



HAL
open science

Etude des effets de la metformine et de l'implication de la voie de signalisation mTOR au cours de l'infection par *Helicobacter pylori* et de la carcinogenèse gastrique

Sarah Courtois

► To cite this version:

Sarah Courtois. Etude des effets de la metformine et de l'implication de la voie de signalisation mTOR au cours de l'infection par *Helicobacter pylori* et de la carcinogenèse gastrique. Médecine humaine et pathologie. Université de Bordeaux, 2017. Français. NNT : 2017BORD0830 . tel-02426174

HAL Id: tel-02426174

<https://theses.hal.science/tel-02426174>

Submitted on 2 Jan 2020

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 Sciences de la Vie et de la Santé
Spécialité Biologie Cellulaire

Par Sarah COURTOIS

**Etude des effets de la metformine et de l'implication de la
voie de signalisation mTOR au cours de l'infection par
Helicobacter pylori et de la carcinogenèse gastrique**

Sous la direction de Emilie BESSEDE

Soutenue le 12 décembre 2017

Membres du jury :

Mme. DABERNAT Sandrine
Mme. PANNEQUIN Julie
Mme. TOUATI Eliette
M. LINK Alexander
M. LEHOURS Philippe

MCU-PH, Université de Bordeaux
DR CNRS, IGF Montpellier
DR, Institut Pasteur
PU, Université de Magdeburg
PU-PH, Université de Bordeaux

Présidente
Rapporteur
Rapporteur
Invité
Invité

Remerciements

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

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

A ma directrice de thèse Madame le Docteur Emilie Bessède sans qui rien n'aurait été possible. Merci pour m'avoir accordé votre confiance et m'avoir fait l'honneur de me choisir il y a 3 ans pour cette aventure enrichissante, qui m'aura fait grandir tant sur le plan professionnel que personnel. Merci pour votre soutien et vos conseils qui m'ont permis de venir à bout de ce travail.

A Monsieur le Professeur Francis Mégraud, notre Shérif, pour son accueil chaleureux au sein de l'unité U853, ainsi que pour les aventures scientifiques et culturelles auxquelles j'ai pu participer tout au long de ces 3 années.

A Monsieur le Professeur Philippe Lehours, notre Chef Sioux, pour ses encouragements, sa disponibilité dans la correction de mes articles et sa rigueur scientifique.

A Monsieur le Docteur Raúl V. Durán pour sa précieuse collaboration, sa disponibilité, son accueil au sein de son équipe et ses échanges enrichissants. Merci à tous les membres de son équipe : à Monsieur le Docteur Victor H. Villar pour sa patience et sa gentillesse, à Ly Nguyen et Clément Bobineau, pour leur amitié et leur aide.

A Madame le Docteur Christine Varon pour sa disponibilité et ses conseils.

A Monsieur Julien Izotte et Monsieur le Docteur Benoit Rousseau pour leur collaboration et leur aide dans l'expérimentation animale.

A Monsieur le Professeur Pierre Dubus pour m'avoir permis de faire mes premiers pas dans le monde de l'enseignement.

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

A mes collègues et ami(e)s de l'unité, les Helicogirls !, pour leur bonne humeur et la création d'une ambiance de travail très agréable ! Merci en particulier à Lucie Bénéjat et Elodie Sifré pour leur participation dans ce travail et leur patience ! Merci à mes amies et co-thésardes Silvia, Christelle, Pauline et Amandine pour nos grands moments, nos passions communes et la folie qui nous habite ! Merci à Julie qui est arrivée en même temps que moi au laboratoire, Astrid (notre princesse), Alice et dernièrement Alban (le retour) !

A toutes les personnes qui m'ont encouragée et qui ont cru en moi tout au long de ces années d'études.

A ma famille et mes amis pour leur soutien tout au long de ces (longues, longues, longues) années d'études. A mes parents, pour leurs encouragements perpétuels et pour y avoir cru, parfois plus que moi-même. A ma sœur, pour sa présence et sa capacité à faire diminuer la pression, ainsi que pour ses efforts culinaires à la fin de cette thèse !

Titre : Etude des effets de la metformine et de l'implication de la voie de signalisation mTOR au cours de l'infection par *Helicobacter pylori* et de la carcinogénèse gastrique

Résumé :

L'infection chronique par *Helicobacter pylori* touche plus de la moitié de la population mondiale et est la principale cause connue de l'adénocarcinome gastrique. La metformine, un antidiabétique oral, est de plus en plus étudiée pour ses propriétés antitumorales dans de nombreux types de cancers. Cependant, ses effets potentiels ont très peu été étudiés dans le cancer gastrique. Des expériences réalisées sur des lignées cellulaires cancéreuses gastriques et des tumeurs de patients amplifiées par xéno greffe chez la souris (PDX), ont permis de confirmer les propriétés antitumorales de la metformine. La metformine, en traitement préventif et curatif, diminue la capacité de formation des tumorsphères, l'expression des marqueurs de CSC gastriques, et la capacité d'auto-renouvellement propre aux CSC. Dans un second temps, nous avons montré que la metformine est capable d'inhiber la croissance bactérienne de *H. pylori in vitro* et *in vivo*. Enfin, les effets de l'infection par *H. pylori* ont été étudiés sur la voie de signalisation mTOR par la réalisation d'une analyse transcriptomique et de western-blots sur des lignées cellulaires gastriques. Ceci a permis de démontrer que *H. pylori* inhibe le complexe mTORC1.

Pour conclure, ce travail de thèse a permis i) de démontrer la capacité de la metformine à cibler les CSC gastriques, ii) de découvrir une nouvelle propriété antibactérienne de la metformine vis-à-vis de *H. pylori*, iii) de démontrer que *H. pylori* inhibe la voie de signalisation mTOR.

Mots clés : Adénocarcinome gastrique, cellules souches cancéreuses, PDX, tumorsphères, CD44, xéno greffe, propriété antibactérienne

TITLE: Study of metformin effects and involvement of the mTOR signaling pathway in *Helicobacter pylori* infection and gastric carcinogenesis

Abstract:

Chronic infection with *Helicobacter pylori* affects more than half of the world's population and is the main known cause of gastric adenocarcinoma. Metformin is an oral antidiabetic drug used to treat type 2 diabetes patients, and is being increasingly studied for its antitumoral properties in several cancer types. However, its potential effects in gastric cancer have not been thoroughly studied. Experiments performed on gastric cancer cell lines and patient-derived gastric carcinoma xenografts (PDX), have confirmed the antitumoral properties of metformin. Metformin, in preventive and curative treatment, decreases the tumorsphere formation, the expression of gastric CSC markers and the self-renewal capacity of CSC. In a second time, we have shown that metformin is able to inhibit the bacterial growth of *H. pylori in vitro* and *in vivo*. Finally, the effects of the *H. pylori* infection have been studied on the mTOR signaling pathway using a transcriptomic analysis and western blots, performed on gastric cancer cell lines. These show the ability of *H. pylori* to inhibit mTORC1.

To conclude, this thesis work allowed i) to demonstrate the ability of metformin to target gastric CSCs, ii) to discover a new antimicrobial property of metformin against *H. pylori*, iii) to demonstrate that *H. pylori* inhibits the mTOR signaling pathway.

Keywords: Gastric adenocarcinoma, cancer stem cells, PDX, tumorspheres, CD44, xenograft, antimicrobial property

INSERM U1053 – UMR BaRITOn

Equipe 2 « *Helicobacter* infection : inflammation and cancer » - Université de Bordeaux
Bat2B RdC Zone Nord, 146 Rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux cedex

Table des matières

LISTE DES FIGURES.....	9
LISTE DES TABLEAUX.....	10
ABREVIATIONS.....	11
AVANT-PROPOS.....	13
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	15
I. <i>Helicobacter pylori</i>.....	17
1. Historique.....	17
2. Caractéristiques générales de la bactérie.....	17
3. Modes de transmission.....	19
4. Epidémiologie.....	19
5. Facteurs de virulences.....	21
a. Colonisation de l'hôte.....	21
i) Uréase.....	21
ii) Flagelles.....	21
iii) Adhésines et attachement aux récepteurs de surface cellulaire.....	22
b. Le Lipopolysaccharide (LPS).....	23
c. Ilot de pathogénicité <i>cag</i> et son effecteur CagA.....	23
i) Système de sécrétion de type 4 (SST4).....	24
ii) Oncoprotéine CagA.....	25
iii) Toxine Vacuolisante VacA.....	27
6. Pathologies induites par <i>H. pylori</i>	30
a. Ulcères gastroduodénaux.....	31
b. Lymphome gastrique du MALT.....	31
c. Adénocarcinome gastrique.....	31
7. Diagnostic.....	32
8. Antibiothérapie et résistances.....	33
II. L'adénocarcinome gastrique.....	35

1.	Epidémiologie	35
2.	Facteurs de risque.....	36
3.	Classification du cancer gastrique.....	37
a.	Classification histologique	37
i)	L'adénocarcinome gastrique de type intestinal	38
ii)	L'adénocarcinome gastrique de type diffus	40
b.	Classification moléculaire	41
4.	Diagnostic.....	43
5.	Prise en charge du patient.....	44
6.	Modèles d'étude du cancer gastrique	46
a.	Modèles d'étude <i>in vitro</i>	46
b.	Modèles d'étude <i>in vivo</i>	48
i)	Modèle de la gerbille de Mongolie.....	48
ii)	Modèles de souris non génétiquement modifiées.....	48
iii)	Modèles de souris génétiquement modifiées.....	49
iv)	Carcinogénèse chimique	49
v)	Modèles permettant la greffe de matériel humain.....	49
III.	Les cellules souches et les cellules souches cancéreuses	51
1.	Les cellules souches	51
a.	Définition d'une cellule souche.....	51
b.	Les cellules souches gastriques	52
2.	Les cellules souches cancéreuses	55
a.	Concept de la cellule souche cancéreuse.....	56
b.	Origines des cellules souches cancéreuses gastriques.....	58
i)	Les CSC proviennent d'une transformation maligne des cellules souches gastriques	59
ii)	Les CSC proviennent de cellules dérivées de la moelle osseuse (BMDC)	59
iii)	Les CSC proviennent d'une dédifférenciation des cellules épithéliales	60
c.	Méthodes d'identification et propriétés des cellules souches cancéreuses	62
i)	Expression de marqueurs spécifiques	62
ii)	« Side-population »	64
iii)	L'aldéhyde déshydrogénase (ALDH).....	65
iv)	Formation de tumorsphères	66
v)	Greffes <i>in vivo</i>	67
IV.	Metformine	69
1.	Historique.....	69

2.	Utilisation de la metformine dans le diabète non insulino-dépendant	70
a.	Pharmacocinétique	71
b.	Mécanismes d'action de la metformine dans le traitement du diabète	72
i)	Effets dépendants de l'AMPK	74
ii)	Effets indépendants de l'AMPK	78
3.	Effets antitumoraux de la metformine dans le cancer gastrique	79
a.	Etudes épidémiologiques.....	79
b.	Propriétés antitumorales	80
4.	Ciblage des CSC par la metformine	86
OBJECTIFS.....		87
RESULTATS EXPERIMENTAUX		91
Article 1 : La metformine est capable de cibler les CSC gastriques.....		93
Article 2 : La metformine est capable d'inhiber la croissance de <i>H. pylori</i>		95
Article 3 : L'infection par <i>Helicobacter pylori</i> inhibe mTORC1.....		97
DISCUSSION.....		105
BIBLIOGRAPHIE		119

