P., B. D. Mersey, *et al.* (2002). "Cutting edge: urease release by Helicobacter pylori stimulates macrophage inducible nitric oxide synthase." *J Immunol* **168**(12): 6002-6006.
- [162] Gold, M. R., C. L. Miller, *et al.* (1985). "Soluble non-cross-linked peptidoglycan polymers stimulate monocyte-macrophage inflammatory functions." *Infect Immun* **49**(3): 731-741.
- [163] Gordon, J. I. and M. L. Hermiston (1994). "Differentiation and self-renewal in the mouse gastrointestinal epithelium." *Curr Opin Cell Biol* **6**(6): 795-803.
- [164] Gott, P., S. Beck, *et al.* (1996). "Human trefoil peptides: genomic structure in 21q22.3 and coordinated expression." *Eur J Hum Genet* **4**(6): 308-315.
- [165] Graham, D. Y., A. R. Opekun, *et al.* (2004). "Challenge model for Helicobacter pylori infection in human volunteers." *Gut* **53**(9): 1235-1243.
- [166] Grubman, A., M. Kaparakis, *et al.* (2010). "The innate immune molecule, NOD1, regulates direct killing of Helicobacter pylori by antimicrobial peptides." *Cell Microbiol* **12**(5): 626-639.
- [167] Guiney, D. G., P. Hasegawa, *et al.* (2003). "Helicobacter pylori preferentially induces interleukin 12 (IL-12) rather than IL-6 or IL-10 in human dendritic cells." *Infect Immun* **71**(7): 4163-4166.
- [168] Gupta, R. A. and R. N. Dubois (2001). "Colorectal cancer prevention and treatment by inhibition of cyclooxygenase-2." *Nat Rev Cancer* **1**(1): 11-21.
- [169] Guyonnet Duperat, V., J. P. Audie, *et al.* (1995). "Characterization of the human mucin gene MUC5AC: a consensus cysteine-rich domain for 11p15 mucin genes?" *Biochem J* **305 (Pt 1)**: 211-219.
- [170] Haeberle, H. A., M. Kubin, *et al.* (1997). "Differential stimulation of interleukin-12 (IL-12) and IL-10 by live and killed Helicobacter pylori in vitro and association of IL-12 production with gamma interferon-producing T cells in the human gastric mucosa." *Infect Immun* **65**(10): 4229-4235.
- [171] Hafsi, N., P. Volland, *et al.* (2004). "Human dendritic cells respond to Helicobacter pylori, promoting NK cell and Th1-effector responses in vitro." *J Immunol* **173**(2): 1249-1257.
- [172] Hamanaka, Y., M. Nakashima, *et al.* (2001). "Expression of human beta-defensin 2 (hBD-2) in Helicobacter pylori induced gastritis: antibacterial effect of hBD-2 against Helicobacter pylori." *Gut* **49**(4): 481-487.
- [173] Hansen, S., K. K. Melby, *et al.* (1999). "Helicobacter pylori infection and risk of cardia cancer and non-cardia gastric cancer. A nested case-control study." *Scand J Gastroenterol* **34**(4): 353-360.
- [174] Harder, J., J. Bartels, *et al.* (2001). "Isolation and characterization of human beta-defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic." *J Biol Chem* **276**(8): 5707-5713.

- [175] Harrington, L. E., R. D. Hatton, *et al.* (2005). "Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages." *Nat Immunol* **6**(11): 1123-1132.
- [176] Harris, P. R., P. B. Ernst, *et al.* (1998). "Recombinant *Helicobacter pylori* urease activates primary mucosal macrophages." *J Infect Dis* **178**(5): 1516-1520.
- [177] Hase, K., M. Murakami, *et al.* (2003). "Expression of LL-37 by human gastric epithelial cells as a potential host defense mechanism against *Helicobacter pylori*." *Gastroenterology* **125**(6): 1613-1625.
- [178] Heczko, U., V. C. Smith, *et al.* (2000). "Characteristics of *Helicobacter pylori* attachment to human primary antral epithelial cells." *Microbes Infect* **2**(14): 1669-1676.
- [179] Helander, H. F. (1981). "The cells of the gastric mucosa." *Int Rev Cytol* **70**: 217-289.
- [180] Higashi, H., R. Tsutsumi, *et al.* (2002). "SHP-2 tyrosine phosphatase as an intracellular target of *Helicobacter pylori* CagA protein." *Science* **295**(5555): 683-686.
- [181] Hirata, Y., T. Ohmae, *et al.* (2006). "MyD88 and TNF receptor-associated factor 6 are critical signal transducers in *Helicobacter pylori*-infected human epithelial cells." *J Immunol* **176**(6): 3796-3803.
- [182] Hoffmann, W. (2005). "Trefoil factors TFF (trefoil factor family) peptide-triggered signals promoting mucosal restitution." *Cell Mol Life Sci* **62**(24): 2932-2938.
- [183] Hoffmann, W. (2008). "Regeneration of the gastric mucosa and its glands from stem cells." *Curr Med Chem* **15**(29): 3133-3144.
- [184] Holtje, J. V. (1998). "Growth of the stress-bearing and shape-maintaining murein sacculus of *Escherichia coli*." *Microbiol Mol Biol Rev* **62**(1): 181-203.
- [185] a. Honda, S., T. Fujioka, *et al.* (1998). "Gastric ulcer, atrophic gastritis, and intestinal metaplasia caused by *Helicobacter pylori* infection in Mongolian gerbils." *Scand J Gastroenterol* **33**(5): 454-460.
- [186] b. Honda, S., T. Fujioka, *et al.* (1998). "Development of *Helicobacter pylori*-induced gastric carcinoma in Mongolian gerbils." *Cancer Res* **58**(19): 4255-4259.
- [187] Hoover, D. M., C. Boulegue, *et al.* (2002). "The structure of human macrophage inflammatory protein-3 α /CCL20. Linking antimicrobial and CC chemokine receptor-6-binding activities with human beta-defensins." *J Biol Chem* **277**(40): 37647-37654.
- [188] Hornsby, M. J., J. L. Huff, *et al.* (2008). "*Helicobacter pylori* induces an antimicrobial response in rhesus macaques in a cag pathogenicity island-dependent manner." *Gastroenterology* **134**(4): 1049-1057.
- [189] Hotchin, N. A., T. L. Cover, *et al.* (2000). "Cell vacuolation induced by the VacA cytotoxin of *Helicobacter pylori* is regulated by the Rac1 GTPase." *J Biol Chem* **275**(19): 14009-14012.
- [190] Houghton, J., A. Morozov, *et al.* (2007). "Stem cells and cancer." *Semin Cancer Biol* **17**(3): 191-203.
- [191] Houghton, J., C. Stoicov, *et al.* (2004). "Gastric cancer originating from bone marrow-derived cells." *Science* **306**(5701): 1568-1571.

