



HAL
open science

Apport des modèles murins dans la compréhension de la lymphomagénèse gastrique induite par l'infection à *Helicobacter pylori*

Pauline Floch

► **To cite this version:**

Pauline Floch. Apport des modèles murins dans la compréhension de la lymphomagénèse gastrique induite par l'infection à *Helicobacter pylori*. Immunologie. Université de Bordeaux, 2016. Français. NNT : 2016BORD0210 . tel-01674213v1

HAL Id: tel-01674213

<https://theses.hal.science/tel-01674213v1>

Submitted on 2 Jan 2018 (v1), last revised 2 Jan 2018 (v2)

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.

THÈSE PRÉSENTÉE
POUR OBTENIR LE GRADE DE
DOCTEUR DE
L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ
SPÉCIALITÉ MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE

Par Pauline FLOCH

**Apport des modèles murins dans la compréhension de la
lymphomagénèse gastrique induite par l'infection à
*Helicobacter pylori***

Sous la direction de Philippe LEHOURS

Soutenue le 15 novembre 2016

Membres du jury :

M. OSWALD, Eric	Professeur, Université de Toulouse, ENVT	Président
Mme JOSENHANS, Christine	Professeur, Hannover Medical School	Rapporteur
Mme TOUATI, Eliette	Chargé de recherche, Institut Pasteur	Rapporteur
Mme COPIE-BERGMAN, Christiane	Professeur, INSERM U955, Créteil	Examineur
Mme PEREYRE, Sabine	Maître de conférences, Université de Bordeaux	Examineur
M. MEGRAUD, Francis	Professeur, Université de Bordeaux	Examineur
M. LEHOURS, Philippe	Professeur, Université de Bordeaux	Directeur de thèse

Remerciements

J'adresse toute ma reconnaissance et mes remerciements à l'ensemble des personnes qui ont contribué à la réalisation de cette thèse :

A Monsieur le Professeur Philippe Lehours pour m'avoir accordé sa confiance. Merci pour ton soutien, tes conseils et ta rigueur scientifique qui m'ont permis de me dépasser pour la réalisation de ce travail.

A Monsieur le Professeur Francis Mégraud pour son accueil chaleureux au sein du laboratoire que ce soit du côté universitaire mais également hospitalier.

A Monsieur le Professeur Pierre Dubus pour son aide et son expertise anatomopathologique pour l'analyse des modèles murins.

A Amandine et Caroline pour leur collaboration précieuse à ce travail.

A l'ensemble de l'unité U1053, plus particulièrement ceux qui ont participé à ce projet, Alban, Elodie, Lucie C, Julien G, Julien I, ainsi que tous les autres grâce auxquels je prends plaisir à travailler chaque jour au laboratoire. Un grand merci à mes co-thésardes, Christelle, Sarah et Silvia, pour leur bonne humeur et leurs conseils avisés !

A l'ensemble des membres du CNRCH pour leur aide en particulier Lucie B, Astrid et Alice.

A l'ensemble des collaborateurs de ce projet pour leur disponibilité et leur patience : Cathy Staedel pour son aide pour l'étude des microARNs, Antonio Bandeira pour son expertise immunologique, Michael Hahne de nous avoir mis à disposition les souris transgéniques APRIL, Pierre Costet et l'ensemble du personnel de l'animalerie conventionnelle, Benoît Rousseau et l'ensemble du personnel de l'animalerie A2, Xavier Gauthereau de la plateforme de RT PCR et Vincent Pitard de la plateforme de cytométrie en flux.

A Madame Lindsay Mégraud pour son aide dans la correction des articles de cette thèse et sa disponibilité.

Aux membres du jury de cette thèse qui me font l'honneur de juger ce travail.

A l'ensemble du laboratoire de Bactériologie, particulièrement à l'ancienne équipe de Haut-Lévêque dont le Dr Olivia Peuchant, pour leur soutien. A mes co-AHUs, Aurélie et Julien, pour leur présence, leur aide et leur bonne humeur, notamment ces derniers mois.

A ma famille et mes amis.

Abréviations

APC : *Adenomatous Polyposis Coli*

APRIL : *a proliferation-inducing ligand*

BabA : *Blood group antigen-binding adhesin*

BMDC : *Bone Marrow-Derived Cell*

cagPAI : îlot de pathogénicité cag

CSC : Cellule Souche Cancéreuse (*Cancer Stem Cell*)

DC: cellules dendritiques

EMT : Transition Epithélio-Mésenchymateuse

GGT : gamma-glutamyl transpeptidase

IL : interleukine

LLC : leucémie lymphoïde chronique

LGM : Lymphome Gastrique du MALT

LLE : lésions lympho-épithéliales

LPS : Lipopolysaccharide

LTreg : lymphocytes T régulateur

MALT : *Mucosa Associated Lymphoid Tissue*, tissu lymphoïde associé aux muqueuses

miR : microARN

NF-κB : Facteur Nucléaire Kappa B

NK : Cellules *Natural Killer*

PAMP : *Pathogen-Associated Molecular Patterns*, profils moléculaires associés aux Pathogènes

PNN : polynucléaire neutrophile

ROS : dérivés actifs de l'oxygène

RNS : dérivés actifs de l'azote

RT-qPCR : *Reverse Transcription- quantitative Polymerase Chain Reaction*

SabA : *Sialic acid-binding adhesin*

SH2 : *Src Homology 2*

SST4 : *Système de Sécrétion de Type 4*

TLR : *Toll Like Receptor*

TNF α : *Tumor Necrosis Factor α*

Liste des figures

- Figure 1** : Morphologie de *H. pylori* en microscopie électronique
- Figure 2** : Arbre phylogénique représentant les différents taxons du genre *Helicobacter*
- Figure 3** : Prévalence de l'infection à *H. pylori* dans le monde
- Figure 4** : Pathologies induites par l'infection à *H. pylori*
- Figure 5** : Cascade des lésions histologiques induites par l'infection à *H. pylori* menant à l'adénocarcinome gastrique de type intestinal
- Figure 6** : Système de sécrétion de type 4 de *H. pylori*
- Figure 7** : Diversité structurale de CagA
- Figure 8** : Structure de CagA
- Figure 9** : Rôle de CagA dans la signalisation cellulaire induite via le système de sécrétion de type 4
- Figure 10** : Organisation et diversité génétique de VacA
- Figure 11** : Structure possible du LPS de la souche de référence 26695 de *H. pylori*
- Figure 12** : Reconnaissance et échappement de *H. pylori* aux PRRs
- Figure 13** : Activation des NLRs, de la voie du NF- κ B et de la caspase 1 suite à l'infection par *H. pylori*
- Figure 14** : Réponse immunitaire suite à l'infection par *H. pylori*
- Figure 15** : *Gastric mapping*
- Figure 16** : Caractéristiques histologiques des plaques de Peyer
- Figure 17** : Aspect anatomopathologique caractéristique du LGM
- Figure 18** : Algorithme de traitement du LGM
- Figure 19** : *H. pylori* et lymphomagenèse gastrique du MALT
- Figure 20** : Organisation génomique des microARNs
- Figure 21** : Formation des microARNs et mécanismes d'action
- Figure 22** : APRIL et ses récepteurs
- Figure 23** : Production de APRIL par les macrophages infiltrant la tumeur

Liste des tableaux

Tableau 1 : Autres facteurs de virulence de virulence de *H. pylori* et fonctions associées

Tableau 2 : Score de Wotherspoon décrivant les critères histologiques de diagnostic de LGM

Tableau 3 : Système de classification de Lugano

Tableau 4 : Translocations chromosomiques récurrentes décrites dans les lymphomes du MALT

Tableau 5 : Molécules disponibles pour le traitement par chimiothérapie du LGM selon les recommandations Américaines et européennes

Tableau 6 : Critères d'évaluation post-traitement du LGM selon le GELA (Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte)

Sommaire

Introduction.....	8
Etude Bibliographique.....	11
I. <i>Helicobacter pylori</i>	12
I.1 Caractères généraux	12
I.2 Epidémiologie	15
I.3 Pathologies induites par <i>H. pylori</i>	16
I.3.1 Gastrite.....	17
I.3.2 Ulcères	17
I.3.3 Adénocarcinome gastrique.....	18
I.3.4 Lymphome gastrique du MALT	20
I.3.5 Pathologies extra-gastriques	21
I.4 Facteurs de virulence.....	21
I.4.1 Facteurs de virulence importants pour la colonisation de l'hôte	21
I.4.2 Ilot de pathogénicité <i>cag</i>	25
I.4.3 VacA	33
I.4.4 Lipopolysaccharide	35
I.4.5 Spécificité des souches de lymphome gastrique du MALT.....	37
II. Réponse inflammatoire et infection à <i>H. pylori</i>	40
II.1 Immunité innée et inflammation	40
II.2 Immunité adaptative	45
III. Lymphome gastrique du MALT	49
III.1 Introduction	49
III.2 Infection à <i>H. pylori</i> et lymphome gastrique du MALT.....	49
III.3 Clinique	51
III.4 Aspects endoscopiques	51
III.5 Aspect anatomopathologique	52
III.6 Anomalies moléculaires	57
III.7 Traitement.....	59
III.7.1 Traitement d'éradication de <i>H. pylori</i>	61
III.7.2 Alternatives thérapeutiques	61
III.7.3 Suivi post-traitement.....	63

III.8	Physiopathologie	64
IV.	Modèles animaux d'étude de l'infection à <i>H. pylori</i>	70
IV.1	Quelle espèce ?	70
IV.2	La gerbille de Mongolie	72
IV.3	Modèles murins	73
IV.3.1	BALB/c	74
IV.3.2	C57BL6	74
IV.4	Modèles alternatifs	75
IV.5	Modèles animaux et lymphome gastrique du MALT	76
	Objectifs.....	79
	Résultats expérimentaux.....	81
	Article n°1	82
	Article n°2.....	84
	Article n°3.....	86
	Article n°4.....	93
	Discussion – Conclusion.....	100
	Bibliographie.....	106

Introduction

Plus de trente ans se sont écoulés depuis la découverte de *Helicobacter pylori* (246). Cette bactérie, strictement adaptée à l'estomac humain, est unique à plus d'un titre et l'importance reconnue de cette infection dans diverses pathologies gastriques a valu à ces deux médecins d'être lauréats du Prix Nobel de Médecine. Depuis sa découverte, elle a fait l'objet de nombreuses études et le domaine de la gastro-entérologie a vécu plusieurs révolutions dans le traitement de pathologies liées en fait à *H. pylori*. Ainsi, le traitement de l'ulcère ou du lymphome gastrique du MALT (tissu lymphoïde associé aux muqueuses) ou LGM passe à présent par un traitement d'éradication de *H. pylori* en première ligne.

Le développement du LGM est directement lié à l'infection par *H. pylori* mais n'apparaît que chez un nombre très restreint de sujets infectés (moins de 0,1% des sujets infectés) (213). Dans cette pathologie la stimulation antigénique chronique exercée par *H. pylori* sur la muqueuse gastrique entraîne un recrutement de lymphocytes et entretient une prolifération monoclonale de lymphocytes B s'organisant en follicules lymphoïdes de type MALT normalement absents de la muqueuse gastrique. Cette infiltration est associée à des lésions lympho-épithéliales (LLE) impliquant les lymphocytes B. La prolifération des lymphocytes B néoplasiques est activée par les lymphocytes T CD4⁺ non néoplasiques via la costimulation CD40L-CD40. Les lymphocytes T CD8⁺ présents au sein des infiltrats perdent dans cette pathologie leur capacité d'induire l'apoptose des cellules B (104). L'éradication de la bactérie par des antibiotiques permet, dans 60 à 80 % des cas, la régression du LGM au stade de faible degré de malignité de la maladie (446). Cependant, des translocations chromosomiques peuvent apparaître et conduire à une lymphoprolifération indépendante de la stimulation antigénique bactérienne (320). Toutefois, les mécanismes physiopathologiques conduisant au LGM notamment les réponses inflammatoires, immunologiques et cellulaires ne sont pas clairement élucidés.

Afin de mieux comprendre la physiopathologie de ce lymphome et faute de pouvoir avoir accès à des pièces chirurgicales post-gastrectomies de patients atteints de LGM, plusieurs équipes se sont attachées à reproduire cette pathologie chez l'animal. Trois espèces du genre *Helicobacter* : *Helicobacter felis* (275), *Helicobacter heilmannii* (114) et *H. pylori* (58), et trois hôtes différents, la souris BALB/c, la souris C57BL6 ou la gerbille de Mongolie, ont été principalement utilisées. L'équipe INSERM « *Helicobacter* infection: inflammation and cancer » (INSERM U1053-UMR BaRITOn) au sein de laquelle j'ai réalisé ma thèse, a récemment décrit un modèle basé sur l'utilisation de souris BALB/c thymectomisées à 3 jours de vie infectées par *H. pylori* pour étudier la physiopathologie du LGM (58).

A partir du matériel d'étude de ce travail, l'objectif de ma thèse a tout d'abord été de participer à la caractérisation de la réponse inflammatoire impliquée dans le recrutement, la prolifération et le

développement d'infiltrats lymphoïdes au sein de la muqueuse gastrique des souris développant un LGM (Article n°1).

Nous avons ensuite tenté de clarifier l'effet de la thymectomie néonatale sur les réserves en Lymphocytes T régulateurs au niveau des organes de réserve et tenté d'évaluer leur présence et leur rôle au niveau du site de lymphomagenèse (Article n°2).

Lors de la troisième partie de notre travail, nous nous sommes intéressés aux mécanismes moléculaires conduisant au développement du LGM via l'étude des microARNs (Article n°3). En effet, ces petits ARNs non codant sont des acteurs majeurs de la régulation post-transcriptionnelle des gènes et sont impliqués dans le développement, la prolifération et la différenciation cellulaire ainsi que dans la régulation de la réponse immune.

La dernière étape de notre travail a consisté au développement d'un modèle alternatif de LGM, plus facile à mettre en place que celui basé sur la thymectomie néonatale (Article n°4).

Ce manuscrit est composé d'une partie bibliographique composée de quatre chapitres (une partie générale sur *H. pylori*, une deuxième dédiée à la réponse inflammatoire induite par la bactérie, suivie d'une partie générale sur le lymphome gastrique du MALT et pour terminer, la présentation des modèles animaux d'étude de l'infection) suivie de quatre publications originales récapitulant les principaux résultats obtenus pendant ces trois années de préparation.

Etude bibliographique

I. *Helicobacter pylori*

Des études phylogénétiques indiquent que *H. pylori* colonise l'estomac humain depuis au moins 88 000 à 116 000 ans (267). Si cette bactérie semble aussi âgée que l'homme, elle a été isolée et cultivée pour la première fois en 1982 par deux chercheurs australiens, R. Warren et B. Marshall. La première description de la présence d'une bactérie hélicoïdale dans les estomacs humains date pourtant de la fin du XIX^{ème} siècle (193) et a été suivie par plusieurs descriptions chez des patients souffrant d'ulcères ou de cancers gastriques au cours du XX^{ème} siècle, mais la culture de cette bactérie avait jusqu'alors échoué. R. Warren et B. Marshall démontrèrent par la suite que cette bactérie causait des ulcères gastriques en remplissant efficacement les postulats de Koch (246). Cette découverte leur valut le prix Nobel de physiologie et de médecine en 2005. En 1994, *H. pylori* a été classée parmi les agents carcinogènes de classe I par l'agence internationale de recherche contre le cancer (IARC) pour son implication dans les cancers de l'estomac. Il s'agit de la première bactérie carcinogène reconnue. L'infection à *H. pylori* représente en effet la principale cause de cancers induits par un agent pathogène. Environ 5,5% des cancers dans le monde sont attribuables à cette bactérie (311).

I.1 Caractères généraux

H. pylori est un bacille spiralé à Gram négatif de 0,5 à 0,9 µm de large et de 2 à 4 µm de long appartenant à la superfamille des epsilonprotéobactéries et à la famille des *Helicobacteraceae*. Initialement nommé *Campylobacter pyloridis*, il fut renommé ainsi en 1989 à cause de sa forme spiralée (139). Il est doté de 2 à 6 flagelles qui lui permettent de se déplacer dans le mucus qui recouvre la paroi de l'estomac (Figure 1). Sa principale caractéristique sur le plan biochimique est son uréase qui est très active. Il possède également une catalase, une cytochrome oxydase et une gamma-glutamyl transpeptidase (GGT). Il ne fermente pas les sucres et n'hydrolyse pas l'hippurate (256) (309) (253). *Ex vivo*, la croissance de *H. pylori* est difficile et nécessite des milieux riches additionnés de sang, de sérum ou de suppléments d'enrichissement (309). La bactérie est sensible à la composition gazeuse de l'environnement et pousse dans une atmosphère microaérobie à une température comprise entre 33 et 40°C (256) (309). Il possède un génome de petite taille (environ 1,6 Mégabases) (395).



Figure 1 : Morphologie de *H. pylori* en microscopie électronique (x 30 000). D'après <http://www.u-bordeaux.fr/Actualites/De-la-recherche/Clouer-Helicobacter-pylori-au-pilori>. *H. pylori* est un bacille spiralé de 0,5 à 0,9 μm de large et de 2 à 4 μm de long possédant 2 à 6 flagelles lui permettant de se déplacer dans le mucus gastrique.

Le genre *Helicobacter* regroupe actuellement 30 espèces validées (258). En fonction des niches spécifiques auxquelles ils sont associés, les Hélicobacters sont divisés en deux groupes : les Hélicobacters gastriques comprenant *H. pylori* et *H. felis* notamment et les Hélicobacters entéro-hépatiques colonisant le tractus gastro-intestinal et les voies biliaires (Figure 2).

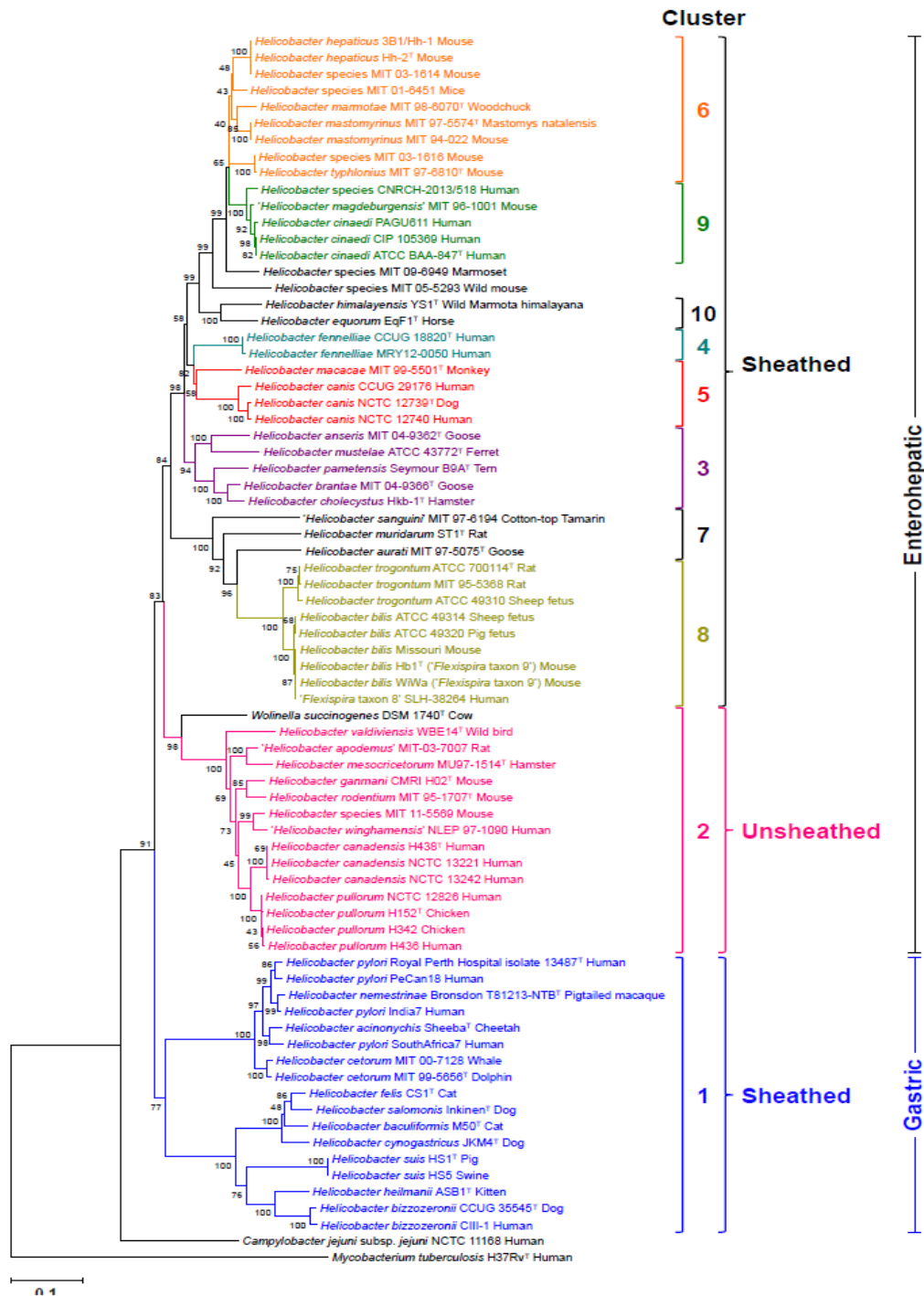


Figure 2 : Arbre phylogénique représentant les différents taxons du genre *Helicobacter*. Figure reproduite d'après Ménard *et al.* (258). L'arbre phylogénique présenté est basé sur l'alignement d'environ 700 résidus de la protéine GyrA. Il a été réalisé avec la méthode du neighbor-joining. La séquence du gène *GyrA* de *Mycobacterium tuberculosis* a été utilisée comme séquence de groupe externe. Cet arbre permet une séparation des Hélicobacters gastriques et entéro-hépatiques, et différencie parmi ces derniers les espèces dont les flagelles sont gainés (*sheathed*) de celles qui ont des flagelles non-gainés (*unsheathed*).

I.2 Epidémiologie

L'infection à *H. pylori* est l'infection bactérienne chronique la plus répandue. Elle s'acquiert généralement pendant l'enfance mais persiste toute la vie tant qu'il n'y a pas d'éradication (254). Le taux d'infection varie en fonction de nombreux critères comme l'âge, l'origine géographique et les conditions de vie. L'homme peut être contaminant par deux moyens : la voie orale ou par ses selles. Le mode d'infection est lié à la promiscuité qui constitue un terrain favorable à la transmission de personne à personne de manière oro-orale et surtout gastro-orale. La contamination peut en effet se faire par un contact direct avec la salive infectée par des régurgitations ou lors des vomissements. C'est pourquoi *H. pylori* se transmet le plus souvent au sein d'une même famille, en particulier dans le sens parent-enfant ou entre enfants car ces derniers sont plus sensibles. Parmi les facteurs favorisant la transmission de l'infection, on retrouve la vie en collectivité, le partage des couverts ou l'habitude de mastiquer les aliments donnés aux nourrissons (40). La transmission par les selles, suite à un contact par l'intermédiaire des mains ou encore à cause de l'eau et d'aliments contaminés, est plus rare et se rencontre plutôt dans les pays en voie de développement où l'hygiène est déficiente.

Ainsi, dans les pays en voie de développement, l'infection est très rapidement acquise en raison des conditions d'hygiène et de la promiscuité : on estime que 80 % de la population y est touchée avant l'âge de 20 ans (94) (Figure 3). En revanche, dans les pays développés, 1 adulte sur 5 est infecté à l'âge de 20 ans (254). En France, 5 à 10 % des enfants sont infectés et l'infection est rare avant 4 ans. Ce chiffre atteint 20 à 50 % chez les adultes. Après 60 ans, c'est près d'un français sur deux qui est infecté (406). Avec l'amélioration des conditions de vie et d'hygiène dans les pays développés, l'infection est moins fréquente pour les nouvelles générations que pour les anciennes (254) (241). En Europe, les migrants sont plus fréquemment infectés que les populations d'origine et le taux d'infection est plus important quand le niveau socio-économique est bas (349).

H. pylori est l'espèce inféodée à l'homme et ne vit que dans l'estomac humain. La transmission est interhumaine. Certains animaux ont été incriminés, la bactérie a en effet été détectée chez le chat domestique et quelques primates mais ces réservoirs anecdotiques ne jouent pas de rôle dans la transmission à l'homme (52). Les animaux ont d'ailleurs leur propre flore de *Helicobacter* qui colonise leur tube digestif. La bactérie pourrait également survivre plusieurs jours dans un milieu aquatique (200) (379).



Figure 3 : Prévalence de l'infection à *H. pylori* dans le monde. D'après Azevedo *et al.* (15) La carte est basée sur les données collectées par Lunet *et al.* (237) et complétée par d'autres études (410) (291) (21) (203) (62) (2) (163) (431). Les données ont été obtenues principalement par sérologie. N. D. absence d'étude de la prévalence de *H. pylori*.

I.3 Pathologies induites par *H. pylori*

H. pylori est une bactérie pathogène qui entraîne toujours une réaction inflammatoire de la muqueuse gastrique. L'inflammation gastrique ou gastrite liée à *H. pylori* est asymptomatique dans la majorité des cas. Pour environ 0,1% des personnes infectées, la gastrite évolue vers le lymphome gastrique du MALT. Pour 5 à 10% des patients, la gastrite évolue vers un ulcère gastrique ou duodéal. Enfin, pour les patients qui présentent une gastrite atrophique, 1% auront une évolution de la gastrite vers un adénocarcinome (Figure 4).

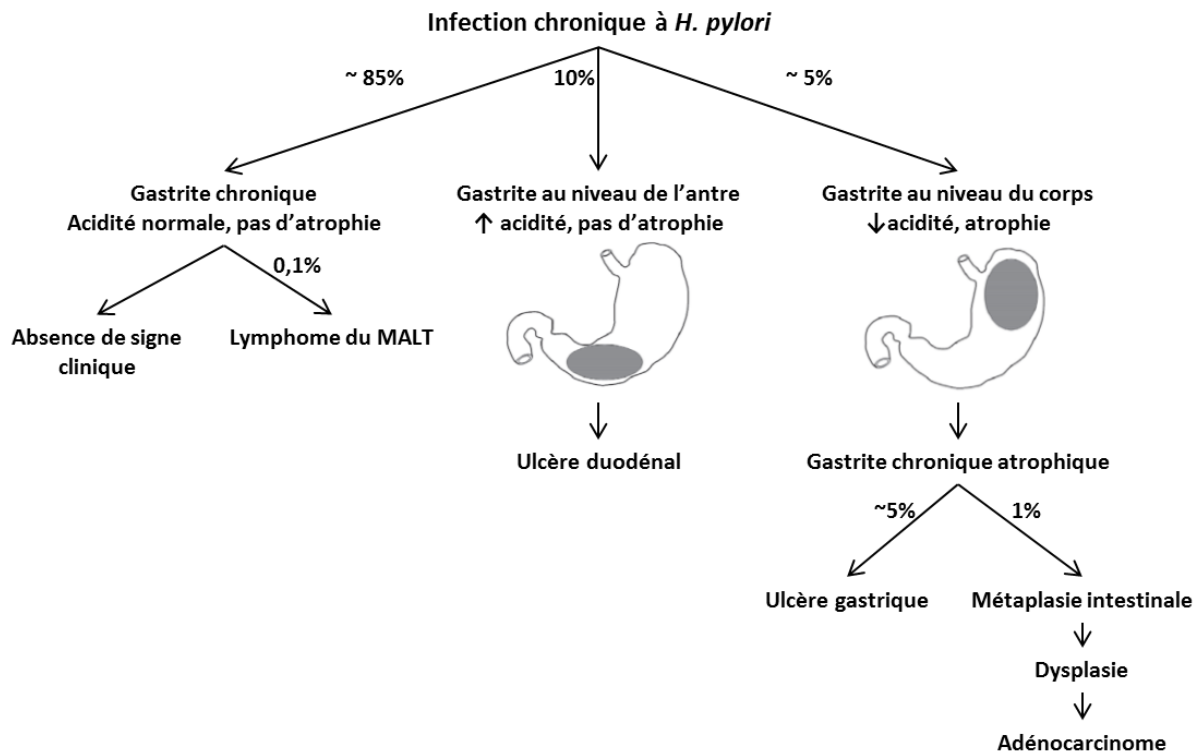


Figure 4 : Pathologies induites par l'infection à *H. pylori*. Figure reproduite d'après Megraud *et al.* (255).

I.3.1 Gastrite

La bactérie provoque chez la personne infectée une gastrite chronique qui persiste toute la vie si l'infection n'est pas traitée. Elle aboutit à une diminution du nombre de glandes gastriques (79). Le plus souvent, elle est d'évolution silencieuse sans manifestations ou symptômes particuliers mais elle peut évoluer dans 5 à 10 % des cas d'infections vers des pathologies plus graves.

I.3.2 Ulcères

La gastrite peut évoluer vers des formes pathologiques non malignes comme l'ulcère gastrique ou duodénal (164). Il est aujourd'hui estimé que 5 à 10% des patients infectés par *H. pylori* développent un ulcère gastrique ou duodénal au cours de leur vie. Le mécanisme pathologique supposé passerait par une augmentation de l'inflammation gastrique, avec une augmentation de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-8, l'IL-1 β et le *Tumor Necrosis Factor α* (TNF α) (205). Concernant l'ulcère duodénal, l'infection serait responsable d'une augmentation de l'acidité gastrique, due à une modification de la synthèse hormonale de somatostatine. L'hyperchlorhydrie gastrique conduirait à une augmentation de l'acidité au niveau du duodénum qui produirait alors une

métaplasie antrale protectrice. Alors qu'en condition physiologique *H. pylori* ne peut infecter le duodénum, cette métaplasie permet la colonisation par *H. pylori*, provoquant une inflammation locale qui fragilise la muqueuse et prédispose à l'apparition d'un ulcère duodéal (13).

I.3.3 Adénocarcinome gastrique

L'adénocarcinome gastrique est un cancer hétérogène. D'un point de vue anatomopathologique, il est nécessaire de distinguer deux grands groupes d'adénocarcinomes en fonction de leur localisation : les tumeurs du cardia, situées au niveau de la jonction avec l'œsophage (partie proximale de l'estomac), qui pour la plupart ne sont pas liées à l'infection à *H. pylori*, et celles de la partie distale de l'estomac, situées au niveau du corps ou de l'antrum gastrique. L'infection par *H. pylori* est associée uniquement aux cancers distaux.

Selon des critères histologiques établis par Lauren, il existe deux types d'adénocarcinomes gastriques : le type intestinal et le type diffus (219). Le type intestinal est le plus fréquent et présente sur le plan anatomo-pathologique une structure identique au cancer du côlon. Une évolution lente est observée : suite à l'inflammation chronique de la muqueuse gastrique induite par *H. pylori*, des lésions préneoplasiques se développent successivement, atrophie gastrique, métaplasie intestinale, dysplasie puis carcinome gastrique (429) (Figure 5). L'évolution de ces lésions histopathologiques est connue sous le nom de «cascade de Correa», en référence à l'auteur qui fut le premier à la décrire avant la découverte de *H. pylori* (66). Il avait déjà été noté qu'au terme de ce processus, 1% des gastrites chroniques évoluent vers le cancer (65). Il est admis que l'éradication de *H. pylori* a le potentiel de prévenir l'évolution vers l'adénocarcinome gastrique (243). Il n'y a pas de profils de mutations successives typiques de cette évolution, contrairement aux mutations APC (*Adenomatous Polyposis Coli*) et autres décrites dans le cancer du côlon, ou aux mutations KRAS décrites dans le cancer du poumon et présentes dès le stade de métaplasie intestinale. En revanche, il a été démontré dans un modèle murin que l'infection par *H. pylori* est un agent mutagène. Cette génotoxicité peut être attribuable aux dommages oxydatifs de l'ADN impliqués dans la réponse inflammatoire de l'hôte (413). De plus *H. pylori* affecte les mécanismes de réparation de l'ADN rendant les cellules épithéliales gastriques plus sensibles à l'accumulation de mutations (239). *H. pylori* a par ailleurs un effet carcinogène direct via la production de facteurs de pathogénicité comme la protéine CagA. Cet aspect sera développé dans le paragraphe I.4 Facteurs de virulence.

Lors de la carcinogénèse gastrique *H. pylori* induit une transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) générant ainsi des cellules possédant des propriétés de cellules souches cancéreuses (CSC) (32). Ces cellules cancéreuses ont pour origine pour deux tiers des progéniteurs locaux mais peuvent

également se développer à partir de cellules dérivant de la moelle osseuse (*bone marrow-derived cells* ou BMDC). En effet suite aux lésions inflammatoires induites par l'infection à *H. pylori*, des cellules mésenchymateuses circulantes de type BMDC sont recrutées au sein de la muqueuse gastrique et contribuent à la régénération des tissus. Le processus infectieux étant toujours présent, les cellules ne se différencient pas correctement pour réparer la muqueuse gastrique et se transforment en CSC (428).

L'adénocarcinome gastrique de type diffus ne présente pas ces différentes étapes et survient plus fréquemment chez les personnes plus jeunes. Des mutations du gène codant pour l'E-cadhérine (*cdh1*) sont retrouvées chez environ 30% des cas. Cette protéine joue un rôle fondamental dans l'adhésion cellulaire et assure le maintien de l'architecture cellulaire. Certaines formes familiales de ce type de cancer existent et la prédisposition évolue selon un mode autosomique dominant. Des mutations somatiques au niveau des gènes codant pour la β -caténine ou l'APC ont également été retrouvées dans ce type de cancer. De même, une publication rapporte la présence de mutations au niveau de la séquence du gène codant pour la protéine IQGAP1, dans de rares cas de cancers gastriques de type diffus (273).

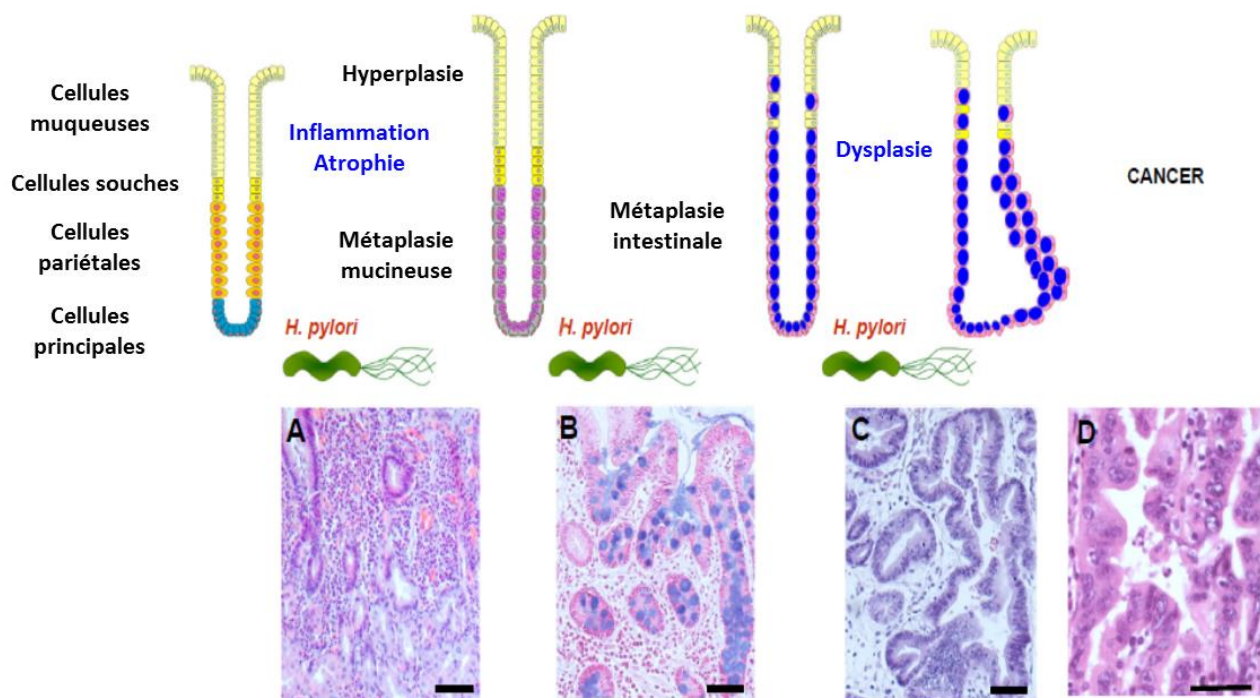


Figure 5 : Cascade des lésions histologiques induites par l'infection à *H. pylori* menant à l'adénocarcinome gastrique de type intestinal. Figure reproduite d'après Megraud *et al.* (255). Une muqueuse gastrique normale présente des glandes de structure normale. Lors d'une gastrite aiguë, l'épaisseur de la muqueuse est augmentée (hyperplasie). Au cours d'une gastrite chronique (A), des dilatations glandulaires sont observées. La gastrite chronique peut évoluer en gastrite atrophique avec perte des cellules pariétales et une perte variable des glandes gastriques. La métaplasie intestinale (B) correspond à l'acquisition d'un phénotype intestinal avec apparition de cellules caliciformes. La métaplasie intestinale peut évoluer en dysplasie (C) caractérisée par des glandes de forme et de taille irrégulières. Enfin, le stade cancer (D) associe des néoplasies intra-épithéliales et une invasion de la musculaire muqueuse et de la musculuse.

I.3.4 Lymphome gastrique du MALT

Dans moins de 0,1% des cas, la gastrite induite par *H. pylori* peut évoluer après de nombreuses années en un lymphome gastrique du MALT. Le chapitre III sera consacré à cette pathologie.

I.3.5 Pathologies extra-gastriques

Du fait de la chronicité de l'infection à *H. pylori* et du modèle d'inflammation chronique qu'elle représente, son rôle dans le développement et la progression de pathologies extra-digestives a été rapporté dans de nombreuses études (121). Les hypothèses de mécanismes sous-jacents incluent l'induction d'une inflammation chronique et sa persistance locale et systémique, l'induction d'un mimétisme moléculaire, c'est-à-dire la production d'anticorps dirigés contre des protéines de *H. pylori* capables de reconnaître des antigènes de l'hôte (auto-immunité) et la modification de l'absorption de certains nutriments comme la vitamine B12. De nombreuses pathologies extra-digestives seraient concernées telles que des pathologies cardiovasculaires, neurologiques, respiratoires, hématologiques, ophtalmologiques, dermatologiques, uro-génitales ou encore métaboliques (137).

I.4 Facteurs de virulence

Le rôle carcinogène de *H. pylori* a d'abord été considéré comme indirect via l'inflammation chronique induite par la colonisation de l'estomac. Il est maintenant admis que le rôle de l'infection à *H. pylori* dans les pathologies digestives et en particulier dans la carcinogénèse tient vraisemblablement à la présence de facteurs de virulence. Ces derniers ont de multiples fonctions, ils permettent d'une part à la bactérie de survivre à l'acidité de l'estomac, se déplacer dans le mucus et coloniser la muqueuse gastrique en échappant à la réponse immunitaire de l'hôte. D'autre part certains facteurs de virulence peuvent entraîner des pathologies plus graves via des mécanismes pro-inflammatoires entraînant une altération tissulaire gastrique notamment.

I.4.1 Facteurs de virulence importants pour la colonisation de l'hôte

a) Uréase et survie à l'acidité de l'estomac

L'environnement gastrique est un environnement hostile à la majorité des microorganismes, cependant *H. pylori* est capable d'y survivre et de s'y développer. Cette résistance à l'acidité gastrique est essentiellement due à la présence d'une uréase. *H. pylori* produit en effet une importante quantité de cette enzyme qui représente 6 à 10% de la masse protéique totale de la bactérie (217). Cette enzyme transforme l'urée en ammoniac et carbamate, ce dernier étant spontanément dégradé en une seconde molécule d'ammoniac et en bicarbonate (35). Ces composés

agissent comme un tampon et neutralisent l'acidité gastrique créant ainsi un micro-environnement protecteur de pH neutre autour de *H. pylori* (391). Ainsi *H. pylori* peut survivre et se multiplier dans l'estomac (88) (357). L'uréase de *H. pylori* est retrouvée à la fois à la surface de la bactérie et dans son cytoplasme. C'est une métallo-enzyme de structure hexapolymérique contenant du nickel. Elle est composée de deux sous-unités UreA et UreB liées à deux ions nickel et c'est Ure B qui est la partie active (262). Elle s'organise sous la forme d'un complexe dodécamérique (4 trimères d'hétérodimères UreA-B) de 1,1MDa contenant 24 ions nickel (142).

Cette enzyme est indispensable à la colonisation gastrique, bien que la bactérie se développe en fait essentiellement dans le mucus où le pH est moins acide, plutôt que dans la lumière gastrique (88) (415). Cette uréase permettrait par ailleurs à *H. pylori* d'échapper à la réponse macrophagique (371). Elle pourrait également jouer un rôle dans le chimiotactisme bactérien (153) (281) et induire l'apoptose des cellules épithéliales gastriques (101).

b) Flagelles et mobilité

H. pylori doit sa mobilité à la présence de 2 à 6 flagelles polaires. Plus de 40 protéines seraient impliquées dans leur biosynthèse et leur activation (228). Ces flagelles, principalement constitués des flagellines FlaA et FlaB (90), sont recouverts d'une gaine de composition similaire à celle de la membrane externe de la bactérie permettant une protection contre l'acidité gastrique (183). De plus, cette gaine diminuerait le relargage d'épitopes immunogènes expliquant l'absence d'activation de la voie immunitaire innée du *Toll Like Receptor 5* (TLR) qui reconnaît normalement les flagellines (133). Ceci pourrait donc contribuer à la persistance de la bactérie chez l'hôte infecté. Ces flagelles et la forme spiralée de la bactérie lui permettent de pénétrer dans le mucus jusqu'à atteindre les couches muqueuses profondes et les cellules épithéliales. On estime que la majorité des bactéries se multiplient dans le mucus alors qu'une plus petite partie colonise la surface des cellules épithéliales (244). Les flagelles sont indispensables à la mobilité et aux capacités de colonisation de la bactérie (183) (91). La mobilité de la bactérie dépend d'un tropisme particulier pour certains acides aminés, l'urée ou le bicarbonate de sodium (409). Ce chimiotactisme permettrait à la bactérie de se déplacer dans un milieu favorable à son développement.

Outre la présence de flagelles, la forme hélicoïdale de *H. pylori* semble cruciale pour la mobilité et la colonisation. Certaines peptidases, les Ccrps (*coiled-coil-rich proteins*) sont nécessaires à la formation du peptidoglycane et donc à la forme de la bactérie. Une mutation d'un des gènes codant pour ces protéines entraînant une baisse de la mobilité et de la pathogénicité des souches (365).

c) Adhésines et attachement aux récepteurs cellulaires

Les capacités d'adhérence bactérienne sont indispensables à une bonne colonisation et à la persistance de l'infection. *H. pylori* se multiplie au niveau du mucus gastrique et une faible proportion de bactéries atteint la surface des cellules épithéliales et y adhère grâce à l'expression d'adhésines (236). *H. pylori* doit être capable d'adhérer aux cellules épithéliales gastriques pour éviter d'être éliminé par les mouvements péristaltiques gastriques et le renouvellement du mucus (107). Plusieurs adhésines ont été décrites parmi lesquelles les plus étudiées sont BabA (*Blood group antigen-binding adhesin*) et SabA (*Sialic acid-binding adhesin*). Ces protéines se lient aux antigènes Lewis qui sont similaires à ceux des groupes sanguins et qui sont présents à la surface des cellules épithéliales gastriques (174) (424). Il existe 2 allèles pour le gène *babA*, *babA1* et *babA2*. Les souches *babA2* sont associées aux pathologies plus graves comme l'ulcère et l'adénocarcinome (328) (305). SabA serait également l'agent agglutinant des érythrocytes et des neutrophiles (422) (12). La reconnaissance des neutrophiles par SabA permettrait leur activation, et donc un relargage de radicaux oxygénés et azotés, induisant des lésions épithéliales (422) (461). Les adhésines majeures BabA et SabA, ainsi que les différentes protéines de membranes externes, semblent pouvoir moduler leur expression en fonction du contexte environnemental (455). Ainsi, la protéine BabA pourrait être modulée par variation de phase et variation antigénique *in vivo* facilitant l'adhérence à l'épithélium et permettant une infection chronique (387). De la même façon, l'expression de SabA semble très dépendante du pH (138).

H. pylori possède d'autres adhésines qui sont des protéines de membrane externe (OMP, *Outer Membrane Protein*). Leur rôle est difficile à estimer dû au manque de connaissances de leurs récepteurs spécifiques. Au sein de ces OMP, il a été montré que la protéine HomB joue un rôle important dans l'adhérence cellulaire et dans la réponse pro-inflammatoire. Cette protéine est également associée à l'ulcère et constitue un éventuel nouveau facteur de virulence (304). Les protéines OipA, HopZ (*H. pylori outer membrane protein*), LabA (*lacdiNAc-binding adhesin*), NAP (*neutrophil-activating protein*), Hsp60 (*heat shock protein 60*), AlpA et AlpB (*adherence-associated proteins*) participeraient également à l'adhérence de *H. pylori* (Tableau 1).

d) Rôle de la gamma-glutamyl transpeptidase

La gamma-glutamyl transpeptidase (GGT) de *H. pylori* est présente chez 100% des souches et est exprimée de manière constitutive (433). Elle est exprimée tout au long de la croissance bactérienne et est capable d'exercer son activité enzymatique au pH de la muqueuse gastrique de l'hôte (433). Elle a un rôle important dans le métabolisme de *H. pylori* permettant à la bactérie l'utilisation de

nutriments fondamentaux (382). Elle permettrait de priver les cellules épithéliales en glutathion, les rendant ainsi plus sensibles aux substances oxydantes ce qui pourrait conduire à des dommages au niveau de l'ADN, une apoptose et participer au processus de carcinogénèse.

La GGT n'est pas indispensable à la bactérie, une délétion du gène *ggt* n'inhibe pas la croissance bactérienne mais apporte un avantage dans la colonisation gastrique. En effet, dans une première étude, Chevalier *et al.* (56) ont montré qu'une délétion du gène *ggt* rendait la souche *H. pylori* SS1 incapable de coloniser la muqueuse gastrique de souris *Swiss*, ce qui n'était pas le cas de la souche sauvage. D'autres études ont montré qu'une délétion du gène *ggt* conduisait à une réduction importante de la colonisation par rapport à la souche sauvage (252) (300). *In vitro*, la GGT favorise la croissance de *H. pylori*, des souches ayant une forte activité enzymatique poussant mieux que celles ayant une activité enzymatique plus faible (135). Elle jouerait par ailleurs un rôle dans la maladie ulcéreuse (136).

La GGT a également un rôle dans l'inhibition de la prolifération lymphocytaire T en arrêtant le cycle cellulaire en phase G1 (132) (368) (102) et permettant ainsi à *H. pylori* d'échapper à la réponse immunitaire ce qui pourrait participer à la chronicité de l'infection. L'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 est caractérisé par une augmentation du taux de p27, inhibiteur des Cdk et une diminution des cyclines. La voie Ras semble être la cible de la GGT.

La GGT de *H. pylori* est également capable d'agir sur les cellules dendritiques et d'orienter la réponse cytokinique induisant une réponse T régulatrice (300).

Plusieurs études ont par ailleurs montré que la GGT de *H. pylori* participe à l'apoptose des cellules épithéliales gastriques humaines via l'activation des caspases 3 et 9, de Bax, la diminution d'expression de Bcl-2 et Bcl-xl, protéines anti-apoptotiques, et la libération du cytochrome c (197) (196) (113). Une autre voie possible d'apoptose est l'augmentation de la concentration d'H₂O₂ due au catabolisme du glutathion par la GGT (136). Cette génération d'H₂O₂ est également responsable de dommages au niveau de l'ADN cellulaire ainsi que d'une activation de l'inflammation (augmentation de la synthèse d'Il-8 et activation de la voie du NFκB en présence de la GGT de *H. pylori*) (113) (468).

Facteur de virulence	Fonctions	Référence
AlpA	Adhérence cellulaire	(299)
AlpB		
DupA	Activité pro-inflammatoire (induction production IL-8, IL-12) Association avec ulcère duodéal	(171) (383)
HopZ	Adhérence cellulaire	(315)
Hsp60	Activité pro-inflammatoire (induction production IL-6, IL-8, TNF- α , activation voie du NF- κ B)	(232) (473)
LabA	Adhérence cellulaire	(348)
NAP	Activité pro-inflammatoire (stimule production des ROS, IL-6, IL-8, IL-12, IL-23) Induction de lésions épithéliales, altération des jonctions épithéliales Adhésion cellulaire	(99) (324)
OipA	Adhérence cellulaire activité pro-inflammatoire (induction production IL-8) association avec adénocarcinome gastrique	(454) (123)

Tableau 1 : Autres facteurs de virulence de virulence de *H. pylori* et fonctions associées. ROS : dérivés actifs de l'oxygène.

I.4.2 Ilot de pathogénicité *cag*

Présent chez 60 à 70% des souches, l'îlot de pathogénicité *cag* (*cagPAI*) correspond à une région génomique de 40kb acquise au cours de l'évolution contenant environ 30 gènes dont *cagA* (cytotoxin-associated gene A) et des gènes codant pour un système de sécrétion de type IV (SST4) composé de plusieurs protéines (19). CagA est considérée comme étant la première oncoprotéine bactérienne.

a) Le système de sécrétion de type 4 (SST4)

Le SST4 présente une structure comparable à celui des autres bacilles à Gram négatif qui sont composés de l'assemblage de 11 protéines (VirB 1 à 11) couplées à une NTPase (VirD4). Le SST4 de *H. pylori* comprend des protéines avec des séquences compatibles avec les protéines VirB mais également 5 composants ne présentant aucune similarité avec ceux des SST4 des autres bactéries (111). Les protéines formant le SST4 peuvent être séparées en trois parties, celles qui s'assemblent pour former le complexe central où se situe le canal, les protéines du pilus et celles permettant de fournir l'énergie nécessaire à la translocation. Le complexe central serait composé de CagT (VirB7), CagX (VirB9), CagY (VirB10), et CagU, et le complexe de la membrane interne de CagE (BirB3/4), CagW (VirB6) et CagV (VirB8). La partie associée à la membrane externe comprend deux composants essentiels, CagM et Cag3 interagissant avec les composants du complexe central pour former une extension (214). D'autres composants ont été décrits, comme CagH, CagC, CagL ou CagI (17) (Figure 6). Le rôle de la majorité des protéines formant le SST4 n'est pas clair même si la plupart d'entre elles sont essentielles pour la sécrétion de CagA ou l'induction de l'IL-8 (112).

Ce système de sécrétion peut être comparé à une seringue permettant la translocation de facteurs de pathogénicité bactériens dont CagA au sein des cellules épithéliales gastriques (53) (3). Des études par microscopie électronique ont montré que le SST4 formait une structure comparable à un pilus à la surface bactérienne (344) (401) (216) toujours localisé à un pôle et induit par le contact avec les cellules cibles. Le rôle exact des protéines composant le SST4 n'est pas bien défini. Il a été décrit que CagF, une protéine chaperonne, a un rôle crucial dans la translocation de CagA (67) (314). CagI et CagL seraient indispensables à la formation du pilus (378). La composition exacte du pilus n'est cependant pas connue, tout comme le composant principal de cette structure. CagL agirait d'autre part comme une adhésine connectant le SST4 aux cellules cibles (216) via l'intégrine $\alpha 5 \beta 1$. Cette interaction est indispensable pour la translocation de CagA. Elle va induire une modification du potentiel de membrane de la cellule hôte, premier effet du SST4. CagL va également stimuler l'intégrine $\alpha 5 \beta 1$ et la tyrosine kinase FAK (*focal adhesion kinase*) permettant l'activation de Src, la tyrosine kinase phosphorylant CagA. Le SST4 va donc jouer un rôle direct dans la phosphorylation de CagA au niveau du site d'injection. Ces effets seront développés dans le paragraphe suivant. Le SST4 a par ailleurs des effets indépendants de CagA via l'injection d'autres molécules bactériennes dans le cytoplasme cellulaire. En effet, il permet à certaines molécules du peptidoglycane de rejoindre le cytoplasme des cellules hôtes conduisant à l'activation de la voie du NF- κ B via le récepteur NOD1 (430) et donc à une réponse pro-inflammatoire. Le SST4 active également certaines

GTPases (61), récepteurs et voies de signalisation (191) indépendamment de CagA sans que les effecteurs aient été mis en évidence pour l'instant.

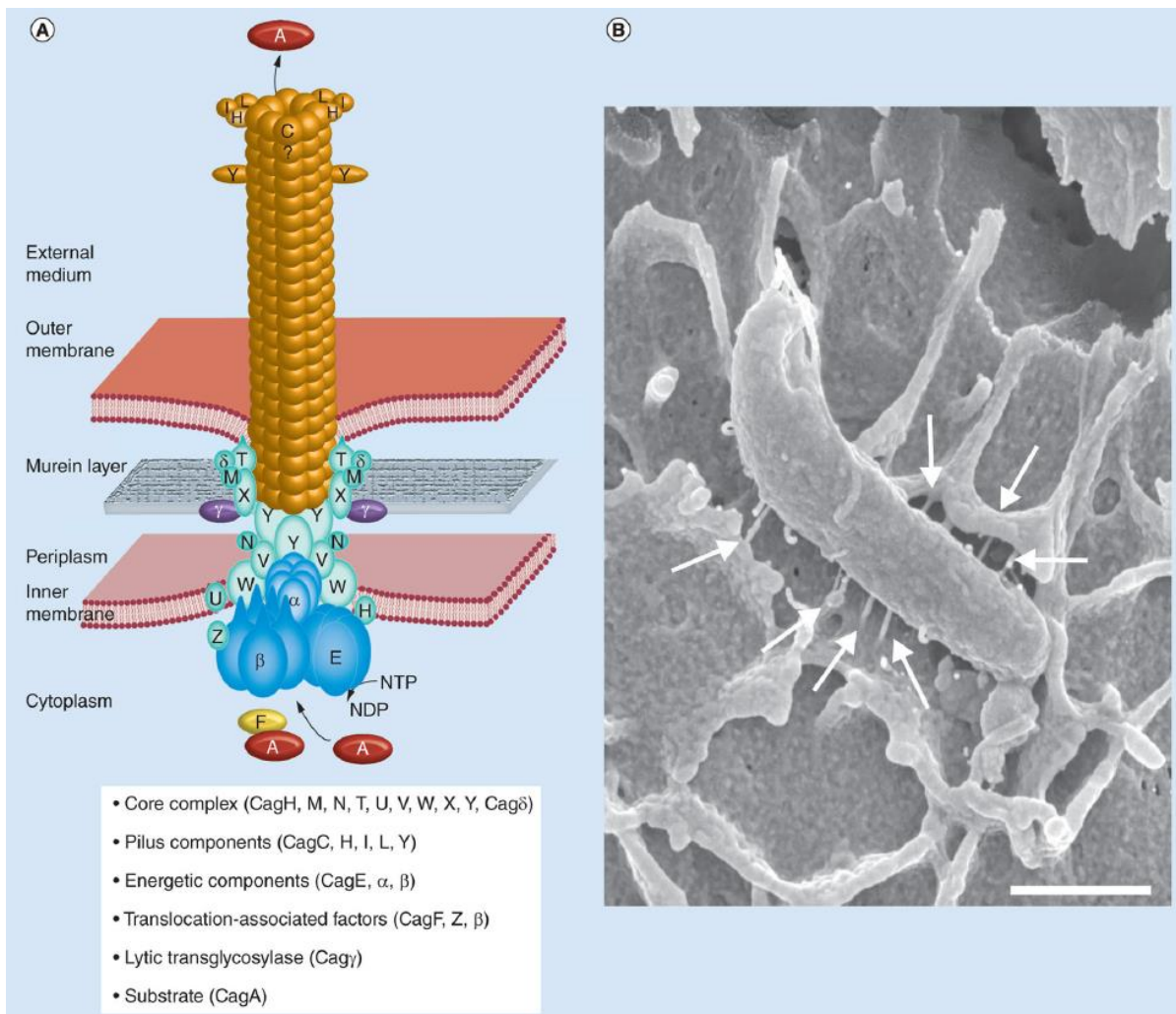


Figure 6 : Système de sécrétion de type 4 de *H. pylori*. D'après Backert *et al.* (17). A) Le SST4, codé par l'îlot de pathogénicité *cag*, est un complexe multi-protéique localisé au niveau des membranes interne et externe de *H. pylori* et présentant une homologie structurale avec le SST4 de *Agrobacterium* et d'autres bactéries à Gram négatif. (B) Image par microscopie électronique de l'infection par *H. pylori* de cellules de la lignée épithéliale gastrique AGS sur laquelle on peut observer la présence de pili correspondant au SST4 connectant la bactérie à la membrane cellulaire de l'hôte.

b) CagA

CagA est une protéine monomérique de 135-145 kDa dont l'activité dépend de son extrémité C-terminale de 35-45 kDa comportant jusqu'à 5 répétitions du motif EPIYA (Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala) (152) (Figure 7). Ce domaine présente un polymorphisme qui affecte sa structure et sa virulence et coïncide avec une répartition géographique des souches bactériennes. En effet, 4 segments EPIYA peuvent être distingués en fonction des séquences flanquantes des motifs EPIYA : EPIYA-A, EPIYA-B, EPIYA-C et EPIYA-D (11) (198). Des recombinaisons entre ces séquences peuvent expliquer la variabilité de CagA. Dans les pays Occidentaux, les régions contenant les motifs EPIYA des souches de *H. pylori* correspondent à un arrangement des segments EPIYA-A, EPIYA-B et EPIYA-C (présent pour ce dernier en 1 à 3 copies) alors que les souches de *H. pylori* d'Extrême Orient (Japon, Chine, Corée) ne possèdent pas de segment EPIYA-C mais un segment EPIYA-D. L'activité de CagA est hétérogène, dépendant du nombre et du motif de phosphorylation. Les types C et D ont été associés à un risque plus important de cancer (339).

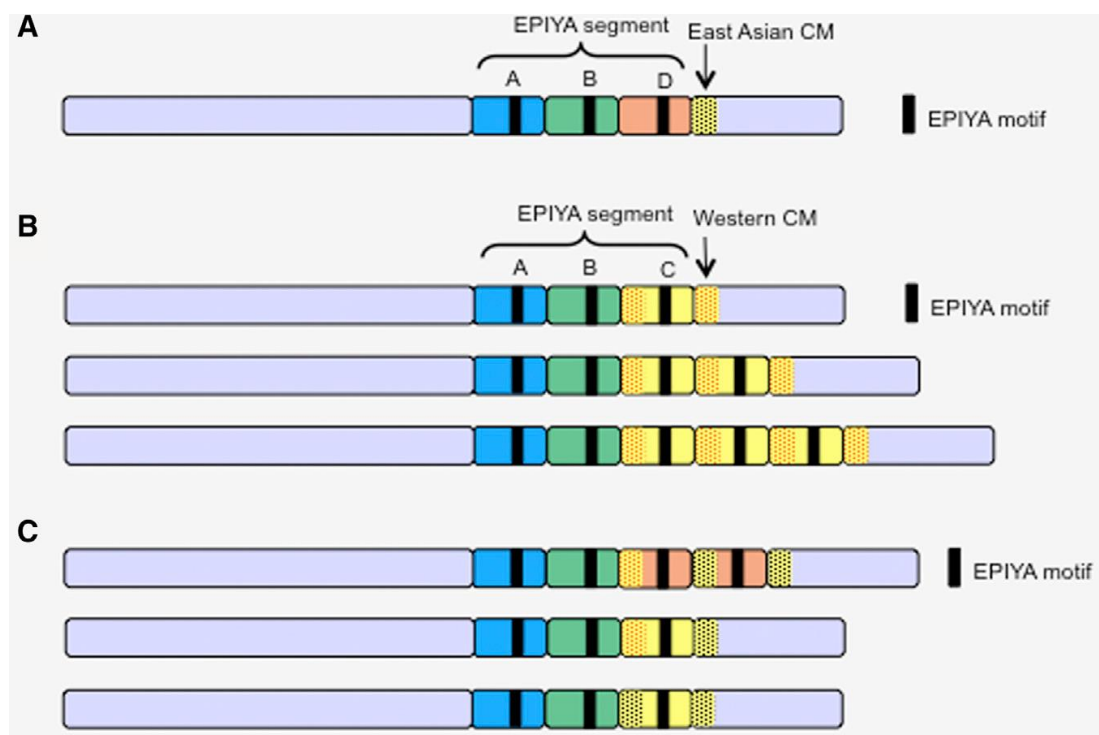


Figure 7 : Diversité structurale de CagA. D'après Hatakeyama *et al.* (151). (A et B) Les souches d'Asie de l'Est (A) et occidentales (B) sont caractérisées par la présence d'un segment EPIYA-D et EPIYA-C respectivement. Les souches occidentales peuvent posséder une à trois répétitions du segment EPIYA-C. (C) Il existe quelques variants de CagA comprenant des combinaisons atypiques parmi les souches asiatiques et occidentales.

La structure tridimensionnelle de CagA a été décrite récemment. CagA est constituée d'une partie carboxy-terminale non structurée et d'un large fragment amino-terminal structuré contenant des éléments de structure secondaire. La structure d'un fragment de CagA (résidus 1 à 884 sur 1186 au total) a été déterminée par cristallographie (187). Elle contient 4 domaines, D1, D2, D3 et D4, interagissant entre eux assez faiblement (Figure 8). D1 est un domaine hélicale dont la séquence exacte n'est pas connue. Le cœur de la protéine est le domaine D2, formé d'un long feuillet bêta incurvé (*single layer beta sheet* ou SLB) soutenu sur sa face convexe par un petit domaine globulaire (D2') et par trois hélices formant une épingle. D2 est prolongé par une hélice alpha amphipatique (D3) qui sépare D2 du domaine carboxy-terminal D4. L'analyse des résidus exposés et conservés indique plusieurs régions d'intérêt pouvant correspondre aux domaines de liaison avec différentes cibles de CagA (188).

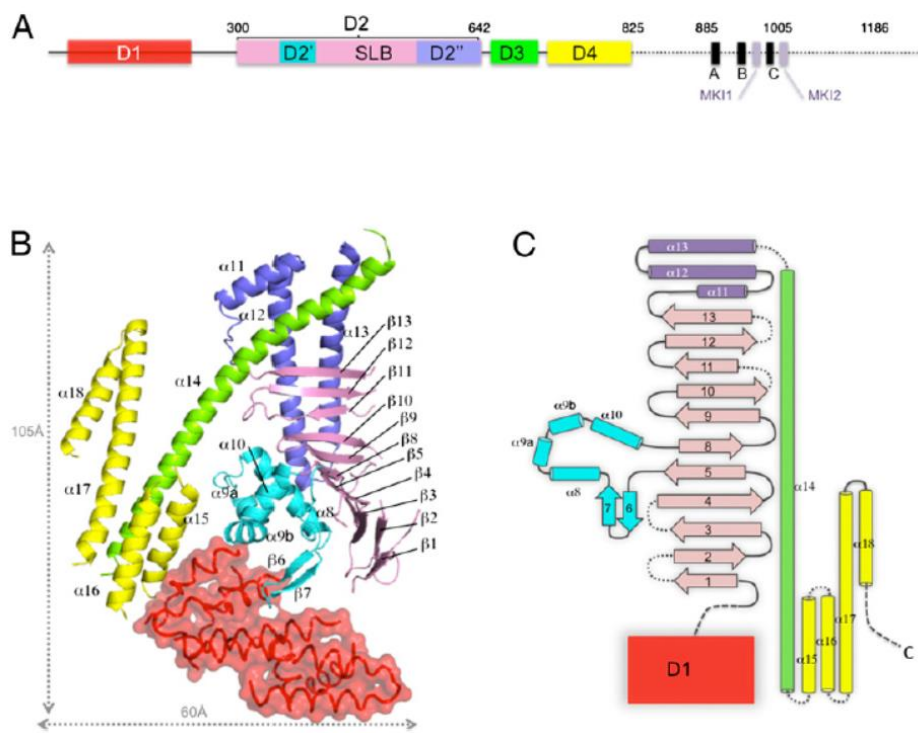


Figure 8 : Structure de CagA. D'après Kaplan-Türköz *et al.* (187). (A) Représentation schématique de CagA (souche 26695). Les rectangles représentent les domaines définis lors de l'analyse par cristallographie des résidus 1 à 884 de CagA, avec D1 en rouge, D2 en cyan, violet et bleu, D3 en vert et D4 en jaune. Les positions des motifs EPIYA sont indiquées par A, B et C et ceux des motifs liant la kinase PAR1-MARK par MK11 et MK12. (B) Représentation en ruban de la structure du domaine N-terminal de CagA. Les couleurs des différents domaines correspondent à celles de (A). (C) Diagramme de topologie de la structure du domaine N-terminal de CagA.

CagA est présente chez 90% des souches asiatiques (240) et chez 50 à 70% des souches occidentales (425). Une fois dans la cellule hôte, CagA se localise au niveau de la membrane plasmique, et c'est au niveau de la tyrosine du motif EPIYA que CagA va être phosphorylée par les kinases cellulaires de la famille des Src (373) (390) et des Abl (c-Abl, Arg) (325) (400). *H. pylori* contrôle l'activité de ces kinases (400).

Suite à sa phosphorylation, CagA va interagir avec différentes protéines dont la première identifiée a été la tyrosine phosphatase SHP-2 qui inhibe la déphosphorylation de Src (160). Une dizaine de protéines ont été répertoriées comme étant capables d'interagir avec CagA sous sa forme phosphorylée, comme FAK qui régule l'adhésion à la matrice cellulaire ou c-Met, MAPK et d'autres régulateurs du cytosquelette d'actine (16) (18). Toutes ces protéines contiennent un domaine SH2 (« *Src homology 2* ») qui correspond au site majeur d'interaction des tyrosines phosphorylées. Ainsi, CagA va mimer les effets des tyrosines phosphorylées des protéines endogènes à la cellule hôte. Ces différentes interactions de CagA vont jouer un rôle dans le réarrangement du cytosquelette, les cellules vont d'ailleurs acquérir un phénotype particulier dit « *hummingbird* » évoquant les ailes d'un colibri et correspondant à un allongement cellulaire important associé à des réarrangements du cytosquelette et à une augmentation de la mobilité cellulaire (372) (160) (263). CagA peut induire cet allongement cellulaire en inhibant la rétractation cellulaire au niveau des jonctions focales (37), en déphosphorylant et inactivant FAK (417) et en activant la voie de signalisation Erk (159). CagA est capable d'inactiver Src, entraînant un rétrocontrôle négatif sur sa propre phosphorylation (374) (416). L'acquisition du phénotype « *hummingbird* » mime la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) avec une augmentation de l'expression des marqueurs des cellules mésenchymateuses et une diminution des marqueurs des cellules épithéliales. D'autre part, ces cellules expriment à haut niveau CD44, marqueur des CSC gastriques, et possèdent des caractéristiques identiques aux CSC telles qu'une plus grande capacité de migration, d'envahissement et de formation de tumeursphères (24) (32).

Les effets de CagA ne nécessitent pas tous une phosphorylation : CagA peut en effet interagir avec la E-cadhérine, c-Met, la phospholipase PLC- γ , la kinase Par1 notamment sous sa forme non phosphorylée (260) (60) (467). Si la forme phosphorylée a un rôle important au niveau des voies de signalisation du cytosquelette, la forme non phosphorylée induit des modifications au niveau des jonctions serrées et adhérentes, une perte de la polarité cellulaire et une réponse pro-inflammatoire.

Les jonctions serrées et adhérentes ont un rôle essentiel pour l'intégrité de l'épithélium gastrique. CagA interagit avec les protéines des jonctions serrées ZO-1, JAM conduisant à un rassemblement des composants des jonctions serrées au niveau du site de fixation des bactéries (6). CagA se lie également à la kinase Par1, régulateur important de la polarité cellulaire, et inhibe son activité kinase

ce qui conduit à une perte de la polarité cellulaires une déstabilisation des jonctions serrées (356). CagA interagit par ailleurs avec la E-cadhérine, protéine de jonction cellule-cellule, conduisant à une déstabilisation des jonctions adhérentes et donc de l'épithélium gastrique (278).

CagA est aussi capable d'augmenter la transcription du NF- κ B ce qui induit une sécrétion de cytokines pro-inflammatoires notamment de l'interleukine IL-8 et le TNF α (38). La production d'IL-8 est dépendante de la présence du *cagPAI*, aucun autre facteur capable d'entraîner la production d'IL-8 chez les souches *cagPAI* négatives n'a été décrit (103). CagA activerait également la voie de la β -caténine entraînant une accumulation de la β -caténine au niveau nucléaire aboutissant à une augmentation de transcription de facteurs mitogènes impliqués dans la carcinogénèse (122). CagA active certains facteurs de transcription comme le « *Serum Responsive Factor* » qui joue un rôle dans la prolifération cellulaire, l'apoptose ou encore l'inflammation (161). CagA serait par ailleurs capable d'inhiber le suppresseur de tumeur p53, ce qui aurait un rôle dans la carcinogénèse (442).

Les voies de signalisation de CagA sont récapitulées dans la figure 9.

Les souches CagA positives sont associées à des lésions inflammatoires de la muqueuse gastrique plus marquées que les souches CagA négatives et elles augmentent ainsi le risque de cancer gastrique (34) (207) (312) (298). Le potentiel oncogénique de CagA a été démontré via la production de souris transgéniques exprimant CagA de manière ubiquitaire ou spécifiquement au niveau du tissu gastrique. Ces souris développent, sans infection par *H. pylori*, des polypes hyperplasiques et dans des cas limités un adénocarcinome gastrique (302). De plus, il a été montré que l'infection par une souche CagA positive chez la gerbille de Mongolie entraîne la cascade d'évènements conduisant à un adénocarcinome gastrique contrairement à l'infection par un mutant isogénique CagA négatif (123). Le rôle de CagA dans la physiopathologie du LGM sera discuté dans un paragraphe spécifique (I.4.5 Spécificité des couches de LGM).

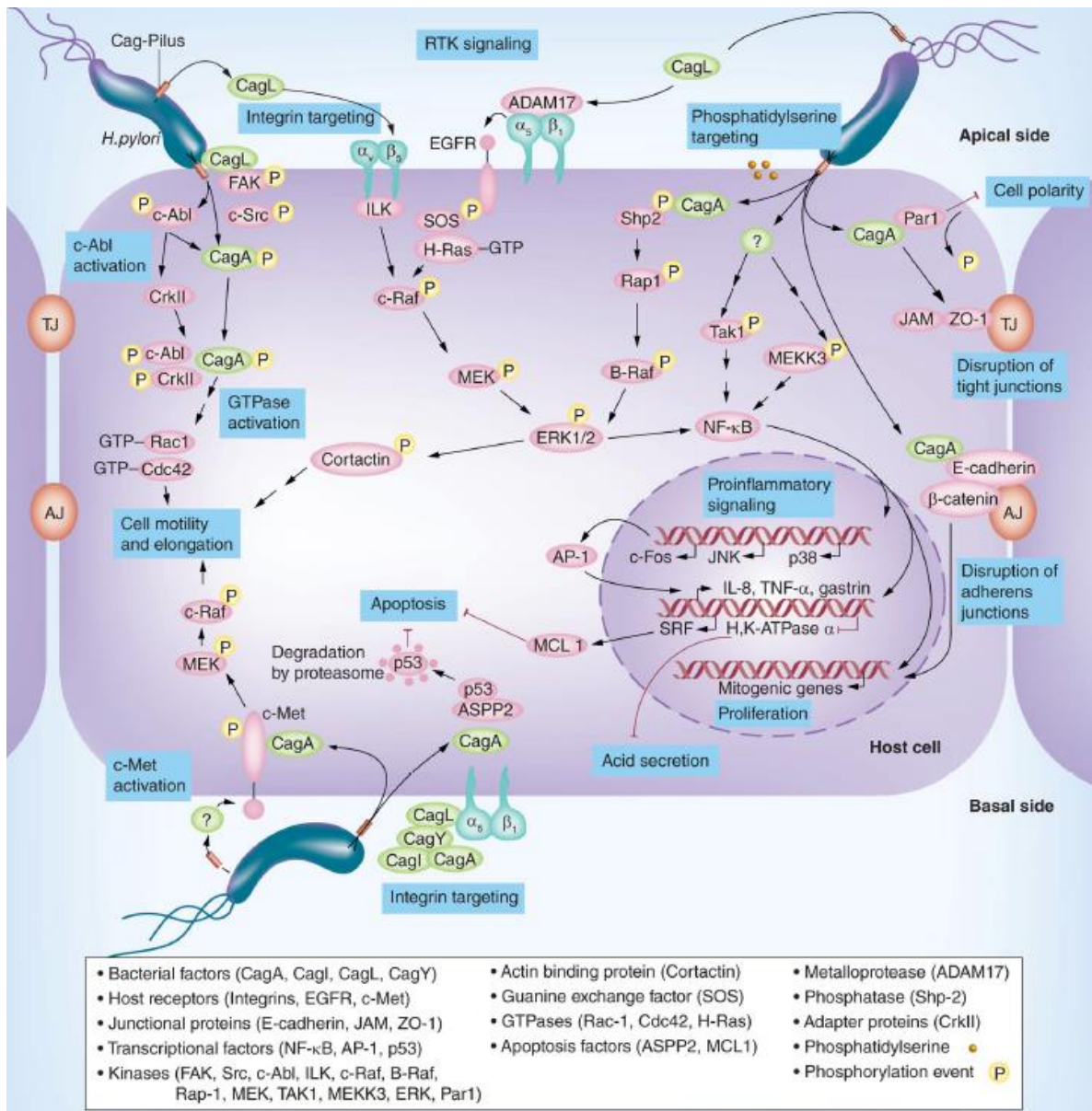


Figure 9 : Rôle de CagA dans la signalisation cellulaire induite via le système de sécrétion de type 4. D'après Backert *et al.* (17). CagA est injecté dans le cytoplasme des cellules épithéliales et agit sur de nombreuses cascades de signalisation associées à la prolifération cellulaire, l'inflammation, la mobilité, des réarrangements du cytosquelette, la destruction des jonctions adhérentes et l'inhibition de l'apoptose ou de la sécrétion acide. Des récepteurs des tyrosines kinases tels que EGFR et c-Met, des facteurs de transcription comme NF-κB et AP-1, ou les GTPases Rac1 et Cdc-42 sont activés.

I.4.3 VacA

La toxine vacuolisante VacA tire son nom de sa capacité à induire la formation de vacuoles dans certaines lignées cellulaires *in vitro* (229). Le gène *vacA* code pour une protéine de 140 kDa. L'ensemble des souches de *H. pylori* possède une copie de ce gène, mais seulement 50% possèdent la capacité vacuolisante *in vitro*. Ceci s'explique par son polymorphisme, le niveau variable de transcription du gène (116) et le niveau de sécrétion de la protéine (70). Trois grandes régions de diversité dans la séquence de VacA ont été décrites aboutissant à différents allèles (Figure 10) : la région s au niveau de la séquence signal compte 4 allèles différents (s1a, s1b, s1c, s2), la région centrale m 3 allèles (m1, m2a, m2b) et la région intermédiaire i 3 allèles (i1, i2, i3). Chaque gène présente une combinaison entre ces différents allèles qui conditionne l'activité de la toxine (14). Des études épidémiologiques ont montré une corrélation entre les allèles présents et le risque de développer une pathologie duodénale. Le risque d'adénocarcinome gastrique ou d'ulcère gastro-duodéal est augmenté chez les personnes infectées par des souches portant les allèles s1, m1 ou i1 par rapport à celles infectées par des souches s2, m2 ou i2 (14) (341) (106) (68). Ce risque est probablement lié à la présence d'autres facteurs de virulence associée. En effet la présence de l'allèle s1 de *vacA* est souvent associée à la présence de l'îlot de pathogénicité *cag* et de l'adhésine BabA, alors que les souches présentant l'allèle s2 sont dépourvues la plupart du temps de ces deux facteurs de pathogénicité (68).

La protéine de 140 kDa subit au cours de sa sécrétion un clivage aux extrémités C-terminale et N-terminale (342) conduisant à une protéine mature de 88 kDa (Figure 10) qui va transloquer à travers la membrane externe et pourra ensuite être sécrétée dans le milieu extracellulaire ou rester à la surface bactérienne où elle pourra jouer le rôle d'adhésine (70) (288) (42) (432). Cette protéine peut ensuite être clivée en deux sous-unités A et B de 33 et 55 kDa liées de façon non covalente (402) (411). La toxine se lie aux cellules épithéliales par l'intermédiaire de la plus grande sous-unité, puis elle est internalisée et localisée autour du noyau (129).

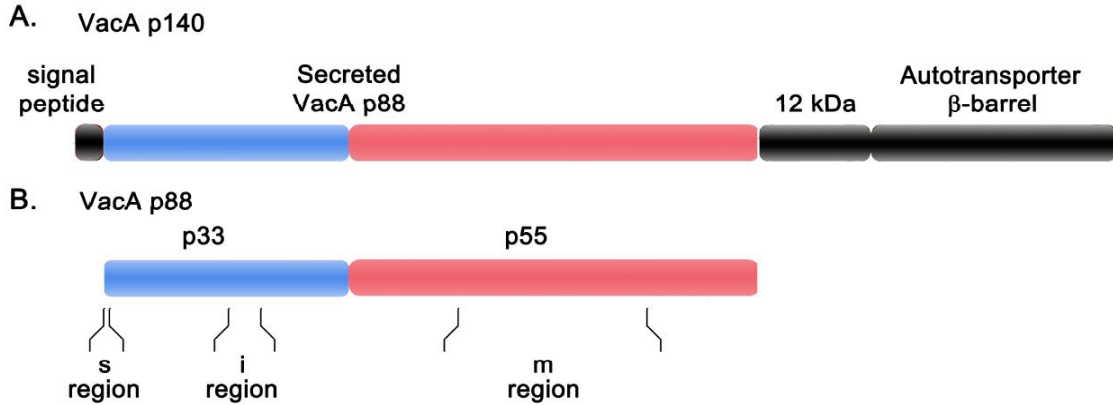


Figure 10 : Organisation et diversité génétique de VacA. (A) organisation de la protéine de 140 kDa, incluant un peptide signal, la protéine sécrétée de 88 kDa, un peptide de 12 kDa dont la fonction est inconnue et un auto-transporteur β -barrel. (B) La toxine VacA sécrétée de 88kDa qui peut subir un clivage en deux sous-unités de respectivement 33 (bleu) et 55 (rouge) kDa. Les régions s, i et m sont des régions hypervariables. D'après Foegeding *et al.* (115)

Les effets de la cytotoxine VacA sont nombreux sur les cellules, que ce soit *in vivo* ou *in vitro*. D'une part VacA peut activer des voies de signalisation cellulaire pro-inflammatoires après liaison à des récepteur cellulaires comme RPTP- β (*Receptor-type Protein Tyrosine Phosphatase β*), le récepteur de l'EGF ou diverses lipides (69) (125) (286) (376). VacA stimule par exemple l'expression de COX-2, une enzyme pro-inflammatoire par les macrophages et les polynucléaires neutrophiles (36). D'autre part, il a été montré que VacA induit l'apoptose de cellules épithéliales à la fois *in vitro* et *in vivo* (316) (128) (206). VacA serait en effet capable de pénétrer à l'intérieur des mitochondries provoquant à un relargage du cytochrome C qui activerait une voie de signalisation pro-apoptotique (128) (456). VacA inhiberait l'activation et la prolifération des lymphocytes B et T (36) (130) (412) et pourrait interférer avec la présentation antigénique des lymphocytes B (265). VacA induit une voie impliquant une cascade de phosphorylation/activation menant à l'activation de la GTPase Rac et à une réorganisation du cytosquelette d'actine (166). VacA aurait également un effet sur les cellules pariétales en contribuant à la diminution de la sécrétion acide au niveau gastrique, ce qui favoriserait la persistance de *H. pylori* (202) (435).