Liste des Figures

Figure 1: Photographie en microscopie électronique de <i>Helicobacter pylori</i>	18
Figure 2 : Prévalence mondiale de l'infection à <i>H. pylori</i>	20
Figure 3 : Système de sécrétion de type 4 (SST4) de <i>H. pylori</i>	24
Figure 4 : Effets de <i>H. pylori</i> sur les voies de signalisation de la cellule hôte.....	26
Figure 5 : Transformation du phénotype épithélial en phénotype mésenchymateux, dit colibri ou "Hummingbird", suite à l'infection par <i>H. pylori</i>	27
Figure 6 : Organisation et diversité génétique de VacA.	28
Figure 7 : Effets de VacA sur les cellules épithéliales de la muqueuse gastrique, ainsi que sur les cellules immunitaires (lymphocytes B et T et macrophages).	29
Figure 8 : Pathologies induites par l'infection à <i>H. pylori</i>	30
Figure 9 : Incidence mondiale estimée du cancer gastrique en 2012.....	35
Figure 10 : Classification histologique de l'adénocarcinome gastrique.	38
Figure 11 : Cascade de lésions induites par <i>H. pylori</i> conduisant à l'adénocarcinome gastrique de type intestinal.....	39
Figure 12 : Classification moléculaire du cancer gastrique selon « The Cancer Genome Atlas » (TCGA) et l'« Asian Cancer Research Group » (ACRG).	42
Figure 13 : Arbre décisionnel du traitement du cancer gastrique.	44
Figure 14 : Architecture des glandes gastriques et localisation des cellules souches/progénitrices gastriques.....	53
Figure 15 : Propriétés des cellules souches cancéreuses gastriques et stratégies thérapeutiques.	55
Figure 16 : Modèles stochastique et hiérarchique expliquant l'hétérogénéité tumorales.....	57
Figure 17 : Différentes étapes de la carcinogenèse gastrique induite par <i>H. pylori</i> et origine des cellules souches cancéreuses.....	58
Figure 18 : Modifications cellulaires structurales et protéiques retrouvées au cours de l'EMT.	61
Figure 19 : Gène codant pour le CD44 et structure de la protéine.....	64
Figure 20 : Structure de la guanidine et de ses dérivés.	70
Figure 21 : Inhibition du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale par la metformine.	73
Figure 22: Voie de signalisation de l'AMPK.	75

Figure 23 : La metformine contrôle l'expression des gènes de la gluconéogenèse <i>via</i> l'activation de l'AMPK.	76
Figure 24 : Mécanismes moléculaires induits par la metformine dans la cellule hépatique. ...	77
Figure 25 : Voies de signalisation mTORC1 et mTORC2.....	84
Figure 26 : Mécanismes moléculaires identifiés dans la réponse à la metformine dans le modèle de cancer gastrique.	85
Figure 27 : Etapes de l'autophagie.....	100
Figure 28 : Voies de régulation et acteurs de l'autophagie.	101
Figure 29 : Implication de l'autophagie dans les processus physiopathologiques.	102
Figure 30 : Evaluation du nombre de tumorsphères restantes après un traitement curatif par metformine seule, doxorubicine seule et par la metformine associée à la doxorubicine.	109
Figure 31 : La metformine diminue la production d'ATP et active l'AMPK.	110
Figure 32 : La metformine n'inhibe pas la voie de signalisation mTORC1.....	111
Figure 33 : Evaluation du rôle de l'autophagie dans les CSC gastriques, en réponse à la metformine	114

Liste des Tableaux

Tableau 1 : Types de cancers gastriques familiaux.....	37
Tableau 2 : Lignées cellulaires de cancer gastrique disponibles dans le commerce.....	47
Tableau 3 : Souches de souris immunodéficientes permettant de greffe de tumeurs humaines.....	50
Tableau 4 : Marqueurs des cellules souches gastriques identifiées par traçage de lignée	54

Abréviations

ABC : ATP Binding Cassette
ACC : acétyl-CoA carboxylase
AGRC : Asian Cancer Research Group
ALDH : Aldéhyde déshydrogénase
AMP : adénosine monophosphate
AMPK : AMP-activating protein kinase
Atg : autophagy-related genes
ATRA : acide transrétinoïque
BabA : blood-antigen binding protein A
BMDC : bone marrow-derived cells
CagA : cytotoxin-associated gene A
cagPAI : cag pathogenicity island
CD : cluster de différenciation
CIN : Chromosomal instability
CREB : c-AMP-response element-binding protein
CSC : cancer stem cell
EBV : Epstein-Barr Virus
EGFR : epidermal growth factor receptor
ELISA : enzyme-linked immunosorbent assay
EMT : epithelial-to-mesenchymal transition
eR1 : Runx1 enhancer element
ERK/MAP Kinase : extracellular signal regulated kinase / Mitogen activated protien kinase
FACS : fluorescence-activated cell sorting
G6Pase : glucose 6-phosphatase
HBP : heptose-1,7-bisphosphate
HDGC : cancer gastrique diffus héréditaire
hEGF : human epidermal growth factor
HER2 : human epithelial growth factor receptor 2
HNF4 α : hepatocyte nuclear factor-4 α
IPP : inhibiteur de pompe à protons
IRS-2 : insulin receptor substrates

KLF4 : Krüppel-like-factor 4
Lgr5 : Leucine-rich G protein-coupled receptor 5
LITAF : lipopolysaccharide-induced TNF α factor
LPS : lipopolysaccharide
MALT : mucosa associated lymphoid tissue
mGDP : mitochondrial glycerol 3-phosphate dehydrogenase
MMP9 : matrix metalloproteinase-9
MSI : Microsatellite instability
MSS : Microsatellite stable
mTOR : mammalian Target Of Rapamycin
NF- κ B : facteur nucléaire Kappa B
Nod1 : Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 1
NSG ou NOD/SCID : Nonobese Diabetic/Severe Combined Immunodeficiency
NTPase : nucleoside-triphosphatase
OCT1 : Organic cation transporter 1
OMP : outer-membrane proteins
PCR : polymerase chain reaction
PDX : Patient-Derived gastric carcinoma Xenografts
PEPCK : phosphoenolpyruvatecarboxykinase
PGI : pepsinogen
PI3K : phosphatidylinositol 3-kinase
PKA : cAMP-dependant protein kinase
SabA : sialic acid-binding adhesin
SNP : single-nucleotide polymorphism
SST4 : système de sécrétion de type 4
TCGA : The Cancer Genome Atlas
Tff2 : Trefoil factor family 2
TLR : Toll-like receptor
TNF α : Tumor Necrosis Factor α
VacA : toxine vacuolisante VacA
VEGF : vascular endothelial growth factor

Avant-propos

La découverte d'*Helicobacter pylori* en 1982 par R. Warren et B. Marshall a été le point de départ d'une révolution dans le monde de la Gastroentérologie. En effet, il est apparu au cours des années qui ont suivi cette découverte, que l'infection bactérienne était responsable de la majorité des gastrites chroniques et des ulcères gastroduodénaux. Dès la fin des années 1990, le rôle de l'infection à *H. pylori* dans la physiopathologie des ulcères et surtout l'intérêt de l'éradication de l'infection pour traiter la maladie ulcéreuse ont été admis par l'ensemble de la communauté médicale. Il est ensuite assez rapidement apparu que l'infection chronique de l'estomac sur plusieurs dizaines d'années pouvait être à l'origine de cancers gastriques. D'ailleurs, l'Organisation Mondiale de la Santé a, dès 1994, classé l'infection à *H. pylori* comme un agent carcinogène de type 1.

Depuis, il a été montré que la gastrite chronique liée à l'infection à *H. pylori* peut évoluer vers une gastrite atrophique avec ou sans métaplasie intestinale et, finalement vers un cancer dans à peu près 1 cas sur 100. L'adénocarcinome gastrique est le cinquième cancer le plus fréquent dans le monde et la troisième cause de mortalité par cancer dans le monde. C'est un cancer de mauvais pronostic, avec un taux de survie à 5 ans de seulement 25%, et qui est souvent diagnostiqué tardivement. De plus, il n'existe pas de thérapie ciblée et les rechutes, dues à la chimiorésistance des cellules souches cancéreuses, sont fréquentes. Il apparaît donc essentiel de déterminer précisément les mécanismes de la carcinogenèse gastrique liée à l'infection par *H. pylori* afin de pouvoir identifier de nouvelles cibles thérapeutiques.

Par ailleurs, il a été démontré que l'éradication préventive de l'infection à *H. pylori* diminue l'incidence du cancer chez les patients à haut risque. Ainsi est-il nécessaire de pouvoir traiter efficacement les patients infectés. Actuellement, les traitements d'éradication de la bactérie sont dans la majorité des cas efficaces. Toutefois, dans certains cas, il pourrait être intéressant de disposer de nouvelles molécules efficaces contre *H. pylori*.

Dans ce contexte, mes travaux de thèse s'articulent autour de trois axes : i) étude de l'utilisation de la metformine pour cibler les cellules souches cancéreuses gastriques ; ii) étude des effets de la metformine sur *H. pylori* ; iii) étude de l'impact de l'infection par *H. pylori* sur la voie de signalisation mTOR.

Etude Bibliographique

I. *Helicobacter pylori*

1. Historique

L'infection de l'homme par *Helicobacter pylori* daterait d'il y a environ 100 000 ans (Moodley *et al.*, 2012). Mais c'est seulement en 1875, que les bactériologistes G. Bottcher et M. Letulle observèrent la présence de bactéries dans les estomacs de patients souffrant d'ulcères gastriques (Kidd and Modlin, 1998) et évoquèrent les premiers la possibilité qu'une bactérie puisse être l'agent responsable de l'ulcère. Ces données furent confirmées par C. Klebs en 1881, qui observa lui aussi des micro-organismes de type bacille dans la lumière des glandes gastriques. Cependant, à l'époque, le fait que les ulcères gastriques puissent être causés par une bactérie ne fut pas retenu par la communauté scientifique. En 1893 le pathologiste italien G. Bizzozero décrivit la présence de microorganismes spiralés dans les glandes gastriques de chiens. Puis en 1906, le médecin allemand W. Krienitz identifia des Spirochètes dans le contenu gastrique de patients souffrant de cancer gastrique (Kidd and Modlin, 1998; Mazzarello *et al.*, 2001). De nombreuses descriptions microbiologiques bactériennes se succédèrent mais ce fut finalement en 1982 que J. Robbin Warren et Barry J. Marshall réussirent à faire pousser et à identifier un bacille spiralé Gram négatif à partir de biopsies gastriques de patient souffrant de gastrite chronique ou d'ulcère gastroduodéal (Marshall and Warren, 1984). La découverte de la bactérie *Helicobacter pylori* et de son rôle dans la gastrite et l'ulcère gastro-duodéal leur valut le prix Nobel de physiologie et de médecine en 2005.

2. Caractéristiques générales de la bactérie

Cette bactérie fut initialement nommée *Campylobacter pyloridis*. Puis, en 1989, l'analyse phylogénétique du gène codant pour l'ARN ribosomique 16S fut réalisée et une nouvelle espèce fut créée : *Helicobacter pylori* dans le nouveau genre *Helicobacter*, famille *Helicobacteraceae*, ordre des *Campylobacteraceae* appartenant aux *Epsilon Proteobacteria* (Goodwin *et al.*, 1989).