- [192] Houghton, J. and T. C. Wang (2005). "Helicobacter pylori and gastric cancer: a new paradigm for inflammation-associated epithelial cancers." *Gastroenterology* **128**(6): 1567-1578.
- [193] Huntly, B. J. and D. G. Gilliland (2005). "Leukaemia stem cells and the evolution of cancer-stem-cell research." *Nat Rev Cancer* **5**(4): 311-321.
- [194] Hwang, I. R., P. I. Hsu, *et al.* (2003). "Interleukin-6 genetic polymorphisms are not related to Helicobacter pylori-associated gastroduodenal diseases." *Helicobacter* **8**(2): 142-148.
- [195] Hwang, I. R., T. Kodama, *et al.* (2002). "Effect of interleukin 1 polymorphisms on gastric mucosal interleukin 1beta production in Helicobacter pylori infection." *Gastroenterology* **123**(6): 1793-1803.
- [196] Ierardi, E., A. Di Leo, *et al.* (2003). "Tumor necrosis factor alpha and apoptosis in Helicobacter pylori related progressive gastric damage: a possible mechanism of immune system involvement in epithelial turnover regulation." *Immunopharmacol Immunotoxicol* **25**(2): 203-211.
- [197] Ilver, D., A. Arnqvist, *et al.* (1998). "Helicobacter pylori adhesin binding fucosylated histo-blood group antigens revealed by retagging." *Science* **279**(5349): 373-377.
- [198] Ishihara, S., M. A. Rumi, *et al.* (2004). "Essential role of MD-2 in TLR4-dependent signaling during Helicobacter pylori-associated gastritis." *J Immunol* **173**(2): 1406-1416.
- [199] Isomoto, H., H. Mukae, *et al.* (2004). "Elevated concentrations of alpha-defensins in gastric juice of patients with Helicobacter pylori infection." *Am J Gastroenterol* **99**(10): 1916-1923.
- [200] a. Israel, D. A., N. Salama, *et al.* (2001). "Helicobacter pylori strain-specific differences in genetic content, identified by microarray, influence host inflammatory responses." *J Clin Invest* **107**(5): 611-620.
- [201] b. Israel, D. A., N. Salama, *et al.* (2001). "Helicobacter pylori genetic diversity within the gastric niche of a single human host." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(25): 14625-14630.
- [202] Itskovitz-Eldor, J., M. Schuldiner, *et al.* (2000). "Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies compromising the three embryonic germ layers." *Mol Med* **6**(2): 88-95.
- [203] Iwakura, Y. and H. Ishigame (2006). "The IL-23/IL-17 axis in inflammation." *J Clin Invest* **116**(5): 1218-1222.
- [204] Jackson, L. M., K. C. Wu, *et al.* (2000). "Cyclooxygenase (COX) 1 and 2 in normal, inflamed, and ulcerated human gastric mucosa." *Gut* **47**(6): 762-770.
- [205] Jager, S., E. F. Stange, *et al.* (2010). "Antimicrobial peptides in gastrointestinal inflammation." *Int J Inflam* **2010**: 910283.
- [206] Jang, S., K. R. Jones, *et al.* (2010). "Epidemiological link between gastric disease and polymorphisms in VacA and CagA." *J Clin Microbiol* **48**(2): 559-567.

- [207] Jiang, Q., K. Hiratsuka, *et al.* (1996). "Variability of gene order in different *Helicobacter pylori* strains contributes to genome diversity." *Mol Microbiol* **20**(4): 833-842.
- [208] Josenhans, C., A. Labigne, *et al.* (1995). "Comparative ultrastructural and functional studies of *Helicobacter pylori* and *Helicobacter mustelae* flagellin mutants: both flagellin subunits, FlaA and FlaB, are necessary for full motility in *Helicobacter* species." *J Bacteriol* **177**(11): 3010-3020.
- [209] Jung, H. C., J. M. Kim, *et al.* (1997). "Helicobacter pylori induces an array of pro-inflammatory cytokines in human gastric epithelial cells: quantification of mRNA for interleukin-8, -1 alpha/beta, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, monocyte chemoattractant protein-1 and tumour necrosis factor-alpha." *J Gastroenterol Hepatol* **12**(7): 473-480.
- [210] Jung, S. W., M. Sugimoto, *et al.* (2009). "homB status of *Helicobacter pylori* as a novel marker to distinguish gastric cancer from duodenal ulcer." *J Clin Microbiol* **47**(10): 3241-3245.
- [211] Juttner, S., T. Cramer, *et al.* (2003). "Helicobacter pylori stimulates host cyclooxygenase-2 gene transcription: critical importance of MEK/ERK-dependent activation of USF1/-2 and CREB transcription factors." *Cell Microbiol* **5**(11): 821-834.
- [212] Kabir, S. (2011). "The role of interleukin-17 in the *Helicobacter pylori* induced infection and immunity." *Helicobacter* **16**(1): 1-8.
- [213] Kao, C. Y., Y. Chen, *et al.* (2004). "IL-17 markedly up-regulates beta-defensin-2 expression in human airway epithelium via JAK and NF-kappaB signaling pathways." *J Immunol* **173**(5): 3482-3491.
- [214] Kaparakis, M., L. Turnbull, *et al.* (2010). "Bacterial membrane vesicles deliver peptidoglycan to NOD1 in epithelial cells." *Cell Microbiol* **12**(3): 372-385.
- [215] Karam, S. and C. P. Leblond (1995). "Origin and migratory pathways of the eleven epithelial cell types present in the body of the mouse stomach." *Microsc Res Tech* **31**(3): 193-214.
- [216] Karam, S. M. (1999). "Lineage commitment and maturation of epithelial cells in the gut." *Front Biosci* **4**: D286-298.
- [217] Karmali, S., P. Schauer, *et al.* (2010). "Laparoscopic sleeve gastrectomy: an innovative new tool in the battle against the obesity epidemic in Canada." *Can J Surg* **53**(2): 126-132.
- [218] Karttunen, R., T. Karttunen, *et al.* (1995). "Interferon gamma and interleukin 4 secreting cells in the gastric antrum in *Helicobacter pylori* positive and negative gastritis." *Gut* **36**(3): 341-345.
- [219] Katagiri, M., M. Asaka, *et al.* (1997). "Increased cytokine production by gastric mucosa in patients with *Helicobacter pylori* infection." *J Clin Gastroenterol* **25 Suppl 1**: S211-214.
- [220] Kato, S., T. Tsukamoto, *et al.* (2006). "High salt diets dose-dependently promote gastric chemical carcinogenesis in *Helicobacter pylori*-infected Mongolian gerbils

- associated with a shift in mucin production from glandular to surface mucous cells." *Int J Cancer* **119**(7): 1558-1566.
- [221] Kavermann, H., B. P. Burns, *et al.* (2003). "Identification and characterization of *Helicobacter pylori* genes essential for gastric colonization." *J Exp Med* **197**(7): 813-822.
- [222] Kawai, T. and S. Akira (2009). "The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition." *Int Immunol* **21**(4): 317-337.
- [223] Kawai, T. and S. Akira (2010). "The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors." *Nat Immunol* **11**(5): 373-384.
- [224] Kawai, T. and S. Akira (2011). "Toll-like Receptors and Their Crosstalk with Other Innate Receptors in Infection and Immunity." *Immunity* **34**(5): 637-650.
- [225] Kawakubo, M., Y. Ito, *et al.* (2004). "Natural antibiotic function of a human gastric mucin against *Helicobacter pylori* infection." *Science* **305**(5686): 1003-1006.
- [226] a. Keates, S., Y. S. Hitti, *et al.* (1997). "*Helicobacter pylori* infection activates NF-kappa B in gastric epithelial cells." *Gastroenterology* **113**(4): 1099-1109.
- [227] b. Keates, S., A. C. Keates, *et al.* (1997). "Enterocytes are the primary source of the chemokine ENA-78 in normal colon and ulcerative colitis." *Am J Physiol* **273**(1 Pt 1): G75-82.
- [228] Keates, S., A. C. Keates, *et al.* (1999). "Differential activation of mitogen-activated protein kinases in AGS gastric epithelial cells by *cag+* and *cag-* *Helicobacter pylori*." *J Immunol* **163**(10): 5552-5559.
- [229] Khader, S. A., S. L. Gaffen, *et al.* (2009). "Th17 cells at the crossroads of innate and adaptive immunity against infectious diseases at the mucosa." *Mucosal Immunol* **2**(5): 403-411.
- [230] Khoo, M. L., L. R. McQuade, *et al.* (2005). "Growth and differentiation of embryoid bodies derived from human embryonic stem cells: effect of glucose and basic fibroblast growth factor." *Biol Reprod* **73**(6): 1147-1156.
- [231] Kim, E. E. and H. W. Wyckoff (1991). "Reaction mechanism of alkaline phosphatase based on crystal structures. Two-metal ion catalysis." *J Mol Biol* **218**(2): 449-464.
- [232] Kim, H., J. W. Lim, *et al.* (2001). "*Helicobacter pylori*-induced expression of interleukin-8 and cyclooxygenase-2 in AGS gastric epithelial cells: mediation by nuclear factor-kappaB." *Scand J Gastroenterol* **36**(7): 706-716.
- [233] Kim, J. G., S. J. Lee, *et al.* (2004). "Nod1 is an essential signal transducer in intestinal epithelial cells infected with bacteria that avoid recognition by toll-like receptors." *Infect Immun* **72**(3): 1487-1495.
- [234] Kim, N., W. Y. Park, *et al.* (2007). "Analysis of Gene Expression Profile of AGS Cells Stimulated by *Helicobacter pylori* Adhesion." *Gut Liver* **1**(1): 40-48.
- [235] Kim, S. Y., Y. C. Lee, *et al.* (2006). "*Helicobacter pylori* CagA transfection of gastric epithelial cells induces interleukin-8." *Cell Microbiol* **8**(1): 97-106.
- [236] Knipp, U., S. Birkholz, *et al.* (1996). "Partial characterization of a cell proliferation-inhibiting protein produced by *Helicobacter pylori*." *Infect Immun* **64**(9): 3491-3496.