Comme nous l'avons vu précédemment, VacA tient son nom de la capacité à former des vacuoles dans les cellules cibles. Ces vacuoles proviendraient des vésicules d'endocytose présentes après la liaison de VacA au niveau de la membrane cellulaire (77) (69). Après cette liaison, plusieurs monomères de Vac A forment des oligomères qui s'organisent en canaux permettant le passage d'ions chlorure. Ce passage anionique serait compensé par l'entrée d'ions hydrogènes par les canaux

cellulaires. Les vacuoles seraient alors une conséquence du rétablissement de la pression osmotique (69). VacA aurait par ailleurs un rôle dans l'autophagie induite par *H. pylori* (403) via la formation de canaux membranaires. Enfin, VacA peut pénétrer dans le cytoplasme des lymphocytes après reconnaissance du CD18 et interférer avec la sécrétion d'IL-2 (377). *In vivo*, l'administration de la protéine purifiée à des souris est à l'origine d'une dégénération de la muqueuse gastrique et d'un recrutement de cellules inflammatoires (134) (245) (398). Enfin, VacA joue donc un rôle important dans la capacité de colonisation de la bactérie (361).

H. pylori possède également trois gènes « VacA-like » dont le produit correspond à l'extrémité C-terminale de la protéine VacA qui ne correspond pas à une part active de la toxine VacA. Ces gènes sont appelés *imaA* (*immunomodulatory autotransporteur A*), *faaA* (*flagella-associated autotransporteur A*) et *vlpC* (*VacA-like protein C*) (363) (332). Chacun de ces gènes augmente la capacité de colonisation de *H. pylori* dans des modèles de rongeurs (189) (22) (363) (332).

I.4.4 Lipopolysaccharide

Les lipopolysaccharides (LPS) sont des lipoglycanes phosphorylés retrouvés au niveau de la membrane externe des bactéries à Gram négatif et qui possèdent des propriétés immunomodulatrices et immunostimulantes. Le LPS est composé de 3 éléments (Figure 11) : une chaîne polysaccharide ayant une partie constante (« core ») et une autre variable correspondant à l'antigène O et le lipide A. Le lipide A est responsable de l'activité biologique et immunologique du LPS. Le LPS de *H. pylori* est considéré comme un facteur de virulence important. Le lipide A du LPS de *H. pylori* est tétra-acétylé et 1000 fois moins actif biologiquement que le LPS hexa-acétylé de *Escherichia coli* (270). Ce LPS peut résister à certains peptides antimicrobiens (comme la polymyxine B) et échapper à la reconnaissance des *Toll-like receptors* (TLRs) (73). Suite à des modifications constitutives par différentes enzymes, de fortes concentrations du LPS de *H. pylori* sont nécessaires pour activer le TLR4 comparativement à ce qui est observé pour le LPS de *E. coli* (73). Ces modifications du lipide A permettent à *H. pylori* d'échapper à la réponse immunitaire innée et ainsi favorisent ainsi la persistance bactérienne. Elles résultent d'un processus complexe passant par 5 voies enzymatiques successives.

La partie centrale du LPS située entre le lipide A et l'antigène O appelée « core » peut être divisé en 2 parties, le « core » interne et externe. Sa structure est conservée entre les différentes bactéries à Gram négatif (333). Le « core » contribue à la pathogénicité et la colonisation bactérienne (149). Le

« core » interne peut se lier à la laminine, une glycoprotéine de la matrice extra-cellulaire retrouvée au niveau de la membrane basale (423). Cette liaison inhibe la reconnaissance de la laminine par les récepteurs des cellules épithéliales (intégrine) ce qui entraîne une perte de l'intégrité de la muqueuse gastrique et par la suite une apoptose cellulaire (385).

La chaîne O du LPS de *H. pylori* a une composition similaire aux antigènes de type Lewis X (Le^x) ou Y (Le^y) des groupes sanguins, retrouvés également au niveau des cellules épithéliales gastriques (426). Ce mimétisme bactérien a pour conséquence un échappement à la réponse immunitaire, *H. pylori* n'étant plus reconnu comme du non-soi ce qui favorise la colonisation et contribue à la chronicité de l'infection (9) (269). D'autre part, ce mimétisme est impliqué dans le phénomène d'auto-immunité conduisant à une atrophie gastrique (10). La nature de l'antigène de Lewis exprimé par le LPS de *H. pylori* détermine l'interaction avec les cellules dendritiques via une lectine de type C appelée DC-SIGN présente à la surface des cellules dendritiques (29). Cette interaction avec DC-SIGN pourrait influencer la réponse pro-inflammatoire. Les souches Lewis négatives échappent à la liaison avec les cellules dendritiques et induisent une réponse de type Th1, tandis que les souches exprimant Le^x et/ou Le^y se lient aux DC-SIGN entraînant la production d'IL-10 en faveur d'une réponse de type T régulatrice et bloquant la réponse de type Th1. D'autre part, un switch de l'antigène de Lewis pourrait être possible notamment avec le pH, celui-ci favorisant l'adhérence aux cellules épithéliales ou permettant à la bactérie de persister dans la couche muqueuse (268).

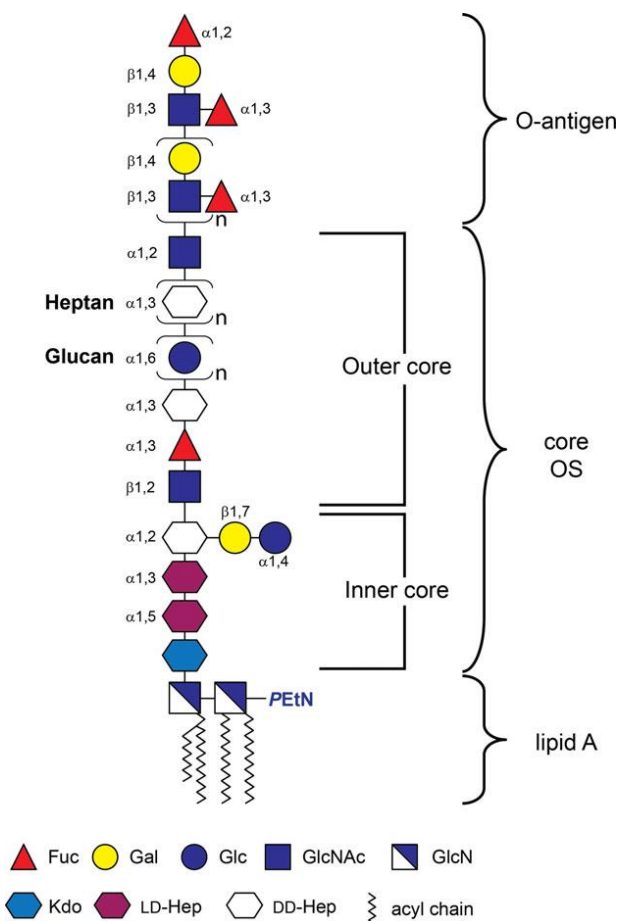


Figure 11 : Structure possible du LPS de la souche de référence 26695 de *H. pylori*. Les 3 éléments du LPS sont indiqués : antigène O, « core » (séparé en « core » externe et interne) et lipide A. D'après Li *et al.* (230)

I.4.5 Spécificité des souches de lymphome gastrique du MALT

Les souches de LGM, comme l'ensemble des souches de *H. pylori*, sont capables de survivre dans l'estomac grâce à la production d'une uréase, possèdent des flagelles permettant leur mobilité dans le mucus et sont capables d'adhérer aux cellules épithéliales.

Contrairement à ce qui est observé dans les ulcères et l'adénocarcinome gastrique, le rôle de CagA dans la physiopathologie du LGM reste controversé. Certaines études ont montré une association entre les souches CagA positives et la survenue du LGM (93) (319) (367) (80) (459), d'autres non (78) (225) (457). Il a par ailleurs été montré que la prévalence des souches CagA positives est plus importante dans les lymphomes B à grandes cellules que dans le LGM (319) (80). Toutefois, CagA serait capable de transloquer dans les lymphocytes B humains via SST4 *in vitro* (234). Une fois dans le cytoplasme, la protéine se lie à SHP-2 ce qui stimule la prolifération lymphocytaire B et inhibe

l'apoptose via la régulation de voies intracellulaires, notamment par l'activation de ERK 1/2 (*endoplasmic reticulum kinase 1 et 2*) et la MAP kinase p38 et l'augmentation de l'expression de Bcl-2 et Bcl-X_L (234) (474). La corrélation entre la présence de CagA et celle des facteurs de signalisation de ces voies a été confirmée chez l'homme (210). Chez des souris transgéniques exprimant CagA de manière ubiquitaire ou spécifiquement au niveau du tissu gastrique, CagA induirait une hyperleucocytose mais également des leucémies myéloïdes et des lymphomes B via la dérégulation de SHP-2, ce qui est en faveur du rôle de cette protéine dans la physiopathologie du LGM. Cette activité serait dépendante de la phosphorylation de CagA (302). CagA agirait également en inhibant l'accumulation de p53, important régulateur de l'apoptose et suppresseur de tumeur, et permettrait ainsi aux lymphocytes B d'échapper à l'apoptose conduisant à l'accumulation de mutations génétiques (421). Contrairement à ce qui a été observé précédemment, cet effet de CagA serait indépendant de sa phosphorylation (421). CagA aurait également une activité inhibitrice sur la prolifération lymphocytaire B via la suppression de la voie de signalisation JAK-STAT ce qui permettrait à la bactérie d'éviter une réaction immunitaire spécifique (421). Concernant l'expression de CagA dans le LGM, Kuo *et al.* (208) ont détecté la protéine chez la moitié des patients. Il a été observé dans cette étude que les patients développant un LGM et infectés par une souche CagA positive, répondaient significativement plus rapidement à une éradication que ceux infectés par une souche CagA négative (208). L'absence de CagA chez environ la moitié des patients développant un LGM lié à l'infection à *H. pylori* suggère cependant l'existence d'autres mécanismes dans la lymphomagénèse.

L'association du facteur de virulence VacA avec le LGM a également été étudiée. L'allèle *vacAm2*, correspondant aux souches les moins biologiquement actives, prédomine et semble associé aux souches isolées de LGM (204) (224).

Lehours *et al.* ont étudié la présence de neuf gènes de virulence, *cagA*, *cagE*, *vacA*, *IceA*, *babA*, *hopQ*, *oipA*, *sabA* et *hopZ*, chez 43 souches de LGM en comparaison avec 39 souches isolées de gastrite (225). Aucun de ces gènes considéré individuellement ne semblait associé avec le LGM. Le groupe de gènes comprenant l'allèle *iceA1*, *sabA* et *hopZ* a été identifié chez les souches avec lesquelles le risque de développement de LGM était dix fois plus important que pour les souches associées à une gastrite. La faible prévalence de ces souches parmi les souches MALT en fait cependant un marqueur de faible sensibilité.

Le LPS est l'un des effecteurs essentiels des TLR4 et il a été démontré que la nature des antigènes de type Lewis exprimés à la surface du LPS de *H. pylori* conditionne l'interaction avec les cellules dendritiques par reconnaissance avec une lectine de type C (nommée DC-SIGN) (29). Ces interactions participeraient à la polarisation de la réponse T. Les antigènes exprimés par le LPS des

souches de LGM ont été étudiés (227). Les souches de MALT *cagPAI* négative expriment très fortement les antigènes de type Lewis Y. Ces antigènes de type Y ont été par le passé associés à des manifestations auto-immunes, ce qui suggère une composante de ce type dans la physiopathologie du MALT gastrique.

Par hybridation soustractive, le gène JHP950 (présent à l'extrémité de la zone de plasticité du génome de *H. pylori* de la souche de référence J99) a été identifié comme étant associé au LGM et serait un marqueur spécifique des souches à haut risque d'entraîner cette pathologie même si sa fonction reste inconnue (224).

Enfin par une approche protéomique nommée Blue Native-Poly Acrylamide Gel Electrophoresis (BN-PAGE), les complexes protéiques cytosoliques et membranaires d'une souche de lymphome ont été étudié (30). Au niveau membranaire, 16 complexes protéiques multi-hétérooligomériques et 2 complexes homooligomériques ont été identifiés et comprennent en particulier les lipoprotéines AlpA et AlpB, les adhésines majeures BabA et SabA. Ces complexes protéiques constituent des candidats potentiellement reconnus *in vivo* par les cellules de l'immunité adaptative notamment les lymphocytes T.

II. Réponse inflammatoire et infection à *H. pylori*

H. pylori est responsable d'une inflammation gastrique chronique symptomatique ou non chez l'ensemble des personnes infectées. La réponse de l'hôte comprend une réponse immune innée et adaptative conduisant au recrutement au niveau de l'estomac de cellules pro-inflammatoires telles que cellules dendritiques, macrophages, polynucléaires neutrophiles, mastocytes, cellules NK (*natural killer*), lymphocytes B et T (343). Ces cellules produisent des cytokines pro-inflammatoires, telles que l'IL-1, TNF α , IFN γ (interferon γ), IL-17, ainsi que des dérivés actifs de l'oxygène (ROS) et de l'azote (RNS), conduisant à une inflammation active chronique caractéristique de l'infection à *H. pylori* pouvant aboutir à une altération de l'épithélium.

La plupart des patients infectés par *H. pylori* sont incapables d'éliminer le pathogène, ce qui suggère que la bactérie est capable de détourner la réponse immune de l'hôte. D'autre part, si l'éradication de *H. pylori* conduit à une régression des lésions, une nouvelle infection est accompagnée d'un retour de la pathologie. Une première infection ne conduit donc pas à une réponse immune protectrice vis-à-vis d'une nouvelle rencontre avec le pathogène.

II.1 Immunité innée et inflammation

H. pylori est essentiellement une bactérie extracellulaire qui n'envahit pas la muqueuse gastrique de l'hôte, la réponse de l'hôte est donc d'abord médiée par l'interaction avec les cellules épithéliales gastriques. Ce sont en effet les premières cellules jouant un rôle dans l'immunité innée. La reconnaissance par les cellules épithéliales et la modulation de cette réponse par *H. pylori* ont un rôle clé dans la colonisation de l'épithélium gastrique.

Les PRRs (*pattern recognition receptors*) exprimés par les cellules épithéliales et les cellules de l'immunité innée interagissent avec *H. pylori* et activent l'expression de gènes pro-inflammatoires (Figure 12). Ces molécules, incluant les TLRs, reconnaissent les profils moléculaires spécifiques des pathogènes ou PAMPS (*pathogen-associated molecular patterns*) comme le LPS ou les flagellines (386). Les TLRs sont exprimés à la surface cellulaire ou au niveau des endosomes et peuvent reconnaître différents PAMPs. Parmi eux, le TLR4 se lie au LPS, TLR2 aux acides lipotechoïques et aux lipoprotéines, TLR3 aux ARNs double-brin, TLR5 à la flagelline et le TLR9 aux CpG non-méthylés. *H. pylori* évite la reconnaissance par les TLRs via la modification de certains PAMPs pour limiter l'activation des PRRs, comme le LPS tétra-acétylé faiblement reconnu par le TLR4 ou la flagelline FlaA ayant moins d'affinité pour le TLR5 (360). Le TLR2 et/ou le TLR4 semblent être les principaux récepteurs pour détecter le LPS de *H. pylori*.

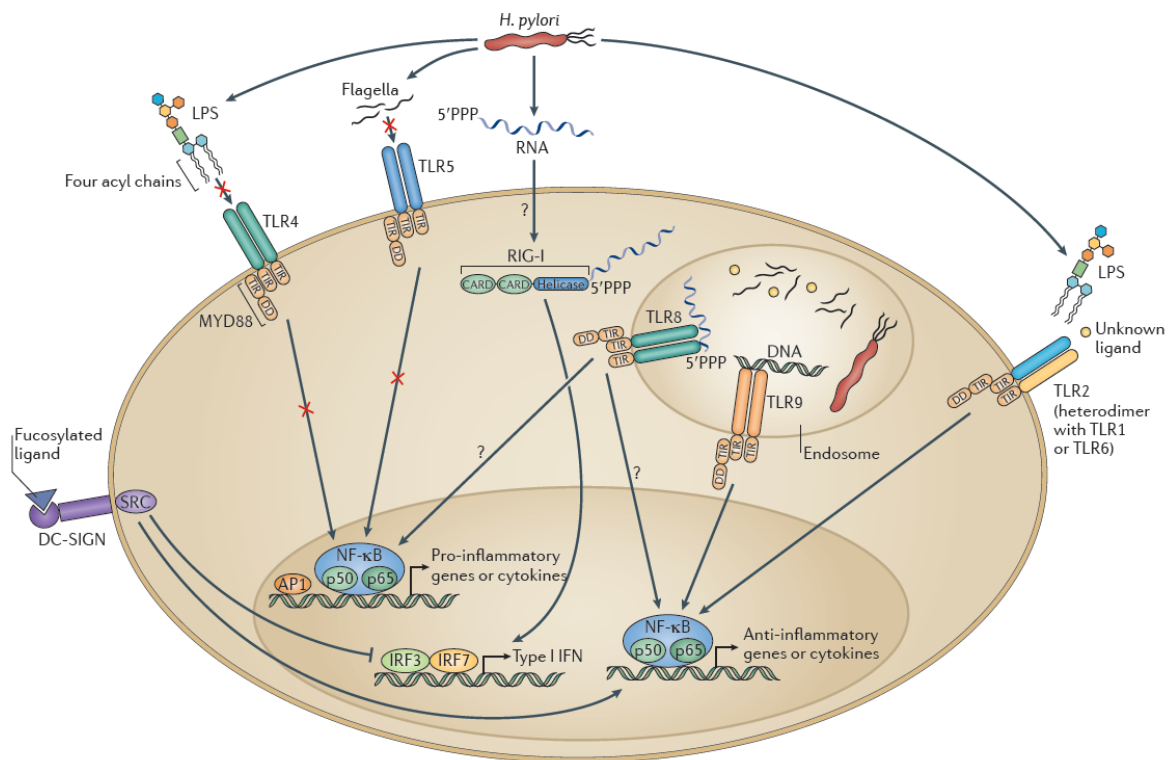


Figure 12 : Reconnaissance et échappement de *H. pylori* aux PRRs. D'après Salama *et al.* (360). *H. pylori* possède des PAMPS (*pathogen-associated molecular patterns*) capables d'échapper à la reconnaissance et la réaction pro-inflammatoire des TLRs (*Toll-like receptors*). *H. pylori* exprime un LPS tétra-acétylé moins actif que le LPS hexa-acétylé des autres bacilles à Gram négatif diminuant sa reconnaissance par le TLR4. La flagelline de *H. pylori* n'est pas détectée par le TLR5 suite à des mutations au niveau du site de liaison. L'ADN bactérien ainsi que d'autres agents bactériens sont détectés par le TLR9 et le TLR2 qui activent principalement des voies de signalisation anti-inflammatoires. Les ARNs triphosphorylés peuvent activer des RLRs (*RIG-like helicase receptors*) conduisant à la production d'IFN α et IFN β . L'ARN bactérien pourrait aussi être détecté par le TLR8 au niveau des endosomes. Les ligands DC-SIGN (*dendritic cell-specific intracellular adhesion molecule-3 gabbing non-integrin*) fucosylés de *H. pylori* inhibent cette voie de signalisation via les CLR (C-type lectin receptors) et induisent des gènes anti-inflammatoires. Les TLRs, RLRs et CLR ne sont pas tous exprimés par le même type de cellule.

D'autre part, *H. pylori* est capable d'entraîner grâce à l'îlot de pathogénicité Cag une réponse pro-inflammatoire des cellules épithéliales via l'activation de la voie NF- κ B (112) résultant en la production de chimiokines telles que CXCL2 et l'IL-8, responsables du recrutement et de l'activation des polynucléaires neutrophiles au niveau du site de l'infection. L'îlot de pathogénicité Cag est également responsable de la production des chimiokines CXCL1-3, CXCL5, CLL20, beta-défensine 2 (BD2) et du TNF α (280). Outre les dommages associés à l'îlot de pathogénicité Cag, d'autres composants de *H. pylori* peuvent induire une réponse pro-inflammatoire, comme le LPS, les lipoprotéines via la production de cytokines et une augmentation de l'expression du CMH de type II. L'interaction de *H. pylori* avec l'épithélium conduit à l'augmentation de production de nombreuses chimiokines et cytokines pro-inflammatoires, parmi lesquelles l'IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, TNF α et IFN γ participant au recrutement des polynucléaires neutrophiles, macrophages, cellules dendritiques, cellules NK et lymphocytes. La toxine VacA conduit par ailleurs à des altérations de la muqueuse gastrique facilitant le passage des antigènes bactériens et contribuant à l'activation des macrophages (265).

Les macrophages et cellules dendritiques expriment, tout comme les cellules épithéliales, des PRRs dont les NLRPs (*NOD-like receptors*), qui détectent un large éventail de PAMPs et sont essentiels pour détecter les motifs moléculaires libérés par l'hôte suite à la perturbation de l'homéostasie tissulaire induite par la colonisation bactérienne (392). Parmi les NLRs, NOD1 et NOD2 reconnaissent les métabolites et activent la voie de signalisation de NF- κ B (199) tandis que la plupart des autres NLRs favorisent l'assemblage de complexes protéiques oligomériques appelés inflammasomes qui activent la caspase 1 (Figure 13) (41). NOD1 participe à la reconnaissance du peptidoglycane injecté au sein des cellules de l'hôte via le SST4 (430). Des vésicules de membrane externe (OMV) peuvent également permettre l'interaction du peptidoglycane et de NOD1 (185). L'activation de NOD1 conduit l'induction de la voie du NF- κ B ainsi qu'à l'activation du facteur de transcription AP1 via les voies de signalisations dépendantes de ERK et p38 (5). *H. pylori* présente des ligands non caractérisés à l'heure actuelle capables d'activer l'inflammasome et la caspase 1, une cystéine protéase qui contrôle la production et la sécrétion d'IL-1 β et d'IL-18 (369). Une augmentation de ces facteurs est observée lors de l'infection par *H. pylori* (49).

De manière identique aux autres caspases, la caspase 1 est synthétisée sous la forme d'un précurseur inactif qui est activée par auto-clivage suite à l'assemblage de l'inflammasome. Cet assemblage est régulé par la reconnaissance des ligands par les NLRs qui induit l'oligomérisation des NLRs avec la molécule adaptatrice ASC (*apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase activation and recruitment domain* (CARD)) et la pro-caspase 1 (392). La plupart des ligands des NLRs ne sont pas identifiés, cependant il a été montré que le LPS de *H. pylori* est capable d'activer

l'inflammasome via NLRP3 dans les cellules dendritiques et entraîne la production d'IL-1 β (375). L'IL-1 β , cytokine pro-inflammatoire, entraîne la différenciation Th1 et Th17 (162). L'IL-18, seconde cytokine sécrétée suite à l'activation de l'inflammasome est essentielle pour l'induction de la réponse inflammatoire T régulatrice suite à l'infection par *H. pylori* (301). La part de l'inflammasome dans la réponse à l'infection à *H. pylori* est encore mal comprise. Le développement de modèles murins de souris KO pour certains composants de cette réponse permettra à l'avenir de mieux en comprendre son importance.

Les macrophages recrutés au sein de la muqueuse gastrique infectée exercent un rôle pro-inflammatoire via la production de cytokines et d'oxyde nitrique, des souris déplétées en macrophages ayant une gastrite à *H. pylori* moins sévère que des souris sauvages (186). Les polynucléaires neutrophiles contribuent également à la gastrite via la sécrétion de cytokines et de facteurs créant des lésions tissulaires dont les ROS et les RNS lors de la dégranulation. Ils participent, tout comme les macrophages, à la phagocytose bactérienne à laquelle *H. pylori* peut résister en interférant avec les protéines lysosomales (4). Des souris infectées déplétées en polynucléaires neutrophiles sont en effet colonisées de la même façon par *H. pylori* que des souris normales (179).

H. pylori peut par ailleurs détoxifier les radicaux oxygénés libres grâce à sa catalase et sa superoxyde dismutase et limiter leur production grâce à son arginase.

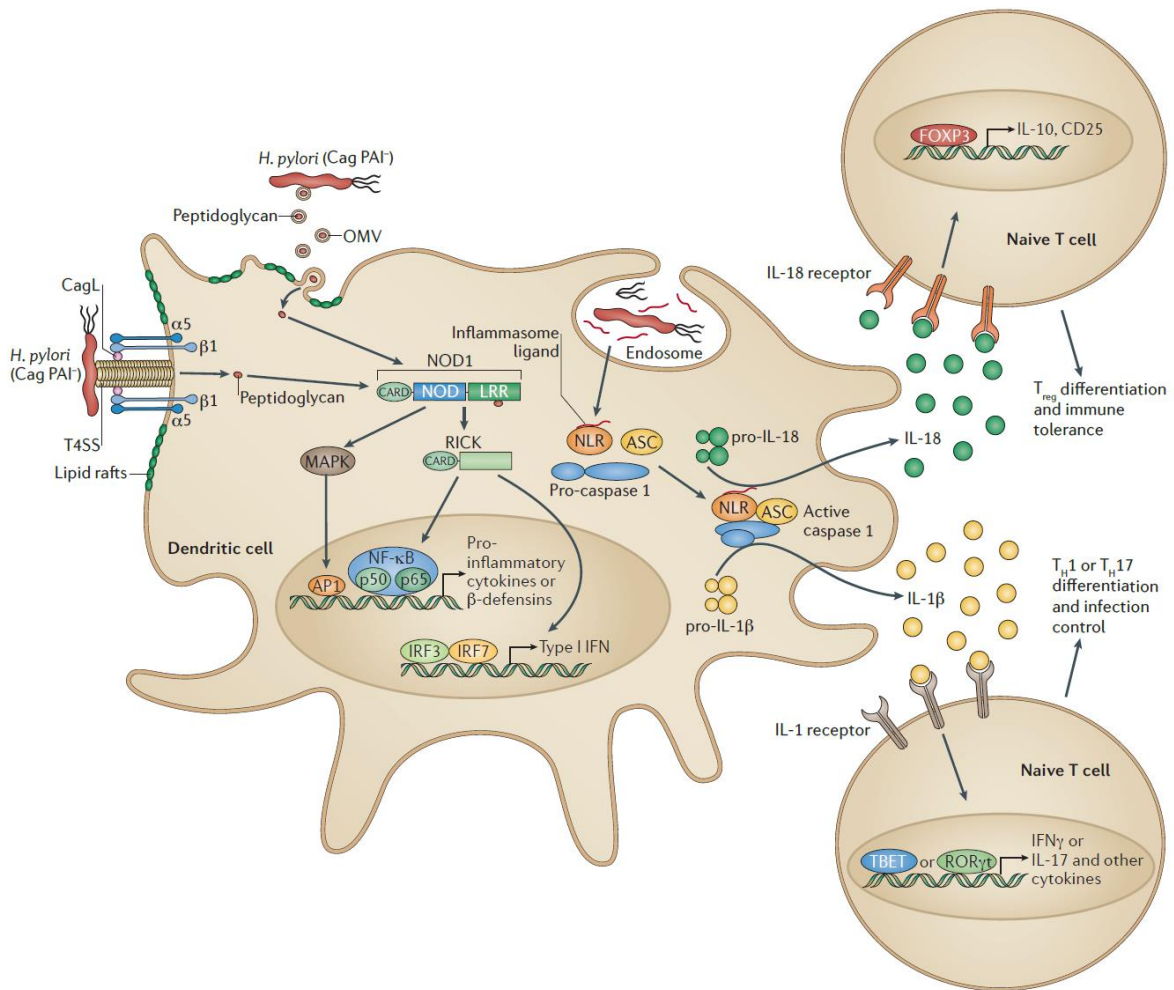


Figure 13 : Activation des NLRs, de la voie du NF-κB et de la caspase 1 suite à l'infection par *H. pylori*. D'après Salama *et al.* (360). Le peptidoglycane de *H. pylori* se lie aux NLRs cytoplasmiques via le SST4 ou des OMVs. L'activation de NOD1 conduit à l'expression de cytokines pro-inflammatoires, de β-defensine et d'interféron via les voies du NF-κB, AP1, IRF3 et IRF7. Des ligands non-identifiés des NLRs activent l'inflammasome conduisant au clivage de la pro-caspase 1 et la sécrétion d'IL-1β et d'IL-18. L'IL-18 favorise la différenciation des lymphocytes T naïfs en lymphocytes T régulateurs CD4⁺ CD25⁺. L'IL-1β induit la différenciation Th1 ou Th17. Cette figure représente une cellule dendritique, même si l'activation de NOD1 par le peptidoglycane a été décrite chez les cellules épithéliales gastriques.

Des mastocytes sont aussi présents au niveau de la muqueuse gastrique infectée (23), leur rôle n'est pas élucidé mais ils pourraient participer à la réparation tissulaire et à l'inflammation.

Les cellules dendritiques et les cellules épithéliales gastriques produisent de l'acide rétinoïque, important facteur de régulation de l'inflammation. Suite à l'infection par *H. pylori*, la production d'acide rétinoïque au niveau de la muqueuse est diminuée, conduisant à une augmentation de l'inflammation et possiblement un risque de développement d'un ulcère ou d'un adénocarcinome gastrique (33).

Des cellules NK sont également présentes au niveau de la muqueuse gastrique des patients infectés et dans le sang périphérique (293) (351), mais leur rôle dans la physiopathologie de l'infection n'est pas établi. Les perforines et granzymes issues de ces cellules pourraient induire des lésions tissulaires. *In vitro*, les cellules NK répondent à l'infection par *H. pylori* en sécrétant des cytokines telles que l'IFN γ , et le TNF α (464).

L'autophagie, voie de dégradation lysosomale des constituants cellulaires, est essentielle à l'homéostasie cellulaire qui participe à la régulation de la réponse inflammatoire. Une dérégulation de l'autophagie peut conduire à la production de ROS et des altérations de l'ADN. Il a été montré que *H. pylori* était capable de perturber l'autophagie, notamment via VacA (338) ou via l'interaction entre les OMVs et NOD1 (175).

II.2 Immunité adaptative

La chronicité de l'infection à *H. pylori* est associée à l'induction d'une réponse adaptative à la suite de la réponse innée.

Les macrophages jouent un rôle important dans la coordination de cette immunité adaptative en particulier via la production d'IL-12 favorisant une réponse Th1. L'infection à *H. pylori* induit en effet une réponse T importante incluant la présence de lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺. Les lymphocytes T CD8⁺ présents au niveau de la muqueuse gastrique contribuent à l'inflammation, leur rôle est moins connu que celui des lymphocytes T CD4⁺.

Les lymphocytes T CD4⁺ ou helper peuvent se différencier en deux sous-types principaux : T helper 1 (Th1) sécrétant IL-2 et IFN γ , favorisant la réponse macrophagique, et T helper 2 (Th2) sécrétant IL-4, IL-5, et IL-13 qui ont un rôle dans la croissance et différenciation des lymphocytes B, mais également T régulatrice (Treg) via la production d'IL-10.

La réponse immunitaire induite par *H. pylori* est dans un premier temps de type Th1 avec la production d'IL-1 β , IL-12, IL-18, TNF α et IFN γ (148). Ces cytokines régulent leur propre

expression par des mécanismes autocrines afin d'amplifier la réponse inflammatoire (292). Les lymphocytes T régulateurs (LTreg) participent à la régulation de la réponse Th1 par la production d'IL-10 et de TGF β et ainsi permettent la persistance de l'infection via leur action anti-inflammatoire (334). Ils protègent la muqueuse gastrique d'une inflammation exagérée et de lésions tissulaires (336) (335). Les LTregs peuvent être recrutés par des chimiokines comme CCL17 et CCL22 (72), CCL20 et CXCL13 (63), ou l'IL-18 sécrétée suite à l'activation de l'inflammasome. Une déplétion en LTregs chez des souris infectées par *H. pylori* conduit à une gastrite sévère, un afflux de lymphocytes B, T et de macrophages dans la muqueuse gastrique et diminue la colonisation par *H. pylori* (329).

Ainsi, *in vivo* chez l'homme, la réponse obtenue est majoritairement polarisée Th1 notamment dans les ulcères et l'adénocarcinome. Elle devrait permettre l'élimination du pathogène mais cette réponse est inadaptée pour une bactérie essentiellement extracellulaire. Elle est par ailleurs contrebalancée par la réponse Treg qui se met en place. Cette réponse Treg est en particulier très intense au cours des premières années de l'infection naturelle. Certains auteurs pensent d'ailleurs qu'elle pourrait avoir des effets bénéfiques indirects, notamment protecteurs, contre certaines manifestations allergiques (301) (300). Cette balance Th1/Treg est contrôlée par les cellules dendritiques (DC) infiltrant la muqueuse gastrique. On considère que ces DC orientent vers une réponse Treg par plusieurs mécanismes simultanés : la reconnaissance par le DC-SIGN, la stimulation de TLRs intracellulaires et l'action de la GGT de *H. pylori*. Les conséquences de la coopération DC-LT sont donc le fruit d'un subtil équilibre qui se met en place *in vivo*. Une stratégie vaccinale, actuellement en cours d'évaluation en Allemagne (Pr M Gerhard, Munich), vise à induire la production d'anticorps neutralisant la GGT ce qui permettrait de libérer la réponse Th1.

L'infection est caractérisée mais d'une manière beaucoup moins importante, par une réponse de type Th2 notamment via la production d'IL-4 et d'IL-13. Dans le LGM les deux réponses Th1 et Th2 sont cependant présentes et il existerait un certain équilibre entre les deux (294). La présence de lymphocytes de type Th17 est également observée. Ces cellules produisent des cytokines pro-inflammatoires dont l'IL-17A, IL-17F, IL-21 et IL-22 et favorisent l'expression de peptides antimicrobiens, ROS, RNS et chimiokines conduisant à une augmentation de l'inflammation et au recrutement des polynucléaires neutrophiles (443).

H. pylori induit l'expression de BAFF, un membre de la famille du TNF ayant un rôle dans la différenciation Th17 par les macrophages (276). D'autre part, les souches *cagA* positives sont capables d'induire une réponse de type Th17 en augmentant l'expression d'IL-23 (165). Chez les

souris infectées par *H. pylori*, une réponse Th17 est observée avec la réponse Th1 et conduit à une gastrite sévère (381). Lors de l'infection par *H. pylori*, une accumulation de lymphocytes de type Th22 au sein de la muqueuse gastrique humaine et murine (475). Son rôle dans l'inflammation induite par *H. pylori* n'est pas bien défini. La polarisation Th22 serait favorisée par l'IL-23 produite par les cellules dendritiques.

L'infection à *H. pylori* induit également une réponse humorale, caractérisée principalement par la production d'IgM, d'IgG et d'IgA (396). La muqueuse gastrique peut en effet être infiltrée par des lymphocytes B, lymphoplasmocytes et plasmocytes. La réponse B en dehors du contexte du LGM est considérée comme bénéfique pour compenser la réponse T. Elle ne confère aucune protection contre le pathogène. Une production locale d'immunoglobulines muqueuses est présente, notamment d'IgA mais non stables en milieu acide. La forte réponse humorale à IgG, notamment au stade chronique de l'infection, est utilisée comme un marqueur indirect de l'infection. Ces anticorps ne parviennent pas à éradiquer le pathogène et pourraient contribuer à maintenir une charge bactérienne faible (140).

L'infection à *H. pylori* peut être associée à des gastrites auto-immunes. Plusieurs études cliniques et épidémiologiques indiquent en effet que la plupart des patients présentant une gastrite auto-immune sont colonisés par *H. pylori* (76). La bactérie induit la production d'anticorps reconnaissant les antigènes de la muqueuse gastrique chez environ la moitié des individus (100). La pompe à proton gastrique, H⁺K⁺ ATPase, est la cible principale de ces auto-anticorps. La gastrite auto-immune est médiée par les lymphocytes T CD4⁺ avec un TCR reconnaissant les antigènes de la pompe à proton (27). La gastrite auto-immune peut être induite par une réponse de type Th1, Th2 ou Th17 (393). Les lymphocytes Tregs auraient un rôle dans l'initiation de cette gastrite en inhibant l'activation des cellules dendritiques présentant les auto-antigènes (84).

Les principales étapes de la réponse immunitaire sont résumées dans la figure 14.

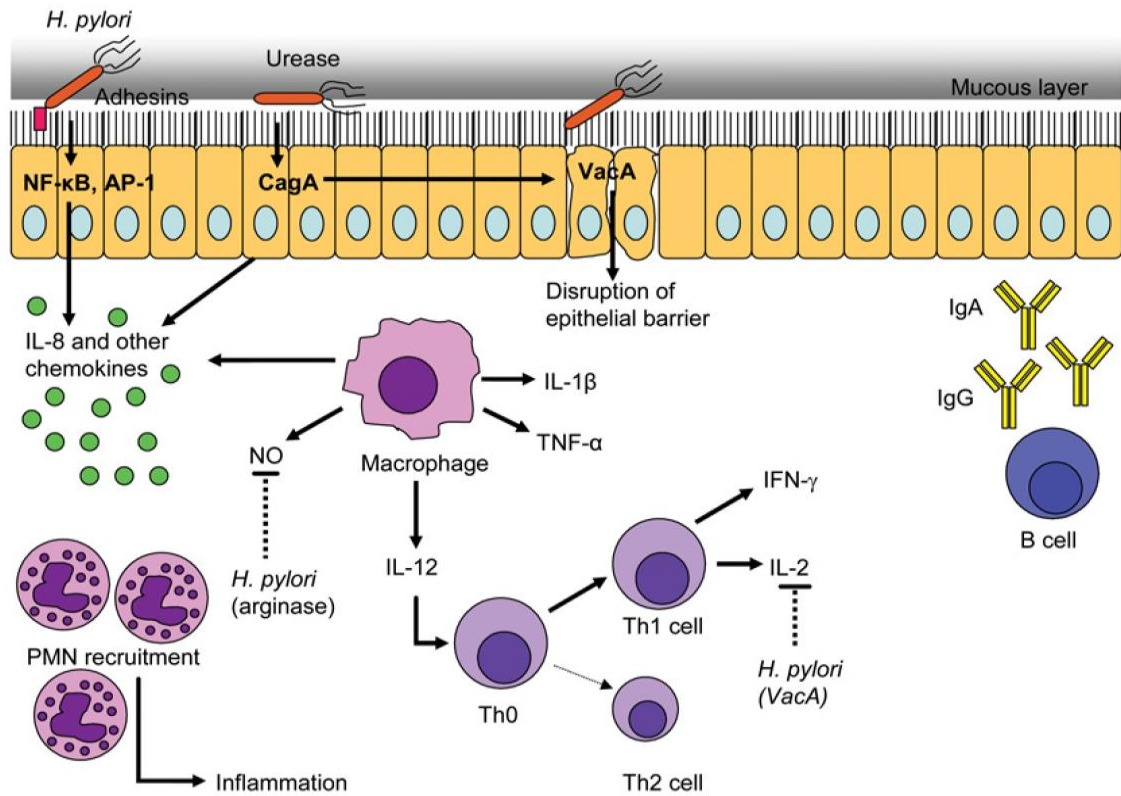


Figure 14 : Réponse immunitaire suite à l'infection par *H. pylori*. D'après Portal-Celhay et Perez-Perez (326).

III. Lymphome gastrique du MALT

III.1 Introduction

Le terme « lymphome » évoque en premier lieu une pathologie ganglionnaire. Cependant, on retrouve la présence de tissu lymphoïde au niveau de certains organes, notamment le tube digestif. Ainsi les lymphomes surviennent dans 25% des cas en dehors des ganglions et la localisation la plus fréquente est le tube digestif (124).

Certains organes, comme l'estomac, les glandes salivaires, les poumons ou la thyroïde sont normalement dépourvus de toute structure lymphoïde et peuvent cependant être le siège de lymphomes regroupés sous le nom de lymphomes de type MALT (*Mucosa Associated Lymphoid Tissue*). Ce sont des lymphomes extra-ganglionnaires non hodgkiniens (394) (176). Les lymphomes primitifs gastro-intestinaux (LPGI) représentent 30 à 40% des lymphomes extra-ganglionnaires et regroupent différentes entités anatomo-pathologiques définies selon l'origine cellulaire (B ou T), la présentation clinique ou le traitement. Le site de développement est l'estomac dans deux tiers des cas. Dans les pays occidentaux, 90% des LPGI se développent à partir de lymphocytes B. Parmi les lymphomes B, on peut distinguer selon la taille des cellules les lymphomes de bas degré de malignité ou de bas grade (petites cellules) de ceux de haut degré de malignité ou haut grade (grandes cellules), beaucoup plus agressifs (355).

Le lymphome gastrique du MALT (LGM) est un lymphome non Hodgkinien caractérisé par la prolifération de lymphocytes B au niveau de la muqueuse gastrique. Ce lymphome est peu agressif, reste localisé au niveau de l'estomac et a une évolution lente. Son développement est directement lié à l'infection à *H. pylori* bien que cette évolution survienne seulement chez un nombre très faible de sujets infectés. L'incidence de cette pathologie est faible, en Europe elle est estimée entre 0,2 et 0,8 personnes pour 100 000 personnes, l'âge médian de diagnostic est de 60 ans et le sexe ratio est en faveur de l'homme (1,27 pour 1) (420).

III.2 Infection à *H. pylori* et lymphome gastrique du MALT

Il est maintenant admis que le lymphome de type MALT est directement associé à l'infection par *H. pylori* (320) (404).

Tout d'abord plusieurs études épidémiologiques ont appuyé ce lien dans les années 1990. La prévalence de l'infection à *H. pylori* dans le LGM était de 92 % dans les premières études publiées alors que la prévalence de l'infection dans la population française était de 25% (448) (177) (92). Une

augmentation des cas à priori *H. pylori* négatif est cependant rapportée (86). Des études épidémiologiques ont trouvé une corrélation entre la fréquence de l'infection à *H. pylori* et celle des lymphomes gastriques dans certaines régions (en Italie notamment) (85). En outre, le risque de développer un LGM est six fois plus élevé en cas d'infection par *H. pylori* selon deux larges cohortes (313). Cette infection n'augmente pas les risques de lymphomes nodaux, soulignant le lien spécifique entre *H. pylori* et LGM. Qui plus est, quinze ans avant le diagnostic du LGM, 88% des patients possédaient déjà des anticorps anti-*H. pylori* au niveau sérique : l'infection est donc chronologiquement antérieure à l'apparition du lymphome.

En ce qui concerne la physiopathologie du LGM, il a été montré que les follicules lymphoïdes apparaîtraient après une stimulation antigénique chronique exercée par *H. pylori* sur la muqueuse gastrique. Cette hypothèse a été validée *in vitro* en montrant que des lymphocytes T purifiés de gastrectomies de patient LGM sensibilisés par *H. pylori* produisent des cytokines stimulant la prolifération lymphocytaire B (75) (173) (172). Cette prolifération était spécifique de *H. pylori*, elle n'a été observée qu'avec certaines souches et uniquement avec des cellules de lymphome gastrique (173).

La preuve définitive de l'implication de *H. pylori* dans la physiopathologie du LGM a été apportée par l'effet de l'éradication de la bactérie sur la régression des lésions lymphomateuses. Une première étude décrite par Wotherspoon *et al.* a permis de démontrer la possibilité de faire régresser le LGM après éradication de la bactérie par des antibiotiques (446) : une régression à 22 mois du LGM a été observée chez 5 des 6 patients de l'étude. Plusieurs études ont confirmé ces résultats (441) et il est maintenant admis que dans 60 à 80% des cas le LGM de faible degré de malignité peut être traité par l'éradication de *H. pylori* (242). Si une réinfection a lieu, le LGM reprend son développement de manière plus rapide, les cellules néoplasiques étant déjà sensibilisées au stimulus antigénique de la bactérie (46). Au stade de haut degré de malignité les chances de guérison par éradication semblent beaucoup plus aléatoires, sans doute du fait de l'accumulation d'anomalies génétiques cellulaires irréversibles (287).

L'infection par *H. pylori* n'est pas détectée dans environ 5 à 10% des LGM (86), pourtant une régression du LGM peut être obtenue suite à l'éradication de *H. pylori* chez une proportion des patients concernés variable selon les études (285) (330) (331). Une des hypothèses expliquant la réponse au traitement d'éradication est que les patients pourraient être infectés par une bactérie autre que *H. pylori* qui serait éliminée lors du traitement antibiotique, comme « *Helicobacter heilmannii* »

(272). La seconde hypothèse la plus probable est liée à la difficulté à diagnostiquer l'infection à *H. pylori* chez certains patients LGM (226). En effet, aucune méthode diagnostique n'est sensible à 100% que ce soit les méthodes invasives (culture, biologie moléculaire et histologie) ou non-invasives (test respiratoire à l'urée marquée, sérologie). Les méthodes invasives peuvent être facilement prise en défaut notamment en cas d'inoculum faible. La méthode la plus adaptée dans le LGM semble être l'histologie et la sérologie même si cette dernière n'est pas le reflet d'une infection toujours active. La culture et la PCR étaient moins sensibles dans l'étude de Lehours *et al.*, mais cependant à cette époque le format de PCR utilisé (PCR en point final) était moins sensible que les PCR en temps réel utilisées maintenant en routine (226) (306).

III.3 Clinique

Les symptômes des patients souffrant de LGM sont peu spécifiques (394) (104) ce qui complique le diagnostic précoce de l'infection pourtant essentiel à la mise en place d'un traitement adapté. Les symptômes se résument souvent à des douleurs épigastriques pouvant évoquer une maladie ulcéreuse. Une dyspepsie, des saignements et des brûlures d'estomac peuvent être observés. Plus rarement des symptômes plus sévères tels qu'une anémie, des mélémas, hématomèses, vomissements et perte de poids sont retrouvés. Le LGM peut être découvert à l'occasion d'une perforation gastrique ou d'hémorragies (353). L'altération de l'état général est le plus souvent modérée. Le LGM évolue très progressivement et reste longtemps localisé dans l'estomac. Compte-tenu du peu de spécificité de la présentation clinique, le diagnostic est réalisé par l'analyse de biopsies gastriques réalisées par endoscopie.

III.4 Aspects endoscopiques

Tout comme la clinique, les aspects endoscopiques peuvent ne pas être évocateurs de LGM pour un endoscopiste non spécialisé. Des lésions malignes claires peuvent être présentes, comme des ulcères, masses, mais fréquemment seuls des érosions, des petits nodules ou un épaissement des plis gastriques peuvent être observés. La muqueuse gastrique peut également être normale (480). Compte-tenu du peu de spécificité des signes cliniques et endoscopiques, un nombre suffisant de biopsies à la fois de lésions macroscopiques et de muqueuse normale doit être effectué (354). Cette procédure est appelée « *Gastric mapping* » (Figure 15), au moins 10 biopsies doivent être réalisées au niveau des lésions macroscopiques, tandis que le nombre de biopsies au niveau de la muqueuse

normale n'est pas spécifié. Ce type de protocole n'est pas réalisé en première intention, mais souvent suite à une première endoscopie faisant suspecter un LGM.

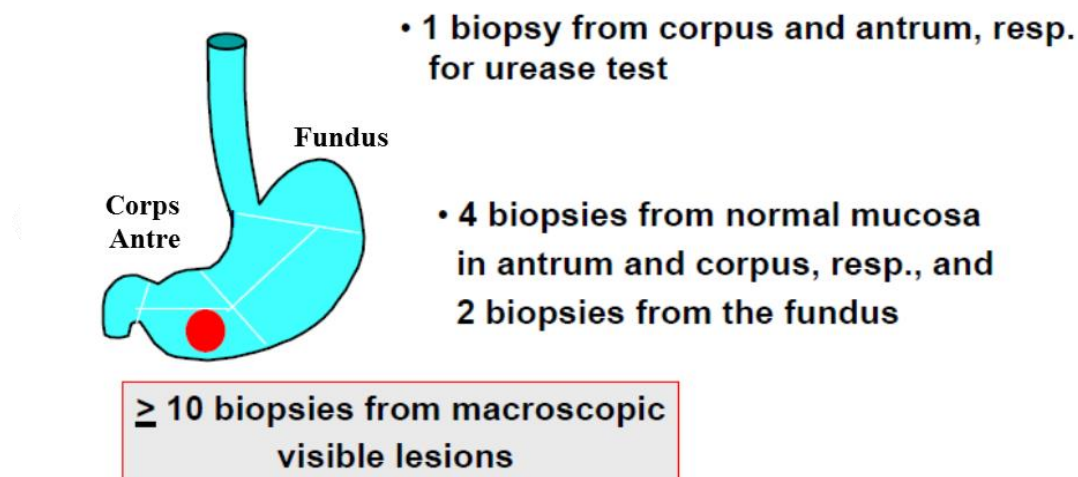


Figure 15 : Gastric mapping. D'après Fischbach (109). Compte-tenu du peu de spécificité des signes cliniques et endoscopiques, un nombre suffisant de biopsies à la fois de lésions macroscopiques et de muqueuse normale doit être effectué.

III.5 Aspect anatomopathologique

L'estomac est normalement dépourvu de tissu lymphoïde de type MALT. Un infiltrat lymphoïde peut cependant apparaître lors d'une gastrite aiguë ou chronique. Dans certains cas, cette inflammation s'accompagne de l'apparition de follicules lymphoïdes (tissus lymphoïdes organisés) à partir desquels émerge le lymphome du MALT. Le LGM se caractérise par une infiltration au niveau de la muqueuse gastrique de cellules lymphoïdes, faite de petites cellules B monomorphes d'allure centrocytique. Parfois une différenciation plasmocytoïde peut être observée parmi les petits lymphocytes (104). Les cellules sont organisées en follicules lymphoïdes organisés à l'image d'une plaque de Peyer (Figure 16). Le LGM est aussi caractérisé par la présence de lésions lympho-épithéliales (LLE) dues à une prolifération excessive de cellules B résultant en une infiltration de l'épithélium et une destruction des cellules épithéliales gastriques (178) (Figure 17). Il est établi que l'on peut retrouver, au sein d'un LGM de faible degré de malignité, une proportion variable de grandes cellules transformées, sans pour autant porter le diagnostic de LGM de haut degré de malignité.

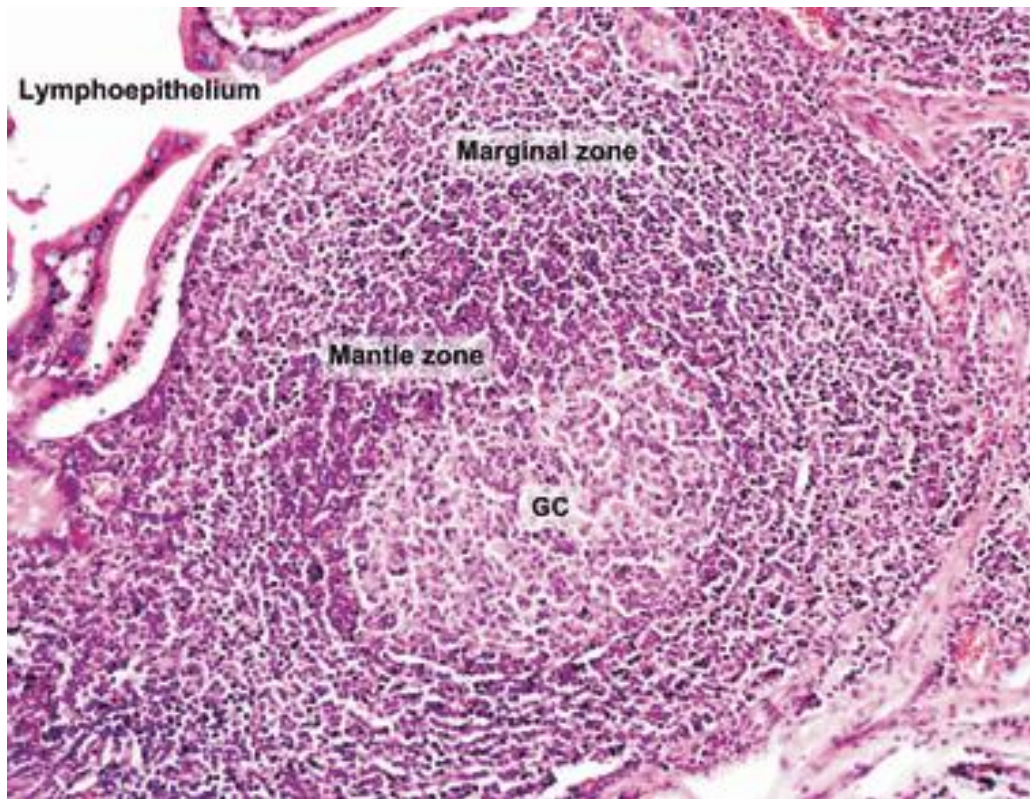


Figure 16 : Caractéristiques histologiques des plaques de Peyer : les plaques de Peyer constituent le meilleur exemple de tissu lymphoïde associé aux muqueuses. Elles sont principalement retrouvées au niveau de la partie terminale de l'iléon et sont caractérisées par des follicules lymphoïdes avec des centres germinaux bien définis (GC), entourés d'une zone composée de petits lymphocytes monomorphes appelée zone du manteau. Cette zone est entourée de la zone marginale composée de lymphocytes B mémoires, plasmocytes et lymphocytes T. L'épithélium entourant ce tissu lymphoïde est composé de cellules épithéliales membranaires appelées cellules M qui transportent les antigènes de la lumière de l'intestin vers la lamina propria. Des lymphocytes sont présents au sein de l'épithélium, principalement des lymphocytes T cytotoxiques. Cette zone forme avec la zone marginale le lymphoépithélium. D'après Ferreri *et al.* (104)

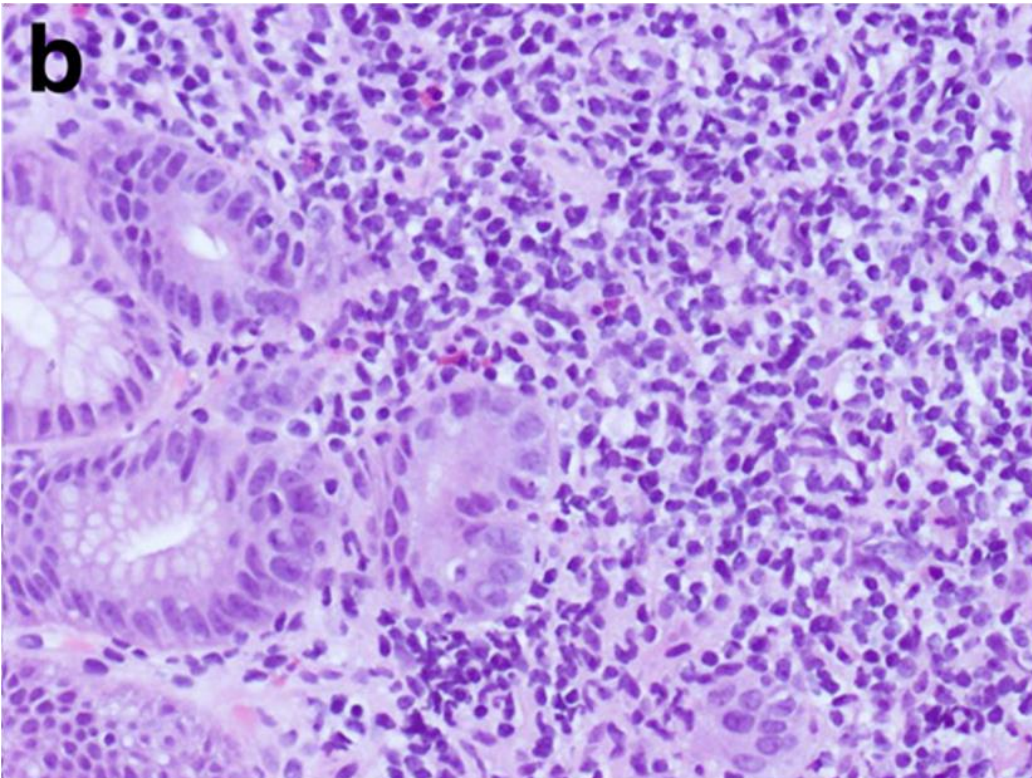
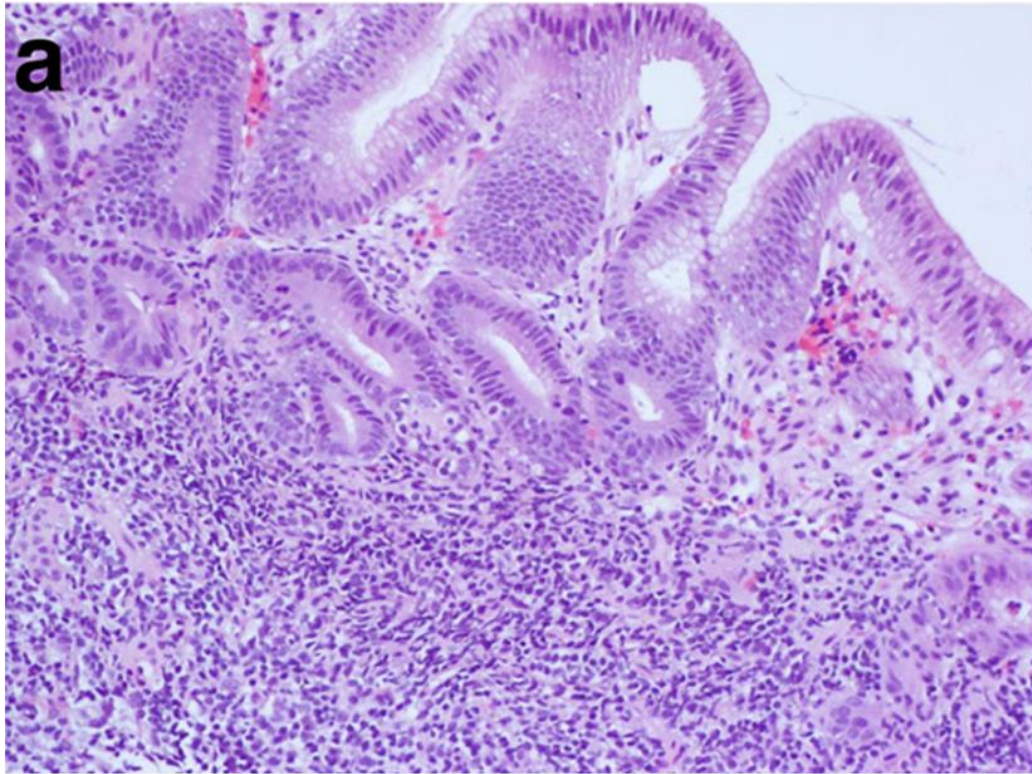


Figure 17 : Aspect anatomopathologique caractéristique du LGM. Biopsie gastrique montrant un infiltrat de petits lymphocytes monomorphes d'allure centrocytique au sein de la lamina propria (a, grossissement X100) et la présence de lésions lympho-épithéliales (b, coloration H&E, grossissement X200). Figure reproduite d'après Hu *et al.* (169)

Les changements histologiques observés entre la muqueuse gastrique normale, la gastrite chronique active et le LGM ont été décrits par Wotherspoon *et al.* (Tableau 2) (446). Mais s'il existe une continuité dans les stades histologiques, le diagnostic peut être délicat si les variations sont minimales. Les infiltrats lymphoïdes sont composés majoritairement de lymphocytes B ne présentant pas de profil antigénique spécifique mais ayant le même immunophénotypage que les lymphocytes B de la zone marginale présents dans la rate, les plaques de Peyer et les ganglions lymphoïdes. Ils expriment donc des marqueurs de surfaces bien spécifiques et typiques de la zone marginale : CD20, CD79a, Bcl2 et une immunoglobuline membranaire de type M et ont un marquage IgD, CD5, CD10, Bcl6 et cycline D1 négatif. Un réarrangement monoclonal du gène des chaînes lourdes des immunoglobulines (*IgH*) est observé dans les LGM, avec une monotypie lambda ou kappa des chaînes légères (212). Cette monoclonalité peut être détectée par méthodes moléculaires. L'apparition de cette monoclonalité des cellules B lors d'une gastrite annonce souvent l'évolution vers un LGM (283). Des lymphocytes T CD3⁺ non néoplasiques accompagnent souvent ces infiltrats avec une prédominance des LyT helpers (CD4⁺). En effet, la prolifération des lymphocytes B est T-dépendante par l'interaction CD40-CD40L avec les LyT helpers activés par *H. pylori*.

Score	Diagnostic	Caractéristiques histologiques
0	Normal	Plasmocytes disséminés dans la lamina propria. Absence de follicules lymphoïdes.
1	Gastrite chronique active	Petits clusters de lymphocytes dans la lamina propria. Absence de follicules lymphoïdes ni de LLE.
2	Gastrite chronique active avec formation de follicules lymphoïdes	Follicules lymphoïdes importants entourés de cellules de la zone du manteau et de plasmocytes
3	Infiltrat lymphoïde suspect, probablement réactif	Follicules lymphoïdes entourés de lymphocytes d'allure centrocytique infiltrant de manière diffuse la lamina propria et occasionnellement l'épithélium.
4	Infiltrat lymphoïde suspect, probablement lymphomateux	Follicules lymphoïdes entourés de lymphocytes d'allure centrocytique infiltrant de manière diffuse la lamina propria et l'épithélium par petits groupes.
5	Lymphome du MALT de bas grade	Présence d'infiltrats denses et diffus de lymphocytes d'allure centrocytique dans la lamina propria avec des LLE importantes.

Tableau 2 : Score de Wotherspoon décrivant les critères histologiques de diagnostic de LGM (446)

Le LGM est un lymphome B de bas grade avec un infiltrat de petits lymphocytes, sa transformation vers un lymphome de haut grade n'est pas classique. Les lésions lympho-épithéliales et les follicules lymphoïdes disparaissent pour laisser place à des grandes cellules à l'allure de centroblastes ou à des immunoblastes avec parfois une différenciation plasmocytaire. Dans ce cas, l'infiltrat peut être mineur ou majeur selon le stade de transformation. La transformation en LGM de haut grade est de moins bon pronostic.

Le LGM reste le plus souvent localisé au niveau de l'estomac, mais peut présenter comme tout lymphome d'autres localisations tumorales, d'où l'intérêt d'un bilan d'extension. Les localisations secondaires concernent en particulier les muqueuses hébergeant des lymphocytes de type MALT, soit à l'état physiologique (poumon, intestin), soit à l'état pathologique (thyroïde, cavum, parotide). L'atteinte médullaire et la présence d'adénopathies périphériques sont rares.

Le bilan de ces examens permet de classer le lymphome en différents stades. Plusieurs classifications existent comme celle de Lugano utilisée depuis une vingtaine d'années (Tableau 3) (478) ou des plus récentes comme la classification modifiée d'Ann Arbor (Musshoff) (354). A l'heure actuelle, le système à utiliser pour évaluer les stades du LGM reste controversé (478).

La plupart des LGM sont localisés au niveau de la muqueuse et sous-muqueuse gastrique, plus rarement au niveau de la couche supérieure de la musculaire (stade I). Un envahissement des ganglions lymphatiques peut également être observé. La présence simultanée d'un LGM et d'un adénocarcinome gastrique est exceptionnelle au stade du diagnostic (45) (54) (184).

Classification	Extension tumorale
Stade I : tractus gastro-intestinal uniquement	Muqueuse Sous-muqueuse Musculeuse Séreuse
Stade II : Extension à l'abdomen	Ganglions lymphatiques peri-gastriques
II ₁ : envahissement ganglions adjacents	Ganglions régionaux plus distants
II ₂ : envahissement ganglions distants	
Stade II _E : pénétration de la séreuse pour envahissement des organes ou tissus adjacents	Envahissement des structures adjacents +/- ganglions lymphatiques abdominaux
Stade IV : envahissement extra-ganglionnaire disséminé ou envahissement ganglionnaire supra-diaphragmique	Ganglions lymphatiques extra-abdominaux +/- organes distants abdominaux ou extra-abdominaux +/- moelle osseuse

Tableau 3 : Système de classification de Lugano (478)

III.6 Anomalies moléculaires

La prolifération crée des conditions favorables à l'apparition d'une instabilité génétique dans les cellules B. Des translocations chromosomiques peuvent ainsi apparaître induisant une lymphoprolifération alors indépendante de la stimulation antigénique exercée par *H. pylori* et donc ne régressant plus après antibiothérapie (394). Les anomalies cytogénétiques les plus souvent retrouvées dans le lymphome gastrique du MALT sont des translocations entraînant l'activation du

facteur de transcription nucléaire NF-κB. Ce facteur de transcription est impliqué dans l'inflammation mais aussi dans la survie, la différenciation et la prolifération cellulaire. Cinq translocations ont été décrites dans les lymphomes du MALT (Tableau 4). Aucune de ces translocations n'est cependant suffisante pour induire à elle seule un lymphome du MALT, suggérant le rôle d'autres facteurs associés, dont les facteurs immuns, génétiques et environnementaux (87).

Translocation	Protéine de fusion
t(11;18)(q21;q21)	API2-MALT1
t(1;14)(p22;q32)	BCL10-IGH
t(1;2)(p22;p12)	BCL10-IGK
t(14;18)(q32;q21)	IGH-MALT1
t(3;14)(p14;q32)	FOXP1-IGH

Tableau 4 : Translocations chromosomiques récurrentes décrites dans les lymphomes du MALT. API2 : *Apoptosis inhibitor 2* ; MALT1 : *Mucosa-associated lymphoid tissue translocation protein 1* ; BCL10 : *B-cell chronic lymphocytic leukemia/lymphoma protein 10* ; IGH : *Immunoglobulin heavy chain* ; IGK : *Immunoglobulin kappa light chain* ; FOXP1 : *Forkhead box protein P1*.

La translocation t(11;18)(q21;q21) conduisant au gène de fusion *API2/MALT1* est la mieux caractérisée, elle est retrouvée dans 20 à 60% des lymphomes gastriques du MALT. Elle n'est pas détectée dans les LGM de haut degré de malignité ni dans les autres lymphomes gastriques (20), mais elle peut être retrouvée dans des lymphomes de la zone marginale d'autres sites muqueux. Cette translocation conduit à une expression constitutive de NFκB par fusion des gènes *API2* (*apoptosis inhibitor 2*) et *MALT1* (*mucosa-associated lymphoid tissue translocation protein 1*) (320). Plusieurs zones de fusion ont été identifiées au sein des exons 7 et 8 du gène *API2*, et 3 sites majoritaires dans le gène *MALT1*. Cette translocation est associée à des stades plus avancés, en particulier aux tumeurs ayant commencé à envahir la sous-muqueuse. Cette translocation est plus significativement associée à des souches CagA positives (459). Les patients ne possédant pas cette translocation présentent une meilleure réponse au traitement d'éradication et une médiane de survie plus importante (55).

La translocation t(1;14)(p22;q32) a également été caractérisée et est retrouvée dans environ 5% des lymphomes gastriques (449) (1). Elle entraîne la surexpression de la protéine Bcl-10 (*B Cell Lymphoma 10*) dont le gène est placé sous le contrôle du promoteur du gène des chaînes lourdes des

immunoglobulines. Cette protéine possède un domaine de recrutement des caspases CARD et peut donc jouer un rôle dans la régulation de l'apoptose. La protéine Bcl-10 sauvage a un rôle proapoptotique et anti-tumoral, tandis que Bcl-10 tronquée produite suite à la translocation est capable d'activer NF- κ B et la prolifération cellulaire (469) (352). Elle possède une activité oncogénique (444). La translocation t(1;2)(p22;p12) est une variante, le gène de Bcl-10 étant juxtaposé au gène *IGK* (chaîne légère kappa des immunoglobulines) conduisant à une surexpression de Bcl-10.

Les translocations t(14;18)(q32;q21) et t(3;14) (p14;q32) ont également été mises en évidence mais leur signification clinique n'a pas été établie.

Les gènes induits par NF- κ B et favorisant la survie cellulaire commencent à être identifiés. Ils incluent un membre de la famille Bcl-2 (*B Cell Lymphoma 2*) aux propriétés anti-apoptotiques, des inhibiteurs de caspases et les facteurs TRAF1 et TRAF2 (membres de la famille des Facteurs Associés au Récepteur du TNF) impliqués dans l'inflammation, la réponse aux pathogènes et l'apoptose (59) (434) (476).

Dans certains cas de LGM de faible degré de malignité, d'autres anomalies moléculaires peuvent être retrouvées. La protéine p53, impliquée dans le maintien de l'intégrité du génome, est partiellement inactivée dans 28% des cas (317). Des mutations sur les régions régulatrices de l'oncogène c-myc ont été observées et concernent 16% de LGM (318) ainsi que des délétions dans le gène *A20* (ou *TNFAIP3*, *TNF-alpha-induced protein 3*) conduisant à l'inactivation de la protéine inhibitrice de NF- κ B (167). L'inactivation des gènes peut également être due à une hyperméthylation comme ce qui est observé pour les gènes *TP15* (10%) et *TP16* (44%) (248) (249). Des anomalies génétiques surnuméraires au niveau des chromosomes 3, 8 et 12 ont également été décrites. La trisomie 3 est notamment présente dans 30% des LGM mais son importance fonctionnelle dans la progression de la pathologie est mal établie (447). Cette trisomie n'est d'ailleurs pas spécifique du LGM et retrouvée dans d'autres lymphomes.

III.7 Traitement

Le traitement du LGM ne fait pas toujours l'objet d'un consensus. Il repose d'abord sur l'éradication de *H. pylori* et en cas d'absence de régression ou de progression tumorale sur des traitements locorégionaux (radiothérapie) ou généraux (chimiothérapie) (Figure 18) (478).

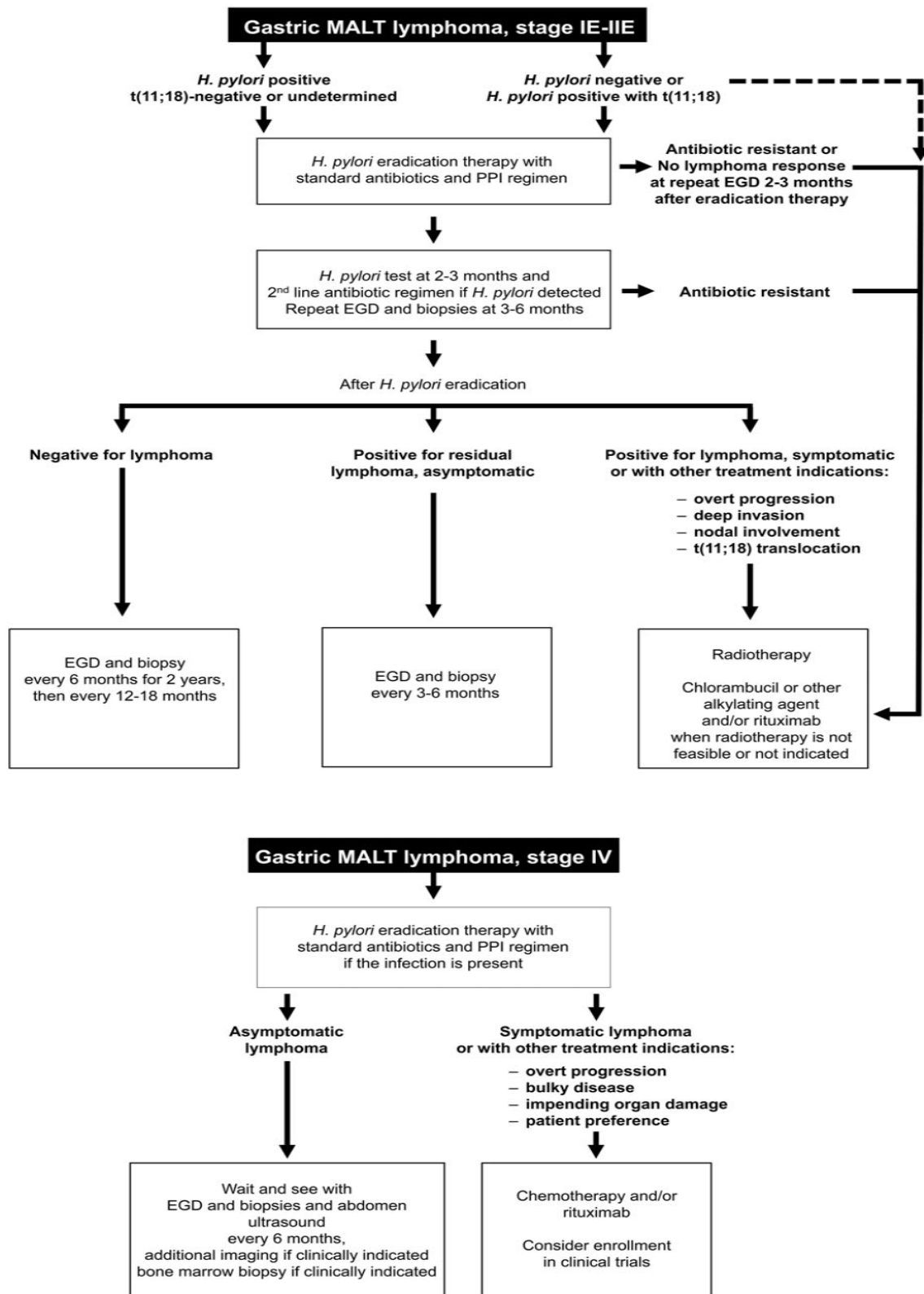


Figure 18 : Algorithme de traitement du LGM. Algorithme établi selon le stade du LGM défini selon la classification de Lugano décrite tableau 3. Figure reproduite d'après Zucca *et al.* (478)

III.7.1 Traitement d'éradication de *H. pylori*

Des études prospectives ont montré que l'éradication de *H. pylori* permet la régression du lymphome chez 60 à 90 % des patients (266) avec maintien de la rémission à 5 ans chez 87 à 97 % des patients initialement répondeurs (450) (284). La régression tumorale est plus fréquente en cas de lymphome du MALT localisé (stade I) (110) (211), tandis que les lymphomes de stade II_E ainsi que ceux présentant la translocation t(11;18) sont moins répondeurs. Les auteurs s'accordent pour recommander l'éradication de *H. pylori* chez tous les patients présentant un LGM quel que soit le stade du lymphome ou le statut *H. pylori* (478). En effet, comme évoqué plus haut, une régression du LGM peut être observée après éradication de l'infection à *H. pylori* chez des patients à priori négatifs (331)

Le traitement d'éradication de *H. pylori* dans le LGM est identique à celui utilisé dans les autres pathologies induites par la bactérie et doit se conformer aux recommandations nationales ou internationales (242). Il comprend classiquement une association entre un inhibiteur de la pompe à proton et deux antibiotiques pendant 10 à 14 jours. Il tient par ailleurs compte de la résistance aux macrolides de la souche pouvant être détectée par méthodes phénotypiques et génotypiques. En cas d'échec de la première ligne de traitement, une seconde ligne comportant des antibiotiques non utilisés précédemment doit être mise en place.

Une rémission complète peut être observée chez certains patients présentant un LGM de haut grade. Bien que la chimiothérapie soit recommandée en première ligne, il peut être intéressant de proposer un traitement antibiotique compte tenu des effets indésirables limités et du bénéfice possible en particulier dans les stades précoces de LGM de haut grade (51) (479) (211) (261). De plus, ce traitement d'éradication pourrait éviter une résurgence de la pathologie après chimiothérapie due à la présence de *H. pylori*.

III.7.2 Alternatives thérapeutiques

Ces alternatives sont proposées chez les patients pour lesquels l'éradication de *H. pylori* n'a conduit à aucune modification endoscopique et histologique ou à une évolution des lésions. La stratégie actuelle est de favoriser des traitements permettant la conservation de l'estomac. Bien que la gastrectomie soit curative dans le traitement du LGM (209), d'autres traitements sont privilégiés tels que la radiothérapie ou la chimiothérapie compte-tenu des conséquences de cette pratique notamment sur la qualité de vie du patient (460).

La radiothérapie est indiquée pour les patients présentant un stade précoce de LGM réfractaire aux traitements d'éradication (stade I et II). Les doses de radiations ont été diminuées ces dernières années. Une radiothérapie (30-40Gy) de 4 semaines au niveau de l'estomac et des ganglions adjacents donne une rémission de 90 à 100% avec une survie à 5 ans sans rechute de 80% (452) (414).

Une chimiothérapie doit être envisagée chez les patients présentant un stade avancé avec envahissement des ganglions lymphatiques et/ou de la moelle osseuse et les patients ayant un LGM de haut grade transformé réfractaires au traitement d'éradication. Plusieurs molécules ont été évaluées seules ou en association dans différentes études avec des résultats dépendants du stade de lymphome (Tableau 5). Les associations rituximab, chlorambucil ou fludarabine semblent donner de très bons résultats (362) (7). Il a en effet été montré que 95% des patients dont le LGM n'avait pas régressé suite à l'éradication de *H. pylori* ont présenté une rémission complète après une immunochemiothérapie par chlorambucil et rituximab, dont l'efficacité était supérieure à celle du chlorambucil ou du rituximab utilisé en monothérapie (247) (147) (307) (477).

Une chimiothérapie est recommandée pour les lymphomes de haut degré de malignité comme traitement de première intention. Le protocole R-CHOP (Rituximab, Cyclophosphamide, Hydroxydaunorubicine (adriamycine), Oncovin (vincristine), prednisone) est recommandé pour le LGM de haut grade (81).

Famille thérapeutique	Nom de la molécule
Alkylants	Chlorambucil ¹
	Cyclophosphamide ^{1,2}
	Bendamustine ^{1,2}
Analogues nucléosidiques des purines	Fludarabine ^{1,2}
	Cladribine ¹
Anthracyclines	Doxorubicine ²
	Mitoxantrone ²
Alkaloïdes	Vincristine ²

Tableau 5 : Molécules disponibles pour le traitement par chimiothérapie du LGM selon les recommandations Américaines et européennes. D'après Pereira *et al.* (320). Les recommandations actuelles proposent plusieurs molécules en monothérapie, association de chimiothérapies ou associées à une immunothérapie comme le Rituximab. ¹ *European Society for Medical Oncology 2013 guidelines*; ² *National Comprehensive Cancer Network 2011 guidelines*.

III.7.3 Suivi post-traitement

Un suivi post-traitement est nécessaire. Tout d'abord l'éradication de *H. pylori* doit être vérifiée 2-3 mois après le traitement antibiotique compte-tenu du risque d'échec thérapeutique afin de pouvoir mettre en place une deuxième ligne d'antibiotiques. De plus, le traitement d'éradication ne permet pas la rémission de la totalité des LGM, d'où l'intérêt d'un suivi endoscopique avec des biopsies répétées afin de démontrer la rémission complète.

Cette évaluation doit être faite selon les recommandations du Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte (GELA) (Tableau 6). Afin d'établir correctement la rémission, au moins 2 endoscopies et analyses histologiques (à 1 et 3 mois) doivent être réalisées (354) (478). Quand la rémission est établie, plusieurs endoscopies de contrôle avec des biopsies de tous les sites gastriques doivent être réalisées tous les 6 mois pendant les deux premières années puis tous les 12 mois pendant les 5 années suivantes (354) (478). Il n'y a pas de recommandations précises sur la fin du suivi. Chez certains patients une maladie résiduelle peut persister au niveau histologique sans lésions

macroscopiques, une stratégie « *watch and wait* » peut alors être pratiquée (108). Malgré une rémission complète, une rechute est possible après plusieurs années chez environ 7% des patients (480), d'où l'importance du suivi. Cette rechute peut être due à une réinfection par *H. pylori* même si ce risque est faible étant donné que l'infection à *H. pylori* s'acquière très majoritairement pendant l'enfance. Il a par ailleurs été montré dans une étude épidémiologique aux Pays-Bas que les patients ayant développé un LGM ont 6 fois plus de risque de développer un adénocarcinome par la suite (48) ; la présence simultanée d'un LGM et d'un adénocarcinome gastrique est par contre exceptionnelle au stade du diagnostic (45) (184).