Le genre *Helicobacter* comprend actuellement 36 espèces validées. En fonction de leur site d'infection, les Helicobacters sont divisés en deux groupes :

- les Helicobacters gastriques, comprenant entre autres *Helicobacter pylori*, *Helicobacter felis* ou *Helicobacter bizzozeronii* ;

- les Helicobacters entéro-hépatiques, comportant 24 espèces colonisant le tractus gastro-intestinal et les voies biliaires tels que *Helicobacter hepaticus*, *Helicobacter bilis* ou *Helicobacter pullorum* (Ménard *et al.*, 2016).

Helicobacter pylori (*H. pylori*) est une bactérie Gram-négative flagellée, de forme hélicoïdale avec 1 à 3 tours, mesurant de 3 à 5 µm de long et 0,5 µm de diamètre (Figure 1). Sa culture est réalisée sur une gélose riche en nutriments et enrichie en sang, en atmosphère microaérobie (5% oxygène et 5-10% CO₂) à 35°C. Elle forme de petites colonies circulaires et translucides. Après 3 à 4 jours de culture, *H. pylori* change de morphologie et adopte une forme coccoïde ou sphérique associée à une diminution de la viabilité (Owen, 1998; O'Rourke and Bode, 2001; Blanchard and Nedrud, 2012).

Sa principale caractéristique biochimique est la présence d'une uréase très active qui lui permet de survivre dans le milieu acide de l'estomac. *H. pylori* possède également une catalase, une cytochrome oxydase et une phosphatase alcaline (Mégraud *et al.*, 1985; Goodwin *et al.*, 1989; Owen, 1998).

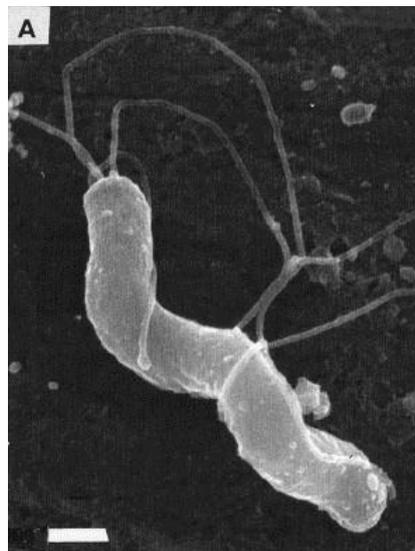


Figure 1: Photographie en microscopie électronique de *Helicobacter pylori*.

H. pylori est caractérisé par sa forme hélicoïdale et la présence de multiples flagelles polaires. Barre d'échelle : 0,5 µm. D'après (O'Rourke and Bode, 2001)

3. Modes de transmission

De nombreuses espèces animales possèdent leur propre espèce d'*Helicobacter* et *H. pylori* serait l'espèce inféodée à l'homme. Ainsi, l'estomac de l'homme est considéré comme étant le réservoir exclusif de *H. pylori*. Sa transmission est donc interhumaine et survient principalement dans la petite enfance. La séroprévalence estimée chez l'enfant augmente avec l'âge et passe de 20% chez les enfants de moins de 6 ans à 37% chez les enfants de 6 à 11 ans puis à 44% chez les enfants de 12 à 18 ans (Zabala Torres *et al.*, 2017). La transmission peut se faire par voie oro-orale ou gastro-orale *via* la salive contaminée et les vomissures ; c'est le mode de transmission le plus fréquent dans les pays développés. Elle peut aussi se faire par voie oro-fécale *via* les selles, notamment dans les pays en voie de développement (Mégraud, 2003). La contamination d'une personne saine nécessite donc une certaine promiscuité avec une personne infectée. Il est admis que la contamination est généralement intrafamiliale. Il a été montré que la prévalence de l'infection à *H. pylori* est plus importante chez les enfants vivants dans une famille de personnes infectées (Brown, 2000). Une personne infectée doit nécessairement recourir à un traitement antibiotique pour éradiquer la bactérie.

4. Epidémiologie

L'infection par *H. pylori* est considérée comme étant l'infection bactérienne chronique la plus répandue dans le monde, avec près de 4,4 milliards d'individus infectés, soit plus de la moitié de la population mondiale (Mégraud, 2003; Hooi *et al.*, 2017).

Une méta-analyse menée par Hooi *et al.* a mis en évidence que les régions avec les prévalences les plus fortes sont l'Afrique (70,1%), l'Amérique du sud (69,4%) et l'Asie occidentale (66,7%). Au contraire, les régions avec les prévalences les plus faibles sont l'Océanie (24,4%), l'Europe de l'ouest (34,3%) et l'Amérique du nord (37,1%) (Figure 2). La prévalence de l'infection à *H. pylori* en France est estimée à 46,9% (34,7 – 59,1%) de la population, soit plus de 30 millions de personnes (Hooi *et al.*, 2017).

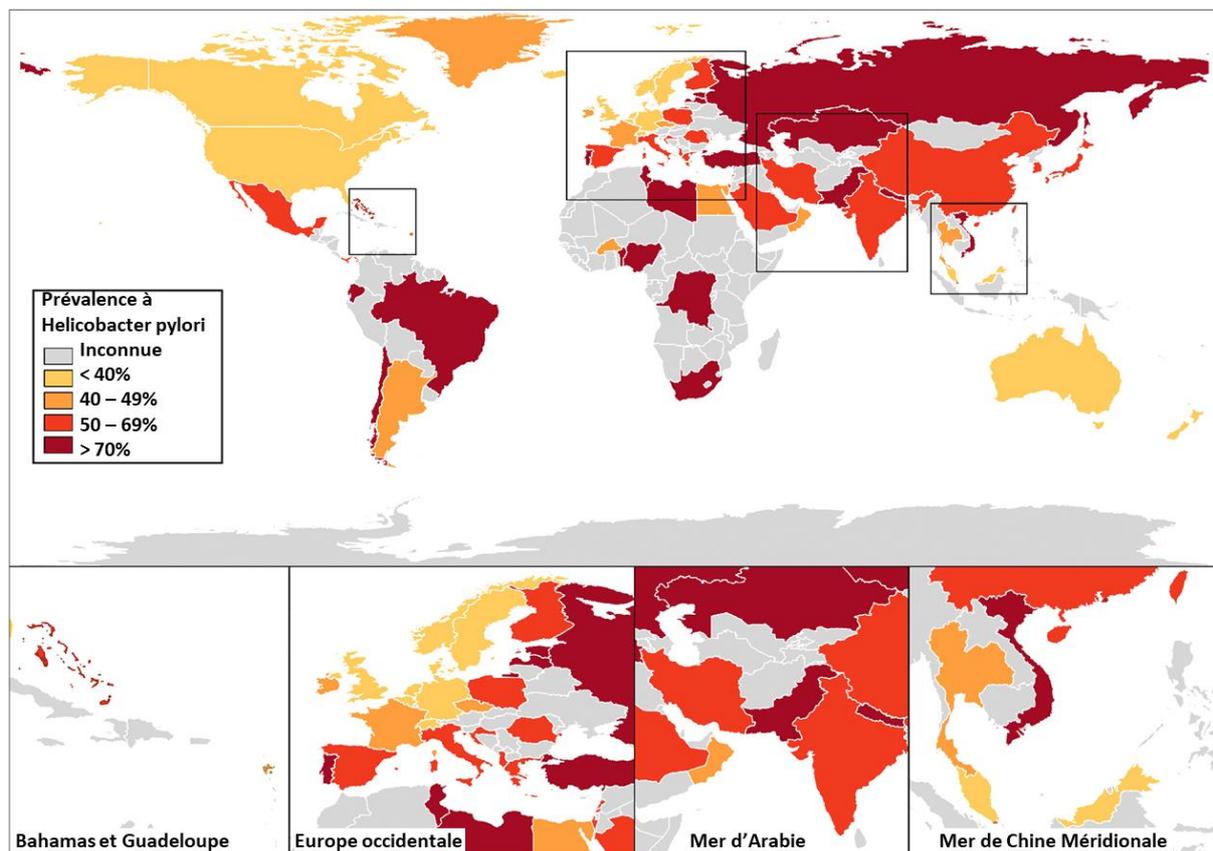


Figure 2 : Prévalence mondiale de l'infection à *H. pylori*.
D'après (Hooi et al., 2017)

La prévalence reste élevée dans les pays en voie de développement et est généralement liée au niveau d'urbanisation (installations sanitaires, conditions d'hygiène) et au statut socioéconomique. Ainsi par exemple, en Australie, la prévalence estimée de la population générale est de 24,6%, alors que celle de la communauté indigène rurale de l'Australie occidentale est de 76,0% (Hooi *et al.*, 2017).

Au niveau mondial, la prévalence de l'infection à *H. pylori* tend à diminuer. Hooi *et al.*, ont comparé les prévalences entre les périodes 1970 à 1999 et 2000 à 2016. En Europe celle-ci est passée de 48,8 à 39,8%, celle de l'Amérique du nord de 42,7 à 26,6% et celle de l'Océanie de 26,6 à 18,7%. Cependant, celle-ci reste étonnamment stable en Asie, en Amérique Latine et aux Caraïbes (Hooi *et al.*, 2017).

5. Facteurs de virulences

a. Colonisation de l'hôte

Une fois dans l'estomac, *H. pylori* doit se protéger du pH acide pour survivre. Pour cela, la bactérie va coloniser la muqueuse gastrique en traversant la couche de mucus sécrétée par les cellules épithéliales. Ce mucus, composé d'un ensemble de glycoprotéines, forme une barrière de protection de 1 à 1,5 mm d'épaisseur contre l'acidité gastrique. Le pH à la surface du mucus, au niveau de la lumière de l'estomac, est de 2 et passe progressivement à 7 au contact des cellules (Quigley and Turnberg, 1987).

Cette colonisation est possible grâce à la présence d'une uréase, de flagelles, conférant à la bactérie sa mobilité, et l'expression d'adhésines, permettant son interaction avec les cellules épithéliales.

i) Uréase

Afin de survivre dans le milieu acide de l'estomac, *H. pylori* possède une métalloenzyme particulière, l'uréase, qui lui permet d'alcaliniser le milieu environnant (Dunn *et al.*, 1990; Marshall *et al.*, 1990). Cette enzyme représente 10 à 15% du poids des protéines totales de la bactérie (Ha *et al.*, 2001). Elle est produite par un cluster de 7 gènes codant pour les sous-unités catalytiques (UreA/B), un transporteur permettant l'entrée de l'urée en condition acide (UreI) et des protéines d'assemblages (UreE-H) (Scott *et al.*, 2010). Dans un environnement dont le pH est inférieur ou égal à 6, en présence d'eau, l'uréase dégrade une molécule d'urée ($\text{NH}_2\text{-CO-NH}_2$) en deux molécules d'ammoniaque (NH_3) et dioxyde de carbone (CO_2). Les molécules d'ammoniac vont absorber les protons entrant dans le cytoplasme formant ainsi des ions ammonium (NH_4^+) pouvant ensuite être assimilés par la bactérie. Le CO_2 rejoint l'espace périplasmique *via* le transporteur UreI où il est transformé en bicarbonate (HCO_3^-). Ceci va permettre à la bactérie de maintenir le pH de l'espace périplasmique à environ 6,1 et son cytoplasme à un pH neutre (Weeks *et al.*, 2000; Scott *et al.*, 2010).

ii) Flagelles

La colonisation de l'estomac par *H. pylori* dépend de sa mobilité, de sa capacité à rejoindre le mucus gastrique et à y pénétrer. *H. pylori* est mobile grâce à la présence de 2 à 6 flagelles unipolaires selon les souches. Ces flagelles vont propulser la bactérie et entraîner sa

rotation. La forme hélicoïdale de *H. pylori*, couplée à la rotation, va faciliter sa pénétration dans le mucus, relativement visqueux (Eaton *et al.*, 1992). Plus de 40 gènes participent à la synthèse des flagelles. Trois parties peuvent être distinguées dans la composition du flagelle : le corps basal, composé de nombreuses protéines structurales et participant à fournir de l'énergie ; le crochet, composé de la protéine FlgE et reliant le corps basal au filament ; et le filament flagellaire, composé des deux flagellines FlaA et FlaB (Geis *et al.*, 1989; Kostrzynska *et al.*, 1991). Cette structure est couplée à un système chimio-sensoriel qui va réguler la rotation des flagelles afin de diriger la bactérie sensible aux niveaux d'urée, de bicarbonate, d'acides aminés et de cholestérol (Beier *et al.*, 1997; Terry *et al.*, 2005).

iii) Adhésines et attachement aux récepteurs de surface cellulaire

La majorité des souches de *H. pylori* reste dans la couche de mucus à proximité des cellules et seulement 20% des souches vont adhérer aux cellules. Or, cette interaction est nécessaire à la colonisation et à la pathogénèse. Ce sont les adhésines, des protéines de surface ou OMPs (« outer-membrane proteins »), qui vont permettre à la bactérie d'interagir avec les récepteurs cellulaires des cellules épithéliales gastriques (Ljungh *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 2015).