- [237] Kranzer, K., A. Eckhardt, *et al.* (2004). "Induction of maturation and cytokine release of human dendritic cells by *Helicobacter pylori*." *Infect Immun* **72**(8): 4416-4423.
- [238] Kranzer, K., L. Sollner, *et al.* (2005). "Impact of *Helicobacter pylori* virulence factors and compounds on activation and maturation of human dendritic cells." *Infect Immun* **73**(7): 4180-4189.
- [239] Krejs, G. J. (2010). "Gastric cancer: epidemiology and risk factors." *Dig Dis* **28**(4-5): 600-603.
- [240] Kuipers, E. J., L. Lundell, *et al.* (1996). "Atrophic gastritis and *Helicobacter pylori* infection in patients with reflux esophagitis treated with omeprazole or fundoplication." *N Engl J Med* **334**(16): 1018-1022.
- [241] a. Kuipers, E. J., G. I. Perez-Perez, *et al.* (1995). "*Helicobacter pylori* and atrophic gastritis: importance of the *cagA* status." *J Natl Cancer Inst* **87**(23): 1777-1780.
- [242] b. Kuipers, E. J., A. M. Uytterlinde, *et al.* (1995). "Long-term sequelae of *Helicobacter pylori* gastritis." *Lancet* **345**(8964): 1525-1528.
- [243] Kumar, H., T. Kawai, *et al.* (2009). "Pathogen recognition in the innate immune response." *Biochem J* **420**(1): 1-16.
- [244] Kumar Pachathundikandi, S., S. Brandt, *et al.* (2011). "Induction of TLR-2 and TLR-5 Expression by *Helicobacter pylori* Switches *cagPAI*-Dependent Signalling Leading to the Secretion of IL-8 and TNF-alpha." *PLoS One* **6**(5): e19614.
- [245] Kusters, J. G., A. H. van Vliet, *et al.* (2006). "Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection." *Clin Microbiol Rev* **19**(3): 449-490.
- [246] Kutter, S., R. Buhrdorf, *et al.* (2008). "Protein subassemblies of the *Helicobacter pylori* Cag type IV secretion system revealed by localization and interaction studies." *J Bacteriol* **190**(6): 2161-2171.
- [247] Kuwahara, H., Y. Miyamoto, *et al.* (2000). "*Helicobacter pylori* urease suppresses bactericidal activity of peroxynitrite via carbon dioxide production." *Infect Immun* **68**(8): 4378-4383.
- [248] Lai, Y. P., J. C. Yang, *et al.* (2006). "*Helicobacter pylori* infection and CagA protein translocation in human primary gastric epithelial cell culture." *Helicobacter* **11**(5): 451-459.
- [249] Leach, S. T., H. M. Mitchell, *et al.* (2008). "S100 calgranulin proteins S100A8, S100A9 and S100A12 are expressed in the inflamed gastric mucosa of *Helicobacter pylori*-infected children." *Can J Gastroenterol* **22**(5): 461-464.
- [250] Lee, S. K., A. Stack, *et al.* (2003). "*Helicobacter pylori* flagellins have very low intrinsic activity to stimulate human gastric epithelial cells via TLR5." *Microbes Infect* **5**(15): 1345-1356.
- [251] Lehmann, F. S., L. Terracciano, *et al.* (2002). "In situ correlation of cytokine secretion and apoptosis in *Helicobacter pylori*-associated gastritis." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **283**(2): G481-488.
- [252] Leying, H., S. Suerbaum, *et al.* (1992). "Cloning and genetic characterization of a *Helicobacter pylori* flagellin gene." *Mol Microbiol* **6**(19): 2863-2874.

- [253] Liang, S. C., X. Y. Tan, *et al.* (2006). "Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides." *J Exp Med* **203**(10): 2271-2279.
- [254] Limburg, P., Y. Qiao, *et al.* (2001). "Helicobacter pylori seropositivity and subsite-specific gastric cancer risks in Linxian, China." *J Natl Cancer Inst* **93**(3): 226-233.
- [255] Lin, J. T., L. Y. Wang, *et al.* (1995). "A nested case-control study on the association between Helicobacter pylori infection and gastric cancer risk in a cohort of 9775 men in Taiwan." *Anticancer Res* **15**(2): 603-606.
- [256] Lin, T. M., J. L. Tsai, *et al.* (2005). "Accelerated growth and prolonged lifespan of adipose tissue-derived human mesenchymal stem cells in a medium using reduced calcium and antioxidants." *Stem Cells Dev* **14**(1): 92-102.
- [257] Lindholm, C., M. Quiding-Jarbrink, *et al.* (1998). "Local cytokine response in Helicobacter pylori-infected subjects." *Infect Immun* **66**(12): 5964-5971.
- [258] Linz, B., F. Balloux, *et al.* (2007). "An African origin for the intimate association between humans and Helicobacter pylori." *Nature* **445**(7130): 915-918.
- [259] Locksley, R. M., N. Killeen, *et al.* (2001). "The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology." *Cell* **104**(4): 487-501.
- [260] Loh, J. T., V. J. Torres, *et al.* (2007). "Regulation of Helicobacter pylori cagA expression in response to salt." *Cancer Res* **67**(10): 4709-4715.
- [261] a. Lu, H., P. I. Hsu, *et al.* (2005). "Duodenal ulcer promoting gene of Helicobacter pylori." *Gastroenterology* **128**(4): 833-848.
- [262] b. Lu, H., J. Y. Wu, *et al.* (2005). "Regulation of interleukin-6 promoter activation in gastric epithelial cells infected with Helicobacter pylori." *Mol Biol Cell* **16**(10): 4954-4966.
- [263] Lundgren, A., E. Stromberg, *et al.* (2005). "Mucosal FOXP3-expressing CD4+ CD25high regulatory T cells in Helicobacter pylori-infected patients." *Infect Immun* **73**(1): 523-531.
- [264] Lundgren, A., E. Suri-Payer, *et al.* (2003). "Helicobacter pylori-specific CD4+ CD25high regulatory T cells suppress memory T-cell responses to *H. pylori* in infected individuals." *Infect Immun* **71**(4): 1755-1762.
- [265] Lusitani, D., S. E. Malawista, *et al.* (2003). "Calprotectin, an abundant cytosolic protein from human polymorphonuclear leukocytes, inhibits the growth of *Borrelia burgdorferi*." *Infect Immun* **71**(8): 4711-4716.
- [266] Luster, A. D. (1998). "Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation." *N Engl J Med* **338**(7): 436-445.
- [267] Luzzza, F., T. Parrello, *et al.* (2000). "Up-regulation of IL-17 is associated with bioactive IL-8 expression in Helicobacter pylori-infected human gastric mucosa." *J Immunol* **165**(9): 5332-5337.
- [268] Lytton, S. D., W. Fischer, *et al.* (2005). "Production of ammonium by Helicobacter pylori mediates occludin processing and disruption of tight junctions in Caco-2 cells." *Microbiology* **151**(Pt 10): 3267-3276.