Score	Infiltrats lymphoïdes	LLE	Aspect du stroma
Rémission histologique complète	Absents ou plasmocytes et petites cellules lymphoïdes dispersées dans la LP	Absentes	Normal ou LP vide et/ou fibrose
Maladie résiduelle minimale probable	Agrégats de cellules lymphoïdes ou follicules lymphoïdes dans la LP/MM et/ou SM	Absentes	LP vide et/ou fibrose
Maladie résiduelle	Denses, diffus ou nodulaires en expansion autour des glandes de la LP	LLE focales ou absentes	LP focale vide et/ou fibrose
Pas de modification	Denses, diffus ou nodulaires	Présentes (peuvent être absentes)	Pas de changement

Tableau 6 : Critères d'évaluation post-traitement du LGM selon le GELA (Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte) (64). (MM : musculaire muqueuse ; LP : lamina propria ; SM : sous-muqueuse ; LLE : lésion lympho-épithéliale)

III.8 Physiopathologie

A l'heure actuelle, les mécanismes physiopathologiques conduisant à l'initiation et au développement du lymphome gastrique du MALT sont encore mal connus.

Les lymphocytes B et T sont recrutés au niveau de la muqueuse suite à la colonisation chronique par *H. pylori* qui induit la formation de follicules lymphoïdes de type MALT au niveau gastrique, première étape de la lymphomagenèse (384). Il a été démontré que la gastrite à *H. pylori* est la première cause d'apparition de MALT au sein de la muqueuse gastrique (131). Le développement de MALT dans cette muqueuse peut donc être considérée comme pathognomonique de l'infection à *H. pylori*. Tous les patients auraient donc un risque potentiel de développer un lymphome gastrique du MALT. Cependant étant donné la prévalence élevée de l'infection dans la population mondiale par rapport à la prévalence faible du LGM, d'autres facteurs entrent en considération dans le développement de cette pathologie.

La prolifération B est au départ secondaire à l'activation des lymphocytes T par les antigènes de *H. pylori*. En effet, dans le LGM des lymphocytes T non néoplasiques, majoritairement de type CD4⁺ infiltrent la tumeur et sont une aide importante pour l'activation et la prolifération des lymphocytes B via la costimulation CD40L-CD40 ainsi que par la production de cytokines de type Th2 (173) (141). Dans l'étude de Hussell *et al.*, il a cependant été observé que seule une des treize souches testées était capable d'induire une prolifération lymphocytaire B et que ce n'était pas la même selon le patient (173). Le rôle de l'interaction CD40L-CD40 pour la stimulation des lymphocytes B a été toutefois remis en question, Craig *et al.* ayant montré que les lymphocytes T CD4⁺ étaient essentiels à la prolifération lymphocytaire B mais indépendamment de l'interaction CD40-CD40L, une prolifération B étant toujours observée après blocage du CD40L par un anticorps spécifique (72). Ces données suggèrent que les facteurs solubles produits par les lymphocytes T sont plus importants que l'interaction CD40L-CD40 pour induire la prolifération lymphocytaire B. D'autres molécules semblent nécessaires pour l'interaction B et T : CD80 et CD86 chez les lymphocytes B néoplasiques et CD28 ou CTLA-4 pour les lymphocytes T (274). Lors de la lymphomagenèse, l'orientation du système immunitaire initialement de type Th1 évolue vers le type Th2 avec la sécrétion d'IL-4 et d'autres cytokines de type Th2. Une population hétérogène de lymphocytes T helper est présente avec la sécrétion de cytokines de type Th1 et Th2 (74).

Parmi les lymphocytes T CD4⁺ infiltrant la tumeur, les lymphocytes T-régulateurs (Tregs) semblent également avoir un rôle dans la physiopathologie du LGM. L'infection par *H. pylori* stimule en effet la réponse T régulatrice (337) et il a été montré un enrichissement en Tregs au sein du lymphome du MALT par rapport à une muqueuse gastrique présentant une gastrite (72). Les lymphocytes Tregs sont recrutés sur le site de lymphomagenèse par les cellules B tumorales via la sécrétion de CCL17, CCL22, CCL20 et CXCL13 (72) (63). Une déplétion de ces Tregs ou de l'ensemble des lymphocytes T CD4⁺ induit une régression de la tumeur, ces populations lymphocytaires sont donc indispensables à la lymphomagenèse (72). Ils participent à la persistance du pathogène au sein de la muqueuse

gastrique en limitant la réaction inflammatoire et les lésions tissulaires, permettant une stimulation antigénique chronique (336). Les Tregs pourraient par ailleurs favoriser la prolifération lymphocytaire B (72).

Les lymphocytes T cytotoxiques CD8⁺ sont également présents en moindre proportion que les lymphocytes T helper CD4⁺ sur le site de lymphomagenèse et semblent avoir un rôle dans la physiopathologie du LGM (28). En effet, contrairement à ce qui est observé dans la gastrite auto-immune à *H. pylori*, les lymphocytes T CD8⁺ sont déficients en perforines impliquées dans la cytotoxicité et la majorité des clones ne possède plus la fonction Fas-FasL permettant d'induire l'apoptose de la cellule cible. Ces caractéristiques ne sont présentes que chez les lymphocytes T CD8⁺ présents sur le site de lymphomagenèse, tandis que les lymphocytes T circulants présentent la même activité cytotoxique et pro-apoptotique que ceux présents chez les patients atteints d'une gastrite chronique (75). Ces altérations de la réponse T cytotoxique favorisent l'activation accrue et non contrôlée des lymphocytes B néoplasiques au niveau du MALT (394) (104).

Les lymphocytes B possèdent des immunoglobulines de surface ayant subi des réarrangements somatiques (71). Ces immunoglobulines recombinantes sont capables de reconnaître un panel d'antigènes du soi et du non soi avec la même affinité. Ceci a été montré chez l'homme et dans un modèle animal de souris BALB/c. Les récepteurs de surface des lymphocytes B ou BCR (*B-cell Receptor*) sont par ailleurs stimulés directement par les antigènes de *H. pylori* et des auto-antigènes ce qui aboutit à la prolifération des cellules tumorales (72). Dans un modèle de souris BALB/c infectées par *H. felis*, il a été montré que la prolifération lymphocytaire B était à la fois dépendante de la stimulation des BCR et de la présence des lymphocytes T CD4⁺ au sein des infiltrats. Après une prolifération oligoclonale des lymphocytes B, un clone est sélectionné et prolifère de manière monoclonale. La prolifération lymphocytaire est accompagnée d'une augmentation du relargage d'immunoglobulines monoclonales et d'IL-2.

Les chimiokines ainsi que leurs récepteurs jouent un rôle dans la lymphomagenèse. Elles permettent l'initiation de la réponse immune, exercent une activité chimiotactique pour attirer les lymphocytes T au niveau de site d'inflammation (238). Ce sont les principaux régulateurs de la migration des cellules dendritiques et des lymphocytes, du développement de follicules lymphoïdes et de l'homéostasie lymphocytaire (238) (168). Une étude a tout d'abord montré que l'expression de CXCL13 ou BCA-1 et de son récepteur CXCR5 était augmentée dans le LGM (251). Pendant l'infection à *H. pylori*, CXCL13 favorise le recrutement et la transformation des lymphocytes B et

induit la production de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-8. CXCL13 semble avoir un rôle important dans la formation des follicules lymphoïdes, l'utilisation d'un anticorps anti-CXCL13 permettant d'éviter leur formation dans un modèle animal de LGM (453). De même, des souris déficientes pour CXCR5 ne développent pas de follicules lymphoïdes suite à la colonisation par *H. pylori* (445). D'autres études ont montré que l'expression de CXCR3 dans le LGM était corrélée avec la migration des lymphocytes B vers la circulation sanguine et d'autres organes lymphoïdes suggérant que cette chimiokine pouvait être liée à l'autonomie du LGM vis-à-vis de *H. pylori* (303). Une étude a montré que l'expression de CCR7, CXCR3 et CXCR7, chimiokines impliquées dans le recrutement leucocytaire et l'activation lymphocytaire B, était augmentée au stade LGM par rapport au stade gastrite, tandis que l'expression de CXCR4, qui est liée à l'apparition de métastases dans de nombreuses tumeurs solides, était diminuée (82).

D'autre part, les membres de la famille du TNF pourraient jouer un rôle important dans la lymphomagénèse, de par leur activité pro-inflammatoire d'une part, mais également via leur rôle dans la régulation de la prolifération cellulaire. Il a été montré que les macrophages infiltrant la tumeur produisaient la cytokine APRIL (*a proliferation-inducing ligand*), membre de la famille du TNF ayant un rôle dans le développement, la maturation et la survie des lymphocytes B (277). Le rôle spécifique de APRIL sera développé en chapitre introductif à l'article n°4 de ce manuscrit. Le microenvironnement tumoral semble donc essentiel au développement du LGM.

Contrairement à ce qui est observé dans les ulcères et l'adénocarcinome gastrique, les facteurs de virulence de *H. pylori* semblent jouer un rôle minime dans la physiopathologie du LGM. Cet aspect a été développé dans le paragraphe précédemment (I.4.5 Spécificité des souches de LGM).

La prolifération chronique des lymphocytes B crée des conditions favorables à l'apparition d'une instabilité génétique dans les cellules B conduisant à l'apparition de mutations. L'hyperméthylation de p15 et p16 favorise l'expansion clonale Ag-dépendante des LB. La lymphomagénèse est aussi facilitée par les dommages à l'ADN provoqués par la libération de dérivés réactifs oxygénés par les neutrophiles lors de la réponse à *H. pylori* (31). La production importante de ROS conduit à des erreurs durant la mitose et une accumulation de mutations (413). De plus, *H. pylori* induit des mismatch lors des réparations ADN (195). Ces données permettent d'expliquer la présence dans le LGM d'aberrations génétiques incluant les translocations, les mutations ponctuelles, l'amplification de gènes voir la délétion de gènes suppresseurs de tumeurs (394).

La réponse inflammatoire médiée par les cytokines joue un rôle majeur dans la physiopathologie de l'infection à *H. pylori* et il est possible qu'un déséquilibre soit responsable de la progression et oriente la pathologie induite par la bactérie. Certains facteurs impliqués dans la réponse cytokinique pourraient promouvoir la lymphomagenèse ou au contraire protéger l'hôte contre une évolution en LGM. Un simple polymorphisme dans les régions codantes ou dans le promoteur d'une cytokine ou d'un récepteur peut conduire à une augmentation ou une diminution de ces facteurs. Ainsi plusieurs équipes se sont attachées à étudier les polymorphismes dans le LGM. Rollinson *et al.* ont par exemple montré une association entre un allèle du gène codant pour l'IL-1 ra (*IL-1 receptor antagonist*) et le LGM (345). D'autre part, la présence de l'allèle *TNF-857 T* a été associée à un risque plus élevé de développement d'un lymphome gastrique de bas grade (157). Des polymorphismes de l'IL-22 sont également associés au LGM et à la réponse au traitement d'éradication de *H. pylori* (231). La présence de la mutation R702W dans le gène *NOD2/CARD15* augmente le risque de développement de lymphome gastrique (347). Le complexe majeur d'histocompatibilité joue un rôle important dans la réponse immunitaire d'où un intérêt pour les antigènes du HLA. La prévalence des allèles *HLADQA1*0103* et *HALDQB1*0601* et de l'haplotype *DQA1*0103-DQB1*0601* est augmentée chez les patients développant un LGM (190). L'allèle G du Toll-like Receptor 4 (TLR4 Asp299Gly), impliqué dans la reconnaissance du LPS bactérien, apparaît également comme un potentiel facteur de prédisposition dans les lymphomes gastriques (156). Des polymorphismes dans les gènes codant pour des enzymes anti-oxydantes telles que la glutathion S-transférase (GST) ont été décrits (345). Ces différents polymorphismes seuls ou associés pourraient donc contribuer à la lymphomagenèse gastrique induite par certaines souches de *H. pylori*. Le principal problème réside cependant dans le fait que ces polymorphismes ne sont pas transposables d'une population de malade à une autre d'origine géographique différente.

Les principales étapes de la physiopathologie du lymphome gastrique du MALT sont résumées dans la figure 19.

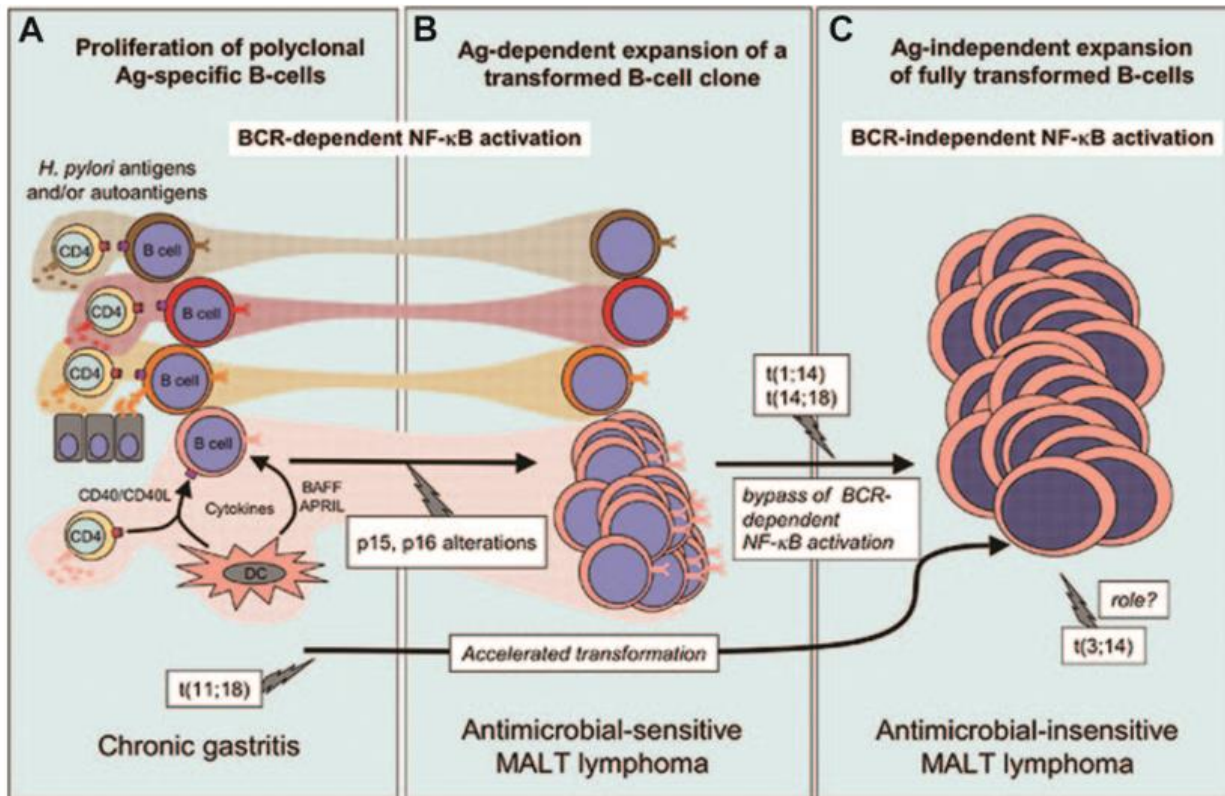


Figure 19 : *H. pylori* et lymphomagénèse gastrique du MALT. Figure reproduite d'après Suarez *et al.* (394) (A) Les antigènes de *H. pylori* entraînent une réponse lymphocytaire B polyclonale. Les lymphocytes T CD4⁺ et les cellules dendritiques produisent des signaux de costimulation tels que CD40, des cytokines et des membres de la famille du TNF comme BAFF ou APRIL. (B) Des événements génétiques tels que l'hyperméthylation de p15 ou p16 permet la sélection d'un clone de lymphocytes B. (C) La prolifération devient antigène-indépendante suite à l'apparition de translocations génétiques telles que *t(14 ;18)*, ou de mutations.

IV. Modèles animaux d'étude de l'infection à *H. pylori*

Depuis la découverte de l'implication de *H. pylori* dans les pathologies gastriques dont l'adénocarcinome et le LGM, de nombreux modèles animaux ont été développés afin de mieux comprendre la physiopathologie de l'infection ou développer de nouvelles stratégies de prévention. L'étendue des modèles utilisés est large, allant des primates aux rongeurs. Chacun de ces modèles présente des avantages et des inconvénients, le choix du modèle adapté dépend de la question posée.

De nombreux animaux, dont les primates, chats, porcs, chiens, peuvent être colonisés par des espèces du genre *Helicobacter*. La physiologie proche de l'homme de ces modèles constitue un des avantages de leur utilisation. Cependant, outre la disponibilité, le prix de ces animaux et la difficulté de disposer d'animaleries adaptées, il y est parfois impossible (ulcères) ou difficile (cancers gastriques) d'y reproduire les pathologies humaines liées à ces infections.

Les rongeurs sont donc les hôtes de choix pour l'étude de l'infection à *H. pylori*, ils peuvent être infectés aisément expérimentalement par gavage oral au sein d'animaleries adaptées. De plus ils développent des infections chroniques étudiables sur de longues périodes. Des manipulations génétiques sont par ailleurs possibles en modèles murins afin d'étudier la physiopathologie de l'infection. Seuls les modèles de rongeurs seront développés dans ce paragraphe.

IV.1 Quelle espèce ?

H. pylori n'est pas un pathogène naturel des rongeurs. Cette bactérie colonise difficilement l'estomac murin et la gastrite induite est moins intense que chez l'homme, d'où l'intérêt d'avoir recours à des pathogènes de l'animal, tels que le groupe « *Helicobacter heilmannii* », *Helicobacter felis* ou *Helicobacter mustelae* pour l'étude de la physiopathologie de l'infection.

H. felis et le groupe « *H. heilmannii* » sont les Hélicobacters les plus adaptées pour l'infection des modèles de rongeurs (275) (71), ils sont capables de coloniser les souris mais également les gerbilles de Mongolie. Les données obtenues *in vivo* montrent que l'infection par *H. felis* et « *H. heilmannii* » est capable de reproduire les changements histologiques observés lors de l'infection à *H. pylori* chez l'homme (72). *H. felis* et « *H. heilmannii* » induisent une inflammation gastrique plus sévère que *H. pylori*.

Le groupe « *H. heilmannii* » est composé de plusieurs espèces très hétérogènes capables d'infecter différents hôtes et d'entraîner une inflammation gastrique importante. Cependant, ces espèces sont très difficilement cultivables *in vitro* ce qui complique leur utilisation et ne possèdent pas les

principaux facteurs de virulence de *H. pylori*. *Helicobacter suis* («*H. heilmannii* type 1 »), le plus fréquent des Hélicobacters-non *pylori* retrouvé chez l'homme (1% des cas d'infection), est présent dans l'estomac des porcs (jusqu'à 90%) et peut coloniser certains primates (143). Le sous-groupe «*H. heilmannii* type 2 » est un groupe hétérogène comprenant les espèces *H. felis*, *H. bizzozeronii*, *H. salomonis*, *H. heilmannii s.s.*, *H. cynogastricus*, *H. baculiformis* et *H. ailurogastricus* parfois isolées chez l'homme mais le plus fréquemment retrouvées chez le chat et le chien. Elles sont responsables de gastrite active chronique et de vomissements. Plusieurs équipes ont développé des modèles animaux avec «*H. heilmannii* » qui correspondent en fait à l'utilisation de différentes espèces : O'Rourke *et al.* ont par exemple infecté des souris BALB/c avec 10 espèces *H.heilmannii*-like (296), Flahou *et al.* se sont intéressés à *H. suis* (*H. heilmannii* type 1) chez la gerbille de Mongolie ainsi que chez des souris BALB/c et C57Bl6 (114) et d'autres équipes ayant utilisé «*Candidatus Helicobacter heilmannii* » chez la souris C57Bl6 (282) (358).

H. felis est une espèce qui a été initialement isolée de l'estomac d'un chat (222) qui a ensuite été adaptée à l'estomac de la souris (221). La souche *H. felis* CS1 (ATCC 49179) est la souche utilisée dans les modèles animaux (97) (275). Elle présente l'avantage d'être facile à cultiver, contrairement aux espèces du groupe «*H. heilmannii* » et de pouvoir coloniser différents hôtes. C'est une espèce fortement pro-inflammatoire *in vivo* qui est associée à des lésions de type dysplasie ou lymphome. Toutefois, cette espèce n'est pas pathogène pour l'homme et n'exprime pas les principaux facteurs de virulence de *H. pylori*.

H. mustelae a également participé à la compréhension de l'infection à *H. pylori* chez l'homme. *H. mustelae* est naturellement responsable de LGM chez le furet (98) et a été utilisé comme modèle pour l'étude de la physiopathologie de la gastrite, la maladie ulcéreuse et l'adénocarcinome notamment (118) (120) (463).

L'étude de la physiopathologie de l'infection à *H. pylori* passe également par le développement de modèles animaux utilisant des souches de *H. pylori*, principale espèce de *Helicobacter* responsable de pathologies gastriques chez l'homme. Cette bactérie est facilement cultivable et présente l'avantage d'être naturellement transformable. Toutefois, toutes les souches isolées chez l'homme n'ont pas la capacité à infecter la souris ce qui nécessite des étapes d'adaptation afin d'augmenter la capacité de colonisation de ces souches. De plus, des réarrangements génétiques ainsi qu'une instabilité ou perte de fonctionnalité de certains facteurs de virulence sont observés *in vivo* chez

H. pylori. L'ensemble des souches de *H. pylori* arrivent cependant à coloniser la gerbille de Mongolie.

Plusieurs souches de *H. pylori* ont été utilisées pour générer des modèles animaux avec des capacités de colonisation variables chez la souris (439). La souche SS1 (*Sydney strain 1*) a été adaptée à la souris et possède une capacité de colonisation importante d'où son utilisation dans de nombreuses études (223). L'adaptation de cette souche humaine (pre-SS1) à la souris suite à des passages successifs *in vivo* a induit des recombinaisons génétiques et inactivé l'îlot *cagPAI* initialement fonctionnel chez la souche pre-SS1. D'autres souches de *H. pylori* colonisant la souris sans adaptation préalable ont été utilisées dont la souche TNF2G4, isolée d'un ulcère et présentant un îlot *cagPAI* fonctionnel (126), la souche 7.13 associée à l'adénocarcinome et possédant également un îlot *cagPAI* fonctionnel (123), ou les souches B38 et B47 (405) (58), *cagPAI* négatives, isolées de patients présentant un LGM.

Un des principaux avantages de l'utilisation de modèles animaux infectés par *H. pylori* est la possibilité de déterminer les facteurs bactériens essentiels au pouvoir pathogène de la bactérie (297). Les premiers facteurs identifiés furent l'uréase et la mobilité par mutagenèse ou sélection phénotypique chez une souche donnée (88) (90). Depuis des techniques de mutagenèse dirigée ont permis d'évaluer l'importance de certains gènes comme *flaA* et *flaB* (91) (8). Des techniques de complémentation ont également été utilisées pour démontrer le rôle de *UreB* notamment (89). Le rôle de la GGT, *CagA* et *VacA* dans la physiopathologie de l'infection à *H. pylori* a également pu être étudié via l'utilisation de mutants (56) (105) (123).

IV.2 La gerbille de Mongolie

La gerbille de Mongolie développe des pathologies similaires à l'homme suite à l'infection par des souches de *H. pylori* sauvages. Elle a été utilisée par de nombreuses équipes pour étudier les conséquences de l'infection par *H. pylori*. Des gastrites sévères, métaplasies intestinales, ulcères gastriques et adénocarcinomes gastriques ont été reportés chez des gerbilles infectées par *H. pylori* (470).

La gerbille de Mongolie semble notamment être un modèle intéressant pour l'étude de la physiopathologie de l'adénocarcinome gastrique induit par l'infection à *H. pylori*. Watanabe *et al.*, ont en effet montré l'apparition de lésions néoplasiques gastriques 62 semaines après l'infection avec la souche *H. pylori* TN2GF4 avec le développement d'un adénocarcinome chez un tiers des animaux (440). Ces résultats ont été confirmés par la suite par plusieurs études (123) (346), mais des résultats

contradictoires ont également été observés avec l'absence d'adénocarcinome malgré une période de suivi allant de 40 à 70 semaines après l'infection (397) (95) (47). Ces disparités peuvent s'expliquer d'une part par l'utilisation de souches différentes de *H. pylori*. En effet, Franco *et al.*, qui ont utilisé la souche 7.13 adaptée à la gerbille de Mongolie et dérivée d'une souche isolée d'un patient (123), ont obtenu des tumeurs beaucoup plus rapidement que dans les études ayant utilisé les souches de *H. pylori* ATCC43504 et TN2GF4. D'autre part, le fond génétique des gerbilles de Mongolie, initialement créé au Japon puis exportées aux Etats-Unis et enfin en Europe, peut très bien avoir évolué différemment et influencé le développement des tumeurs. Les conditions d'élevage et d'hébergement ainsi que la flore associée à l'environnement dans lequel évoluent les animaux peuvent également influencer sur le développement de tumeurs. La lecture anatomopathologique et plus précisément les critères utilisés pour définir les lésions observées peuvent également entraîner des disparités (95). La gerbille de Mongolie semble être un modèle prometteur sans être un modèle infaillible pour l'étude de la physiopathologie de l'adénocarcinome gastrique. Il est également intéressant de noter que dans le modèle de la gerbille de Mongolie, aucune métastase n'a été rapportée, l'évolution de la pathologie restant relativement limitée par rapport à la situation chez l'homme.

La gerbille de Mongolie semble un modèle intéressant pour l'étude de la physiopathologie de l'infection à *H. pylori*, en particulier de l'adénocarcinome, mais le manque de souches transgéniques ou délétées d'un gène spécifique et la difficulté d'avoir des anticorps utilisables en immunohistochimie ou cytométrie en flux, ont limité son utilisation par rapport aux modèles murins.

IV.3 Modèles murins

De nombreuses équipes se sont intéressées au développement de modèles murins de par la facilité d'accès à ces animaux, l'existence de modèles transgéniques ainsi que la courte durée de reproduction. La réponse de l'hôte dans la physiopathologie de l'infection à *H. pylori* est essentielle d'où l'étude de différents fonds génétiques. Les souris BALB/c et C57BL6 sont les plus utilisées pour l'étude de l'infection à *H. pylori*, mais d'autres fonds génétiques comme les souris *Swiss*, les C3H ou les FVB/N ont également fait l'objet d'études. Seuls les fonds génétiques BALB/c et C57BL6 seront abordés dans cette partie.

IV.3.1 BALB/c

Les souris BALB/c ont été très utilisées pour l'étude de la physiopathologie de l'adénocarcinome et de la réponse immunitaire à l'infection. Ces souris présentent une réponse immunitaire T majoritairement Th2 suite à l'infection par *H. pylori*, avec un niveau de colonisation important et peu de lésions épithéliales (264) (407). La présence d'infiltrats lymphocytaires a été observée 15 mois post-infection par *H. pylori* (407), ce qui en ferait plutôt un modèle d'étude de LGM. Malgré un suivi de 80 à 100 semaines, aucun adénocarcinome gastrique n'a pu être observé dans ce modèle (437).

IV.3.2 C57BL6

Les souris C57BL6 ont été très utilisées pour étudier le rôle de *H. pylori* dans la carcinogénèse gastrique notamment. A la suite d'une infection par *H. pylori* ou *H. felis*, la réponse immunitaire T est principalement de type Th1, contrairement à ce qui est observé dans le fond génétique BALB/c, avec l'induction lésions épithéliales importantes compensées par une augmentation de la prolifération cellulaire associée à une diminution de la charge bactérienne (223) (437). *H. felis* induit une inflammation gastrique plus sévère que *H. pylori* dans le fond C57BL6 (359). Chez l'homme l'inflammation induite par *H. pylori* est caractérisée par l'accumulation de polynucléaires neutrophiles (PNN) et de cellules mononuclées au sein de la muqueuse gastrique, tandis que le recrutement des PNN est moins important chez les souris infectées par *H. felis* ou *H. pylori*. Un influx de cellules mononuclées est détecté dans les deux modèles (359) (407).

L'infection à *H. felis* peut évoluer en adénocarcinome, via de la métaplasie et une dysplasie (43), reproduisant ainsi les changements morphologiques observés durant la carcinogénèse gastrique chez l'homme. De plus, un traitement d'éradication précoce permettait d'éviter l'apparition d'adénocarcinomes gastriques dans ce modèle. Les souris C57/BL6 infectées par la souche *H. pylori* SS1 n'ont par contre pas présenté de lésions dysplasiques de haut grade malgré un suivi à 80 semaines post-infection (194).

L'utilisation de modèles animaux a de plus permis d'étudier l'effet de l'éradication de la bactérie sur l'évolution des lésions et de montrer que l'inflammation, la métaplasie et la dysplasie sont réversibles suite à un traitement antibiotique précoce et qu'une éradication plus tardive peut permettre de limiter la progression de la dysplasie (43).

IV.4 Modèles alternatifs

De nombreux modèles de souris génétiquement modifiées ont été utilisés pour étudier la physiopathologie des infections à *Helicobacter* et développer des modèles murins d'adénocarcinome gastrique. La plupart de ces modèles ont été développés en fond génétique C57BL6.

Plusieurs modèles de souris transgéniques ont notamment été utilisés comme modèles d'étude de l'adénocarcinome gastrique lié à l'infection par *H. pylori*. Le premier modèle décrit a utilisé des souris déficientes pour le TGF- β et infectées par *H. pylori* (144). Un second modèle dans lequel des souris surexpriment la gastrine (INS-GAS) a permis de développer des adénocarcinomes suite à l'infection par *H. pylori* SS1 en 30 semaines (119). Des souris transgéniques déficientes en p27 et infectées par *H. pylori* développent une métaplasie, dysplasie puis des adénocarcinomes gastriques (215). Par ailleurs des souris transgéniques surexprimant l'IL-1 β infectées par *H. felis* développent des adénocarcinomes gastriques mais avec une incidence faible (418).

Des modèles animaux ont également été développés pour étudier la physiopathologie de l'infection et la relation hôte-pathogène. Une gastrite moins sévère, ainsi que des lésions épithéliales réduites ont été observées chez des souris C57BL6 déficientes en IFN γ infectées par *H. pylori* ou *H. felis* par rapport à des souris sauvages (364), démontrant le rôle de l'IFN γ dans la réponse inflammatoire à l'infection. Le rôle du TNF α a pu être également étudié via la génération de souris KO (*knock-out*) (150). De même pour l'IL-10, dont le rôle anti-inflammatoire et immunorégulateur lors de l'infection à *H. felis* a pu être mis en évidence (26). De nombreux mutants KO ont donc été infectés par des espèces du genre *Helicobacter* participant ainsi à la compréhension de la physiopathologie de l'infection.

Des modèles de souris transgéniques ont également été générées, comme les souris transgéniques CagA exprimant l'oncoprotéine ubiquitairement ou au niveau de l'estomac seulement (302). L'utilisation de souris transgéniques *Big Blue* possédant le transgène *lacI* au niveau du phage λ a par ailleurs permis d'étudier les lésions de l'ADN induites par l'infection et de démontrer le pouvoir mutagène direct de *H. pylori* (413)

Afin d'étudier des facteurs environnementaux, des équipes ont également utilisé des cofacteurs connus pour favoriser la carcinogénèse, comme des agents alkylants (N-nitroso-N-méthylurea) ou des régimes hypersalés (117) (146).

IV.5 Modèles animaux et lymphome gastrique du MALT

Afin de mieux comprendre la physiopathologie du LGM et faute de pouvoir avoir accès à des pièces chirurgicales post-gastrectomie de patients atteints de LGM, plusieurs équipes se sont attachées à reproduire cette pathologie chez l'animal. Trois espèces de *Helicobacter* : *H. felis* (97) (96) (275) (274), groupe *H. heilmannii* (275) (296) (114) (358) et *H. pylori* (438) (275) (439) (407) et trois hôtes différents, la souris BALB/c (274) (97) (275) (96) (296) (407) (438) (439), la souris C57BL6 (358) (438) ou la gerbille de Mongolie (114), ont été principalement utilisés. Ces modèles animaux miment les caractéristiques cliniques et anatomopathologiques des LGM humains, dont la régression de la pathologie suite à l'éradication de la bactérie.

En effet, la souris BALB/c infectée par *H. felis* permet de reproduire à 22 mois post-infection, des lésions histologiques évocatrices de LGM caractérisées par des infiltrats lymphoïdes multiples composés de lymphocytes B d'allure centrocytique et de quelques lymphocytes T essentiellement CD4⁺, associées à des LLEs (97) (275). Ces lymphomes régressent sous antibiothérapie (96) ou réémergent de façon rapide et agressive lors d'essais de réinfection des souris confirmant le caractère Ag-dépendant de la lymphomagénèse (96) (274).

Les espèces du groupe *H. heilmannii* induisent chez la souris BALB/c (275) (296), la souris C57BL6 (358) ou la gerbille de Mongolie (114) le développement de LGM à des degrés différents. Les espèces du groupe *H. heilmannii* sont capables d'induire chez les souris BALB/c des lésions comparables à ce qui est observé dans le LGM chez l'homme (275), (296) (399). Des LLEs ont été observées chez 40 à 100% des souris 18-20 mois post-infection selon l'espèce et la souche de *H. heilmannii* inoculée, et un LGM a été diagnostiqué chez un quart des animaux environ (296). Mueller *et al.* ont observé le développement d'un LGM chez 60% des animaux 22-24 mois post-infection (275), tandis que Suzuki *et al.* ont décrit 80% de LGM à 19 mois (399). Ces disparités peuvent s'expliquer par l'espèce et la souche utilisée ainsi que les conditions environnementales notamment la diète des animaux. En règle générale, plus de LLEs sont observées chez les animaux infectés par *H. heilmannii* que chez ceux infectés par *H. felis* ou *H. pylori* (295). La gerbille de Mongolie semble être un modèle plus productif que les modèles murins, elle développe en effet un LGM à 8 mois post-infection (114). *H. heilmannii* colonise principalement l'antra de l'estomac de la gerbille identiquement à ce qui est observé chez l'homme. Le groupe *H. heilmannii* semble également capable d'induire un LGM en fond génétique C57BL6 même si le délai d'apparition des lésions semble dépendant de l'espèce : Nakamura *et al.* ont observé l'apparition d'un LGM chez 100% des souris 6 mois post-infection (282), tandis que dans l'étude de Flahou *et al.* ce type de

lésion est absent chez les C57BL6 8 mois post-infection (114). Park *et al.* ont noté également l'apparition de follicules lymphoïdes 18 mois post-infection sans développement de LGM (310).

Pour *H. pylori*, espèce principalement impliquée chez l'homme dans les LGM, la situation est plus complexe. La souris C57BL6 semblerait être un modèle d'étude de LGM de haut degré de malignité (438) (439) alors que la souris BALB/c a été décrite comme un modèle de LGM de faible degré de malignité (439) (275) (407). Cette dichotomie reflète probablement le fond génétique respectivement de type Th1 et Th2 de ces deux lignées. La moitié des souris C57BL6 infectées par *H. pylori* développent un lymphome de haut grade 13 mois post-infection (438). Ces lésions sont dépendantes de la souche inoculée, la souche SS1 n'entraînant pas de lymphome contrairement aux souches 119p et G50 (439). Chez la souris BALB/c seul un faible pourcentage (inférieur à 20%) de souris développent à 24 mois post-infection des lymphomes ce qui en fait un modèle peu productif et trop tardif (439) (275) (407). Par ailleurs, toutes les études publiées ont utilisé un nombre limité de souches dont la souche SS1 adaptée à l'estomac de souris. Cette souche ne semble d'ailleurs pas la plus intéressante pour l'induction d'un LGM chez les souris BALB/c (439) (407). Dans l'étude de Wang *et al.*, seule la souche 119p était capable d'entraîner des lésions lymphomateuses, non observées suite à l'infection par la souche SS1 (439)

Un modèle alternatif a été décrit il y a une quinzaine d'années par une équipe Japonaise (308) (419) (289) (126). Il s'appuie sur l'utilisation de souris BALB/c thymectomisées dès la naissance. Ces souris infectées par la souche TN2GF4 de *H. pylori* développaient dès deux mois post-infection une gastrite avec l'apparition de follicules lymphoïdes (qui précèdent le développement d'un LGM chez l'homme) associée à la production de cytokines correspondant à une réponse inflammatoire de type Th1 (IFN γ) mais également Th2 (IL-4) dans environ 60% des cas (308) (289). Quelques mois après l'infection, les souris thymectomisées montrent des LLEs caractéristiques du LGM, et une infiltration B oligoclonale ou monoclonale (126). Une majorité de souris reproduisaient les lésions histologiques caractéristiques des LGM à 12 mois post-infection. L'apparition de follicules lymphoïdes n'a par contre pas été observée suite à l'infection par *H. pylori* chez des souris C57BL/6 thymectomisées (126). Notre équipe a souhaité, préalablement à mon arrivée au laboratoire, évaluer le modèle de la souris BALB/c normale (NTx) et thymectomisée à 3 jours de vie (d3Tx) infectées par *H. pylori* comme modèle de lymphomagénèse gastrique du MALT en utilisant deux souches associées à cette pathologie (B38 et B47) et deux souches témoins (SS1 et TN2GF4) (58). Ces modèles n'avaient jamais été évalués ni sur un grand nombre de souches, ni après infection par des souches associées au LGM. Le développement de tissu lymphoïde de type MALT a été observé suite à l'infection avec des souches isolées ou non de patients atteints de LGM. L'infiltrat de lymphocytes

B était monoclonal ou oligoclonal chez 60% des souris thymectomisées infectées. La présence d'infiltrats B monoclonaux ou oligoclonaux ainsi que de LLEs permettait de conclure à l'évolution vers un LGM. Le modèle de la souris BALB/c thymectomisée semble donc être un modèle d'étude intéressant de la physiopathologie du LGM malgré sa complexité de mise en œuvre.

Objectifs

Les objectifs de ma thèse ont été de participer à la caractérisation de la réponse inflammatoire gastrique dans le modèle murin de LGM préalablement développé au laboratoire (Article n°1). Nous avons également tenté de clarifier les conséquences de la thymectomie néonatale sur les réserves en lymphocytes T régulateurs et tenté d'élucider leur rôle dans la lymphomagénèse gastrique (Article n°2). D'autre part nous avons essayé de comprendre comment celle-ci est contrôlée ou favorisée via l'étude des microARNs dérégulés au stade de LGM et d'en préciser leurs rôles (Article n°3).

Le dernier objectif du travail a consisté au développement d'un modèle alternatif de LGM, plus facile à mettre en place que celui basé sur la thymectomie néonatale, basé sur l'utilisation de souris transgéniques exprimant la forme humaine de la cytokine APRIL et infectées par des bactéries du genre *Helicobacter* (Article n°4).

Résultats expérimentaux

Article n°1

Characterisation of inflammatory processes in *Helicobacter pylori*-induced gastric lymphomagenesis in a mouse model.

Pauline Floch*, Amandine Marine Laur*, Victoria Korolik, Delphine Chrisment, David Cappellen, Yasmina Idrissi, Pierre Dubus, Francis Mégraud, Philippe Lehours. (*co-premiers auteurs)

Oncotarget 2015 Oct 27;6(33):34525-36. doi: 10.18632/oncotarget.5948.

Résumé des principaux résultats

Le rôle de l'inflammation dans la physiopathologie du LGM et la manière dont elle contribue à sa régulation et/ou à son développement ne sont pas clairement définis. Nous avons dans ce contexte entrepris l'étude des mécanismes inflammatoires au sein des estomacs des souris d3Tx pour caractériser l'environnement favorable au développement d'un LGM. Nous avons utilisé deux approches complémentaires : d'une part des PCR arrays traduisant les variations d'expression de nombreuses cytokines et chimiokines, et d'autre part des protéines arrays afin de vérifier au niveau protéique la surexpression des cibles observées au niveau moléculaire.

De nombreuses cibles étaient surexprimées au niveau moléculaire chez les souris d3Tx infectées au stade LGM, notamment : 1) des cytokines de type Th1 comme $IFN\gamma$, IL-12, et de type Th2 telles que IL-4, IL-6 et IL-13 ; 2) des activateurs ou régulateurs de la réponse lymphocytaire tels que le signal de co-stimulation CD40L, la lymphotoxine (LT) β , l'antagoniste du récepteur à l'IL-1, IL-1 α et β , IL-16, le FasL et d'autres membres de la famille du TNF comme le TNF, TRAIL, BAFF ou RANKL ; 3) de nombreuses chimiokines de type CCL (CCL1, 2, 3, 4, 5) ou CXCL (9, 10, 11, 13). La surexpression significative dans les souris d3Tx infectées de l'IL-4, $IFN\gamma$, $LT\alpha$ et $LT\beta$ a été validée par qPCR et nos résultats ont été corrélés aux scores inflammatoires. Parmi les cibles surexprimées au niveau moléculaire, 60% étaient surexprimées (ou bien leurs récepteurs respectifs) au niveau protéique. La surexpression de cytokines dont la surexpression n'avait pas été détectée au niveau moléculaire a été observée au niveau protéique, tels que des cytokines de type Th17.

Toutes ces cytokines et chimiokines identifiées par PCR arrays ou protéines arrays sont compatibles avec le recrutement, l'entretien et le maintien d'une prolifération lymphocytaire. De nombreux membres de la famille du TNF étaient surexprimés suggérant un rôle central de cette famille dans le microenvironnement du LGM en particulier via leur action sur la prolifération et l'activité fonctionnelle des différentes populations lymphocytaires, ainsi qu'avec une activité pro ou anti-apoptotique. Une balance entre ces différents facteurs pourrait contribuer à un environnement favorable au développement d'un LGM.

Ce travail a été publié en 2015 dans Oncotarget.

Characterisation of inflammatory processes in *Helicobacter pylori*-induced gastric lymphomagenesis in a mouse model

Pauline Floch^{1,2,*}, Amandine Marine Laur^{1,2,*}, Victoria Korolik³, Delphine Chrisment^{1,2}, David Cappellen⁴, Yamina Idrissi⁴, Pierre Dubus⁴, Francis Mégraud^{1,2} and Philippe Lehours^{1,2}

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

² INSERM U853, F-33000 Bordeaux, France

³ Institute for Glycomics, Griffith University, Gold Coast, QLD, Australia

⁴ Univ. Bordeaux, EA 2406, F-33000 Bordeaux, France

* These authors have contributed equally to this work

Correspondence to: Philippe Lehours, **email:** philippe.lehours@u-bordeaux.fr

Keywords: cytokines, chemokines, MALT lymphoma, TNF, animal model

Received: August 04, 2015

Accepted: September 08, 2015

Published: October 01, 2015

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

ABSTRACT

Gastric MALT lymphoma (GML) can be induced by *Helicobacter pylori* infection in BALB/c mice thymectomised at day 3 post-birth (d3Tx). This represented a unique opportunity to investigate the inflammatory process involved in the recruitment, proliferation and structuration of lymphoid infiltrates in the gastric mucosa of mice developing GML. Complementary molecular and proteomic approaches demonstrated that Th1 and Th2 cytokines were upregulated, along with activators/regulators of the lymphoid response and numerous chemokines. Interleukin-4, interferon γ , lymphotoxin- α and - β were significantly upregulated and correlated with the inflammatory scores for all the d3Tx mice. GML lesions in d3Tx mice infected with *H. pylori* were associated with the presence of the inflammatory response. The dysregulation of numerous members of the tumour necrosis factor superfamily was also evident and suggests that they could play an important role in GML pathology, especially in light of their ability to promote and control lymphocyte proliferation.

INTRODUCTION

Helicobacter pylori is a helical rod-shaped Gram-negative bacterium that colonises the human gastric mucosa with colonisation rates of about 50% worldwide. The infection causes inflammation (gastritis) which is first superficial and asymptomatic but may evolve, under the influence of virulence factors, towards other pathologies such as gastric or duodenal ulcer, gastric adenocarcinoma or gastric mucosa associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma (GML) [1] [2] [3].

GML is a rare consequence of chronic inflammation in the gastric mucosa caused by *H. pylori* infection [4]. This pathology is characterised by organised lymphoid infiltrates (similar to intestinal Peyer's patches), mainly constituted of neoplastic B cells from the marginal zone.

Chronic inflammatory diseases caused by pathogens or even autoimmune-induced processes are often associated with the neogenesis of lymphoid tissues in non-lymphoid organs such as the stomach [5] [6].

Several studies have clearly demonstrated that human GML biopsies are infiltrated by large numbers of T-helper cells expressing interleukin-4 (IL-4) and other T-helper cell type 2 cytokines. Intratumoural T cells sustain tumour B cell proliferation in a CD40/CD40L dependent manner [7] [8] [2] [9]. As a general rule, the tendency of a response to become polarized toward Th1 or Th2 effectors is influenced by a combination of host genetic factors and the type and amount of antigen that is encountered. Chemokines also play well defined roles in the initiation of T cell immune responses and homing of effector T cells to sites of inflammation [10].

Furthermore, chemokines are the principal regulators of lymphocyte and dendritic cell migration, lymphoid organ development, and lymphoid homeostasis [10] [6]. The investigation of the gastric inflammatory response at a GML stage was therefore of major importance in order to better characterise the driving forces that could favour the emergence of lymphoid infiltrates in an organ that is naturally devoid of lymphoid tissue.

Here we have used the material previously obtained using BALB/c mice in which we showed that *H. pylori* infection can induce the emergence of GML lesions 12 month post-infection in thymectomised 3 days after birth (d3Tx) only, but not in non-thymectomised (NTx) infected mice [11].

The main goal of the present study was to compare inflammatory responses of GML model d3Tx mice and NTx mice. An extensive investigation of the pro-inflammatory local response in animals presenting a lymphoid infiltration was conducted in order to obtain more information on the effectors stimulating B cell expansion. First, the expression of inflammatory molecules was evaluated by a global approach using a qRT-PCR array on selected samples to identify dysregulation of

relevant genes. Then the gastric overexpression of some identified target genes was confirmed on a larger number of samples. To verify these data, the inflammatory response was investigated by protein array. Our results indicate that GML-developing mice developed a local inflammatory response that is likely to trigger the recruitment of leukocytes and promote lymphocyte proliferation and the emergence of lymphoid structures. We postulate that tumour necrosis factor superfamily members may play a pivotal role in the emergence and proliferation of lymphoma cells.

RESULTS

Investigation of the gastric inflammatory response by PCR array

To establish a baseline, the gastric inflammatory responses in the 3 non-infected (NI) non-thymectomised (NTx) and the 3 NI thymectomised (d3Tx) mice were first compared. There was no significant upregulated

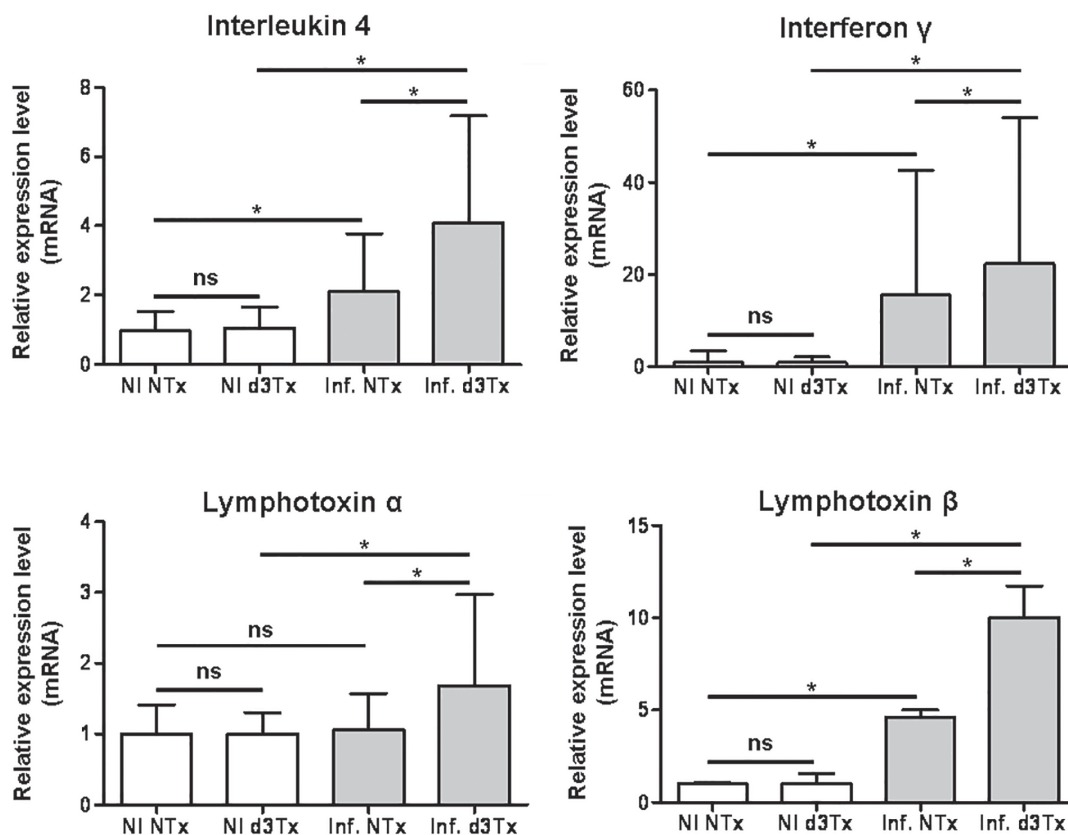


Figure 1: Relative expression levels of IL-4, IFN γ and lymphotoxins α and β in infected NTx and d3Tx mouse stomachs in comparison with expression levels in NI mice. Expression levels for infected NTx ($n = 40$) and d3Tx ($n = 29$) mouse groups were normalised in comparison with respective NI NTx ($n = 10$) and NI d3Tx ($n = 8$) control group expression levels. Data are plotted as bar graphs displaying the average/mean \pm standard deviation for each group, $*p < 0.05$, ns = not significant. *Gusb* was used as housekeeping gene. Similar results were obtained with *HPRT* (not shown).

Table 1: Upregulated targets in thymectomised and non-thymectomised infected mice.

Target	Symbol	d3Tx	NTx
Chemokine (C-C motif) ligand 1	CCL1	3.3776	1.1702
Chemokine (C-C motif) ligand 12	CCL12	4.3967	3.2908
Chemokine (C-C motif) ligand 2	CCL2	4.8391	1.6392
Chemokine (C-C motif) ligand 20	CCL20	2.1021	5.7411
Chemokine (C-C motif) ligand 3	CCL3	12.0991	1.3768
Chemokine (C-C motif) ligand 4	CCL4	15.1562	1.3756
Chemokine (C-C motif) ligand 5	CCL5	9.0041	-1.3194
CD40 ligand	CD40L	2.997	1.3188
Chemokine (C-X-C motif) ligand 10	CXCL10	2.213	-1.4186
Chemokine (C-X-C motif) ligand 11	CXCL11	2.4126	1.2647
Chemokine (C-X-C motif) ligand 13	CXCL13	2.8116	1.5674
Chemokine (C-X-C motif) ligand 9	CXCL9	8.9471	1.5075
Fas ligand (TNF superfamily, member 6)	FasL	2.5457	1.178
Interferon gamma	INF γ	6.0846	1.4778
Interleukin 12B	IL-12b	4.2728	1.3981
Interleukin 13	IL-13	3.6621	1.3101
Interleukin 16	IL-16	3.4635	1.4876
Interleukin 1 alpha	IL-1a	2.323	1.3689
Interleukin 1 beta	IL-1b	3.2729	1.5132
Interleukin 1 receptor antagonist	IL-1rn	4.9337	1.4163
Interleukin 4	IL-4	4.9508	1.6454
Interleukin 6	IL-6	3.0502	1.1797
Lymphotoxin B	Ltb	6.726	1.7984
Tumour necrosis factor	TNF	3.6536	1.4453
Tumour necrosis factor (ligand) superfamily, member 10 (TRAIL)	TNFsf10	4.6554	-1.16
Tumour necrosis factor (ligand) superfamily, member 11 (TRANCE/RANKL)	TNFsf11	3.8508	1.2266
Tumour necrosis factor (ligand) superfamily, member 13b (BAFF)	TNFsf13b	2.3759	1.567
Chemokine (C motif) ligand 1	XCL1	5.4538	2.1276

For each group 8 mice were included and fold-regulation values were compared to 6 non-infected animals. Those higher or lower than 2 are highlighted in bold for both infected groups of mice. The complete designation of each target is indicated as well as the common symbol. d3Tx: thymectomised infected mice; NTx: non-thymectomised infected mice.

or downregulated target genes among the two groups (data not shown). Therefore the Ct values of these 6 NI were considered as a single control group and used for identification of the dysregulated expression of chemokines and cytokines in each infected group (NTx and d3Tx). The distribution of dysregulation values higher or lower than cut-off of 2 are shown in Table 1.

A total of 3 chemokine encoding genes (CCL12, CCL20 and Xcl1) were found upregulated in infected NTx mice when compared to the NI control group. In contrast, a total of 25 genes were found specifically upregulated in infected d3Tx mice (Table 1): 1) Th1 associated cytokines such as IFN γ , IL-12, and Th2 associated cytokines such as IL-4, IL-6 and IL-13, as well as the lymphocyte chemoattractant factor IL-16; 2) activators or regulators of the lymphocytic response such as co-stimulation signaling molecule CD40L, LT β , IL-1 (IL-1 α , IL-1 β and IL-1 receptor antagonist), FasL and other members of the TNF-superfamily such as TNF, TRAIL, RANKL and

BAFF; and 3) numerous chemokines of CCL (CCL1, 2; 3, 4, 5) or CXCL type (9, 10, 11, 13). The presence of all of these cytokines/chemokines is in agreement with a mixed Th1/Th2 response and with the recruitment and sustainment of a lymphocytic proliferation. Neither Th17 (such as IL-17, IL-21, IL-23) cytokines, nor regulatory T cells (Tregs) (IL-10 or TGF β) targets were upregulated in infected animals. In conclusion, mice developing GML exhibited an inflammatory response that could trigger leukocyte recruitment and B lymphocyte proliferation. The inflammatory background appeared Th1 and Th2 polarized.

Relative expression levels of IL-4 and IFN γ cytokines and lymphotoxins in NTx and d3Tx mice

A set of the upregulated targets identified above were investigated further using a larger number of

Table 2: Targets upregulated at transcriptional and translational levels in infected thymectomised mice.

	A	B	C	D	E
Chemokines	CCL (1, 3, 5, 20) CXCL (10, 13)	CCL (11, 17, 19) CXCL (1, 5, 12, 16)	CCL (2, 12) CXCL (9, 11) Xcl1	CCL (25, 27) CXCL2	CCL4
Th1 cytokines	IFN- γ IL-12B	IL-2 IL-12A		IL-2 R α	
Th2 cytokines	IL-13		IL-4 IL-6	IL-6 R	
Th17 cytokines		IL-17 IL-21			
Lymphocyte activation and regulation factors	<u>CD40 L</u> IL-1 α IL-1 β <u>TNFα</u>	IL-3	<u>FasL</u> IL-1 RA <u>TRANCE</u>	<u>CD27 (+L)</u> <u>CD30 (+L)</u> CD40 Fc γ RIIB <u>GITR (+L)</u> GAS 6 IL-3 R β IL-20 IL-28 sTNF RI sTNF RII TACI <u>TWEAK (+L)</u>	IL-16 <u>LTβ</u> <u>TRAIL</u> <u>BAFF</u>
Number of targets	(13)	(12)	(10)	(22)	(5)

A: over-expressed targets by PCR and cytokine antibody array; B: over-produced targets by cytokine antibody array only; C: over-expressed targets by PCR array only; D: over-produced targets by cytokine antibody array (not determined by PCR-array), E: over-expressed targets by PCR array (not determined by cytokine antibody array). Members of the TNF-superfamily are underlined. (cytokine antibody array and PCR array : fold change > or =2).

samples in order to evaluate more precisely their specific dysregulation at the lymphoma stage. The relative expression level of IL-4 (associated with a Th2 immune response) in stomachs of infected NTx mice was found to be approximately twice that of NI NTx mice ($*p < 0.05$). In infected d3Tx mouse stomachs, it was 4 times higher than in the NI d3Tx control group ($*p < 0.05$), and approximately 2 times higher in infected d3Tx mice in comparison with infected NTx mice ($*p < 0.05$) (Figure 1).

The same phenomenon was observed for INF γ (associated with a Th1 immune response) with relative expression levels 15 and 22 times superior to controls in infected NTx and d3Tx mice, respectively ($*p < 0.05$). The expression level was again higher in infected d3Tx mice in comparison with infected NTx ($*p < 0.05$).

Among the TNF α superfamily members, LT α and LT β were both investigated even though LT β only was upregulated in the PCR array. Indeed it has been suggested that these lymphotoxins, working together, represent key molecules in the development of lymphoid structures in general [12] [13] and in the stomach specifically [14]. It is noteworthy that the expression levels of LT α were unchanged in infected NTx mice in comparison with the NI controls, but were significantly elevated in infected d3Tx mice ($*p < 0.05$). The expression levels of LT β in infected NTx mice were 4 to 5 times higher to that of the

NI control ($*p < 0.05$), and 10 times higher to that of the infected d3Tx control ($*p < 0.05$). The relative level of LT β in infected d3Tx mice was approximately twice that of the infected NTx group ($*p < 0.05$) (Figure 1).

These relative expression levels obtained for each infected d3Tx mouse were classified according to histological scores of inflammation and lymphoid infiltrates as described previously [11]. In general, a positive correlation was observed with the scores for all cytokines/LTs investigated (Figures 2A and 2B). In comparison with the NI d3Tx control group, the 4 targets were all significantly overexpressed in mice with inflammation and lymphoid infiltrate scores of 2 or higher which correlated with mice with GML lesions.

Hence, infected d3Tx mice seemed to develop a more pronounced Th2 (IL-4) and Th1 (INF γ) response than infected NTx mice. Overexpression of the 2 active subunits of LT only appears in d3Tx mice and correlated with the structuring of lymphoid follicles in their stomachs.

Analysis of the gastric inflammatory response by cytokine antibody array

Overexpression of genes encoding cytokines and chemokines was verified at the protein level by cytokine antibody arrays. Inflammatory response in 4

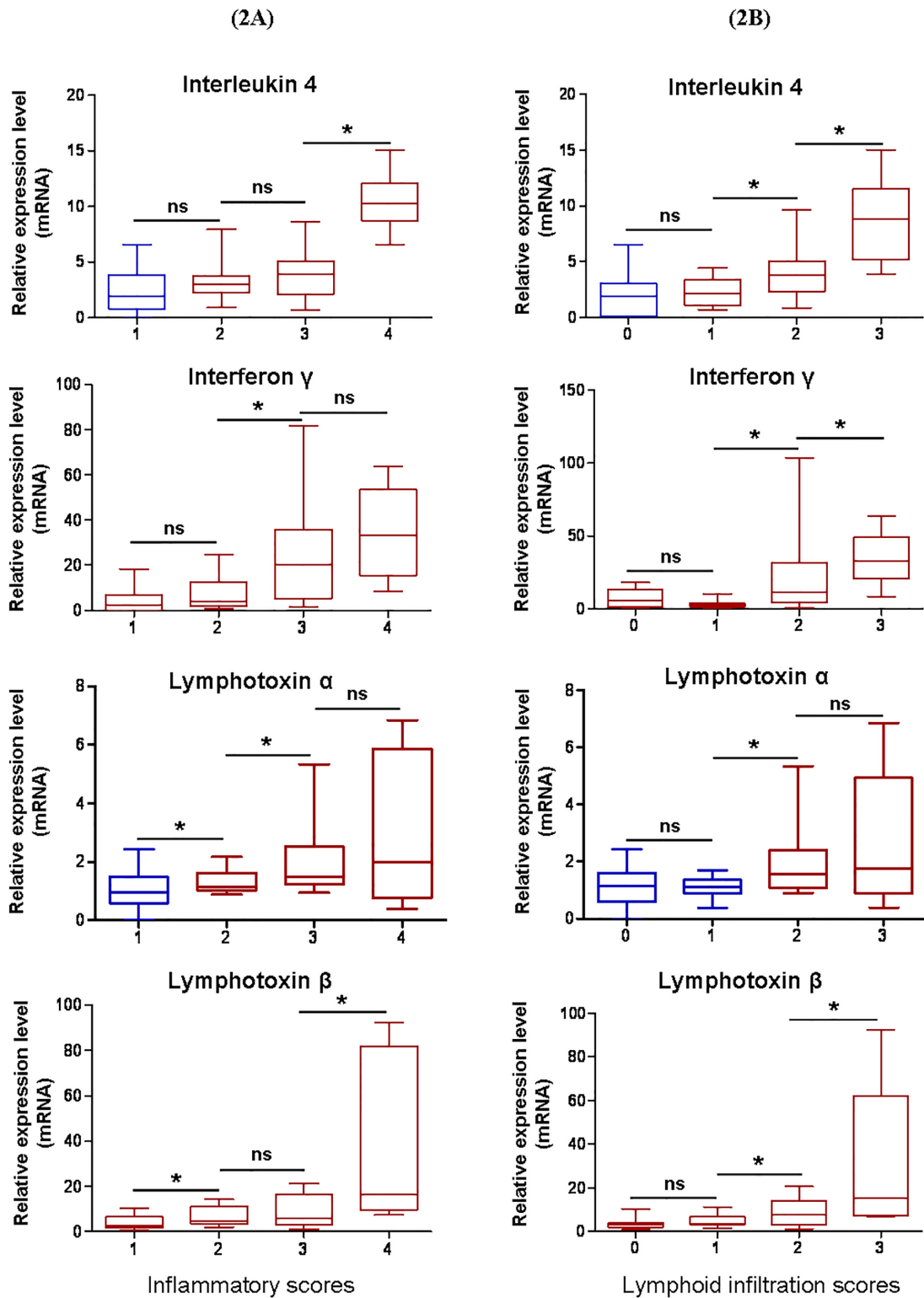


Figure 2: Correlation between relative expression levels of IL-4, IFN γ and lymphotoxins α and β and histological scores of infected d3Tx mice. Relative expression levels for each gene of interest were classified according to histological scores obtained for each infected d3Tx mouse. **A.** Correlation of relative expression levels in comparison with inflammation scores ($n = 8, 9, 9$ and 3 respectively for scores of $1, 2, 3$ and 4). **B.** Correlation of relative expression levels in comparison to lymphoid infiltrates scores ($n = 5, 8, 12$ and 4 respectively for scores of $0, 1, 2$ and 3). Graphic representations as box plots, with the box representing 50% of values around the median (horizontal line) and the whiskers representing the minimum and maximum of all the data, * $p < 0.05$, ns = not significant. In blue not significant expression levels when compared to the NI d3Tx control group, in red significant expression levels when compared to this same group ($p < 0.05$). *Gusb* was used as housekeeping gene. Similar results were obtained with *HPRT* (not shown).

infected versus 3 NI d3Tx mice (as described in material and methods) was therefore compared to the relative abundance of cytokines and chemokines in the stomach.

The fold-regulation values equal to or higher than 2 are shown in Supplemental Table 1 (Table S1). A total of 65 proteins among the 144 examined, were overproduced in infected d3Tx mice: 1) Th1 cytokines such as IL-2 and its receptor IL-2 R α , IL-12A and IL-12B, INF γ ; Th2 cytokines such as IL-13 and Th17 cytokines such as IL-17 and IL-21; 2) numerous activators or regulators of the lymphocytic response such as co-stimulation signal CD40L and its receptor CD40, IL-1 (IL-1 α , IL-1 β), IL-3 and its receptor IL-3 R β , IL-20, IL-28, TNF α and its receptors (sTNF RI and RII) and other members of the TNF-superfamily such as GITR, TWEAK, CD27, CD30 (and their respective ligands) and TACI; 3) numerous chemokines of CCL- (1, 3, 5, 11, 17, 19, 20, 25, 27) or CXCL-type (1, 2, 5, 10, 12, 13, 16); 4), as well as other proteins (Table S1). Production of these cytokines and chemokines correlates with a mixed Th1/Th2/Th17 inflammatory response and with the recruitment and sustainment of a lymphocytic proliferation.

Among the 28 targets identified at the transcriptional level in infected d3Tx mice, 13 (46.4%) were also found to be over-produced in the cytokine antibody array (Table 2). Over-production of twelve target genes that were not detected at the transcriptional level (likely due to high turnover of mRNA) were detected by cytokine antibody array (Table 2). Presence of cytokines such as Th17, IL-17 and IL-21, suggests a role for Th17 response in the inflammatory process leading to development of GML. Of the 4 targets that were found over-expressed by PCR array, but not determined by cytokine array, BAFF was investigated further. We confirmed by ELISA quantification that it was over-produced (around 16.6 times higher in infected d3Tx mice compared to NI controls) in mice developing GML (Figure 3). Moreover, the cytokine antibody array allowed the identification of 22 targets that were not included in the PCR array panel and, among these, numerous members of TNF-superfamily (Table 2). Considering the respective pro-inflammatory, proliferative and/or pro-apoptotic activities of these latter targets, it is likely that they may play an important role in the GML microenvironment. Finally, Tregs (IL-10 or TGF β) cytokines were never found to be upregulated in infected animals in our analyses.

In conclusion, antibody array results confirmed and complemented those obtained by qRT-PCR array and highlighted the putative involvement of members of the TNF-superfamily in the inflammatory process.

DISCUSSION

This study focused on the gastric inflammatory response involved in the emergence of GML. By using the gastric biopsies obtained in our previous study [11]

from *H. pylori*-infected d3Tx mice that developed GML, we showed the upregulation at transcriptional and translational levels of numerous gene targets which, when considered together, highlight the molecular processes likely to trigger emergence of lymphoid structures in the gastric mucosa.

Three genes were found to be dysregulated in both NTx and d3Tx models, a common signature of *H. pylori* infection in BALB/c mice. Xcl1, a T cell attractant factor [15], CCL20, implicated in the formation and function of mucosal lymphoid tissues via chemoattraction of lymphocytes (including regulatory T cells) and dendritic cells [16], and CCL12, involved in the recruitment of eosinophils, monocytes and lymphocytes [17] were all upregulated in infected NTx and d3Tx animals. This common inflammatory trait could initiate the recruitment of leukocytes at the site of infection in both models. However, the inflammatory response within the structuration of lymphoid infiltrates was highly evident in infected d3Tx mice only [11]. Considering the role of the target genes that we found to be specifically upregulated in d3Tx mice developing GML, several mechanisms of how GML is controlled or favoured could be hypothesised.

Some of the inflammatory factors identified in this study could favour the recruitment of leukocytes and promote lymphocyte proliferation in mice developing GML. Th1 (IFN γ) and Th2 (IL-4 and IL-13) mixed inflammatory response was indeed observed in both of our NTx and d3Tx mouse models. IFN γ and IL-4 transcript levels were significantly higher in the d3Tx model and the increase in expression of these pro-inflammatory factors correlates with the increase of the histological scores of inflammation and lymphoid infiltrates. Our results are in agreement with previous data found in GML patients, in which tumour infiltrating T cells were comprised of a

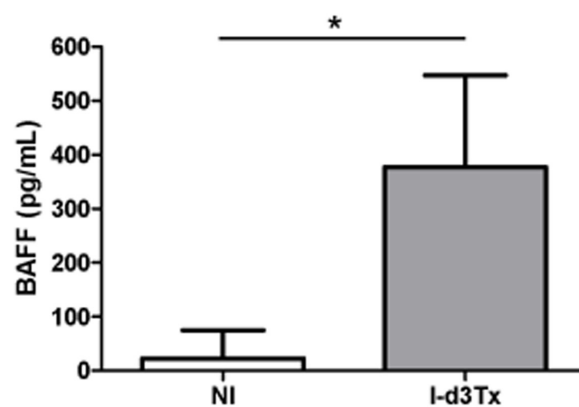


Figure 3: Determination of BAFF overproduction in gastric biopsies from thymectomised mice. BAFF levels for non-infected d3Tx (NI, $n = 5$) and infected d3Tx (I-d3Tx, $n = 6$) mouse groups were determined by ELISA. Each sample was tested in duplicate. Data are plotted as bar graphs displaying the average/mean \pm standard deviation for each group, * $p < 0.05$, ns = not significant.

heterogenous population consisting of multiple functional subsets which secreted different combinations of both cytokines, Th1- and Th2-type [18].

Cytokines, in particular IL-12 and IL-4, are dominant factors that regulate T cell differentiation. However, alternative pathways for Th1 and Th2 polarization exist [10]. For example, T cell-derived chemokines might influence T cell priming and differentiation and are likely to be especially important at sites of inflammation.

CCL2 is considered to be a Th2-inducing chemokine via two major pathways: either the reduction of IL-12 production by antigen presenting cells or the enhancement of IL-4 production by activated T cells. Aside from CCL2 activity, it has been shown that, when high amounts of CCL3 or CCL5 are present at a site of T cell activation, a cell-mediated Th1-type response is favoured [19] [10]. Finally, CCL19 may play a role in dampening an inflammatory Th1-type response [10].

TNF α is a very strong stimulus for chemokine expression. It has been shown specifically that that TNF α synergized with IL-4, and to a lesser extent with IFN γ and IL-13, to release chemokines such as CCL1 or CXCL1. [20] There probably is a local crosstalk between all of these partners that induces and sustains the

inflammatory response. While T cell cytokines may, in the end, be driving this activation, the role of the early innate response and macrophage/dendritic cell/epithelial cell activation in recruiting the T cells to the gastric tissue has to be investigated further. The study of the inflammatory response at earlier time points after infection could be very interesting to determine if the early events are different in NTx and d3Tx mice.

A range of factors has been related to the structuration of lymphoid infiltrates in gastric mucosa. CCL1 has been implicated in leukaemia and lymphoma, in particular via an autocrine loop that protects cells from apoptosis [21]. It also promotes migration of tumour cells towards lymph nodes [22]. LTs, CXCL13 and CCL19 have been shown to influence the organisation and function of tertiary lymphoid structures and maintenance of lymphoid tissue microarchitecture [5] [6].

Similarly, LT-mediated (TNF-superfamily) signalling has been shown to actively contribute to effector immune responses and is present in different heterotrimeric (LT α 1 β 2 or LT α 2 β 1) or soluble homotrimeric (LT α 3) forms. It is interesting to note that in the present study, only infected d3Tx mice overexpressed both LT α and LT β subunits, both necessary for its biological action. This overexpression was also correlated to inflammation and

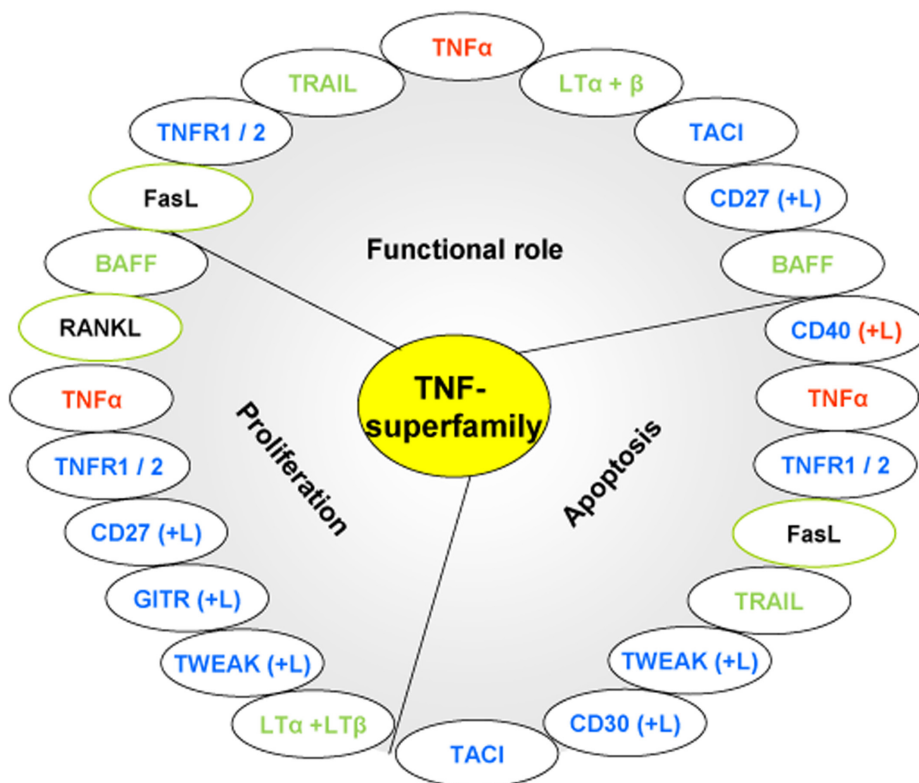


Figure 4: Roles of the upregulated members of the TNF-superfamily in our study. Each member of the TNF-superfamily can exhibit various functions. (In red: members upregulated at molecular and protein levels; in blue: members overproduced at the protein level (mRNA expression not determined); in green: members overexpressed at molecular level (protein production not determined); in black framed in green: members overexpressed at transcriptional level but not at protein level)

lymphoid infiltrate scoring. Lack of significant lymphoid infiltrates in NTx mouse stomachs is therefore consistent with previous observation that a deletion of LT α leads to a defect in lymphoid organ development [23]. Moreover, LT might also be essential for Th2 cell development, similar to that shown for helminth infection [24]. Even more interesting is the evidence of a positive feedback loop between CXCL13 and the upregulation of LT α 1 β 2 on B cells for the maintenance of B cell follicles which has been suggested previously [5] [6]. Migration of lymphocytes into the gastric mucosa and structuration of lymphoid infiltrates in GML could therefore be influenced by presence of LT. These results are in line with previous reports, where CXCL13 was shown to be crucial for lymphoid infiltrate formation in GML [25] in other animal models [26].

Finally, it has been shown that in GML CD40 and its receptor CD40L, play an important role in the co-stimulation of B cells [8]. CD40 signalling in B cells is also known to promote germinal centre formation, and to be essential for the survival of many cell types including gastric cancer B cells under normal and inflammatory conditions [27]. Therefore, the upregulation of these factors could favour the emergence of lymphoid structures in GML.

TNF-superfamily members could play important roles in GML pathogenesis. Interestingly our study also revealed upregulation of numerous members of the TNF-superfamily, suggesting an important role of this family in the GML microenvironment. All members of the TNF-superfamily, without exception, exhibit pro-inflammatory activity, in part via activation of the transcription factor NF- κ B. This ability to activate a pro-inflammatory transcription factor provides members of the TNF-superfamily with carcinogenic activities by regulating the expression of genes linked to tumour cell survival, proliferation, invasion, angiogenesis and metastasis [28].

Several members such as BAFF, CD27, GITR, LT α and LT β , and RANKL which are upregulated in mice developing GML (either at the transcriptional or translational level), exhibit proliferation activation of haematopoietic cells, in part by activating various mitogen-activated kinases. In contrast, other members of this family such as CD40, FasL, TRAIL and CD30, play a role in apoptosis. TRAIL can regulate lymphocyte functions in the periphery by inhibiting T cells cell-cycle progression [29]. Other members such as TNF α , FasL and TWEAK display both pro-apoptotic and proliferative activities (Figure 4). In some cell types, TWEAK functions not as a death factor but as a cell survival [30] or proliferation factor [31]. Therefore, most members of the TNF-superfamily have both beneficial and potentially harmful effects [32] and a disbalance between their respective proliferative and/or pro-apoptotic activities would create a favourable environment for GML development.

Specific attention needs to be directed to BAFF, a member of the TNF-superfamily, as it appears to play a critical role in GML development and critical to B-cell survival and maturation [33] [34]. BAFF expression is known to be regulated in response to cytokines such as INF γ and CD40L that we also found to be upregulated in GML-developing mice. Numerous studies have demonstrated that BAFF-signalling induces expression of anti-apoptotic molecules such as Bcl-2 in B cells, confirming its significant role in promoting B-cell survival [35] [36]. Furthermore, BAFF plays a role in lymphocyte differentiation as B-cell differentiation is completely abolished in BAFF-deficient mice [37]. Aberrant BAFF expression was reported to be associated with *H. pylori* independent growth of GML [38]. Here we propose that dysregulation of BAFF could play a major role in stimulation of B cell proliferation even in *H. pylori* GML positive cases.

BAFF is also able to drive Th17 response during *H. pylori* infection; the Th17 response that was characterized in our model involves upregulation of IL-17 and IL-21 at the protein level [39]. Interestingly, it has been shown that IL-21 has a role in sustaining both Th1 and Th17 effector cell responses [40]. It was also shown that IL-21 contributes to *H. pylori* specific antibody responses, suggesting this cytokine may have an effect on B cell proliferation [40].

It has been shown that in human gastric biopsies of GML patients, a chemokine related to BAFF, called APRIL (A Proliferation Inducing Ligand) or TNFSF 13a, was produced by the infiltrating macrophages adjacent to neoplastic B cells [41]. APRIL is involved in the induction and maintenance of B and T cell responses, as well as in the promotion and survival of neoplastic cells [42]. It could therefore be interesting to investigate APRIL further, using our model, as this chemokine was absent of our panels of PCR and cytokine antibody arrays.

Autoimmune processes may be important in gastric lymphomagenesis. Indeed, BAFF is also known to affect the onset and severity of several autoimmune diseases [43]. Excessive production of BAFF helps the survival of low affinity and self-reactive B cells leading to a collapse of B cell tolerance [44]. Increased levels of this factor have been observed in the sera of patients with different types of autoimmune diseases, as well as in lymphoproliferative B cell diseases [45] [43]. Therefore the upregulation of BAFF in our GML mouse model may suggest involvement of an autoimmune attribute in this disease. The dysregulation of CD40 signalling has also been observed in multiple autoimmune diseases. The inhibition of LT and CD40 pathways has been shown to be effective in quieting inflammation in settings where DC-T cell interaction are key players of disease progression such as GML [46] [47].

In conclusion, the present study of the inflammatory response in mice developing GML following *H. pylori*

infection allowed us to highlight several driving forces in this pathology: 1) the induction of a mixed inflammatory response, probably in line with the chemokine environment found at the lymphoma stage; 2) the upregulation of B cell promoting factors that have key functions in lymphoid organogenesis and 3) signs of a possible involvement of autoimmune phenomena. Our study also paves the way for future work on genetic predisposition for the dysregulation of some of TNF-superfamily members as putative genetic markers for this rare disease.

MATERIALS AND METHODS

RNA extraction

RNA was extracted from gastric biopsies using DNA/RNA/miRNA Universal Qiagen kit (Qiagen, Courtaboeuf, France): 50 and 40 RNA samples extracted from NTx (10 NI and 40 infected mice) and d3Tx mice (8 NI and 32 infected mice) respectively.

Chemokines and cytokines PCR Array

The expression of chemokines and cytokines in the gastric mucosa of NTx and d3Tx mice was evaluated by PCR array using the commercialised "Mouse Cytokines & Chemokines panel" PAMM-150ZA-2 (Qiagen). For each model, a specific subset of 3 NI and 8 infected mice were investigated (reported in Chrisment *et al.* [11]). For d3Tx infected mice, animals that exhibited typical GML lesions were included, *i.e.* mice with B lymphoid infiltrates associated with lymphoepithelial lesions [11]. Moreover, only RNAs of high integrity and appropriate concentration after analysis on the Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) were considered: the final selection included 8 *H. pylori* infected d3Tx mice and 8 infected NTx mice.

500 ng of RNA was reverse transcribed to single-stranded cDNA using the RT² First Strand kit (Qiagen) according to the manufacturer's protocol. Analysis of the expression of 84 inflammation mediator genes as well as that of five housekeeping genes (HKG) using the RT² SYBR Green Mastermix (Qiagen) was performed according to manufacturer's recommendations. PCR arrays were performed using the Stratagene MX3005p System (Agilent Technologies). Cycle thresholds were downloaded from the machine and analysed using the $\Delta\Delta C_t$ method via Qiagen PCR array online system (<http://www.sabiosciences.com/pcrarraydataanalysis.php>). Data was normalised to the mean values of the five HKG. Fold-regulation calculations were performed using SABiosciences' data analysis softwares. Fold-regulation values greater or less than two indicate an upregulation or downregulation, respectively.

Quantitative real-time (RT)-PCR

Study of various genes' expression in d3Tx and NTx mice stomachs was carried out by qRT-PCR.