Les adhésines les mieux caractérisées à ce jour sont : BabA (« blood-antigen binding protein A ») et SabA (« sialic acid-binding adhesin ») qui peuvent se lier respectivement aux antigènes de Lewis b et sialyl-Lewis x, exprimés par les cellules épithéliales (Mahdavi *et al.*, 2002; Van de Bovenkamp *et al.*, 2003). Il a été démontré que la présence de l'antigène de Lewis b en cas d'infection par *H. pylori* conduit à une inflammation plus sévère. Ceci montre bien l'importance de l'interaction bactérie-cellule hôte (Falk *et al.*, 1995; Guruge *et al.*, 1998). D'autres adhésines (AlpA/B, HopZ, OipA) ont été identifiées et participent également à l'inflammation. Bien que leurs ligands ne soient pas caractérisés, elles semblent d'avantage impliquées dans l'interaction bactérie-cellule (Odenbreit, 2005; Kalali *et al.*, 2014). Ainsi, deux catégories d'adhésines peuvent être distinguées : celles principalement impliquées dans l'induction de l'inflammation et celles qui jouent un rôle important dans l'adhésion aux cellules.

b. Le Lipopolysaccharide (LPS)

Le lipopolysaccharide (LPS) est le glycolipide majeur de la paroi externe des bactéries Gram-négatives qui joue un rôle dans l'interaction hôte-pathogène mettant en jeu le système immunitaire inné. Cette endotoxine bactérienne est composée de trois domaines : 1) le lipide A, un domaine hydrophobe qui ancre le LPS dans la membrane externe, 2) une partie centrale, le noyau, qui fait le lien avec 3) les chaînes glucidiques formant l'antigène O, en contact direct avec le milieu extérieur (Raetz and Whitfield, 2002).

Quatre-vingt-cinq pour cent des souches de *H. pylori* sont porteuses d'antigènes de Lewis (majoritairement x ou y) au niveau de l'antigène O, également exprimés dans les cellules épithéliales gastriques. Ce mimétisme avec l'hôte permet à *H. pylori* d'échapper au système immunitaire (Appelmek *et al.*, 1996, 2000). De plus, la structure du lipide A et du noyau confère à la bactérie une résistance aux peptides antimicrobiens cationiques.

Le noyau du LPS contribue à la colonisation et à la pathogenèse en se liant à la laminine, une glycoprotéine de la matrice extracellulaire. Cette liaison inhibe la reconnaissance de la laminine par son récepteur cellulaire, l'intégrine, entraînant une perte d'intégrité de la muqueuse gastrique et par la suite une apoptose cellulaire (Slomiany *et al.*, 1991; Valkonen *et al.*, 1994).

Les interactions du LPS de *H. pylori* avec les TLR (« Toll-like receptor »), des récepteurs du système immunitaire inné, ont été examinées et ont montré que le LPS de *H. pylori* peut être reconnu par le TLR4, mais se lie préférentiellement au TLR2, un récepteur impliqué dans la signalisation des cytokines (Mandell *et al.*, 2004).

c. Ilot de pathogénicité *cag* et son effecteur CagA

L'ilot de pathogénicité *cag* (*cagPAI* pour « *cag* pathogenicity island ») est un segment d'ADN génomique de 40 kb acquis au cours de l'évolution par transfert horizontal de gènes d'un donneur inconnu. Le *cagPAI* contient 31 gènes dont 18 codent pour un système de sécrétion de type 4 (SST4) composé de plusieurs protéines (Backert *et al.*, 2000). A l'extrémité 3' du *cagPAI* est situé le gène codant pour l'oncoprotéine bactérienne CagA (« Cytotoxin-associated gene A ») (Stein *et al.*, 2001). Environ 30 à 40% des souches de *H. pylori* isolées dans les pays occidentaux ne portent pas le *cagPAI* et sont donc CagA-négatives, alors que presque tous les isolats de *H. pylori* des pays de l'Asie de l'Est contiennent le *cagPAI* et sont donc CagA-positifs (Hatakeyama, 2017).

i) Système de sécrétion de type 4 (SST4)

Le SST4 est une structure complexe qui forme un canal entre les membranes interne et externe de la bactérie et le cytoplasme de la cellule hôte (Figure 3). Le SST4 est composé d'un assemblage de 11 protéines, VirB1 à 11, couplées à VirD4, une NTPase (Figure 3) (Backert and Selbach, 2008). Sa formation est induite par le contact bactérie-cellule. Il agit comme une seringue et permet la translocation de la protéine CagA et du peptidoglycane de la bactérie vers le cytoplasme de la cellule (Censini *et al.*, 1996; Akopyants *et al.*, 1998). Ainsi, les effets cellulaires du SST4 sont soit dépendants, soit indépendants de CagA.

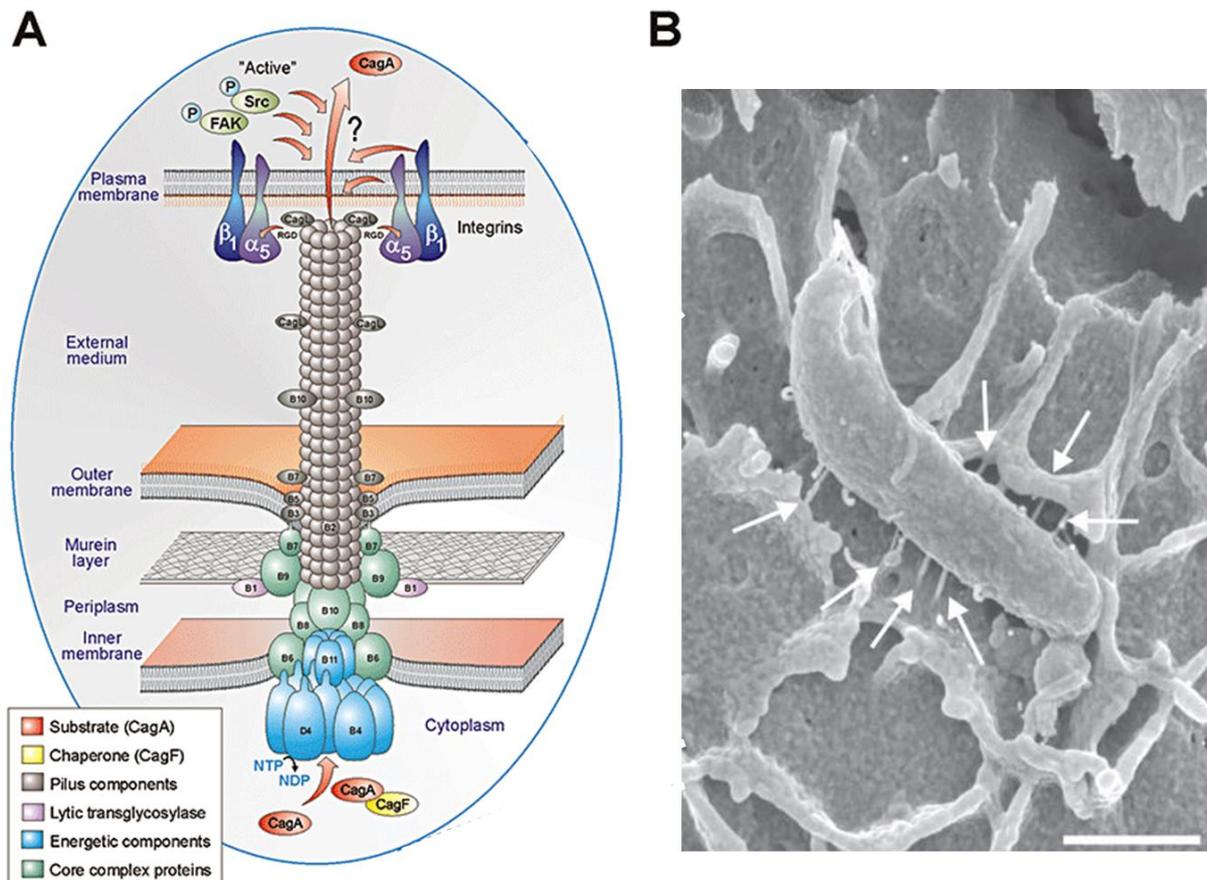


Figure 3 : Système de sécrétion de type 4 (SST4) de *H. pylori*.

(A) Schéma du SST4 avec les différentes protéines le constituant (Backert and Selbach, 2008). (B) Photographie en microscopie électronique du SST4 de *H. pylori*. Les flèches blanches montrent le SST4. Barre d'échelle : 1 μm. D'après (Backert *et al.*, 2015)

Le SST4, indépendamment de CagA, active des voies de signalisation pro-inflammatoires. Des petits fragments du peptidoglycane bactérien transloqués *via* le SST4, sont reconnus par la protéine Nod1 (« Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 1 »). Cette reconnaissance entraîne l'activation du facteur de transcription NF-κB

(facteur nucléaire Kappa B) (Viala *et al.*, 2004) et induit la production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-8, le TNF- α (« Tumor Necrosis Factor α ») et la β -défensine. De plus, le NF- κ B activé supprime l'expression de H,K-ATPase, l'enzyme contrôlant la sécrétion d'acide gastrique (Figure 4). Ceci entraîne une hypochlorhydrie, communément rencontrée pendant la phase aiguë de l'infection (Chaput and Boneca, 2006; Backert and Selbach, 2008; Backert *et al.*, 2015).

Récemment il a été démontré que le SST4 permet la translocation, à l'intérieur de la cellule hôte, du heptose-1,7-bisphosphate (HBP), un intermédiaire métabolite du LPS. Les voies médiées par le HBP participent à l'activation du NF- κ B et à la production de l'IL-8 (Stein *et al.*, 2017; Zimmermann *et al.*, 2017).

Ainsi, le SST4, indépendamment de CagA, participe à la pathogenèse liée à *H. pylori*.