- [269] Maeda, S., M. Akanuma, *et al.* (2001). "Distinct mechanism of Helicobacter pylori-mediated NF-kappa B activation between gastric cancer cells and monocytic cells." *J Biol Chem* **276**(48): 44856-44864.
- [270] Mahdavi, J., B. Sonden, *et al.* (2002). "Helicobacter pylori SabA adhesin in persistent infection and chronic inflammation." *Science* **297**(5581): 573-578.
- [271] Mane, S. P., M. G. Dominguez-Bello, *et al.* (2010). "Host-interactive genes in Amerindian Helicobacter pylori diverge from their Old World homologs and mediate inflammatory responses." *J Bacteriol* **192**(12): 3078-3092.
- [272] Manente, L., A. Perna, *et al.* (2008). "The Helicobacter pylori's protein VacA has direct effects on the regulation of cell cycle and apoptosis in gastric epithelial cells." *J Cell Physiol* **214**(3): 582-587.
- [273] Mannick, E. E., L. E. Bravo, *et al.* (1996). "Inducible nitric oxide synthase, nitrotyrosine, and apoptosis in Helicobacter pylori gastritis: effect of antibiotics and antioxidants." *Cancer Res* **56**(14): 3238-3243.
- [274] Marshall, B. J., J. A. Armstrong, *et al.* (1985). "Attempt to fulfil Koch's postulates for pyloric Campylobacter." *Med J Aust* **142**(8): 436-439.
- [275] Marshall, B. J. and J. R. Warren (1984). "Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration." *Lancet* **1**(8390): 1311-1315.
- [276] Masui, S., Y. Nakatake, *et al.* (2007). "Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells." *Nat Cell Biol* **9**(6): 625-635.
- [277] Matic, M., W. H. Evans, *et al.* (2002). "Epidermal stem cells do not communicate through gap junctions." *J Invest Dermatol* **118**(1): 110-116.
- [278] McCarthy, C. J., L. J. Crofford, *et al.* (1999). "Cyclooxygenase-2 expression in gastric antral mucosa before and after eradication of Helicobacter pylori infection." *Am J Gastroenterol* **94**(5): 1218-1223.
- [279] McDonald, S. A., L. C. Greaves, *et al.* (2008). "Mechanisms of field cancerization in the human stomach: the expansion and spread of mutated gastric stem cells." *Gastroenterology* **134**(2): 500-510.
- [280] Megraud, F. (2003). "[When and how does Helicobacter pylori infection occur?]." *Gastroenterol Clin Biol* **27**(3 Pt 2): 374-379.
- [281] Meyer-ter-Vehn, T., A. Covacci, *et al.* (2000). "Helicobacter pylori activates mitogen-activated protein kinase cascades and induces expression of the proto-oncogenes c-fos and c-jun." *J Biol Chem* **275**(21): 16064-16072.
- [282] Meyer, F., K. S. Ramanujam, *et al.* (2003). "Cutting edge: cyclooxygenase-2 activation suppresses Th1 polarization in response to Helicobacter pylori." *J Immunol* **171**(8): 3913-3917.
- [283] Meyer, F., K. T. Wilson, *et al.* (2000). "Modulation of innate cytokine responses by products of Helicobacter pylori." *Infect Immun* **68**(11): 6265-6272.
- [284] Miehleke, S., C. Kirsch, *et al.* (2000). "The Helicobacter pylori vacA s1, m1 genotype and cagA is associated with gastric carcinoma in Germany." *Int J Cancer* **87**(3): 322-327.

- [285] Mitsui, K., Y. Tokuzawa, *et al.* (2003). "The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells." *Cell* **113**(5): 631-642.
- [286] Miyasaki, K. T., A. L. Bodeau, *et al.* (1993). "In vitro antimicrobial activity of the human neutrophil cytosolic S-100 protein complex, calprotectin, against *Capnocytophaga sputigena*." *J Dent Res* **72**(2): 517-523.
- [287] Mizuno, T., T. Ando, *et al.* (2005). "Interleukin-17 levels in *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosa and pathologic sequelae of colonization." *World J Gastroenterol* **11**(40): 6305-6311.
- [288] Moese, S., M. Selbach, *et al.* (2007). "The *Helicobacter pylori* CagA protein disrupts matrix adhesion of gastric epithelial cells by dephosphorylation of vinculin." *Cell Microbiol* **9**(5): 1148-1161.
- [289] Monack, D. M., A. Mueller, *et al.* (2004). "Persistent bacterial infections: the interface of the pathogen and the host immune system." *Nat Rev Microbiol* **2**(9): 747-765.
- [290] Montalban, C. and F. Norman (2006). "Treatment of gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma: *Helicobacter pylori* eradication and beyond." *Expert Rev Anticancer Ther* **6**(3): 361-371.
- [291] Moore, K. A. and I. R. Lemischka (2006). "Stem cells and their niches." *Science* **311**(5769): 1880-1885.
- [292] Morrison, S. J. and J. Kimble (2006). "Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer." *Nature* **441**(7097): 1068-1074.
- [293] Morrison, S. J. and A. C. Spradling (2008). "Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life." *Cell* **132**(4): 598-611.
- [294] Munoz, N. (1994). "Is *Helicobacter pylori* a cause of gastric cancer? An appraisal of the seroepidemiological evidence." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **3**(5): 445-451.
- [295] Muotiala, A., I. M. Helander, *et al.* (1992). "Low biological activity of *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide." *Infect Immun* **60**(4): 1714-1716.
- [296] Murphy, K. M. and S. L. Reiner (2002). "The lineage decisions of helper T cells." *Nat Rev Immunol* **2**(12): 933-944.
- [297] Murthy, A. R., R. I. Lehrer, *et al.* (1993). "In vitro candidastatic properties of the human neutrophil calprotectin complex." *J Immunol* **151**(11): 6291-6301.
- [298] Nacken, W., F. C. Mooren, *et al.* (2005). "S100A9 deficiency alters adenosine-5'-triphosphate induced calcium signalling but does not generally interfere with calcium and zinc homeostasis in murine neutrophils." *Int J Biochem Cell Biol* **37**(6): 1241-1253.
- [299] Naka, T., N. Nishimoto, *et al.* (2002). "The paradigm of IL-6: from basic science to medicine." *Arthritis Res* **4 Suppl 3**: S233-242.
- [300] Nakachi, N., T. W. Klein, *et al.* (2000). "*Helicobacter pylori* infection of human gastric epithelial cells induces IL-8 and TNF α , but not TGF β 1 mRNA." *FEMS Immunol Med Microbiol* **29**(1): 23-26.

- [301] Naumann, M., S. Wessler, *et al.* (1999). "Activation of activator protein 1 and stress response kinases in epithelial cells colonized by *Helicobacter pylori* encoding the cag pathogenicity island." *J Biol Chem* **274**(44): 31655-31662.
- [302] Noach, L. A., N. B. Bosma, *et al.* (1994). "Mucosal tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1 beta, and interleukin-8 production in patients with *Helicobacter pylori* infection." *Scand J Gastroenterol* **29**(5): 425-429.
- [303] Nomura, A., G. N. Stemmermann, *et al.* (1991). "Helicobacter pylori infection and gastric carcinoma among Japanese Americans in Hawaii." *N Engl J Med* **325**(16): 1132-1136.
- [304] Nozawa, Y., K. Nishihara, *et al.* (2002). "Identification of a signaling cascade for interleukin-8 production by *Helicobacter pylori* in human gastric epithelial cells." *Biochem Pharmacol* **64**(1): 21-30.
- [305] O'Neil, D. A., S. P. Cole, *et al.* (2000). "Regulation of human beta-defensins by gastric epithelial cells in response to infection with *Helicobacter pylori* or stimulation with interleukin-1." *Infect Immun* **68**(9): 5412-5415.
- [306] O'Neil, D. A., E. M. Porter, *et al.* (1999). "Expression and regulation of the human beta-defensins hBD-1 and hBD-2 in intestinal epithelium." *J Immunol* **163**(12): 6718-6724.
- [307] O'Rourke, J. L. and A. Lee (2003). "Animal models of *Helicobacter pylori* infection and disease." *Microbes Infect* **5**(8): 741-748.
- [308] O'Toole, P. W., M. C. Lane, *et al.* (2000). "Helicobacter pylori motility." *Microbes Infect* **2**(10): 1207-1214.
- [309] Obst, B., S. Wagner, *et al.* (2000). "Helicobacter pylori causes DNA damage in gastric epithelial cells." *Carcinogenesis* **21**(6): 1111-1115.
- [310] Odenbreit, S., J. Puls, *et al.* (2000). "Translocation of *Helicobacter pylori* CagA into gastric epithelial cells by type IV secretion." *Science* **287**(5457): 1497-1500.
- [311] Ogiwara, H., M. Sugimoto, *et al.* (2009). "Role of deletion located between the intermediate and middle regions of the *Helicobacter pylori* vacA gene in cases of gastroduodenal diseases." *J Clin Microbiol* **47**(11): 3493-3500.
- [312] Oguma, K., H. Oshima, *et al.* (2008). "Activated macrophages promote Wnt signalling through tumour necrosis factor-alpha in gastric tumour cells." *EMBO J* **27**(12): 1671-1681.
- [313] Ogura, K., M. Takahashi, *et al.* (1998). "Interleukin-8 production in primary cultures of human gastric epithelial cells induced by *Helicobacter pylori*." *Dig Dis Sci* **43**(12): 2738-2743.
- [314] Oh, J. D., S. M. Karam, *et al.* (2005). "Intracellular *Helicobacter pylori* in gastric epithelial progenitors." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(14): 5186-5191.
- [315] Ohnishi, N., H. Yuasa, *et al.* (2008). "Transgenic expression of *Helicobacter pylori* CagA induces gastrointestinal and hematopoietic neoplasms in mouse." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(3): 1003-1008.