Gastric RNA sample reverse transcription: the PrimescriptTM RT Reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) (Takara, Saint-Germain-en-Laye, France) was used for reverse transcription of all purified RNA samples (750 ng) Primers used: among targets previously identified as overexpressed by PCR array, IL-4, IFN γ , LT α and LT β were selected. Commercial primers targeting IL-4, LT α and LT β (PPM03013F, PPM03114A and PPM03119A, respectively) and HKG *Gusb* (PPM05490C) (RT² qPCR Primer Assay, Qiagen) were used. Primers targeting IFN γ and HKG hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase (*HPRT*), described by B. Flahou *et al.* [48] were synthesised by Eurofins MWG Biotech (Courtaboeuf, France). All of these primers allowed an evaluation of the relative expression levels for each target compared to HKG in stomachs. The primers were used at a concentration of 10 μ M.

Amplification conditions: SYBR[®] Premix Ex TaqTM (Tli RNaseH Plus) (Takara) Mix was used for all qRT-PCRs. PCR experiments to amplify IL-4, IFN γ , LT α and LT β and HKG *Gusb* and *HPRT* were performed in 384-well plates (Bio-Rad, Marnes la Coquette, France) with 3 μ l of diluted cDNA (1/10) in a total volume of 10 μ l. Each target was tested in triplicate for each sample. PCRs were carried out using a RT-PCR thermocycler CFX384TM (Bio-Rad) at the TBM-Core real-time PCR platform (University of Bordeaux).

PCRs started with a 95°C DNA denaturation step for 3 minutes, followed by 40 cycles comprising 2 steps: a denaturation at 95°C for 5 seconds and a primer hybridisation at 60°C for 30 seconds. After each cycle, fluorescence was measured in order to quantify newly synthesised DNA. At the end of the procedure, a melting curve was generated by a slow elevation in the temperature from 65 to 95°C and the continuous measurement of fluorescence. The generation of this melting curve permitted the verification of one specific peak at the expected melting temperature for each product, which showed the PCR specificity.

Relative quantification of the targets' expression: Cycle threshold (Ct) values above 35 were considered as non-specific and therefore not considered for the analysis. For each sample, Ct values obtained for each gene of interest were normalised in relation to the average of Ct values obtained for each HKG ($\Delta C_t = C_{t_{\text{gene of interest}}} - C_{t_{\text{housekeeping gene}}}$). The $2^{-\Delta C_t}$ value was then calculated, and enabled the results to be expressed as relative expression levels of genes of interest.

Relative expression levels of IL-4, IFN γ and LT α and LT β genes for NI mice (control groups) were rationalised to 1, in order to normalise the expression

levels in groups of infected mice in comparison to the expression levels in corresponding NI controls.

Relative expression levels of each target gene for the d3Tx mice group were also correlated with the histological scoring previously obtained [11].

Cytokine antibody arrays

The expression of chemokines and cytokines in the gastric mucosa of d3Tx mice was evaluated at the protein level by cytokine antibody arrays (RayBio C-series, Mouse Cytokine Antibody Array C2000, RayBiotech, Inc, Norcross, GA, USA) according to the manufacturer's instructions. Five NI and 6 d3Tx infected mice which exhibited typical GML lesions were included [11].

Briefly, tissues were lysed in the cell lysis buffer provided after addition of proteinase inhibitors (Complete Mini, Roche, Basel, Switzerland), homogenized, glass-bead smashed (TissueLyser II, Qiagen) and centrifuged at 10,000 g for 10 min (4°C). The supernatants were recovered.

Protein extracts of each group of mice were pooled and pooled extracts diluted at least 10-fold in 1x blocking buffer to a total volume of 1.2 mL. After a blocking step, array membranes were incubated in pooled extracts at 4°C overnight. Each membrane was processed according to manufacturer's recommendations, incubated in ECL-plus and imaged on ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare Life Sciences, Velizy-Villacoublay, France).

Relative chemiluminescence intensity of each spot, corresponding to each protein, was recorded using ImageJ software. Data obtained with this software were analysed with RayBio Mouse Cytokine Antibody Array C Series 2000 Analysis Tool according to the manufacturer's instructions. Ratios of infected/NI d3Tx were calculated for each target and variation in expression was considered only when the ratio was > or equal to 2-fold.

ELISA

The concentrations of BAFF were measured in the same protein extracts as above, by using a mouse BAFF/BLyS/TNFSF13B Immunoassay ELISA kit in accordance with the manufacturer's protocols (R&D systems, Minneapolis, MN). Plates were read using the Spectrostar Nano reader (BMG Labtech, Champigny sur Marne, France). All samples were tested in duplicate. Results were expressed in pg/mL.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed with GraphPad Prism 5.01 (GraphPad Software, Inc. La Jolla, CA, USA). Means were compared by the non-parametric Mann-

Whitney test. Differences were considered significant when p was inferior to 0.05 ($*p < 0.05$).

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Xavier Gauthereau from the TBM-Core real-time PCR platform (University of Bordeaux), and Lindsay Mégraud for English revision of the manuscript. Alban Giese and the Experimental Histology unit were funded by the Cancéropôle Grand Sud Ouest.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. Lehours P, Menard A, Dupouy S, Bergey B, Richey F, Zerbib F, Ruskone-Fourmestreaux A, Delchier JC and Megraud F. Evaluation of the association of nine *Helicobacter pylori* virulence factors with strains involved in low-grade gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Infect Immun.* 2004; 72:880-888.
2. Ferreri AJ, Ernberg I and Copie-Bergman C. Infectious agents and lymphoma development: molecular and clinical aspects. *J Intern Med.* 2009; 265:421-438.
3. Salama NR, Hartung ML and Muller A. Life in the human stomach: persistence strategies of the bacterial pathogen *Helicobacter pylori*. *Nat Rev Microbiol.* 2013; 11:385-399.
4. Kusters JG, van Vliet AH and Kuipers EJ. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Clin Microbiol Rev.* 2006; 19:449-490.
5. Foo SY and Phipps S. Regulation of inducible BALF formation and contribution to immunity and pathology. *Mucosal Immunol.* 2010; 3:537-544.
6. Hopken UE and Rehm A. Homeostatic chemokines guide lymphoma cells to tumor growth-promoting niches within secondary lymphoid organs. *J Mol Med (Berl).* 2012; 90:1237-1245.
7. Hussell T, Isaacson PG, Crabtree JE and Spencer J. *Helicobacter pylori*-specific tumour-infiltrating T cells provide contact dependent help for the growth of malignant B cells in low-grade gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue. *J Pathol.* 1996; 178:122-127.
8. Suarez F, Lortholary O, Hermine O and Lecuit M. Infection-associated lymphomas derived from marginal zone B cells: a model of antigen-driven lymphoproliferation. *Blood.* 2006; 107:3034-3044.
9. Craig VJ, Cogliatti SB, Arnold I, Gerke C, Balandat JE, Wundisch T and Muller A. B-cell receptor signaling and CD40 ligand-independent T cell help cooperate in *Helicobacter*-induced MALT lymphomagenesis. *Leukemia.* 2010; 24:1186-1196.

10. Luther SA and Cyster JG. Chemokines as regulators of T cell differentiation. *Nat Immunol.* 2001; 2:102-107.
11. Chrisment D, Dubus P, Chambonnier L, Hoces de la Guardia A, Sifre E, Giese A, Capone M, Khairallah C, Costet P, Rousseau B, Hubert C, Burlen-Defranoux O, Varon C, Bandeira A, Megraud F and Lehours P. Neonatal Thymectomy Favors *Helicobacter pylori*-Promoted Gastric Mucosa-Associated Lymphoid Tissue Lymphoma Lesions in BALB/c Mice. *Am J Pathol.* 2014; 184:2174-2184.
12. Bauer J, Namineni S, Reisinger F, Zoller J, Yuan D and Heikenwalder M. Lymphotoxin, NF- κ B, and cancer: the dark side of cytokines. *Dig Dis.* 2012; 30:453-468.
13. Upadhyay V and Fu YX. Lymphotoxin signalling in immune homeostasis and the control of microorganisms. *Nat Rev Immunol.* 2013; 13:270-279.
14. Uchida K, Okazaki K, Debrecceni A, Nishi T, Iwano H, Inai M, Uose S, Nakase H, Ohana M, Oshima C, Matsushima Y, Kawanami C, Hiai H, Masuda T and Chiba T. Analysis of cytokines in the early development of gastric secondary lymphoid follicles in *Helicobacter pylori*-infected BALB/c mice with neonatal thymectomy. *Infect Immun.* 2001; 69:6749-6754.
15. Lei Y and Takahama Y. XCL1 and XCR1 in the immune system. *Microbes Infect.* 2015; 14:262-267.
16. Cook KW, Letley DP, Ingram RJ, Staples E, Skjoldmose H, Atherton JC and Robinson K. CCL20/CCR6-mediated migration of regulatory T cells to the *Helicobacter pylori*-infected human gastric mucosa. *Gut.* 2014; 63:1550-1559.
17. Sarafi MN, Garcia-Zepeda EA, MacLean JA, Charo IF and Luster AD. Murine monocyte chemoattractant protein (MCP)-5: a novel CC chemokine that is a structural and functional homologue of human MCP-1. *J Exp Med.* 1997; 185:99-109.
18. D'Elis MM, Amedei A and Del Prete G. *Helicobacter pylori* antigen-specific T-cell responses at gastric level in chronic gastritis, peptic ulcer, gastric cancer and low-grade mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma. *Microbes Infect.* 2003; 5:723-730.
19. Zou W, Borvak J, Marches F, Wei S, Galanaud P, Emilie D and Curiel TJ. Macrophage-derived dendritic cells have strong Th1-polarizing potential mediated by beta-chemokines rather than IL-12. *J Immunol.* 2000; 165:4388-4396.
20. Meyer-Hoffert U, Lezcano-Meza D, Bartels J, Montes-Vizuet AR, Schroder JM and Teran LM. Th2- and to a lesser extent Th1-type cytokines upregulate the production of both CXC (IL-8 and gro- α) and CC (RANTES, eotaxin, eotaxin-2, MCP-3 and MCP-4) chemokines in human airway epithelial cells. *Int Arch Allergy Immunol.* 2003; 131:264-271.
21. Ruckes T, Saul D, Van Snick J, Hermine O and Grassmann R. Autocrine antiapoptotic stimulation of cultured adult T-cell leukemia cells by overexpression of the chemokine I-309. *Blood.* 2001; 98:1150-1159.
22. Das S, Sarrou E, Podgrabska S, Cassella M, Mungamuri SK, Feirt N, Gordon R, Nagi CS, Wang Y, Entenberg D, Condeelis J and Skobe M. Tumor cell entry into the lymph node is controlled by CCL1 chemokine expressed by lymph node lymphatic sinuses. *J Exp Med.* 2013; 210:1509-1528.
23. Banks TA, Rouse BT, Kerley MK, Blair PJ, Godfrey VL, Kuklin NA, Bouley DM, Thomas J, Kanangat S and Mucenski ML. Lymphotoxin- α -deficient mice. Effects on secondary lymphoid organ development and humoral immune responsiveness. *J Immunol.* 1995; 155:1685-1693.
24. Leon B, Ballesteros-Tato A, Browning JL, Dunn R, Randall TD and Lund FE. Regulation of T(H)2 development by CXCR5+ dendritic cells and lymphotoxin-expressing B cells. *Nat Immunol.* 2012; 13:681-690.
25. Mazzucchelli L, Blaser A, Kappeler A, Scharli P, Laissue JA, Baggiolini M and Uguccioni M. BCA-1 is highly expressed in *Helicobacter pylori*-induced mucosa-associated lymphoid tissue and gastric lymphoma. *J Clin Invest.* 1999; 104:R49-54.
26. Zhang G, Ducatelle R, De Bruyne E, Joosten M, Bosschem I, Smet A, Haesebrouck F and Flahou B. Role of gamma-glutamyltranspeptidase in the pathogenesis of *Helicobacter suis* and *Helicobacter pylori* infections. *Vet Res.* 2015; 46:31.
27. D'Orlando O, Gri G, Cattaruzzi G, Merluzzi S, Betto E, Gattei V and Pucillo C. Outside inside signalling in CD40-mediated B cell activation. *J Biol Regul Homeost Agents.* 2007; 21:49-62.
28. Balkwill F. Tumour necrosis factor and cancer. *Nat Rev Cancer.* 2009; 9:361-371.
29. Song K, Chen Y, Goke R, Wilmen A, Seidel C, Goke A, Hilliard B and Chen Y. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) is an inhibitor of autoimmune inflammation and cell cycle progression. *J Exp Med.* 2000; 191:1095-1104.
30. Jakubowski A, Browning B, Lukashev M, Sizing I, Thompson JS, Benjamin CD, Hsu YM, Ambrose C, Zheng TS and Burkly LC. Dual role for TWEAK in angiogenic regulation. *J Cell Sci.* 2002; 115:267-274.
31. Lynch CN, Wang YC, Lund JK, Chen YW, Leal JA and Wiley SR. TWEAK induces angiogenesis and proliferation of endothelial cells. *J Biol Chem.* 1999; 274(13):8455-8459.
32. Aggarwal BB. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol.* 2003; 3:745-756.
33. Schneider P, MacKay F, Steiner V, Hofmann K, Bodmer JL, Holler N, Ambrose C, Lawton P, Bixler S, Acha-Orbea H, Valmori D, Romero P, Werner-Favre C, Zubler RH, Browning JL and Tschopp J. BAFF, a novel ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates B cell growth. *J Exp Med.* 1999; 189:1747-1756.
34. Batten M, Groom J, Cachero TG, Qian F, Schneider P, Tschopp J, Browning JL and Mackay F. BAFF mediates survival of peripheral immature B lymphocytes. *J Exp Med.* 2000; 192:1453-1466.

35. Mackay F, Woodcock SA, Lawton P, Ambrose C, Baetscher M, Schneider P, Tschopp J and Browning JL. Mice transgenic for BAFF develop lymphocytic disorders along with autoimmune manifestations. *J Exp Med.* 1999; 190:1697-1710.
36. Do RK, Hatada E, Lee H, Tourigny MR, Hilbert D and Chen-Kiang S. Attenuation of apoptosis underlies B lymphocyte stimulator enhancement of humoral immune response. *J Exp Med.* 2000; 192:953-964.
37. Schiemann B, Gommerman JL, Vora K, Cachero TG, Shulga-Morskaya S, Dobles M, Frew E and Scott ML. An essential role for BAFF in the normal development of B cells through a BCMA-independent pathway. *Science.* 2001; 293:2111-2114.
38. Kuo SH, Yeh PY, Chen LT, Wu MS, Lin CW, Yeh KH, Tzeng YS, Chen JY, Hsu PN, Lin JT and Cheng AL. Overexpression of B cell-activating factor of TNF family (BAFF) is associated with *Helicobacter pylori*-independent growth of gastric diffuse large B-cell lymphoma with histologic evidence of MALT lymphoma. *Blood.* 2008; 112:2927-2934.
39. Munari F, Fassan M, Capitani N, Codolo G, Vila-Caballer M, Pizzi M, Rugge M, Della Bella C, Troilo A, D'Elis S, Baldari CT, D'Elis MM and de Bernard M. Cytokine BAFF released by *Helicobacter pylori*-infected macrophages triggers the Th17 response in human chronic gastritis. *J Immunol.* 2014; 193:5584-5594.
40. Carbo A, Olivares-Villagomez D, Hontecillas R, Bassaganya-Riera J, Chaturvedi R, Piazuelo MB, Delgado A, Washington MK, Wilson KT and Algood HM. Systems modeling of the role of interleukin-21 in the maintenance of effector CD4+ T cell responses during chronic *Helicobacter pylori* infection. *MBio.* 2014; 5:e01243-01214.
41. Munari F, Lonardi S, Cassatella MA, Doglioni C, Cangi MG, Amedei A, Facchetti F, Eishi Y, Rugge M, Fassan M, de Bernard M, D'Elis MM and Vermi W. Tumor-associated macrophages as major source of APRIL in gastric MALT lymphoma. *Blood.* 2011; 117:6612-6616.
42. Stein JV, Lopez-Fraga M, Elustondo FA, Carvalho-Pinto CE, Rodriguez D, Gomez-Caro R, De Jong J, Martinez AC, Medema JP and Hahne M. APRIL modulates B and T cell immunity. *J Clin Invest.* 2002; 109:1587-1598.
43. Lahiri A, Varin MM, Le Pottier L, Pochard P, Bendaoud B, Youinou P and Pers JO. Specific forms of BAFF favor BAFF receptor-mediated epithelial cell survival. *J Autoimmun.* 2014; 51:30-37.
44. Schneider P and Tschopp J. BAFF and the regulation of B cell survival. *Immunol Lett.* 2003; 88:57-62.
45. Mackay F, Silveira PA and Brink R. B cells and the BAFF/APRIL axis: fast-forward on autoimmunity and signaling. *Curr Opin Immunol.* 2007; 19:327-336.
46. Gommerman JL and Summers deLuca L. LTbetaR and CD40: working together in dendritic cells to optimize immune responses. *Immunol Rev.* 2011; 244:85-98.
47. Hoces de la Guardia A, Staedel C, Kaafarany I, Clement A, Roubaud Baudron C, Megraud F and Lehours P. Inflammatory cytokine and microRNA responses of primary human dendritic cells cultured with *Helicobacter pylori* strains. *Front Microbiol.* 2013; 4:236.
48. Flahou B, Deun KV, Pasmans F, Smet A, Volf J, Rychlik I, Ducatelle R and Haesebrouck F. The local immune response of mice after *Helicobacter suis* infection: strain differences and distinction with *Helicobacter pylori*. *Vet Res.* 2012; 43:75.

Article n°2

Regulatory T cells may participate in *Helicobacter pylori* persistence in gastric MALT lymphoma: lessons from an animal model.

Amandine Marine Laur*, Pauline Floch*, Lucie Chambonnier, Lucie Benejat, Victoria Korolik, Alban Giese, Pierre Dubus, Francis Mégraud, Antonio Bandeira, Philippe Lehours. (*co-premiers auteurs)

Oncotarget. 2016 Jan 19;7(3):3394-402. doi: 10.18632/oncotarget.6492.

Résumé des principaux résultats

Les conséquences de la thymectomie néonatale chez les souris BALB/c sont : 1-une lymphopénie ; 2-un défaut d'éducation thymique ; 3-potentiellement un déficit en lymphocytes T régulateurs (LTregs). Afin de déterminer si la thymectomie était responsable d'un déficit en LTregs (72), nous avons étudié les réserves en LTregs au niveau de la rate de nos souris thymectomisées à 3 jours de vie (d3Tx) non-infectées (NI) à 1 an post-chirurgie. Nous avons réalisé pour cela des qPCR et des marquages en IHC pour FoxP3 et CD3ε, qui nous ont permis d'estimer la quantité de LTregs présents par rapport au nombre de lymphocytes T (LT) total. Un déficit significatif en LT totaux a été observé dans les rates des souris d3Tx par rapport aux souris non thymectomisées (NTx), sans différence notable pour les LTregs, traduisant un enrichissement relatif en LTregs dans la rate suite à la thymectomie. Les souris d3Tx NI ont donc toujours 12 mois post-thymectomie un déficit en LT totaux, les LTregs continuant eux à s'expandre au sein de l'organe de réserve.

Il a été suggéré qu'au niveau gastrique les LTregs pourraient participer à la lymphomagenèse en favorisant la prolifération des lymphocytes B tumoraux. Aussi l'infiltration gastrique a été vérifiée dans nos souris d3Tx. Une augmentation en LT totaux et LTregs a été observée par qPCR Foxp3 et CD3ε et IHC, dans les estomacs des souris développant un LGM par rapport aux souris NTx, en corrélation avec les scores d'inflammation. La présence de ces LTregs au niveau de la muqueuse gastrique pourrait avoir un rôle dans la protection contre une inflammation gastrique importante et le développement de lésions tissulaires. Ces LTregs participeraient d'autre part à la préservation d'un inoculum bactérien minimal pour maintenir une stimulation antigénique chronique nécessaire au maintien d'une prolifération lymphoïde antigène-dépendante. L'environnement inflammatoire était par ailleurs favorable au recrutement ou à l'induction de LTregs. Ces LTregs peuvent correspondre soit à des LTregs naturels produits par le thymus recrutés in situ pour contrôler l'inflammation, soit à des LTregs induits localement à partir de LT. Nous n'avons pas réussi à mettre au point en IHC un marquage anti-neuropiline (marqueur des Tregs naturels) qui aurait pu permettre de trancher entre ces deux possibilités.

Ce travail a été publié en 2016 dans Oncotarget.

Regulatory T cells may participate in *Helicobacter pylori* persistence in gastric MALT lymphoma: lessons from an animal model

Amandine Marine Laur^{1,2,*}, Pauline Floch^{1,2,*}, Lucie Chambonnier^{1,2}, Lucie Benejat¹, Victoria Korolik³, Alban Giese⁴, Pierre Dubus⁴, Francis Mégraud^{1,2}, Antonio Bandeira⁵, Philippe Lehours^{1,2}

¹Univ. Bordeaux, Bacteriology Laboratory, Bordeaux, France

²INSERM U853, Bordeaux, France

³Institute for Glycomics, Griffith University, Gold Coast, QLD, Australia

⁴Univ. Bordeaux, EA 2406, Bordeaux, France

⁵Unit for Biology of Lymphocyte Populations, Immunology Department, Institut Pasteur and CIMI, Unity of Treg Biology and Therapy, University of Pierre & Marie Curie, Paris, France

*These authors have contributed equally to this work

Correspondence to: Philippe Lehours, **e-mail:** philippe.lehours@u-bordeaux.fr

Keywords: MALT lymphoma, regulatory T cell, animal model, *Helicobacter pylori*

Received: August 04, 2015

Accepted: November 16, 2015

Published: December 07, 2015

ABSTRACT

It has been postulated that the emergence of autoimmune gastritis in neonatal thymectomised (d3Tx) BALB/c mice may be a consequence of post-surgery deficit in Tregs. In this study, previously obtained samples from d3Tx mice were used in order to determine whether thymectomy creates a deficit in this T cell subset thereby allowing the emergence of autoimmune phenomena as a prerequisite for GML. The splenic Treg reserve and the local recruitment of these cells in the gastric mucosa were investigated using complementary molecular and immunohistochemistry approaches. Higher Foxp3/CD3 ratios were found in the spleen of non-infected d3Tx mice compared to non-thymectomised (NTx) controls. These results indicate a relative enrichment of Tregs following thymectomy in adult mice. The absence of Treg depletion in d3Tx mice is in line with the absence of auto-immune gastritis in non-infected d3Tx mice. Higher levels of T cell and Treg infiltration were also found in the stomach of GML-developing d3Tx mice versus NTx mice. Surprisingly, inflammatory scores inversely correlated with the bacterial inoculum. The presence of a small Treg containing compartment among gastric biopsies of GML developing d3Tx mice may play a role in perseverance of a minimal bacterial numbers thereby maintaining an antigen-dependent stimulation and proliferation.

INTRODUCTION

A unique animal model, pioneered by a Japanese team, showed that murine autoimmune gastritis (AIG) spontaneously occurring in BALB/c mice subjected to thymectomy (Tx) 3 days after birth (d3Tx mice), predisposes these mice after *Helicobacter pylori* infection, to pathological changes similar to gastric MALT lymphoma (GML) [1] [2] [3]. We recently reproduced in the laboratory this mouse model [4]. A major difference with results from previous studies was the very low incidence of atrophic gastritis or overt inflammation in

non-infected d3Tx mice, contrary to the high incidence reported in the previous studies. We postulated that the low incidence of autoimmune gastritis may be related to the infection protected status of our mouse colony and/or differences in diet.

During prenatal and early postnatal life the thymus generates a pool of naive T cells and thus establishes a high degree of diversity in the TCR repertoire, while also playing an important role for the negative selection of potentially self-reactive T cells, which is crucial to avoid the development of autoimmunity [5]. Autoimmune diseases had been shown to develop in some mouse strains

when thymectomy is performed at 3 days of age (d3Tx). This could be related to insufficient T cell regulation after thymectomy, possibly by creating a defect in regulatory T (Treg) cells [6]. Thymectomy at 3 days after birth is indeed thought to be followed by a lack of regulatory T cells. It has been proposed that Tregs are exported from the thymus to the periphery after the third day postnatal [7]. This hypothesis is based on the observation that this surgery can lead to the development of organ-specific autoimmune disorders in mice, which are prevented by the early transfer of adult CD25⁺CD4⁺ T cells [7].

In contrast, Monteiro *et al.* found that presence of Treg containing compartment is not affected by neonatal thymectomy and does not lead to a susceptibility to d3Tx-induced autoimmune disease [8]. In fact, they showed that thymectomy-induced gastritis is not caused by the absence of Treg; instead the presence of “gastritogenic” T cell clones is responsible for susceptibility to disease. The expansion of such clones is favored by lymphopenic conditions and, in particular, the reduced Treg/effector T cell ratio that is insufficient to control gastritis development.

In humans, the innate immune response induced by *H. pylori* infection is not able to eliminate the pathogen [9]. An adaptive response follows, with the recruitment of B and T cells to the infection site. Most of these T cells are CD4⁺ T helper (Th) cells, polarized towards a Th1 phenotype under the influence of surrounding chemokines and cytokines. The Th1 lymphocytes produce proinflammatory cytokines against *H. pylori*, but the pathogen is able to manipulate the immune response and to persist chronically [10]. Tregs recruited to the gastric mucosa during the infection play an important role in this persistence and development of a chronic inflammation via the production of regulatory cytokines such as TGFβ and IL-10 [11]. This hypothesis is based on the fact that *H. pylori* is not able to colonize the gastric mucosa of IL10^{-/-} mice. The immune response is known to contribute to chronic gastritis, leading to the development of more serious diseases in some individuals [12] [13] [11].

It has been previously shown that human gastric MALT lymphoma biopsies are infiltrated by large numbers of Foxp3⁺ Tregs, which can exhibit a suppressive behaviour toward effector T cells and may be essential for optimal tumor B-cell proliferation [14].

This study utilised complementary molecular and immunohistochemistry approaches to investigate the effect of neonatal thymectomy on the Tregs repertoire using previously obtained samples from d3Tx mice, in order to determine whether thymectomy creates a deficit in this T cell subset thereby allowing the emergence of autoimmune phenomena as a prerequisite for GML. The presence of Tregs at the site of infection was also correlated with inflammatory response and bacterial inoculum.

RESULTS

Evaluation of total T cells (CD3ε+) and Tregs (Foxp3+) presence in spleens from non-infected mice

Relative expression levels of *Foxp3* and *CD3ε* in non-infected (NI) mice spleens were used to estimate the amount of Tregs within the T cell compartment. The results of qRT-PCR showed a significant deficit of *CD3ε* transcripts in d3Tx mice compared to NTx mice, without a noticeable difference in the quantity of *Foxp3* transcripts. These results suggest that d3Tx mice which were originally selected based on their lymphopenic stage (evaluated 4 weeks post thymectomy) prior to *H. pylori* infection [4], maintained a long-lasting state of lymphopenia. However, when considering relative ratios of *Foxp3/CD3ε* expression levels, a significant enrichment in Tregs within the total T cell compartment was apparent in d3Tx mice spleens in comparison to NTx mice spleens (Figure 1A). A semi-quantitative evaluation of Foxp3 and CD3ε positive cells by immunohistochemistry (IHC) on the corresponding spleens confirmed that Foxp3/CD3ε ratios were higher in d3Tx mice spleens (Figure 1B). In conclusion, GML emergence in d3Tx infected mice is not related to a Tregs deficit.

Evaluation of the lymphocytic infiltration in infected d3Tx mice stomachs

To verify the local Treg infiltration, an evaluation of relative expression levels of *Foxp3* and *CD3ε* was made for NI NTx and d3Tx mice ($n = 10$ for each model) and infected mice ($n = 39$ and $n = 29$, respectively) by qRT-PCR. A significant increase in the amount of *CD3ε* transcripts was found in both types of infected mice, with higher levels evident in d3Tx mice. This correlates with histological inflammatory scores described previously [4]. *Foxp3* relative expression levels were significantly higher in d3Tx infected mice only (Figure 2A). When *Foxp3* and *CD3ε* relative expression levels in d3Tx infected mice were stratified according to the inflammatory scores, they were statistically significant for mice with inflammatory scores higher than 1 (Figure 2B).

Detection of Foxp3, CD3ε and CD45R (B cell surface marker) was carried out by IHC in order to confirm the local presence of Tregs within gastric lymphoid infiltrates in d3Tx infected mice. An example of an IHC staining is presented in Figure 2C and shows a few infiltrating T cells, including a small number of Tregs, in a lymphoid infiltrate made of a majority of B cells in the stomach of an infected d3Tx mouse (Figure 2C). After semi quantification of the CD45R and CD3 IHC stainings in 11 d3Tx infected mice with the highest inflammatory scores (2 to 3 areas with lymphoid infiltrates were

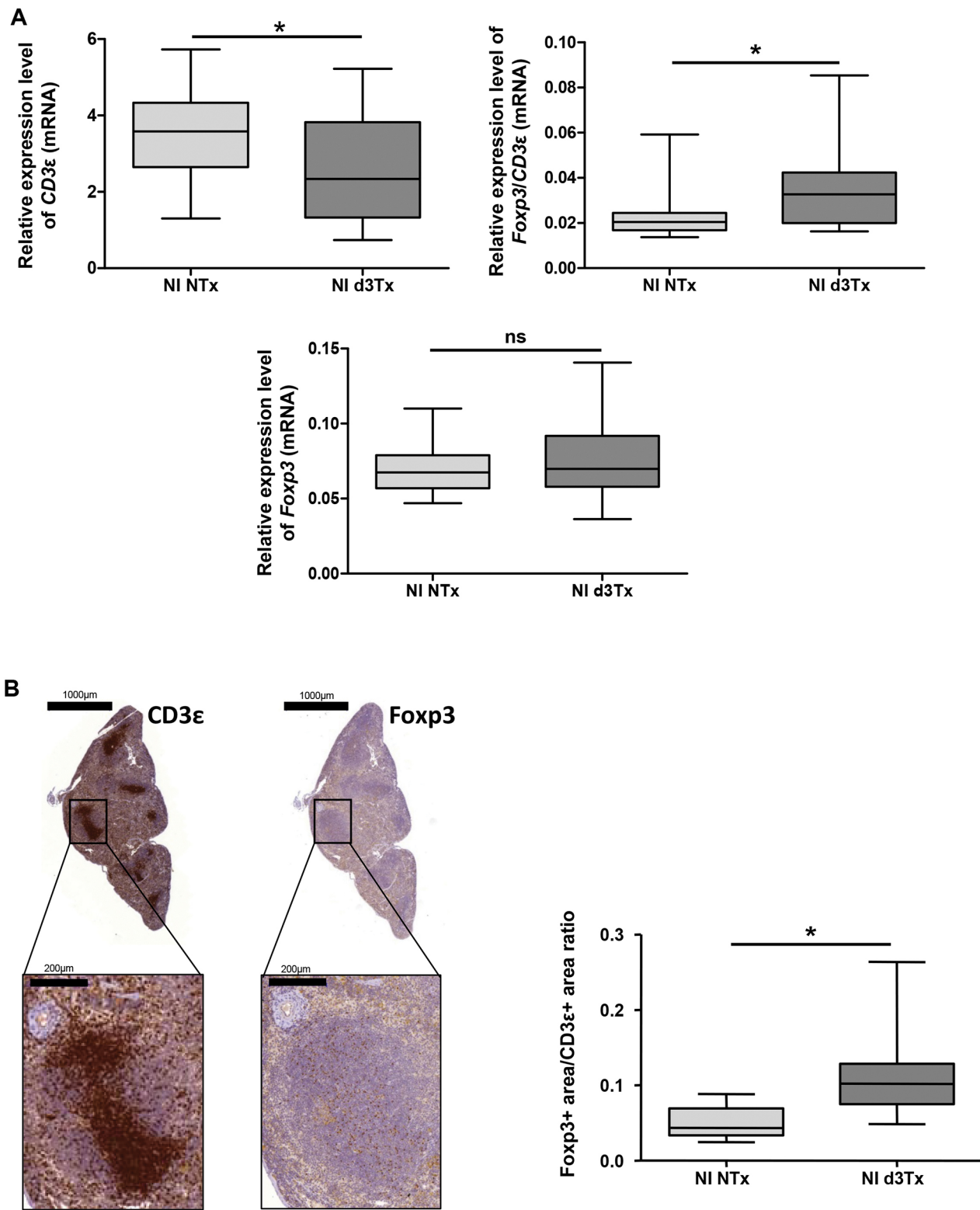


Figure 1: Evaluation of total T cells ($CD3\epsilon^+$) and Tregs ($Foxp3^+$) reserve in non-infected (NI) mice spleens. A. Relative expression levels of *Foxp3*, *CD3ε* and *Foxp3/CD3ε* ratio quantified by qRT-PCR in NI non-thymectomised (NTx) ($n = 10$) and NI thymectomised (d3Tx) ($n = 10$) mice spleens. **B.** *CD3ε* and *Foxp3* IHC stainings in one representative spleen from a NI d3Tx mice at 12 months post-infection. The quantification of these stainings, performed as described in the material and methods, on NI NTx ($n = 10$) and NI d3Tx ($n = 9$) mice spleens are represented as a *Foxp3/CD3ε* ratio. Graphic representations are box plots, with the box representing 50% of the values around the median (horizontal line) and the whiskers representing the minimum and maximum of all the data, $*p < 0.05$, ns = non significant.

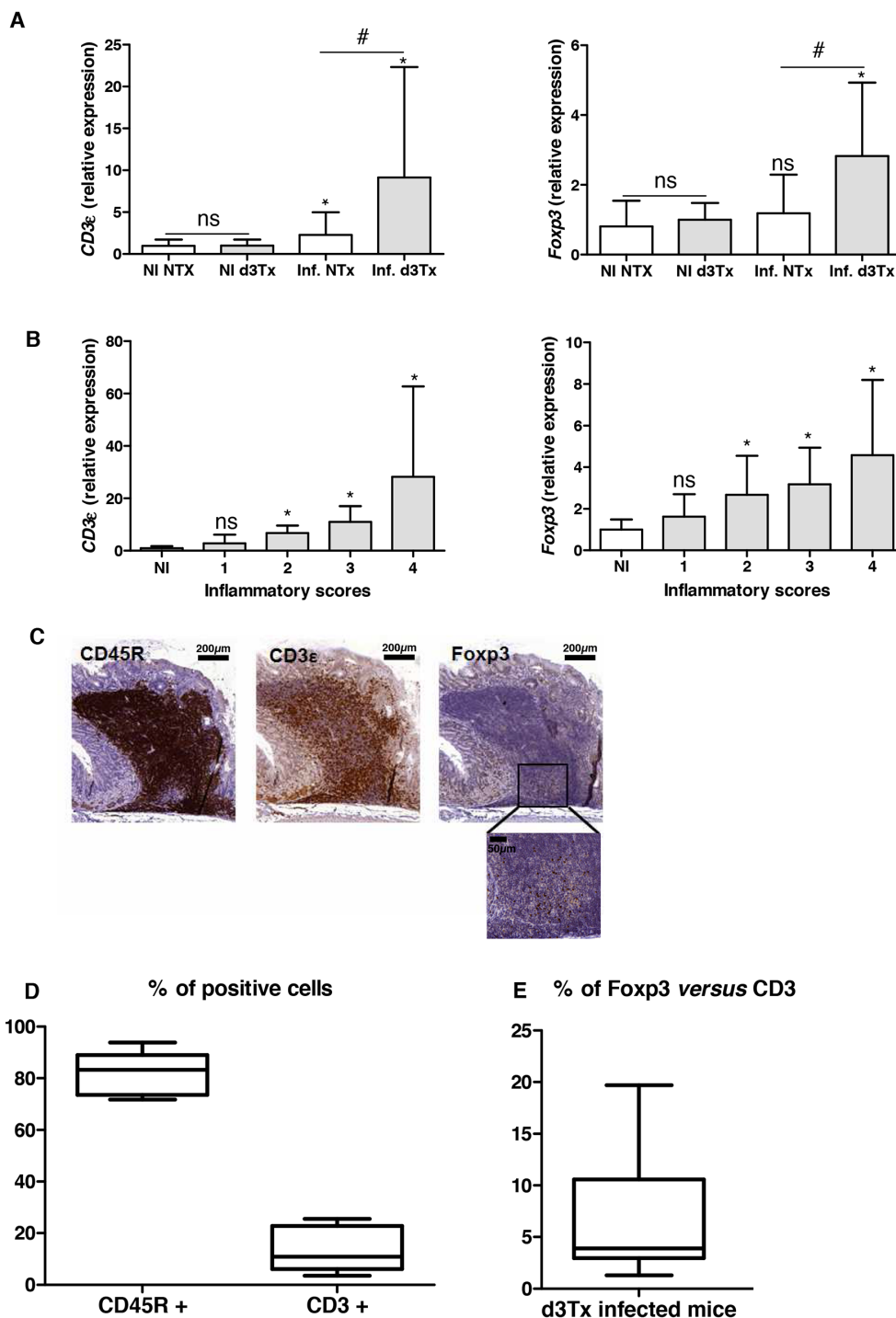


Figure 2: Evaluation of the lymphocytic infiltration in infected d3Tx mice stomachs. **A.** Relative expression levels of *Foxp3* and *CD3ε* quantified by qRT-PCR in NI d3Tx ($n = 10$) or NI NTx ($n = 8$) as well as infected d3Tx ($n = 29$) or infected NTx ($n = 39$) mice stomachs. **B.** Evolution of relative expression levels of *Foxp3* and *CD3ε* in d3Tx mice stomachs in comparison with inflammatory scores (NI, $n = 10$) (infected, $n = 8, 10, 8$ and 3 for scores $1, 2, 3$ and 4 , respectively). In A and B: Data are plotted as bar graphs displaying the mean \pm standard deviation. ns: non-significant; $*p < 0.05$ versus NI mice for each group of mice (NTx or d3Tx); $\#p < 0.05$ d3Tx compared to NTx. **C.** Example of B cells (CD45R+), T cells (CD3ε+) and Tregs (Foxp3+) after IHC staining on sections of a *H. pylori*-infected d3Tx mouse stomach (strain B47). Scale bars are indicated in μm . A higher magnification of Foxp3 IHC is shown (bar = $50 \mu\text{m}$). **D.** Semi-quantitative evaluation of CD45R and CD3ε stainings in leucocyte infiltrates in d3Tx infected mice ($n = 11$). **E.** Semi-quantitative evaluation of Foxp3 and CD3ε stainings in leucocyte infiltrates in d3Tx infected mice ($n = 11$). In D and E, the results are expressed as percentage calculated with the ratio of surface of positive cells/the total surface of selected area for each marker, analyzed with the software Mercator. Graphic representations are box plots, with the box representing 50% of values around the median (horizontal line) and the whiskers representing the minimum and maximum of all the data.

considered for each mouse), the proportion of B cells and T cells was around 82.5% ($\pm 8.1\%$), and 15.6 ($\pm 10.2\%$) (Figure 2D). Using Ki67 IHC staining, the percentage of proliferating cells among these infiltrates was around 7.6% ($\pm 4.4\%$) (data not shown). Using the same approach for semi quantification of the CD3 ϵ and Foxp3 IHC stainings in the same infected d3Tx mice, the proportion of Tregs was estimated to be approximately 6.9% of the total T cells (min 1.5, max 19.4%) (Figure 2E). The proportion of Tregs compared to B cells was found to be minimal (around 0.74% \pm 0.2%) (data not shown).

In conclusion, Tregs can be detected in gastric GML lesions in d3Tx *H. pylori*-infected mice.

Estimation of the bacterial load in gastric biopsies from infected mice

The comparison of bacteria-to-cell ratios between NTx and d3Tx mice groups had shown that the number of bacteria per cell was approximately ten times lower in d3Tx mice (average bacteria/cell = 0.037) than in NTx mice (average bacteria/cell = 0.35) ($*p < 0.05$)

(Figure 3A). The same phenomenon was observed when data were separated according to the 4 infecting bacterial strains described previously [4]. For each strain, bacteria/cell ratios were 7 to 20 times lower in d3Tx mice compared to NTx mice. Colonization levels were higher for B47 and SS1 strains in both models, whereas for B38 and TN2GF4 strains, the amount of bacteria per cell in the d3Tx model was close to the method's detection limit (Figure 3B). Interestingly, B47 and SS1 were previously identified as strains with a high potential to induce gastric lymphomagenesis in d3Tx BALB/c mice [4].

For the B47- and SS1-infected d3Tx model, bacteria/cell ratios decreased dramatically for mice in which inflammatory scores were higher than 1 (Figure 3C). At 6 months post-infection, there were no significant differences between the bacterial load in the infected NTx mice compared to NTx mice at 12 month post-infection. The ratio was, however, significantly higher in d3Tx mice (with low inflammation scores) [4] compared to d3Tx at 12 month post-infection at a GML stage (Figure S1). These results confirm the influence of the inflammation on the bacterial persistence.

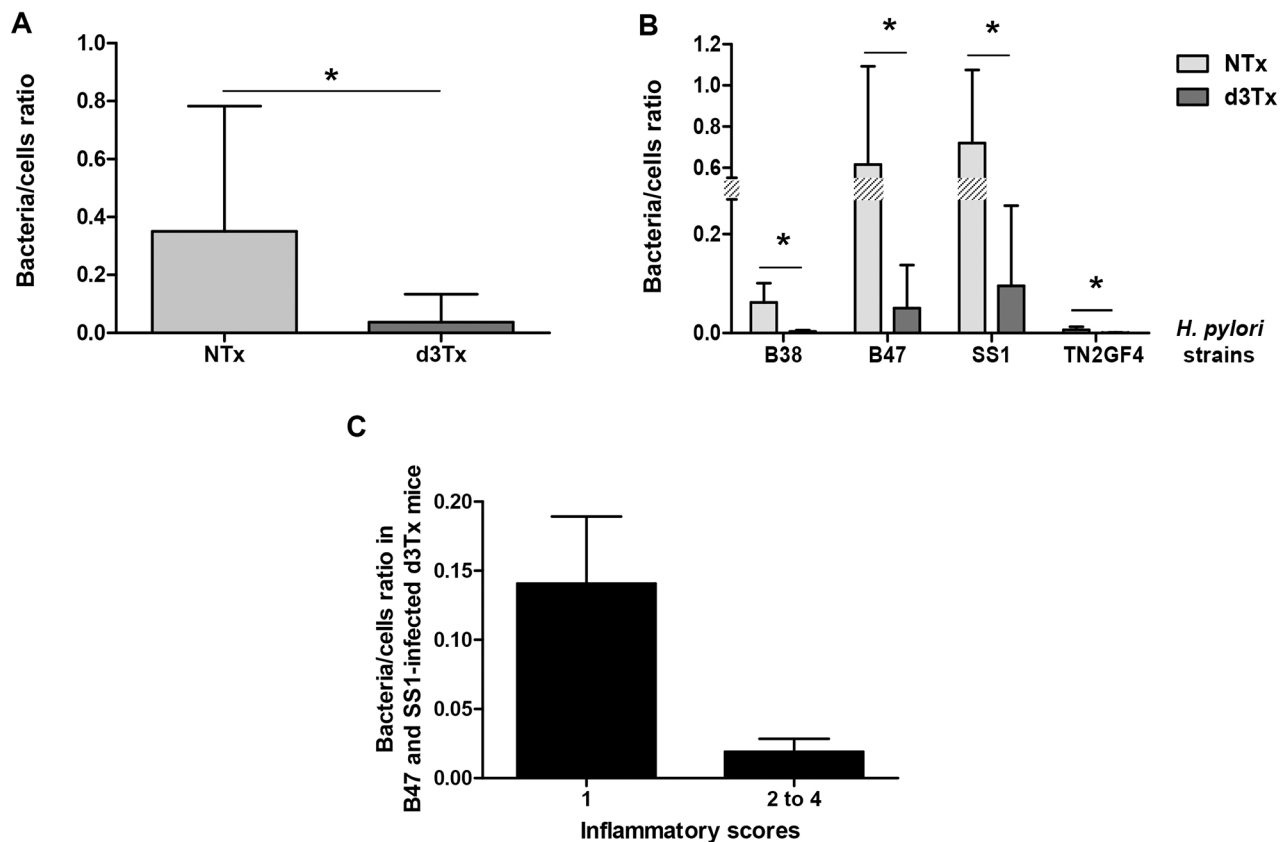


Figure 3: Quantification of the bacterial load in gastric biopsies from infected mice. Results obtained by quantitative PCR. **A.** Bacteria/murine cell ratio in NTx ($n = 40$) versus d3Tx ($n = 32$) mice stomachs. **B.** Bacteria/murine cell ratio in NTx ($n = 10$ for each bacterial strain) versus d3Tx ($n = 8$ for each bacterial strain) mice stomachs classified according to the infecting bacterial strain: B38, B47, SS1 and TN2GF4. **C.** Bacteria/murine cell ratio in B47- and SS1-infected d3Tx mice stomachs only, classified according to inflammation scores obtained for each mouse ($n = 3$ and 11 for scores of 1 and 2–4, respectively). Data are presented as bar graphs displaying the mean \pm standard deviation for each group, $*p < 0.05$.

DISCUSSION

This study showed that there was no deficit of Tregs in our d3Tx adult mice [4], which is consistent with previous studies conducted on mice 2 to 3 months post-surgery [15] [8]. We confirmed that neonatal thymectomy leads to an enrichment of Tregs within the pool of T cells [15]. These lymphocytes probably multiply from the T cell “library” exported out of the thymus before surgery, despite a poor T cell receptor diversity. Indeed, Monteiro *et al.* showed that neonatal Tregs proliferate extensively after thymectomy during the first week of life and they are maintained throughout adulthood [8].

In the case of infection induced chronic inflammation, Tregs may be involved in pathogen’s persistence [13] [16]. On one hand, Tregs are important in protecting the *H. pylori*-infected host against excessive gastric inflammation and disease symptoms; while on the other hand, they may promote bacterial colonization which may increase the risk in *H. pylori*-infected animals to develop GML.

We postulate that Tregs could play a role in the physiopathology in *H. pylori*-induced GML. The presence of Tregs in gastric samples of d3Tx mice developing GML, could be considered as a strategy to protect the gastric mucosa from exaggerated inflammation and tissue damage [17] [16]. It is possible to hypothesise that these Tregs are recruited or induced in the mouse stomachs in order to control inflammation. As shown in a GML murine model involving a *Helicobacter felis* infection, Tregs might be recruited by chemokines such as CCL17 and CCL22 [14], CCL20 and CXCL13 [18]. Concurrent study demonstrated that most of these factors are significantly overexpressed in d3Tx mice developing GML [19]. Interestingly, the administration of anti-CXCL13 antibody has been shown to be promising in patients where the lymphoma does not regress after standard antibiotic treatment [20].

Alternatively, soluble signals derived from tumor B cells, (whose nature is still unknown), may allow the conversion of naive CD4+ T cells into Foxp3+ induced Tregs, similar to that reported for *H. felis* [14]. Indeed, in addition to natural Tregs (nTreg) produced by thymus, peripherally induced Tregs (iTreg) can develop under chronic inflammatory conditions caused by infections or tumours [16]. Unfortunately it was not possible to obtain a suitable commercial antibody for IHC staining which recognizes murine Neuropilin-1, previously described as a suitable marker for distinction between nTregs and iTregs [21].

In a parallel study, neither PCR arrays nor protein arrays [19] showed any overexpression of regulatory cytokines such as IL-10 or TGF β , typically produced by Tregs. IL-10 is an important cytokine involved in reducing *H. pylori*-induced gastritis and is therefore a particularly important Treg effector at mucosal surfaces. It has also been shown that TGF β can induce Foxp3 expression in

naive T cells and stimulate differentiation into functional iTregs, if present during antigen presentation [16]. The absence of detectable IL-10 and TGF β transcripts in this study could be explained by the very low level of Treg infiltration in the stomachs in comparison to the amount of CD4+ T cells producing pro-inflammatory cytokines. Previous studies showed that Tregs from d3Tx animals have normal suppressive properties both *in vitro* and *in vivo* [15] [8]. Therefore the local cytokine environment may have important influence. In particular, it has been shown that the presence of Th2 cytokines (which are upregulated in our model) [19] can inhibit the induction of Foxp3 and thus impair the generation of inducible Treg cells [22]. As for the anti-CXCL13 strategy [20], *in vivo* cytokine blocking experiments, for example anti-IL-4 or anti-IL-10, could be evaluated in this model.

The presence of Tregs could also be considered, as already suggested by others [14], as promoters of the B cell proliferation, either by directly stimulating B cells or suppressing T cells. Indeed, it was shown that CD4+ or CD25+ cell depletion *in vivo* induced a regression of the GML in mice, demonstrating that T helper cells are necessary for efficient induction of malignant B cell proliferation *in vitro* bringing into play CD40L in particular and in a suitable cytokine environment [14] as it was identified in our GML mice [19]. However, in our d3Tx mice, the proportion proliferating cells was low and moreover the proportion of Tregs compared to B cells was found to be minimal. Therefore the role of Tregs as promoters of the B cell proliferation may be of less importance in our GML model.

Interestingly, Tregs may also participate in *H. pylori* persistence in chronic inflammation of gastric mucosa. It was previously shown in C57BL/6 mice infected with *Leishmania major* that Tregs inhibited the immune response resulting in the persistence of the pathogen in a dormant state [23]. The results of this study indicate a potential role for Tregs in persistence of a minimal level of colonization allowing the antigenic stimulation process mandatory for B cell proliferation. Indeed, higher Foxp3/CD4 cell ratios and the absolute number of Foxp3 cells in GML were previously found to be significantly higher in *H. pylori* eradication responders compared to non-responders, suggesting that Tregs have a function in regression mechanisms of MALT lymphoma [24] [25].

In summary, although neonatal thymectomy in BALB/c mice may lead to the emergence of GML induced by *H. pylori* infection, it cannot be linked to a global deficit in the Treg reserve. Tregs were detected among lymphoid follicles that form in the gastric mucosa of *H. pylori*-infected d3Tx mice suggesting that they may be induced directly in the stomach mucosa or they may be actively recruited. These cells may act on local T responses being induced in the lymphoid follicles. Local Tregs could also be of major importance for perseverance of a minimal bacterial persistence, thereby maintaining

an antigen-dependent disease that could regress after antimicrobial eradication. Tregs depletion by injecting CD25 antibody or the use of DEpletion of REGulatory T cells (DEREG) mice [26] would be useful in the future to assess more precisely the effect on the bacterial load and development of GML in the d3Tx mice.

MATERIALS AND METHODS

RNA extraction

RNA from paraffin-embedded spleens of 12-months non-infected (NI) mice were extracted using AllPrep DNA/RNA FFPE Qiagen kit (Qiagen, Courtaboeuf, France): 10 RNAs from NI NTx and d3Tx mice. Gastric RNAs were extracted from gastric biopsies using DNA/RNA/miRNA Universal Qiagen kit (Qiagen): 50 and 40 RNA samples extracted from NTx (10 NI and 40 infected mice) and d3Tx mice (8 NI and 32 infected mice) respectively.

Pre-amplification of splenic RNA samples

A pre-amplification step of *Foxp3* (forkhead box P3, Treg marker) and *CD3ε* (CD3 epsilon chain, T cell marker) along with a housekeeping gene (HKG) (beta-glucuronidase (*Gusb*)) was carried out with the RT² PreAMP cDNA Synthesis kit (Qiagen). 250 ng of RNA were used for each sample. First, a genomic DNA elimination step was performed, followed by reverse transcription of RNA into complementary DNA (cDNA) according to the manufacturer's instructions. With *Foxp3* (PPM05497F), *CD3ε* (PPM04598A) and the HKG *Gusb* (PPM05490C) primers (RT² qPCR Primer Assay, Qiagen), a PCR was performed in order to amplify these targets, according to the manufacturer's instructions. PCR conditions were as follows: a 95°C DNA denaturation step for 10 minutes followed by 8 amplification cycles of 2 steps, a 95°C denaturation step for 15 seconds and a 60°C primers' hybridization step for 2 minutes. The cDNA samples obtained were then stored at -80°C.

Gastric RNA sample reverse transcription

The Primescript™ RT Reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) (Takara, Saint-Germain-en-Laye, France) was used for reverse transcription of all purified RNA samples (750 ng) was performed according to the manufacturer's instructions

Quantitative real-time (RT)-PCR

Primers used: Primers targeting *Foxp3*, *CD3ε* and *Gusb* (same as above) were used to assess the relative expression levels of *Foxp3* and *CD3ε* genes in comparison to the HKG *Gusb* in stomachs of both mice groups (NTx and d3Tx) and spleens of NI mice groups.

The amplification conditions were as follows: SYBR® Premix Ex Taq™ Mix (Tli RNaseH Plus) (Takara) was used for all qRT-PCRs. Experiments concerning the expression of *Foxp3*, *CD3ε* and *Gusb* in spleens and stomachs were carried out in 96-well plates (Bio-Rad, Marnes la Coquette, France) with 1 µl of pure cDNA in a final volume of 25 µl according to the manufacturer's instructions. Each target was tested in triplicate on each sample. PCRs were performed in real-time PCR thermocycler CFX96™ (Bio-Rad) at the TBM-Core real-time PCR platform (University of Bordeaux).

Concerning the relative quantification of the targets' expression, cycle threshold (Ct) values above 35 were considered as non-specific and therefore not considered for the analysis. For each sample, Ct values obtained for each gene of interest were normalised in relation to the average Ct value obtained for each HKG ($\Delta Ct = Ct_{\text{gene of interest}} - Ct_{\text{HKG}}$). The $2^{-\Delta Ct}$ value was then calculated, to express the results as relative expression levels of genes of interest.

Relative expression levels of each target gene for the d3Tx mice group were also correlated with the histological scoring previously obtained [4].

CD45R, Ki67, Foxp3 and CD3ε immunohistochemistry (IHC)

Sections (3 µm thick) from stomachs of infected d3Tx mice and NTx mice and 20 spleens of NI d3Tx and NTx mice (10 in each group) were prepared, put on glass slides and deparaffined then rehydrated. Antigenic sites were uncovered with Tris EDTA (pH 9 for CD45R, Foxp3 and CD3ε IHC or pH6 for Ki67 IHC), 30 min at 100°C and then 30 min at room temperature. Three percent hydrogen peroxide (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) was used to inactivate endogenous peroxidases. Rabbit anti-murine Foxp3 (1/1500, ab54501, Abcam, Paris, France) and goat anti-murine CD3ε (1/1000, M-20 clone, CliniSciences, Nanterre, France) polyclonal primary antibodies, along with rat anti-murine CD45R monoclonal primary antibody (1/100, RA3-6B2 clone, Santa Cruz, CA, USA) were used for detection of Tregs, T and B cells, respectively. Rat anti-murine Ki67 antibody (1/5, clone 16A8, BioLegend, San Diego, CA, USA) was used for detection of proliferating cells. After a hour long incubation, anti-rabbit (EnVision®+System-HRP (DAKO, Copenhagen, Denmark)), anti-goat (Immpress Goat Ig (MP 7405, Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA)) and anti-rat (Immpress Rat (MP7444, Vector Laboratories)) secondary antibodies were used to bind primary antibodies previously listed. Liquid DAB+ Substrate Chromogen (DAKO) reagent allowed the revelation of those secondary antibodies. Slides were then counterstained with hemalun (VWR International, Fontenay sous Bois, France), dehydrated and fixed with Eukitt medium (VWR). These slides were then scanned

with the MIRAX SCAN (3DHISTECH Ltd, Budapest, Hungary) scanner, and images were read with Panoramic Viewer (3DHISTECH Ltd) software. A semi-quantitative evaluation of the stainings in leucocyte infiltrates was carried out with Mercator (Explora Nova, La Rochelle, France) software. Slide scanning and semi-quantitative evaluation of stainings were performed at the histology platform of our University.

Quantitative PCR to determine of the bacterial load in gastric biopsies

A quantitative PCR using Fluorescence Resonance Energy Transfer technology targeting DNA coding for *H. pylori* 23S ribosomal RNA (rRNA) previously developed in the laboratory [27] was adapted to our project. Primers described by Oleastro *et al.* were used to amplify the 23S rRNA gene [27] and primers amplifying the *GAPDH* (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) gene were designed for the present study (mGapdh1-F: CTGCAGGTTCTCCACACCTATG; mGapdh1-R: GAA TTTGCCGTGAGTGGAGTC). Every target was tested in duplicate on all samples.

A standard curve was prepared using serial dilutions of a DNA extract from a CFU/mL calibrated bacterial suspension of the *H. pylori* SS1 strain and another from a DNA extract of the m-ICcl2 murine epithelial cell line available in the laboratory. The LightCycler® 480 SYBR® Green I Master Mix (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland), compatible with the LightCycler® 480 (Roche Diagnostics) thermocycler was used according to the manufacturer's instructions. The PCR started with a 95°C DNA denaturation step during 10 min, followed by 45 cycles comprised of 3 steps: a 95°C denaturation step for 10 sec, a 60°C primers' hybridization step for 10 sec and a 72°C elongation step for 15 sec. The final results were expressed as a ratio of bacteria/murine cells. The method's detection limit was around 0.001 bacteria/cell.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed with GraphPad Prism 5.01 (GraphPad Software, Inc, La Jolla, CA, USA). Means were compared by the nonparametric Mann-Whitney test. Differences were considered significant when p was inferior to 0.05 ($*p < 0.05$).

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Lindsay Megraud for English revision of the manuscript and Xavier Gauthereau from the TBM-Core real-time PCR platform (University of Bordeaux). Alban Giese and the Experimental Histology unit were funded by the Cancéropôle Grand Sud Ouest.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors disclose no conflicts of interest.

REFERENCES

1. Oshima C, Okazaki K, Matsushima Y, Sawada M, Chiba T, Takahashi K, Hiai H, Katakai T, Kasakura S and Masuda T. Induction of follicular gastritis following postthymectomy autoimmune gastritis in *Helicobacter pylori*-infected BALB/c mice. *Infect Immun.* 2000; 68:100–106.
2. Uchida K, Okazaki K, Debrecceni A, Nishi T, Iwano H, Inai M, Uose S, Nakase H, Ohana M, Oshima C, Matsushima Y, Kawanami C, Hiai H, Masuda T and Chiba T. Analysis of cytokines in the early development of gastric secondary lymphoid follicles in *Helicobacter pylori*-infected BALB/c mice with neonatal thymectomy. *Infect Immun.* 2001; 69:6749–6754.
3. Fukui T, Okazaki K, Tamaki H, Kawasaki K, Matsuura M, Asada M, Nishi T, Uchida K, Iwano M, Ohana M, Hiai H and Chiba T. Immunogenetic analysis of gastric MALT lymphoma-like lesions induced by *Helicobacter pylori* infection in neonatally thymectomized mice. *Lab Invest.* 2004; 84:485–492.
4. Chrisment D, Dubus P, Chambonnier L, Hoces de la Guardia A, Sifre E, Giese A, Capone M, Khairallah C, Costet P, Rousseau B, Hubert C, Burlen-Defranoux O, Varon C, Bandeira A, Megraud F and Lehours P. Neonatal Thymectomy Favors *Helicobacter pylori*-Promoted Gastric Mucosa-Associated Lymphoid Tissue Lymphoma Lesions in BALB/c Mice. *Am J Pathol.* 2014; 184:2174–2184.
5. Sauce D and Appay V. Altered thymic activity in early life: how does it affect the immune system in young adults? *Curr Opin Immunol.* 2011; 23:543–548.
6. Gagnerault MC, Lanvin O, Pasquier V, Garcia C, Damotte D, Lucas B and Lepault F. Autoimmunity during thymectomy-induced lymphopenia: role of thymus ablation and initial effector T cell activation timing in nonobese diabetic mice. *J Immunol.* 2009; 183:4913–4920.
7. Asano M, Toda M, Sakaguchi N and Sakaguchi S. Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation. *J Exp Med.* 1996; 184:387–396.
8. Monteiro JP, Farache J, Mercadante AC, Mignaco JA, Bonamino M and Bonomo A. Pathogenic effector T cell enrichment overcomes regulatory T cell control and generates autoimmune gastritis. *J Immunol.* 2008; 181:5895–5903.
9. Salama NR, Hartung ML and Muller A. Life in the human stomach: persistence strategies of the bacterial pathogen *Helicobacter pylori*. *Nat Rev Microbiol.* 2013; 11:385–399.
10. Robinson K, Argent RH and Atherton JC. The inflammatory and immune response to *Helicobacter pylori* infection. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2007; 21:237–259.

11. O’Keeffe J and Moran AP. Conventional, regulatory, and unconventional T cells in the immunologic response to *Helicobacter pylori*. *Helicobacter*. 2008; 13:1–19.
12. D’Elios MM, Amedei A and Del Prete G. *Helicobacter pylori* antigen-specific T-cell responses at gastric level in chronic gastritis, peptic ulcer, gastric cancer and low-grade mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma. *Microbes Infect*. 2003; 5:723–730.
13. Kusters JG, van Vliet AH and Kuipers EJ. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Clin Microbiol Rev*. 2006; 19:449–490.
14. Craig VJ, Cogliatti SB, Arnold I, Gerke C, Balandat JE, Wundisch T and Muller A. B-cell receptor signaling and CD40 ligand-independent T cell help cooperate in *Helicobacter*-induced MALT lymphomagenesis. *Leukemia*. 2010; 24:1186–1196.
15. Dujardin HC, Burlen-Defranoux O, Boucontet L, Vieira P, Cumano A and Bandeira A. Regulatory potential and control of Foxp3 expression in newborn CD4+ T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004; 101:14473–14478.
16. Raghavan S and Quiding-Jarbrink M. Immune modulation by regulatory T cells in *Helicobacter pylori*-associated diseases. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. 2012; 12:71–85.
17. Raghavan S and Holmgren J. CD4+CD25+ suppressor T cells regulate pathogen induced inflammation and disease. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2005; 44:121–127.
18. Cook KW, Letley DP, Ingram RJ, Staples E, Skjoldmose H, Atherton JC and Robinson K. CCL20/CCR6-mediated migration of regulatory T cells to the *Helicobacter pylori*-infected human gastric mucosa. *Gut*. 2014; 63:1550–1559.
19. Floch P, Laur AM, Korolik V, Chrisment D, Cappellen D, Idrissi Y, Dubus P, Megraud F and Lehours P. Characterisation of inflammatory processes in *Helicobacter pylori*-induced gastric lymphomagenesis in a mouse model. *Oncotarget*. 2015.
20. Yamamoto K, Nishiumi S, Yang L, Klimatcheva E, Pandina T, Takahashi S, Matsui H, Nakamura M, Zauderer M, Yoshida M and Azuma T. Anti-CXCL13 antibody can inhibit the formation of gastric lymphoid follicles induced by *Helicobacter infection*. *Mucosal Immunol*. 2014; 7:1244–1254.
21. Singh K, Hjort M, Thorvaldson L and Sandler S. Concomitant analysis of Helios and Neuropilin-1 as a marker to detect thymic derived regulatory T cells in naive mice. *Sci Rep*. 2015; 5:7767.
22. Mantel PY, Kuipers H, Boyman O, Rhyner C, Ouaked N, Ruckert B, Karagiannidis C, Lambrecht BN, Hendriks RW, Cramer R, Akdis CA, Blaser K and Schmidt-Weber CB. GATA3-driven Th2 responses inhibit TGF-beta1-induced FOXP3 expression and the formation of regulatory T cells. *PLoS Biol*. 2007; 5:e329.
23. Belkaid Y, Piccirillo CA, Mendez S, Shevach EM and Sacks DL. CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. *Nature*. 2002; 420:502–507.
24. Garcia M, Bellosillo B, Sanchez-Gonzalez B, Garcia-Payarols F, Seoane A, Ferrer AM, Gimeno E, Barranco LE, Torner A, Sole F, Besses C, Serrano S and Salar A. Study of regulatory T-cells in patients with gastric malt lymphoma: influence on treatment response and outcome. *PLoS One*. 2012; 7:e51681.
25. Iwaya Y, Kobayashi M, Momose M, Hiraoka N, Sakai Y, Akamatsu T, Tanaka E, Ohtani H, Fukuda M and Nakayama J. High levels of FOXP3(+) regulatory T cells in gastric MALT lymphoma predict responsiveness to *Helicobacter pylori* eradication. *Helicobacter*. 2013; 18:356–362.
26. Lahl K and Sparwasser T. *In vivo* depletion of FoxP3+ Tregs using the DEREK mouse model. *Methods Mol Biol*. 2011; 707:157–172.
27. Oleastro M, Ménard A, Santos A, Lamouliatte H, Monteiro L, Barthelemy P and Mégraud F. Real-time PCR assay for rapid and accurate detection of point mutations conferring resistance to clarithromycin in *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol*. 2003; 41:397–402.

Article n°3

Deregulation of microRNAs in a mouse model of *Helicobacter pylori*-associated gastric lymphomagenesis.

Pauline Floch*, Caroline Capdevielle*, Cathy Staedel, Julien Izotte, Elodie Sifré, Amandine Marine Laur, Alban Giese, Pierre Dubus, Francis Mégraud, Philippe Lehours. (*co-premiers auteurs)

À soumettre

Généralités sur les microARNs

I. Définition

Découverts il y a une vingtaine d'années, les microARNs (miARNs) reçoivent à ce jour une considérable attention par leur implication dans le développement, la prolifération et la différenciation cellulaire ainsi que dans la régulation de la réponse immunitaire. Les miARNs sont des petits ARN non codants de 18 à 24 nucléotides de long qui régulent l'expression des gènes au niveau post-transcriptionnel. Leur rôle est d'inhiber les ARN messagers (ARNm) par hybridation (« *silencing* ») et éventuellement dégradation de ces derniers.

Des analyses bio-informatiques prédisent la présence de plus de 1000 miARNs codés par le génome humain. Ces miARNs cibleraient approximativement 60% des gènes codant pour des protéines (388), chaque miARN pouvant cibler des centaines de gènes cibles. Des analyses fonctionnelles indiquent que ces petits ARNs participent à la régulation de quasiment tous les processus cellulaires, toute altération dans leur niveau d'expression est associée à des pathologies (201).

Les séquences codant pour les miARNs sont dispersées dans tout le génome et peuvent être retrouvées au niveau des introns, de promoteurs indépendants, voir des exons (Figure 20) (472). Certains gènes codant pour des miARNs peuvent être organisés en « *clusters* » génomiques.

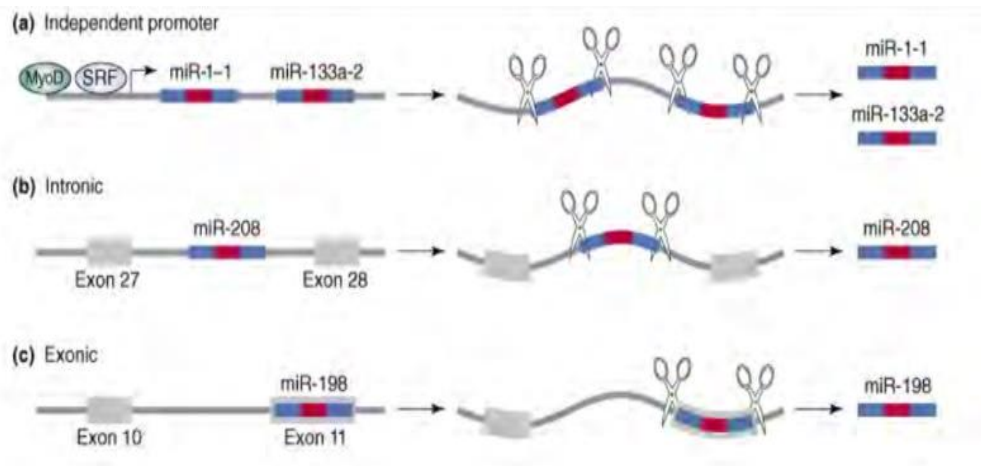


Figure 20 : Organisation génomique des microARNs. La transcription se fait à partir d'un promoteur indépendant, d'introns ou d'exons. D'après Zhao *et al.* (472)

Les miARNs sont transcrits par la polymérase II le plus souvent ou dans de rare cas par la polymérase III (Figure 21). Un transcrite primaire nommé pri-miARN est ainsi obtenu et va ensuite être coupé par le complexe MiPC (*Nuclear Microprocessor Complex*) pour former un fragment en

tige boucle de 70 nucléotides (pré-miARN). Ce complexe est composé d'une RNase de type III appelée Drosha qui va cliver le pri-miARN à l'aide de DGCR8 (*Di George Critical Region 8*). Ce dernier possède un domaine de liaison à l'ARN et il permet ainsi de stabiliser l'activité de Drosha. L'exportine 5, un récepteur d'export nucléaire, exporte ce pré-miARN du noyau vers le cytoplasme et celui-ci est clivé en miARN de 18-24bp par un complexe comprenant en particulier une autre RNase de type III appelée Dicer. Un duplex de miARNs est pris en charge par le complexe RISC (*RNA induced silencing complex*). Il est composé d'une protéine de la famille des argonautes, possédant une activité endoribonucléase et d'une hélicase permettant de dissocier le duplex de miARNs. La sélection d'un brin de miARN par RISC permet la liaison à un ARNm cible au niveau du 3' UTR. Par cet attachement, le miARN inhibe la traduction ou dégrade l'ARNm cible suivant la complémentarité des brins. Lors de l'hybridation complète du miARN sur sa cible, le brin d'ARNm est déadénylé puis dégradé. En revanche, lorsque le miARN est partiellement complémentaire à sa cible, la traduction du brin d'ARNm est inhibée sans dégradation de l'ARNm cible. Le brin du miARN qui n'a pas été sélectionné est alors dégradé (388). Chez les mammifères il semblerait que la dégradation des ARNm cibles soit moins fréquente que l'inhibition de traduction des ARNm. En effet, la majorité des miARNs affecte le niveau d'expression protéique sans pour autant diminuer le niveau d'ARNm (39).

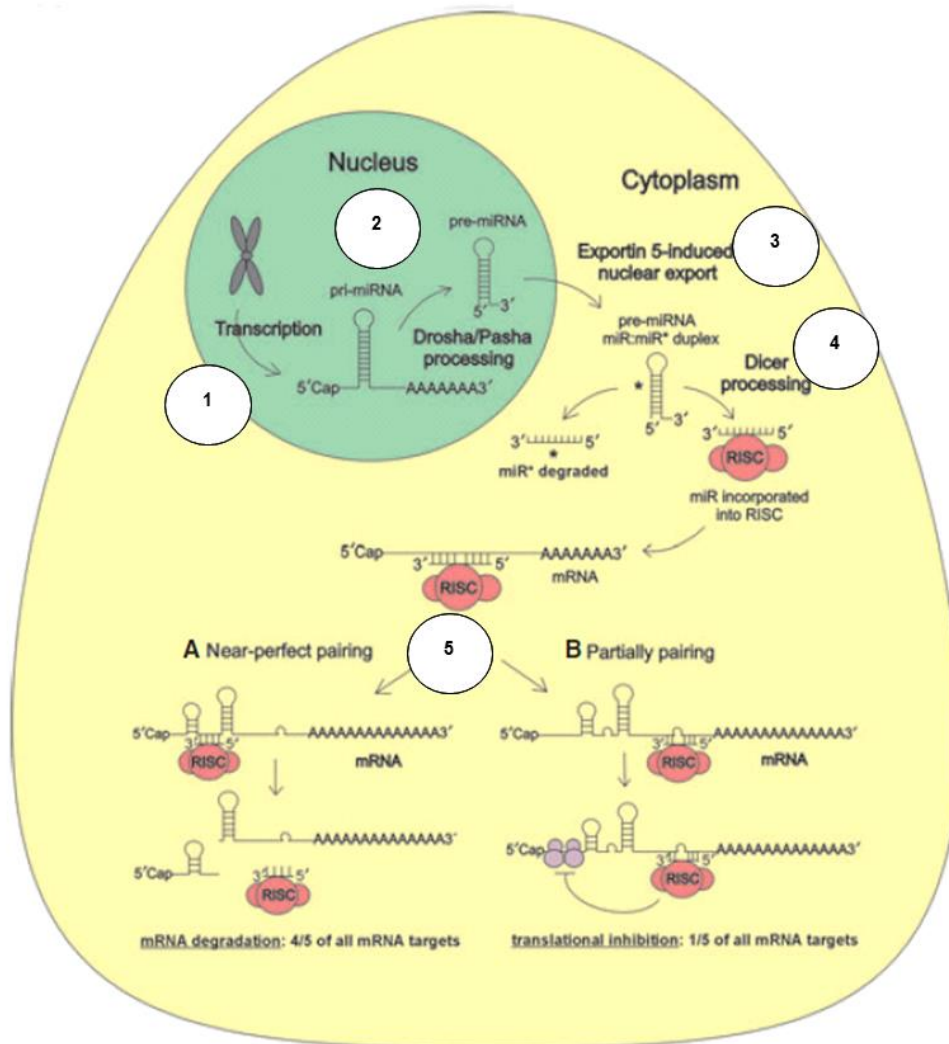


Figure 21 : Formation des microARNs et mécanismes d'action. D'après Tomankova T. *et al.* (408)

(1) Transcription par polymérase II en pri-miARN ; (2) Clivage en pré-miARN par Drosha et DGCR8 ; (3) Export dans le cytoplasme par l'exportine 5 ; (4) Clivage en miARNs par Dicer ; (5) Prise en charge d'un brin par RISC et inhibition et/ou dégradation de l'ARNm cible.

Il existerait également d'autres voies de formation des miARNs, notamment pour les miARNs introniques ou « mirtrons » où le « spliceosome » intervient pour la formation du pré-miARN (350).

II. MicroARNs et inflammation

Les miARNs ont un rôle important dans la réponse de l'hôte vis-à-vis d'un pathogène. Ils permettent le maintien de l'homéostasie ainsi que le contrôle cellulaire en réponse à un stimulus extérieur. Plusieurs miARNs ont déjà été décrits comme importants pour la régulation de facteurs impliqués

dans l'immunité. Par exemple, miR-146 est augmenté lors d'infections à certaines bactéries, *H. pylori* compris (388). Son expression est dépendante de la reconnaissance de motifs bactériens par les TLR. Ainsi, NFκB est activé et va permettre l'expression de miR-146. Son rôle dans le système immunitaire est de réguler négativement des facteurs précis de la cascade de signalisation de la voie de NFκB (notamment TRAF6 et IRAK1) (388). miR-146 agit donc en diminuant la réponse inflammatoire afin d'éviter une activation trop excessive. miR-146 a aussi un rôle dans la maintenance de la tolérance. Les macrophages sont plus tolérants aux stimuli bactériens grâce à l'expression de miR-146 qui diminue MyD88, un acteur de la voie de NFκB. L'hôte évite ainsi un choc septique par une diminution de l'activité de NFκB et de la production de TNF-α (388).

Un autre miARN a également un rôle très important : miR-155 est en effet induit par des composés bactériens (LPS) mais aussi viraux contrairement à miR-146. Son rôle est similaire à miR-146 en agissant comme un régulateur négatif de la réponse immune après infection mais ses cibles cellulaires sont différentes. Des composants de la cascade de signalisation des TLR tels que FADD (*Fas-Associated protein with Death Domain*) ou TAB2 (*TAK1 binding protein 2*), ont été identifiés comme des cibles directes de miR-155. L'augmentation de l'expression de miR-155 et miR-146 a notamment été décrite en parallèle de la production de cytokines pro-inflammatoires dans un modèle de co-culture de *H. pylori* avec des cellules dendritiques (165). Ils y contrôlent notamment la production de TNFα et d'IL-10.

D'autres miARNs peuvent être réprimés pendant la réponse immunitaire. Par exemple miR-125b est réprimé suite à la stimulation de macrophages par du LPS bactérien ce qui conduit à l'induction du TNFα, cytokine pro-inflammatoire.

III. MicroARNs et cancer

Il a été décrit que les miARNs agissent sur la prolifération, la différenciation et l'apoptose cellulaire. Il existe des miARNs clairement associés à certains cancers et qui agissent comme des oncogènes ou comme des suppresseurs de tumeurs. En effet, certains miARNs contrôlent l'expression d'oncogènes et leur répression peut donc conduire à leur surexpression. Au contraire, d'autres miARNs peuvent inhiber l'expression de gènes suppresseurs de tumeurs et favoriser la carcinogénèse, on les appelle des oncomiRs. L'association entre miARNs et cancers a été identifiée pour la première fois dans la leucémie lymphoïde chronique (LLC). La diminution du cluster suppresseur de tumeur, miR-15 et miR-16, cible notamment la protéine anti-apoptotique Bcl2, en lien avec la LLC. (44) (465). Les cellules de l'immunité ne sont pas les seules capables de produire des miARNs. Les cellules épithéliales sont la première ligne de défense contre les pathogènes et sont aussi capables de produire des miARNs (388). A ce jour, les miARNs ont été associés à d'autres types de cancer comme par

exemple le myélome multiple où l'augmentation de miR-21 bloque l'apoptose (321) ou bien la diminution de let-7 dans les cancers du poumon, du colon ou des ovaires (366). Un dernier exemple est la diminution de miR-145 dans la leucémie à cellules T adultes (451).

IV. MicroARNs, *H. pylori* et lymphome gastrique du MALT

miR-21 est le premier miARN décrit comme influencé par l'infection à *H. pylori* (471). Une augmentation de son expression a été observée lors de l'infection par cette bactérie et dans l'adénocarcinome gastrique. Ce miARN a un rôle important dans la régulation de la réponse inflammatoire (380) et est augmenté dans de nombreux cancers tels que les cancers hépatocellulaires mais aussi dans des lymphomes (lymphome diffus à grandes cellules B, lymphome folliculaire...) (220) (279).

Plusieurs équipes ont cherché à caractériser le profil d'expression des miARNs dans la gastrite à *H. pylori* ou dans l'adénocarcinome gastrique permettant de révéler quelques miARNs mais également de nombreuses discordances. La variabilité des résultats montre qu'il est difficile d'établir un profil unique pour une situation donnée. Matshushima *et al.* ont caractérisé l'expression des miARNs dans les estomacs de patients infectés par *H. pylori* versus des témoins non-infectés (250). Ils ont montré une augmentation d'expression de miR-223 et une diminution de 7 autres miARNs. Ce miARN, produit par les macrophages, aurait un rôle anti-inflammatoire afin de contrôler la réponse à *H. pylori* (436). D'autres miARNs sont impliqués dans la régulation de l'inflammation suite à l'infection, comme miR-155 (458), ou encore miR-200 (180). Les miARNs induits par l'infection à *H. pylori* peuvent d'une part activer la réponse inflammatoire et d'autre part la contrôler négativement afin de permettre la persistance de la bactérie.

Concernant la lymphomagénèse gastrique, miR-142a et miR-155 ont été décrits comme étant des marqueurs potentiels du LGM. À partir de biopsies gastriques de patients atteints de LGM, une augmentation de l'expression de ces deux miARNs par rapport à des biopsies saines a été identifiée. Ceci a été validé dans un modèle animal utilisant la souris C57BL/6 infectée par *H. heilmanii*. La cible moléculaire de ces deux miARNs est le gène codant pour la *Tumor Protein P53 Inducible Nuclear Protein 1* (TP53IN1) qui est une protéine pro apoptotique. Son inhibition par les miARNs inhiberait l'apoptose et ainsi permettrait l'accélération de la prolifération des lymphocytes B dans le LGM (358). Une augmentation d'expression de l'un de ces microARNs serait associée à une moins bonne réponse au traitement d'éradication (358).

V. Objectifs de l'étude et principaux résultats

Nous nous sommes intéressés à la caractérisation des miARNs dérégulés au stade de LGM, en utilisant le matériel d'études des souris d3Tx. Par PCR array, et qPCR, nous avons identifié 5 miARNs (miR-21a, miR-135b, miR-142a, miR-150, miR-155) surexprimés au sein des estomacs des souris au stade LGM. Seul miR-142a était surexprimé également au niveau sérique. miR-135b, miR-142a, miR-150 et miR-155 ciblent tous potentiellement l'ARNm de TP53INP1 qui est une protéine pro-apoptotique. Nous avons vérifié par western blot l'extinction de l'expression de cette protéine à partir de protéines extraites de souris d3Tx au stade LGM, validant ainsi en modèle murin, la mécanistique anti-apoptotique de ces miRs dans la lymphomagenèse gastrique.