L'autre rôle du SST4 est d'injecter CagA dans la cellule après attachement de *H. pylori* à la membrane cellulaire *via* les adhésines (Figure 3) : les effets du SST4 dépendants de CagA sont développés dans le paragraphe suivant.

ii) **Oncoprotéine CagA**

La majorité des souches de *H. pylori* expriment l'oncoprotéine bactérienne CagA (« Cytotoxin-associated gene A »). Sa présence est associée à des pathologies plus sévères chez l'homme et en fait le facteur de virulence le plus étudié.

CagA est une protéine monomérique de 135 à 145 kDa dont l'activité dépend de son extrémité C-terminale, de 35 à 45 kDa, comportant jusqu'à 5 répétitions du motif EPIYA (Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala). Suivant la séquence des acides aminés environnants, 4 motifs peuvent être distingués : EPIYA-A, EPIYA-B, EPIYA-C et EPIYA-D. Dans les pays occidentaux, les souches de *H. pylori* possèdent les motifs 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 motif EPIYA-C mais, à la place, un motif EPIYA-D (Hatakeyama, 2009, 2017).

Une fois injectée dans le cytoplasme via le SST4, CagA altère de nombreuses voies de signalisation à la fois sous sa forme phosphorylée et sous sa forme non phosphorylée (Figure 4) (Backert *et al.*, 2000). La liaison de la protéine CagL, composante du SST4, avec l'intégrine $\alpha_5\beta_1$ active la voie de signalisation médiée par les intégrines. Ceci entraîne l'activation des kinases Src et Abl qui vont phosphoryler CagA sur sa tyrosine au niveau du motif EPIYA (Stein *et al.*, 2002; Selbach *et al.*, 2004). CagA phosphorylée va ainsi se lier et activer la tyrosine phosphatase SHP-2 et affecter de nombreuses voies de signalisation telles que la voie ERK/MAP Kinase (« Extracellular signal Regulated Kinase/Mitogen Activated Protein

Kinase ») régulant l'adhésion, la mobilité cellulaire et l'organisation du cytosquelette (Figure 4) (Yong *et al.*, 2015). Le segment EPIYA-D présente une affinité de liaison plus forte pour SHP-2 et donc une plus grande capacité à induire des changements morphologiques dans les cellules épithéliales que le CagA de type Occidental. Ainsi, les individus infectés par des souches de *H. pylori* d'Extrême Orient ont un risque accru de développer un ulcère gastro-duodéal ou un cancer gastrique par rapport à ceux infectés par des souches de *H. pylori* de type occidental, présentant le segment EPIYA-C (Vilaichone *et al.*, 2004).

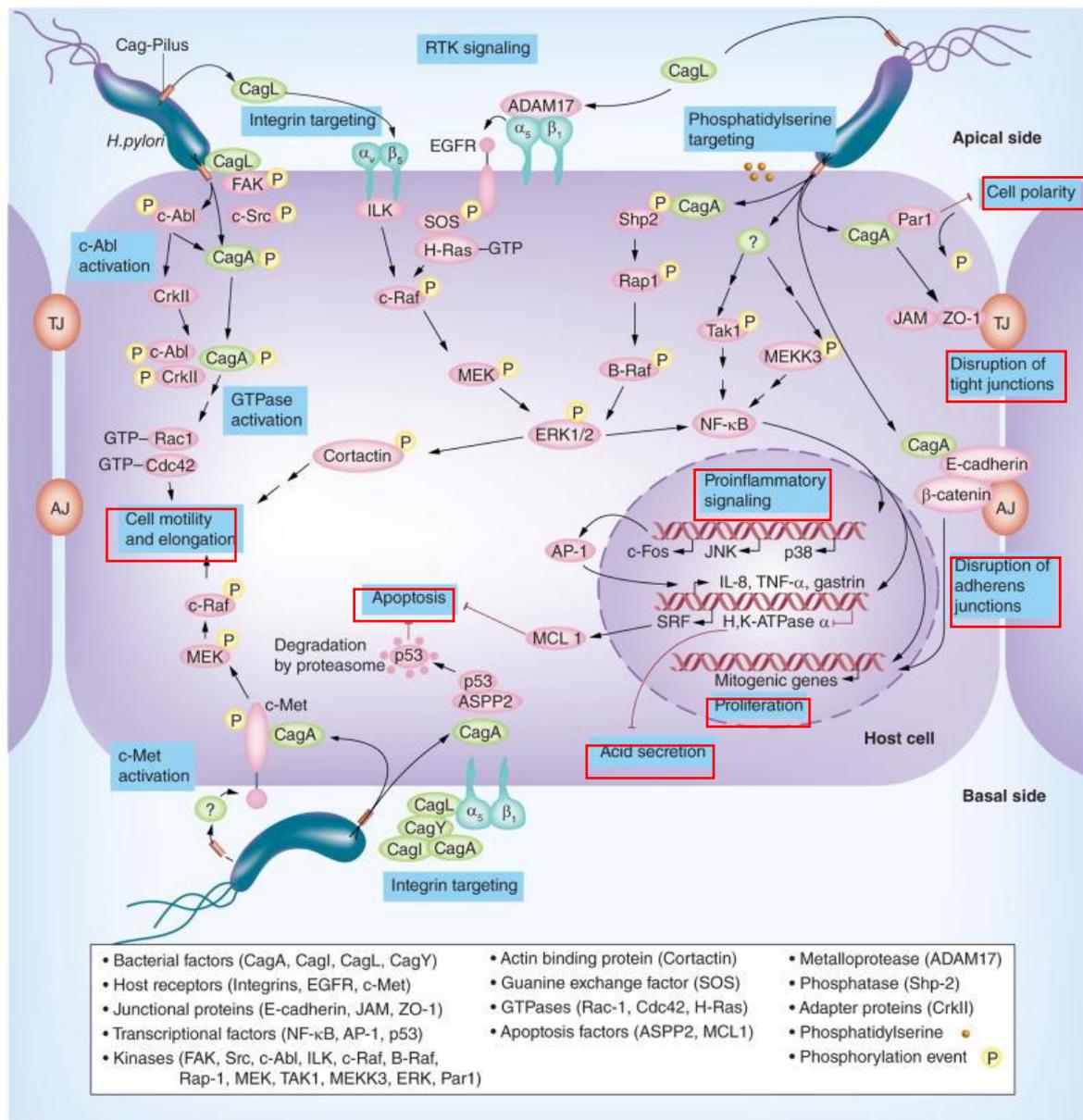


Figure 4 : Effets de *H. pylori* sur les voies de signalisation de la cellule hôte.

Les effecteurs du SST4 modifient différents processus cellulaires dans les cellules épithéliales gastriques polarisées. CagA est transloquée dans le cytoplasme des cellules infectées et module diverses cascades de signalisation associées à la prolifération cellulaire, à l'inflammation, à la motilité, aux réarrangements cytosquelettiques, à la rupture des jonctions serrées et adhérentes (AJ et TJ) et à la suppression de l'apoptose ou de la sécrétion d'acide. Les récepteurs tyrosine kinases tels que EGFR et c-Met, les facteurs de transcription NF-κB et AP-1 ainsi que les petites Rho GTPases Rac1 et Cdc42 peuvent également être activés par le T4SS. D'après (Backert *et al.*, 2015)

Sous sa forme non phosphorylée, CagA interagit avec différentes protéines de signalisation telles que Met, E-cadhérine, Grb2 et Par1b qui vont ensuite activer les voies de signalisation correspondantes : PI3K/Akt (« phosphatidylinositol 3-kinase/Akt »), NF- κ B, Wnt/ β -caténine et Ras. L'activation de ces voies de signalisation induit la prolifération cellulaire, la réponse pro-inflammatoire, une rupture des jonctions cellule-cellule et une perte de la polarité cellulaire (Figure 4) (Amieva *et al.*, 2003). Ainsi CagA, à la fois sous sa forme phosphorylée et non-phosphorylée, va induire un allongement de la cellule et entraîner la perte du phénotype épithélial au profit d'un phénotype colibri ou « Hummingbird » (Segal *et al.*, 1999; Backert *et al.*, 2001; Higashi *et al.*, 2002), correspondant à un phénotype mésenchymateux (Figure 5).

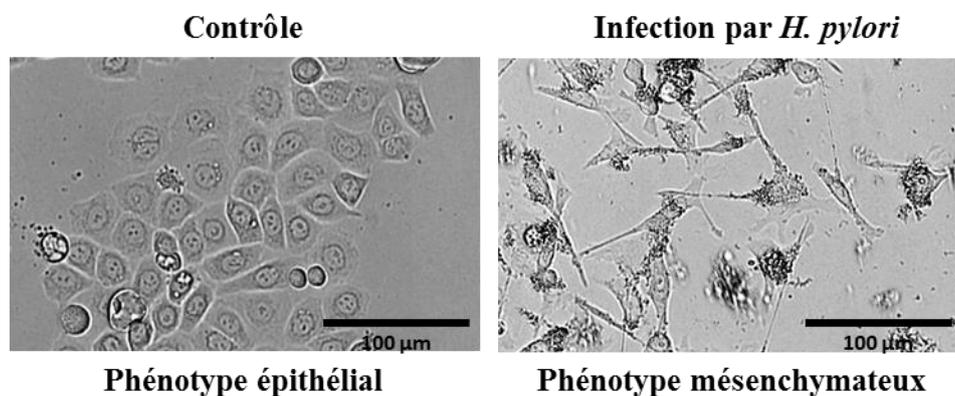


Figure 5 : Transformation du phénotype épithélial en phénotype mésenchymateux, dit colibri ou "Hummingbird", suite à l'infection par *H. pylori*.

Photographie en microscopie optique d'une lignée cellulaire cancéreuse gastrique (AGS) cultivée *in vitro*. Les cellules épithéliales sont cohésives, polarisées et de forme cubique. L'infection par *H. pylori* induit, *via* CagA, une rupture des jonctions cellule-cellule, une perte d'adhésion et un réarrangement du cytosquelette conduisant à un allongement des cellules en forme de colibri.

iii) Toxine Vacuolisante VacA

Contrairement à CagA, le gène de la toxine vacuolisante VacA est présent dans toutes les souches de *H. pylori*, mais seulement 50% des souches forment des vacuoles *in vitro*.

Trois grandes régions de diversité dans la séquence de *vacA* ont été décrites définissant différents allèles (Figure 6) : la région s au niveau de la séquence signal (types s1 et s2) ; la région intermédiaire i (types i1 et i2) ; et la région centrale m (types m1 et m2). Différentes combinaisons entre les régions s, i et m peuvent exister et chaque combinaison présente un niveau différent de cytotoxicité. Le risque de cancer gastrique ou d'ulcère gastro-duodéal est

plus important chez les personnes infectées avec les souches contenant les allèles s1, i1 ou m1, par rapport aux personnes infectées avec des souches contenant les allèles s2, i2 ou m2 (Atherton *et al.*, 1997).

VacA est traduite sous forme d'une pré-prototoxine de 140 kDa (Figure 6), dont les extrémités C et N-terminales sont clivées pendant la sécrétion de la toxine hors de la bactérie par des protéases membranaires. La première protéolyse entraîne le clivage de la séquence signal N-terminale s1 ou s2 (33 aa) responsable du transport de la toxine dans le périplasma bactérien. La deuxième protéolyse entraîne le clivage du domaine C-terminal, qui se produit au moment de la sécrétion de la toxine au niveau de la membrane externe. Les produits de clivage sont donc une toxine mature de 88 kDa, un peptide sécrété de 12 kDa (s1 ou s2) et un domaine autotransporteur de 33 kDa restant associé à la membrane bactérienne (Cover, 1996). La toxine mature sécrétée est composée de 2 sous-unités, p33 et p55, correspondant aux 2 domaines fonctionnels de VacA (Figure 6).