- [316] Otani, K., T. Watanabe, *et al.* (2009). "Anti-inflammatory effects of IL-17A on *Helicobacter pylori*-induced gastritis." *Biochemical and Biophysical Research Communications* **382**(2): 252-258.
- [317] Ottemann, K. M. and A. C. Lowenthal (2002). "*Helicobacter pylori* uses motility for initial colonization and to attain robust infection." *Infect Immun* **70**(4): 1984-1990.
- [318] Pabst, M. J., N. P. Cummings, *et al.* (1980). "Lipophilic derivative of muramyl dipeptide is more active than muramyl dipeptide in priming macrophages to release superoxide anion." *Infect Immun* **29**(2): 617-622.
- [319] Parkin, D. M., F. Bray, *et al.* (2005). "Global cancer statistics, 2002." *CA Cancer J Clin* **55**(2): 74-108.
- [320] Parsonnet, J., G. D. Friedman, *et al.* (1997). "Risk for gastric cancer in people with CagA positive or CagA negative *Helicobacter pylori* infection." *Gut* **40**(3): 297-301.
- [321] Parsonnet, J., G. D. Friedman, *et al.* (1991). "*Helicobacter pylori* infection and the risk of gastric carcinoma." *N Engl J Med* **325**(16): 1127-1131.
- [322] Paziak-Domanska, B., M. Chmiela, *et al.* (2000). "Potential role of CagA in the inhibition of T cell reactivity in *Helicobacter pylori* infections." *Cell Immunol* **202**(2): 136-139.
- [323] Peek, R. M., Jr., M. J. Blaser, *et al.* (1999). "*Helicobacter pylori* strain-specific genotypes and modulation of the gastric epithelial cell cycle." *Cancer Res* **59**(24): 6124-6131.
- [324] Peek, R. M., Jr., C. Fiske, *et al.* (2010). "Role of innate immunity in *Helicobacter pylori*-induced gastric malignancy." *Physiol Rev* **90**(3): 831-858.
- [325] Peek, R. M., Jr., G. G. Miller, *et al.* (1995). "Detection of *Helicobacter pylori* gene expression in human gastric mucosa." *J Clin Microbiol* **33**(1): 28-32.
- [326] Peek, R. M., Jr., S. A. Thompson, *et al.* (1998). "Adherence to gastric epithelial cells induces expression of a *Helicobacter pylori* gene, *iceA*, that is associated with clinical outcome." *Proc Assoc Am Physicians* **110**(6): 531-544.
- [327] Philpott, D. J., D. Belaid, *et al.* (2002). "Reduced activation of inflammatory responses in host cells by mouse-adapted *Helicobacter pylori* isolates." *Cell Microbiol* **4**(5): 285-296.
- [328] Pinto-Santini, D. M. and N. R. Salama (2009). "Cag3 is a novel essential component of the *Helicobacter pylori* Cag type IV secretion system outer membrane subcomplex." *J Bacteriol* **191**(23): 7343-7352.
- [329] Powell, D. W., P. A. Adegboyega, *et al.* (2005). "Epithelial cells and their neighbors I. Role of intestinal myofibroblasts in development, repair, and cancer." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **289**(1): G2-7.
- [330] Powell, D. W., R. C. Mifflin, *et al.* (1999). "Myofibroblasts. II. Intestinal subepithelial myofibroblasts." *Am J Physiol* **277**(2 Pt 1): C183-201.
- [331] Qiao, X. T. and D. L. Gumucio (2011). "Current molecular markers for gastric progenitor cells and gastric cancer stem cells." *J Gastroenterol* **46**(7): 855-865.
- [332] Qiao, X. T., J. W. Ziel, *et al.* (2007). "Prospective identification of a multilineage progenitor in murine stomach epithelium." *Gastroenterology* **133**(6): 1989-1998.

- [333] Quante, M. and T. C. Wang (2009). "Stem cells in gastroenterology and hepatology." *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **6**(12): 724-737.
- [334] Rad, R., L. Brenner, *et al.* (2006). "CD25+/Foxp3+ T cells regulate gastric inflammation and *Helicobacter pylori* colonization in vivo." *Gastroenterology* **131**(2): 525-537.
- [335] Reubinoff, B. E., M. F. Pera, *et al.* (2000). "Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro." *Nat Biotechnol* **18**(4): 399-404.
- [336] Reya, T., S. J. Morrison, *et al.* (2001). "Stem cells, cancer, and cancer stem cells." *Nature* **414**(6859): 105-111.
- [337] Rhead, J. L., D. P. Letley, *et al.* (2007). "A new *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin determinant, the intermediate region, is associated with gastric cancer." *Gastroenterology* **133**(3): 926-936.
- [338] Richter-Dahlfors, A., U. Heczko, *et al.* (1998). "*Helicobacter pylori*-infected human antral primary cell cultures: effect on gastrin cell function." *Am J Physiol* **275**(3 Pt 1): G393-401.
- [339] Rieder, G., W. Einsiedl, *et al.* (2001). "Comparison of CXC chemokines ENA-78 and interleukin-8 expression in *Helicobacter pylori*-associated gastritis." *Infect Immun* **69**(1): 81-88.
- [340] Rieder, G., J. L. Merchant, *et al.* (2005). "*Helicobacter pylori* cag-type IV secretion system facilitates corpus colonization to induce precancerous conditions in Mongolian gerbils." *Gastroenterology* **128**(5): 1229-1242.
- [341] Ristimaki, A., N. Honkanen, *et al.* (1997). "Expression of cyclooxygenase-2 in human gastric carcinoma." *Cancer Res* **57**(7): 1276-1280.
- [342] Robinson, K., R. H. Argent, *et al.* (2007). "The inflammatory and immune response to *Helicobacter pylori* infection." *Best Pract Res Clin Gastroenterol* **21**(2): 237-259.
- [343] Rollins, B. J. (1997). "Chemokines." *Blood* **90**(3): 909-928.
- [344] Romano, M., V. Ricci, *et al.* (1998). "*Helicobacter pylori* up-regulates cyclooxygenase-2 mRNA expression and prostaglandin E2 synthesis in MKN 28 gastric mucosal cells in vitro." *J Biol Chem* **273**(44): 28560-28563.
- [345] Rosen, J. M. and C. T. Jordan (2009). "The increasing complexity of the cancer stem cell paradigm." *Science* **324**(5935): 1670-1673.
- [346] Rudi, J., C. Kolb, *et al.* (1997). "Serum antibodies against *Helicobacter pylori* proteins VacA and CagA are associated with increased risk for gastric adenocarcinoma." *Dig Dis Sci* **42**(8): 1652-1659.
- [347] Saadat, I., H. Higashi, *et al.* (2007). "*Helicobacter pylori* CagA targets PAR1/MARK kinase to disrupt epithelial cell polarity." *Nature* **447**(7142): 330-333.
- [348] Saha, A., C. E. Hammond, *et al.* (2008). "*Helicobacter pylori*-induced H,K-ATPase alpha-subunit gene repression is mediated by NF-kappaB p50 homodimer promoter binding." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **294**(3): G795-807.
- [349] Sawaoka, H., S. Kawano, *et al.* (1998). "*Helicobacter pylori* infection induces cyclooxygenase-2 expression in human gastric mucosa." *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **59**(5): 313-316.