Ces données sont présentées sous la forme d'un projet d'article.

1 **Deregulation of microRNAs in a mouse model of *Helicobacter pylori*-associated gastric**
2 **lymphomagenesis.**

3

4 Pauline Floch^{1§}, Caroline Capdevielle^{1§}, Cathy Staedel², Julien Izotte¹, Elodie Sifré¹,
5 Amandine Marine Laur¹, Alban Giese¹, Pierre Dubus¹, Francis Mégraud¹, Philippe Lehours¹.

6

7 ¹ Université de Bordeaux, INSERM UMR1053, Bordeaux Research in Translational
8 Oncology, BaRITOn, Bordeaux France

9 ² Université de Bordeaux, INSERM U869, ARNA Laboratory, Bordeaux, France

10 [§]Pauline Floch and Caroline Capdevielle contributed equally to the work.

11

12 Conflicts of interest: The authors disclose no conflicts.

13

14 Corresponding author: Pr Philippe Lehours, Université de Bordeaux, INSERM UMR1053,
15 Bordeaux Research in Translational Oncology, BaRITOn, Bordeaux, France;
16 philippe.lehours@u-bordeaux.fr.

17 **Abstract**

18 *Helicobacter pylori* infection is considered an excellent model of chronic inflammation-
19 induced tumor development. Our project focuses on gastric MALT lymphoma (GML) related
20 to *H. pylori* infection that originates from a chronic inflammatory process initiated by the
21 infection. Recently, microRNAs (miRNAs) have emerged as a new class of gene regulators
22 which play key roles in inflammation and carcinogenesis acting as oncogenes or tumor
23 suppressors. Their precise characterization in the development of inflammation and their
24 contribution in regulating responses of host cells to infection by *H. pylori* have been little
25 explored. Our goal was to analyze the miRNAs specifically induced in a mouse model of
26 GML previously developed by the laboratory, using BALB/c mice thymectomized at day 3
27 post-birth (d3Tx model) and to clarify their implication in GML pathogenesis.

28 By PCR array and RT-qPCR, five miRNAs overexpressed in the stomachs of GML-
29 developing d3Tx mice infected by *H. pylori* were identified (miR-21a, miR-135b, miR-142a,
30 miR-150, miR-155). The analysis of their putative targets allowed us to identify TP53INP1,
31 an antiproliferative and proapoptotic protein, as a common target of 4 of the 5 upregulated
32 miRNAs identified. We propose a scenario by which these miRNAs may act in synergy to
33 promote the development of GML. miR-142a was also overexpressed in sera samples and
34 therefore could serve as a diagnostic marker. *In situ* hybridization on gastric samples revealed
35 a global upregulation of this miRNA by the tumor microenvironment at the lymphoma stage.
36 Overexpression of these 5 miRNAs could play a critical role in the pathogenesis of GML and
37 might offer potential applications as therapeutic targets and novel biomarkers for this disease.

38

39 Keywords: MALT lymphoma, *Helicobacter pylori*, microRNAs, apoptosis.

40

41 **Introduction**

42 *Helicobacter pylori* is a Gram-negative bacterium that colonizes the human gastric mucosa of
43 about 50% of the world's population. The infection causes an inflammation (gastritis) which
44 is superficial and asymptomatic at first, but may evolve towards gastric or duodenal ulcer,
45 gastric adenocarcinoma or gastric mucosa associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma or
46 GML (14) (5) (15).

47 GML is the extremely rare consequence of chronic inflammation of the gastric mucosa caused
48 by *H. pylori* infection (less than 0.1% of infected subjects) (8). GML is a non-Hodgkin's
49 lymphoma characterized by infiltration and excessive proliferation of B lymphocytes in the
50 gastric mucosa. *H. pylori* infection promotes recruitment and proliferation of B cells in
51 organized lymphoid follicles similar to intestinal Peyer's patches. Mechanisms underlying the
52 initiation and progression of GML are not fully understood.

53 MicroRNAs (miRNAs) are small (18-24 nucleotides), non-coding RNAs that regulate the
54 expression of target genes through translational repression or messenger RNA (mRNA)
55 degradation (1). miRNAs are expressed in a tissue-specific manner and are involved in
56 cellular development, proliferation, apoptosis and differentiation. They can also regulate
57 immune response and their participation in many regulatory pathways has already been
58 proven (18). Aberrant expression of miRNAs is frequently associated with cancers,
59 particularly lymphomas (21) (12). They play an important role as tumor suppressor genes or
60 oncogenes (oncomir) during human carcinogenesis. The association between miRNAs and
61 cancer was first identified in chronic lymphocytic leukemia (CLL). In CLL, miR-15 and miR-
62 16 targeting anti-apoptotic protein Bcl2 and promoting lymphomagenesis exhibit a decreased
63 expression (2) (28). miRNAs have been associated with other cancers such as multiple
64 myeloma in which overexpression of miR-21 inhibits apoptosis (16) and lung, colon or
65 ovarian cancer where let-7 expression is reduced (18). In GML miR-142a and miR-155
66 potentially play a role by targeting mRNA coding for the pro-apoptotic protein, tumor protein
67 P53 inducible nuclear protein 1 (TP53INP1). By inhibiting protein translation, these two
68 miRNAs may be involved in lymphocyte proliferation in GML. This study was carried out on
69 C57BL/6 mice infected with *Helicobacter heilmannii* and overexpression of miRNAs was
70 confirmed on gastric biopsies of GML patients (17).

71 In the present study, the deregulation of miRNAs at the GML stage was investigated in a
72 mouse model of lymphomagenesis using the materials obtained in a GML mouse model
73 previously developed in the laboratory (4) based on BALB/c mice thymectomized at day 3

74 post birth (d3Tx) and infected with *H. pylori*. These mice developed GML contrary to non-
75 thymectomized (NTx) infected mice. A set of 5 miRNAs (miR-21a, miR-135b, miR-142a,
76 miR-150, miR-155) were identified as being overexpressed in the stomachs of these GML-
77 developing d3Tx mice. The analysis of their putative targets allowed us to propose that these
78 miARNs act in synergy to inhibit lymphocyte apoptosis and proliferation. *In situ*
79 hybridization on gastric samples suggests that the tumor microenvironment plays a role in the
80 deregulation of miR-142a. We also propose that this miR could serve as a non-invasive
81 diagnostic marker of GML.

82

83 **Materials and methods**

84 **miRNA extraction**

85 miRNAs were extracted from frozen gastric biopsies using the miRNeasy mini kit (Qiagen,
86 Courtaboeuf, France) according to the manufacturer's instructions. Fifty-two miRNA samples
87 extracted from NTx (7 non-infected (NI) and 19 *H. pylori* infected mice) and d3Tx mice (7 NI
88 and 19 *H. pylori* infected mice) were obtained. miRNAs were also extracted from paraffin-
89 embedded gastric tissues using the miRNeasy FFPE kit (Qiagen). Two 20 µm sections or four
90 10 µm sections from 6 d3Tx mice stomachs (3 NI and 3 infected mice) were used according
91 to the manufacturer's instructions. MiRNAs were extracted from 500 µl of serum diluted 4-
92 fold by adding 750 µl of TRIzol® LS Reagent (Ambion by Life Technologies, Carlsbad, CA,
93 USA) according to the manufacturer's instructions.

94

95 **miRNA reverse-transcription**

96 The miScript II RT kit with the HiSpec Buffer (Qiagen) was used for reverse transcription of
97 extracted miRNA samples (250 ng of retrotranscribed RNA per sample). The reaction was
98 performed according to the manufacturer's instructions.

99

100 **PCR Array**

101 The expression of 372 miRNAs among the gastric mucosa of infected and NI d3Tx mice was
102 evaluated by PCR array using the commercially available panel "Mouse Cancer Pathway
103 Finder 384HC" (Qiagen).

104 First, a PCR array with miRNAs from frozen gastric biopsies was performed. 3 NI and 4
105 infected d3Tx mice were included. Mice with the lowest and highest inflammatory scores in
106 NI and infected d3Tx mice, respectively, were included. Only RNAs of high integrity and
107 appropriate concentration after analysis on the Agilent 2200 Tape Station (Agilent
108 Technologies, Santa Clara, CA, USA) were included. An additional PCR array with miRNAs
109 from paraffin-embedded gastric tissues was then performed. Two infected d3Tx mice
110 exhibiting typical GML lesions were included and compared to 2 NI d3Tx mice.

111 Analysis of expression of 372 miRNAs related to cancer research, as well as six reference
112 miRNAs (SNORD61, SNORD95, SNORD96A, SNORD68, SNORD72, RNU6) was
113 performed using the QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix and miScript Universal
114 Primer (Qiagen), according to the manufacturer's recommendations. Distribution in the plates
115 was carried out with the robot Eppendorf epMotion M5073 (Eppendorf, Hambourg,

116 Germany). A quantity of 0.93 ng of cDNA was distributed per well. PCR arrays were
117 performed using the CFX384TM Real-Time PCR detection system (Bio-Rad, Marnes la
118 Coquette, France). Cycle threshold (Cq) values were downloaded from the machine and
119 analyzed following the $\Delta\Delta C_t$ method using the online system available for Qiagen PCR arrays
120 users (pcrdataanalysis.sabiosciences.com/mirna/arrayanalysis.php). Data were normalized to
121 4 of the 6 reference miRNAs by selecting the most stable ones between runs (variation <0.5
122 Cq). Fold-regulation values were calculated to compare miRNA expression between NI and
123 infected d3Tx mice. Values greater than or less than 3 indicated an upregulation or
124 downregulation, respectively. Cq values above 30 were not taken into account for the analysis
125 and were considered negative as the expression was too weak or inexistent.

126

127 **Quantitative real-time PCR**

128 A study on the expression of five miRNAs (miR-21a, miR-135b, miR-142a, miR-150, miR-
129 155) in d3Tx and NTx mice stomachs was performed by RT-qPCR to confirm the results of
130 the previous PCR arrays.

131 Amplification conditions: SYBR® Green Premix Ex TaqTM (Tli RNaseH Plus) (Takara,
132 Saint-Germain-en-Laye, France) was used for all RT-qPCR. miScript Universal Primer
133 (Qiagen) and specific primers for each miRNA tested (Qiagen) were used at a final
134 concentration of 0.25 μ M. PCR reactions were carried out in 96-well plates (Bio-Rad) with
135 1 μ l of diluted cDNA (1/25, 1 ng/ μ l) in a total volume of 10 μ l. Each target was tested in
136 duplicate for each sample. SNORD72 and RNU6 were used as reference genes. PCRs were
137 carried out using the CFX96TM Real-Time PCR detection system (Bio-Rad) at the
138 Quantitative PCR Platform at the University of Bordeaux (TBM-Core Real-Time PCR
139 Platform).

140 This PCR consists of a 95°C DNA denaturation step for 1 min, followed by 40 cycles
141 comprised of 2 steps: denaturation at 95°C for 5 sec and primer hybridization at 55°C for 30
142 sec. After each cycle, fluorescence was measured in order to quantify newly synthesized
143 DNA. At the end of the procedure, a melting curve was generated by a slow increment in the
144 temperature from 65 to 95°C and the continuous measurement of fluorescence. The
145 generation of this melting curve allowed a verification of the PCR specificity by generation of
146 one specific peak at the expected melting temperature for each product.

147 Concerning the relative quantification of the miRNA expression, for each sample, Cq values
148 obtained for each miRNA of interest were normalized in relation to the average of Cq values
149 obtained for SNORD72 and RNU6, the most stable miRNAs in gastric tissues ($\Delta Cq = Cq_{\text{gene}}$

150 of interest – $C_{t\text{SNORD72}}$). The $2^{-\Delta C_q}$ values were then calculated, enabling the results to be
151 presented as relative expression levels of the miRNA of interest.

152 Relative expression levels of each miRNA for the d3Tx mice group were also correlated with
153 the previously obtained histological scoring (4).

154 RT-qPCRs were also performed to study miRNA expression in sera samples from NI and
155 infected d3Tx mice. Thirteen mice overexpressing at least 3 miRNAs of interest in their
156 stomach were included and 7 NI d3Tx mice constituted the control group. The amplification
157 conditions were the same as described above. Cq values obtained for each miRNA of interest
158 were normalized in relation to the average of Cq values obtained for miR-16a (10).

159

160 **Bioinformatic analysis of predicted targets**

161 An analysis of putative targets by base complementarity and conservation between species
162 was performed for the five miRNAs studied using the Targetscan website
163 (<http://www.targetscan.org/>).

164

165 **Western blotting**

166 Gastric tissues (from 4 GML-developing infected d3Tx mice and 4 infected d3Tx mice
167 showing no inflammation (inflammatory scores equal to 0) or lymphoid infiltration (lymphoid
168 infiltration score equal to 0)) were lysed in the cell lysis buffer after addition of proteinase
169 inhibitors (Complete Mini, Roche, Basel, Switzerland), homogenized, glassbead smashed
170 (TissueLyser II, Qiagen) and centrifuged at 10,000 g for 10 min (4°C). The supernatants were
171 recovered.

172 Protein extracts were separated using SDS/polyacrylamide gel electrophoresis and transferred
173 to a nitrocellulose membrane. The membranes were hybridized with the rat anti-mouse
174 TP53INP1 monoclonal antibody (graciously offered by Dr. Alice Carrier, CRCM, Marseille,
175 France). After blotting, membranes were stained with SYPRO Ruby Protein Blot Stain
176 (Invitrogen) and scanned with the Molecular Imager PharosFX (Bio-Rad) for the
177 quantification of protein load. Specific antibody signals were normalized by total protein
178 amount for each entire lane. The signal intensities were analyzed using ImageJ software.

179

180 ***In situ* hybridization**

181 For *in situ* hybridization (ISH) of miR-142a, deparaffinized and rehydrated tissue sections of
182 6 μm thickness were digested by Proteinase K (Invitrogen, 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in a 5mM Tris HCl (pH
183 7.4), 1mM EDTA and 1mM NaCl buffer) for 20 min at 37°C, and postfixed in 4%

184 paraformaldehyde in PBS for 10 min at 4°C. After three washes in PBS, the tissues were
185 prehybridized for 1 h at 55°C in 25% formamide, 4X SSC, dextran sulfate 200 mg/ml, and
186 tRNA 220 µg/ml, and hybridized overnight at 55°C in the same buffer containing 100 nmol/l
187 anti-miR-142a probe or 5 nmol/l anti-RNU6 probe labelled at both 3' and 5' ends with
188 digoxigenin. After successive stringent washes (SSC 5X x2, SSC 1X x2, SSC 0.2X x2) at
189 55°C, the slides were incubated with blocking solution for 1 h at room temperature. An anti-
190 digoxigenin antibody coupled to alkaline phosphatase (Roche, Meylan, France, 1/800
191 dilution, overnight incubation at 4°C) was used to reveal hybridization of the anti-miRNA
192 probes. After 3 washes, a 2 h incubation step at room temperature in 1-StepNBT/BCIP plus
193 Suppressor Solution (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA) was performed. Slides were
194 dehydrated and mounted with Eukit-mounting medium (O. Kindler GmbH, Freiburg,
195 Germany).

196 Slides were scanned using a digital slide scanner (Panoramic SCAN; 3DHISTECH Ltd,
197 Budapest, Hungary) equipped with a Zeiss objective (Plan-Apochromat 40; numerical
198 aperture, 0.95; Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Germany) and a high-resolution color
199 camera (VCC-FC60FR19CL, 4MP, CIS Corporation, Japan) available at the Experimental
200 Histopathology Platform, US 005 UMS 3427-TBM CORE. The images were read using the
201 Panoramic Viewer software version 1.15.4 (3DHISTECH Ltd).

202

203 **Statistical analysis**

204 Statistical analyses were performed with GraphPad Prism 5.01 (GraphPad Software, Inc., La
205 Jolla, CA, USA). Means were compared by the non-parametric Mann-Whitney test.
206 Differences were considered significant when p was inferior to 0.05 (*p<0.05).

207

208 **Results**

209 **Investigation of miRNA expression by PCR array**

210 First, a PCR array with a pool of miRNAs of frozen gastric biopsies from 4 infected and 3 NI
211 d3Tx mice was performed. Infected d3Tx mice with inflammatory scores between 3 and 4
212 and lymphoid infiltration scores between 1.5 and 3 were included and compared to NI d3Tx
213 mice with inflammatory and lymphoid infiltration scores between 0 and 1 (4). Among the 372
214 miRNAs represented on the array, 110 were undetectable or weakly expressed (Cq value >
215 30), leaving 262 miRNAs for the analysis. Among these, only 2 miRNAs (miR-135b and
216 miR-155) were significantly increased in the infected group (Fold-regulation value >3),
217 whereas 5 miRNAs (miR-206, miR-802, miR-122, miR-377, miR-33) were decreased (Fold-
218 regulation value <3).

219 Considering this restricted number of deregulated miRNAs at the lymphoma stage using this
220 first approach, a second PCR array was performed using paraffin-embedded gastric tissues.
221 miRNA expression was studied in the 2 mice most representative of GML (inflammatory
222 scores between 3 and 4 and lymphoid infiltration scores equal to 3). miRNAs were extracted
223 from these paraffin-embedded gastric tissues, because of the lack of frozen gastric biopsies
224 from these mice. miRNA expression from a pool of RNA of 2 infected d3Tx mice was
225 compared to a pool of RNA from 2 NI d3Tx mice (2 of the 3 mice that were included in the
226 first PCR array run). Among the 372 miRNAs represented on the array, 136 were
227 undetectable or weakly expressed (Ct value >30), leaving 236 miRNAs for the analysis.
228 Among these, 19 miRNAs were significantly increased at GML stage (Fold-regulation value
229 >3), whereas 14 miRNAs were decreased (Fold-regulation value <-3) (Table 1).

230

231 **Relative expression levels of miR-21a, miR-135b, miR-142a, miR150 and miR-155 in** 232 **NTx and d3Tx mice**

233 Some of the upregulated miRNAs identified above were investigated further on a larger
234 number of samples in order to evaluate more precisely their specific deregulation at the
235 lymphoma stage. They were selected by comparing the results of both PCR arrays and using
236 data from the literature. An overexpression of miR-135b and miR-155 was observed at GML
237 stage in both PCR arrays, with fold-regulation values >3 (Table 1). miR-21a was also
238 overexpressed with a fold-regulation >3 in the second PCR (Table 1). However, according to
239 a previous study, miR-21a may play an important role in inflammatory response (19) and was

240 therefore included in our study. miR-142a and miR-150 were also included even if they were
241 overexpressed only in the second PCR array, as their overexpression at the lymphoma stage
242 was described by others (17) (6) (22).

243 Overexpression of miR-21a, miR-135b, miR-142a, miR-150 and miR-155 was confirmed at
244 the GML stage (Figure 1) compared to NI d3Tx mice and to infected NTx mice. The relative
245 expression levels of these miRNAs in stomachs of infected d3Tx mice were 4 to 11 times
246 superior to that of NI d3Tx mice. None of these 5 miRNAs were increased in infected NTx
247 stomachs compared to their NI counterparts.

248 The relative expression levels obtained for these 5 miRNAs in infected d3Tx mice were
249 classified according to histological scores of inflammation and lymphoid infiltrates
250 determined previously in the laboratory (4) and compared to those obtained for NI d3Tx mice.
251 A positive correlation was observed with those scores only for miR-21a (Figures 2A and 2B).
252 This was not the case for the 4 other miRNAs studied (data not shown). In comparison with
253 the NI d3Tx control group, miR-21a was significantly overexpressed in mice with
254 inflammatory and lymphoid infiltrate scores equal or superior to 2 and 1 respectively which
255 correlated with mice with GML lesions. Hence, miR-21a could be a marker of inflammation
256 intensity during gastric lymphomagenesis induced by *H. pylori* infection.

257

258 **TP53INP1 is targeted by miRNAs overexpressed in gastric MALT lymphoma**

259 Identification of miRNA target genes is essential for determining miRNA function. Recent
260 studies have indicated that a single miRNA may regulate more than 200 target genes.
261 Furthermore, one target gene could be regulated by many miRNAs. A database for predicting
262 target genes, TargetScan (<http://www.targetscan.org>), revealed that 4 of the 5 miRNAs
263 upregulated in our model (miR-135b, miR-142a, miR-150 and miR155) are able to bind to the
264 3' UTR of the mRNA of the proapoptotic gene TP53INP1. A decrease in this protein
265 expression would be associated with B cell survival.

266 To confirm the activity of miR-135b, miR-142a, miR-150 and miR155 on TP53INP1
267 production, we examined the expression levels of TP53INP1 by Western blot analysis in
268 GML-developing infected d3Tx mice. These expression levels were compared to those of
269 infected d3Tx mice showing no inflammation (inflammatory scores equal to 0) or lymphoid
270 infiltration (lymphoid infiltration equal to 0). As expected, the expression of TP53INP1 was
271 decreased in GML mice relative to control mice (Figure 5A).

272 This target has already been validated for miR-142a and miR-155 (17). A luciferase reporter
273 assay using a vector containing the putative TP53INP1 3' UTR target sites downstream of the

274 luciferase reporter gene would have to be done to confirm the target specificity of miR-135b
275 and miR-150 for TP53INP1.

276 Hence, these miRNAs could be involved in lymphocyte survival and act in synergy to
277 promote the development of GML.

278

279 **miR-142a could be a diagnostic marker of gastric MALT lymphoma**

280 miRNAs have already been described as potential diagnostic markers of human diseases (3).

281 Relative expression of miR-21a, miR-135b, miR-142a, miR-150 and miR-155 was therefore
282 evaluated in NI and infected d3Tx mice sera by RT-qPCR. Expression of these five miRNAs
283 was detected in mice sera, but only miR-142a expression was significantly increased in the
284 sera of GML-developing mice compared to the control group (Figure 3).

285 Hence, miR-142a could be a non-invasive diagnostic marker of gastric MALT lymphoma.

286 The same approach would have to be done on human sera samples for confirmation.

287

288 **miR-142a is expressed by lymphoid infiltrates and the tumor environment**

289 We also tried to understand which cells were producing miR-142a, either lymphocytes or
290 cells from the tumor microenvironment such as epithelial cells. ISH for miR-142a was
291 performed on sections from NI and infected d3Tx mice stomachs and showed that it was
292 expressed by both lymphoid infiltrates and the tumor environment (Figure 4).

293

294 **Discussion**

295 miRNAs play an important role in the regulation of the immune system (13) and are involved
296 in carcinogenesis (18). Our work focused on the deregulation of miRNAs that could favor the
297 emergence of GML. By using the unique material obtained from a previous study (4) in which
298 we were able to induce GML in *H. pylori*-infected d3Tx mice, we showed an overexpression
299 of 5 miRNAs (miR-21a, miR-135b, miR-142a, miR-150 and miR-155) in mice stomachs at
300 the lymphoma stage. Studying their predicted targets allowed us to identify a common target
301 which corresponds to a pro-apoptotic factor. Our work highlighted that miR-21a is a marker
302 of intensity of gastric inflammatory scores and for the first time that miR142a could be a non-
303 invasive marker of GML.

304

305 An overexpression of miR-21a was observed in infected d3Tx mice stomachs and relative
306 expression levels of this miRNA were correlated to histological scores of inflammation and
307 lymphoid infiltrates determined previously in the laboratory (4). Expression of miR-21a
308 increased gradually with inflammation and MALT development. miR-21a targets PTEN
309 (phosphatase and TENsin homolog), an mRNA which regulates the PI3K (phosphoinositide
310 3-kinase)/Akt pathway, influencing apoptosis, cell growth and cellular cycle, and PDCD4
311 (programmed cell death protein 4), an mRNA which regulates apoptosis and decreases
312 expression of the anti-inflammatory cytokine IL-10 (19). This miRNA could control the
313 inflammatory response as shown *in vitro* on cancer cell line AGS (29). However, miR-21a has
314 both pro-inflammatory and anti-inflammatory activities *in vivo*, and its deregulation may
315 influence homeostasis (19). In particular, miR-21a overexpression could regulate lymphoid
316 infiltration in gastric mucosa. In hepatocellular, gastric carcinomas and in lymphomas such as
317 follicular lymphomas (29) (9) (12), this miRNA was involved in invasion, cell migration and
318 apoptosis inhibition.

319 miR-135b is increased in various cancers such as colorectal cancers and acts as an oncomir
320 (23) but was never studied in GML. In contrast, this miRNA is also considered a tumor
321 suppressor in Hodgkin lymphoma by inhibiting JAK2 expression which is implicated in cell
322 survival and proliferation (9).

323 An overexpression of miR-150 has already been described in GML (6) (22) as well as in
324 gastric carcinoma (25). This miRNA is considered a tumor suppressor gene in hematopoietic
325 carcinoma. NK/T cell proliferation was also associated with a decrease in miR-150 expression
326 (24). miR-150 regulates EGR2 production, inducing cell proliferation (25). miR-150 can also
327 inhibit cell proliferation by targeting c-Myb mRNA which has a pro-oncogene activity (27).

328 miR-135b and miR-150 deregulation varies depending on the type of carcinoma suggesting
329 that the tumor microenvironment could play a crucial role in carcinogenesis. The role of these
330 miRNAs in GML remains to be defined.

331 An overexpression of miR-142a and miR-155 has already been described in GML tissues of
332 C57BL/6 mice infected by *H. heilmannii* and in gastric biopsies of GML patients (17). miR-
333 155 expression is increased with *H. pylori* infection (26) and miR-155 inhibits the NF- κ B
334 pathway by inhibiting TNF- α production (7). miR-155 is an oncomir in GML (17). This
335 miRNA targets SHIP-1 (Src homology 2 domain-containing inositol-5-phosphatase 1), an
336 mRNA which regulates the PI3K/AKT pathway (22).

337 In theory, a single miRNA can target multiple mRNAs and one mRNA is often targeted by
338 multiple miRNAs. The relative expression level of a protein can be considerably reduced if its
339 corresponding mRNA is targeted by several miRNAs. miR-135b, miR-142a, miR-150 and
340 miR155 are potentially able to bind to the 3' UTR region of the proapoptotic gene TP53INP1
341 mRNA. This target has already been validated for miR-142a and miR-155 (17). A luciferase
342 reporter assay using a vector containing the putative TP53INP1 3' UTR target sites
343 downstream of the luciferase reporter gene is in progress to confirm the target specificity of
344 miR-135b and miR-150 for TP53INP1. Expression of TP53INP1 miRNA in mice stomachs
345 evaluated by RT-qPCR did not significantly differ between NI and infected d3Tx mice (data
346 not shown) suggesting a post-transcriptional mechanism, but TP53INP1 production evaluated
347 by Western blot analysis was decreased in GML-developing mice in comparison to control
348 mice. Hence, miR-135b, miR-142a, miR-150 and miR155 seem to regulate TP53INP1
349 production via mRNA translational repression but not mRNA degradation.

350 A single miRNA can act both as an oncogene (miR-21a, miR-135b, miR-142a, miR-150 and
351 miR-155) or a tumor suppressor (miR-135b, miR-150) thus complicating the understanding of
352 the mechanisms involved in lymphomagenesis. The five miRNAs overexpressed in our study
353 could act synergistically by targeting multiple signaling pathways (Figure 5B). miR-21a,
354 miR-135b et miR-155 target indirectly the PI3K/AKT signaling pathway. miR-21a and miR-
355 155 activate the PI3K/AKT signaling pathway by targeting PTEN and SHIP-1 mRNAs
356 respectively, and promote cell survival (19) (22). On the contrary, miR-135b inhibits JAK2
357 mRNA involved in the activation of this pathway (9). As mentioned previously, cell survival
358 may also be mediated by inhibition of TP53INP1 by miR-135b, miR-142a, miR-150 and
359 miR-155. Therefore, these five miRNAs overexpressed at the GML stage in mice could
360 represent important molecular factors to inhibit lymphocyte apoptosis and promote B cell
361 survival and proliferation.

362 Interestingly, an overexpression of miR-21a and miR-155 has also been described in NK/T
363 cell proliferation induced by Epstein Bar Virus (EBV) (21). These miRNAs are involved in
364 immortalization of lymphocytes. Lymphomagenesis induced by two different pathogens
365 which have different mechanisms of action (indirect for *H. pylori* and direct for EBV) could
366 be linked through common miRNA deregulation disrupting the same signaling pathways.

367

368 Evaluation of miRNA expression in serum samples is considered a simple and non-invasive
369 predictive tool in the diagnosis of certain cancers (11). In our study we observed that miR-
370 142a could be a potential biomarker of GML. It would be interesting to evaluate miR-142a
371 expression prior to the development of GML. In the perspective of an animal model, the
372 presence of serum markers will allow the detection of GML development in order to better
373 adapt the time of sacrifice. miR-142a seems to be expressed in both lymphoid infiltrates and
374 the tumor environment. This result is consistent with a previous study; both immune cells and
375 epithelial cells are able to produce miRNAs (20) and this suggests an important role of tumor
376 microenvironment in gastric lymphomagenesis.

377

378 In conclusion, five miRNAs potentially involved in gastric lymphomagenesis were identified
379 in our study. They could act synergistically and promote cell survival and lymphocyte
380 proliferation, in particular by inhibiting lymphocyte apoptosis. Further analysis of these
381 miRNAs in human biopsies or histological sections would validate their deregulation at the
382 GML stage and define potential new therapeutic targets. miR-142a could also be a potential
383 marker of GML and must now be validated in human sera samples.

384

385 **Acknowledgments**

386 The authors thank Xavier Gauthereau from the TBM-Core Real-Time PCR Platform
387 (University of Bordeaux), Alice Carrier (Inserm, U1068, CRCM, Marseille, F-13009, France;
388 Institut Paoli-Calmettes, Marseille, F-13009, France; Aix-Marseille Université, UM 105,
389 Marseille, F-13284, France; CNRS, UMR7258, CRCM, Marseille, F-13009, France) for
390 providing anti-TP53INP1 antibody, Lindsay Mégraud for English revision of the manuscript.
391 Alban Giese from the Experimental Histopathology Platform, US 005 UMS 3427-TBM
392 CORE, was funded by SIRIC BRIO.

393 **References**

- 394 1. **Bartel, D. P.** 2009. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*
395 **136**:215-33.
- 396 2. **Calin, G. A., Y. Pekarsky, and C. M. Croce.** 2007. The role of microRNA and other
397 non-coding RNA in the pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia. *Best Pract Res*
398 *Clin Haematol* **20**:425-37.
- 399 3. **Cho, W. C.** 2010. MicroRNAs: potential biomarkers for cancer diagnosis, prognosis
400 and targets for therapy. *Int J Biochem Cell Biol* **42**:1273-81.
- 401 4. **Chrisment, D., P. Dubus, L. Chambonnier, A. Hoces de la Guardia, E. Sifre, A.**
402 **Giese, M. Capone, C. Khairallah, P. Costet, B. Rousseau, C. Hubert, O. Burlen-**
403 **Defranoux, C. Varon, A. Bandeira, F. Megraud, and P. Lehours.** 2014. Neonatal
404 thymectomy favors *Helicobacter pylori*-promoted gastric mucosa-associated lymphoid
405 tissue lymphoma lesions in BALB/c mice. *Am J Pathol* **184**:2174-84.
- 406 5. **Ferreri, A. J., I. Ernberg, and C. Copie-Bergman.** 2009. Infectious agents and
407 lymphoma development: molecular and clinical aspects. *J Intern Med* **265**:421-38.
- 408 6. **Gebauer, N., J. Kuba, A. Senft, A. Schillert, V. Bernard, and C. Thorns.** 2014.
409 MicroRNA-150 Is up-regulated in extranodal marginal zone lymphoma of MALT
410 type. *Cancer Genomics Proteomics* **11**:51-6.
- 411 7. **Hoces de la Guardia, A., C. Staedel, I. Kaafarany, A. Clement, C. Roubaud**
412 **Baudron, F. Megraud, and P. Lehours.** 2013. Inflammatory cytokine and
413 microRNA responses of primary human dendritic cells cultured with *Helicobacter*
414 *pylori* strains. *Front Microbiol* **4**:236.
- 415 8. **Kusters, J. G., A. H. van Vliet, and E. J. Kuipers.** 2006. Pathogenesis of
416 *Helicobacter pylori* infection. *Clin Microbiol Rev* **19**:449-90.
- 417 9. **Lawrie, C. H.** 2012. MicroRNAs and lymphomagenesis: a functional review. *Br J*
418 *Haematol* **160**:571-81.
- 419 10. **Lawrie, C. H., S. Gal, H. M. Dunlop, B. Pushkaran, A. P. Liggins, K. Pulford, A.**
420 **H. Banham, F. Pezzella, J. Boulwood, J. S. Wainscoat, C. S. Hatton, and A. L.**
421 **Harris.** 2008. Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum
422 of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Br J Haematol* **141**:672-5.
- 423 11. **Madhavan, D., K. Cuk, B. Burwinkel, and R. Yang.** 2013. Cancer diagnosis and
424 prognosis decoded by blood-based circulating microRNA signatures. *Front Genet*
425 **4**:116.

- 426 12. **Musilova, K., and M. Mraz.** 2015. MicroRNAs in B-cell lymphomas: how a
427 complex biology gets more complex. *Leukemia* **29**:1004-17.
- 428 13. **O'Connell, R. M., D. S. Rao, and D. Baltimore.** 2012. microRNA regulation of
429 inflammatory responses. *Annu Rev Immunol* **30**:295-312.
- 430 14. **Parsonnet, J., G. D. Friedman, D. P. Vandersteen, Y. Chang, J. H. Vogelman, N.**
431 **Orentreich, and R. K. Sibley.** 1991. *Helicobacter pylori* infection and the risk of
432 gastric carcinoma. *N Engl J Med* **325**:1127-31.
- 433 15. **Pereira, M. I., and J. A. Medeiros.** 2014. Role of *Helicobacter pylori* in gastric
434 mucosa-associated lymphoid tissue lymphomas. *World J Gastroenterol* **20**:684-98.
- 435 16. **Pichiorri, F., S. S. Suh, M. Ladetto, M. Kuehl, T. Palumbo, D. Drandi, C.**
436 **Taccioli, N. Zanesi, H. Alder, J. P. Hagan, R. Munker, S. Volinia, M. Boccardo,**
437 **R. Garzon, A. Palumbo, R. I. Aqeilan, and C. M. Croce.** 2008. MicroRNAs
438 regulate critical genes associated with multiple myeloma pathogenesis. *Proc Natl*
439 *Acad Sci U S A* **105**:12885-90.
- 440 17. **Saito, Y., H. Suzuki, H. Tsugawa, H. Imaeda, J. Matsuzaki, K. Hirata, N. Hosoe,**
441 **M. Nakamura, M. Mukai, H. Saito, and T. Hibi.** 2012. Overexpression of miR-142-
442 5p and miR-155 in gastric mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma
443 resistant to *Helicobacter pylori* eradication. *PLoS One* **7**:e47396.
- 444 18. **Schickel, R., B. Boyerinas, S. M. Park, and M. E. Peter.** 2008. MicroRNAs: key
445 players in the immune system, differentiation, tumorigenesis and cell death. *Oncogene*
446 **27**:5959-74.
- 447 19. **Sheedy, F. J.** 2015. Turning 21: Induction of miR-21 as a Key Switch in the
448 Inflammatory Response. *Front Immunol* **6**:19.
- 449 20. **Staedel, C., and F. Darfeuille.** 2013. MicroRNAs and bacterial infection. *Cell*
450 *Microbiol* **15**:1496-507.
- 451 21. **Tagawa, H., S. Ikeda, and K. Sawada.** 2013. Role of microRNA in the pathogenesis
452 of malignant lymphoma. *Cancer Sci* **104**:801-9.
- 453 22. **Thorns, C., J. Kuba, V. Bernard, A. Senft, S. Szymczak, A. C. Feller, and H. W.**
454 **Bernd.** 2010. Deregulation of a distinct set of microRNAs is associated with
455 transformation of gastritis into MALT lymphoma. *Virchows Arch* **460**:371-7.
- 456 23. **Valeri, N., C. Braconi, P. Gasparini, C. Murgia, A. Lampis, V. Paulus-Hock, J. R.**
457 **Hart, L. Ueno, S. I. Grivennikov, F. Lovat, A. Paone, L. Cascione, K. M. Sumani,**
458 **A. Veronese, M. Fabbri, S. Carasi, H. Alder, G. Lanza, R. Gafa, M. P. Moyer, R.**
459 **A. Ridgway, J. Cordero, G. J. Nuovo, W. L. Frankel, M. Rugge, M. Fassan, J.**

- 460 **Groden, P. K. Vogt, M. Karin, O. J. Sansom, and C. M. Croce.** 2014. MicroRNA-
461 135b promotes cancer progression by acting as a downstream effector of oncogenic
462 pathways in colon cancer. *Cancer Cell* **25**:469-83.
- 463 24. **Watanabe, A., H. Tagawa, J. Yamashita, K. Teshima, M. Nara, K. Iwamoto, M.**
464 **Kume, Y. Kameoka, N. Takahashi, T. Nakagawa, N. Shimizu, and K. Sawada.**
465 2011. The role of microRNA-150 as a tumor suppressor in malignant lymphoma.
466 *Leukemia* **25**:1324-34.
- 467 25. **Wu, Q., H. Jin, Z. Yang, G. Luo, Y. Lu, K. Li, G. Ren, T. Su, Y. Pan, B. Feng, Z.**
468 **Xue, X. Wang, and D. Fan.** 2010. MiR-150 promotes gastric cancer proliferation by
469 negatively regulating the pro-apoptotic gene EGR2. *Biochem Biophys Res Commun*
470 **392**:340-5.
- 471 26. **Xiao, B., Z. Liu, B. S. Li, B. Tang, W. Li, G. Guo, Y. Shi, F. Wang, Y. Wu, W. D.**
472 **Tong, H. Guo, X. H. Mao, and Q. M. Zou.** 2009. Induction of microRNA-155
473 during *Helicobacter pylori* infection and its negative regulatory role in the
474 inflammatory response. *J Infect Dis* **200**:916-25.
- 475 27. **Xiao, C., D. P. Calado, G. Galler, T. H. Thai, H. C. Patterson, J. Wang, N.**
476 **Rajewsky, T. P. Bender, and K. Rajewsky.** 2007. MiR-150 controls B cell
477 differentiation by targeting the transcription factor c-Myb. *Cell* **131**:146-59.
- 478 28. **Zanesi, N., Y. Pekarsky, F. Trapasso, G. Calin, and C. M. Croce.** 2010.
479 MicroRNAs in mouse models of lymphoid malignancies. *J Nucleic Acids Investig*
480 **1**:36-40.
- 481 29. **Zhang, Z., Z. Li, C. Gao, P. Chen, J. Chen, W. Liu, S. Xiao, and H. Lu.** 2008.
482 miR-21 plays a pivotal role in gastric cancer pathogenesis and progression. *Lab Invest*
483 **88**:1358-66.
- 484

485 **Figure legends**

486 **Figure 1: Relative expression levels of miR-21a, miR-135b, miR-142a, miR150 and miR-**
487 **155 in *Helicobacter pylori* infected and non-infected (NI) NTx and d3Tx mice stomachs.**

488 Expression levels quantified by RT-qPCR for infected NTx (n=19) and d3Tx (n=19) mice
489 groups (in gray) were normalized in comparison to expression levels for NI NTx (n=7) and NI
490 d3Tx (n=7) control groups (in white), respectively. SNORD72 was used to normalize miRNA
491 expression levels. The results were similar to those obtained with RNU6. Data are plotted as
492 bar graphs displaying the mean \pm standard deviation for each group, **p<0.01, ***p<0.001.

493

494 **Figure 2: Correlation between relative expression levels of miR-21a and histological**
495 **scores of *Helicobacter pylori* infected d3Tx mice.** Relative expression levels for miR-21a

496 quantified by RT-qPCR were classified according to histological scores obtained for each
497 infected d3Tx mouse. (A) Correlation of relative expression levels in comparison with
498 inflammation scores (n= 8, n=11 for scores of 2 and 3/4, respectively). (B) Correlation of
499 relative expression levels in comparison with lymphoid infiltrate scores (n= 4, 10 and 5 for
500 scores of 1, 2 and 3, respectively). Data are plotted as bar graphs displaying the mean \pm
501 standard deviation for each group,*p<0.05. NS = non-significant; in red, significant
502 expression levels when compared with NI d3Tx control group (n=7) (p<0.05).

503

504 **Figure 3: Relative expression levels of interest miRNAs in *Helicobacter pylori* infected**
505 **and non-infected (NI) d3Tx mice sera.**

506 Expression levels in sera quantified by RT-qPCR for NI infected d3Tx mice group (n=12)
507 were normalized in comparison to NI d3Tx (n=7) control group expression levels. miR-16a
508 was used to normalize miRNA expression levels. Graphic representation as box plots, with
509 the box representing 50% of values around the median (horizontal line) and the whiskers
510 representing the minimum and maximum of all the data, ***p<0.001.

511

512 **Figure 4: miR-142a is expressed by lymphoid infiltrates and the tumor environment.** *In*
513 *situ* hybridization (ISH) of miR-142a. Images taken by light microscopy (Nikon Eclipse 50i)
514 with a 20X objective, and using a camera (Nikon Digital Sight DS-F11). A) Example of ISH
515 of miR-142a from a NI d3Tx mouse stomach: absence of labelling. B) Example of ISH of
516 miR-142a from an infected d3Tx mouse stomach: miR-142a is expressed by lymphoid

517 infiltrates and the tumor environment. For this mouse, the gastric mucosa is clearly
518 hyperplastic and dysplastic. The lymphoid infiltrates are visible at the basis of the slide.

519

520 **Figure 5: TP53INP1 expression levels in gastric mucosa associated lymphoid tissue**
521 **lymphoma (GML) and potential action network of predicted targets of miRNAs**
522 **overexpressed in GML mice stomachs.**

523 (A) Western-blot analysis of TP53INP1 in GML-developing, *Helicobacter pylori* infected d3Tx
524 mice (n=4) compared to infected d3Tx mice showing no inflammation (inflammatory scores
525 equal to 0) or lymphoid infiltration (lymphoid infiltration equal to 0) (n=4). Total protein
526 normalization was performed using Sypro Ruby staining. The expression of TP53INP1
527 decreased in GML-developing mice compared to that observed in control mice. Data are
528 plotted as bar graphs displaying the mean \pm standard deviation for each group, *p<0.05.

529 (B) The five miRNAs overexpressed in our study (in yellow) could inhibit the expression of
530 various targets such as TP53INP1. Activation of a signaling pathway is represented by blue
531 arrows and inhibition by red arrows. Validated targets are in yellow and non-validated targets
532 in gray.

533

534 **Table 1.** Deregulated miRNAs in infected d3Tx mice compared to NI d3Tx mice.

535

miRNA	Fold-regulation value	
	PCR Array 1	PCR Array 2
miR-135b	4.655	15.614
miR-142a	1.216	12.410
miR-150	2.062	10.776
miR-19a	-1.914	8.495
miR-153	-1.915	5.541
miR-17	-1.531	5.483
miR-340	-1.208	5.095
miR-155	7.301	4.801
miR-135a	1.276	4.695
miR-19b	-2.615	4.654
miR-140	-1.482	4.595
miR-190a	-1.393	4.407
let-7c-2	-1.367	3.950
miR-101a	-2.974	3.757
miR-21a	2.415	3.735
miR-342	1.06	3.571
miR-376c	-2.209	3.252
miR-18a	-1.213	3.171
miR-126a	-1.620	3.077
let-7b	1.294	-3.064
miR-323	-1.323	-3.232
miR-125a	-1.309	-3.320
miR-615	2.212	-3.347
miR-320	1.666	-3.454
miR-375	-1.172	-3.490
miR-382	-1.759	-3.565
miR-193b	-1.182	-4.116
miR-762	-1.556	-4.502

miR-1224	-1.665	-5.071
miR-494	-2.229	-5.181
miR-802	-3.937	-5.374
miR-217	-1.824	-17.816
miR-216a	-1.093	-41.184

536 PCR array 1 was performed with a pool of miRNAs from frozen gastric biopsies from 4
537 infected and 3 NI d3Tx mice. PCR array 2 was performed with a pool of miRNAs from
538 paraffin-embedded gastric tissues from 2 infected and 2 NI d3Tx mice.

539 miRNAs regulated in common between the two runs of PCR arrays are underlined in gray.

Figure 1.

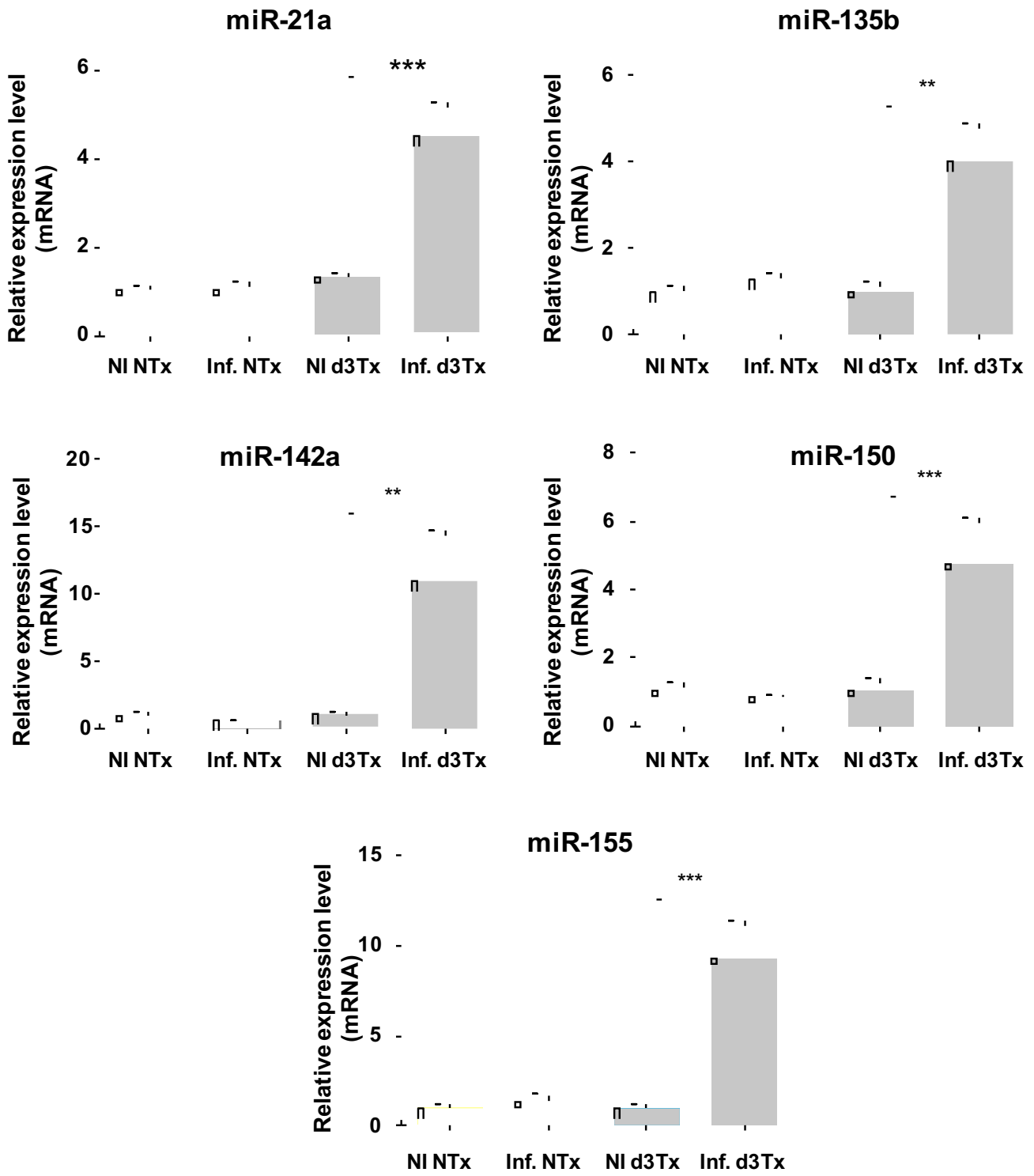
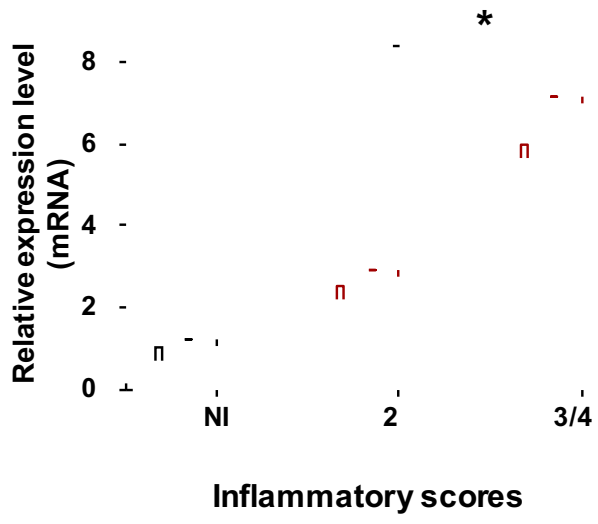


Figure 2.

(2A)



(2B)

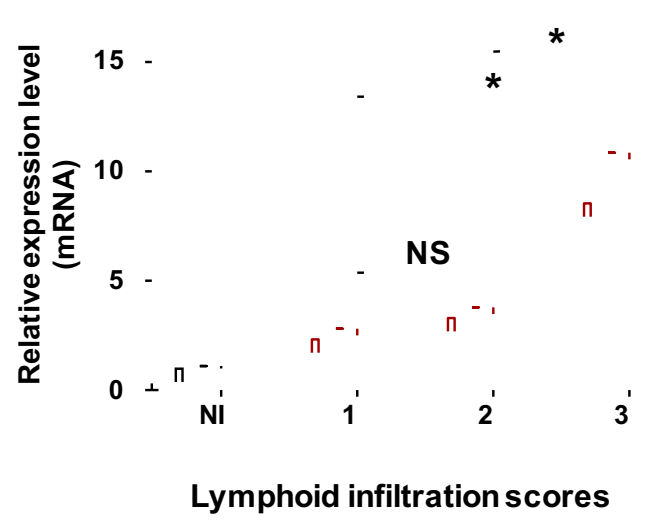


Figure 3.

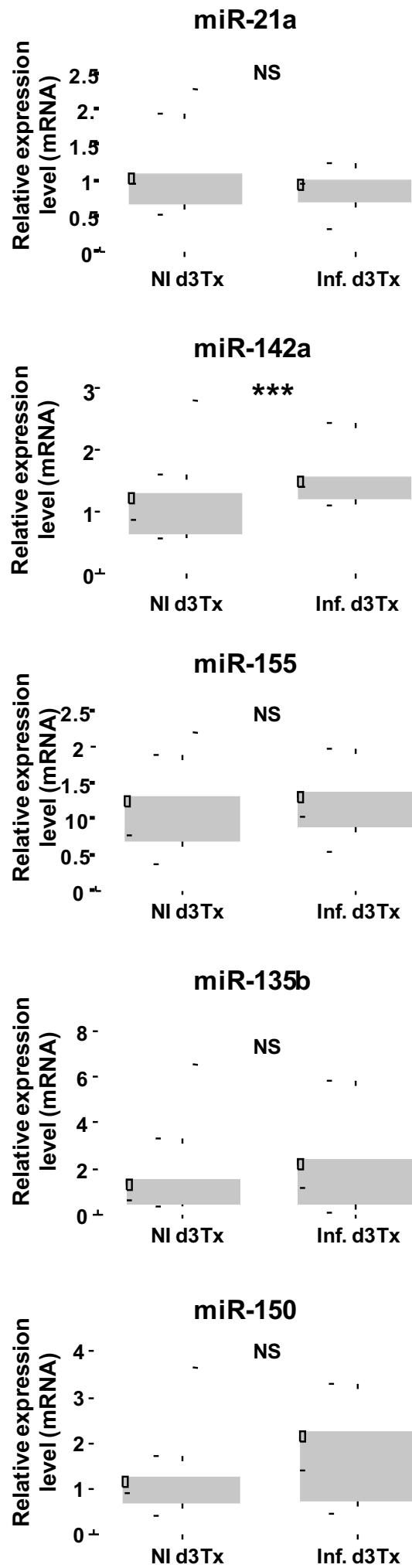


Figure 4.

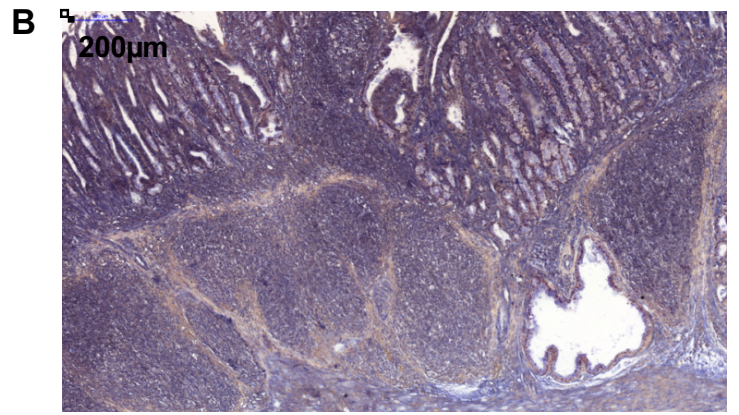
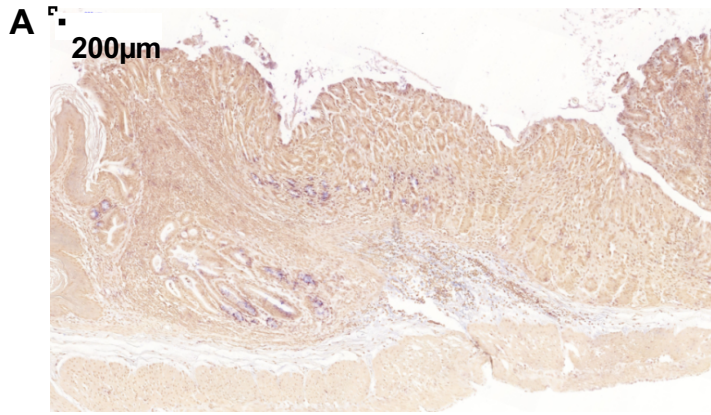
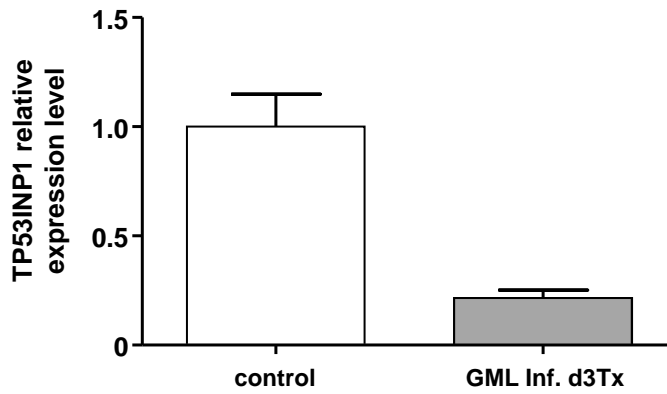
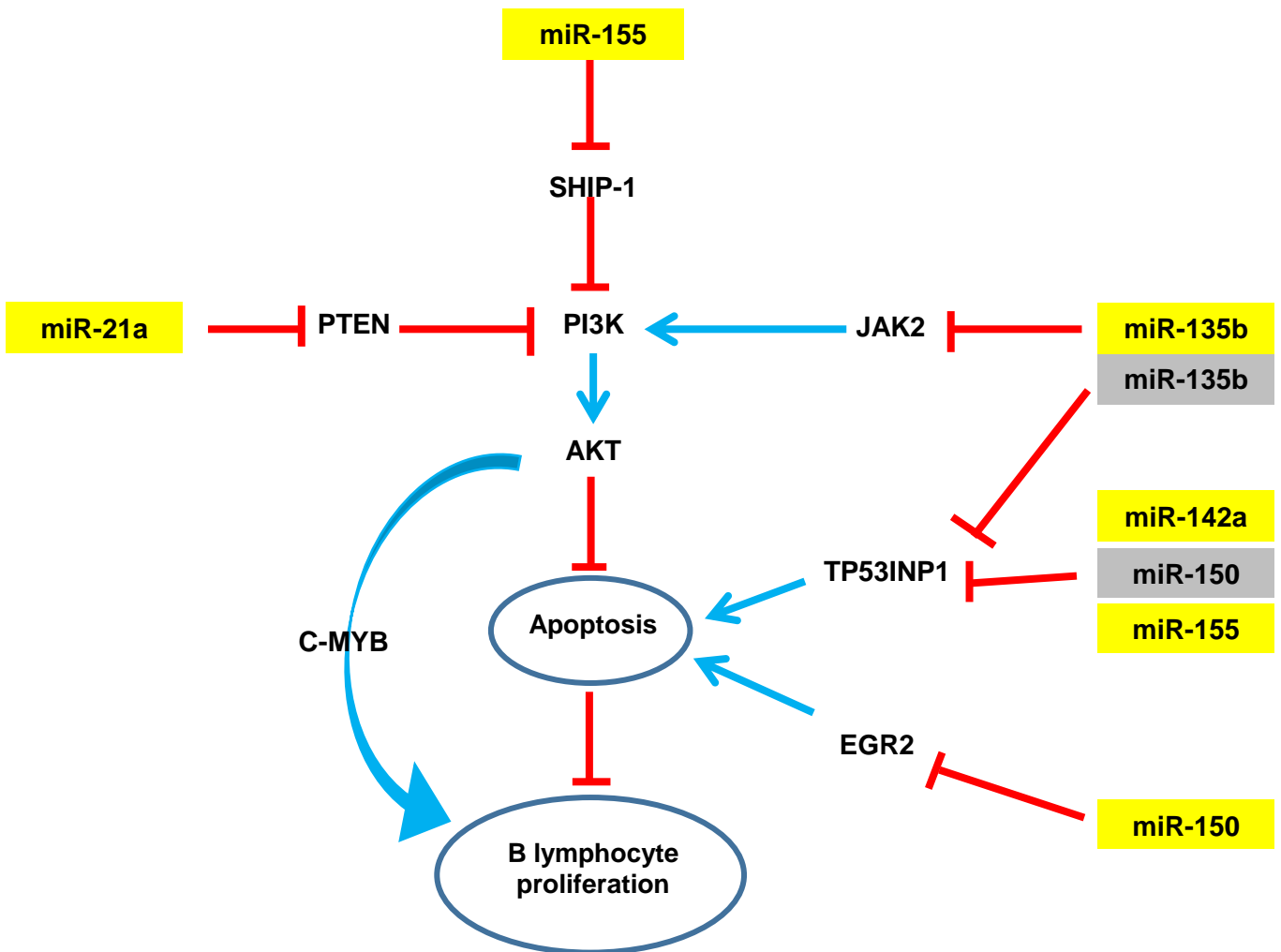


Figure 5.

(A)



(B)



Article n°4

A new animal model of gastric lymphomagenesis: APRIL transgenic mice infected by *Helicobacter* species.

Pauline Floch, Julien Izotte, Julien Guillemaud, Elodie Sifré, Pierre Costet, Benoit Rousseau, Amandine Marine Laur, Alban Giese, Francis Mégraud, Pierre Dubus, Michael Hahne, Philippe Lehours.

A soumettre

Généralités sur la cytokine APRIL

I. Introduction

APRIL (*A proliferation inducing ligand* ou TNFSF 13a) est une cytokine de la famille du TNF (*Tumor Necrosis Factor*) décrite pour la première fois en 1998. Elle est impliquée dans de multiples aspects de la physiologie des lymphocytes B via ses récepteurs appartenant à la famille des récepteurs des membres du TNF, TACI et BCMA (83) (Figure 22). APRIL peut aussi se lier aux *Heparan Sulfate Proteo-Glycans* (HSPGs) via un site différent de celui liant TACI et BCMA (158). APRIL présente 30% d'homologie protéique avec un autre membre de la famille du TNF, BAFF (*B-cell activating factor* ou TNFSF 13b), qui peut aussi se lier à TACI et avec une affinité moindre à BCMA. BAFF possède également un récepteur spécifique, BAFF-R (ou BR-3). La partie N-terminale de APRIL peut fusionner avec la partie C-terminale de TWEAK, autre membre de la famille du TNF, générant une protéine liée à la membrane, TWE-PRIL (327). APRIL et BAFF sont synthétisés sous forme de protéines transmembranaires de type II avec un domaine C-terminal caractéristique des membres de la famille du TNF. APRIL est produite par clivage en une protéine soluble par une furin-like protéase au niveau intracellulaire avant sa sécrétion. APRIL et BAFF peuvent former des homotrimères solubles et peuvent également s'associer en hétérotrimères biologiquement actifs.

La forme APRIL humaine comporte environ 80% d'homologie protéique avec la forme murine, de plus il a été montré que la cytokine humaine se lie avec une affinité comparable aux récepteurs TACI et BCMA murins et humains (389). Ces données permettent d'envisager que la forme humaine soit biologiquement active chez la souris.

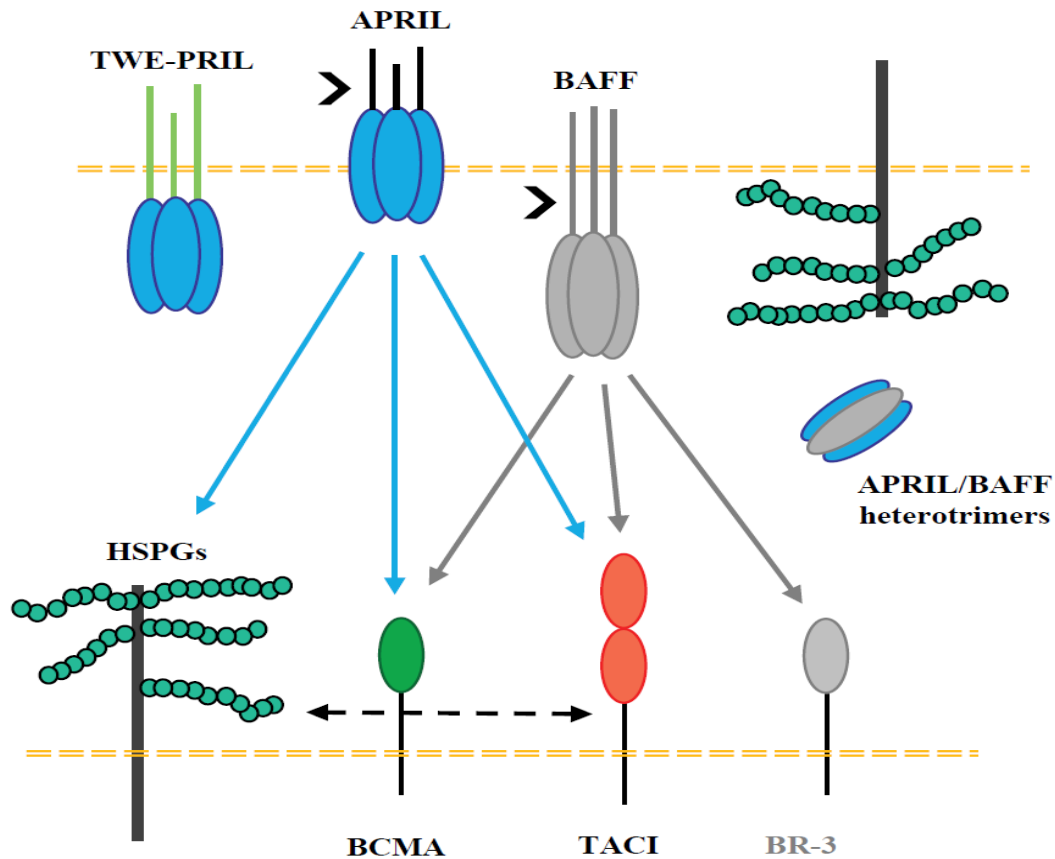


Figure 22 : APRIL et ses récepteurs. APRIL et BAFF peuvent être clivés et sécrétés comme facteurs solubles. APRIL peut se lier aux HSPGs, à TACI et BCMA. TACI est capable d’interagir avec APRIL et BAFF avec la même affinité. TACI peut interagir également avec les HSPGs. BAFF peut se lier avec BCMA avec une affinité moindre que APRIL. BAFF-R ou BR-3 est un récepteur spécifique de BAFF.

APRIL est exprimée par de nombreuses cellules du système immunitaire dont les polynucléaires neutrophiles, monocytes, macrophages, cellules dendritiques, lymphocytes T (145). L’expression de APRIL par les monocytes, macrophages et cellules dendritiques dépend de l’environnement cytokinique et de la présence de PRRs et CD40 à la surface cellulaire. APRIL est également exprimée par des cellules n’appartenant pas au système immunitaire, comme les cellules épithéliales, les ostéoclastes et des cellules tumorales (tumeurs solides, lymphomes hodgkiniens et non hodgkiniens, myélome multiple) (271) (155).

APRIL est impliquée dans l’induction et le maintien des réponses B et T bien que ses fonctions soient moins bien caractérisées que celles de BAFF. APRIL a un rôle dans la survie et la prolifération des lymphocytes B (83). APRIL favorise la prolifération de lymphocytes B murins et humains *in vitro* (462) et promeut la présentation antigénique aux lymphocytes B via l’augmentation d’expression de molécules de co-stimulation comme CD40 et CMH II. APRIL favorise également la

recombinaison isotypique de classe des IgG et IgA (235). Dans un modèle de souris transgéniques APRIL, il a été observé une augmentation des titres d'IgM et d'IgA sériques pouvant être expliquée par l'augmentation de l'activité des lymphocytes B1 (322). Deux équipes ont généré des souris déficientes en APRIL (427) (50). Ce phénotype n'a pas induit de modification sur la prolifération et la réponse lymphocytaire T. Le développement lymphocytaire B semblait également normal, mais le titre d'IgA était diminué dans une des études. De plus en réponse à une stimulation antigénique des variations significatives dans le taux d'IgA et IgG ont été observées, APRIL semble donc jouer un rôle dans la recombinaison isotypique des classes (50). APRIL a également un rôle important pour la différenciation et la survie des plasmocytes (170) (25).

L'augmentation de l'expression de APRIL dans des pathologies lymphoïdes comme la LLC, le lymphome du manteau, le lymphome folliculaire, le lymphome de Hodgkin mais également dans des tumeurs solides (cancer du sein), laisse entrevoir le rôle important de cette cytokine dans la promotion et la survie de cellule néoplasiques.

II. APRIL et cancers

Dès la première description de APRIL, son association à la carcinogénèse a été suspectée (145). Dans cette étude il a été montré que APRIL était exprimée par plusieurs lignées de cellules cancéreuses, dont des lignées coliques, thyroïdiennes et lymphocytaires, et que cette cytokine stimulait la prolifération cellulaire *in vivo* et *in vitro*. Depuis, de nombreuses études se sont intéressées au rôle de APRIL dans le cancer, majoritairement dans les lymphomes mais également dans des cancers solides.

TACI et BCMA étant exprimés physiologiquement par les lymphocytes B, il n'est pas étonnant de les retrouver impliqués dans la LLC, les lymphomes du manteau, les lymphomes folliculaires ou encore les lymphomes B à grandes cellules (154) (370) (290) (192). L'expression de ces récepteurs varie parmi les patients présentant la même pathologie. Dans les lymphomes de Hodgkin, il a été montré que APRIL via les récepteurs TACI et BCMA entraînait une activation de la voie de NF- κ B aboutissant à une augmentation de la survie et de la prolifération cellulaire (57). Le même phénomène a été observé dans la LLC, les lymphomes folliculaires et les lymphomes de Burkitt notamment. La concentration sérique de APRIL est augmentée dans la LLC, APRIL pourrait être un marqueur biologique de pronostic et/ ou de suivi de traitement de la LLC (Planelles, 2007). APRIL pourrait également jouer un rôle dans le myélome multiple, une ses fonctions physiologiques étant la survie des plasmocytes.

Bien que le rôle de APRIL dans les pathologies hématopoïétiques semble admis, seulement quelques études se sont intéressées à l'association entre APRIL et cancers solides. Rennert *et al.* ont observé qu'une inhibition de APRIL conduisait à un arrêt de prolifération de cellules cancéreuses coliques (340). Une augmentation de APRIL a été observée chez environ 50% de patients présentant différentes tumeurs solides (259). APRIL interagirait avec les HSPGs présents au niveau de ces tissus. Plus récemment, deux modèles murins d'étude de carcinogénèse colique exprimant la cytokine APRIL humaine ont été développés (218). L'expression ectopique de APRIL dans ces modèles augmente le nombre et la taille des lésions carcinomateuses coliques, ce qui est en faveur du rôle de APRIL dans le cancer colo-rectal.

III. APRIL et lymphome gastrique du MALT

Le rôle de APRIL dans le LGM a fait l'objet de très peu d'études. Planelles *et al.* ont observé une augmentation d'expression de cette cytokine dans le LGM (323). Les macrophages infiltrant tumeur produisent APRIL dans les LGM dépendants de *H. pylori* suite à la stimulation par les antigènes bactériens et les lymphocytes T (277) (Figure 23). Cette production est induite par *H. pylori* et les lymphocytes T spécifiques de *H. pylori*. Suite à l'éradication de *H. pylori*, il a été observé une diminution importante des macrophages produisant APRIL (277).

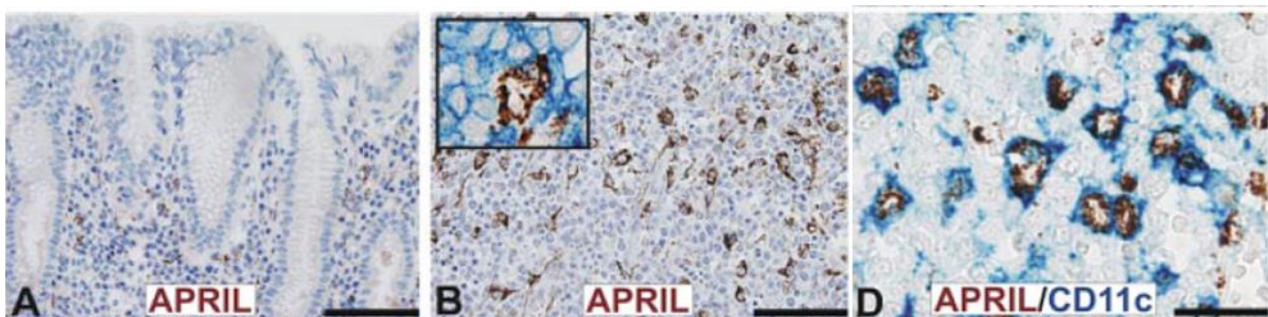


Figure 23 : Production de APRIL par les macrophages infiltrant la tumeur. Coupes histologiques d'une muqueuse gastrique normale (A) et d'une muqueuse gastrique présentant des infiltrats lymphoïdes (B-D). Une faible quantité de APRIL est détectée par immunohistochimie dans la muqueuse gastrique normale au niveau de la lamina propria (A), alors que APRIL est présente en quantité importante en cas de LGM (B). Un co-marquage permet de démontrer que les cellules produisant APRIL expriment CD11c (D) (en plus de CD68 et CD163), phénotype des macrophages. D'après Munari *et al.* (277)

IV. Objectifs de notre étude

Les données obtenues en modèle de souris d3Tx nous ont permis d'envisager un lien entre la dérégulation de certains membres de la famille du TNF et la lymphomagenèse gastrique. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons souhaité développer un modèle alternatif de LGM, plus facile à mettre en place que celui basé sur la thymectomie néonatale. Notre choix s'est porté sur des souris C57BL6 et BALB/c exprimant APRIL humain au niveau des lymphocytes T grâce à un promoteur spécifique (389). Nous avons au préalable vérifié par qRT-PCR que cette cytokine était bien surexprimée dans les souris d3Tx au stade lymphome. Une collaboration a été établie avec l'équipe ayant généré ce modèle (Dr M Hahne, Institut de Génétique Moléculaire de Montpellier (IGMM)-UMR5535, Université de Montpellier).

Nous avons en effet posé l'hypothèse que l'infection par *Helicobacter* dans des souris exprimant au niveau de leurs lymphocytes T une cytokine permettant d'aider *in vivo* les lymphocytes B à proliférer, permettrait de dépasser « le frein » observé dans les souris BALB/c non thymectomisées à développer un LGM.

Nos objectifs étaient d'évaluer : 1-dans les 2 fonds génétiques C57BL6 et BALB/c l'inflammation et l'évolution histologique induites par deux espèces du genre *Helicobacter* (*H. felis* versus *H. pylori*) ; 2- si APRIL favorise l'apparition de LGM chez ces souris.

V. Résumés des principaux résultats

Trois groupes égaux pour chaque modèle (WT ou Tg APRIL) ont été constitués avec *H. pylori* (souche de LGM, B47), *H. felis*, ou non infecté. Les souris ont été sacrifiées à 18 mois post-infection. Nous ne présentons ici, sous la forme d'un projet d'article, que les résultats obtenus dans la lignée C57BL6, les résultats en fond génétique BALB/c étant préliminaires.

Par cytométrie, les souris WT infectées présentent une infiltration leucocytaire moins importante que les souris Tg APRIL, majoritairement T CD4⁺ pour *H. pylori* ou T CD8⁺ pour *H. felis*. Pour les souris Tg APRIL infectées, les infiltrats leucocytaires sont majoritairement B accompagnés de lymphocytes T, majoritairement CD4⁺. Les lymphocytes B expriment les marqueurs de surface de lymphocytes B de la zone marginale (CD5⁻, CD21⁺, IgM⁺).

Ces données ont été confirmées par les analyses histologiques. Les souris WT infectées par *H. felis* présentent une inflammation gastrique plus importante que celles infectées par *H. pylori*. L'évolution histologique est particulièrement spectaculaire dans les souris Tg APRIL infectées par *H. felis* avec notamment la présence d'infiltrats lymphoïdes massifs. L'évolution histologique est moins extensive

pour *H. pylori* avec néanmoins des infiltrats B de grande taille. Les estomacs des souris non-infectées ne présentent pas de signes d'inflammation.

Ces résultats confirment notre hypothèse quant à l'importance de APRIL dans le fond génétique C57BL6, dans la genèse *in vivo* d'infiltrats lymphoïdes au sein d'estomacs infectés par des bactéries du genre *Helicobacter*.

Ces données sont présentées sous la forme d'un projet d'article.

1 **A new animal model of gastric lymphomagenesis: APRIL transgenic mice infected by**
2 ***Helicobacter* species.**

3 Pauline Floch¹, Julien Izotte¹, Julien Guillemaud¹, Elodie Sifré¹, Pierre Costet², Benoit
4 Rousseau², Amandine Marine Laur¹, Alban Giese¹, Francis Mégraud¹, Pierre Dubus¹, Michael
5 Hahne³, Philippe Lehours¹

6 ¹Université de Bordeaux, INSERM UMR1053, Bordeaux Research in Translational
7 Oncology, BaRITOn, Bordeaux, France

8 ²Université de Bordeaux, Animal facilities. Bordeaux, France

9 ³Université de Montpellier, Institut de Génétique Moléculaire de Montpellier (IGMM)-
10 UMR5535, Montpellier, France

11

12 Conflicts of interest: The authors disclose no conflicts.

13

14 Corresponding author: Pr Philippe Lehours, Université de Bordeaux, INSERM UMR1053,
15 Bordeaux Research in Translational Oncology, BaRITOn, Bordeaux, France;
16 philippe.lehours@u-bordeaux.fr.

17 **Abstract**

18 APRIL (a proliferation inducing ligand) is a TNF family member involved in the regulation of
19 B cell immunity. In the present study, we studied the infection by *Helicobacter* species in
20 transgenic (Tg) C57BL6 mice ectopically expressing the human form of APRIL. For this,
21 wild type (WT) and APRIL Tg mice were infected or not with the two species
22 *Helicobacter felis* and *Helicobacter pylori*. Mice were sacrificed 18-months post-infection
23 and analyzed for inflammatory responses and histological alterations. Flow cytometry results
24 showed that WT-infected mice exhibited less leukocyte infiltration than APRIL Tg-infected
25 mice. In WT-infected mice, infiltrates were predominantly comprised of T cells, mainly CD4⁺
26 for *H. pylori* and CD8⁺ for *H. felis*. In APRIL Tg-infected mice, leukocyte infiltrates were
27 composed of B cells with few CD4⁺ T cells for both species. B cells expressed B surface
28 markers compatible with a marginal zone origin. These results were confirmed by
29 immunohistochemistry. B cells were particularly involved in lymphoepithelial lesions, a
30 hallmark of gastric MALT lymphoma. Monoclonality was observed in a minority of
31 infiltrates when lymphoepithelial lesions were present. The APRIL Tg-infected mice harbored
32 higher levels of bacterial colonization compared to the WT animals.

33 These results confirm the importance of APRIL *in vivo* in the development of gastric
34 lymphoid infiltrates induced by *Helicobacter* species. We believe that APRIL transgenic mice
35 infected by *Helicobacter* species may represent an original animal model of gastric
36 lymphomagenesis which is more convenient to use than previously described models.

37

38 **Keywords:** MALT lymphoma, *Helicobacter*, APRIL, animal model.

39 Introduction

40 Extranodal marginal zone lymphomas of the mucosa-associated lymphoid tissue (MALT)
41 type are indolent, low-grade, mature small B-cell non-Hodgkin lymphomas which occur in a
42 number of extranodal organs including the gastrointestinal tract (19). Among these, the
43 stomach is the most frequent site for MALT lymphoma development. Gastric MALT
44 lymphoma (GML) in humans is directly related to infection by *Helicobacter pylori*, but it
45 only appears in a small subset of infected individuals (39). *H. pylori* eradication leads to a
46 complete remission in 60 to 80% of the cases (44). Chronic antigenic stimulation exerted by
47 *H. pylori* on the gastric mucosa leads to the formation of dense lymphoid infiltrates
48 containing small centrocytic B cells expressing surface markers typical of the marginal zone
49 B cells of normal MALT. B cells are organized in lymphoid follicles, and are involved in
50 lymphoepithelial lesions (LELs), characterized by the invasion of the epithelium of the gastric
51 glands by proliferating B cells and epithelial cells destruction (45). Non-neoplastic T
52 lymphocytes are associated with lymphoma cells with a predominance of CD4⁺ T-helper cells
53 (12).

54 To better understand mechanisms that promote gastric lymphomagenesis and due to the
55 difficulty in obtaining primary xenografts from surgical specimens of GML patients, animal
56 models were developed. Three *Helicobacter* species, *Helicobacter felis* (10) (9) (26) (25),
57 *Helicobacter heilmannii* (26) (28) (13) (32) and *H. pylori* (42) (26) (43) (38) (6), and three
58 rodents, C57BL6 (42) (32) and BALB/c mice (10) (9) (42) (26) (43) (28) (38) (25) and
59 Mongolian gerbils (13), were mainly used.

60 At 18 to 24 months post-infection (PI), *H. felis*-infected BALB/c mice develop histological
61 lesions evocative of GML, composed of B cells with some infiltrating T cells (mainly CD4⁺)
62 associated with LELs (10) (26). *H. heilmannii* induced the development of GML to various
63 degrees (25 to 66% of infected animals) and at a later time after infection (18 to 24 months
64 PI) in BALB/c (26) (28), C57BL6 (10) (32), or Mongolian gerbils (13). For *H. pylori*, the
65 *Helicobacter* species mostly found in human GML, the situation is more complex. C57BL/6
66 mice were first described as a model of high-grade GML (42), whereas BALB/c mice were
67 described as a model of low-grade GML (26) (43) (38). Only a small percentage (<20%) of
68 infected BALB/c mice developed lymphomas 24 months PI, rendering this model difficult to
69 use. More recently BALB/c mice that underwent thymectomy at day 3 after birth (d3Tx) have
70 been described as an alternative model with a much earlier onset of gastric lymphomagenesis
71 (6). d3Tx BALB/c mice infected with *H. pylori* strains developed histological characteristics

72 of GML at 12 months PI in 60% of cases, whereas non-infected mice and infected non-
73 thymectomized mice did not (6). Neonatal thymectomy seems to be an interesting model to
74 study the pathophysiology of GML but is very difficult to implement in practice.