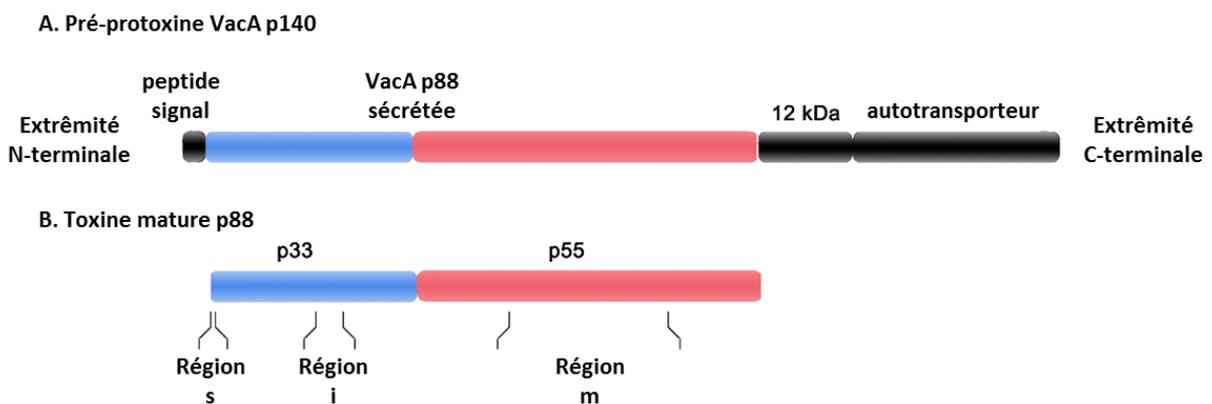


Figure 6 : Organisation et diversité génétique de VacA.

(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 autotransporteur. (B) La toxine VacA sécrétée de 88 kDa 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.*, 2016)

VacA est capable de s'oligomériser et forme des canaux dans la membrane des cellules épithéliales. Les canaux formés laissent passer les anions ainsi que des petites molécules hydrophobes telles que l'urée, qui sera utilisée par la bactérie pour permettre sa survie dans la muqueuse. La petite sous-unité, p33, contient une séquence hydrophobe. La plus grande sous-unité, p55, permet à la toxine de se lier à différents récepteurs cellulaires tels que l'EGFR (« epidermal growth factor receptor »), la sphingomyéline, la fibronectine, l'héparine et l'héparane sulfate, le CD18, ou des lipides membranaires. Ceci va réguler de nombreuses voies

de signalisation intracellulaire. En particulier, p55 est capable de lier le récepteur β à tyrosine phosphatase RPTP β qui régule la prolifération, la différenciation et l'adhésion cellulaire (Atherton, 2006; Peek *et al.*, 2010).

Les effets de VacA sont nombreux (Figure 7). Comme son nom l'indique, VacA induit la formation de larges vacuoles intracellulaires après internalisation du canal par endocytose. La présence de ce canal dans la membrane des vésicules d'endocytose permet aux anions de pénétrer dans les endosomes tardifs. Cette entrée d'anions est compensée par l'entrée d'ions hydrogènes, d'où la formation de ces grandes vacuoles (Kao *et al.*, 2016).

Par ailleurs, VacA peut être localisée au niveau de la mitochondrie. Ceci induit l'apoptose des cellules en réduisant le potentiel transmembranaire mitochondrial et la libération du cytochrome C. VacA est aussi associée à une déstabilisation des jonctions cellulaires, à une diminution de la production de mucines et à une activité immunosuppressive, notamment suggérée par une altération de la maturation du phagosome (Figure 7). Enfin, VacA influence la réponse inflammatoire de l'hôte principalement en supprimant l'activation des lymphocytes T (Rieder *et al.*, 2005).

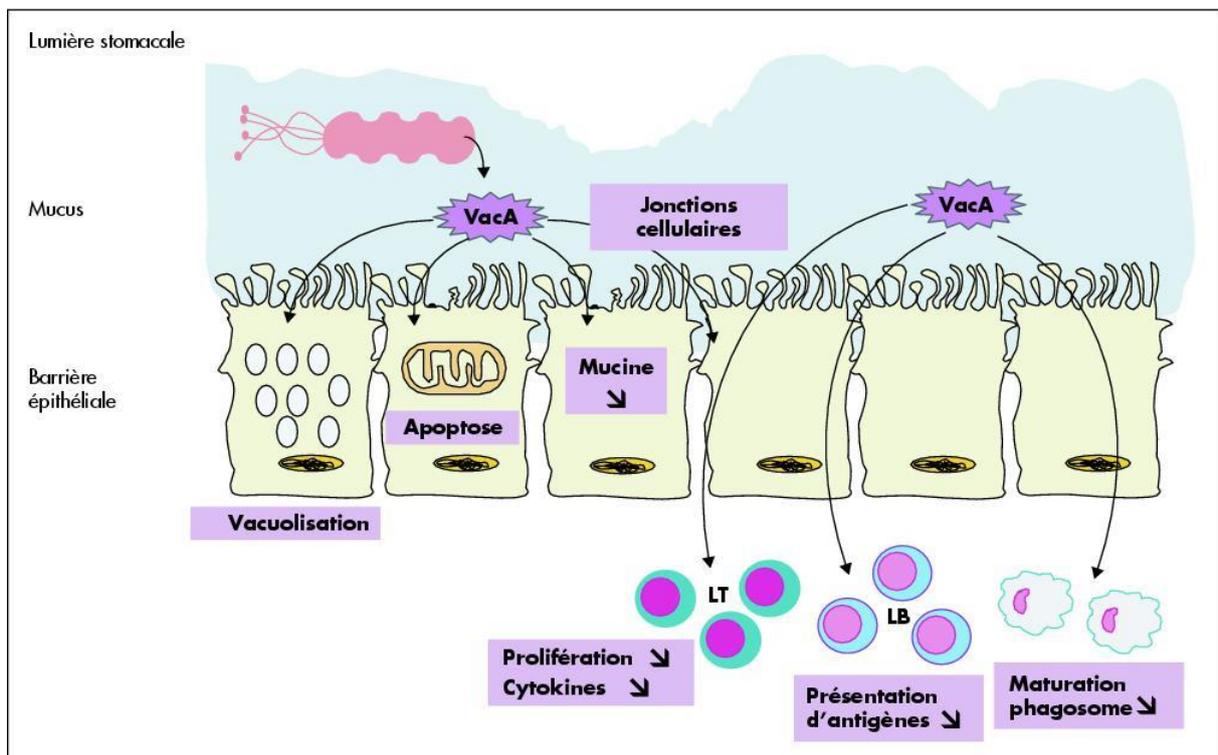


Figure 7 : Effets de VacA sur les cellules épithéliales de la muqueuse gastrique, ainsi que sur les cellules immunitaires (lymphocytes B et T et macrophages).

Les effets de la toxine VacA sont nombreux. Elle entraîne la formation de vacuoles dans les cellules épithéliales, déstabilise les jonctions cellulaires, diminue la production de mucines et induit l'apoptose. VacA agit aussi sur les cellules immunitaires, à l'origine de son activité immunosuppressive. D'après (Chaput and Boneca, 2006)

6. Pathologies induites par *H. pylori*

L'infection par *H. pylori* entraîne une réaction inflammatoire de la muqueuse gastrique ou gastrite, caractérisée par un infiltrat des effecteurs de la réponse immunitaire (lymphocytes, et polynucléaires neutrophiles) et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-8, l'IL-1 β et le TNF α (Dixon *et al.*, 1996; Konturek *et al.*, 2006). La gastrite est asymptomatique dans la majorité des cas (85%) mais peut aussi évoluer vers différentes pathologies (Figure 8) : ulcère gastroduodénal, adénocarcinome gastrique ou lymphome gastrique du MALT.

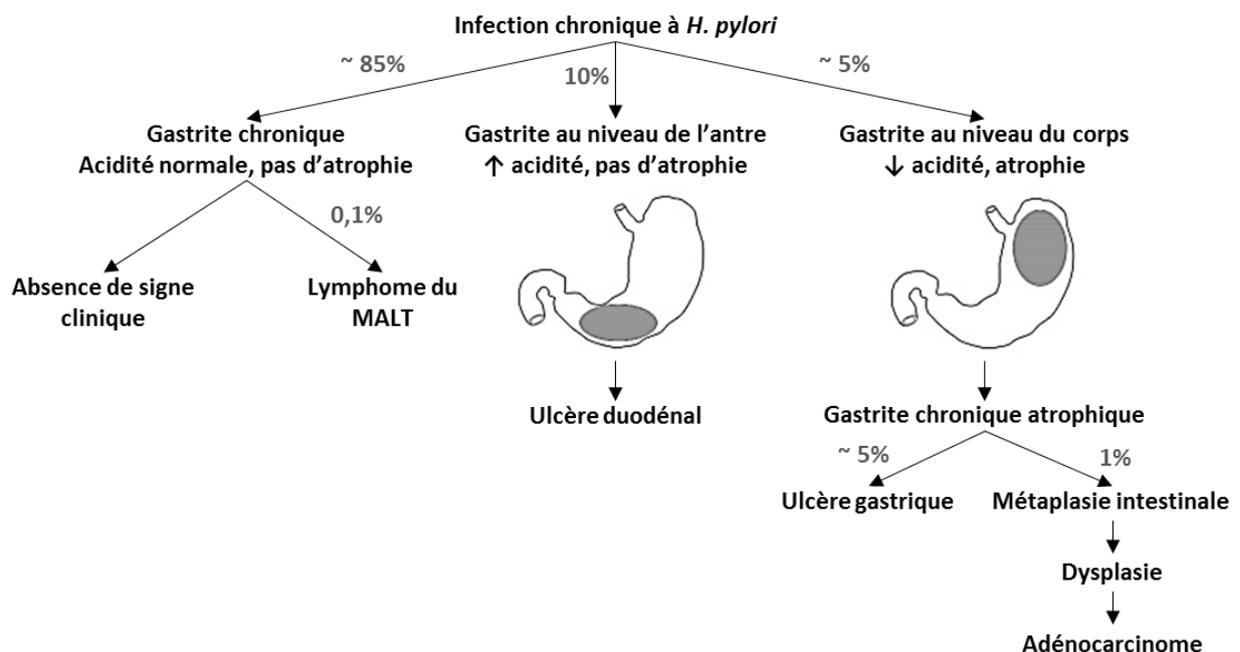


Figure 8 : Pathologies induites par l'infection à *H. pylori*.