- [350] Schmausser, B., M. Andrulis, *et al.* (2004). "Expression and subcellular distribution of toll-like receptors TLR4, TLR5 and TLR9 on the gastric epithelium in *Helicobacter pylori* infection." *Clin Exp Immunol* **136**(3): 521-526.
- [351] Schmausser, B., M. Andrulis, *et al.* (2005). "Toll-like receptors TLR4, TLR5 and TLR9 on gastric carcinoma cells: an implication for interaction with *Helicobacter pylori*." *Int J Med Microbiol* **295**(3): 179-185.
- [352] Schnyder-Candrian, S. and A. Walz (1997). "Neutrophil-activating protein ENA-78 and IL-8 exhibit different patterns of expression in lipopolysaccharide- and cytokine-stimulated human monocytes." *J Immunol* **158**(8): 3888-3894.
- [353] Schottelius, A. J., L. L. Moldawer, *et al.* (2004). "Biology of tumor necrosis factor-alpha- implications for psoriasis." *Exp Dermatol* **13**(4): 193-222.
- [354] Schroder, J. M. and J. Harder (2006). "Antimicrobial skin peptides and proteins." *Cell Mol Life Sci* **63**(4): 469-486.
- [355] Schubert, M. L. and D. A. Peura (2008). "Control of gastric acid secretion in health and disease." *Gastroenterology* **134**(7): 1842-1860.
- [356] Schwandner, R., R. Dziarski, *et al.* (1999). "Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2." *J Biol Chem* **274**(25): 17406-17409.
- [357] Sebkova, L., A. Pellicano, *et al.* (2004). "Extracellular signal-regulated protein kinase mediates interleukin 17 (IL-17)-induced IL-8 secretion in *Helicobacter pylori*-infected human gastric epithelial cells." *Infect Immun* **72**(9): 5019-5026.
- [358] Segal, E. D., J. Cha, *et al.* (1999). "Altered states: involvement of phosphorylated CagA in the induction of host cellular growth changes by *Helicobacter pylori*." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(25): 14559-14564.
- [359] Segal, E. D., S. Falkow, *et al.* (1996). "*Helicobacter pylori* attachment to gastric cells induces cytoskeletal rearrangements and tyrosine phosphorylation of host cell proteins." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(3): 1259-1264.
- [360] Segal, E. D., C. Lange, *et al.* (1997). "Induction of host signal transduction pathways by *Helicobacter pylori*." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(14): 7595-7599.
- [361] a. Selbach, M., S. Moese, *et al.* (2002). "Src is the kinase of the *Helicobacter pylori* CagA protein in vitro and in vivo." *J Biol Chem* **277**(9): 6775-6778.
- [362] b. Selbach, M., S. Moese, *et al.* (2002). "Functional analysis of the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island reveals both VirD4-CagA-dependent and VirD4-CagA-independent mechanisms." *Infect Immun* **70**(2): 665-671.
- [363] Semino-Mora, C., S. Q. Doi, *et al.* (2003). "Intracellular and interstitial expression of *Helicobacter pylori* virulence genes in gastric precancerous intestinal metaplasia and adenocarcinoma." *J Infect Dis* **187**(8): 1165-1177.
- [364] Semple, C. A., P. Gautier, *et al.* (2006). "The changing of the guard: Molecular diversity and rapid evolution of beta-defensins." *Mol Divers* **10**(4): 575-584.
- [365] Sharma, S. A., M. K. Tummuru, *et al.* (1995). "Interleukin-8 response of gastric epithelial cell lines to *Helicobacter pylori* stimulation in vitro." *Infect Immun* **63**(5): 1681-1687.

- [366] Shen, F. and S. L. Gaffen (2008). "Structure-function relationships in the IL-17 receptor: implications for signal transduction and therapy." *Cytokine* **41**(2): 92-104.
- [367] Shi, Y., X. F. Liu, *et al.* (2010). "Helicobacter pylori-Induced Th17 Responses Modulate Th1 Cell Responses, Benefit Bacterial Growth, and Contribute to Pathology in Mice." *The Journal of Immunology* **184**(9): 5121-5129.
- [368] Shimoyama, T. and J. E. Crabtree (1997). "Mucosal chemokines in Helicobacter pylori infection." *J Physiol Pharmacol* **48**(3): 315-323.
- [369] Shimoyama, T., S. M. Everett, *et al.* (1998). "Chemokine mRNA expression in gastric mucosa is associated with Helicobacter pylori cagA positivity and severity of gastritis." *J Clin Pathol* **51**(10): 765-770.
- [370] Shiomi, S., A. Toriie, *et al.* (2008). "IL-17 is involved in Helicobacter pylori-induced gastric inflammatory responses in a mouse model." *Helicobacter* **13**(6): 518-524.
- [371] Sieveking, D., H. M. Mitchell, *et al.* (2004). "Gastric epithelial cell CXC chemokine secretion following Helicobacter pylori infection in vitro." *J Gastroenterol Hepatol* **19**(9): 982-987.
- [372] Silen, W. and S. Ito (1985). "Mechanisms for rapid re-epithelialization of the gastric mucosal surface." *Annu Rev Physiol* **47**: 217-229.
- [373] Siman, J. H., A. Forsgren, *et al.* (1997). "Association between Helicobacter pylori and gastric carcinoma in the city of Malmo, Sweden. A prospective study." *Scand J Gastroenterol* **32**(12): 1215-1221.
- [374] Sipponen, P. and B. J. Marshall (2000). "Gastritis and gastric cancer. Western countries." *Gastroenterol Clin North Am* **29**(3): 579-592, v-vi.
- [375] Smith, M. F., Jr., A. Mitchell, *et al.* (2003). "Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR5, but not TLR4, are required for Helicobacter pylori-induced NF-kappa B activation and chemokine expression by epithelial cells." *J Biol Chem* **278**(35): 32552-32560.
- [376] Smith, S. M., A. P. Moran, *et al.* (2011). "Tribbles 3: a novel regulator of TLR2-mediated signaling in response to Helicobacter pylori lipopolysaccharide." *J Immunol* **186**(4): 2462-2471.
- [377] Smoot, D. T., J. H. Resau, *et al.* (1996). "Effects of Helicobacter pylori vacuolating cytotoxin on primary cultures of human gastric epithelial cells." *Gut* **39**(6): 795-799.
- [378] Smoot, D. T., J. H. Resau, *et al.* (1993). "Adherence of Helicobacter pylori to cultured human gastric epithelial cells." *Infect Immun* **61**(1): 350-355.
- [379] Smoot, D. T., J. Sewchand, *et al.* (2000). "A method for establishing primary cultures of human gastric epithelial cells." *Methods Cell Sci* **22**(2-3): 133-136.
- [380] Sohnle, P. G., M. J. Hunter, *et al.* (2000). "Zinc-reversible antimicrobial activity of recombinant calprotectin (migration inhibitory factor-related proteins 8 and 14)." *J Infect Dis* **182**(4): 1272-1275.
- [381] Stein, M., F. Bagnoli, *et al.* (2002). "c-Src/Lyn kinases activate Helicobacter pylori CagA through tyrosine phosphorylation of the EPIYA motifs." *Mol Microbiol* **43**(4): 971-980.