75

76 Previous studies have demonstrated the implication of a proliferation-inducing ligand
77 cytokine named APRIL, in the induction and maintenance *in vivo* of B cell immunity and in
78 the survival and proliferation of B cells (8). APRIL promotes antigen presentation to B cells
79 via increasing expression of co-stimulatory molecules such as CD40 (47). In Hodgkin
80 lymphoma APRIL activates the NF-kappa B pathway and promotes the expression of anti-
81 apoptotic proteins (BCL-2, BCL-xL and MYC) via TACI and BCMA receptors, resulting in
82 an increased survival and cell proliferation (5). The same observation was shown in CLL,
83 follicular lymphoma and Burkitt lymphomas. Recently, Munari *et al.* reported that high levels
84 of APRIL were produced by tumor-infiltrating macrophages in a *H. pylori* dependent GML
85 case, and that macrophages produced APRIL following direct stimulation with both *H. pylori*
86 and *H. pylori* T cells (27). The number of APRIL-producing macrophages was reduced after
87 lymphoma regression induced by *H. pylori* eradication. APRIL is a tumor necrosis factor
88 (TNF) superfamily member known to be important for B cell development, maturation and
89 survival. Interestingly, several members of the TNF superfamily such as APRIL, BAFF or
90 TACI, a receptor for APRIL, were found to be overexpressed in *H. pylori*-d3Tx infected mice
91 at the GML stage (14).

92 To study the role of APRIL during *Helicobacter* infection we employed previously described
93 APRIL Tg mice (35). APRIL acts as a secreted factor by T cells and therefore systemically in
94 this mouse strain. We hypothesized that infection with *Helicobacter* (*H. felis* versus *H. pylori*)
95 in mice ectopically expressing APRIL would override the natural "brake" observed in WT
96 animals, and therefore allow lymphoid infiltration. The results presented in this study show
97 that APRIL transgenic mice infected by *Helicobacter* species is indeed a novel animal model
98 of gastric lymphomagenesis, which might be alternatively used to previously described
99 models.

100 **Materials and methods**

101 **Mice**

102 *Helicobacter*-free C57BL6 mice were obtained from Charles River Laboratories (L'Arbresle,
103 France). APRIL Tg C57BL6 mice were provided by Dr. Michael Hahne (Université de
104 Montpellier, Institut de Génétique Moléculaire de Montpellier (IGMM)-UMR5535) (35) and
105 bred under specific pathogen-free conditions in level 1 facilities at the University of Bordeaux
106 (Bordeaux, France). All experiments were performed in level 1 and level 2 animal facilities at
107 the University of Bordeaux with the approval of institutional guidelines determined by the
108 local ethical committee of the University of Bordeaux and in conformity with the French
109 Ministry of Agriculture Guidelines on Animal Care and the French Committee of Genetic
110 Engineering (approval number 50120143-A). Only female neonates were used for
111 experiments.

112

113 ***Helicobacter* species strains and infection experiments**

114 *H. pylori* strain B47, a *H. pylori* *cag* pathogenicity island (PAI)-negative GML-associated
115 strain, was used for its ability to colonize mice stomachs (24) (37) and to induce GML-lesions
116 as previously described (6). *H. felis* CS1 (ATCC 49179) was used for its capacity to induce
117 severe inflammation and GML-lesions in mouse models.

118 *H. pylori* and *H. felis* strains were cultured under microaerobic conditions (N₂, 85%; O₂, 5%;
119 CO₂, 10%) at 37°C, as previously described (11).

120 For infection inocula, *H. pylori* and *H. felis* strains were grown on selective agar plates and
121 transferred to brucella broth medium. Six-week-old mice were fasted to facilitate bacterial
122 colonization and then force-fed for 3 consecutive days with a dose of either 10⁸ *H. pylori* or
123 10⁸ *H. felis* per mouse, as previously described (20 mice for each group) (40).

124 At the end of the experiment, 18 months PI, half of the stomach of every mouse was fixed in
125 formaldehyde, a small part was frozen at -80°C, and the remainder was used for flow
126 cytometry analysis.

127

128 **Flow cytometry analysis of stomach samples**

129 Stomachs were cut into small fragments that were then subjected to two 20 min incubation
130 cycles with gentle shaking at 37°C in 10 mL HBSS (Ca²⁺Mg²⁺ free) (Gibco, Life
131 Technologies, Saint Aubin, France) + 1 mmol/L HEPES (Gibco, Life Technologies) +
132 1 mmol/L dithioerythritol (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) + 10% fetal

133 bovine serum (FBS) (Sigma-Aldrich). Debris was removed by passage through a 70 μ m
134 Falcon Cell Strainer (BD Biosciences). After filtration, the cells were centrifuged at 1,870 x g
135 for 5 min at 4°C, the supernatant was discarded, and the cells were washed twice in 10 mL of
136 RPMI 1640 medium (GlutaMAX; Gibco, Life Technologies) + 8% FBS before staining. All
137 cell suspensions were incubated with DAPI in order to assess cell viability (Invitrogen, Cergy
138 Pontoise, France) in a volume of 10 mL PBS + 0.5% bovine serum albumin (BSA) (Gibco,
139 Life Technologies) + 2 mmol/L EDTA (Sigma-Aldrich) for 15 min at 4°C. All labelled
140 antibodies were purchased from PharMingen/BD Biosciences. T lymphocytes were
141 characterized using CD45-APC (clone 30-F11), CD3 ϵ -FITC (clone 145-2C11), CD8a-PECy7
142 (clone 53-6.7), and CD4-APC (clone RM4-5). B lymphocytes were characterized using
143 CD21/CD35-APC (clone 7G6), CD5-FITC (clone 53-7.3), IgM-PECy7 (clone R6-60.2), and
144 B220-PE (clone RA3-6B2). Cells were washed once and analyzed on a LSRFortessa flow
145 cytometer (BD Biosciences) using FACS Diva software version 8.0.1 (BD Biosciences).

146

147 **Histological and immunohistochemistry experiments**

148 Tg and WT mice were sacrificed at 18 months PI. Half of the stomach was fixed in
149 formaldehyde. Sections (3 μ m thick) from paraffin-embedded tissues were processed for
150 hematoxylin and eosin (H&E) staining. H&E stained sections were coded and examined
151 blindly by a pathologist (P.D.) for the presence of lymphoid infiltrates and LELs. These
152 features were graded on a 0 to 3-point scale, according to the following criteria (26): for
153 lymphocytic infiltration: 0, no change; 1, single or few small aggregates of lymphocytes; 2,
154 multiple multifocal large lymphoid aggregates or follicles; and 3, extensive multifocal
155 lymphocytic infiltration often extending through the depth of mucosa, resulting in distortion
156 of the epithelial surface, as previously described (6). Hyperplasia, oxyntic gland atrophy, and
157 mucinous as well as pseudo-intestinal metaplasia were scored using a scale of 1 to 4, as
158 previously described (40).

159 For immunohistochemistry (IHC), sections (3 μ m thick) from paraffin-embedded tissue were
160 rehydrated, washed, and heated to 100°C for 30 min and then brought to room temperature for
161 30 min for antigen retrieval using a buffer (pH 6 for CD45R staining; pH 9 for CD3 ϵ and E-
162 cadherin staining). Endogenous peroxidases were inhibited with 3% hydrogen peroxide
163 (Sigma-Aldrich) in water for 5 min, and blocking with 2.5% normal goat (for CD45R) or
164 horse (for CD3 ϵ and E-cadherin) serum (ImmPRESS Reagent kit peroxidase, vector
165 laboratories, Burlingame, CA, USA) was performed for 30 min. B lymphocytes were

166 identified with the rat monoclonal antibody anti-CD45R (1:100, clone RA3-6B2; Santa Cruz,
167 CA, USA), and T cells with a polyclonal goat anti-CD3 ϵ (1:1000, clone M-20; Tebu-bio). A
168 gastric cell-cell adhesion protein, E-cadherin, was detected by a polyclonal mouse antibody
169 anti-E-cadherin (1:200, clone 36/E-cadherin; BD Biosciences, San Jose, CA, USA). After 1h
170 incubation at room temperature, these primary antibodies were revealed using ImmPRESS
171 reagent peroxydase (ImmPRESS Reagent kit peroxydase, vector laboratories), and revealed
172 by an additional 10 min incubation with liquid diaminobenzidine Substrate-Chromogen
173 System (Dako, Copenhagen, Denmark) at room temperature. All slides were counterstained
174 with hematoxylin, dehydrated, and mounted with Eukitt mounting medium (Labonord; VWR
175 International, Fontenay-sous-Bois, France).
176 Slides were scanned using a digital slide scanner (Panoramic SCAN; 3DHISTECH Ltd,
177 Budapest, Hungary) equipped with a Zeiss objective (Plan-Apochromat 40; numerical
178 aperture, 0.95; Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Germany) and a high-resolution color
179 camera (VCC-FC60FR19CL, 4MP, CIS Corporation, Japan) available at the Experimental
180 Histopathology Platform, US 005 UMS 3427-TBM CORE. The images were read using the
181 Panoramic Viewer software version 1.15.4 (3DHISTECH Ltd).

182

183 **DNA extraction and PCR amplification of the immunoglobulin heavy chain**

184 DNA extraction and immunoglobulin heavy chain amplification were performed for all
185 APRIL Tg mice sacrificed at 18 months PI. Genomic DNA was extracted with MagNA Pure
186 96 (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) from the murine stomach specimen stored at -
187 80°C.

188 To detect immunoglobulin D-JH rearrangement, PCR was performed in a reaction volume of
189 25 μ L containing 5 μ L of DNA extract (5 ng/ μ L), with a mixture of 1X PCR buffer (GoTaq;
190 Promega, Charbonnières, France), 1 μ mol/L of each primer [DSF, 5'-
191 AGGGATCCTTGTGAAGGGATCTACTACTGTG-3', JH4, 5'-
192 AAAGACCTGCAGAGGCCATTCTTACC-3' (Eurofins, Nantes, France), described by
193 Kawamoto *et al.* (20)], 125 μ mol/L of dNTPs (Promega), and 0.625 U of Go Taq G2 Hot
194 Start polymerase (Promega). DNAs extracted from mice with B cell lymphoma were used as
195 a positive control (a kind gift of Dr. Yves Denisot, University of Limoges, Limoges, France).
196 PCRs started with a 95°C DNA denaturation step for 2 min, followed by 40 cycles comprising
197 3 steps: a denaturation at 94°C for 30 sec, a primer hybridization at 58°C for 30 sec, and an
198 elongation at 72°C for 1.5 min. Amplified DNA products were loaded onto a 1% agarose gel

199 containing Midori Green Advance DNA Stain (Nippon Genetics, Düren, Germany) and were
200 also analyzed by Agilent D5000 ScreenTape System (Agilent Technologies, Santa-Clara, CA,
201 USA) with a 2200 TapeStation instrument (Agilent Technologies) using TapeStation
202 Controller Software (Agilent Technologies).

203 A polyclonal profile was defined by the presence of several rearrangements on the CDR3
204 region of the *IgH* gene and represented by amplicons of different sizes of comparable
205 intensity. An oligoclonal profile was defined by the restriction of the number of PCR
206 fragments and a monoclonal profile by one single PCR amplicon.

207

208 **Quantitative PCR to determine the bacterial load in gastric biopsies**

209 A quantitative PCR using Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) technology
210 targeting DNA coding for *H. pylori* 23S ribosomal RNA (rRNA) previously developed in the
211 laboratory (29) was performed. Primers described by Oleastro *et al.* were used to amplify the
212 23S rRNA gene (29) and primers described by Laur *et al.* were used to amplify the
213 glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) gene (22). Each target was tested in
214 duplicate on all samples. A standard curve was prepared using serial dilutions of a DNA
215 extract from a CFU/mL calibrated bacterial suspension of the *H. pylori* SS1 strain. The
216 LightCycler® 480 SYBR® Green I Master Mix (Roche Diagnostics), compatible with the
217 LightCycler® 480 thermocycler (Roche Diagnostics), was used according to the
218 manufacturer's instructions and as previously described (6).

219 A quantitative PCR using FRET technology targeting DNA coding for *H. felis flaA* was
220 developed. Primers described by Burkitt *et al.* were used to amplify the *flaA* gene (3). Each
221 target was tested in duplicate on all samples. A standard curve was prepared using serial
222 dilutions of a DNA extract from a CFU/mL calibrated bacterial suspension of the *H. felis* CS1
223 strain. The SYBR® Premix Ex Taq™ Mix (Tli RNaseH Plus) (Takara, Saint-Germain-en-
224 Laye, France) compatible with the PCR thermocycler CFX96™ (Bio-Rad) available at the
225 TBMCORE real-time PCR platform (University of Bordeaux) was used according to the
226 manufacturer's instructions. The PCR started with a 95°C DNA denaturation step for 3 min,
227 followed by 40 cycles comprising 2 steps: a 95°C denaturation step for 5 sec and a 60°C
228 primers' hybridization step for 30 sec. After each cycle, fluorescence was measured in order
229 to quantify newly synthesized DNA. At the end of the procedure, a melting curve was
230 generated by a slow elevation in the temperature from 65 to 95°C and the continuous
231 measurement of fluorescence. The generation of this melting curve permitted the verification

232 of one specific peak at the expected melting temperature for each product, which showed the
233 PCR specificity. The final results were expressed as a ratio of bacteria/murine cells.

234 DNA extracted from the m-ICcl2 murine epithelial cell line available in the laboratory was
235 used to express results as a ratio of bacteria/murine cells. The method's detection limit was
236 around 0.001 bacteria/murine cell for *H. pylori* and 0.002 bacteria/murine cell for *H. felis*.

237

238 **Statistical analysis**

239 Statistical analyses were performed with GraphPad Prism 5.01 (GraphPad Software, Inc., La
240 Jolla, CA, USA). Means were compared by the non-parametric Mann-Whitney test.
241 Differences were considered significant when p was inferior to 0.05 (*p<0.05).

242 **Results**

243 **Macroscopic appearance of mice stomachs**

244 The external appearance of the stomachs of non-infected and infected mice did not differ 18
245 months PI (Figure 1A, B and C). The thickness of the stomach was, however, larger in
246 infected APRIL Tg mice, particularly in those infected by *H. felis*, compared to non-infected
247 APRIL Tg mice (Figure 1A and C). All the 10 *H. felis* APRIL Tg mice and 9 of the 14
248 *H. pylori*-infected APRIL Tg mice (64.3%) had a thicker and more rigid stomach. The gastric
249 mucosa of non-infected mice (WT and APRIL Tg) showed less visible changes (6/13 *H. felis*
250 APRIL Tg mice (46.2%) and 2/16 *H. pylori*-infected APRIL Tg mice (12.5%)). However,
251 some infected APRIL Tg mice presented small (in *H. pylori* APRIL Tg mice) to numerous (in
252 *H. felis* APRIL Tg mice) round nodules in the corpus (Figure 1B and C). These nodular
253 aspects were compatible with the infiltration of the gastric mucosa by lymphoid follicles as
254 described by others (25).

255

256 **Characterization of leukocyte infiltration located in the gastric mucosa of WT and** 257 **APRIL Tg mice 18 months after infection determined by flow cytometry**

258 To provide quantitative information on the relative frequency of leukocyte subsets and to
259 investigate surface markers that cannot be studied by IHC because of the lack of
260 commercialized and/or validated antibodies for paraffin-embedded biopsy specimens from
261 mice, flow cytometric analysis was systematically performed on non-infected and infected
262 WT and APRIL Tg mice stomachs 18 months PI.

263 Non-infected WT and APRIL Tg mice did not develop leukocyte infiltration ($0.7\% \pm 0.3$ and
264 $0.6\% \pm 0.4$, respectively) (Figure 1D). Infected WT ($2.5\% \pm 1.4$ for *H. pylori*-infected mice
265 and $8.8\% \pm 6.3$ for *H. felis*-infected mice) and APRIL Tg mice ($19.1\% \pm 13.0$ for *H. pylori*-
266 infected mice and $28.6\% \pm 5.8$ for *H. felis*-infected mice) developed significant leukocyte
267 infiltration compared to their respective non-infected group. This infiltration was significantly
268 higher in *H. felis*-infected mice compared to *H. pylori*-infected mice for WT and Tg mice
269 (Figure 1D).

270 For *H. pylori*- and *H. felis*-infected WT mice, most lymphocytes were T cells ($CD3^+$) (71.5%
271 $\pm 9.8\%$ and $68.7\% \pm 16.8$, respectively), unlike APRIL Tg mice where a predominant B
272 infiltration ($B220^+$) was observed ($64.6\% \pm 19.9$ for *H. pylori*-infected mice and $78.7\% \pm 4.8$
273 for *H. felis*-infected mice) (Figure 1E). In infected APRIL Tg mice, B lymphocytes were

274 mostly CD5⁻, CD21⁺, and IgM⁺, a typical phenotype of marginal zone B cells (69.8% ± 16.0
275 for *H. pylori*-infected mice and 71.0% ± 3.6 for *H. felis*-infected mice). In *H. pylori*-infected
276 WT and APRIL Tg mice, CD4⁺ T cells predominated over CD8⁺ T cells (CD4/CD8 ratio: 2.2
277 ± 1.2 and 2.0 ± 0.8, respectively). Surprisingly, *H. felis*-infected WT mice exhibited a clear
278 CD8⁺ T cell infiltration (CD4/CD8 ratio: 0.6 ± 0.2) in opposition to their APRIL Tg-*H. felis*-
279 infected mice counterparts where a clear switch towards CD4⁺ T cells was found (CD4/CD8
280 ratio: 2.8 ± 1.3) (Figure 1F).

281 In conclusion, APRIL promotes B cell infiltration with a marginal zone phenotype in
282 *H. pylori*- and *H. felis*-infected mice as well as the recruitment of T helper lymphocytes
283 (CD4⁺) in *H. felis*-infected mice.

284

285 **Histological and inflammatory aspects during *H. pylori* and *H. felis* infection in WT and** 286 **APRIL Tg C57BL6 mice 18 months after infection**

287 Non-infected WT and APRIL Tg mice did not develop signs of gastric inflammation or any
288 other pathological alterations 18 months PI (Figures 2, 3A and 3B). At 18 months PI, a
289 moderate leukocyte infiltration (median scores <2) and a few scattered small lymphoid
290 infiltrates were observed in stomachs of *H. pylori*-infected WT mice. No significant epithelial
291 lesions and LELs were observed in this group. These histological aspects were compatible
292 with a gastritis stage. *H. felis*-infected WT mice showed more inflammation and lymphoid
293 infiltrates than *H. pylori*-infected WT mice. Leukocyte infiltration present at the base of the
294 mucosa was composed of polymorphonuclears with some B lymphocytes and T lymphocytes.
295 T lymphocytes were observed within the gastric mucosa, alongside glands (Figures 3C, 3E
296 and 4A), an aspect compatible with a lymphocytic gastritis.

297 At 18 months PI, *H. pylori*- and *H. felis*-infected APRIL Tg mice showed more inflammation
298 and lymphoid infiltrates than their respective infected WT mice counterparts (Figure 3D, 3F).
299 Extensive multifocal lymphocytic infiltrations deforming the gastric mucosa were observed in
300 *H. pylori*- and *H. felis*-infected mice (Figure 3D, 3F). They were composed of a majority of B
301 lymphocytes surrounded or including areas with T cells (Figure 4 B and 4D). The presence of
302 LELs was investigated by using H&E and E-cadherin IHC staining (Figure 4B and 4D).
303 Overall, LELs were found in 5/12 (41.7%) *H. pylori*-infected APRIL Tg mice and 7/10 (70%)
304 *H. felis*-infected APRIL Tg mice, while no LELs were detected in WT mice.

305

306 Concerning epithelial disturbances, *H. felis* induced significant oxyntic gland atrophy
307 associated with hyperplasia, mucinous metaplasia, pseudo-intestinal metaplasia and dysplasia
308 in both the WT or APRIL Tg mice (Figure 3), a set of alterations compatible with established
309 gastritis and the preneoplastic stage. *H. pylori*-infected WT mice showed no significant
310 epithelial disturbances, however there was a clear effect of the APRIL Tg background on
311 oxyntic gland atrophy associated with hyperplasia, mucinous metaplasia, pseudo-intestinal
312 metaplasia and dysplasia scores, although less spectacular than for the *H. felis*-infected
313 APRIL Tg mice (Figure 2).

314 In conclusion, we confirmed by histological and immunohistochemistry experiments that
315 *Helicobacter* infection promotes B cell proliferation and lymphoid infiltrate formation in
316 APRIL Tg mice only. *H. felis* was more aggressive on the gastric mucosa as we found these
317 lymphoid infiltrates often associated with preneoplastic lesions. Presence of LELs in the
318 majority of the infected Tg mice supports the hypothesis that APRIL may promote B
319 lymphoma development.

320

321 **Evaluation of B lymphocyte clonality**

322 Amplification of the CDR3 region of the *IgH* gene was used to study the level of clonality of
323 infiltrating B cells in the stomachs of all APRIL Tg mice at 18 months PI. No amplification or
324 polyclonal profile was observed in non-infected APRIL Tg mice (n=9). A polyclonal profile
325 was found in 100% (14/14) of the *H. pylori*-infected APRIL Tg mice and 70% (7/10) of the
326 *H. felis*-infected APRIL Tg mice. Ten percent (1/10) of *H. felis*-infected APRIL Tg mice
327 showed an oligoclonal profile and 20% (2/10) had a monoclonal profile with a single band
328 observed. LELs were present in the 3 mice with monoclonal or oligoclonal profiles. Thus
329 *H. felis* appeared more efficient to induce GML-like lesions.

330

331 **Estimation of the bacterial load in gastric biopsies from infected mice**

332 The comparison of bacteria-to-cell ratios between *H. pylori*- and *H. felis*-infected WT and
333 APRIL Tg mice is shown in Figure 5. WT and APRIL Tg mice were infected at 6 weeks of
334 age with the same bacterial inoculum of *H. pylori* or *H. felis* per mouse for 3 consecutive
335 days. At 18 months PI bacteria/cell ratios were more than 100 times lower in *H. pylori*-
336 infected WT mice (with 11 mice negative among the 16 mice analyzed) than in APRIL Tg
337 mice (average bacteria/cell = 0.08635 (n=14, with *H. pylori* detected in all)) (p < 0.05)
338 (Figure 5A).

339 To verify these results, DNAs were extracted from 5 mice sacrificed at 12 months PI in order
340 to check the kinetics of the disease for both *Helicobacter* species in this new animal model.
341 Again bacteria/cell ratios were 10 times lower in *H. pylori*-infected WT mice (with 2 mice
342 negative among the 5 mice analyzed) than in APRIL Tg mice (average bacteria/cell =
343 0.00258, with *H. pylori* detected in 4 of the 5 mice) ($p < 0.05$) (Figure 5A). *H. pylori*
344 colonization was also higher at 18 months PI versus 12 months PI in APRIL Tg mice ($p <$
345 0.05).

346 This phenomenon was even more marked in *H. felis*-infected mice (Figure 5B): at 12 months
347 PI, bacteria/cell ratios were 100 times lower in infected WT mice (with 4 mice negative
348 among the 5 analyzed) than in APRIL Tg mice (average bacteria/cell = 0.13644, with *H. felis*
349 detected in 4 of the 5 mice) ($p < 0.05$). At 18 months PI, bacteria/cell ratios were 1,000 times
350 lower in infected WT mice (with 7 mice negative among the 13 analyzed) than in APRIL Tg
351 mice (average bacteria/cell = 0.40870, with *H. felis* detected in all mice (n=10)) ($p < 0.05$).

352 In conclusion, for most of the WT infected animals the bacterial inoculum was eliminated or
353 under the detection limit. Altogether, these results highlight the influence of the inflammatory
354 response on bacterial persistence in *Helicobacter*-infected APRIL Tg mice.

355 Discussion

356 From the first time APRIL was described, its association with carcinogenesis was suspected
357 (16). Overexpression of APRIL was detected in numerous B cell lymphomas including
358 lymphocytic leukemia (CLL), diffuse large B-cell lymphoma, mantle cell lymphoma and
359 Hodgkin lymphoma (31). High levels of APRIL were also observed in *H. pylori* dependent
360 GML (27), in which it was produced by tumor-infiltrating macrophages upon direct
361 stimulation with both *H. pylori* and *H. pylori* T cells (27). A model of APRIL transgenic mice
362 specifically expressing human APRIL in T cells was previously described (35) but never after
363 infection by *Helicobacter* species. In the present study, we showed that *Helicobacter* species
364 infection promotes the development of some typical histological lesions (namely, massive B
365 lymphoid infiltrates associated with LELs), considered as a characteristic of a lymphoma
366 stage, in gastric mucosa of APRIL Tg C57BL6 mice. WT C57BL6 mice did not develop these
367 lesions. These results confirm our hypothesis on the importance of the deregulation of APRIL
368 in the development of gastric lymphoid infiltrates induced by *Helicobacter* species.

369

370 Our first observation was the resistance of WT C57BL6 mice to develop GML-like lesions
371 even 18 months PI by *H. pylori* or *H. felis*. Previous studies have indeed described that these
372 mice developed high-grade GML after *H. pylori* infection (42) (43). Others found that *H. felis*
373 induced GML-like lesions in BALB/c mice at 22 months PI (10) (26) or even gastric
374 adenocarcinoma in C57BL6 mice (4). All of these descriptions should be considered with
375 caution, as the criteria used to define GML or even gastric adenocarcinoma are sometimes
376 lacking, e.g. only histological analyses were performed without precise characterization of
377 infiltrating lymphoid cells (42). That is the reason why, as in our previous study, we took care
378 to show not only big lymphoid infiltrates made of B cells, but also LELs and immunological
379 surface markers for B cells of marginal zone origin such as those found in human GML.

380 It should also be kept in mind that the *H. pylori* strain used in our study differs from those
381 used by other groups, namely *H. pylori* strains 119/95, G50 or SS1 (42) (43) used to infect
382 C57BL6 mice. Interestingly, in these studies the appearance of GML-like lesions was
383 dependent on the strain: only *H. pylori* strains 119p and G50 were able to induce lymphoma-
384 like lesions, while *H. pylori* strain SS1 was not. *H. pylori* strain B47 used in our study was
385 tested for the first time in the C57BL6 genetic background. It was originally isolated from a
386 GML patient, and is known for its ability to efficiently colonize BALB/c mice stomachs and
387 to induce GML-like lesions in neonatal thymectomized mice as described previously (6). The

388 fact that *H. pylori* strain B47 is *cagPAI* negative suggests that this important virulence marker
389 is not required for MALT pathogenesis, as already suggested (36) (24) (6); hence GML
390 appearance is possibly related to unknown stimulating bacterial antigens in a host with a
391 favorable inflammatory response such as those found in APRIL Tg C57BL6 mice. Finally,
392 the resistance of WT mice to develop GML lesions after *H. pylori* infection could be
393 explained by an earlier sacrifice point. However, we are not allowed to keep mice alive
394 beyond 18 months PI.

395 As expected, more inflammation and gastric lesions were observed with *H. felis* compared to
396 *H. pylori* in WT C57BL6 mice (33). Indeed *H. felis* is described as a more potent pro-
397 inflammatory species than *H. pylori* in mice (26). This is no doubt related to the incidence and
398 severity of GML-like lesions which varied between *H. pylori*- and *H. felis*-infected APRIL Tg
399 mice. Indeed, more extensive and severe lesions were found with *H. felis* compared to
400 *H. pylori*. In particular, *H. felis* induced preneoplastic lesions such as dysplasia even in WT
401 infected animals, whereas *H. pylori* induced lesions in infected APRIL Tg mice only.

402

403 Surprisingly, we found that for both *Helicobacter* species, the level of colonization was lower
404 in WT than in APRIL Tg animals. This was especially spectacular for *H. pylori*. As both
405 groups of mice were infected the same day and with the same bacterial suspension, we can
406 exclude a problem of oral gavage for the WT group. Our hypothesis is that the inflammatory
407 response induced in WT C57BL6 mice, and especially the induction of Th1 response, may
408 play an important role in bacterial clearance or reduction of colonization levels. It has been
409 shown that Th1 cytokines, in particular IFN γ , are essential for *Helicobacter* clearance *in vivo*
410 (34). An inflammatory balance (Th2 or Treg) may be present in infected APRIL Tg animals
411 which allows bacterial colonization, even if these mice harbored the highest inflammatory
412 scores. These results are indeed very surprising, as we showed a decrease in the level of
413 colonization with these scores in d3Tx infected animals (22). Nevertheless, for both species
414 the levels of colonization were low or sometimes undetectable in APRIL Tg-infected animals,
415 suggesting that GML appearance is dependent on a minimal level of bacterial antigens. This
416 is no doubt related to the difficulty to diagnose *H. pylori* infection at the GML stage. The
417 antigen-dependence of GML appearance in the APRIL Tg model should be tested after
418 antibiotic eradication of *Helicobacter* as already done by others (9) (25).

419 As in the C57BL6 background, the immune response is predominantly Th1-skewed following
420 *H. felis* and *H. pylori* infection (23) (41). It is therefore also of major interest to compare the

421 inflammatory responses induced by both species in WT and Tg animals in order to understand
422 the inflammatory driving forces in this new animal model and also to compare their pro-
423 lymphomagenesis properties. Some authors have indeed suggested that IFN γ is a key
424 mediator for the initiation of lymphoid follicle appearance (30) (46).

425

426 The second main point of our study is the confirmation of the importance of APRIL in the
427 development of gastric lymphoid infiltrates and GML-like lesions after *H. pylori* or *H. felis*
428 infection. Flow cytometry and histological analyses showed the presence of lymphoid
429 infiltrates with a predominance of B cells with the phenotype expected for marginal zone B
430 cell lymphoma (CD5⁻, CD21⁺, IgM⁺) (12). As previously described, there was an emergence
431 of lymphoid infiltrates associated with LELs, which constitutes a characteristic criterion. Our
432 in-depth histological analysis also revealed that *H. pylori*- and *H. felis*-infected APRIL Tg
433 mice developed mucosal atrophy, metaplasia, and dysplasia, lesions that are frequently
434 observed at the time of GML diagnosis in humans (17) (21). These lesions were not present in
435 *H. pylori*-infected WT mice. Unfortunately, oligoclonality or monoclonality of the lymphoid
436 infiltrates has been observed in only 30% of *H. felis*-infected APRIL Tg mice and in none of
437 *H. pylori*-infected mice. Despite this characteristic not being a prerequisite for the diagnosis
438 of GML (1), monoclonal B cell populations are detected in approximately 80 to 90% of
439 human GML cases (2) (18). This absence of clonality could be explained by a lack of
440 sensitivity of our detection method (DNA extraction being performed on the entire stomachs
441 and not just on the lymphoid infiltrates) or a low abundance of the clonal population among
442 the entire lymphocyte infiltrates. The sacrifices may also have been performed too early.
443 However, regarding the severity of the gastric lesions and the extensive lymphoid infiltrates in
444 APRIL Tg infected mice, it would have been difficult to keep the mice alive for a longer
445 period of time. Another explanation could be a rapid B cell proliferation induced by APRIL
446 without clonal selection.

447 We also identified indicators related to infiltrating T cells that are similar to those described in
448 human GML, especially the predominance of CD4⁺ over CD8⁺ T lymphocytes (15) (7). The
449 predominance of the former subset is compatible with helper T cell-dependent B cell
450 proliferation occurring early in low-grade GML, whereas the low number of CD8⁺ T cells is
451 consistent with the impaired cytotoxicity of tumor-infiltrating T cells described in humans (7),
452 both features contributing to lymphoma development. It is interesting to note the switch of T
453 response between *H. felis*-infected WT and APRIL Tg mice, confirming the importance of

454 CD4⁺ T cells to promote marginal zone B cell proliferation. The effect of APRIL on T cells
455 subsets during infection is novel and represents a new research axis to develop. Interestingly,
456 these T cells were mainly found among the lymphoid infiltrates in GML-developing mice
457 whereas they were scattered into the gastric mucosa in infected WT animals. This may be
458 explained by the proinflammatory response that recruits T cells which in turn help B cells to
459 proliferate in GML APRIL Tg mice or participate in epithelial disturbances in WT animals.

460

461 Another major objective of our study was to compare the ability of *H. pylori* versus *H. felis* to
462 induce GML-like lesions. *H. pylori* and *H. felis* were both able to induce lymphoid infiltrates,
463 with a predominance of B cells displaying the phenotype expected for marginal zone B cell
464 lymphoma in APRIL Tg mice, but more LELs were observed after *H. felis* infection
465 compared to *H. pylori* infection. Moreover, monoclonality or oligoclonality of B infiltrates
466 was detected only in *H. felis*-infected APRIL Tg mice. *H. felis* appeared *prima facie* more
467 efficient to induce GML-like lesions promptly. Despite the finding that *H. pylori* seemingly
468 induced GML-like lesions later than *H. felis*, preneoplastic lesions such as dysplasia were less
469 present. Therefore, histological response after infection with *H. pylori* seems to be closer to
470 that observed in humans.

471

472 In conclusion, our model is original and confirms the implication of APRIL in GML
473 development, consequently it will be easier to use and be more productive than all of the
474 previous models. Perspectives arising from the present study are multiple, in particular, the
475 understanding of inflammatory and molecular mechanisms involved in gastric
476 lymphomagenesis. APRIL Tg mice also represent an interesting model to test different
477 *H. pylori* knock-out strains for certain virulence factors associated with this disease.

478 **Acknowledgments**

479 The authors thank Vincent Pitard from the TBM-Core Cytometry Platform (University of
480 Bordeaux), Xavier Gauthereau from the TBM-Core Real-Time PCR Platform (University of
481 Bordeaux), Dr. Yves Denisot (University of Limoges, Limoges, France) for providing DNA
482 extracts from mice with B cell lymphoma for positive control, Lindsay Mégraud for English
483 revision of the manuscript. Alban Giese from the Experimental Histopathology Platform, US
484 005 UMS 3427-TBM CORE, was funded by SIRIC BRIO.

485 **References**

- 486 1. **Bacon, C. M., M. Q. Du, and A. Dogan.** 2007. Mucosa-associated lymphoid tissue
487 (MALT) lymphoma: a practical guide for pathologists. *J Clin Pathol* **60**:361-72.
- 488 2. **Bertoni, F., A. Conconi, C. Capella, T. Motta, R. Giardini, M. Ponzoni, E.**
489 **Pedrinis, D. Novero, P. Rinaldi, G. Cazzaniga, A. Biondi, A. Wotherspoon, B. W.**
490 **Hancock, P. Smith, R. Souhami, F. E. Cotter, F. Cavalli, and E. Zucca.** 2002.
491 Molecular follow-up in gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphomas: early
492 analysis of the LY03 cooperative trial. *Blood* **99**:2541-4.
- 493 3. **Burkitt, M. D., J. M. Williams, C. A. Duckworth, A. O'Hara, A. Hanedi, A.**
494 **Varro, J. H. Caamano, and D. M. Pritchard.** 2013. Signaling mediated by the NF-
495 kappaB sub-units NF-kappaB1, NF-kappaB2 and c-Rel differentially regulate
496 *Helicobacter felis*-induced gastric carcinogenesis in C57BL/6 mice. *Oncogene*
497 **32**:5563-73.
- 498 4. **Cai, X., J. Carlson, C. Stoicov, H. Li, T. C. Wang, and J. Houghton.** 2005.
499 *Helicobacter felis* eradication restores normal architecture and inhibits gastric cancer
500 progression in C57BL/6 mice. *Gastroenterology* **128**:1937-52.
- 501 5. **Chiu, A., W. Xu, B. He, S. R. Dillon, J. A. Gross, E. Sievers, X. Qiao, P. Santini,**
502 **E. Hyjek, J. W. Lee, E. Cesarman, A. Chadburn, D. M. Knowles, and A. Cerutti.**
503 2007. Hodgkin lymphoma cells express TACI and BCMA receptors and generate
504 survival and proliferation signals in response to BAFF and APRIL. *Blood* **109**:729-39.
- 505 6. **Chrisment, D., P. Dubus, L. Chambonnier, A. Hoces de la Guardia, E. Sifre, A.**
506 **Giese, M. Capone, C. Khairallah, P. Costet, B. Rousseau, C. Hubert, O. Burlen-**
507 **Defranoux, C. Varon, A. Bandeira, F. Megraud, and P. Lehours.** 2014. Neonatal
508 thymectomy favors *Helicobacter pylori*-promoted gastric mucosa-associated lymphoid
509 tissue lymphoma lesions in BALB/c mice. *Am J Pathol* **184**:2174-84.
- 510 7. **D'Elis, M. M., A. Amedei, M. Manghetti, F. Costa, C. T. Baldari, A. S. Quazi, J.**
511 **L. Telford, S. Romagnani, and G. Del Prete.** 1999. Impaired T-cell regulation of B-
512 cell growth in *Helicobacter pylori*-related gastric low-grade MALT lymphoma.
513 *Gastroenterology* **117**:1105-12.
- 514 8. **Dillon, S. R., J. A. Gross, S. M. Ansell, and A. J. Novak.** 2006. An APRIL to
515 remember: novel TNF ligands as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov* **5**:235-46.
- 516 9. **Enno, A., J. O'Rourke, S. Braye, R. Howlett, and A. Lee.** 1998. Antigen-dependent
517 progression of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT)-type lymphoma in the

- 518 stomach. Effects of antimicrobial therapy on gastric MALT lymphoma in mice. *Am J*
519 *Pathol* **152**:1625-32.
- 520 10. **Enno, A., J. L. O'Rourke, C. R. Howlett, A. Jack, M. F. Dixon, and A. Lee.** 1995.
521 MALToma-like lesions in the murine gastric mucosa after long-term infection with
522 *Helicobacter felis*. A mouse model of *Helicobacter pylori*-induced gastric lymphoma.
523 *Am J Pathol* **147**:217-22.
- 524 11. **Ferreira-Chagas, B., G. Lasne, S. Dupouy, A. Gallois, A. Morgner, A. Menard, F.**
525 **Megraud, and P. Lehours.** 2007. In vitro proinflammatory properties of *Helicobacter*
526 *pylori* strains causing low-grade gastric MALT lymphoma. *Helicobacter* **12**:616-7.
- 527 12. **Ferreri, A. J., I. Ernberg, and C. Copie-Bergman.** 2009. Infectious agents and
528 lymphoma development: molecular and clinical aspects. *J Intern Med* **265**:421-38.
- 529 13. **Flahou, B., F. Haesebrouck, F. Pasmans, K. D'Herde, A. Driessen, K. Van Deun,**
530 **A. Smet, L. Duchateau, K. Chiers, and R. Ducatelle.** 2010. *Helicobacter suis* causes
531 severe gastric pathology in mouse and mongolian gerbil models of human gastric
532 disease. *PLoS One* **5**:e14083.
- 533 14. **Floch, P., A. M. Laur, V. Korolik, D. Chrisment, D. Cappellen, Y. Idrissi, P.**
534 **Dubus, F. Megraud, and P. Lehours.** 2015. Characterisation of inflammatory
535 processes in *Helicobacter pylori*-induced gastric lymphomagenesis in a mouse model.
536 *Oncotarget* **6**:34525-36.
- 537 15. **Greiner, A., C. Knorr, Y. Qin, W. Sebald, A. Schimpl, J. Banchereau, and H. K.**
538 **Muller-Hermelink.** 1997. Low-grade B cell lymphomas of mucosa-associated
539 lymphoid tissue (MALT-type) require CD40-mediated signaling and Th2-type
540 cytokines for *in vitro* growth and differentiation. *Am J Pathol* **150**:1583-93.
- 541 16. **Hahne, M., T. Kataoka, M. Schroter, K. Hofmann, M. Irmeler, J. L. Bodmer, P.**
542 **Schneider, T. Bornand, N. Holler, L. E. French, B. Sordat, D. Rimoldi, and J.**
543 **Tschopp.** 1998. APRIL, a new ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates
544 tumor cell growth. *J Exp Med* **188**:1185-90.
- 545 17. **Herrera-Goepfert, R., J. Arista-Nasr, and A. Alba-Campomanes.** 1999. Pathologic
546 features of the gastric mucosa adjacent to primary MALT-lymphomas. *J Clin*
547 *Gastroenterol* **29**:266-9.
- 548 18. **Hummel, M., S. Oeschger, T. F. Barth, C. Loddenkemper, S. B. Cogliatti, A.**
549 **Marx, H. H. Wacker, A. C. Feller, H. W. Bernd, M. L. Hansmann, H. Stein, and**
550 **P. Moller.** 2006. Wotherspoon criteria combined with B cell clonality analysis by

- 551 advanced polymerase chain reaction technology discriminates covert gastric marginal
552 zone lymphoma from chronic gastritis. *Gut* **55**:782-7.
- 553 19. **Isaacson, P., and D. H. Wright.** 1983. Malignant lymphoma of mucosa-associated
554 lymphoid tissue. A distinctive type of B-cell lymphoma. *Cancer* **52**:1410-6.
- 555 20. **Kawamoto, H., T. Ikawa, K. Ohmura, S. Fujimoto, and Y. Katsura.** 2000. T cell
556 progenitors emerge earlier than B cell progenitors in the murine fetal liver. *Immunity*
557 **12**:441-50.
- 558 21. **Lamarque, D., M. Levy, M. T. Chaumette, F. Roudot-Thoraval, M. Cavicchi, J.**
559 **Auroux, A. Courillon-Mallet, C. Haioun, and J. C. Delchier.** 2006. Frequent and
560 rapid progression of atrophy and intestinal metaplasia in gastric mucosa of patients
561 with MALT lymphoma. *Am J Gastroenterol* **101**:1886-93.
- 562 22. **Laur, A. M., P. Floch, L. Chambonnier, L. Benejat, V. Korolik, A. Giese, P.**
563 **Dubus, F. Megraud, A. Bandeira, and P. Lehours.** 2016. Regulatory T cells may
564 participate in *Helicobacter pylori* persistence in gastric MALT lymphoma: lessons
565 from an animal model. *Oncotarget* **7**:3394-402.
- 566 23. **Lee, A., J. O'Rourke, M. C. De Ungria, B. Robertson, G. Daskalopoulos, and M.**
567 **F. Dixon.** 1997. A standardized mouse model of *Helicobacter pylori* infection:
568 introducing the Sydney strain. *Gastroenterology* **112**:1386-97.
- 569 24. **Lehours, P., A. Menard, S. Dupouy, B. Bergey, F. Richey, F. Zerbib, A. Ruskone-**
570 **Fourmestraux, J. C. Delchier, and F. Megraud.** 2004. Evaluation of the association
571 of nine *Helicobacter pylori* virulence factors with strains involved in low-grade gastric
572 mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Infect Immun* **72**:880-8.
- 573 25. **Mueller, A., J. O'Rourke, P. Chu, A. Chu, M. F. Dixon, D. M. Bouley, A. Lee, and**
574 **S. Falkow.** 2005. The role of antigenic drive and tumor-infiltrating accessory cells in
575 the pathogenesis of *helicobacter*-induced mucosa-associated lymphoid tissue
576 lymphoma. *Am J Pathol* **167**:797-812.
- 577 26. **Mueller, A., J. O'Rourke, J. Grimm, K. Guillemin, M. F. Dixon, A. Lee, and S.**
578 **Falkow.** 2003. Distinct gene expression profiles characterize the histopathological
579 stages of disease in *Helicobacter*-induced mucosa-associated lymphoid tissue
580 lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:1292-7.
- 581 27. **Munari, F., S. Lonardi, M. A. Cassatella, C. Doglioni, M. G. Cangi, A. Amedei, F.**
582 **Facchetti, Y. Eishi, M. Rugge, M. Fassan, M. de Bernard, M. M. D'Elis, and W.**

- 583 **Vermi**. 2011. Tumor-associated macrophages as major source of APRIL in gastric
584 MALT lymphoma. *Blood* **117**:6612-6.
- 585 28. **O'Rourke, J. L., M. F. Dixon, A. Jack, A. Enno, and A. Lee**. 2004. Gastric B-cell
586 mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma in an animal model of
587 '*Helicobacter heilmannii*' infection. *J Pathol* **203**:896-903.
- 588 29. **Oleastro, M., A. Menard, A. Santos, H. Lamouliatte, L. Monteiro, P. Barthelemy,**
589 **and F. Megraud**. 2003. Real-time PCR assay for rapid and accurate detection of point
590 mutations conferring resistance to clarithromycin in *Helicobacter pylori*. *J Clin*
591 *Microbiol* **41**:397-402.
- 592 30. **Riedel, S., M. Kraft, T. Kucharzik, H. G. Pauels, M. Tiemann, A. Steinbuchel, W.**
593 **Domschke, and N. Luger**. 2001. CD4+ Th1-cells predominate in low-grade B-cell
594 lymphoma of gastric mucosa-associated lymphoid tissue (MALT type). *Scand J*
595 *Gastroenterol* **36**:1198-203.
- 596 31. **Roosnek, E., M. Burjanadze, P. Y. Dietrich, T. Matthes, J. Passweg, and B.**
597 **Huard**. 2009. Tumors that look for their springtime in APRIL. *Crit Rev Oncol*
598 *Hematol* **72**:91-7.
- 599 32. **Saito, Y., H. Suzuki, H. Tsugawa, H. Imaeda, J. Matsuzaki, K. Hirata, N. Hosoe,**
600 **M. Nakamura, M. Mukai, H. Saito, and T. Hibi**. 2012. Overexpression of miR-142-
601 5p and miR-155 in gastric mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma
602 resistant to *Helicobacter pylori* eradication. *PLoS One* **7**:e47396.
- 603 33. **Sakagami, T., M. Dixon, J. O'Rourke, R. Howlett, F. Alderuccio, J. Vella, T.**
604 **Shimoyama, and A. Lee**. 1996. Atrophic gastric changes in both *Helicobacter felis*
605 and *Helicobacter pylori* infected mice are host dependent and separate from antral
606 gastritis. *Gut* **39**:639-48.
- 607 34. **Sayi, A., E. Kohler, I. Hitzler, I. Arnold, R. Schwendener, H. Rehrauer, and A.**
608 **Muller**. 2009. The CD4+ T cell-mediated IFN-gamma response to *Helicobacter*
609 infection is essential for clearance and determines gastric cancer risk. *J Immunol*
610 **182**:7085-101.
- 611 35. **Stein, J. V., M. Lopez-Fraga, F. A. Elustondo, C. E. Carvalho-Pinto, D.**
612 **Rodriguez, R. Gomez-Caro, J. De Jong, A. C. Martinez, J. P. Medema, and M.**
613 **Hahne**. 2002. APRIL modulates B and T cell immunity. *J Clin Invest* **109**:1587-98.
- 614 36. **Taupin, A., A. Occhialini, A. Ruskone-Fourmestreaux, J. C. Delchier, J. C.**
615 **Rambaud, and F. Megraud**. 1999. Serum antibody responses to *Helicobacter pylori*

- 616 and the *cagA* marker in patients with mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma.
617 Clin Diagn Lab Immunol **6**:633-8.
- 618 37. **Thiberge, J. M., C. Boursaux-Eude, P. Lehours, M. A. Dillies, S. Creno, J. Y.**
619 **Coppee, Z. Rouy, A. Lajus, L. Ma, C. Burucoa, A. Ruskone-Foumestreaux, A.**
620 **Courillon-Mallet, H. De Reuse, I. G. Boneca, D. Lamarque, F. Megraud, J. C.**
621 **Delchier, C. Medigue, C. Bouchier, A. Labigne, and J. Raymond.** 2010. From
622 array-based hybridization of *Helicobacter pylori* isolates to the complete genome
623 sequence of an isolate associated with MALT lymphoma. BMC Genomics **11**:368.
- 624 38. **Thompson, L. J., S. J. Danon, J. E. Wilson, J. L. O'Rourke, N. R. Salama, S.**
625 **Falkow, H. Mitchell, and A. Lee.** 2004. Chronic *Helicobacter pylori* infection with
626 Sydney strain 1 and a newly identified mouse-adapted strain (Sydney strain 2000) in
627 C57BL/6 and BALB/c mice. Infect Immun **72**:4668-79.
- 628 39. **Ullrich, A., W. Fischbach, and M. Blettner.** 2002. Incidence of gastric B-cell
629 lymphomas: a population-based study in Germany. Ann Oncol **13**:1120-7.
- 630 40. **Varon, C., P. Dubus, F. Mazurier, C. Asencio, L. Chambonnier, J. Ferrand, A.**
631 **Giese, N. Senant-Dugot, M. Carlotti, and F. Megraud.** 2012. *Helicobacter pylori*
632 infection recruits bone marrow-derived cells that participate in gastric preneoplasia in
633 mice. Gastroenterology **142**:281-91.
- 634 41. **Wang, T. C., J. R. Goldenring, C. Dangler, S. Ito, A. Mueller, W. K. Jeon, T. J.**
635 **Koh, and J. G. Fox.** 1998. Mice lacking secretory phospholipase A2 show altered
636 apoptosis and differentiation with *Helicobacter felis* infection. Gastroenterology
637 **114**:675-89.
- 638 42. **Wang, X., R. Willen, C. Andersson, and T. Wadstrom.** 2000. Development of high-
639 grade lymphoma in *Helicobacter pylori*-infected C57BL/6 mice. Apmis **108**:503-8.
- 640 43. **Wang, X., R. Willen, M. Svensson, A. Ljungh, and T. Wadstrom.** 2003. Two-year
641 follow-up of *Helicobacter pylori* infection in C57BL/6 and Balb/cA mice. Apmis
642 **111**:514-22.
- 643 44. **Wotherspoon, A. C., C. Doglioni, T. C. Diss, L. Pan, A. Moschini, M. de Boni, and**
644 **P. G. Isaacson.** 1993. Regression of primary low-grade B-cell gastric lymphoma of
645 mucosa-associated lymphoid tissue type after eradication of *Helicobacter pylori*.
646 Lancet **342**:575-7.

- 647 45. **Wotherspoon, A. C., C. Ortiz-Hidalgo, M. R. Falzon, and P. G. Isaacson.** 1991.
648 *Helicobacter pylori*-associated gastritis and primary B-cell gastric lymphoma. *Lancet*
649 **338**:1175-6.
- 650 46. **Yang, L., K. Yamamoto, S. Nishiumi, M. Nakamura, H. Matsui, S. Takahashi, T.**
651 **Dohi, T. Okada, K. Kakimoto, N. Hoshi, M. Yoshida, and T. Azuma.** 2015.
652 Interferon-gamma-producing B cells induce the formation of gastric lymphoid
653 follicles after *Helicobacter suis* infection. *Mucosal Immunol* **8**:279-95.
- 654 47. **Yu, G., T. Boone, J. Delaney, N. Hawkins, M. Kelley, M. Ramakrishnan, S.**
655 **McCabe, W. R. Qiu, M. Kornuc, X. Z. Xia, J. Guo, M. Stolina, W. J. Boyle, I.**
656 **Sarosi, H. Hsu, G. Senaldi, and L. E. Theill.** 2000. APRIL and TALL-I and
657 receptors BCMA and TACI: system for regulating humoral immunity. *Nat Immunol*
658 **1**:252-6.
659

660 **Figure legends**

661 **Figure 1: Macroscopic appearance of APRIL Tg mice and characterization of leukocyte**
662 **infiltration in the gastric mucosa of WT and APRIL Tg mice 18 months after infection**
663 **determined by flow cytometry.**

664 Macroscopic findings in the mice stomachs 18 months post-infection (external appearance
665 and gastric mucosa aspect): (A) Non-infected APRIL Tg mice which did not show
666 abnormalities such as non-infected WT mice, (B) *H. pylori*-infected APRIL Tg mice, (C)
667 *H. felis*-infected APRIL Tg mice. Several small round protrusive lesions formed in the fundic
668 area (indicated by black arrows) of infected mice, especially in mice infected by *H. felis*.

669 Characterization of the leukocyte infiltration: (D) Viable leukocytes (CD45⁺/DAPI) in the
670 gastric mucosa of the non-infected (n=5 in each group), *H. pylori* (n=15 and n=13 in WT and
671 Tg group) and *H. felis* (n=12 and n=10 in WT and Tg group) WT and APRIL Tg mice were
672 evaluated as percentages of the total number of cells that were analyzed by the cytometer. (E):
673 Percentage of infiltrating T lymphocytes (CD3⁺) and B lymphocytes (B220⁺ cells) in the
674 *H. pylori*- (n=9 and n=13 in WT and Tg group) and *H. felis*- (n=12 and n=10 in WT and Tg
675 group) infected WT and APRIL Tg mice among CD45⁺ cells. (F): Percentages of infiltrating
676 T helper lymphocytes (CD4⁺) and T cytotoxic lymphocytes (CD8⁺) in the *H. pylori*- (n=4 and
677 n=13 in WT and Tg group) and *H. felis*- (n=12 and n=10 in WT and Tg group) infected WT
678 and APRIL Tg mice among CD3⁺ cells. Data were obtained with a LSRFortessa flow
679 cytometer using FACS Diva software. WT: wild-type, *Hp*: *H. pylori*, *Hf*: *H. felis*. Graphic
680 representations are box plots, with the box representing 50% of values around the median
681 (horizontal line) and the whiskers representing the minimum and maximum of all the data. # p
682 < 0.05 versus respective NI controls, *p<0.05.

683
684 **Figure 2: Scores of gastric histopathological lesions in non-infected and infected WT and**
685 **APRIL Tg mice 18 months post infection.** Inflammation (A), lymphoid infiltration (B),
686 oxyntic gland atrophy (C), dysplasia (D), hyperplasia (E), mucinous metaplasia (F), and
687 intestinal metaplasia (G). For the indicated lesions, scores range from 0 to 4, except for the
688 lymphoid infiltration (scores 0 to 3) (Materials and Methods). Data are plotted as bar graphs
689 displaying the average/mean ± standard deviation for each group,
690 Non-infected (NI) wild-type (WT) (n = 9) and APRIL Tg (n = 9) mice, *H. pylori* (*Hp*)
691 infected WT (n = 11) and APRIL Tg (n = 14) mice, *H. felis* infected WT (n = 8) and APRIL

692 Tg (n = 10) mice. For each group, the bar represents the arithmetic mean of scores. # p < 0.05
693 versus respective NI controls, *p<0.05. NS = non-significant

694

695 **Figure 3: Histological and inflammatory aspects during *H. pylori* and *H. felis* infection in**
696 **WT and APRIL Tg C57BL6 mice 18 months post infection.** Sections (3 µm thick) from
697 paraffin-embedded tissues were processed for H&E staining.

698 Representative histopathological features of non-infected (NI) WT (A) and APRIL Tg (B)
699 C57BL6 stomachs. The gastric mucosa has a normal aspect with no sign of inflammation or
700 epithelial disorders. (C): Representative histopathological features of *H. pylori* (*Hp*)-infected
701 WT mice. Few inflammatory infiltrates are observed. (D): Representative histopathological
702 features of *H. pylori*-infected APRIL Tg mice. Lymphoid infiltrates are observed. (E):
703 Representative histopathological features of *H. felis* (*Hf*)-infected WT mice. Inflammatory
704 infiltrates composed of lymphocytes and polymorphonuclears are observed (F).
705 Representative histopathological features of *H. felis*-infected APRIL Tg mice. Extensive
706 multifocal lymphocytic infiltrations are observed. Scale bars: 1,000 µm, 200 µm (inset).

707

708 **Figure 4: Analysis by immunohistochemistry of the lymphoid infiltrates found in WT**
709 **and APRIL Tg infected mice 18 months post infection**

710 Consecutive cuts of the same gastric biopsy specimen are showed. (A) Inflammatory
711 infiltrate, composed mainly of polymorphonuclears accompanied with few B and T
712 lymphocytes, found at the base of the mucosa of a *H. pylori* (*Hp*)-infected WT mouse. (B) In
713 a *H. pylori*-infected APRIL Tg mouse, a representative infiltrate comprised of B lymphocytes
714 with some infiltrating T cells. The B cells are involved in LELs. A higher magnification of the
715 E-cadherin staining is shown.

716 (C) In a *H. felis* (*Hf*)-infected WT mice, representative lymphoid follicle comprised of B cells
717 with numerous T cells either in enriched areas of the follicle or present throughout the gastric
718 glands, and T lymphocytes found at the base of the mucosa of a *H. pylori*-infected WT
719 mouse. (D) In a *H. felis*-infected APRIL Tg mouse, representative infiltrate comprised of B
720 lymphocytes with some infiltrating T cells. This infiltrate extends through the entire mucosa
721 level resulting in distortion of the epithelial surface. The B cells are involved in LELs. A
722 higher magnification of the E-cadherin staining is shown.

723 Scale bars: 250 µm for CD45R and CD3ε stainings, 50 µm for E-cadherin staining.

724

725 **Figure 5: Quantification of the bacterial load in gastric biopsies from infected mice.**
726 Results were obtained by quantitative PCR as described in Material and methods. (A)
727 *H. pylori*/murine cell ratio in WT and APRIL Tg mice infected by *H. pylori* at 12 months
728 post-infection (n=5 and n=4, respectively) versus 18 months post-infection (n=16 and n=14,
729 respectively). (B) *H. felis*/murine cell ratio in WT and APRIL Tg mice infected by *H. felis* 12
730 months post-infection (n=5 and n=4 respectively) versus 18 months post-infection (n=13 and
731 n=10 respectively). Data are presented as bar graphs displaying the mean \pm standard deviation
732 for each group, *p < 0.05. NS = non-significant. The number of positive mice in each group is
733 indicated under each bar.

Figure 1.

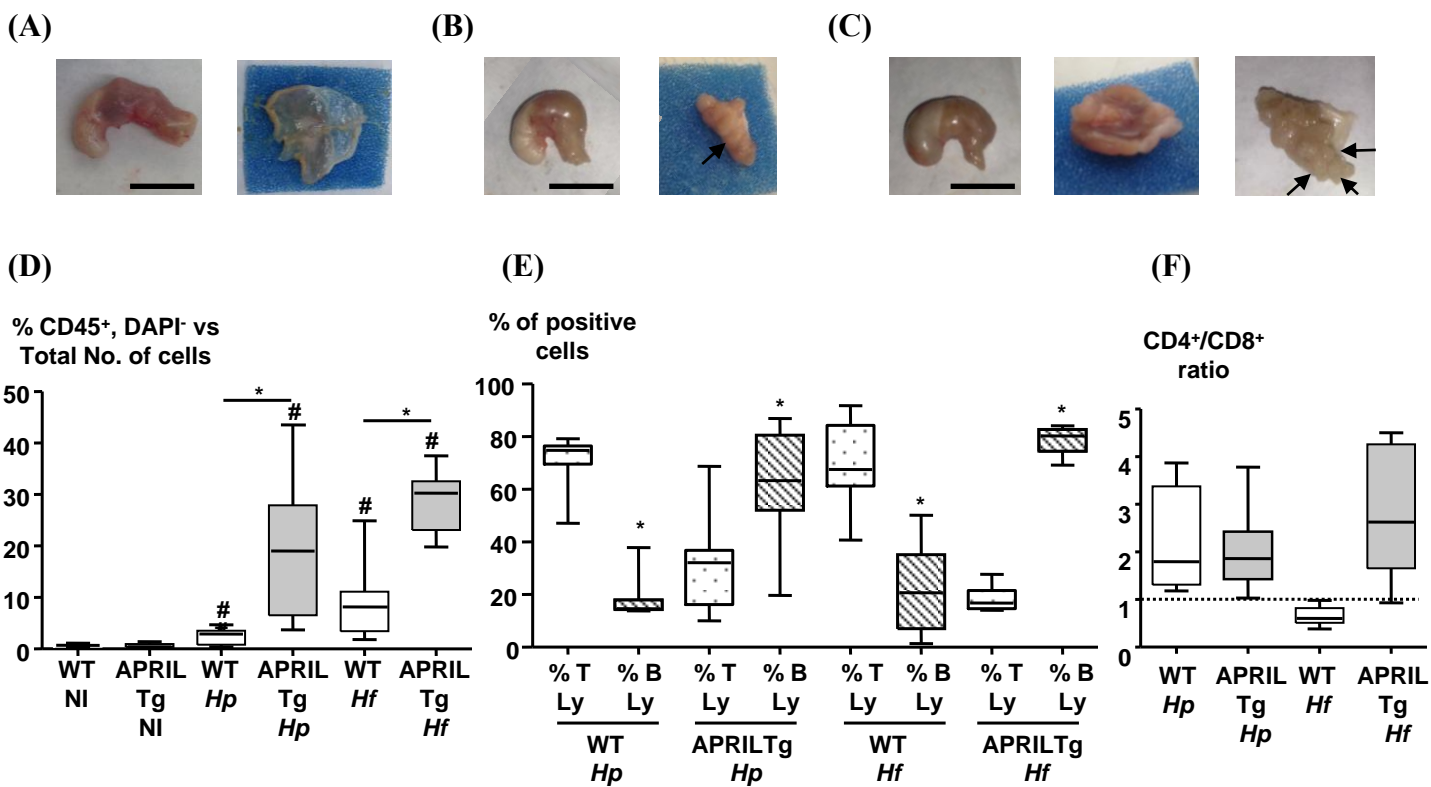


Figure 2.

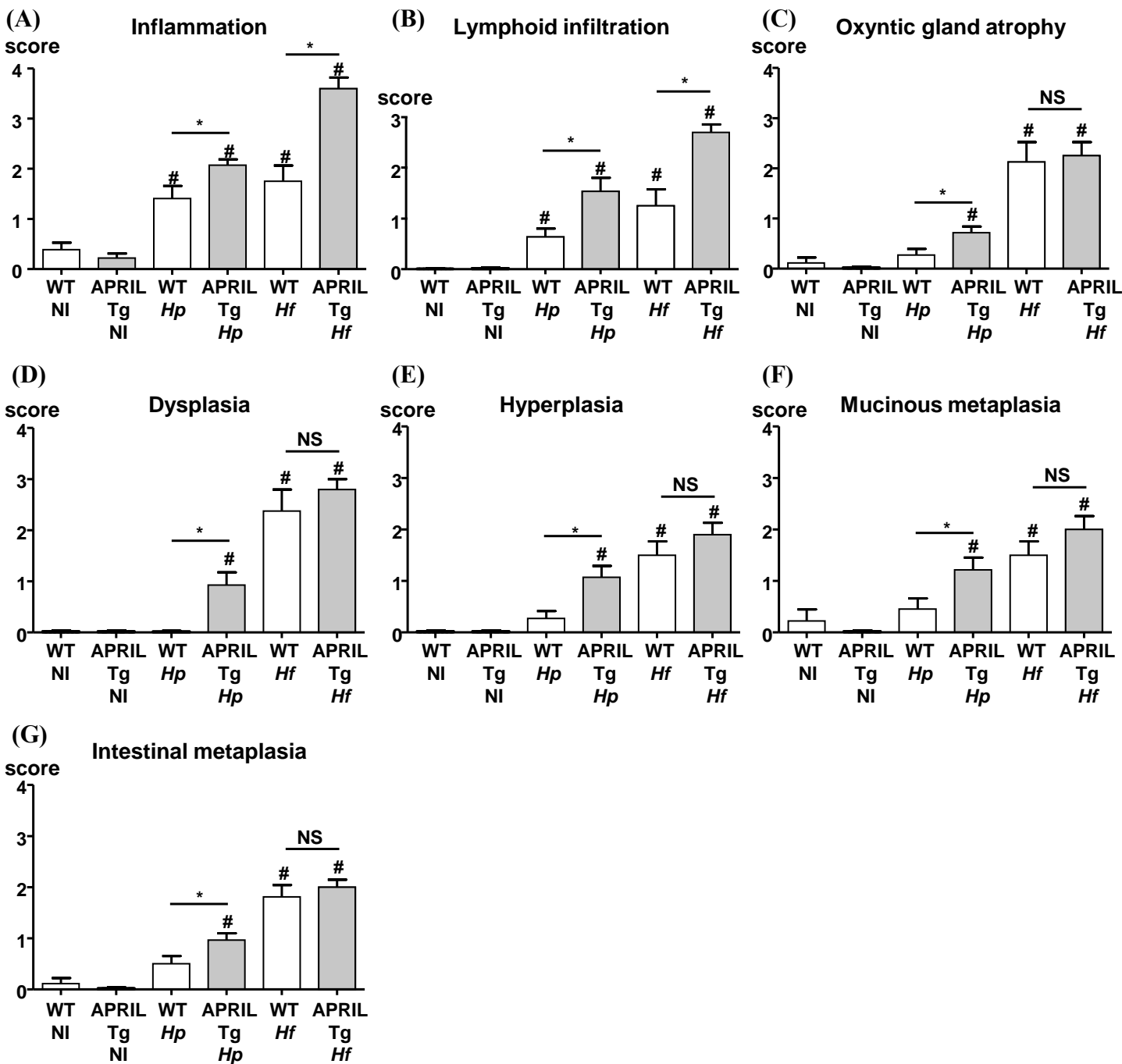


Figure 3.

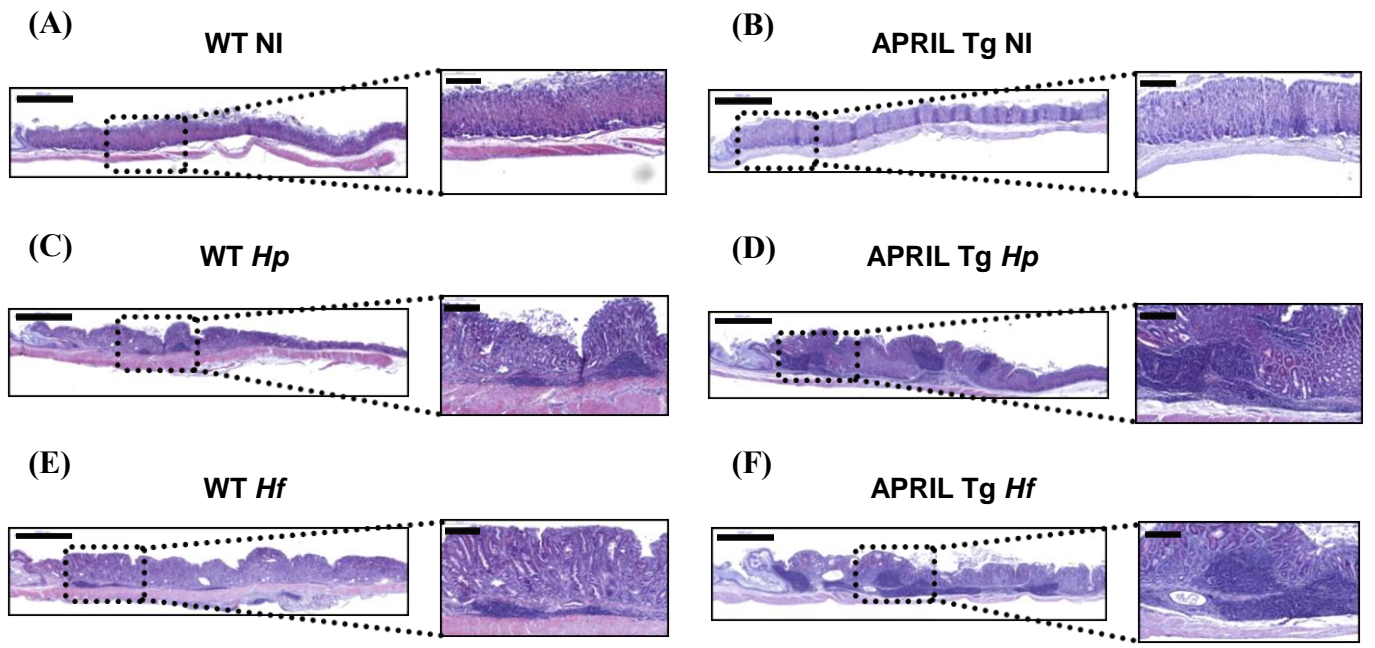


Figure 4.

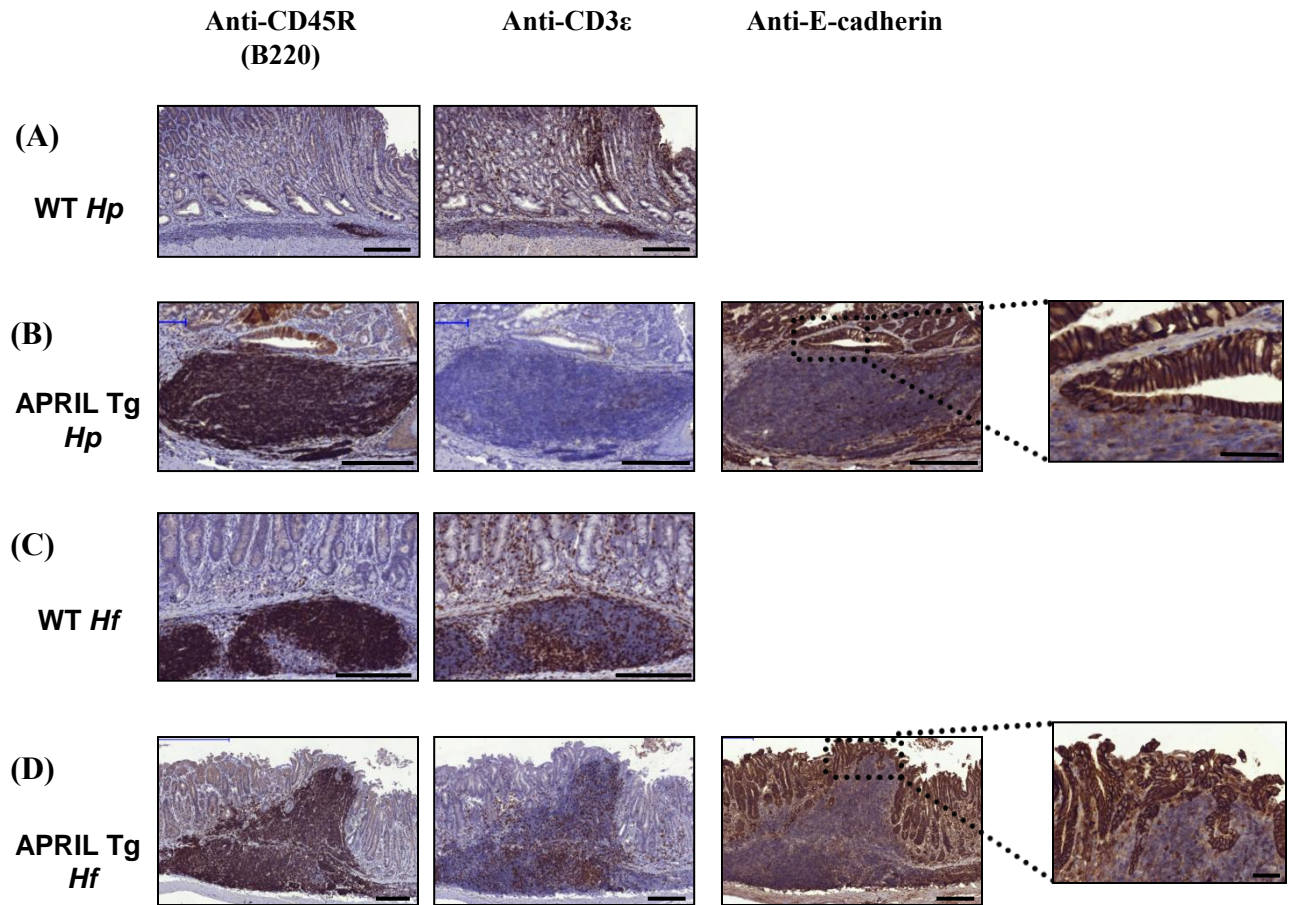
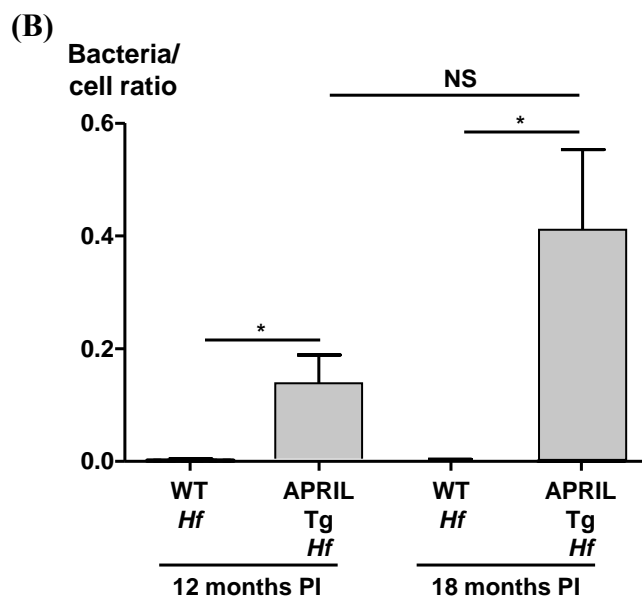
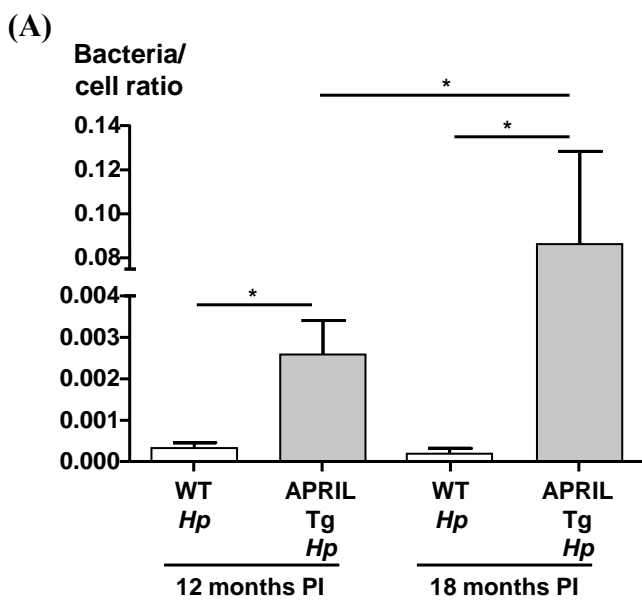


Figure 5.



Discussion - Conclusion

Le lymphome gastrique du MALT émane d'une stimulation antigénique chronique exercée au sein de la muqueuse gastrique par *H. pylori*. La bactérie doit dans un premier temps être capable de persister et de coloniser la muqueuse gastrique. La production de facteurs de virulence tels que l'uréase va permettre la survie en milieu acide et la multiplication de *H. pylori* dans l'estomac (357) (391). Les flagelles de *H. pylori* et sa forme spiralée lui permettent par ailleurs de pénétrer dans le mucus jusqu'à atteindre les couches muqueuses profondes et les cellules épithéliales. *H. pylori* va également exprimer de nombreuses adhésines dont BabA et SabA indispensables à une bonne colonisation et à la persistance de l'infection. Contrairement à ce qui est observé dans les ulcères et l'adénocarcinome gastrique, les facteurs de virulence de *H. pylori* semblent jouer un rôle minime dans la physiopathologie du LGM (225).

Outre la production de facteurs de virulence favorisant la persistance bactérienne, la réponse inflammatoire de l'hôte va jouer un rôle important dans la chronicité de l'infection à *H. pylori*. Elle comprend une réponse immune innée et adaptative conduisant au recrutement au niveau de l'estomac de cellules pro-inflammatoires telles que cellules dendritiques, macrophages, polynucléaires neutrophiles, mastocytes, cellules NK, lymphocytes B et T (343). La réponse de l'hôte est d'abord médiée par l'interaction avec les cellules épithéliales gastriques qui sont les premières cellules jouant un rôle dans l'immunité innée. Nous avons mis en évidence au stade LGM la surexpression de nombreuses chimiokines de type CCL (CCL (1,2,3,4,5,11,12,17,19,20)) et CXCL (CXCL (1,5,9,10,11,12,13,16)) impliquées dans le recrutement des leucocytes et notamment des lymphocytes T expliquant ainsi leur afflux au niveau du site de lymphomagenèse. Ces résultats confirment des résultats précédents ayant montré une augmentation de CXCL13 et de son récepteur CXCR5 dans le LGM (251). Pendant l'infection à *H. pylori*, CXCL13 favorise le recrutement et la transformation des lymphocytes B, induit la production de cytokines pro-inflammatoires et participe à la formation des follicules lymphoïdes (453). Nos résultats ont permis d'identifier de nouvelles chimiokines surexprimées au stade lymphome et pouvant être impliquées dans le développement du LGM. Cette surexpression devra être confirmée au niveau gastrique chez l'homme. Une collaboration a été mise en place avec des spécialistes français de la pathologie dans cette optique.

Dans le LGM, la réponse immunitaire locale induit un recrutement et une polarisation des lymphocytes T. Il a été montré précédemment que l'orientation du système immunitaire initialement de type Th1 évoluait vers le type Th2 avec la sécrétion d'IL-4 et d'autres cytokines de type Th2 lors de la lymphomagenèse. Une population hétérogène de lymphocytes T helper est présente avec la sécrétion de cytokines de type Th1 et Th2 (74). Nous confirmons ces résultats dans notre modèle

animal de LGM basé sur la thymectomie néonatale. En effet, la réponse inflammatoire chez ces souris, au stade LGM, était localement équilibrée avec une augmentation de l'expression de chimiokines permettant de polariser la réponse inflammatoire Th1 (CCL(3,5,19)), Th2 (CCL2, CD30, lymphotoxine β) mais également Th17 (BAFF) et des cytokines qui en découlent (IFN γ , IL-12 et IL-2 pour la réponse Th1 ; IL-4, IL-13 et IL-6 pour Th2 et IL-17, IL-21 pour Th17).

Nous souhaitons à présent étudier la réponse inflammatoire en modèle transgénique APRIL. Elle pourra être réalisée au niveau gastrique selon les mêmes protocoles que ceux utilisés dans le modèle de souris thymectomisées mais de manière plus ciblée en nous focalisant sur les cytokines signatures des réponses Th1 (INF γ), Th2 (IL-4), Th17 (IL-17, IL-21) et T régulatrice (IL-10, TGF β).

La réponse inflammatoire induite dans le modèle de souris C57BL6 transgéniques est d'autant plus importante à définir puisque le développement de lésion type LGM semble dépendre du fond génétique de l'hôte. En effet, nous avons également développé un modèle de souris transgéniques APRIL en fond génétique BALB/c infectées de la même manière que les C57BL6 par *H. pylori* ou *H. felis* et qui, contrairement aux C57BL6, ne semblent pas développer de lésions caractéristiques de LGM 18 mois post-infection selon les résultats préliminaires obtenus par cytométrie en flux et histologie (coloration H&E). Une caractérisation exacte des infiltrats observés au sein de la muqueuse gastrique de ces souris par IHC est en cours. Ces différences pourraient être expliquées par une réponse immunitaire majoritairement de type Th1 en fond génétique C57BL6 et de type Th2 en fond BALB/c. La comparaison des réponses inflammatoires induite par les espèces du genre *Helicobacter* dans ces 2 modèles de souris transgéniques devrait être informative.

Parmi les lymphocytes T CD4⁺ infiltrant la tumeur, les lymphocytes Tregs semblent avoir un rôle dans la physiopathologie du LGM. Une augmentation de l'expression de CXCL13 a été observée dans notre modèle animal au stade LGM compatible avec un recrutement des LTregs (63). L'infection par *H. pylori* stimule en effet la réponse Treg (337) et il a été montré que les LTregs étaient indispensables à la lymphomagenèse (72). Un enrichissement relatif en LTregs par rapport aux LT totaux a été observé au niveau des organes de réserve (rate) post-thymectomie contrairement à ce qui avait été décrit précédemment (127). Au niveau du site de lymphomagenèse, la présence d'infiltrats T comportant des LTregs au sein des infiltrats lymphoïdes a été observée. Ces infiltrats en LTregs étaient corrélés aux scores inflammatoires mais inversement corrélés à l'inoculum bactérien évalué par qPCR. Ces LTregs pourraient participer à la préservation d'un inoculum bactérien minimal en modérant la réponse inflammatoire pour permettre une stimulation antigénique chronique

nécessaire au maintien d'une prolifération lymphoïde antigène-dépendante (213) (336). Les Tregs pourraient par ailleurs favoriser la prolifération lymphocytaire B comme suggéré par certains (72). Notre étude est un travail descriptif sur le rôle potentiel des lymphocytes LTregs dans le développement du LGM dans le modèle de souris thymectomisées. Pour caractériser plus précisément leur implication dans la lymphomagenèse gastrique, il faudrait par exemple isoler les LTregs des souris d3Tx afin d'en tester leur fonctionnalité régulatrice, ou encore les en dépléter avec un anticorps anti-CD25 puis les infecter. Ceci n'a pu être réalisé en pratique dans le temps imparti à ce travail de thèse mais pourrait être envisagé dans le nouveau modèle de souris C57BL6 transgéniques développé.