La gastrite est asymptomatique dans 85% des cas mais elle peut aussi évoluer et être associée à : i) une hypersécrétion acide, dans 10% des cas, qui confine *H. pylori* dans l'antré, la gastrite reste antrale et peut évoluer vers l'ulcère duodénal ; ii) une hyposécrétion acide, qui permet à *H. pylori* de coloniser aussi le corps de l'estomac et qui entraîne une gastrite atrophique puis le développement d'un ulcère gastrique (5%) ou d'un adénocarcinome gastrique (1%) ; iii) le lymphome gastrique du MALT (« mucosa-associated lymphoid tissue ») pour environ 0,1% des personnes infectées. D'après (Mégraud *et al.*, 2015)

a. Ulcères gastroduodénaux

L'ulcère gastrique ou duodéal est associé à la virulence des souches ainsi qu'à une inflammation sévère de la muqueuse gastrique. L'infection par *H. pylori* entraîne une diminution de la synthèse hormonale de somatostatine puis une augmentation de la production de gastrine dont la fonction principale est de stimuler la production d'acide chlorhydrique. Ceci conduit à une augmentation de l'acidité gastrique, ou hyperchlorhydrie gastrique, entraînant une métaplasie antrale protectrice. Cette métaplasie permet la colonisation du duodénum par *H. pylori*, induisant une inflammation locale qui fragilise la muqueuse favorisant l'apparition d'un ulcère duodéal (Atherton, 2006; Konturek *et al.*, 2006). L'ulcère gastrique est associé à une production acide normale ou réduite, puis à des dommages de l'épithélium gastrique au niveau de l'antrum et du corps de l'estomac (Atherton, 2006).

b. Lymphome gastrique du MALT

Le lymphome gastrique du MALT (« mucosa associated lymphoid tissue ») est une conséquence rare de l'inflammation chronique de la muqueuse gastrique causée par l'infection à *H. pylori*. La réaction inflammatoire induite par la bactérie entraîne le recrutement de lymphocytes B normalement quasi-absents de la muqueuse gastrique. En présence de *H. pylori*, la prolifération de ces cellules est stimulée par des cytokines libérées par les cellules T activées, et non pas par la bactérie elle-même (Ruskoné-Fourmestreaux, 2004). Ceci va aboutir à l'apparition de follicules lymphoïdes (tissus lymphoïdes organisés) à partir desquels émerge le lymphome du MALT (Delchier, 2008). Ce lymphome de bas grade de malignité est peu agressif, reste localisé au niveau de l'estomac et à une évolution lente. Parfois, le lymphome peut évoluer vers un haut degré de malignité, *via* l'accumulation de mutations avec des dommages oxydatifs. Ces lymphomes sont plus souvent associés à des souches *H. pylori* CagA positives et à une inflammation plus importante de la muqueuse gastrique (Atherton, 2006). L'éradication de *H. pylori* conduit à une régression du lymphome dans 75% des cas et constitue le traitement de première intention du lymphome gastrique du MALT (Bayerdörffer *et al.*, 1995).

c. Adénocarcinome gastrique

L'infection par *H. pylori* est le facteur causal dominant de l'adénocarcinome gastrique. Le chapitre II sera consacré à cette pathologie.

7. Diagnostic

Le diagnostic de l'infection à *H. pylori* repose sur différentes méthodes invasives ou non invasives (Calvet *et al.*, 2013; Mentis *et al.*, 2015; Bessède *et al.*, 2017).

Les tests dits invasifs sont réalisés à partir de biopsies gastriques prélevées au cours d'une endoscopie. L'endoscopie permet d'observer directement la morphologie de la muqueuse gastrique. De récents progrès dans les méthodes endoscopiques permettent aux gastroentérologues d'apprécier plus finement l'aspect de la muqueuse gastrique et de prélever des biopsies gastriques ciblées. A partir des biopsies prélevées, il est possible de réaliser un test rapide à l'uréase en salle d'endoscopie. Il repose sur la détection de l'uréase produite par *H. pylori*. La biopsie gastrique est placée sur une bandelette colorée, imprégnée d'urée, qui va virer de couleur du fait de l'activité uréasique en présence de la bactérie. Sa positivité est suffisante pour initier un traitement d'éradication mais sa négativité n'exclut pas une infection. Ce test n'est pas recommandé pour le contrôle de l'éradication chez les patients traités par IPP ou antibiotiques. En France, ce test n'est pas pris en charge par l'assurance maladie.

L'examen histologique réalisé à partir des biopsies gastriques permet de détecter l'infection et évalue les lésions de la muqueuse. Cinq biopsies sont recommandées : une de l'angle de la petite courbure, deux du corps gastrique (petite et grande courbure) et deux de l'antrum (petite et grande courbure). La présence d'une gastrite chronique active, correspondant à la présence de polynucléaires neutrophiles dans la muqueuse, est un signe indirect de l'infection. Celle-ci sera confirmée par une sérologie ou un test respiratoire à l'urée ¹³C à distance des traitements. L'immunohistochimie facilite la détection de la bactérie mais n'est pas recommandée en routine.

La culture de la bactérie à partir de la biopsie gastrique constitue la méthode de référence pour identifier *H. pylori* et est la seule méthode permettant de déterminer la sensibilité de la bactérie à tous les antibiotiques. Elle est recommandée chaque fois que possible et particulièrement après échec d'un traitement d'éradication. Cependant, elle nécessite un transport rapide des prélèvements dans un milieu spécifique ou une conservation à -80°C et un transport dans la carboglace.

L'amplification génique (PCR) a une excellente sensibilité et spécificité pour le diagnostic de l'infection. Elle se fait à partir de biopsies gastriques et permet en outre la détermination des principales mutations impliquées dans la résistance aux macrolides (clarithromycine) voire aux fluoroquinolones (levofloxacine). La PCR est donc une alternative à la culture avec antibiogramme, d'autant qu'elle nécessite des conditions de transport moins contraignantes que la culture. Plusieurs techniques de PCR sont commercialisées.

La PCR est plus sensible que la culture de la bactérie à partir de la biopsie gastrique, mais elle ne permet pas de tester la sensibilité à tous les antibiotiques.

Il est également possible de détecter la présence de *H. pylori* de manière non invasive et indirecte. Le test respiratoire à l'urée consiste à détecter une infection active par la mise en évidence d'une activité uréasique. En présence de *H. pylori*, l'ingestion d'urée marquée par un isotope non radioactif du carbone (^{13}C) est suivie du rejet dans l'air expiré de CO_2 marqué dont la quantité peut être mesurée par spectrométrie de masse isotopique, reflétant ainsi la présence ou l'absence de *H. pylori*.

Il est possible d'effectuer une recherche sérologique des anticorps IgG dirigés contre *H. pylori* dans le sérum des patients. Ce test peut être utilisé dans certaines circonstances pour détecter l'infection mais ne doit pas être utilisé pour vérifier l'efficacité d'un traitement d'éradication. La sensibilité de la sérologie *H. pylori* varie en fonction des trousse ELISA (« enzyme-linked immunosorbent assay ») commercialisées. Les tests ELISA les plus performants ont une sensibilité supérieure à 90% (Burucoa *et al.*, 2013). Enfin, la recherche d'antigènes de *H. pylori* par anticorps monoclonaux peut être effectuée dans les selles des patients. Ce test est recommandé pour le diagnostic et le contrôle de l'éradication si le test respiratoire n'est pas réalisable. Cependant, en France, ce test n'est pas pris en charge par l'assurance maladie.

8. Antibiothérapie et résistances

Le traitement d'éradication de la bactérie repose sur l'utilisation d'antibiotiques et d'un inhibiteur de la pompe à proton (IPP). Des recommandations sur le traitement de l'infection sont régulièrement publiées afin d'adapter le traitement à l'évolution des antibio-résistances (Malfertheiner *et al.*, 2017). Il est admis qu'un traitement ayant une efficacité inférieure à 80% n'est pas recommandable. Les deux facteurs responsables de l'échec d'un traitement antibiotique sont l'apparition de souches résistantes et la faible observance des patients envers le traitement. En effet, depuis les années 90 les résistances n'ont fait qu'augmenter. En 2014 a été menée une large étude pour déterminer les taux de résistances en France à différents antibiotiques utilisés dans les traitements d'éradication de *H. pylori*. Les taux de résistances à la clarithromycine n'ont fait qu'augmenter, pour atteindre 22 à 25% des patients. Ceci est dû à l'apparition de mutations ponctuelles dans le gène codant pour l'ARN ribosomique 23S, empêchant la fixation et donc l'action de la clarithromycine. La résistance à l'amoxicilline

quant à elle reste exceptionnelle et n'a pas été mise en évidence en France (Ducournau *et al.*, 2016; Lamarque *et al.*, 2017; Mégraud, 2017).

De toutes nouvelles recommandations françaises parues en 2017 préconisent des traitements orientés par les résultats des tests de détection des résistances aux antibiotiques : antibiogramme (culture de la souche) ou PCR. Ainsi est-il conseillé en première ligne d'effectuer une trithérapie de 14 jours comprenant un IPP à plus forte dose (rabéprozole ou ésoméprozole) ainsi que deux antibiotiques : amoxicilline et, suivant le profil de résistance de la souche, clarithromycine, lévofloxacine ou métronidazole (Lamarque *et al.*, 2017).

Un contrôle systématique de l'éradication de la bactérie doit être réalisé par un test respiratoire ou des prélèvements gastriques au cours d'une endoscopie, au plus tôt 4 semaines après l'arrêt de l'antibiothérapie et 15 jours après l'arrêt des IPP.

En cas d'échec d'éradication, il faut éviter de prescrire des antibiotiques déjà administrés précédemment. Si le patient n'a pas reçu de clarithromycine, celle-ci peut lui être prescrite pour une durée de 14 jours en combinaison avec 2 autres antibiotiques, l'amoxicilline et le métronidazole. Sinon, le traitement de seconde ligne qui est proposé consiste en une quadrithérapie à base de sels de bismuth nommée PYLERA[®], regroupant dans une même capsule les sels de bismuth, la tétracycline et le métronidazole, associé à un IPP (oméprozole). Une étude européenne a montré un taux d'éradication de 93% en réponse à la quadrithérapie prescrite en deuxième ligne chez des patients traités en première ligne par une trithérapie à base de clarithromycine (Lamarque *et al.*, 2017).

Enfin, en cas de multi-résistance bactérienne chez des patients en échec d'une quadrithérapie à base de bismuth, la prescription de rifabutine peut être envisagée.

Ces traitements antibiotiques peuvent entraîner des effets indésirables qui peuvent être sévères et la prescription d'antibiotiques doit être décidée suivant le rapport bénéfice/risque du traitement. Il est à noter que l'éradication de *H. pylori* peut stopper l'évolution de la gastrite chronique vers l'adénocarcinome gastrique et même induire une régression de l'atrophie chez des patients ayant développé des lésions cancéreuses (Lu and Li, 2014; Ford *et al.*, 2015).

II. L'adénocarcinome gastrique

1. Epidémiologie

L'adénocarcinome gastrique est le cinquième cancer le plus fréquent dans le monde après les cancers du poumon, du sein, le cancer colorectal et celui de la prostate (WHO, 2012). Il est plus fréquent chez les hommes que chez les femmes, avec un ratio de 2 pour 1, en particulier pour le type intestinal. L'âge typique au moment du diagnostic est de 60 ans, mais il est diagnostiqué de plus en plus tôt, dès 40 ans (Ajani *et al.*, 2017).

C'est la troisième cause de mortalité par cancer dans le monde avec un taux de survie à 5 ans de 25 à 30%. Cependant, certains pays à très forte prévalence d'*H. pylori* tels que le Japon, la Chine et la Corée du Sud (Fock, 2014), ont mis en place une stratégie de détection précoce du cancer gastrique, associé à un taux de survie supérieur à 95%. En revanche, lorsque celui-ci est détecté tardivement à un stade avancé, la médiane de survie passe alors à 9-10 mois (Ajani *et al.*, 2017).