- [382] Stein, M., R. Rappuoli, *et al.* (2000). "Tyrosine phosphorylation of the *Helicobacter pylori* CagA antigen after cag-driven host cell translocation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(3): 1263-1268.
- [383] Steinbakk, M., C. F. Naess-Andresen, *et al.* (1990). "Antimicrobial actions of calcium binding leucocyte L1 protein, calprotectin." *Lancet* **336**(8718): 763-765.
- [384] Strober, W., P. J. Murray, *et al.* (2006). "Signalling pathways and molecular interactions of NOD1 and NOD2." *Nat Rev Immunol* **6**(1): 9-20.
- [385] Suerbaum, S. and C. Josenhans (1999). "Virulence factors of *Helicobacter pylori*: implications for vaccine development." *Mol Med Today* **5**(1): 32-39.
- [386] Suerbaum, S., C. Josenhans, *et al.* (1993). "Cloning and genetic characterization of the *Helicobacter pylori* and *Helicobacter mustelae* flaB flagellin genes and construction of *H. pylori* flaA- and flaB-negative mutants by electroporation-mediated allelic exchange." *J Bacteriol* **175**(11): 3278-3288.
- [387] Sugimoto, M., T. Ohno, *et al.* (2009). "Gastric mucosal interleukin-17 and -18 mRNA expression in *Helicobacter pylori*-induced Mongolian gerbils." *Cancer Sci* **100**(11): 2152-2159.
- [388] Sun, J., K. Aoki, *et al.* (2006). "Effect of NaCl and *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin on cytokine expression and viability." *World J Gastroenterol* **12**(14): 2174-2180.
- [389] Sundrud, M. S., V. J. Torres, *et al.* (2004). "Inhibition of primary human T cell proliferation by *Helicobacter pylori* vacuolating toxin (VacA) is independent of VacA effects on IL-2 secretion." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(20): 7727-7732.
- [390] Sung, J. J., W. K. Leung, *et al.* (2000). "Cyclooxygenase-2 expression in *Helicobacter pylori*-associated premalignant and malignant gastric lesions." *Am J Pathol* **157**(3): 729-735.
- [391] Suzuki, M., H. Mimuro, *et al.* (2005). "Interaction of CagA with Crk plays an important role in *Helicobacter pylori*-induced loss of gastric epithelial cell adhesion." *J Exp Med* **202**(9): 1235-1247.
- [392] Tai, M. H., C. C. Chang, *et al.* (2005). "Oct4 expression in adult human stem cells: evidence in support of the stem cell theory of carcinogenesis." *Carcinogenesis* **26**(2): 495-502.
- [393] Takahashi, M., S. Ota, *et al.* (1995). "Hepatocyte growth factor is the most potent endogenous stimulant of rabbit gastric epithelial cell proliferation and migration in primary culture." *J Clin Invest* **95**(5): 1994-2003.
- [394] Takashima, M., T. Furuta, *et al.* (2001). "Effects of *Helicobacter pylori* infection on gastric acid secretion and serum gastrin levels in Mongolian gerbils." *Gut* **48**(6): 765-773.
- [395] Tan, S., L. S. Tompkins, *et al.* (2009). "*Helicobacter pylori* usurps cell polarity to turn the cell surface into a replicative niche." *PLoS Pathog* **5**(5): e1000407.
- [396] Tani, Y., Y. Akiyama, *et al.* (2007). "Transcription factor SOX2 up-regulates stomach-specific pepsinogen A gene expression." *J Cancer Res Clin Oncol* **133**(4): 263-269.

- [397] Taylor, D. E., M. Eaton, *et al.* (1992). "Construction of a *Helicobacter pylori* genome map and demonstration of diversity at the genome level." *J Bacteriol* **174**(21): 6800-6806.
- [398] Tee, W., J. R. Lambert, *et al.* (1995). "Cytotoxin production by *Helicobacter pylori* from patients with upper gastrointestinal tract diseases." *J Clin Microbiol* **33**(5): 1203-1205.
- [399] Terradot, L. and G. Waksman (2011). "Architecture of the *Helicobacter pylori* Cag-type IV secretion system." *FEBS J* **278**(8): 1213-1222.
- [400] Tetreault, M. P., P. Chailier, *et al.* (2005). "Differential growth factor induction and modulation of human gastric epithelial regeneration." *Exp Cell Res* **306**(1): 285-297.
- [401] Thomson, J. A., J. Itskovitz-Eldor, *et al.* (1998). "Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts." *Science* **282**(5391): 1145-1147.
- [402] Toledo, H., M. Valenzuela, *et al.* (2002). "Acid stress response in *Helicobacter pylori*." *FEMS Microbiol Lett* **213**(1): 67-72.
- [403] Tomb, J. F., O. White, *et al.* (1997). "The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*." *Nature* **388**(6642): 539-547.
- [404] Torok, A. M., A. H. Bouton, *et al.* (2005). "*Helicobacter pylori* induces interleukin-8 secretion by Toll-like receptor 2- and Toll-like receptor 5-dependent and -independent pathways." *Infect Immun* **73**(3): 1523-1531.
- [405] Torres, J., G. I. Perez-Perez, *et al.* (1998). "Infection with CagA+ *Helicobacter pylori* strains as a possible predictor of risk in the development of gastric adenocarcinoma in Mexico." *Int J Cancer* **78**(3): 298-300.
- [406] Treiber, G. and J. R. Lambert (1998). "The impact of *Helicobacter pylori* eradication on peptic ulcer healing." *Am J Gastroenterol* **93**(7): 1080-1084.
- [407] Tsai, H. F. and P. N. Hsu (2010). "Interplay between *Helicobacter pylori* and immune cells in immune pathogenesis of gastric inflammation and mucosal pathology." *Cell Mol Immunol* **7**(4): 255-259.
- [408] Tsutsumi, R., H. Higashi, *et al.* (2003). "Attenuation of *Helicobacter pylori* CagA x SHP-2 signaling by interaction between CagA and C-terminal Src kinase." *J Biol Chem* **278**(6): 3664-3670.
- [409] Van den Brink, G. R., J. C. Hardwick, *et al.* (2001). "Sonic hedgehog regulates gastric gland morphogenesis in man and mouse." *Gastroenterology* **121**(2): 317-328.
- [410] Vaughan, A. T., A. Roghanian, *et al.* (2011). "B cells--masters of the immunoverse." *Int J Biochem Cell Biol* **43**(3): 280-285.
- [411] Viala, J., C. Chaput, *et al.* (2004). "Nod1 responds to peptidoglycan delivered by the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island." *Nat Immunol* **5**(11): 1166-1174.
- [412] Wada, A., N. Mori, *et al.* (1999). "Induction of human beta-defensin-2 mRNA expression by *Helicobacter pylori* in human gastric cell line MKN45 cells on cag pathogenicity island." *Biochem Biophys Res Commun* **263**(3): 770-774.
- [413] Wagner, T. U. (2007). "Bone morphogenetic protein signaling in stem cells--one signal, many consequences." *FEBS J* **274**(12): 2968-2976.