Dans le LGM, la réponse immunitaire locale induit donc un recrutement de lymphocytes T principalement CD4⁺ au sein de la muqueuse gastrique qui vont polariser la réponse inflammatoire et entraîner une prolifération lymphocytaire B sans parvenir à la contrôler. Une surexpression de nombreux facteurs impliqués dans la prolifération et la survie lymphocytaire B (CCL1, CD40 et CD40L, BAFF, CD27, GITR, TRANCE) a été observée au stade lymphome dans notre étude expliquant le recrutement et la prolifération des lymphocytes B au sein de la muqueuse gastrique. Dans les LGM, les lymphocytes s'organisent en un tissu de type MALT normalement absent de la muqueuse gastrique. La surexpression de facteurs permettant la formation de follicules lymphoïdes (lymphotoxines α et β , CXCL13, CCL(19,20), CD40, CD40L) expliquant l'organisation des lymphocytes en îlots lymphoïdes de type MALT a été observée. Parmi ces facteurs surexprimés, nous souhaitons étudier plus particulièrement en collaboration avec une équipe allemande (Prof M Gerhard, Université de Munich) le rôle des lymphotoxines, notamment la lymphotoxine β et les voies de signalisation afférentes (voie non canonique d'activation du NF κ B en particulier) (257), dans la genèse et la structuration d'infiltrats lymphoïdes, via l'utilisation d'un anticorps ciblant le récepteur de la lymphotoxine β (LT β R-Ig) dans notre modèle animal de souris C57BL6 transgéniques.

Parmi ces facteurs surexprimés au stade lymphome, de nombreux membres de la famille du TNF ont été identifiés suggérant un rôle central de cette famille dans le microenvironnement du LGM en particulier via leur action sur la prolifération et l'activité fonctionnelle des différentes populations lymphocytaires. Ces données nous ont permis d'envisager un lien entre la dérégulation de certains membres de la famille du TNF, notamment la cytokine APRIL, et la lymphomagenèse gastrique. APRIL est impliquée dans le maintien et la régulation des réponses B et T et son augmentation avait

été observée chez l'homme dans le LGM (323). Nous avons donc développé en collaboration avec l'équipe du Dr M Hahne (Institut de Génétique Moléculaire de Montpellier (IGMM)-UMR5535, Université de Montpellier) un modèle basé sur l'utilisation de souris transgéniques C57BL6 exprimant la forme humaine de APRIL (389) afin d'évaluer le rôle de APRIL dans l'émergence du LGM *in vivo*. Ces souris ont été infectées par *H. pylori* ou *H. felis* afin d'étudier l'influence de l'espèce. Une analyse par cytométrie en flux et histologie a permis de mettre en évidence au sein des estomacs des souris transgéniques infectées 18 mois post-infection la présence de lésions compatibles avec celles du LGM (infiltrats lymphocytaires composés majoritairement de lymphocytes B présentant un phénotype compatible avec une origine marginale et présence de LELs) ce qui n'était pas observé chez les souris WT infectées. Ces résultats ont confirmé l'importance de APRIL *in vivo* dans le développement du LGM induit par des espèces du genre *Helicobacter*. Ce modèle de souris C57BL6 APRIL infectées par des espèces du genre *Helicobacter* semble par ailleurs un modèle prometteur d'étude de la lymphomagenèse gastrique plus facile à mettre en place que la thymectomie néonatale et plus productif que les souris C57BL6 et BALB/c WT. L'étude de potentiels facteurs de virulence bactériens impliqués dans le LGM pourra en particulier être réalisée dans ce modèle via l'utilisation de souches KO.

APRIL semble avoir un rôle crucial dans le développement du LGM et il pourrait être intéressant de réaliser une étude des polymorphismes génétiques de cette cytokine afin d'identifier des facteurs de prédisposition génétique au développement du LGM. Il a en effet été montré que des polymorphismes dans les gènes codant pour APRIL, BAFF ou leurs récepteurs communs TACI et BCMA pouvaient constituer des facteurs de risque pour le développement d'une LLC (182) (181). Des polymorphismes de BAFF ont également été associés à des pathologies auto-immunes (466) (233), mais n'ont pas été étudiés dans le contexte de l'infection à *H. pylori*.

La réponse inflammatoire et la prolifération lymphocytaire peuvent par ailleurs être contrôlées au niveau moléculaire par les miARNs, petits ARNs non codants simples brin, considérés comme des acteurs majeurs de la régulation post-transcriptionnelle de l'expression des gènes. La dérégulation de l'expression des miARNs est fréquemment associée à des cancers, en particulier les lymphomes (279). La caractérisation des miARNs dérégulés au stade de LGM a encore été peu étudiée. Nous avons identifié 5 miARNs (miR-21, miR-135b, miR-142a, miR-150, miR-155) surexprimés au stade LGM qui pourraient agir en synergie en inhibant l'apoptose et en induisant une prolifération lymphocytaire via des cibles distinctes décrites dans la littérature. Quatre de ces 5 miARNs agiraient notamment sur la synthèse de TP53INP1 une protéine antiproliférative et proapoptotique. Cette cible

a été validée dans le LGM pour miR-142a et miR-155 (358) et nous souhaitons à court terme valider cette cible pour miR-135b et miR-150 en système luciférase. L'évaluation de l'expression de ces 5 miARNs au niveau sérique, nous a permis d'identifier miR-142a comme un marqueur non-invasif de LGM.

Les perspectives de ce projet sont de valider la dérégulation de ces 5 miARNs au stade lymphome chez l'homme par RT-qPCR par rapport à la population témoin (patients présentant une gastrite) grâce à la collaboration mise en place avec des spécialistes français de la pathologie de l'Hôpital Henri Mondor. Nous souhaitons également vérifier la surexpression de miR-142a dans le sérum de patients au stade LGM. Si nous validons la surexpression au stade LGM de miR-142a, nous disposerons d'un premier outil prédictif et moins invasif de diagnostic utilisable notamment au laboratoire pour adapter la date de sacrifice de nos modèles animaux. Ces résultats pourraient permettre à l'avenir de cibler les miARNs impliqués dans la lymphomagenèse et ainsi révéler d'éventuelles futures cibles thérapeutiques sous la forme d'antisens/miRNAs synthétiques.

En conclusion, ces travaux réalisés à partir de modèles animaux nous ont permis de participer à la compréhension de la physiopathologie du LGM. L'importance des différents acteurs de la réponse inflammatoire et lymphoproliférative mis en évidence dans notre étude doit à présent être confirmée chez l'homme d'une part et par une validation mécanistique d'autre part. Le modèle de souris transgénique APRIL en fond C57BL6 infecté par des espèces du genre *Helicobacter* décrit dans cette étude semble être un modèle prometteur pour préciser le rôle des différents éléments décrits dans le modèle de souris thymectomisées.

Bibliographie

1. **Achuthan, R., S. M. Bell, J. P. Leek, P. Roberts, K. Horgan, A. F. Markham, P. J. Selby, and K. A. MacLennan.** 2000. Novel translocation of the BCL10 gene in a case of mucosa associated lymphoid tissue lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer* **29**:347-9.
2. **Aguemon, B. D., M. J. Struelens, A. Massougoudji, and E. M. Ouendo.** 2005. Prevalence and risk-factors for *Helicobacter pylori* infection in urban and rural Beninese populations. *Clin Microbiol Infect* **11**:611-7.
3. **Akopyants, N. S., S. W. Clifton, D. Kersulyte, J. E. Crabtree, B. E. Youree, C. A. Reece, N. O. Bukanov, E. S. Drazek, B. A. Roe, and D. E. Berg.** 1998. Analyses of the cag pathogenicity island of *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol* **28**:37-53.
4. **Allen, L. A., B. R. Beecher, J. T. Lynch, O. V. Rohner, and L. M. Wittine.** 2005. *Helicobacter pylori* disrupts NADPH oxidase targeting in human neutrophils to induce extracellular superoxide release. *J Immunol* **174**:3658-67.
5. **Allison, C. C., T. A. Kufer, E. Kremmer, M. Kaparakis, and R. L. Ferrero.** 2009. *Helicobacter pylori* induces MAPK phosphorylation and AP-1 activation via a NOD1-dependent mechanism. *J Immunol* **183**:8099-109.
6. **Amieva, M. R., R. Vogelmann, A. Covacci, L. S. Tompkins, W. J. Nelson, and S. Falkow.** 2003. Disruption of the epithelial apical-junctional complex by *Helicobacter pylori* CagA. *Science* **300**:1430-4.
7. **Amiot, A., M. Levy, C. Copie-Bergman, J. Dupuis, V. Szablewski, Y. Le Baleur, M. Baia, K. Belhadj, I. Sobhani, K. Leroy, C. Haioun, and J. C. Delchier.** 2014. Rituximab, alkylating agents or combination therapy for gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma: a monocentric non-randomised observational study. *Aliment Pharmacol Ther* **39**:619-28.
8. **Andrutis, K. A., J. G. Fox, D. B. Schauer, R. P. Marini, X. Li, L. Yan, C. Josenhans, and S. Suerbaum.** 1997. Infection of the ferret stomach by isogenic flagellar mutant strains of *Helicobacter mustelae*. *Infect Immun* **65**:1962-6.
9. **Appelmek, B. J., M. A. Monteiro, S. L. Martin, A. P. Moran, and C. M. Vandembroucke-Grauls.** 2000. Why *Helicobacter pylori* has Lewis antigens. *Trends Microbiol* **8**:565-70.
10. **Appelmek, B. J., I. Simoons-Smit, R. Negrini, A. P. Moran, G. O. Aspinall, J. G. Forte, T. De Vries, H. Quan, T. Verboom, J. J. Maaskant, P. Ghiara, E. J. Kuipers, E. Bloemena, T. M. Tadema, R. R. Townsend, K. Tyagarajan, J. M. Crothers, Jr., M. A. Monteiro, A. Savio, and J. De Graaff.** 1996. Potential role of molecular mimicry between *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide and host Lewis blood group antigens in autoimmunity. *Infect Immun* **64**:2031-40.
11. **Aras, R. A., W. Fischer, G. I. Perez-Perez, M. Crosatti, T. Ando, R. Haas, and M. J. Blaser.** 2003. Plasticity of repetitive DNA sequences within a bacterial (Type IV) secretion system component. *J Exp Med* **198**:1349-60.
12. **Aspholm, M., F. O. Olfat, J. Norden, B. Sonden, C. Lundberg, R. Sjostrom, S. Altraja, S. Odenbreit, R. Haas, T. Wadstrom, L. Engstrand, C. Semino-Mora, H. Liu, A. Dubois, S. Teneberg, A. Arnqvist, and T. Boren.** 2006. SabA is the *H. pylori* hemagglutinin and is polymorphic in binding to sialylated glycans. *PLoS Pathog* **2**:e110.
13. **Atherton, J. C.** 2006. The pathogenesis of *Helicobacter pylori*-induced gastro-duodenal diseases. *Annu Rev Pathol* **1**:63-96.
14. **Atherton, J. C., P. Cao, R. M. Peek, Jr., M. K. Tummuru, M. J. Blaser, and T. L. Cover.** 1995. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. Association of specific vacA types with cytotoxin production and peptic ulceration. *J Biol Chem* **270**:17771-7.

15. **Azevedo, N. F., N. Guimaraes, C. Figueiredo, C. W. Keevil, and M. J. Vieira.** 2007. A new model for the transmission of *Helicobacter pylori*: role of environmental reservoirs as gene pools to increase strain diversity. *Crit Rev Microbiol* **33**:157-69.
16. **Backert, S., and M. Selbach.** 2008. Role of type IV secretion in *Helicobacter pylori* pathogenesis. *Cell Microbiol* **10**:1573-81.
17. **Backert, S., N. Tegtmeyer, and W. Fischer.** 2015. Composition, structure and function of the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island encoded type IV secretion system. *Future Microbiol* **10**:955-65.
18. **Backert, S., N. Tegtmeyer, and M. Selbach.** 2010. The versatility of *Helicobacter pylori* CagA effector protein functions: The master key hypothesis. *Helicobacter* **15**:163-76.
19. **Backert, S., E. Ziska, V. Brinkmann, U. Zimny-Arndt, A. Fauconnier, P. R. Jungblut, M. Naumann, and T. F. Meyer.** 2000. Translocation of the *Helicobacter pylori* CagA protein in gastric epithelial cells by a type IV secretion apparatus. *Cell Microbiol* **2**:155-64.
20. **Baens, M., B. Maes, A. Steyls, K. Geboes, P. Marynen, and C. De Wolf-Peeters.** 2000. The product of the t(11;18), an API2-MLT fusion, marks nearly half of gastric MALT type lymphomas without large cell proliferation. *Am J Pathol* **156**:1433-9.
21. **Bakka, A. S., and B. A. Salih.** 2002. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection in asymptomatic subjects in Libya. *Diagn Microbiol Infect Dis* **43**:265-8.
22. **Baldwin, D. N., B. Shepherd, P. Kraemer, M. K. Hall, L. K. Sycuro, D. M. Pinto-Santini, and N. R. Salama.** 2007. Identification of *Helicobacter pylori* genes that contribute to stomach colonization. *Infect Immun* **75**:1005-16.
23. **Bamba, N., S. Nakajima, A. Andoh, M. Bamba, H. Sugihara, T. Bamba, and T. Hattori.** 2002. Stem cell factor expressed in human gastric mucosa in relation to mast cell increase in *Helicobacter pylori*-infected gastritis. *Dig Dis Sci* **47**:274-82.
24. **Baud, J., C. Varon, S. Chabas, L. Chambonnier, F. Darfeuille, and C. Staedel.** 2013. *Helicobacter pylori* initiates a mesenchymal transition through ZEB1 in gastric epithelial cells. *PLoS One* **8**:e60315.
25. **Belnoue, E., M. Pihlgren, T. L. McGaha, C. Tougne, A. F. Rochat, C. Bossen, P. Schneider, B. Huard, P. H. Lambert, and C. A. Siegrist.** 2008. APRIL is critical for plasmablast survival in the bone marrow and poorly expressed by early-life bone marrow stromal cells. *Blood* **111**:2755-64.
26. **Berg, D. J., N. A. Lynch, R. G. Lynch, and D. M. Lauricella.** 1998. Rapid development of severe hyperplastic gastritis with gastric epithelial dedifferentiation in *Helicobacter felis*-infected IL-10(-/-) mice. *Am J Pathol* **152**:1377-86.
27. **Bergman, M. P., A. Amedei, M. M. D'Elis, A. Azzurri, M. Benagiano, C. Tamburini, R. van der Zee, C. M. Vandenbroucke-Grauls, B. J. Appelmelk, and G. Del Prete.** 2003. Characterization of H⁺,K⁺-ATPase T cell epitopes in human autoimmune gastritis. *Eur J Immunol* **33**:539-45.
28. **Bergman, M. P., and M. M. D'Elis.** 2010. Cytotoxic T cells in *H. pylori*-related gastric autoimmunity and gastric lymphoma. *J Biomed Biotechnol* **2010**:104918.
29. **Bergman, M. P., A. Engering, H. H. Smits, S. J. van Vliet, A. A. van Bodegraven, H. P. Wirth, M. L. Kapsenberg, C. M. Vandenbroucke-Grauls, Y. van Kooyk, and B. J. Appelmelk.** 2004. *Helicobacter pylori* modulates the T helper cell 1/T helper cell 2 balance through phase-variable interaction between lipopolysaccharide and DC-SIGN. *J Exp Med* **200**:979-90.
30. **Bernarde, C., P. Lehours, J. P. Lasserre, M. Castroviejo, M. Bonneu, F. Megraud, and A. Menard.** 2010. Complexomics study of two *Helicobacter pylori* strains of two pathological origins: potential targets for vaccine development and new insight in bacteria metabolism. *Mol Cell Proteomics* **9**:2796-826.

31. **Bessede, E., C. Copie-Bergman, P. Lehours, M. Levy, K. Leroy, M. Baia, A. Riou, F. Megraud, J. C. Delchier, and N. Salles.** 2012. Is elevated gastric tissue NOX2 associated with lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue? *Antioxid Redox Signal* **16**:1205-11.
32. **Bessede, E., C. Staedel, L. A. Acuna Amador, P. H. Nguyen, L. Chambonnier, M. Hatakeyama, G. Belleanne, F. Megraud, and C. Varon.** 2014. *Helicobacter pylori* generates cells with cancer stem cell properties via epithelial-mesenchymal transition-like changes. *Oncogene* **33**:4123-31.
33. **Bimczok, D., J. Y. Kao, M. Zhang, S. Cochrun, P. Mannon, S. Peter, C. M. Wilcox, K. E. Monkemuller, P. R. Harris, J. M. Grams, R. D. Stahl, P. D. Smith, and L. E. Smythies.** 2014. Human gastric epithelial cells contribute to gastric immune regulation by providing retinoic acid to dendritic cells. *Mucosal Immunol* **8**:533-44.
34. **Blaser, M. J., G. I. Perez-Perez, H. Kleanthous, T. L. Cover, R. M. Peek, P. H. Chyou, G. N. Stemmermann, and A. Nomura.** 1995. Infection with *Helicobacter pylori* strains possessing *cagA* is associated with an increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach. *Cancer Res* **55**:2111-5.
35. **Boer, J. L., S. B. Mulrooney, and R. P. Hausinger.** 2013. Nickel-dependent metalloenzymes. *Arch Biochem Biophys* **544**:142-52.
36. **Boncristiano, M., S. R. Paccani, S. Barone, C. Ulivieri, L. Patrussi, D. Ilver, A. Amedei, M. M. D'Elios, J. L. Telford, and C. T. Baldari.** 2003. The *Helicobacter pylori* vacuolating toxin inhibits T cell activation by two independent mechanisms. *J Exp Med* **198**:1887-97.
37. **Bourzac, K. M., C. M. Botham, and K. Guillemin.** 2007. *Helicobacter pylori* CagA induces AGS cell elongation through a cell retraction defect that is independent of Cdc42, Rac1, and Arp2/3. *Infect Immun* **75**:1203-13.
38. **Brandt, S., T. Kwok, R. Hartig, W. Konig, and S. Backert.** 2005. NF-kappaB activation and potentiation of proinflammatory responses by the *Helicobacter pylori* CagA protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:9300-5.
39. **Brennecke, J., and S. M. Cohen.** 2003. Towards a complete description of the microRNA complement of animal genomes. *Genome Biol* **4**:228.
40. **Brown, L. M.** 2000. *Helicobacter pylori*: epidemiology and routes of transmission. *Epidemiol Rev* **22**:283-97.
41. **Broz, P., and D. M. Monack.** 2011. Molecular mechanisms of inflammasome activation during microbial infections. *Immunol Rev* **243**:174-90.
42. **Bumann, D., S. Aksu, M. Wendland, K. Janek, U. Zimny-Arndt, N. Sabarth, T. F. Meyer, and P. R. Jungblut.** 2002. Proteome analysis of secreted proteins of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Infect Immun* **70**:3396-403.
43. **Cai, X., J. Carlson, C. Stoicov, H. Li, T. C. Wang, and J. Houghton.** 2005. *Helicobacter felis* eradication restores normal architecture and inhibits gastric cancer progression in C57BL/6 mice. *Gastroenterology* **128**:1937-52.
44. **Calin, G. A., Y. Pekarsky, and C. M. Croce.** 2007. The role of microRNA and other non-coding RNA in the pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia. *Best Pract Res Clin Haematol* **20**:425-37.
45. **Camarota, G., L. M. Larocca, D. D'Ugo, R. Persiani, R. Cianci, R. Nocente, A. Picciocchi, and G. Gasbarrini.** 2001. Synchronous gastric adenocarcinoma and MALT lymphoma in a patient with *H. pylori* infection. Could the two neoplasms share a common pathogenesis? *Hepatogastroenterology* **48**:104-6.
46. **Camarota, G., M. Montalto, A. Tursi, F. M. Vecchio, G. Fedeli, and G. Gasbarrini.** 1995. *Helicobacter pylori* reinfection and rapid relapse of low-grade B-cell gastric lymphoma. *Lancet* **345**:192.

47. **Cao, X., T. Tsukamoto, K. Nozaki, H. Tanaka, L. Cao, T. Toyoda, S. Takasu, H. Ban, T. Kumagai, and M. Tatematsu.** 2007. Severity of gastritis determines glandular stomach carcinogenesis in *Helicobacter pylori*-infected Mongolian gerbils. *Cancer Sci* **98**:478-83.
48. **Capelle, L. G., C. M. den Hoed, A. C. de Vries, K. Biermann, M. K. Casparie, G. A. Meijer, and E. J. Kuipers.** 2008. Premalignant gastric lesions in patients with gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma and metachronous gastric adenocarcinoma: a case-control study. *Eur J Gastroenterol Hepatol* **24**:42-7.
49. **Castano-Rodriguez, N., N. O. Kaakoush, K. L. Goh, K. M. Fock, and H. M. Mitchell.** 2014. The NOD-like receptor signalling pathway in *Helicobacter pylori* infection and related gastric cancer: a case-control study and gene expression analyses. *PLoS One* **9**:e98899.
50. **Castigli, E., S. Scott, F. Dedeoglu, P. Bryce, H. Jabara, A. K. Bhan, E. Mizoguchi, and R. S. Geha.** 2004. Impaired IgA class switching in APRIL-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:3903-8.
51. **Cavanna, L., R. Pagani, P. Seghini, A. Zangrandi, and C. Paties.** 2008. High grade B-cell gastric lymphoma with complete pathologic remission after eradication of *Helicobacter pylori* infection: report of a case and review of the literature. *World J Surg Oncol* **6**:35.
52. **Cave, D. R.** 1997. How is *Helicobacter pylori* transmitted? *Gastroenterology* **113**:S9-14.
53. **Censini, S., C. Lange, Z. Xiang, J. E. Crabtree, P. Ghiara, M. Borodovsky, R. Rappuoli, and A. Covacci.** 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**:14648-53.
54. **Chan, A. O., K. M. Chu, S. T. Yuen, S. Y. Leung, S. K. Lam, and J. Wong.** 2001. Synchronous gastric adenocarcinoma and mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma in association with *Helicobacter pylori* infection: comparing reported cases between the East and West. *Am J Gastroenterol* **96**:1922-4.
55. **Chen, T., L. Cen, R. Xiao, J. H. Yang, N. K. Jiang, X. Z. Lu, Y. Zhang, and J. T. Lu.** 2012. [Prognostic value of t(11; 18) (q21; q21) for gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma]. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi* **29**:181-3.
56. **Chevalier, C., J. M. Thiberge, R. L. Ferrero, and A. Labigne.** 1999. Essential role of *Helicobacter pylori* gamma-glutamyltranspeptidase for the colonization of the gastric mucosa of mice. *Mol Microbiol* **31**:1359-72.
57. **Chiu, A., W. Xu, B. He, S. R. Dillon, J. A. Gross, E. Sievers, X. Qiao, P. Santini, E. Hyjek, J. W. Lee, E. Cesarman, A. Chadburn, D. M. Knowles, and A. Cerutti.** 2007. Hodgkin lymphoma cells express TACI and BCMA receptors and generate survival and proliferation signals in response to BAFF and APRIL. *Blood* **109**:729-39.
58. **Chrismont, D., P. Dubus, L. Chambonnier, A. Hoces de la Guardia, E. Sifre, A. Giese, M. Capone, C. Khairallah, P. Costet, B. Rousseau, C. Hubert, O. Burlen-Defranoux, C. Varon, A. Bandeira, F. Megraud, and P. Lehours.** 2014. Neonatal thymectomy favors *Helicobacter pylori*-promoted gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma lesions in BALB/c mice. *Am J Pathol* **184**:2174-84.
59. **Chu, Z. L., T. A. McKinsey, L. Liu, J. J. Gentry, M. H. Malim, and D. W. Ballard.** 1997. Suppression of tumor necrosis factor-induced cell death by inhibitor of apoptosis c-IAP2 is under NF-kappaB control. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:10057-62.
60. **Churin, Y., L. Al-Ghoul, O. Kepp, T. F. Meyer, W. Birchmeier, and M. Naumann.** 2003. *Helicobacter pylori* CagA protein targets the c-Met receptor and enhances the mitogenic response. *J Cell Biol* **161**:249-55.
61. **Churin, Y., E. Kardalidou, T. F. Meyer, and M. Naumann.** 2001. Pathogenicity island-dependent activation of Rho GTPases Rac1 and Cdc42 in *Helicobacter pylori* infection. *Mol Microbiol* **40**:815-23.
62. **Con, S. A., A. L. Valerin, H. Takeuchi, R. Con-Wong, V. G. Con-Chin, G. R. Con-Chin, S. N. Yagi-Chaves, F. Mena, F. Brenes Pino, G. Echandi, M. Kobayashi, M. Monge-**

- Izaguirre, M. Nishioka, N. Morimoto, T. Sugiura, and K. Araki. 2006. *Helicobacter pylori* CagA status associated with gastric cancer incidence rate variability in Costa Rican regions. *J Gastroenterol* **41**:632-7.
63. Cook, K. W., D. P. Letley, R. J. Ingram, E. Staples, H. Skjoldmose, J. C. Atherton, and K. Robinson. 2014. CCL20/CCR6-mediated migration of regulatory T cells to the *Helicobacter pylori*-infected human gastric mucosa. *Gut* **63**:1550-9.
64. Copie-Bergman, C., A. C. Wotherspoon, C. Capella, T. Motta, E. Pedrinis, S. A. Pileri, F. Bertoni, A. Conconi, E. Zucca, M. Ponzoni, and A. J. Ferreri. 2013. Gela histological scoring system for post-treatment biopsies of patients with gastric MALT lymphoma is feasible and reliable in routine practice. *Br J Haematol* **160**:47-52.
65. Correa, P. 1992. Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process--First American Cancer Society Award Lecture on Cancer Epidemiology and Prevention. *Cancer Res* **52**:6735-40.
66. Correa, P., W. Haenszel, C. Cuello, S. Tannenbaum, and M. Archer. 1975. A model for gastric cancer epidemiology. *Lancet* **2**:58-60.
67. Couturier, M. R., E. Tasca, C. Montecucco, and M. Stein. 2006. Interaction with CagF is required for translocation of CagA into the host via the *Helicobacter pylori* type IV secretion system. *Infect Immun* **74**:273-81.
68. Cover, T. L. 2016. *Helicobacter pylori* Diversity and Gastric Cancer Risk. *MBio* **7**:e01869-15.
69. Cover, T. L., and S. R. Blanke. 2005. *Helicobacter pylori* VacA, a paradigm for toxin multifunctionality. *Nat Rev Microbiol* **3**:320-32.
70. Cover, T. L., and M. J. Blaser. 1992. Purification and characterization of the vacuolating toxin from *Helicobacter pylori*. *J Biol Chem* **267**:10570-5.
71. Craig, V. J., I. Arnold, C. Gerke, M. Q. Huynh, T. Wundisch, A. Neubauer, C. Renner, S. Falkow, and A. Muller. 2010. Gastric MALT lymphoma B cells express polyreactive, somatically mutated immunoglobulins. *Blood* **115**:581-91.
72. Craig, V. J., S. B. Cogliatti, I. Arnold, C. Gerke, J. E. Balandat, T. Wundisch, and A. Muller. 2010. B-cell receptor signaling and CD40 ligand-independent T cell help cooperate in *Helicobacter*-induced MALT lymphomagenesis. *Leukemia* **24**:1186-96.
73. Cullen, T. W., D. K. Giles, L. N. Wolf, C. Ecobichon, I. G. Boneca, and M. S. Trent. 2011. *Helicobacter pylori* versus the host: remodeling of the bacterial outer membrane is required for survival in the gastric mucosa. *PLoS Pathog* **7**:e1002454.
74. D'Elis, M. M., A. Amedei, and G. Del Prete. 2003. *Helicobacter pylori* antigen-specific T-cell responses at gastric level in chronic gastritis, peptic ulcer, gastric cancer and low-grade mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma. *Microbes Infect* **5**:723-30.
75. D'Elis, M. M., A. Amedei, M. Manghetti, F. Costa, C. T. Baldari, A. S. Quazi, J. L. Telford, S. Romagnani, and G. Del Prete. 1999. Impaired T-cell regulation of B-cell growth in *Helicobacter pylori*-related gastric low-grade MALT lymphoma. *Gastroenterology* **117**:1105-12.
76. D'Elis, M. M., B. J. Appelmelk, A. Amedei, M. P. Bergman, and G. Del Prete. 2004. Gastric autoimmunity: the role of *Helicobacter pylori* and molecular mimicry. *Trends Mol Med* **10**:316-23.
77. de Bernard, M., M. Moschioni, A. Habermann, G. Griffiths, and C. Montecucco. 2002. Cell vacuolization induced by *Helicobacter pylori* VacA cytotoxin does not depend on late endosomal SNAREs. *Cell Microbiol* **4**:11-8.
78. de Jong, D., R. W. van der Hulst, G. Pals, W. C. van Dijk, A. van der Ende, G. N. Tytgat, B. G. Taal, and H. Boot. 1996. Gastric non-Hodgkin lymphomas of mucosa-associated lymphoid tissue are not associated with more aggressive *Helicobacter pylori* strains as identified by CagA. *Am J Clin Pathol* **106**:670-5.

79. **de Vries, A. C., and E. J. Kuipers.** 2007. Epidemiology of premalignant gastric lesions: implications for the development of screening and surveillance strategies. *Helicobacter* **12 Suppl 2**:22-31.
80. **Delchier, J. C., D. Lamarque, M. Levy, E. M. Tkoub, C. Copie-Bergman, L. Deforges, M. T. Chaumette, and C. Haioun.** 2001. *Helicobacter pylori* and gastric lymphoma: high seroprevalence of CagA in diffuse large B-cell lymphoma but not in low-grade lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue type. *Am J Gastroenterol* **96**:2324-8.
81. **Detterbeck, F., L. Tanoue, and A. Reid.** 2013. National comprehensive cancer network. *J Natl Compr Canc Netw* **11**:365-6.
82. **Deutsch, A. J., E. Steinbauer, N. A. Hofmann, D. Strunk, T. Gerlza, C. Beham-Schmid, H. Schaidler, and P. Neumeister.** 2013. Chemokine receptors in gastric MALT lymphoma: loss of CXCR4 and upregulation of CXCR7 is associated with progression to diffuse large B-cell lymphoma. *Mod Pathol* **26**:182-94.
83. **Dillon, S. R., J. A. Gross, S. M. Ansell, and A. J. Novak.** 2006. An APRIL to remember: novel TNF ligands as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov* **5**:235-46.
84. **DiPaolo, R. J., C. Brinster, T. S. Davidson, J. Andersson, D. Glass, and E. M. Shevach.** 2007. Autoantigen-specific TGFbeta-induced Foxp3+ regulatory T cells prevent autoimmunity by inhibiting dendritic cells from activating autoreactive T cells. *J Immunol* **179**:4685-93.
85. **Dogliani, C., A. C. Wotherspoon, A. Moschini, M. de Boni, and P. G. Isaacson.** 1992. High incidence of primary gastric lymphoma in northeastern Italy. *Lancet* **339**:834-5.
86. **Du, M. Q.** 2007. MALT lymphoma : recent advances in aetiology and molecular genetics. *J Clin Exp Hematop* **47**:31-42.
87. **Du, M. Q.** 2011. MALT lymphoma: many roads lead to nuclear factor-kappab activation. *Histopathology* **58**:26-38.
88. **Eaton, K. A., C. L. Brooks, D. R. Morgan, and S. Krakowka.** 1991. Essential role of urease in pathogenesis of gastritis induced by *Helicobacter pylori* in gnotobiotic piglets. *Infect Immun* **59**:2470-5.
89. **Eaton, K. A., J. V. Gilbert, E. A. Joyce, A. E. Wanken, T. Thevenot, P. Baker, A. Plaut, and A. Wright.** 2002. *In vivo* complementation of ureB restores the ability of *Helicobacter pylori* to colonize. *Infect Immun* **70**:771-8.
90. **Eaton, K. A., D. R. Morgan, and S. Krakowka.** 1992. Motility as a factor in the colonisation of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori*. *J Med Microbiol* **37**:123-7.
91. **Eaton, K. A., S. Suerbaum, C. Josenhans, and S. Krakowka.** 1996. Colonization of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori* deficient in two flagellin genes. *Infect Immun* **64**:2445-8.
92. **Eck, M., A. Greiner, B. Schmausser, H. Eck, M. Kolve, W. Fischbach, P. Strecker, and H. K. Muller-Hermelink.** 1999. Evaluation of *Helicobacter pylori* in gastric MALT-type lymphoma: differences between histologic and serologic diagnosis. *Mod Pathol* **12**:1148-51.
93. **Eck, M., B. Schmausser, R. Haas, A. Greiner, S. Czub, and H. K. Muller-Hermelink.** 1997. MALT-type lymphoma of the stomach is associated with *Helicobacter pylori* strains expressing the CagA protein. *Gastroenterology* **112**:1482-6.
94. **Ekstrom, A. M., M. Held, L. E. Hansson, L. Engstrand, and O. Nyren.** 2001. *Helicobacter pylori* in gastric cancer established by CagA immunoblot as a marker of past infection. *Gastroenterology* **121**:784-91.
95. **Elfvin, A., I. Bolin, C. Von Bothmer, M. Stolte, H. Watanabe, L. Fandriks, and M. Vieth.** 2005. *Helicobacter pylori* induces gastritis and intestinal metaplasia but no gastric adenocarcinoma in Mongolian gerbils. *Scand J Gastroenterol* **40**:1313-20.
96. **Enno, A., J. O'Rourke, S. Braye, R. Howlett, and A. Lee.** 1998. Antigen-dependent progression of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT)-type lymphoma in the stomach.

- Effects of antimicrobial therapy on gastric MALT lymphoma in mice. *Am J Pathol* **152**:1625-32.
97. **Enno, A., J. L. O'Rourke, C. R. Howlett, A. Jack, M. F. Dixon, and A. Lee.** 1995. MALToma-like lesions in the murine gastric mucosa after long-term infection with *Helicobacter felis*. A mouse model of *Helicobacter pylori*-induced gastric lymphoma. *Am J Pathol* **147**:217-22.
 98. **Erdman, S. E., P. Correa, L. A. Coleman, M. D. Schrenzel, X. Li, and J. G. Fox.** 1997. *Helicobacter mustelae*-associated gastric MALT lymphoma in ferrets. *Am J Pathol* **151**:273-80.
 99. **Evans, D. J., Jr., D. G. Evans, T. Takemura, H. Nakano, H. C. Lampert, D. Y. Graham, D. N. Granger, and P. R. Kvietys.** 1995. Characterization of a *Helicobacter pylori* neutrophil-activating protein. *Infect Immun* **63**:2213-20.
 100. **Faller, G., H. Steininger, J. Kranzlein, H. Maul, T. Kerkau, J. Hensen, E. G. Hahn, and T. Kirchner.** 1997. Antigastric autoantibodies in *Helicobacter pylori* infection: implications of histological and clinical parameters of gastritis. *Gut* **41**:619-23.
 101. **Fan, X., H. Gunasena, Z. Cheng, R. Espejo, S. E. Crowe, P. B. Ernst, and V. E. Reyes.** 2000. *Helicobacter pylori* urease binds to class II MHC on gastric epithelial cells and induces their apoptosis. *J Immunol* **165**:1918-24.
 102. **Ferrand, J., D. Roumanes, V. Pitard, J. F. Moreau, F. Megraud, and P. Lehours.** 2008. Modulation of lymphocyte proliferation induced by gastric MALT lymphoma-associated *Helicobacter pylori* strains. *Helicobacter* **13**:167-73.
 103. **Ferreira-Chagas, B., G. Lasne, S. Dupouy, A. Gallois, A. Morgner, A. Menard, F. Megraud, and P. Lehours.** 2007. *In vitro* proinflammatory properties of *Helicobacter pylori* strains causing low-grade gastric MALT lymphoma. *Helicobacter* **12**:616-7.
 104. **Ferreri, A. J., I. Ernberg, and C. Copie-Bergman.** 2009. Infectious agents and lymphoma development: molecular and clinical aspects. *J Intern Med* **265**:421-38.
 105. **Ferrero, R. L., and J. G. Fox.** 2001. *In Vivo* Modeling of *Helicobacter*-associated Gastrointestinal Diseases.
 106. **Figueiredo, C., J. C. Machado, P. Pharoah, R. Seruca, S. Sousa, R. Carvalho, A. F. Capelinha, W. Quint, C. Caldas, L. J. van Doorn, F. Carneiro, and M. Sobrinho-Simoes.** 2002. *Helicobacter pylori* and interleukin 1 genotyping: an opportunity to identify high-risk individuals for gastric carcinoma. *J Natl Cancer Inst* **94**:1680-7.
 107. **Finlay, B. B., and S. Falkow.** 1997. Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiol Mol Biol Rev* **61**:136-69.
 108. **Fischbach, W.** 2007. Gastric MALT lymphoma - update on diagnosis and treatment. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* **28**:1069-77.
 109. **Fischbach, W.** 2014. Gastric MALT lymphoma - update on diagnosis and treatment. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* **28**:1069-77.
 110. **Fischbach, W.** 2010. Long-term follow-up of gastric lymphoma after stomach conserving treatment. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* **24**:71-7.
 111. **Fischer, W.** 2011. Assembly and molecular mode of action of the *Helicobacter pylori* Cag type IV secretion apparatus. *Febs J* **278**:1203-12.
 112. **Fischer, W., J. Puls, R. Buhrdorf, B. Gebert, S. Odenbreit, and R. Haas.** 2001. Systematic mutagenesis of the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island: essential genes for CagA translocation in host cells and induction of interleukin-8. *Mol Microbiol* **42**:1337-48.
 113. **Flahou, B., F. Haesebrouck, K. Chiers, K. Van Deun, L. De Smet, B. Devreese, I. Vandenberghe, H. Favoreel, A. Smet, F. Pasmans, K. D'Herde, and R. Ducatelle.** 2011. Gastric epithelial cell death caused by *Helicobacter suis* and *Helicobacter pylori* gamma-

- glutamyl transpeptidase is mainly glutathione degradation-dependent. *Cell Microbiol* **13**:1933-55.
114. **Flahou, B., F. Haesebrouck, F. Pasmans, K. D'Herde, A. Driessen, K. Van Deun, A. Smet, L. Duchateau, K. Chiers, and R. Ducatelle.** 2010. *Helicobacter suis* causes severe gastric pathology in mouse and mongolian gerbil models of human gastric disease. *PLoS One* **5**:e14083.
 115. **Foegeding, N. J., R. R. Caston, M. S. McClain, M. D. Ohi, and T. L. Cover.** 2016. An Overview of *Helicobacter pylori* VacA Toxin Biology. *Toxins (Basel)* **8**.
 116. **Forsyth, M. H., J. C. Atherton, M. J. Blaser, and T. L. Cover.** 1998. Heterogeneity in levels of vacuolating cytotoxin gene (*vacA*) transcription among *Helicobacter pylori* strains. *Infect Immun* **66**:3088-94.
 117. **Fox, J. G., C. A. Dangler, N. S. Taylor, A. King, T. J. Koh, and T. C. Wang.** 1999. High-salt diet induces gastric epithelial hyperplasia and parietal cell loss, and enhances *Helicobacter pylori* colonization in C57BL/6 mice. *Cancer Res* **59**:4823-8.
 118. **Fox, J. G., G. Otto, N. S. Taylor, W. Rosenblad, and J. C. Murphy.** 1991. *Helicobacter mustelae*-induced gastritis and elevated gastric pH in the ferret (*Mustela putorius furo*). *Infect Immun* **59**:1875-80.
 119. **Fox, J. G., A. B. Rogers, M. Ihrig, N. S. Taylor, M. T. Whary, G. Dockray, A. Varro, and T. C. Wang.** 2003. *Helicobacter pylori*-associated gastric cancer in INS-GAS mice is gender specific. *Cancer Res* **63**:942-50.
 120. **Fox, J. G., J. S. Wishnok, J. C. Murphy, S. R. Tannenbaum, and P. Correa.** 1993. MNNG-induced gastric carcinoma in ferrets infected with *Helicobacter mustelae*. *Carcinogenesis* **14**:1957-61.
 121. **Franceschi, F., G. Zuccala, D. Roccarina, and A. Gasbarrini.** 2014. Clinical effects of *Helicobacter pylori* outside the stomach. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **11**:234-42.
 122. **Franco, A. T., D. A. Israel, M. K. Washington, U. Krishna, J. G. Fox, A. B. Rogers, A. S. Neish, L. Collier-Hyams, G. I. Perez-Perez, M. Hatakeyama, R. Whitehead, K. Gaus, D. P. O'Brien, J. Romero-Gallo, and R. M. Peek, Jr.** 2005. Activation of beta-catenin by carcinogenic *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:10646-51.
 123. **Franco, A. T., E. Johnston, U. Krishna, Y. Yamaoka, D. A. Israel, T. A. Nagy, L. E. Wroblewski, M. B. Piazuelo, P. Correa, and R. M. Peek, Jr.** 2008. Regulation of gastric carcinogenesis by *Helicobacter pylori* virulence factors. *Cancer Res* **68**:379-87.
 124. **Freeman, C., J. W. Berg, and S. J. Cutler.** 1972. Occurrence and prognosis of extranodal lymphomas. *Cancer* **29**:252-60.
 125. **Fujikawa, A., D. Shirasaka, S. Yamamoto, H. Ota, K. Yahiro, M. Fukada, T. Shintani, A. Wada, N. Aoyama, T. Hirayama, H. Fukamachi, and M. Noda.** 2003. Mice deficient in protein tyrosine phosphatase receptor type Z are resistant to gastric ulcer induction by VacA of *Helicobacter pylori*. *Nat Genet* **33**:375-81.
 126. **Fukui, T., K. Okazaki, H. Tamaki, K. Kawasaki, M. Matsuura, M. Asada, T. Nishi, K. Uchida, M. Iwano, M. Ohana, H. Hiai, and T. Chiba.** 2004. Immunogenetic analysis of gastric MALT lymphoma-like lesions induced by *Helicobacter pylori* infection in neonatally thymectomized mice. *Lab Invest* **84**:485-92.
 127. **Gagnerault, M. C., O. Lanvin, V. Pasquier, C. Garcia, D. Damotte, B. Lucas, and F. Lepault.** 2009. Autoimmunity during thymectomy-induced lymphopenia: role of thymus ablation and initial effector T cell activation timing in nonobese diabetic mice. *J Immunol* **183**:4913-20.
 128. **Galmiche, A., J. Rasso, A. Doye, S. Cagnol, J. C. Chambard, S. Contamin, V. de Thillot, I. Just, V. Ricci, E. Solcia, E. Van Obberghen, and P. Boquet.** 2000. The N-terminal 34 kDa fragment of *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin targets mitochondria and induces cytochrome c release. *Embo J* **19**:6361-70.

129. **Garner, J. A., and T. L. Cover.** 1996. Binding and internalization of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin by epithelial cells. *Infect Immun* **64**:4197-203.
130. **Gebert, B., W. Fischer, E. Weiss, R. Hoffmann, and R. Haas.** 2003. *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin inhibits T lymphocyte activation. *Science* **301**:1099-102.
131. **Genta, R. M., H. W. Hamner, and D. Y. Graham.** 1993. Gastric lymphoid follicles in *Helicobacter pylori* infection: frequency, distribution, and response to triple therapy. *Hum Pathol* **24**:577-83.
132. **Gerhard, M., C. Schmees, P. Voland, N. Endres, M. Sander, W. Reindl, R. Rad, M. Oelsner, T. Decker, M. Mempel, L. Hengst, and C. Prinz.** 2005. A secreted low-molecular-weight protein from *Helicobacter pylori* induces cell-cycle arrest of T cells. *Gastroenterology* **128**:1327-39.
133. **Gewirtz, A. T., Y. Yu, U. S. Krishna, D. A. Israel, S. L. Lyons, and R. M. Peek, Jr.** 2004. *Helicobacter pylori* flagellin evades toll-like receptor 5-mediated innate immunity. *J Infect Dis* **189**:1914-20.
134. **Ghiara, P., M. Marchetti, M. J. Blaser, M. K. Tummuru, T. L. Cover, E. D. Segal, L. S. Tompkins, and R. Rappuoli.** 1995. Role of the *Helicobacter pylori* virulence factors vacuolating cytotoxin, CagA, and urease in a mouse model of disease. *Infect Immun* **63**:4154-60.
135. **Gong, M., and B. Ho.** 2004. Prominent role of gamma-glutamyl-transpeptidase on the growth of *Helicobacter pylori*. *World J Gastroenterol* **10**:2994-6.
136. **Gong, M., S. S. Ling, S. Y. Lui, K. G. Yeoh, and B. Ho.** 2010. *Helicobacter pylori* gamma-glutamyl transpeptidase is a pathogenic factor in the development of peptic ulcer disease. *Gastroenterology* **139**:564-73.
137. **Goni, E., and F. Franceschi.** 2016. *Helicobacter pylori* and extragastric diseases. *Helicobacter* **21 Suppl 1**:45-8.
138. **Goodwin, A. C., D. M. Weinberger, C. B. Ford, J. C. Nelson, J. D. Snider, J. D. Hall, C. I. Paules, R. M. Peek, Jr., and M. H. Forsyth.** 2008. Expression of the *Helicobacter pylori* adhesin SabA is controlled via phase variation and the ArsRS signal transduction system. *Microbiology* **154**:2231-40.
139. **Goodwin, C. S., W. McConnell, R. K. McCulloch, C. McCullough, R. Hill, M. A. Bronsdon, and G. Kasper.** 1989. Cellular fatty acid composition of *Campylobacter pylori* from primates and ferrets compared with those of other campylobacters. *J Clin Microbiol* **27**:938-43.
140. **Gorrell, R. J., O. L. Wijburg, J. S. Pedersen, A. K. Walduck, T. Kwok, R. A. Strugnell, and R. M. Robins-Browne.** 2013. Contribution of secretory antibodies to intestinal mucosal immunity against *Helicobacter pylori*. *Infect Immun* **81**:3880-93.
141. **Guindi, M.** 2000. Role of activated host T cells in the promotion of MALT lymphoma growth. *Semin Cancer Biol* **10**:341-4.
142. **Ha, N. C., S. T. Oh, J. Y. Sung, K. A. Cha, M. H. Lee, and B. H. Oh.** 2001. Supramolecular assembly and acid resistance of *Helicobacter pylori* urease. *Nat Struct Biol* **8**:505-9.
143. **Haesebrouck, F., F. Pasmans, B. Flahou, K. Chiers, M. Baele, T. Meyns, A. Decostere, and R. Ducatelle.** 2009. Gastric helicobacters in domestic animals and nonhuman primates and their significance for human health. *Clin Microbiol Rev* **22**:202-23, Table of Contents.
144. **Hahm, K. B., K. M. Lee, Y. B. Kim, W. S. Hong, W. H. Lee, S. U. Han, M. W. Kim, B. O. Ahn, T. Y. Oh, M. H. Lee, J. Green, and S. J. Kim.** 2002. Conditional loss of TGF-beta signalling leads to increased susceptibility to gastrointestinal carcinogenesis in mice. *Aliment Pharmacol Ther* **16 Suppl 2**:115-27.
145. **Hahne, M., T. Kataoka, M. Schroter, K. Hofmann, M. Irmeler, J. L. Bodmer, P. Schneider, T. Bornand, N. Holler, L. E. French, B. Sordat, D. Rimoldi, and J. Tschopp.**

1998. APRIL, a new ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates tumor cell growth. *J Exp Med* **188**:1185-90.
146. **Han, S. U., Y. B. Kim, H. J. Joo, K. B. Hahm, W. H. Lee, Y. K. Cho, D. Y. Kim, and M. W. Kim.** 2002. *Helicobacter pylori* infection promotes gastric carcinogenesis in a mice model. *J Gastroenterol Hepatol* **17**:253-61.
147. **Hancock, B. W., W. Qian, D. Linch, J. C. Delchier, P. Smith, I. Jakupovic, C. Burton, R. Souhami, A. Wotherspoon, C. Copie-Bergman, C. Capella, C. Traulle, M. Levy, S. Cortelazzo, A. J. Ferreri, A. Ambrosetti, G. Pinotti, G. Martinelli, U. Vitolo, F. Cavalli, C. Gisselbrecht, and E. Zucca.** 2009. Chlorambucil versus observation after anti-*Helicobacter* therapy in gastric MALT lymphomas: results of the international randomised LY03 trial. *Br J Haematol* **144**:367-75.
148. **Harris, P. R., L. E. Smythies, P. D. Smith, and A. Dubois.** 2000. Inflammatory cytokine mRNA expression during early and persistent *Helicobacter pylori* infection in nonhuman primates. *J Infect Dis* **181**:783-6.
149. **Harrison, B. A., H. Fernandez, V. Chandan, M. W. Schuster, L. O. Rademacher, C. Toledo, J. Li, and E. Altman.** 2011. Characterization and functional activity of murine monoclonal antibodies specific for alpha1,6-glucan chain of *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide. *Helicobacter* **16**:459-67.
150. **Hasegawa, S., S. Nishikawa, T. Miura, Y. Saito, H. Madarame, K. Sekikawa, Y. Tagawa, Y. Iwakura, and A. Nakane.** 2004. Tumor necrosis factor-alpha is required for gastritis induced by *Helicobacter felis* infection in mice. *Microb Pathog* **37**:119-24.
151. **Hatakeyama, M.** 2014. *Helicobacter pylori* CagA and gastric cancer: a paradigm for hit-and-run carcinogenesis. *Cell Host Microbe* **15**:306-16.
152. **Hatakeyama, M.** 2008. Linking epithelial polarity and carcinogenesis by multitasking *Helicobacter pylori* virulence factor CagA. *Oncogene* **27**:7047-54.
153. **Hazell, S. L., A. Lee, L. Brady, and W. Hennessy.** 1986. *Campylobacter pyloridis* and gastritis: association with intercellular spaces and adaptation to an environment of mucus as important factors in colonization of the gastric epithelium. *J Infect Dis* **153**:658-63.
154. **He, B., A. Chadburn, E. Jou, E. J. Schattner, D. M. Knowles, and A. Cerutti.** 2004. Lymphoma B cells evade apoptosis through the TNF family members BAFF/BLyS and APRIL. *J Immunol* **172**:3268-79.
155. **He, B., W. Xu, P. A. Santini, A. D. Polydorides, A. Chiu, J. Estrella, M. Shan, A. Chadburn, V. Villanacci, A. Plebani, D. M. Knowles, M. Rescigno, and A. Cerutti.** 2007. Intestinal bacteria trigger T cell-independent immunoglobulin A(2) class switching by inducing epithelial-cell secretion of the cytokine APRIL. *Immunity* **26**:812-26.
156. **Hellmig, S., W. Fischbach, M. E. Goebeler-Kolve, U. R. Folsch, J. Hampe, and S. Schreiber.** 2005. Association study of a functional Toll-like receptor 4 polymorphism with susceptibility to gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Leuk Lymphoma* **46**:869-72.
157. **Hellmig, S., W. Fischbach, M. E. Goebeler-Kolve, U. R. Folsch, J. Hampe, and S. Schreiber.** 2005. A functional promoter polymorphism of TNF-alpha is associated with primary gastric B-Cell lymphoma. *Am J Gastroenterol* **100**:2644-9.
158. **Hendriks, J., L. Planelles, J. de Jong-Odding, G. Hardenberg, S. T. Pals, M. Hahne, M. Spaargaren, and J. P. Medema.** 2005. Heparan sulfate proteoglycan binding promotes APRIL-induced tumor cell proliferation. *Cell Death Differ* **12**:637-48.
159. **Higashi, H., A. Nakaya, R. Tsutsumi, K. Yokoyama, Y. Fujii, S. Ishikawa, M. Higuchi, A. Takahashi, Y. Kurashima, Y. Teishikata, S. Tanaka, T. Azuma, and M. Hatakeyama.** 2004. *Helicobacter pylori* CagA induces Ras-independent morphogenetic response through SHP-2 recruitment and activation. *J Biol Chem* **279**:17205-16.

160. **Higashi, H., R. Tsutsumi, S. Muto, T. Sugiyama, T. Azuma, M. Asaka, and M. Hatakeyama.** 2002. SHP-2 tyrosine phosphatase as an intracellular target of *Helicobacter pylori* CagA protein. *Science* **295**:683-6.
161. **Hirata, Y., S. Maeda, Y. Mitsuno, K. Tateishi, A. Yanai, M. Akanuma, H. Yoshida, T. Kawabe, Y. Shiratori, and M. Omata.** 2002. *Helicobacter pylori* CagA protein activates serum response element-driven transcription independently of tyrosine phosphorylation. *Gastroenterology* **123**:1962-71.
162. **Hitzler, I., A. Sayi, E. Kohler, D. B. Engler, K. N. Koch, W. D. Hardt, and A. Muller.** 2012. Caspase-1 has both proinflammatory and regulatory properties in *Helicobacter* infections, which are differentially mediated by its substrates IL-1beta and IL-18. *J Immunol* **188**:3594-602.
163. **Hoang, T. T., C. Bengtsson, D. C. Phung, M. Sorberg, and M. Granstrom.** 2005. Seroprevalence of *Helicobacter pylori* infection in urban and rural Vietnam. *Clin Diagn Lab Immunol* **12**:81-5.
164. **Hobsley, M., F. I. Tovey, and J. Holton.** 2008. Controversies in the *Helicobacter pylori*/duodenal ulcer story. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **102**:1171-5.
165. **Hoces de la Guardia, A., C. Staedel, I. Kaafarany, A. Clement, C. Roubaud Baudron, F. Megraud, and P. Lehours.** 2013. Inflammatory cytokine and microRNA responses of primary human dendritic cells cultured with *Helicobacter pylori* strains. *Front Microbiol* **4**:236.
166. **Hofman, P., B. Waidner, V. Hofman, S. Bereswill, P. Brest, and M. Kist.** 2004. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* **9 Suppl 1**:15-22.
167. **Honma, K., S. Tsuzuki, M. Nakagawa, H. Tagawa, S. Nakamura, Y. Morishima, and M. Seto.** 2009. TNFAIP3/A20 functions as a novel tumor suppressor gene in several subtypes of non-Hodgkin lymphomas. *Blood* **114**:2467-75.
168. **Hopken, U. E., and A. Rehm.** 2012. Homeostatic chemokines guide lymphoma cells to tumor growth-promoting niches within secondary lymphoid organs. *J Mol Med (Berl)* **90**:1237-45.
169. **Hu, Q., Y. Zhang, X. Zhang, and K. Fu.** 2016. Gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma and *Helicobacter pylori* infection: a review of current diagnosis and management. *Biomark Res* **4**:15.
170. **Huard, B., T. McKee, C. Bosshard, S. Durual, T. Matthes, S. Myit, O. Donze, C. Frossard, C. Chizzolini, C. Favre, R. Zubler, J. P. Guyot, P. Schneider, and E. Roosnek.** 2008. APRIL secreted by neutrophils binds to heparan sulfate proteoglycans to create plasma cell niches in human mucosa. *J Clin Invest* **118**:2887-95.
171. **Hussein, N. R., R. H. Argent, C. K. Marx, S. R. Patel, K. Robinson, and J. C. Atherton.** 2010. *Helicobacter pylori* dupA is polymorphic, and its active form induces proinflammatory cytokine secretion by mononuclear cells. *J Infect Dis* **202**:261-9.
172. **Hussell, T., P. G. Isaacson, J. E. Crabtree, and J. Spencer.** 1996. *Helicobacter pylori*-specific tumour-infiltrating T cells provide contact dependent help for the growth of malignant B cells in low-grade gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue. *J Pathol* **178**:122-7.
173. **Hussell, T., P. G. Isaacson, J. E. Crabtree, and J. Spencer.** 1993. The response of cells from low-grade B-cell gastric lymphomas of mucosa-associated lymphoid tissue to *Helicobacter pylori*. *Lancet* **342**:571-4.
174. **Iver, D., A. Arnqvist, J. Ogren, I. M. Frick, D. Kersulyte, E. T. Incecik, D. E. Berg, A. Covacci, L. Engstrand, and T. Boren.** 1998. *Helicobacter pylori* adhesin binding fucosylated histo-blood group antigens revealed by retagging. *Science* **279**:373-7.
175. **Irving, A. T., H. Mimuro, T. A. Kufer, C. Lo, R. Wheeler, L. J. Turner, B. J. Thomas, C. Malosse, M. P. Gantier, L. N. Casillas, B. J. Votta, J. Bertin, I. G. Boneca, C.**

- Sasakawa, D. J. Philpott, R. L. Ferrero, and M. Kaparakis-Liaskos.** 2014. The immune receptor NOD1 and kinase RIP2 interact with bacterial peptidoglycan on early endosomes to promote autophagy and inflammatory signaling. *Cell Host Microbe* **15**:623-35.
176. **Isaacson, P., and D. H. Wright.** 1983. Malignant lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue. A distinctive type of B-cell lymphoma. *Cancer* **52**:1410-6.
177. **Isaacson, P. G.** 1996. Recent developments in our understanding of gastric lymphomas. *Am J Surg Pathol* **20 Suppl 1**:S1-7.
178. **Isaacson, P. G., and M. Q. Du.** 2004. MALT lymphoma: from morphology to molecules. *Nat Rev Cancer* **4**:644-53.
179. **Ismail, H. F., P. Fick, J. Zhang, R. G. Lynch, and D. J. Berg.** 2003. Depletion of neutrophils in IL-10(-/-) mice delays clearance of gastric *Helicobacter infection* and decreases the Th1 immune response to *Helicobacter*. *J Immunol* **170**:3782-9.
180. **Isomoto, H., K. Matsushima, N. Inoue, T. Hayashi, T. Nakayama, M. Kunizaki, S. Hidaka, M. Nakayama, J. Hisatsune, M. Nakashima, T. Nagayasu, K. Nakao, and T. Hirayama.** 2011. Interweaving microRNAs and proinflammatory cytokines in gastric mucosa with reference to *H. pylori* infection. *J Clin Immunol* **32**:290-9.
181. **Jasek, M., A. Bojarska-Junak, M. Wagner, M. Sobczynski, D. Wolowiec, J. Rolinski, L. Karabon, and P. Kusnierczyk.** 2016. Association of variants in BAFF (rs9514828 and rs1041569) and BAFF-R (rs61756766) genes with the risk of chronic lymphocytic leukemia. *Tumour Biol.*
182. **Jasek, M., M. Wagner, M. Sobczynski, D. Wolowiec, K. Kuliczkowski, D. Woszczyk, M. Kielbinski, P. Kusnierczyk, I. Frydecka, and L. Karabon.** 2015. Polymorphisms in genes of the BAFF/APRIL system may constitute risk factors of B-CLL--a preliminary study on a Polish population. *Tissue Antigens* **86**:279-84.
183. **Josenhans, C., A. Labigne, and S. Suerbaum.** 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**:3010-20.
184. **Kaffes, A., L. Hughes, J. Hollinshead, and P. Katelaris.** 2002. Synchronous primary adenocarcinoma, mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma and a stromal tumor in a *Helicobacter pylori*-infected stomach. *J Gastroenterol Hepatol* **17**:1033-6.
185. **Kaparakis, M., L. Turnbull, L. Carneiro, S. Firth, H. A. Coleman, H. C. Parkington, L. Le Bourhis, A. Karrar, J. Viala, J. Mak, M. L. Hutton, J. K. Davies, P. J. Crack, P. J. Hertzog, D. J. Philpott, S. E. Girardin, C. B. Whitchurch, and R. L. Ferrero.** 2010. Bacterial membrane vesicles deliver peptidoglycan to NOD1 in epithelial cells. *Cell Microbiol* **12**:372-85.
186. **Kaparakis, M., A. K. Walduck, J. D. Price, J. S. Pedersen, N. van Rooijen, M. J. Pearse, O. L. Wijburg, and R. A. Strugnell.** 2008. Macrophages are mediators of gastritis in acute *Helicobacter pylori* infection in C57BL/6 mice. *Infect Immun* **76**:2235-9.
187. **Kaplan-Turkoz, B., L. F. Jimenez-Soto, C. Dian, C. Ertl, H. Remaut, A. Louche, T. Tosi, R. Haas, and L. Terradot.** 2012. Structural insights into *Helicobacter pylori* oncoprotein CagA interaction with beta1 integrin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**:14640-5.
188. **Kaplan-Turkoz, B., and L. Terradot.** 2013. Structure and mode of injection of the oncoprotein CagA of *Helicobacter pylori*. *Med Sci (Paris)* **29**:33-6.
189. **Kavermann, H., B. P. Burns, K. Angermuller, S. Odenbreit, W. Fischer, K. Melchers, and R. Haas.** 2003. Identification and characterization of *Helicobacter pylori* genes essential for gastric colonization. *J Exp Med* **197**:813-22.
190. **Kawahara, Y., M. Mizuno, T. Yoshino, K. Yokota, K. Oguma, H. Okada, S. Fujiki, and Y. Shiratori.** 2005. HLA-DQA1*0103-DQB1*0601 haplotype and *Helicobacter pylori*-

- positive gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Clin Gastroenterol Hepatol* **3**:865-8.
191. **Keates, S., A. C. Keates, S. Nath, R. M. Peek, Jr., and C. P. Kelly.** 2005. Transactivation of the epidermal growth factor receptor by *cag+* *Helicobacter pylori* induces upregulation of the early growth response gene *Egr-1* in gastric epithelial cells. *Gut* **54**:1363-9.
 192. **Kern, C., J. F. Cornuel, C. Billard, R. Tang, D. Rouillard, V. Stenou, T. Defrance, F. Ajchenbaum-Cymbalista, P. Y. Simonin, S. Feldblum, and J. P. Kolb.** 2004. Involvement of BAFF and APRIL in the resistance to apoptosis of B-CLL through an autocrine pathway. *Blood* **103**:679-88.
 193. **Kidd, M., and I. M. Modlin.** 1998. A century of *Helicobacter pylori*: paradigms lost-paradigms regained. *Digestion* **59**:1-15.
 194. **Kim, D. H., S. W. Kim, Y. J. Song, T. Y. Oh, S. U. Han, Y. B. Kim, H. J. Joo, Y. K. Cho, D. Y. Kim, S. W. Cho, M. W. Kim, J. H. Kim, and K. B. Hahm.** 2003. Long-term evaluation of mice model infected with *Helicobacter pylori*: focus on gastric pathology including gastric cancer. *Aliment Pharmacol Ther* **18 Suppl 1**:14-23.
 195. **Kim, J. J., H. Tao, E. Carloni, W. K. Leung, D. Y. Graham, and A. R. Sepulveda.** 2002. *Helicobacter pylori* impairs DNA mismatch repair in gastric epithelial cells. *Gastroenterology* **123**:542-53.
 196. **Kim, K. M., S. G. Lee, J. M. Kim, D. S. Kim, J. Y. Song, H. L. Kang, W. K. Lee, M. J. Cho, K. H. Rhee, H. S. Youn, and S. C. Baik.** 2010. *Helicobacter pylori* gamma-glutamyltranspeptidase induces cell cycle arrest at the G1-S phase transition. *J Microbiol* **48**:372-7.
 197. **Kim, K. M., S. G. Lee, M. G. Park, J. Y. Song, H. L. Kang, W. K. Lee, M. J. Cho, K. H. Rhee, H. S. Youn, and S. C. Baik.** 2007. Gamma-glutamyltranspeptidase of *Helicobacter pylori* induces mitochondria-mediated apoptosis in AGS cells. *Biochem Biophys Res Commun* **355**:562-7.
 198. **Kim, S. Y., Y. C. Lee, H. K. Kim, and M. J. Blaser.** 2006. *Helicobacter pylori* CagA transfection of gastric epithelial cells induces interleukin-8. *Cell Microbiol* **8**:97-106.
 199. **Kim, Y. G., J. H. Park, M. H. Shaw, L. Franchi, N. Inohara, and G. Nunez.** 2008. The cytosolic sensors Nod1 and Nod2 are critical for bacterial recognition and host defense after exposure to Toll-like receptor ligands. *Immunity* **28**:246-57.
 200. **Klein, P. D., D. Y. Graham, A. Gaillour, A. R. Opekun, and E. O. Smith.** 1991. Water source as risk factor for *Helicobacter pylori* infection in Peruvian children. Gastrointestinal Physiology Working Group. *Lancet* **337**:1503-6.
 201. **Kloosterman, W. P., and R. H. Plasterk.** 2006. The diverse functions of microRNAs in animal development and disease. *Dev Cell* **11**:441-50.
 202. **Kobayashi, H., S. Kamiya, T. Suzuki, K. Kohda, S. Muramatsu, T. Kurumada, U. Ohta, M. Miyazawa, N. Kimura, N. Mutoh, T. Shirai, A. Takagi, S. Harasawa, N. Tani, and T. Miwa.** 1996. The effect of *Helicobacter pylori* on gastric acid secretion by isolated parietal cells from a guinea pig. Association with production of vacuolating toxin by *H. pylori*. *Scand J Gastroenterol* **31**:428-33.
 203. **Koch, A., T. G. Krause, K. Kroghelt, O. R. Olsen, T. K. Fischer, and M. Melbye.** 2005. Seroprevalence and risk factors for *Helicobacter pylori* infection in Greenlanders. *Helicobacter* **10**:433-42.
 204. **Koehler, C. I., M. B. Mues, H. P. Dienes, J. Kriegsmann, P. Schirmacher, and M. Odenthal.** 2003. *Helicobacter pylori* genotyping in gastric adenocarcinoma and MALT lymphoma by multiplex PCR analyses of paraffin wax embedded tissues. *Mol Pathol* **56**:36-42.

205. **Konturek, S. J., P. C. Konturek, J. W. Konturek, M. Plonka, M. Czesnikiewicz-Guzik, T. Brzozowski, and W. Bielanski.** 2006. *Helicobacter pylori* and its involvement in gastritis and peptic ulcer formation. *J Physiol Pharmacol* **57 Suppl 3**:29-50.
206. **Kuck, D., B. Kolmerer, C. Iking-Konert, P. H. Krammer, W. Stremmel, and J. Rudi.** 2001. Vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori* induces apoptosis in the human gastric epithelial cell line AGS. *Infect Immun* **69**:5080-7.
207. **Kuipers, E. J., G. I. Perez-Perez, S. G. Meuwissen, and M. J. Blaser.** 1995. *Helicobacter pylori* and atrophic gastritis: importance of the cagA status. *J Natl Cancer Inst* **87**:1777-80.
208. **Kuo, S. H., L. T. Chen, C. W. Lin, M. S. Wu, P. N. Hsu, H. J. Tsai, C. Y. Chu, Y. S. Tzeng, H. P. Wang, K. H. Yeh, and A. L. Cheng.** 2013. Detection of the *Helicobacter pylori* CagA protein in gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma cells: clinical and biological significance. *Blood Cancer J* **3**:e125.
209. **Kuo, S. H., L. T. Chen, M. S. Wu, C. W. Lin, K. H. Yeh, K. T. Kuo, P. Y. Yeh, Y. S. Tzeng, H. P. Wang, P. N. Hsu, J. T. Lin, and A. L. Cheng.** 2008. Long-term follow-up of gastrectomized patients with mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma: need for a revisit of surgical treatment. *Ann Surg* **247**:265-9.
210. **Kuo, S. H., K. H. Yeh, L. T. Chen, C. W. Lin, P. N. Hsu, M. S. Wu, J. M. Liou, H. J. Tsai, Y. S. Tzeng, and A. L. Cheng.** 2015. *Helicobacter pylori* CagA Translocation Is Closely Associated With the Expression of CagA-signaling Molecules in Low-grade Gastric Mucosa-associated Lymphoid Tissue Lymphoma. *Am J Surg Pathol* **39**:761-6.
211. **Kuo, S. H., K. H. Yeh, M. S. Wu, C. W. Lin, P. N. Hsu, H. P. Wang, L. T. Chen, and A. L. Cheng.** 2012. *Helicobacter pylori* eradication therapy is effective in the treatment of early-stage *H. pylori*-positive gastric diffuse large B-cell lymphomas. *Blood* **119**:4838-44; quiz 5057.
212. **Kusic, B., S. Gasparov, M. Katicic, M. Dominis, and M. Antica.** 2003. Monoclonality in *Helicobacter pylori*-positive gastric biopsies: an early detection of mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Exp Mol Pathol* **74**:61-7.
213. **Kusters, J. G., A. H. van Vliet, and E. J. Kuipers.** 2006. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Clin Microbiol Rev* **19**:449-90.
214. **Kutter, S., R. Buhrdorf, J. Haas, W. Schneider-Brachert, R. Haas, and W. Fischer.** 2008. Protein subassemblies of the *Helicobacter pylori* Cag type IV secretion system revealed by localization and interaction studies. *J Bacteriol* **190**:2161-71.
215. **Kuzushita, N., A. B. Rogers, N. A. Monti, M. T. Whary, M. J. Park, B. I. Aswad, H. Shirin, A. Koff, H. Eguchi, and S. F. Moss.** 2005. p27kip1 deficiency confers susceptibility to gastric carcinogenesis in *Helicobacter pylori*-infected mice. *Gastroenterology* **129**:1544-56.
216. **Kwok, T., D. Zabler, S. Urman, M. Rohde, R. Hartig, S. Wessler, R. Misselwitz, J. Berger, N. Sewald, W. Konig, and S. Backert.** 2007. *Helicobacter* exploits integrin for type IV secretion and kinase activation. *Nature* **449**:862-6.
217. **Labigne, A., and H. de Reuse.** 1996. Determinants of *Helicobacter pylori* pathogenicity. *Infect Agents Dis* **5**:191-202.
218. **Lascano, V., L. F. Zabalegui, K. Cameron, M. Guadagnoli, M. Jansen, M. Burggraaf, M. Versloot, H. Rodermond, C. van der Loos, C. E. Carvalho-Pinto, H. Kalthoff, J. P. Medema, and M. Hahne.** 2012. The TNF family member APRIL promotes colorectal tumorigenesis. *Cell Death Differ* **19**:1826-35.
219. **Lauren, P.** 1965. The Two Histological Main Types of Gastric Carcinoma: Diffuse and So-Called Intestinal-Type Carcinoma. an Attempt at a Histo-Clinical Classification. *Acta Pathol Microbiol Scand* **64**:31-49.
220. **Lawrie, C. H.** 2012. MicroRNAs and lymphomagenesis: a functional review. *Br J Haematol* **160**:571-81.

221. **Lee, A., J. G. Fox, G. Otto, and J. Murphy.** 1990. A small animal model of human *Helicobacter pylori* active chronic gastritis. *Gastroenterology* **99**:1315-23.
222. **Lee, A., S. L. Hazell, J. O'Rourke, and S. Kouprach.** 1988. Isolation of a spiral-shaped bacterium from the cat stomach. *Infect Immun* **56**:2843-50.
223. **Lee, A., J. O'Rourke, M. C. De Ungria, B. Robertson, G. Daskalopoulos, and M. F. Dixon.** 1997. A standardized mouse model of *Helicobacter pylori* infection: introducing the Sydney strain. *Gastroenterology* **112**:1386-97.
224. **Lehours, P., S. Dupouy, B. Bergey, A. Ruskone-Foumestraux, J. C. Delchier, R. Rad, F. Richy, J. Tankovic, F. Zerbib, F. Megraud, and A. Menard.** 2004. Identification of a genetic marker of *Helicobacter pylori* strains involved in gastric extranodal marginal zone B cell lymphoma of the MALT-type. *Gut* **53**:931-7.
225. **Lehours, P., A. Menard, S. Dupouy, B. Bergey, F. Richy, F. Zerbib, A. Ruskone-Fourmestraux, J. C. Delchier, and F. Megraud.** 2004. Evaluation of the association of nine *Helicobacter pylori* virulence factors with strains involved in low-grade gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Infect Immun* **72**:880-8.
226. **Lehours, P., A. Ruskone-Fourmestraux, A. Lavergne, F. Cantet, and F. Megraud.** 2003. Which test to use to detect *Helicobacter pylori* infection in patients with low-grade gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma? *Am J Gastroenterol* **98**:291-5.
227. **Lehours, P., Z. Zheng, A. Skoglund, F. Megraud, and L. Engstrand.** 2009. Is there a link between the lipopolysaccharide of *Helicobacter pylori* gastric MALT lymphoma associated strains and lymphoma pathogenesis? *PLoS One* **4**:e7297.
228. **Lertsethtakarn, P., K. M. Ottemann, and D. R. Hendrixson.** 2011. Motility and chemotaxis in *Campylobacter* and *Helicobacter*. *Annu Rev Microbiol* **65**:389-410.
229. **Leunk, R. D., P. T. Johnson, B. C. David, W. G. Kraft, and D. R. Morgan.** 1988. Cytotoxic activity in broth-culture filtrates of *Campylobacter pylori*. *J Med Microbiol* **26**:93-9.
230. **Li, H., T. Liao, A. W. Debowski, H. Tang, H. O. Nilsson, K. A. Stubbs, B. J. Marshall, and M. Benghezal.** 2016. Lipopolysaccharide Structure and Biosynthesis in *Helicobacter pylori*. *Helicobacter*.
231. **Liao, F., Y. C. Hsu, S. H. Kuo, Y. C. Yang, J. P. Chen, P. N. Hsu, C. W. Lin, L. T. Chen, A. L. Cheng, C. S. Fann, J. T. Lin, and M. S. Wu.** 2014. Genetic polymorphisms and tissue expression of interleukin-22 associated with risk and therapeutic response of gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Blood Cancer J* **4**:eXX.
232. **Lin, C. Y., Y. S. Huang, C. H. Li, Y. T. Hsieh, N. M. Tsai, P. J. He, W. T. Hsu, Y. C. Yeh, F. H. Chiang, M. S. Wu, C. C. Chang, and K. W. Liao.** 2009. Characterizing the polymeric status of *Helicobacter pylori* heat shock protein 60. *Biochem Biophys Res Commun* **388**:283-9.
233. **Lin, J. D., S. F. Yang, Y. H. Wang, W. F. Fang, Y. C. Lin, Y. F. Lin, K. T. Tang, M. Y. Wu, and C. W. Cheng.** 2016. Analysis of Associations of Human BAFF Gene Polymorphisms with Autoimmune Thyroid Diseases. *PLoS One* **11**:e0154436.
234. **Lin, W. C., H. F. Tsai, S. H. Kuo, M. S. Wu, C. W. Lin, P. I. Hsu, A. L. Cheng, and P. N. Hsu.** 2010. Translocation of *Helicobacter pylori* CagA into Human B lymphocytes, the origin of mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Cancer Res* **70**:5740-8.
235. **Litinskiy, M. B., B. Nardelli, D. M. Hilbert, B. He, A. Schaffer, P. Casali, and A. Cerutti.** 2002. DCs induce CD40-independent immunoglobulin class switching through BlyS and APRIL. *Nat Immunol* **3**:822-9.
236. **Ljungh, A., and T. Wadstrom.** 1996. Interactions of bacterial adhesins with the extracellular matrix. *Adv Exp Med Biol* **408**:129-40.
237. **Lunet, N., and H. Barros.** 2003. *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer: facing the enigmas. *Int J Cancer* **106**:953-60.

238. **Luther, S. A., and J. G. Cyster.** 2001. Chemokines as regulators of T cell differentiation. *Nat Immunol* **2**:102-7.
239. **Machado, A. M., C. Figueiredo, E. Touati, V. Maximo, S. Sousa, V. Michel, F. Carneiro, F. C. Nielsen, R. Seruca, and L. J. Rasmussen.** 2009. *Helicobacter pylori* infection induces genetic instability of nuclear and mitochondrial DNA in gastric cells. *Clin Cancer Res* **15**:2995-3002.
240. **Maeda, S., K. Ogura, H. Yoshida, F. Kanai, T. Ikenoue, N. Kato, Y. Shiratori, and M. Omata.** 1998. Major virulence factors, VacA and CagA, are commonly positive in *Helicobacter pylori* isolates in Japan. *Gut* **42**:338-43.
241. **Malaty, H. M.** 2007. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* **21**:205-14.
242. **Malfertheiner, P., F. Megraud, C. A. O'Morain, J. Atherton, A. T. Axon, F. Bazzoli, G. F. Gensini, J. P. Gisbert, D. Y. Graham, T. Rokkas, E. M. El-Omar, and E. J. Kuipers.** 2012. Management of *Helicobacter pylori* infection--the Maastricht IV/ Florence Consensus Report. *Gut* **61**:646-64.
243. **Malfertheiner, P., P. Sipponen, M. Naumann, P. Moayyedi, F. Megraud, S. D. Xiao, K. Sugano, and O. Nyren.** 2005. *Helicobacter pylori* eradication has the potential to prevent gastric cancer: a state-of-the-art critique. *Am J Gastroenterol* **100**:2100-15.
244. **Marais, A., G. L. Mendz, S. L. Hazell, and F. Megraud.** 1999. Metabolism and genetics of *Helicobacter pylori*: the genome era. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**:642-74.
245. **Marchetti, M., B. Arico, D. Burroni, N. Figura, R. Rappuoli, and P. Ghiara.** 1995. Development of a mouse model of *Helicobacter pylori* infection that mimics human disease. *Science* **267**:1655-8.
246. **Marshall, B. J., and J. R. Warren.** 1984. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* **1**:1311-5.
247. **Martinelli, G., D. Laszlo, A. J. Ferreri, G. Pruneri, M. Ponzoni, A. Conconi, C. Crosta, E. Pedrinis, F. Bertoni, L. Calabrese, and E. Zucca.** 2005. Clinical activity of rituximab in gastric marginal zone non-Hodgkin's lymphoma resistant to or not eligible for anti-*Helicobacter pylori* therapy. *J Clin Oncol* **23**:1979-83.
248. **Martinez-Delgado, B., J. Fernandez-Piqueras, M. J. Garcia, E. Arranz, J. Gallego, C. Rivas, M. Robledo, and J. Benitez.** 1997. Hypermethylation of a 5' CpG island of p16 is a frequent event in non-Hodgkin's lymphoma. *Leukemia* **11**:425-8.
249. **Martinez-Delgado, B., M. Robledo, E. Arranz, A. Osorio, M. J. Garcia, G. Echezarreta, C. Rivas, and J. Benitez.** 1998. Hypermethylation of p15/ink4b/MTS2 gene is differentially implicated among non-Hodgkin's lymphomas. *Leukemia* **12**:937-41.
250. **Matsushima, K., H. Isomoto, N. Inoue, T. Nakayama, T. Hayashi, M. Nakayama, K. Nakao, T. Hirayama, and S. Kohno.** 2011. MicroRNA signatures in *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosa. *Int J Cancer* **128**:361-70.
251. **Mazzucchelli, L., A. Blaser, A. Kappeler, P. Scharli, J. A. Laissue, M. Baggolini, and M. Ugucioni.** 1999. BCA-1 is highly expressed in *Helicobacter pylori*-induced mucosa-associated lymphoid tissue and gastric lymphoma. *J Clin Invest* **104**:R49-54.
252. **McGovern, K. J., T. G. Blanchard, J. A. Gutierrez, S. J. Czinn, S. Krakowka, and P. Youngman.** 2001. gamma-Glutamyltransferase is a *Helicobacter pylori* virulence factor but is not essential for colonization. *Infect Immun* **69**:4168-73.
253. **Megraud, F.** 2007. *Helicobacter pylori* and antibiotic resistance. *Gut* **56**:1502.
254. **Megraud, F.** 2003. [When and how does *Helicobacter pylori* infection occur?]. *Gastroenterol Clin Biol* **27**:374-9.
255. **Megraud, F., E. Bessede, and C. Varon.** 2015. *Helicobacter pylori* infection and gastric carcinoma. *Clin Microbiol Infect* **21**:984-90.