- [414] Wald, N. J., M. R. Law, *et al.* (1997). "Helicobacter pylori infection and mortality from ischaemic heart disease: negative result from a large, prospective study." *Bmj* **315**(7117): 1199-1201.
- [415] Walz, A., R. Burgener, *et al.* (1991). "Structure and neutrophil-activating properties of a novel inflammatory peptide (ENA-78) with homology to interleukin 8." *J Exp Med* **174**(6): 1355-1362.
- [416] Walz, A., P. Schmutz, *et al.* (1997). "Regulation and function of the CXC chemokine ENA-78 in monocytes and its role in disease." *J Leukoc Biol* **62**(5): 604-611.
- [417] Wang, F., P. Xia, *et al.* (2008). "Helicobacter pylori VacA disrupts apical membrane-cytoskeletal interactions in gastric parietal cells." *J Biol Chem* **283**(39): 26714-26725.
- [418] Wang, T. C., C. A. Dangler, *et al.* (2000). "Synergistic interaction between hypergastrinemia and Helicobacter infection in a mouse model of gastric cancer." *Gastroenterology* **118**(1): 36-47.
- [419] Wang, T. C., J. R. Goldenring, *et al.* (1998). "Mice lacking secretory phospholipase A2 show altered apoptosis and differentiation with Helicobacter felis infection." *Gastroenterology* **114**(4): 675-689.
- [420] a. Watanabe, T., N. Asano, *et al.* (2010). "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): 1645-1662.
- [421] b. Watanabe, T., N. Asano, *et al.* (2010). "NOD1-Mediated Mucosal Host Defense against Helicobacter pylori." *Int J Inflam* **2010**: 476482.
- [422] Watanabe, T., M. Tada, *et al.* (1998). "Helicobacter pylori infection induces gastric cancer in mongolian gerbils." *Gastroenterology* **115**(3): 642-648.
- [423] Watanabe, Y., J. H. Kurata, *et al.* (1997). "Helicobacter pylori infection and gastric cancer. A nested case-control study in a rural area of Japan." *Dig Dis Sci* **42**(7): 1383-1387.
- [424] Watt, F. M. and B. L. Hogan (2000). "Out of Eden: stem cells and their niches." *Science* **287**(5457): 1427-1430.
- [425] Weaver, C. T., R. D. Hatton, *et al.* (2007). "IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages." *Annu Rev Immunol* **25**: 821-852.
- [426] Webb, P. M., M. C. Yu, *et al.* (1996). "An apparent lack of association between Helicobacter pylori infection and risk of gastric cancer in China." *Int J Cancer* **67**(5): 603-607.
- [427] Weeks, D. L., S. Eskandari, *et al.* (2000). "A H⁺-gated urea channel: the link between Helicobacter pylori urease and gastric colonization." *Science* **287**(5452): 482-485.
- [428] Wehkamp, J., K. Schmidt, *et al.* (2003). "Defensin pattern in chronic gastritis: HBD-2 is differentially expressed with respect to Helicobacter pylori status." *J Clin Pathol* **56**(5): 352-357.
- [429] Wen, S., C. P. Felley, *et al.* (2004). "Inflammatory gene profiles in gastric mucosa during Helicobacter pylori infection in humans." *J Immunol* **172**(4): 2595-2606.
- [430] Willhite, D. C., T. L. Cover, *et al.* (2003). "Cellular vacuolation and mitochondrial cytochrome c release are independent outcomes of Helicobacter pylori vacuolating

- cytotoxin activity that are each dependent on membrane channel formation." *J Biol Chem* **278**(48): 48204-48209.
- [431] Williams, C. S., W. Smalley, *et al.* (1997). "Aspirin use and potential mechanisms for colorectal cancer prevention." *J Clin Invest* **100**(6): 1325-1329.
- [432] Wilson, K. T., K. S. Ramanujam, *et al.* (1996). "Helicobacter pylori stimulates inducible nitric oxide synthase expression and activity in a murine macrophage cell line." *Gastroenterology* **111**(6): 1524-1533.
- [433] Wilson, N. J., K. Boniface, *et al.* (2007). "Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells." *Nat Immunol* **8**(9): 950-957.
- [434] Wroblewski, L. E., R. M. Peek, Jr., *et al.* (2010). "Helicobacter pylori and gastric cancer: factors that modulate disease risk." *Clin Microbiol Rev* **23**(4): 713-739.
- [435] Wu, J. Y., H. Lu, *et al.* (2006). "Balance between polyoma enhancing activator 3 and activator protein 1 regulates Helicobacter pylori-stimulated matrix metalloproteinase 1 expression." *Cancer Res* **66**(10): 5111-5120.
- [436] Wu, Y. Y., H. F. Tsai, *et al.* (2007). "Upregulation of CCL20 and recruitment of CCR6+ gastric infiltrating lymphocytes in Helicobacter pylori gastritis." *Infect Immun* **75**(9): 4357-4363.
- [437] Xu, C., M. S. Inokuma, *et al.* (2001). "Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells." *Nat Biotechnol* **19**(10): 971-974.
- [438] Xu, S. and X. Cao (2010). "Interleukin-17 and its expanding biological functions." *Cell Mol Immunol* **7**(3): 164-174.
- [439] Yamanishi, S., T. Iizumi, *et al.* (2006). "Implications for induction of autoimmunity via activation of B-1 cells by Helicobacter pylori urease." *Infect Immun* **74**(1): 248-256.
- [440] Yamaoka, Y., M. Kita, *et al.* (1996). "Helicobacter pylori cagA gene and expression of cytokine messenger RNA in gastric mucosa." *Gastroenterology* **110**(6): 1744-1752.
- [441] Yamaoka, Y., M. Kita, *et al.* (1997). "Induction of various cytokines and development of severe mucosal inflammation by cagA gene positive Helicobacter pylori strains." *Gut* **41**(4): 442-451.
- [442] Yamaoka, Y., M. Kita, *et al.* (1998). "Chemokines in the gastric mucosa in Helicobacter pylori infection." *Gut* **42**(5): 609-617.
- [443] Yamaoka, Y., T. Kodama, *et al.* (2001). "Relation between cytokines and Helicobacter pylori in gastric cancer." *Helicobacter* **6**(2): 116-124.
- [444] Yamaoka, Y., T. Kudo, *et al.* (2004). "Role of interferon-stimulated responsive element-like element in interleukin-8 promoter in Helicobacter pylori infection." *Gastroenterology* **126**(4): 1030-1043.
- [445] Yamaoka, Y., D. H. Kwon, *et al.* (2000). "A M(r) 34,000 proinflammatory outer membrane protein (oipA) of Helicobacter pylori." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(13): 7533-7538.
- [446] Yamaoka, Y., O. Ojo, *et al.* (2006). "Helicobacter pylori outer membrane proteins and gastroduodenal disease." *Gut* **55**(6): 775-781.

- [447] Yang, Y. C., S. W. Wang, *et al.* (2007). "Isolation and characterization of human gastric cell lines with stem cell phenotypes." *J Gastroenterol Hepatol* **22**(9): 1460-1468.
- [448] Yates, A. and I. Chambers (2005). "The homeodomain protein Nanog and pluripotency in mouse embryonic stem cells." *Biochem Soc Trans* **33**(Pt 6): 1518-1521.
- [449] Ye, G., C. Barrera, *et al.* (1997). "Expression of B7-1 and B7-2 costimulatory molecules by human gastric epithelial cells: potential role in CD4+ T cell activation during *Helicobacter pylori* infection." *J Clin Invest* **99**(7): 1628-1636.
- [450] Yen, T. H. and N. A. Wright (2006). "The gastrointestinal tract stem cell niche." *Stem Cell Rev* **2**(3): 203-212.
- [451] Yoshida, A., H. Isomoto, *et al.* (2009). "Enhanced expression of CCL20 in human *Helicobacter pylori*-associated gastritis." *Clin Immunol* **130**(3): 290-297.
- [452] Yuasa, Y. (2003). "Control of gut differentiation and intestinal-type gastric carcinogenesis." *Nat Rev Cancer* **3**(8): 592-600.
- [453] Zaia, A. A., K. J. Sappington, *et al.* (2009). "Subversion of antimicrobial calprotectin (S100A8/S100A9 complex) in the cytoplasm of TR146 epithelial cells after invasion by *Listeria monocytogenes*." *Mucosal Immunol* **2**(1): 43-53.
- [454] Zangrossi, S., M. Marabese, *et al.* (2007). "Oct-4 expression in adult human differentiated cells challenges its role as a pure stem cell marker." *Stem Cells* **25**(7): 1675-1680.
- [455] Zhao, C., I. Wang, *et al.* (1996). "Widespread expression of beta-defensin hBD-1 in human secretory glands and epithelial cells." *FEBS Lett* **396**(2-3): 319-322.
- [456] Zhao, R. and G. Q. Daley (2008). "From fibroblasts to iPS cells: induced pluripotency by defined factors." *J Cell Biochem* **105**(4): 949-955.
- [457] Zheng, P. Y. and N. L. Jones (2003). "*Helicobacter pylori* strains expressing the vacuolating cytotoxin interrupt phagosome maturation in macrophages by recruiting and retaining TACO (coronin 1) protein." *Cell Microbiol* **5**(1): 25-40.
- [458] Zlotnik, A. and O. Yoshie (2000). "Chemokines: a new classification system and their role in immunity." *Immunity* **12**(2): 121-127.
- [459] Zullo, A., C. Hassan, *et al.* (2009). "Eradication therapy for *Helicobacter pylori* in patients with gastric MALT lymphoma: a pooled data analysis." *Am J Gastroenterol* **104**(8): 1932-1937; quiz 1938.