256. **Megraud, F., F. Bonnet, M. Garnier, and H. Lamouliatte.** 1985. Characterization of "*Campylobacter pyloridis*" by culture, enzymatic profile, and protein content. *J Clin Microbiol* **22**:1007-10.
257. **Mejias-Luque, R., J. Zoller, F. Anderl, E. Loew-Gil, M. Vieth, T. Adler, D. B. Engler, S. Urban, J. L. Browning, A. Muller, M. Gerhard, and M. Heikenwalder.** 2016. Lymphotoxin beta receptor signalling executes *Helicobacter pylori*-driven gastric inflammation in a T4SS-dependent manner. *Gut*.
258. **Menard, A., A. Buissonniere, V. Prouzet-Mauleon, E. Sifre, and F. Megraud.** 2015. The GyrA encoded gene: A pertinent marker for the phylogenetic revision of *Helicobacter* genus. *Syst Appl Microbiol* **39**:77-87.
259. **Mhawech-Fauceglia, P., G. Kaya, G. Sauter, T. McKee, O. Donze, J. Schwaller, and B. Huard.** 2006. The source of APRIL up-regulation in human solid tumor lesions. *J Leukoc Biol* **80**:697-704.
260. **Mimuro, H., T. Suzuki, J. Tanaka, M. Asahi, R. Haas, and C. Sasakawa.** 2002. Grb2 is a key mediator of *helicobacter pylori* CagA protein activities. *Mol Cell* **10**:745-55.
261. **Mitsuhashi, K., K. Yamashita, A. Goto, T. Adachi, Y. Kondo, K. Kasai, R. Suzuki, M. Saito, Y. Arimura, and Y. Shinomura.** 2014. Gastric diffuse large B-cell lymphoma cured with *Helicobacter pylori* eradication regardless of whether it contains features of MALT lymphoma. *Intern Med* **53**:695-8.
262. **Mobley, H. L., M. D. Island, and R. P. Hausinger.** 1995. Molecular biology of microbial ureases. *Microbiol Rev* **59**:451-80.
263. **Moese, S., M. Selbach, T. Kwok, V. Brinkmann, W. Konig, T. F. Meyer, and S. Backert.** 2004. *Helicobacter pylori* induces AGS cell motility and elongation via independent signaling pathways. *Infect Immun* **72**:3646-9.
264. **Mohammadi, M., R. Redline, J. Nedrud, and S. Czinn.** 1996. Role of the host in pathogenesis of *Helicobacter*-associated gastritis: *H. felis* infection of inbred and congenic mouse strains. *Infect Immun* **64**:238-45.
265. **Molinari, M., M. Salio, C. Galli, N. Norais, R. Rappuoli, A. Lanzavecchia, and C. Montecucco.** 1998. Selective inhibition of Ii-dependent antigen presentation by *Helicobacter pylori* toxin VacA. *J Exp Med* **187**:135-40.
266. **Montalban, C., and F. Norman.** 2006. Treatment of gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma: *Helicobacter pylori* eradication and beyond. *Expert Rev Anticancer Ther* **6**:361-71.
267. **Moodley, Y., B. Linz, R. P. Bond, M. Nieuwoudt, H. Soodyall, C. M. Schlebusch, S. Bernhoft, J. Hale, S. Suerbaum, L. Mugisha, S. W. van der Merwe, and M. Achtman.** 2012. Age of the association between *Helicobacter pylori* and man. *PLoS Pathog* **8**:e1002693.
268. **Moran, A. P.** 2008. Relevance of fucosylation and Lewis antigen expression in the bacterial gastroduodenal pathogen *Helicobacter pylori*. *Carbohydr Res* **343**:1952-65.
269. **Moran, A. P.** 1996. The role of lipopolysaccharide in *Helicobacter pylori* pathogenesis. *Aliment Pharmacol Ther* **10 Suppl 1**:39-50.
270. **Moran, A. P., B. Lindner, and E. J. Walsh.** 1997. Structural characterization of the lipid A component of *Helicobacter pylori* rough- and smooth-form lipopolysaccharides. *J Bacteriol* **179**:6453-63.
271. **Moreaux, J., F. W. Cremer, T. Reme, M. Raab, K. Mahtouk, P. Kaukel, V. Pantesco, J. De Vos, E. Jourdan, A. Jauch, E. Legouffe, M. Moos, G. Fiol, H. Goldschmidt, J. F. Rossi, D. Hose, and B. Klein.** 2005. The level of TACI gene expression in myeloma cells is associated with a signature of microenvironment dependence versus a plasmablastic signature. *Blood* **106**:1021-30.

272. **Morgner, A., N. Lehn, L. P. Andersen, C. Thiede, M. Bennedsen, K. Trebesius, B. Neubauer, A. Neubauer, M. Stolte, and E. Bayerdorffer.** 2000. *Helicobacter heilmannii*-associated primary gastric low-grade MALT lymphoma: complete remission after curing the infection. *Gastroenterology* **118**:821-8.
273. **Morris, L. E., G. S. Bloom, H. F. Frierson, Jr., and S. M. Powell.** 2005. Nucleotide variants within the IQGAP1 gene in diffuse-type gastric cancers. *Genes Chromosomes Cancer* **42**:280-6.
274. **Mueller, A., J. O'Rourke, P. Chu, A. Chu, M. F. Dixon, D. M. Bouley, A. Lee, and S. Falkow.** 2005. The role of antigenic drive and tumor-infiltrating accessory cells in the pathogenesis of *helicobacter*-induced mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Am J Pathol* **167**:797-812.
275. **Mueller, A., J. O'Rourke, J. Grimm, K. Guillemin, M. F. Dixon, A. Lee, and S. Falkow.** 2003. Distinct gene expression profiles characterize the histopathological stages of disease in *Helicobacter*-induced mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:1292-7.
276. **Munari, F., M. Fassan, N. Capitani, G. Codolo, M. Vila-Caballer, M. Pizzi, M. Rugge, C. Della Bella, A. Troilo, S. D'Elis, C. T. Baldari, M. M. D'Elis, and M. de Bernard.** 2014. Cytokine BAFF released by *Helicobacter pylori*-infected macrophages triggers the Th17 response in human chronic gastritis. *J Immunol* **193**:5584-94.
277. **Munari, F., S. Lonardi, M. A. Cassatella, C. Doglioni, M. G. Cangì, A. Amedei, F. Facchetti, Y. Eishi, M. Rugge, M. Fassan, M. de Bernard, M. M. D'Elis, and W. Vermi.** 2011. Tumor-associated macrophages as major source of APRIL in gastric MALT lymphoma. *Blood* **117**:6612-6.
278. **Murata-Kamiya, N., Y. Kurashima, Y. Teishikata, Y. Yamahashi, Y. Saito, H. Higashi, H. Aburatani, T. Akiyama, R. M. Peek, Jr., T. Azuma, and M. Hatakeyama.** 2007. *Helicobacter pylori* CagA interacts with E-cadherin and deregulates the beta-catenin signal that promotes intestinal transdifferentiation in gastric epithelial cells. *Oncogene* **26**:4617-26.
279. **Musilova, K., and M. Mraz.** 2015. MicroRNAs in B-cell lymphomas: how a complex biology gets more complex. *Leukemia* **29**:1004-17.
280. **Mustapha, P., I. Paris, M. Garcia, C. T. Tran, J. Cremniter, M. Garnier, J. P. Faure, T. Barthes, I. G. Boneca, F. Morel, J. C. Lecron, C. Burucoa, and C. Bodet.** 2014. Chemokines and antimicrobial peptides have a cag-dependent early response to *Helicobacter pylori* infection in primary human gastric epithelial cells. *Infect Immun* **82**:2881-9.
281. **Nakamura, H., H. Yoshiyama, H. Takeuchi, T. Mizote, K. Okita, and T. Nakazawa.** 1998. Urease plays an important role in the chemotactic motility of *Helicobacter pylori* in a viscous environment. *Infect Immun* **66**:4832-7.
282. **Nakamura, M., S. Y. Murayama, H. Serizawa, Y. Sekiya, M. Eguchi, S. Takahashi, K. Nishikawa, T. Takahashi, T. Matsumoto, H. Yamada, T. Hibi, K. Tsuchimoto, and H. Matsui.** 2007. "*Candidatus Helicobacter heilmannii*" from a cynomolgus monkey induces gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphomas in C57BL/6 mice. *Infect Immun* **75**:1214-22.
283. **Nakamura, S., K. Aoyagi, M. Furuse, H. Suekane, T. Matsumoto, T. Yao, Y. Sakai, T. Fuchigami, I. Yamamoto, M. Tsuneyoshi, and M. Fujishima.** 1998. B-cell monoclonality precedes the development of gastric MALT lymphoma in *Helicobacter pylori*-associated chronic gastritis. *Am J Pathol* **152**:1271-9.
284. **Nakamura, S., T. Matsumoto, H. Suekane, S. Nakamura, H. Matsumoto, M. Esaki, T. Yao, and M. Iida.** 2005. Long-term clinical outcome of *Helicobacter pylori* eradication for gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma with a reference to second-line treatment. *Cancer* **104**:532-40.

285. Nakamura, S., T. Matsumoto, H. Ye, S. Nakamura, H. Suekane, H. Matsumoto, T. Yao, M. Tsuneyoshi, M. Q. Du, and M. Iida. 2006. *Helicobacter pylori*-negative gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma: a clinicopathologic and molecular study with reference to antibiotic treatment. *Cancer* **107**:2770-8.
286. Nakayama, M., J. Hisatsune, E. Yamasaki, Y. Nishi, A. Wada, H. Kurazono, J. Sap, K. Yahiro, J. Moss, and T. Hirayama. 2006. Clustering of *Helicobacter pylori* VacA in lipid rafts, mediated by its receptor, receptor-like protein tyrosine phosphatase beta, is required for intoxication in AZ-521 Cells. *Infect Immun* **74**:6571-80.
287. Ng, W. W., C. P. Lam, W. K. Chau, A. Fen-Yau Li, C. C. Huang, F. Y. Chang, and S. D. Lee. 2000. Regression of high-grade gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma with *Helicobacter pylori* after triple antibiotic therapy. *Gastrointest Endosc* **51**:93-6.
288. Nguyen, V. Q., R. M. Caprioli, and T. L. Cover. 2001. Carboxy-terminal proteolytic processing of *Helicobacter pylori* vacuolating toxin. *Infect Immun* **69**:543-6.
289. Nishi, T., K. Okazaki, K. Kawasaki, T. Fukui, H. Tamaki, M. Matsuura, M. Asada, T. Watanabe, K. Uchida, N. Watanabe, H. Nakase, M. Ohana, H. Hiai, and T. Chiba. 2003. Involvement of myeloid dendritic cells in the development of gastric secondary lymphoid follicles in *Helicobacter pylori*-infected neonatally thymectomized BALB/c mice. *Infect Immun* **71**:2153-62.
290. Novak, A. J., R. J. Bram, N. E. Kay, and D. F. Jelinek. 2002. Aberrant expression of B-lymphocyte stimulator by B chronic lymphocytic leukemia cells: a mechanism for survival. *Blood* **100**:2973-9.
291. Nurgalieva, Z. Z., H. M. Malaty, D. Y. Graham, R. Almuchambetova, A. Machmudova, D. Kapsultanova, M. S. Osato, F. B. Hollinger, and A. Zhangabylov. 2002. *Helicobacter pylori* infection in Kazakhstan: effect of water source and household hygiene. *Am J Trop Med Hyg* **67**:201-6.
292. O'Garra, A., and D. Robinson. 2004. Development and function of T helper 1 cells. *Adv Immunol* **83**:133-62.
293. O'Keeffe, J., C. M. Gately, Y. O'Donoghue, S. A. Zulquernain, F. M. Stevens, and A. P. Moran. 2008. Natural killer cell receptor T-lymphocytes in normal and *Helicobacter pylori*-infected human gastric mucosa. *Helicobacter* **13**:500-5.
294. O'Keeffe, J., and A. P. Moran. 2008. Conventional, regulatory, and unconventional T cells in the immunologic response to *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* **13**:1-19.
295. O'Rourke, J. L. 2008. Gene expression profiling in *Helicobacter*-induced MALT lymphoma with reference to antigen drive and protective immunization. *J Gastroenterol Hepatol* **23 Suppl 2**:S151-6.
296. O'Rourke, J. L., M. F. Dixon, A. Jack, A. Enno, and A. Lee. 2004. Gastric B-cell mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma in an animal model of '*Helicobacter heilmannii*' infection. *J Pathol* **203**:896-903.
297. O'Rourke, J. L., and A. Lee. 2003. Animal models of *Helicobacter pylori* infection and disease. *Microbes Infect* **5**:741-8.
298. Occhialini, A., A. Marais, M. Urdaci, R. Sierra, N. Munoz, A. Covacci, and F. Megraud. 2001. Composition and gene expression of the cag pathogenicity island in *Helicobacter pylori* strains isolated from gastric carcinoma and gastritis patients in Costa Rica. *Infect Immun* **69**:1902-8.
299. Odenbreit, S., M. Till, D. Hofreuter, G. Faller, and R. Haas. 1999. Genetic and functional characterization of the alpAB gene locus essential for the adhesion of *Helicobacter pylori* to human gastric tissue. *Mol Microbiol* **31**:1537-48.
300. Oertli, M., M. Noben, D. B. Engler, R. P. Semper, S. Reuter, J. Maxeiner, M. Gerhard, C. Taube, and A. Muller. 2013. *Helicobacter pylori* gamma-glutamyl transpeptidase and

- vacuolating cytotoxin promote gastric persistence and immune tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**:3047-52.
301. **Oertli, M., M. Sundquist, I. Hitzler, D. B. Engler, I. C. Arnold, S. Reuter, J. Maxeiner, M. Hansson, C. Taube, M. Quiding-Jarbrink, and A. Muller.** 2012. DC-derived IL-18 drives Treg differentiation, murine *Helicobacter pylori*-specific immune tolerance, and asthma protection. *J Clin Invest* **122**:1082-96.
 302. **Ohnishi, N., H. Yuasa, S. Tanaka, H. Sawa, M. Miura, A. Matsui, H. Higashi, M. Musashi, K. Iwabuchi, M. Suzuki, G. Yamada, T. Azuma, and M. Hatakeyama.** 2008. Transgenic expression of *Helicobacter pylori* CagA induces gastrointestinal and hematopoietic neoplasms in mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**:1003-8.
 303. **Ohshima, K., H. Suefuji, K. Karube, M. Hamasaki, B. Hatano, T. Tutiya, T. Yamaguchi, K. Suzuki, J. Suzumiya, and M. Kikuchi.** 2003. Expression of chemokine receptor CXCR3 and its ligand, mig, in gastric and thyroid marginal zone lymphomas. Possible migration and autocrine mechanism. *Leuk Lymphoma* **44**:329-36.
 304. **Oleastro, M., R. Cordeiro, J. Ferrand, B. Nunes, P. Lehours, I. Carvalho-Oliveira, A. I. Mendes, D. Penque, L. Monteiro, F. Megraud, and A. Menard.** 2008. Evaluation of the clinical significance of homB, a novel candidate marker of *Helicobacter pylori* strains associated with peptic ulcer disease. *J Infect Dis* **198**:1379-87.
 305. **Oleastro, M., M. Gerhard, A. I. Lopes, P. Ramalho, J. Cabral, A. Sousa Guerreiro, and L. Monteiro.** 2003. *Helicobacter pylori* virulence genotypes in Portuguese children and adults with gastroduodenal pathology. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **22**:85-91.
 306. **Oleastro, M., A. Menard, A. Santos, H. Lamouliatte, L. Monteiro, P. Barthelemy, and F. Megraud.** 2003. Real-time PCR assay for rapid and accurate detection of point mutations conferring resistance to clarithromycin in *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol* **41**:397-402.
 307. **Olszewski, A. J., and J. J. Castillo.** 2013. Comparative outcomes of oncologic therapy in gastric extranodal marginal zone (MALT) lymphoma: analysis of the SEER-Medicare database. *Ann Oncol* **24**:1352-9.
 308. **Oshima, C., K. Okazaki, Y. Matsushima, M. Sawada, T. Chiba, K. Takahashi, H. Hiai, T. Katakai, S. Kasakura, and T. Masuda.** 2000. Induction of follicular gastritis following postthymectomy autoimmune gastritis in *Helicobacter pylori*-infected BALB/c mice. *Infect Immun* **68**:100-6.
 309. **Owen, R. J.** 1995. Bacteriology of *Helicobacter pylori*. *Baillieres Clin Gastroenterol* **9**:415-46.
 310. **Park, J. H., S. H. Seok, M. W. Baek, H. Y. Lee, D. J. Kim, and J. H. Park.** 2008. Gastric lesions and immune responses caused by long-term infection with *Helicobacter heilmannii* in C57BL/6 mice. *J Comp Pathol* **139**:208-17.
 311. **Parkin, D. M., F. Bray, J. Ferlay, and P. Pisani.** 2005. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* **55**:74-108.
 312. **Parsonnet, J., G. D. Friedman, N. Orentreich, and H. Vogelman.** 1997. Risk for gastric cancer in people with CagA positive or CagA negative *Helicobacter pylori* infection. *Gut* **40**:297-301.
 313. **Parsonnet, J., S. Hansen, L. Rodriguez, A. B. Gelb, R. A. Warnke, E. Jellum, N. Orentreich, J. H. Vogelman, and G. D. Friedman.** 1994. *Helicobacter pylori* infection and gastric lymphoma. *N Engl J Med* **330**:1267-71.
 314. **Pattis, I., E. Weiss, R. Laugks, R. Haas, and W. Fischer.** 2007. The *Helicobacter pylori* CagF protein is a type IV secretion chaperone-like molecule that binds close to the C-terminal secretion signal of the CagA effector protein. *Microbiology* **153**:2896-909.
 315. **Peck, B., M. Ortkamp, K. D. Diehl, E. Hundt, and B. Knapp.** 1999. Conservation, localization and expression of HopZ, a protein involved in adhesion of *Helicobacter pylori*. *Nucleic Acids Res* **27**:3325-33.

316. Peek, R. M., Jr., M. J. Blaser, D. J. Mays, M. H. Forsyth, T. L. Cover, S. Y. Song, U. Krishna, and J. A. Pietenpol. 1999. *Helicobacter pylori* strain-specific genotypes and modulation of the gastric epithelial cell cycle. *Cancer Res* **59**:6124-31.
317. Peng, H., G. Chen, M. Du, N. Singh, P. G. Isaacson, and L. Pan. 1996. Replication error phenotype and p53 gene mutation in lymphomas of mucosa-associated lymphoid tissue. *Am J Pathol* **148**:643-8.
318. Peng, H., T. Diss, P. G. Isaacson, and L. Pan. 1997. c-myc gene abnormalities in mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphomas. *J Pathol* **181**:381-6.
319. Peng, H., R. Ranaldi, T. C. Diss, P. G. Isaacson, I. Bearzi, and L. Pan. 1998. High frequency of CagA+ *Helicobacter pylori* infection in high-grade gastric MALT B-cell lymphomas. *J Pathol* **185**:409-12.
320. Pereira, M. I., and J. A. Medeiros. 2014. Role of *Helicobacter pylori* in gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphomas. *World J Gastroenterol* **20**:684-98.
321. Pichiorri, F., S. S. Suh, M. Ladetto, M. Kuehl, T. Palumbo, D. Drandi, C. Taccioli, N. Zanesi, H. Alder, J. P. Hagan, R. Munker, S. Volinia, M. Boccardo, R. Garzon, A. Palumbo, R. I. Aqeilan, and C. M. Croce. 2008. MicroRNAs regulate critical genes associated with multiple myeloma pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**:12885-90.
322. Planelles, L., C. E. Carvalho-Pinto, G. Hardenberg, S. Smaniotto, W. Savino, R. Gomez-Caro, M. Alvarez-Mon, J. de Jong, E. Eldering, A. C. Martinez, J. P. Medema, and M. Hahne. 2004. APRIL promotes B-1 cell-associated neoplasm. *Cancer Cell* **6**:399-408.
323. Planelles, L., J. P. Medema, M. Hahne, and G. Hardenberg. 2008. The expanding role of APRIL in cancer and immunity. *Curr Mol Med* **8**:829-44.
324. Polenghi, A., F. Bossi, F. Fischetti, P. Durigutto, A. Cabrelle, N. Tamassia, M. A. Cassatella, C. Montecucco, F. Tedesco, and M. de Bernard. 2007. The neutrophil-activating protein of *Helicobacter pylori* crosses endothelia to promote neutrophil adhesion *in vivo*. *J Immunol* **178**:1312-20.
325. Poppe, M., S. M. Feller, G. Romer, and S. Wessler. 2007. Phosphorylation of *Helicobacter pylori* CagA by c-Abl leads to cell motility. *Oncogene* **26**:3462-72.
326. Portal-Celhay, C., and G. I. Perez-Perez. 2006. Immune responses to *Helicobacter pylori* colonization: mechanisms and clinical outcomes. *Clin Sci (Lond)* **110**:305-14.
327. Pradet-Balade, B., J. P. Medema, M. Lopez-Fraga, J. C. Lozano, G. M. Kofschoten, A. Picard, A. C. Martinez, J. A. Garcia-Sanz, and M. Hahne. 2002. An endogenous hybrid mRNA encodes TWE-PRIL, a functional cell surface TWEAK-APRIL fusion protein. *Embo J* **21**:5711-20.
328. Prinz, C., M. Schoniger, R. Rad, I. Becker, E. Keiditsch, S. Wagenpfeil, M. Classen, T. Rosch, W. Schepp, and M. Gerhard. 2001. Key importance of the *Helicobacter pylori* adherence factor blood group antigen binding adhesin during chronic gastric inflammation. *Cancer Res* **61**:1903-9.
329. Rad, R., L. Brenner, S. Bauer, S. Schwendy, L. Layland, C. P. da Costa, W. Reindl, A. Dossumbekova, M. Friedrich, D. Saur, H. Wagner, R. M. Schmid, and C. Prinz. 2006. CD25+/Foxp3+ T cells regulate gastric inflammation and *Helicobacter pylori* colonization *in vivo*. *Gastroenterology* **131**:525-37.
330. Raderer, M., B. Streubel, S. Wohrer, M. Hafner, and A. Chott. 2006. Successful antibiotic treatment of *Helicobacter pylori* negative gastric mucosa associated lymphoid tissue lymphomas. *Gut* **55**:616-8.
331. Raderer, M., S. Wohrer, B. Kiesewetter, W. Dolak, H. Lagler, A. Wotherspoon, L. Muellauer, and A. Chott. 2015. Antibiotic treatment as sole management of *Helicobacter pylori*-negative gastric MALT lymphoma: a single center experience with prolonged follow-up. *Ann Hematol* **94**:969-73.

332. **Radin, J. N., J. A. Gaddy, C. Gonzalez-Rivera, J. T. Loh, H. M. Algood, and T. L. Cover.** 2013. Flagellar localization of a *Helicobacter pylori* autotransporter protein. *MBio* **4**:e00613-12.
333. **Raetz, C. R., and C. Whitfield.** 2002. Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu Rev Biochem* **71**:635-700.
334. **Raghavan, S., M. Fredriksson, A. M. Svennerholm, J. Holmgren, and E. Suri-Payer.** 2003. Absence of CD4+CD25+ regulatory T cells is associated with a loss of regulation leading to increased pathology in *Helicobacter pylori*-infected mice. *Clin Exp Immunol* **132**:393-400.
335. **Raghavan, S., and J. Holmgren.** 2005. CD4+CD25+ suppressor T cells regulate pathogen induced inflammation and disease. *FEMS Immunol Med Microbiol* **44**:121-7.
336. **Raghavan, S., and M. Quiding-Jarbrink.** 2012. Immune modulation by regulatory T cells in *Helicobacter pylori*-associated diseases. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* **12**:71-85.
337. **Raghavan, S., E. Suri-Payer, and J. Holmgren.** 2004. Antigen-specific *in vitro* suppression of murine *Helicobacter pylori*-reactive immunopathological T cells by CD4CD25 regulatory T cells. *Scand J Immunol* **60**:82-8.
338. **Raju, D., S. Hussey, M. Ang, M. R. Terebiznik, M. Sibony, E. Galindo-Mata, V. Gupta, S. R. Blanke, A. Delgado, J. Romero-Gallo, M. S. Ramjeet, H. Mascarenhas, R. M. Peek, P. Correa, C. Streutker, G. Hold, E. Kunstmann, T. Yoshimori, M. S. Silverberg, S. E. Girardin, D. J. Philpott, E. El Omar, and N. L. Jones.** 2012. Vacuolating cytotoxin and variants in Atg16L1 that disrupt autophagy promote *Helicobacter pylori* infection in humans. *Gastroenterology* **142**:1160-71.
339. **Ren, S., H. Higashi, H. Lu, T. Azuma, and M. Hatakeyama.** 2006. Structural basis and functional consequence of *Helicobacter pylori* CagA multimerization in cells. *J Biol Chem* **281**:32344-52.
340. **Rennert, P., P. Schneider, T. G. Cachero, J. Thompson, L. Trabach, S. Hertig, N. Holler, F. Qian, C. Mullen, K. Strauch, J. L. Browning, C. Ambrose, and J. Tschopp.** 2000. A soluble form of B cell maturation antigen, a receptor for the tumor necrosis factor family member APRIL, inhibits tumor cell growth. *J Exp Med* **192**:1677-84.
341. **Rhead, J. L., D. P. Letley, M. Mohammadi, N. Hussein, M. A. Mohagheghi, M. Eshagh Hosseini, and J. C. Atherton.** 2007. A new *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin determinant, the intermediate region, is associated with gastric cancer. *Gastroenterology* **133**:926-36.
342. **Rieder, G., W. Fischer, and R. Haas.** 2005. Interaction of *Helicobacter pylori* with host cells: function of secreted and translocated molecules. *Curr Opin Microbiol* **8**:67-73.
343. **Robinson, K., R. H. Argent, and J. C. Atherton.** 2007. The inflammatory and immune response to *Helicobacter pylori* infection. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* **21**:237-59.
344. **Rohde, M., J. Puls, R. Buhrdorf, W. Fischer, and R. Haas.** 2003. A novel sheathed surface organelle of the *Helicobacter pylori* cag type IV secretion system. *Mol Microbiol* **49**:219-34.
345. **Rollinson, S., A. P. Levene, F. K. Mensah, P. L. Roddam, J. M. Allan, T. C. Diss, E. Roman, A. Jack, K. MacLennan, M. F. Dixon, and G. J. Morgan.** 2003. Gastric marginal zone lymphoma is associated with polymorphisms in genes involved in inflammatory response and antioxidative capacity. *Blood* **102**:1007-11.
346. **Romero-Gallo, J., E. J. Harris, U. Krishna, M. K. Washington, G. I. Perez-Perez, and R. M. Peek, Jr.** 2008. Effect of *Helicobacter pylori* eradication on gastric carcinogenesis. *Lab Invest* **88**:328-36.
347. **Rosenstiel, P., S. Hellmig, J. Hampe, S. Ott, A. Till, W. Fischbach, H. Sahly, R. Lucius, U. R. Folsch, D. Philpott, and S. Schreiber.** 2006. Influence of polymorphisms in the

- NOD1/CARD4 and NOD2/CARD15 genes on the clinical outcome of *Helicobacter pylori* infection. *Cell Microbiol* **8**:1188-98.
348. Rossez, Y., P. Gosset, I. G. Boneca, A. Magalhaes, C. Ecobichon, C. A. Reis, C. Cieniewski-Bernard, M. Joncquel Chevalier Curt, R. Leonard, E. Maes, B. Sperandio, C. Slomianny, P. J. Sansonetti, J. C. Michalski, and C. Robbe-Masselot. 2014. The lacdiNAc-specific adhesin LabA mediates adhesion of *Helicobacter pylori* to human gastric mucosa. *J Infect Dis* **210**:1286-95.
349. Rothenbacher, D., G. Bode, G. Berg, R. Gommel, T. Gonser, G. Adler, and H. Brenner. 1998. Prevalence and determinants of *Helicobacter pylori* infection in preschool children: a population-based study from Germany. *Int J Epidemiol* **27**:135-41.
350. Ruby, J. G., C. H. Jan, and D. P. Bartel. 2007. Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. *Nature* **448**:83-6.
351. Rudnicka, K., A. Matusiak, E. Miszczyk, W. Rudnicka, M. Tenderenda, and M. Chmiela. 2013. Immunophenotype of peripheral blood natural killer cells and IL-10 serum levels in relation to *Helicobacter pylori* status. *Apmis* **121**:806-13.
352. Ruland, J., G. S. Duncan, A. Elia, I. del Barco Barrantes, L. Nguyen, S. Plyte, D. G. Millar, D. Bouchard, A. Wakeham, P. S. Ohashi, and T. W. Mak. 2001. Bcl10 is a positive regulator of antigen receptor-induced activation of NF-kappaB and neural tube closure. *Cell* **104**:33-42.
353. Ruskone-Fourmesttraux, A., P. Aegerter, A. Delmer, N. Brousse, A. Galian, and J. C. Rambaud. 1993. Primary digestive tract lymphoma: a prospective multicentric study of 91 patients. Groupe d'Etude des Lymphomes Digestifs. *Gastroenterology* **105**:1662-71.
354. Ruskone-Fourmesttraux, A., W. Fischbach, B. M. Aleman, H. Boot, M. Q. Du, F. Megraud, C. Montalban, M. Raderer, A. Savio, and A. Wotherspoon. 2011. EGILS consensus report. Gastric extranodal marginal zone B-cell lymphoma of MALT. *Gut* **60**:747-58.
355. Ruskone-Fourmesttraux, A., and J. C. Rambaud. 2001. Gastrointestinal lymphoma: prevention and treatment of early lesions. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* **15**:337-54.
356. Saadat, I., H. Higashi, C. Obuse, M. Umeda, N. Murata-Kamiya, Y. Saito, H. Lu, N. Ohnishi, T. Azuma, A. Suzuki, S. Ohno, and M. Hatakeyama. 2007. *Helicobacter pylori* CagA targets PAR1/MARK kinase to disrupt epithelial cell polarity. *Nature* **447**:330-3.
357. Sachs, G., J. M. Shin, K. Munson, O. Vagin, N. Lambrecht, D. R. Scott, D. L. Weeks, and K. Melchers. 2000. Review article: the control of gastric acid and *Helicobacter pylori* eradication. *Aliment Pharmacol Ther* **14**:1383-401.
358. Saito, Y., H. Suzuki, H. Tsugawa, H. Imaeda, J. Matsuzaki, K. Hirata, N. Hosoe, M. Nakamura, M. Mukai, H. Saito, and T. Hibi. 2012. Overexpression of miR-142-5p and miR-155 in gastric mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma resistant to *Helicobacter pylori* eradication. *PLoS One* **7**:e47396.
359. Sakagami, T., M. Dixon, J. O'Rourke, R. Howlett, F. Alderuccio, J. Vella, T. Shimoyama, and A. Lee. 1996. Atrophic gastric changes in both *Helicobacter felis* and *Helicobacter pylori* infected mice are host dependent and separate from antral gastritis. *Gut* **39**:639-48.
360. Salama, N. R., M. L. Hartung, and A. Muller. 2013. Life in the human stomach: persistence strategies of the bacterial pathogen *Helicobacter pylori*. *Nat Rev Microbiol* **11**:385-99.
361. Salama, N. R., G. Otto, L. Tompkins, and S. Falkow. 2001. Vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori* plays a role during colonization in a mouse model of infection. *Infect Immun* **69**:730-6.
362. Salar, A., E. Domingo-Domenech, C. Estany, M. A. Canales, F. Gallardo, O. Servitje, G. Fraile, and C. Montalban. 2009. Combination therapy with rituximab and intravenous or

- oral fludarabine in the first-line, systemic treatment of patients with extranodal marginal zone B-cell lymphoma of the mucosa-associated lymphoid tissue type. *Cancer* **115**:5210-7.
363. **Sause, W. E., A. R. Castillo, and K. M. Ottemann.** 2012. The *Helicobacter pylori* autotransporter ImaA (HP0289) modulates the immune response and contributes to host colonization. *Infect Immun* **80**:2286-96.
 364. **Sawai, N., M. Kita, T. Kodama, T. Tanahashi, Y. Yamaoka, Y. Tagawa, Y. Iwakura, and J. Imanishi.** 1999. Role of gamma interferon in *Helicobacter pylori*-induced gastric inflammatory responses in a mouse model. *Infect Immun* **67**:279-85.
 365. **Schatzle, S., M. Specht, and B. Waidner.** 2015. Coiled coil rich proteins (Ccrp) influence molecular pathogenicity of *Helicobacter pylori*. *PLoS One* **10**:e0121463.
 366. **Schickel, R., B. Boyerinas, S. M. Park, and M. E. Peter.** 2008. MicroRNAs: key players in the immune system, differentiation, tumorigenesis and cell death. *Oncogene* **27**:5959-74.
 367. **Schmausser, B., M. Eck, A. Greiner, M. Kraus, and H. K. Muller-Hermelink.** 2000. Mucosal humoral immune response to CagA shows a high prevalence in patients with gastric MALT-type lymphoma. *Virchows Arch* **436**:115-8.
 368. **Schmees, C., C. Prinz, T. Treptau, R. Rad, L. Hengst, P. Volland, S. Bauer, L. Brenner, R. M. Schmid, and M. Gerhard.** 2007. Inhibition of T-cell proliferation by *Helicobacter pylori* gamma-glutamyl transpeptidase. *Gastroenterology* **132**:1820-33.
 369. **Schroder, K., and J. Tschopp.** 2010. The inflammasomes. *Cell* **140**:821-32.
 370. **Schwaller, J., P. Schneider, P. Mhawech-Fauceglia, T. McKee, S. Myit, T. Matthes, J. Tschopp, O. Donze, F. A. Le Gal, and B. Huard.** 2007. Neutrophil-derived APRIL concentrated in tumor lesions by proteoglycans correlates with human B-cell lymphoma aggressiveness. *Blood* **109**:331-8.
 371. **Schwartz, J. T., and L. A. Allen.** 2006. Role of urease in megasome formation and *Helicobacter pylori* survival in macrophages. *J Leukoc Biol* **79**:1214-25.
 372. **Segal, E. D., J. Cha, J. Lo, S. Falkow, and L. S. Tompkins.** 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**:14559-64.
 373. **Selbach, M., S. Moese, C. R. Hauck, T. F. Meyer, and S. Backert.** 2002. Src is the kinase of the *Helicobacter pylori* CagA protein *in vitro* and *in vivo*. *J Biol Chem* **277**:6775-8.
 374. **Selbach, M., S. Moese, R. Hurwitz, C. R. Hauck, T. F. Meyer, and S. Backert.** 2003. The *Helicobacter pylori* CagA protein induces cortactin dephosphorylation and actin rearrangement by c-Src inactivation. *Embo J* **22**:515-28.
 375. **Semper, R. P., R. Mejias-Luque, C. Gross, F. Anderl, A. Muller, M. Vieth, D. H. Busch, C. Prazeres da Costa, J. Ruland, O. Gross, and M. Gerhard.** 2014. *Helicobacter pylori*-induced IL-1beta secretion in innate immune cells is regulated by the NLRP3 inflammasome and requires the cag pathogenicity island. *J Immunol* **193**:3566-76.
 376. **Seto, K., Y. Hayashi-Kuwabara, T. Yoneta, H. Suda, and H. Tamaki.** 1998. Vacuolation induced by cytotoxin from *Helicobacter pylori* is mediated by the EGF receptor in HeLa cells. *FEBS Lett* **431**:347-50.
 377. **Sewald, X., B. Gebert-Vogl, S. Prassl, I. Barwig, E. Weiss, M. Fabbri, R. Osicka, M. Schiemann, D. H. Busch, M. Semmrich, B. Holzmann, P. Sebo, and R. Haas.** 2008. Integrin subunit CD18 Is the T-lymphocyte receptor for the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin. *Cell Host Microbe* **3**:20-9.
 378. **Shaffer, C. L., J. A. Gaddy, J. T. Loh, E. M. Johnson, S. Hill, E. E. Hennig, M. S. McClain, W. H. McDonald, and T. L. Cover.** 2011. *Helicobacter pylori* exploits a unique repertoire of type IV secretion system components for pilus assembly at the bacteria-host cell interface. *PLoS Pathog* **7**:e1002237.

379. **Shahamat, M., U. Mai, C. Paszko-Kolva, M. Kessel, and R. R. Colwell.** 1993. Use of autoradiography to assess viability of *Helicobacter pylori* in water. *Appl Environ Microbiol* **59**:1231-5.
380. **Sheedy, F. J.** 2015. Turning 21: Induction of miR-21 as a Key Switch in the Inflammatory Response. *Front Immunol* **6**:19.
381. **Shi, Y., X. F. Liu, Y. Zhuang, J. Y. Zhang, T. Liu, Z. Yin, C. Wu, X. H. Mao, K. R. Jia, F. J. Wang, H. Guo, R. A. Flavell, Z. Zhao, K. Y. Liu, B. Xiao, Y. Guo, W. J. Zhang, W. Y. Zhou, G. Guo, and Q. M. Zou.** 2010. *Helicobacter pylori*-induced Th17 responses modulate Th1 cell responses, benefit bacterial growth, and contribute to pathology in mice. *J Immunol* **184**:5121-9.
382. **Shibayama, K., J. Wachino, Y. Arakawa, M. Saidijam, N. G. Rutherford, and P. J. Henderson.** 2007. Metabolism of glutamine and glutathione via gamma-glutamyltranspeptidase and glutamate transport in *Helicobacter pylori*: possible significance in the pathophysiology of the organism. *Mol Microbiol* **64**:396-406.
383. **Shiota, S., O. Matsunari, M. Watada, K. Hanada, and Y. Yamaoka.** 2010. Systematic review and meta-analysis: the relationship between the *Helicobacter pylori* dupA gene and clinical outcomes. *Gut Pathog* **2**:13.
384. **Siddiqui, S. T., E. Naz, F. Danish, T. Mirza, S. Aziz, and A. Ali.** 2011. Frequency of *Helicobacter pylori* in biopsy proven gastritis and its association with lymphoid follicle formation. *J Pak Med Assoc* **61**:138-41.
385. **Slomiany, B. L., J. Piotrowski, S. Sengupta, and A. Slomiany.** 1991. Inhibition of gastric mucosal laminin receptor by *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide. *Biochem Biophys Res Commun* **175**:963-70.
386. **Smith, S. M.** 2014. Role of Toll-like receptors in *Helicobacter pylori* infection and immunity. *World J Gastrointest Pathophysiol* **5**:133-46.
387. **Solnick, J. V., L. M. Hansen, N. R. Salama, J. K. Boonjakuakul, and M. Syvanen.** 2004. Modification of *Helicobacter pylori* outer membrane protein expression during experimental infection of rhesus macaques. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:2106-11.
388. **Staedel, C., and F. Darfeuille.** 2013. MicroRNAs and bacterial infection. *Cell Microbiol* **15**:1496-507.
389. **Stein, J. V., M. Lopez-Fraga, F. A. Elustondo, C. E. Carvalho-Pinto, D. Rodriguez, R. Gomez-Caro, J. De Jong, A. C. Martinez, J. P. Medema, and M. Hahne.** 2002. APRIL modulates B and T cell immunity. *J Clin Invest* **109**:1587-98.
390. **Stein, M., F. Bagnoli, R. Halenbeck, R. Rappuoli, W. J. Fantl, and A. Covacci.** 2002. c-Src/Lyn kinases activate *Helicobacter pylori* CagA through tyrosine phosphorylation of the EPIYA motifs. *Mol Microbiol* **43**:971-80.
391. **Stingl, K., and H. De Reuse.** 2005. Staying alive overdosed: how does *Helicobacter pylori* control urease activity? *Int J Med Microbiol* **295**:307-15.
392. **Strowig, T., J. Henao-Mejia, E. Elinav, and R. Flavell.** 2012. Inflammasomes in health and disease. *Nature* **481**:278-86.
393. **Stummvoll, G. H., R. J. DiPaolo, E. N. Huter, T. S. Davidson, D. Glass, J. M. Ward, and E. M. Shevach.** 2008. Th1, Th2, and Th17 effector T cell-induced autoimmune gastritis differs in pathological pattern and in susceptibility to suppression by regulatory T cells. *J Immunol* **181**:1908-16.
394. **Suarez, F., O. Lortholary, O. Hermine, and M. Lecuit.** 2006. Infection-associated lymphomas derived from marginal zone B cells: a model of antigen-driven lymphoproliferation. *Blood* **107**:3034-44.
395. **Suerbaum, S., C. Kraft, F. E. Dewhirst, and J. G. Fox.** 2002. *Helicobacter nemestrinae* ATCC 49396T is a strain of *Helicobacter pylori* (Marshall *et al.* 1985) Goodwin *et al.* 1989,

- and *Helicobacter nemestrinae* Bronsdon *et al.* 1991 is therefore a junior heterotypic synonym of *Helicobacter pylori*. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**:437-9.
396. **Suerbaum, S., and P. Michetti.** 2002. *Helicobacter pylori* infection. *N Engl J Med* **347**:1175-86.
 397. **Sugiyama, A., F. Maruta, T. Ikeno, K. Ishida, S. Kawasaki, T. Katsuyama, N. Shimizu, and M. Tatematsu.** 1998. *Helicobacter pylori* infection enhances N-methyl-N-nitrosourea-induced stomach carcinogenesis in the Mongolian gerbil. *Cancer Res* **58**:2067-9.
 398. **Supajatura, V., H. Ushio, A. Wada, K. Yahiro, K. Okumura, H. Ogawa, T. Hirayama, and C. Ra.** 2002. Cutting edge: VacA, a vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori*, directly activates mast cells for migration and production of proinflammatory cytokines. *J Immunol* **168**:2603-7.
 399. **Suzuki, A., M. Kobayashi, K. Matsuda, T. Matsumoto, M. Kawakubo, S. Kumazawa, N. Koide, S. Miyagawa, and H. Ota.** 2010. Induction of high endothelial venule-like vessels expressing GlcNAc6ST-1-mediated L-selectin ligand carbohydrate and mucosal addressin cell adhesion molecule 1 (MAdCAM-1) in a mouse model of "*Candidatus Helicobacter heilmannii*"-induced gastritis and gastric mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma. *Helicobacter* **15**:538-48.
 400. **Tammer, I., S. Brandt, R. Hartig, W. Konig, and S. Backert.** 2007. Activation of Abl by *Helicobacter pylori*: a novel kinase for CagA and crucial mediator of host cell scattering. *Gastroenterology* **132**:1309-19.
 401. **Tanaka, J., T. Suzuki, H. Mimuro, and C. Sasakawa.** 2003. Structural definition on the surface of *Helicobacter pylori* type IV secretion apparatus. *Cell Microbiol* **5**:395-404.
 402. **Telford, J. L., P. Ghiara, M. Dell'Orco, M. Comanducci, D. Burroni, M. Bugnoli, M. F. Tecce, S. Censini, A. Covacci, Z. Xiang, and et al.** 1994. Gene structure of the *Helicobacter pylori* cytotoxin and evidence of its key role in gastric disease. *J Exp Med* **179**:1653-58.
 403. **Terebiznik, M. R., D. Raju, C. L. Vazquez, K. Torbricki, R. Kulkarni, S. R. Blanke, T. Yoshimori, M. I. Colombo, and N. L. Jones.** 2009. Effect of *Helicobacter pylori*'s vacuolating cytotoxin on the autophagy pathway in gastric epithelial cells. *Autophagy* **5**:370-9.
 404. **Testerman, T. L., and J. Morris.** 2014. Beyond the stomach: an updated view of *Helicobacter pylori* pathogenesis, diagnosis, and treatment. *World J Gastroenterol* **20**:12781-808.
 405. **Thiberge, J. M., C. Boursaux-Eude, P. Lehours, M. A. Dillies, S. Creno, J. Y. Coppee, Z. Rouy, A. Lajus, L. Ma, C. Burucoa, A. Ruskone-Foumestroux, A. Courillon-Mallet, H. De Reuse, I. G. Boneca, D. Lamarque, F. Megraud, J. C. Delchier, C. Medigue, C. Bouchier, A. Labigne, and J. Raymond.** 2010. From array-based hybridization of *Helicobacter pylori* isolates to the complete genome sequence of an isolate associated with MALT lymphoma. *BMC Genomics* **11**:368.
 406. **Thiefin, G., and D. Jolly.** 2004. [Impact of *Helicobacter pylori* infection on the risk of gastro-duodenal ulcer in patients treated with nonsteroidal antiinflammatory drugs]. *Gastroenterol Clin Biol* **28 Spec No 3**:C45-57.
 407. **Thompson, L. J., S. J. Danon, J. E. Wilson, J. L. O'Rourke, N. R. Salama, S. Falkow, H. Mitchell, and A. Lee.** 2004. Chronic *Helicobacter pylori* infection with Sydney strain 1 and a newly identified mouse-adapted strain (Sydney strain 2000) in C57BL/6 and BALB/c mice. *Infect Immun* **72**:4668-79.
 408. **Tomankova, T., M. Petrek, J. Gallo, and E. Kriegova.** 2011. MicroRNAs: Emerging Regulators of Immune-Mediated Diseases. *Scand J Immunol* **75**:129-41.
 409. **Tomb, J. F., O. White, A. R. Kerlavage, R. A. Clayton, G. G. Sutton, R. D. Fleischmann, K. A. Ketchum, H. P. Klenk, S. Gill, B. A. Dougherty, K. Nelson, J. Quackenbush, L. Zhou, E. F. Kirkness, S. Peterson, B. Loftus, D. Richardson, R. Dodson, H. G. Khalak,**

- A. Glodek, K. McKenney, L. M. Fitzgerald, N. Lee, M. D. Adams, E. K. Hickey, D. E. Berg, J. D. Gocayne, T. R. Utterback, J. D. Peterson, J. M. Kelley, M. D. Cotton, J. M. Weidman, C. Fujii, C. Bowman, L. Watthey, E. Wallin, W. S. Hayes, M. Borodovsky, P. D. Karp, H. O. Smith, C. M. Fraser, and J. C. Venter. 1997. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* **388**:539-47.
410. Torres, M. A., D. J. Passaro, J. Watanabe, J. Parsonnet, P. Small, J. Miyagu, C. Rodriguez, M. Astete, and R. H. Gilman. 2003. No association between *Helicobacter pylori* and *Mycobacterium tuberculosis* infections among gastrointestinal clinic attendees in Lima, Peru. *Epidemiol Infect* **130**:87-91.
411. Torres, V. J., M. S. McClain, and T. L. Cover. 2004. Interactions between p-33 and p-55 domains of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin (VacA). *J Biol Chem* **279**:2324-31.
412. Torres, V. J., S. E. VanCompernelle, M. S. Sundrud, D. Unutmaz, and T. L. Cover. 2007. *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin inhibits activation-induced proliferation of human T and B lymphocyte subsets. *J Immunol* **179**:5433-40.
413. Touati, E., V. Michel, J. M. Thiberge, N. Wuscher, M. Huerre, and A. Labigne. 2003. Chronic *Helicobacter pylori* infections induce gastric mutations in mice. *Gastroenterology* **124**:1408-19.
414. Tsang, R. W., M. K. Gospodarowicz, M. Pintilie, W. Wells, D. C. Hodgson, A. Sun, M. Crump, and B. J. Patterson. 2003. Localized mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma treated with radiation therapy has excellent clinical outcome. *J Clin Oncol* **21**:4157-64.
415. Tsuda, M., M. Karita, T. Mizote, M. G. Morshed, K. Okita, and T. Nakazawa. 1994. Essential role of *Helicobacter pylori* urease in gastric colonization: definite proof using a urease-negative mutant constructed by gene replacement. *Eur J Gastroenterol Hepatol* **6 Suppl 1**:S49-52.
416. Tsutsumi, R., H. Higashi, M. Higuchi, M. Okada, and M. Hatakeyama. 2003. Attenuation of *Helicobacter pylori* CagA x SHP-2 signaling by interaction between CagA and C-terminal Src kinase. *J Biol Chem* **278**:3664-70.
417. Tsutsumi, R., A. Takahashi, T. Azuma, H. Higashi, and M. Hatakeyama. 2006. Focal adhesion kinase is a substrate and downstream effector of SHP-2 complexed with *Helicobacter pylori* CagA. *Mol Cell Biol* **26**:261-76.
418. Tu, S., G. Bhagat, G. Cui, S. Takaishi, E. A. Kurt-Jones, B. Rickman, K. S. Betz, M. Penz-Oesterreicher, O. Bjorkdahl, J. G. Fox, and T. C. Wang. 2008. Overexpression of interleukin-1beta induces gastric inflammation and cancer and mobilizes myeloid-derived suppressor cells in mice. *Cancer Cell* **14**:408-19.
419. Uchida, K., K. Okazaki, A. Debrecceni, T. Nishi, H. Iwano, M. Inai, S. Uose, H. Nakase, M. Ohana, C. Oshima, Y. Matsushima, C. Kawanami, H. Hiai, T. Masuda, and T. Chiba. 2001. Analysis of cytokines in the early development of gastric secondary lymphoid follicles in *Helicobacter pylori*-infected BALB/c mice with neonatal thymectomy. *Infect Immun* **69**:6749-54.
420. Ullrich, A., W. Fischbach, and M. Blettner. 2002. Incidence of gastric B-cell lymphomas: a population-based study in Germany. *Ann Oncol* **13**:1120-7.
421. Umehara, S., H. Higashi, N. Ohnishi, M. Asaka, and M. Hatakeyama. 2003. Effects of *Helicobacter pylori* CagA protein on the growth and survival of B lymphocytes, the origin of MALT lymphoma. *Oncogene* **22**:8337-42.
422. Unemo, M., M. Aspholm-Hurtig, D. Ilver, J. Bergstrom, T. Boren, D. Danielsson, and S. Teneberg. 2005. The sialic acid binding SabA adhesin of *Helicobacter pylori* is essential for nonopsonic activation of human neutrophils. *J Biol Chem* **280**:15390-7.
423. Valkonen, K. H., T. Wadstrom, and A. P. Moran. 1994. Interaction of lipopolysaccharides of *Helicobacter pylori* with basement membrane protein laminin. *Infect Immun* **62**:3640-8.

424. **Van de Bovenkamp, J. H., J. Mahdavi, A. M. Korteland-Van Male, H. A. Buller, A. W. Einerhand, T. Boren, and J. Dekker.** 2003. The MUC5AC glycoprotein is the primary receptor for *Helicobacter pylori* in the human stomach. *Helicobacter* **8**:521-32.
425. **van Doorn, L. J., C. Figueiredo, R. Sanna, A. Plaisier, P. Schneeberger, W. de Boer, and W. Quint.** 1998. Clinical relevance of the *cagA*, *vacA*, and *iceA* status of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* **115**:58-66.
426. **Vandenbroucke-Grauls, C. M., and B. J. Appelmelk.** 1998. *Helicobacter pylori* LPS: molecular mimicry with the host and role in autoimmunity. *Ital J Gastroenterol Hepatol* **30 Suppl 3**:S259-60.
427. **Varfolomeev, E., F. Kischkel, F. Martin, D. Seshasayee, H. Wang, D. Lawrence, C. Olsson, L. Tom, S. Erickson, D. French, P. Schow, I. S. Grewal, and A. Ashkenazi.** 2004. APRIL-deficient mice have normal immune system development. *Mol Cell Biol* **24**:997-1006.
428. **Varon, C., P. Dubus, F. Mazurier, C. Asencio, L. Chambonnier, J. Ferrand, A. Giese, N. Senant-Dugot, M. Carlotti, and F. Megraud.** 2012. *Helicobacter pylori* infection recruits bone marrow-derived cells that participate in gastric preneoplasia in mice. *Gastroenterology* **142**:281-91.
429. **Varon, C., J. F. Mosnier, P. Lehours, T. Matysiak-Budnik, and F. Megraud.** 2009. Gastric carcinogenesis and *Helicobacter pylori* infection. *Methods Mol Biol* **511**:237-65.
430. **Viala, J., C. Chaput, I. G. Boneca, A. Cardona, S. E. Girardin, A. P. Moran, R. Athman, S. Memet, M. R. Huerre, A. J. Coyle, P. S. DiStefano, P. J. Sansonetti, A. Labigne, J. Bertin, D. J. Philpott, and R. L. Ferrero.** 2004. Nod1 responds to peptidoglycan delivered by the *Helicobacter pylori* *cag* pathogenicity island. *Nat Immunol* **5**:1166-74.
431. **Vollaard, A. M., H. W. Verspaget, S. Ali, L. G. Visser, R. A. Veenendaal, H. A. Van Asten, S. Widjaja, C. Surjadi, and J. T. Van Dissel.** 2006. *Helicobacter pylori* infection and typhoid fever in Jakarta, Indonesia. *Epidemiol Infect* **134**:163-70.
432. **Voss, B. J., J. A. Gaddy, W. H. McDonald, and T. L. Cover.** 2014. Analysis of surface-exposed outer membrane proteins in *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol* **196**:2455-71.
433. **Wachino, J., K. Shibayama, S. Suzuki, K. Yamane, S. Mori, and Y. Arakawa.** 2010. Profile of Expression of *Helicobacter pylori* gamma-glutamyltranspeptidase. *Helicobacter* **15**:184-92.
434. **Wang, C. Y., M. W. Mayo, R. G. Korneluk, D. V. Goeddel, and A. S. Baldwin, Jr.** 1998. NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science* **281**:1680-3.
435. **Wang, F., P. Xia, F. Wu, D. Wang, W. Wang, T. Ward, Y. Liu, F. Aikhionbare, Z. Guo, M. Powell, B. Liu, F. Bi, A. Shaw, Z. Zhu, A. Elmoselhi, D. Fan, T. L. Cover, X. Ding, and X. Yao.** 2008. *Helicobacter pylori* *VacA* disrupts apical membrane-cytoskeletal interactions in gastric parietal cells. *J Biol Chem* **283**:26714-25.
436. **Wang, J., J. Wu, Y. Cheng, Y. Jiang, and G. Li.** 2016. Over-expression of microRNA-223 inhibited the proinflammatory responses in *Helicobacter pylori*-infection macrophages by down-regulating IRAK-1. *Am J Transl Res* **8**:615-22.
437. **Wang, T. C., J. R. Goldenring, C. Dangler, S. Ito, A. Mueller, W. K. Jeon, T. J. Koh, and J. G. Fox.** 1998. Mice lacking secretory phospholipase A2 show altered apoptosis and differentiation with *Helicobacter felis* infection. *Gastroenterology* **114**:675-89.
438. **Wang, X., R. Willen, C. Andersson, and T. Wadstrom.** 2000. Development of high-grade lymphoma in *Helicobacter pylori*-infected C57BL/6 mice. *Apmis* **108**:503-8.
439. **Wang, X., R. Willen, M. Svensson, A. Ljungh, and T. Wadstrom.** 2003. Two-year follow-up of *Helicobacter pylori* infection in C57BL/6 and Balb/cA mice. *Apmis* **111**:514-22.
440. **Watanabe, T., M. Tada, H. Nagai, S. Sasaki, and M. Nakao.** 1998. *Helicobacter pylori* infection induces gastric cancer in mongolian gerbils. *Gastroenterology* **115**:642-8.

441. **Weber, D. M., M. A. Dimopoulos, D. P. Anandu, W. C. Pugh, and G. Steinbach.** 1994. Regression of gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue with antibiotic therapy for *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* **107**:1835-8.
442. **Wei, J., J. M. Noto, E. Zaika, J. Romero-Gallo, M. B. Piazuelo, B. Schneider, W. El-Rifai, P. Correa, R. M. Peek, and A. I. Zaika.** 2015. Bacterial CagA protein induces degradation of p53 protein in a p14ARF-dependent manner. *Gut* **64**:1040-8.
443. **Wilke, C. M., K. Bishop, D. Fox, and W. Zou.** 2011. Deciphering the role of Th17 cells in human disease. *Trends Immunol* **32**:603-11.
444. **Willis, T. G., D. M. Jadayel, M. Q. Du, H. Peng, A. R. Perry, M. Abdul-Rauf, H. Price, L. Karran, O. Majekodunmi, I. Wlodarska, L. Pan, T. Crook, R. Hamoudi, P. G. Isaacson, and M. J. Dyer.** 1999. Bcl10 is involved in t(1;14)(p22;q32) of MALT B cell lymphoma and mutated in multiple tumor types. *Cell* **96**:35-45.
445. **Winter, S., C. Loddenkemper, A. Aebischer, K. Rabel, K. Hoffmann, T. F. Meyer, M. Lipp, and U. E. Hopken.** 2010. The chemokine receptor CXCR5 is pivotal for ectopic mucosa-associated lymphoid tissue neogenesis in chronic *Helicobacter pylori*-induced inflammation. *J Mol Med (Berl)* **88**:1169-80.
446. **Wotherspoon, A. C., C. Doglioni, T. C. Diss, L. Pan, A. Moschini, M. de Boni, and P. G. Isaacson.** 1993. Regression of primary low-grade B-cell gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue type after eradication of *Helicobacter pylori*. *Lancet* **342**:575-7.
447. **Wotherspoon, A. C., T. M. Finn, and P. G. Isaacson.** 1995. Trisomy 3 in low-grade B-cell lymphomas of mucosa-associated lymphoid tissue. *Blood* **85**:2000-4.
448. **Wotherspoon, A. C., C. Ortiz-Hidalgo, M. R. Falzon, and P. G. Isaacson.** 1991. *Helicobacter pylori*-associated gastritis and primary B-cell gastric lymphoma. *Lancet* **338**:1175-6.
449. **Wotherspoon, A. C., L. X. Pan, T. C. Diss, and P. G. Isaacson.** 1992. Cytogenetic study of B-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue. *Cancer Genet Cytogenet* **58**:35-8.
450. **Wundisch, T., C. Thiede, A. Morgner, A. Dempfle, A. Gunther, H. Liu, H. Ye, M. Q. Du, T. D. Kim, E. Bayerdorffer, M. Stolte, and A. Neubauer.** 2005. Long-term follow-up of gastric MALT lymphoma after *Helicobacter pylori* eradication. *J Clin Oncol* **23**:8018-24.
451. **Xia, H., S. Yamada, M. Aoyama, F. Sato, A. Masaki, Y. Ge, M. Ri, T. Ishida, R. Ueda, A. Utsunomiya, K. Asai, and H. Inagaki.** 2014. Prognostic impact of microRNA-145 down-regulation in adult T-cell leukemia/lymphoma. *Hum Pathol* **45**:1192-8.
452. **Yahalom, J.** 2001. MALT lymphomas: a radiation oncology viewpoint. *Ann Hematol* **80** Suppl 3:B100-5.
453. **Yamamoto, K., S. Nishiumi, L. Yang, E. Klimatcheva, T. Pandina, S. Takahashi, H. Matsui, M. Nakamura, M. Zauderer, M. Yoshida, and T. Azuma.** 2014. Anti-CXCL13 antibody can inhibit the formation of gastric lymphoid follicles induced by *Helicobacter* infection. *Mucosal Immunol* **7**:1244-54.
454. **Yamaoka, Y., D. H. Kwon, and D. Y. Graham.** 2000. A M(r) 34,000 proinflammatory outer membrane protein (oipA) of *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:7533-8.
455. **Yamaoka, Y., O. Ojo, S. Fujimoto, S. Odenbreit, R. Haas, O. Gutierrez, H. M. El-Zimaity, R. Reddy, A. Arnqvist, and D. Y. Graham.** 2006. *Helicobacter pylori* outer membrane proteins and gastroduodenal disease. *Gut* **55**:775-81.
456. **Yamasaki, E., A. Wada, A. Kumatori, I. Nakagawa, J. Funao, M. Nakayama, J. Hisatsune, M. Kimura, J. Moss, and T. Hirayama.** 2006. *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin induces activation of the proapoptotic proteins Bax and Bak, leading to cytochrome c release and cell death, independent of vacuolation. *J Biol Chem* **281**:11250-9.
457. **Yang, H. B., B. S. Sheu, J. T. Wang, S. T. Lin, and J. J. Wu.** 2004. Serological responses of FldA and small-molecular-weight proteins of *Helicobacter pylori*: correlation with the presence of the gastric MALT tissue. *Helicobacter* **9**:81-6.

458. Yao, Y., G. Li, J. Wu, X. Zhang, and J. Wang. 2015. Inflammatory response of macrophages cultured with *Helicobacter pylori* strains was regulated by miR-155. *Int J Clin Exp Pathol* **8**:4545-54.
459. Ye, H., H. Liu, A. Attygalle, A. C. Wotherspoon, A. G. Nicholson, F. Charlotte, V. Leblond, P. Speight, J. Goodlad, A. Lavergne-Slove, J. I. Martin-Subero, R. Siebert, A. Dogan, P. G. Isaacson, and M. Q. Du. 2003. Variable frequencies of t(11;18)(q21;q21) in MALT lymphomas of different sites: significant association with CagA strains of *H pylori* in gastric MALT lymphoma. *Blood* **102**:1012-8.
460. Yoon, S. S., D. G. Coit, C. S. Portlock, and M. S. Karpeh. 2004. The diminishing role of surgery in the treatment of gastric lymphoma. *Ann Surg* **240**:28-37.
461. Yoshikawa, T., and Y. Naito. 2000. The role of neutrophils and inflammation in gastric mucosal injury. *Free Radic Res* **33**:785-94.
462. Yu, G., T. Boone, J. Delaney, N. Hawkins, M. Kelley, M. Ramakrishnan, S. McCabe, W. R. Qiu, M. Kornuc, X. Z. Xia, J. Guo, M. Stolina, W. J. Boyle, I. Sarosi, H. Hsu, G. Senaldi, and L. E. Theill. 2000. APRIL and TALL-I and receptors BCMA and TACI: system for regulating humoral immunity. *Nat Immunol* **1**:252-6.
463. Yu, J., R. M. Russell, R. N. Salomon, J. C. Murphy, L. S. Palley, and J. G. Fox. 1995. Effect of *Helicobacter mustelae* infection on ferret gastric epithelial cell proliferation. *Carcinogenesis* **16**:1927-31.
464. Yun, C. H., A. Lundgren, J. Azem, A. Sjoling, J. Holmgren, A. M. Svennerholm, and B. S. Lundin. 2005. Natural killer cells and *Helicobacter pylori* infection: bacterial antigens and interleukin-12 act synergistically to induce gamma interferon production. *Infect Immun* **73**:1482-90.
465. Zanesi, N., Y. Pekarsky, F. Trapasso, G. Calin, and C. M. Croce. 2010. MicroRNAs in mouse models of lymphoid malignancies. *J Nucleic Acids Investig* **1**:36-40.
466. Zayed, R. A., H. F. Sheba, M. A. Abo Elazaem, Z. A. Elsaadany, L. O. Elmessery, J. A. Mahmoud, D. R. Abdel Rahman, and F. R. Abdou. 2013. B-cell activating factor promoter polymorphisms in egyptian patients with systemic lupus erythematosus. *Ann Clin Lab Sci* **43**:289-94.
467. Zeaiter, Z., D. Cohen, A. Musch, F. Bagnoli, A. Covacci, and M. Stein. 2008. Analysis of detergent-resistant membranes of *Helicobacter pylori* infected gastric adenocarcinoma cells reveals a role for MARK2/Par1b in CagA-mediated disruption of cellular polarity. *Cell Microbiol* **10**:781-94.
468. Zhang, G., R. Ducatelle, F. Pasmans, K. D'Herde, L. Huang, A. Smet, F. Haesebrouck, and B. Flahou. 2013. Effects of *Helicobacter suis* gamma-glutamyl transpeptidase on lymphocytes: modulation by glutamine and glutathione supplementation and outer membrane vesicles as a putative delivery route of the enzyme. *PLoS One* **8**:e77966.
469. Zhang, Q., R. Siebert, M. Yan, B. Hinzmann, X. Cui, L. Xue, K. M. Rakestraw, C. W. Naeve, G. Beckmann, D. D. Weisenburger, W. G. Sanger, H. Nowotny, M. Vesely, E. Callet-Bauchu, G. Salles, V. M. Dixit, A. Rosenthal, B. Schlegelberger, and S. W. Morris. 1999. Inactivating mutations and overexpression of BCL10, a caspase recruitment domain-containing gene, in MALT lymphoma with t(1;14)(p22;q32). *Nat Genet* **22**:63-8.
470. Zhang, S., and S. F. Moss. 2012. Rodent models of *Helicobacter* infection, inflammation, and disease. *Methods Mol Biol* **921**:89-98.
471. Zhang, Z., Z. Li, C. Gao, P. Chen, J. Chen, W. Liu, S. Xiao, and H. Lu. 2008. miR-21 plays a pivotal role in gastric cancer pathogenesis and progression. *Lab Invest* **88**:1358-66.
472. Zhao, Y., and D. Srivastava. 2007. A developmental view of microRNA function. *Trends Biochem Sci* **32**:189-97.
473. Zhao, Y., K. Yokota, K. Ayada, Y. Yamamoto, T. Okada, L. Shen, and K. Oguma. 2007. *Helicobacter pylori* heat-shock protein 60 induces interleukin-8 via a Toll-like receptor

- (TLR)2 and mitogen-activated protein (MAP) kinase pathway in human monocytes. *J Med Microbiol* **56**:154-64.
474. **Zhu, Y., C. Wang, J. Huang, Z. Ge, Q. Dong, X. Zhong, Y. Su, and S. Zheng.** 2007. The *Helicobacter pylori* virulence factor CagA promotes Erk1/2-mediated Bad phosphorylation in lymphocytes: a mechanism of CagA-inhibited lymphocyte apoptosis. *Cell Microbiol* **9**:952-61.
475. **Zhuang, Y., P. Cheng, X. F. Liu, L. S. Peng, B. S. Li, T. T. Wang, N. Chen, W. H. Li, Y. Shi, W. Chen, K. C. Pang, M. Zeng, X. H. Mao, S. M. Yang, H. Guo, G. Guo, T. Liu, Q. F. Zuo, H. J. Yang, L. Y. Yang, F. Y. Mao, Y. P. Lv, and Q. M. Zou.** 2014. A pro-inflammatory role for Th22 cells in *Helicobacter pylori*-associated gastritis. *Gut* **64**:1368-78.
476. **Zong, W. X., L. C. Edelstein, C. Chen, J. Bash, and C. Gelinas.** 1999. The prosurvival Bcl-2 homolog Bfl-1/A1 is a direct transcriptional target of NF-kappaB that blocks TNFalpha-induced apoptosis. *Genes Dev* **13**:382-7.
477. **Zucca, E., A. Conconi, D. Laszlo, A. Lopez-Guillermo, R. Bouabdallah, B. Coiffier, C. Sebban, F. Jardin, U. Vitolo, F. Morschhauser, S. A. Pileri, C. Copie-Bergman, E. Campo, A. Jack, I. Floriani, P. Johnson, M. Martelli, F. Cavalli, G. Martinelli, and C. Thieblemont.** 2013. Addition of rituximab to chlorambucil produces superior event-free survival in the treatment of patients with extranodal marginal-zone B-cell lymphoma: 5-year analysis of the IELSG-19 Randomized Study. *J Clin Oncol* **31**:565-72.
478. **Zucca, E., C. Copie-Bergman, U. Ricardi, C. Thieblemont, M. Raderer, and M. Ladetto.** 2013. Gastric marginal zone lymphoma of MALT type: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* **24 Suppl 6**:vi144-8.
479. **Zullo, A., C. Hassan, A. Andriani, F. Cristofari, V. Cardinale, G. P. Spinelli, S. Tomao, and S. Morini.** 2010. Primary low-grade and high-grade gastric MALT-lymphoma presentation. *J Clin Gastroenterol* **44**:340-4.
480. **Zullo, A., C. Hassan, F. Cristofari, F. Perri, and S. Morini.** 2010. Gastric low-grade mucosal-associated lymphoid tissue-lymphoma: *Helicobacter pylori* and beyond. *World J Gastrointest Oncol* **2**:181-6.

Annexe

1- Etat civil

Nom : **Pauline Floch**

2- Situation professionnelle actuelle

Assistante Hospitalo-Universitaire (AHU) depuis mai 2014

Adresse Hospitalière CHU de Bordeaux – Hôpital Pellegrin
Laboratoire de Bactériologie (Pr F. Mégraud)
Place Amélie Raba-Léon
33 076 Bordeaux cedex
☎ 05 57 62 14 55
Email : pauline.floch@chu-bordeaux.fr

Adresse Universitaire : INSERM U1053-UMR BaRITOn (Pr J.P. Merlio)
Equipe 2 (Pr P. Lehours)
Université de Bordeaux, site de Carreire
Bâtiment 2B – RDC
146, rue Léo Saignat
33 076 Bordeaux cedex
☎ : 05 57 57 12 87
Email : pauline.floch@u-bordeaux.fr

3- Diplômes

- depuis octobre 2013 **Inscription en thèse de doctorat, spécialité Microbiologie-Immunologie**

Ecole doctorale des sciences de la vie et de la santé, Université de Bordeaux
INSERM U853, (Directeur : Pr F. Mégraud), devenue au 1^{er} janvier 2016 INSERM U1053-Equipe 2
(Responsable d'équipe : Pr P. Lehours)

« Apport des modèles murins dans la compréhension de la lymphomagénèse gastrique induite par l'infection à *Helicobacter pylori* » sous la direction du Pr P. Lehours

Soutenance prévue le 15 novembre 2016 à Bordeaux

- 2014 Diplôme d'Etudes Spécialisées Complémentaire (D.E.S.C) Biologie des agents infectieux

Université Paul Sabatier, Toulouse
Soutenu le 30 septembre 2014 à Bordeaux

- 2012 Diplôme d'Etat de Doctorat en Pharmacie

Université Paul Sabatier, Toulouse
« Etude du rôle de la GGT de *Campylobacter jejuni* sur l'apoptose des cellules épithéliales et la prolifération lymphocytaire », mention très-bien
Soutenu le 26 octobre 2012 à Bordeaux

- 2012 Diplôme d'Etudes Spécialisées (D.E.S) de Biologie Médicale

Université Paul Sabatier, Toulouse
26 octobre 2012 à Bordeaux

- 2012 Master 2 Recherche Microbiologie-Immunologie

Université de Bordeaux, INSERM U853 (Directeur : Pr F. Mégraud)
« Etude du rôle de la GGT de *Campylobacter jejuni* sur l'apoptose des cellules épithéliales et la prolifération lymphocytaire » (sous la direction du Pr P. Lehours), mention Bien
Juin 2012 à Bordeaux

- 2006 Master 1 Santé parcours génétique

UE1 : Génétique moléculaire, UE2 : Génétique médicale
Stage de recherche INSERM U781 – Hôpital Necker- « Rôle de l'endothéline 1 dans la sclérodémie systémique »
Université Paris Descartes

-2003 Baccalauréat série S

Académie de Versailles, mention Bien.

4- Fonctions

Mai 2014 - maintenant Assistante Hospitalo-Universitaire

Laboratoire de Bactériologie, CHU de Bordeaux (Chef de service : Pr F. Mégraud)
INSERM U853 (Directeur : Pr F. Mégraud), devenue au 1^{er} janvier 2016 INSERM U1053
(Directeur : Pr J.P. Merlio) - Equipe 2 (Responsable : Pr P. Lehours) de l'Université de Bordeaux

Mai-2013-Avril-2014 Assistante spécialiste régionale

Laboratoire de Bactériologie, Hôpital Pellegrin du CHU de Bordeaux (Chef de service : Pr F. Mégraud) et laboratoire du CH de Dax (Chef de service : Dr F. Lefèvre)

Nov-2008-Oct-2013 Interne des Hôpitaux en Biologie Médicale

CHU de Bordeaux, Limoges et Toulouse, CH de Dax

5- Travaux

a) Publications

Mégraud F, Floch P, Labenz J, Lehours P. Diagnostic of *Helicobacter pylori* infection. **Helicobacter**. 2016 Sep 21. (IF : 4,106)

Laur AM*, Floch P*, Chambonnier L, Benejat L, Korolik V, Giese A, Dubus P, Mégraud F, Bandeira A, Lehours P. Regulatory T cells may participate in *Helicobacter pylori* persistence in gastric MALT lymphoma: lessons from an animal model. **Oncotarget**. 2016 Jan 19. (IF : 6,359) (*co-premiers auteurs)

Floch P*, Laur AM*, Korolik V, Chriment D, Cappellen D, Idrissi Y, Dubus P, Mégraud F, Lehours P. Characterisation of inflammatory processes in *Helicobacter pylori*-induced gastric lymphomagenesis in a mouse model. **Oncotarget**. 2015 Oct 1. (IF : 6,359) (*co-premiers auteurs)

Sifré E, Ben Amor S, Ducournau A, Floch P, Chardon H, Mégraud F, Lehours P. EUCAST recommendations for antimicrobial susceptibility testing applied to the three main *Campylobacter* species isolated in humans. **J Microbial Methods**. 2015. 2015 Oct 28. pii: S0167-7012(15)30096-8. doi: 10.1016/j.mimet.2015.10.018. [Epub ahead of print]. (IF : 2,026)

Santos AM, Lopes T, Oleastro M, Gato IV, Floch P, Benejat L, Chaves P, Pereira T, Seixas E, Machado J, Guerreiro AS. Curcumin inhibits gastric inflammation induced by *Helicobacter pylori* infection in a mouse model. **Nutrients**. 2015 Jan 6;7(1):306-20. doi: 10.3390/nu7010306. (IF : 3,27)

Floch P, Pey V, Castroviejo M, Dupuy JW, Bonneu M, Hocès de la Guardia A, Pitard V, Mégraud F, Lehours P. Role of *Campylobacter jejuni* gamma-glutamyl transpeptidase on epithelial cell apoptosis and lymphocyte proliferation. **Gut Pathog**. 2014 Jun 12;6:20. doi: 10.1186/1757-4749-6-20. (IF : 2,281)

Floch P, Goret J, Bessède E, Lehours P, Mégraud F. Evaluation of the positive predictive value of a rapid Immunochromatographic test to detect *Campylobacter* in stools. **Gut Pathog**. 2012 Dec 4;4(1):17 doi: 10.1186/1757-4749-4-17 (IF : 2,281)

b) Communications Orales

- Congrès internationaux

Floch P, Izotte J, Sifré E, Costet P, Rousseau B, Giese A, Mégraud F, Dubus P, Hahne M, **Lehours P**. A new animal model of gastric lymphomagenesis? APRIL transgenic mice infected by *Helicobacter* species. XXIXth International Workshop on *Helicobacter* and Microbiota in Inflammation and Cancer. Magdeburg, Germany, September 15 -17 2016

Floch P, Izotte J, Sifré E, Costet P, Rousseau B, Giese A, Mégraud F, Dubus P, Hahne M, **Lehours P**. A new animal model of gastric lymphomagenesis? APRIL transgenic mice infected by *Helicobacter* species. 12th International Workshop on Pathogenesis and Host Response in *Helicobacter* Infections. Helsingør, Danemark, June 29 – July 2 2016

Floch P, Capdevielle C, Staedel C, Mégraud F, Lehours P. Deregulation of microRNAs in a mouse model of *Helicobacter pylori*-associated gastric lymphomagenesis. 26th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID). Amsterdam, Pays-Bas, 9-12 April 2016

Laur A, Chrisment D, Korolik V, Floch P, Chambonnier L, Benejat L, Gauthereau X, Giese A, Capellen D, Idrissi Y, Dubus P, Bandeira A, Mégraud F, **Lehours P**. « Inflammatory response in neonatal thymectomized BALB/c mice infected by *Helicobacter pylori* strains. » 27th International workshop on *Helicobacter* and related bacteria in chronic digestive inflammation. European Helicobacter Study Group, Rome, Italie, 11-13 Septembre 2014

Le nom de la personne ayant présenté la communication est indiqué en gras.

- Congrès nationaux

Floch P, Izotte J, Sifré E, Costet P, Rousseau B, Giese A, Mégraud F, Dubus P, Hahne M, Lehours P. APRIL : une cytokine essentielle à la lymphomagenèse gastrique ? 12^{ème} Congrès de la Société Française de Microbiologie (SFM), Paris, 22-23 mars 2016

Floch P, Izotte J, Sifré E, Costet P, Rousseau B, Giese A, Mégraud F, Dubus P, Hahne M, Lehours P. Nouveau modèle de lymphomagenèse gastrique: la souris transgénique APRIL infectée par des bactéries du genre *Helicobacter*. 24^{ème} réunion annuelle du Groupe d'Etude Français des *Helicobacter* (GEFH), Bordeaux, 29 janvier 2016

Floch P, Capdevielle C, Staedel C, Mégraud F, Lehours P. Dérégulation des microARNs dans un modèle *in vivo* de lymphomagenèse gastrique induite par *Helicobacter pylori*. 24^{ème} réunion annuelle du Groupe d'Etude Français des *Helicobacter* (GEFH), Bordeaux, 29 janvier 2016

Floch P, « Aspects microbiologiques des pneumopathies nosocomiales. », 5^{ème} Journée d'Infectiologie en Aquitaine - 6^{ème} Journée Régionale des Référents en infectiologie. Bordeaux, septembre 2015

c) Communications par voie d'affichage

- Congrès internationaux

Floch P, Capdevielle C, Staedel C, Mégraud F, Lehours P. Deregulation of microRNAs in a mouse model of *Helicobacter pylori*-associated gastric lymphomagenesis. 26th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), Amsterdam, Pays-Bas, 9-12 Avril 2016

Camou F, Dijos M, Greib C, Wirth G, Poustis P, Peuchant O, Floch P, Barandon L, Issa N. Characteristics of 132 healthcare-associated infective endocarditis patients. 26th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), Amsterdam, Pays-Bas, 9-12 Avril 2016

Goret J, Blanchi J, Floch P, Peuchant O, Chrisment D, Sanchez R, Biessy H, Lemarie R, Leyssene D, Loutfi B, Mimouni S, Flao T, Bébéar C and Mégraud F. Multicentric study on the impact of the introduction of a nucleic acid amplification test in *Clostridium difficile* diagnosis on stool rejection policies and positivity rates. 25th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID). Copenhagen, Danemark, Avril 2015

Laur A, Chrisment D, Korolik V, Floch P, Chambonnier L, Benejat L, Gauthereau X, Giese A, Capellen D, Idrissi Y, Dubus P, Bandeira A, Mégraud F, Lehours P. Inflammatory response in neonatal thymectomized BALB/c mice infected by *Helicobacter pylori* strains. 25th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID). Copenhagen, Danemark, Avril 2015

Floch P, Pey V, Mégraud F, Lehours P. Study of the role of gamma-glutamyl transpeptidase of *Campylobacter jejuni* on apoptosis of epithelial cells and lymphocyte proliferation. 17th International Workshop on *Campylobacter*, *Helicobacter* and Related Organisms, CHRO, Aberdeen, Ecosse, Grande-Bretagne, Septembre 2013

- Congrès nationaux

Floch P, Izotte J, Costet P, Rousseau B, Sifré E, Mégraud F, Dubus P, Lehours P. Nouveau modèle de lymphomagénèse gastrique : la souris transgénique APRIL infectée par des bactéries du genre *Helicobacter*. Journée scientifique de la SFR TransBioMed, Bordeaux, Décembre 2015

Floch P, Capdevielle C, Staedel C, Mégraud F, Lehours P. Rôle des microARNs dans la lymphomagénèse gastrique induite par *Helicobacter pylori*. 11^{èmes} journées Cancéropôle Grand Sud-Ouest, Bordeaux, Novembre 2015

Floch P, Hocès de la Guardia A, Mégraud F, Lehours P. Etude du rôle de la gamma-glutamyltranspeptidase de *Campylobacter jejuni* sur l'apoptose des cellules épithéliales et la prolifération lymphocytaire. 32^{ème} Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse (RICAI). Paris, Novembre 2012. (Abstract 442/83A)

Floch P, Goret J, Bessède E, Lehours P, Mégraud F. Evaluation de la valeur prédictive positive d'un test rapide de détection immunochromatographique des Campylobacters dans les selles. 32^{ème} Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse (RICAI). Paris, Novembre 2012. (Abstract 541/91A)