En 2012, un adénocarcinome gastrique a été diagnostiqué chez environ 951 000 personnes et a entraîné la mort de 723 000 personnes dans le monde (Torre *et al.*, 2015). En général, les taux d'incidence les plus élevés sont en Asie de l'Est (en particulier en Corée, en Mongolie, au Japon et en Chine), en Europe centrale et orientale et en Amérique du Sud. Les taux d'incidence les plus bas sont ceux retrouvés en Amérique du Nord et dans la plupart des régions d'Afrique (Figure 9) (Torre *et al.*, 2015). Plus de 70% des cancers gastriques surviennent dans les pays en voie de développement.

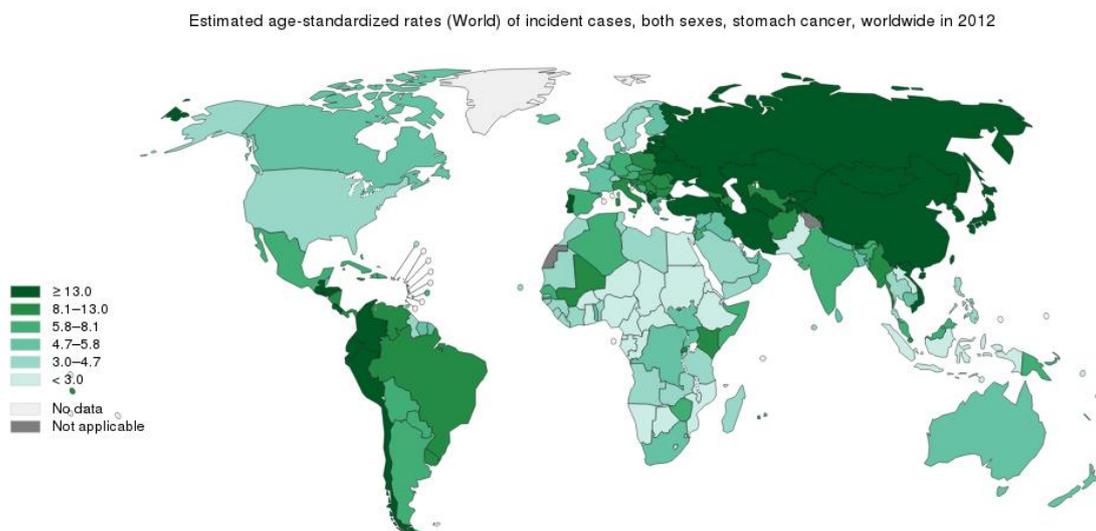


Figure 9 : Incidence mondiale estimée du cancer gastrique en 2012.

Estimation normalisée par rapport à l'âge, hommes et femmes confondus. D'après (WHO, 2012)

2. Facteurs de risque

Le cancer gastrique est une maladie multifactorielle dont les facteurs de risques peuvent être répartis en trois catégories : les facteurs environnementaux, les causes infectieuses et les prédispositions génétiques.

Facteurs environnementaux. Les habitudes alimentaires et le style de vie ont une répercussion sur le risque de cancer gastrique. L'augmentation de l'apport en sel (supérieure à 10g par jour), la nourriture fumée, le tabagisme et la consommation d'alcool sont associés à des augmentations modestes du risque de cancer gastrique, tandis que la consommation de fruits et les légumes et l'apport en vitamine C réduisent les risques (Shikata *et al.*, 2006; Tsugane and Sasazuki, 2007; Shikata *et al.*, 2008).

Causes infectieuses. L'infection chronique par *H. pylori* est le plus grand facteur de risque de cancer gastrique non-cardia (Parsonnet *et al.*, 1991), c'est pourquoi dès 1994, l'Organisation Mondiale de la Santé a classé *Helicobacter pylori* comme carcinogène de classe I, c'est-à-dire entraînant un risque de cancer certain chez l'homme. L'étude Eurogast-EPIC a révélé que 93,2% des patients atteints d'adénocarcinome gastrique étaient positifs pour une infection à *H. pylori* (González *et al.*, 2012). L'éradication de *H. pylori* diminue significativement le risque de développer un cancer gastrique (Lee *et al.*, 2016). Une simulation réalisée sur la population chinoise a conclu que le dépistage et le traitement de *H. pylori* à l'âge de 20 ans réduirait le risque moyen de cancer à vie de 14,5% chez les hommes et de 26,6% chez les femmes (Fock, 2014).

Par ailleurs, il a également été montré que l'infection par le virus Epstein-Barr peut être associée au cancer gastrique (Shibata and Weiss, 1992). En effet, celui-ci a été retrouvé chez 8,7% des patients atteint de cancer gastrique (Murphy *et al.*, 2009). L'infection par le virus Epstein-Barr causerait des méthylations aberrantes au niveau de l'ADN, inhibant ainsi la transcription de gènes suppresseurs de tumeurs dans des stades précoces de la carcinogenèse gastrique. Ainsi, le virus pourrait exacerber le développement de l'adénocarcinome gastrique lié à *H. pylori* (Zhao *et al.*, 2013; Yau *et al.*, 2014).

Prédispositions génétiques. La plupart des cas de cancer gastrique sont sporadiques et résultent d'une interaction complexe entre des facteurs génétiques et des facteurs de risque environnementaux. Les anomalies génétiques acquises peuvent résulter de l'instabilité chromosomique, de l'instabilité des microsatellites, des polymorphismes fonctionnels à un seul

nucléotide, des modifications du profil épigénétique et du profil d'expression des microARN (miRNA) qui affectent profondément l'expression des gènes en aval (McLean and El-Omar, 2014).

Bien que la majorité des cancers gastriques soient sporadiques, 10% des cas de cancers gastriques sont familiaux et associés à la présence de mutations héréditaires, identifiées dans 1 à 3% des cas. Les différents types de cancers gastriques familiaux sont présentés dans le Tableau 1.

Tableau 1 : Types de cancers gastriques familiaux. D'après (Setia *et al.*, 2015)

Syndromes	Genes	Cases associated with mutation, %	Inheritance	Gastric cancer risk, %
Hereditary diffuse gastric cancer syndrome	<i>CDH1</i>	45	Autosomal dominant	56–70
Gastric adenocarcinoma and proximal polyposis syndrome	Implicated gene unknown	Not determined	Autosomal dominant	Not determined
Hereditary nonpolyposis colon cancer	<i>MLH1, MSH2, MSH6, PMS2</i>	<i>MSH2</i> , ~60; <i>MLH1</i> , ~30; <i>PMS2, MSH6, TGFBR2</i> , and <i>MLH3</i> , ~10	Autosomal dominant	2–30
Peutz-Jeghers syndrome	<i>STK11</i>	70	Autosomal dominant	29
Juvenile polyposis	<i>SMAD4, BMPR1A</i>	<i>SMAD4</i> , 4–20; <i>BMPR1A</i> , 20–25	Autosomal dominant	21
Familial breast cancer	<i>BRCA1, BRCA2</i>	—	Autosomal dominant	5.5 2.6
Li-Fraumeni syndrome	<i>TP53</i>	70	Autosomal dominant	3.1–4.9
Familial adenomatous polyposis	<i>APC</i>	≤90	Autosomal dominant	2.1–4.2
MYH-associated polyposis	<i>MYH</i>	~99	Autosomal recessive	Very low

The rare familial intestinal gastric cancer, ataxia telangiectasia, and xeroderma pigmentosum are not included in this table.

3. Classification du cancer gastrique

a. Classification histologique

Les tumeurs gastriques peuvent être classées selon leur localisation. Les tumeurs du cardia sont localisées au niveau de la partie proximale de l'estomac et sont rarement liées à l'infection par *H. pylori* mais plutôt à la prise de poids, au reflux gastro-oesophagien et à l'œsophage de Barrett. Leur incidence est en augmentation (Fang *et al.*, 2015). Les tumeurs distales (non-cardia) sont situées au niveau du corps ou de l'antrum gastrique, et sont liées à l'infection par *H. pylori*. Leur incidence est en diminution.

D'un point de vue histologique, il existe 2 principaux systèmes de classification des adénocarcinomes gastriques : la classification de Laurén et celle de l'OMS. Le système de l'OMS, mis à jour en 2010, reconnaît quatre catégories principales d'adénocarcinomes gastriques: tubulaire, papillaire, mucineux et faiblement cohésif, ainsi que la possibilité de carcinomes mixtes lorsque les tumeurs présentent des composants des quatre groupes principaux. La classification de Laurén décrite en 1965 et basée sur l'analyse de 1344 cas de cancers gastriques, est la classification la plus largement utilisée (Lauren, 1965). Elle décrit deux types d'adénocarcinomes gastriques : le type intestinal et le type diffus (Figure 10).

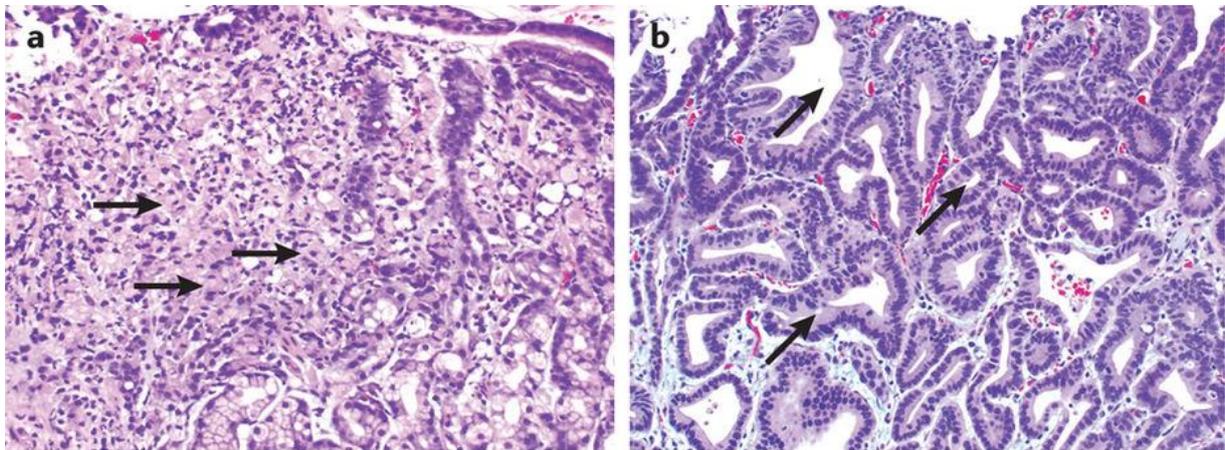


Figure 10 : Classification histologique de l'adénocarcinome gastrique.

a. Type diffus avec des cellules isolées les unes des autres. Les flèches indiquent les « signet-ring cells » ou bague à chaton. Grossissement x30. b. Type intestinal. Les flèches montrent les glandes de type intestinal formées par les cellules tumorales. Grossissement x40. D'après (Ajani *et al.*, 2017).

i) L'adénocarcinome gastrique de type intestinal

L'adénocarcinome gastrique de type intestinal est caractérisé par la formation de glandes présentant des caractéristiques de la muqueuse intestinale, avec ou sans la production de mucines. Son développement se produit généralement à un âge tardif et prédomine chez les hommes (Lauren, 1965). Il évolue selon une série bien définie d'étapes histologiques, 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* (Correa *et al.*, 1975). Les différentes étapes de cette cascade sont : la gastrite chronique superficielle, la gastrite atrophique, la métaplasie intestinale, la dysplasie et enfin l'adénocarcinome (Correa *et al.*, 1975; Peek and Blaser, 2002) (Figure 11).

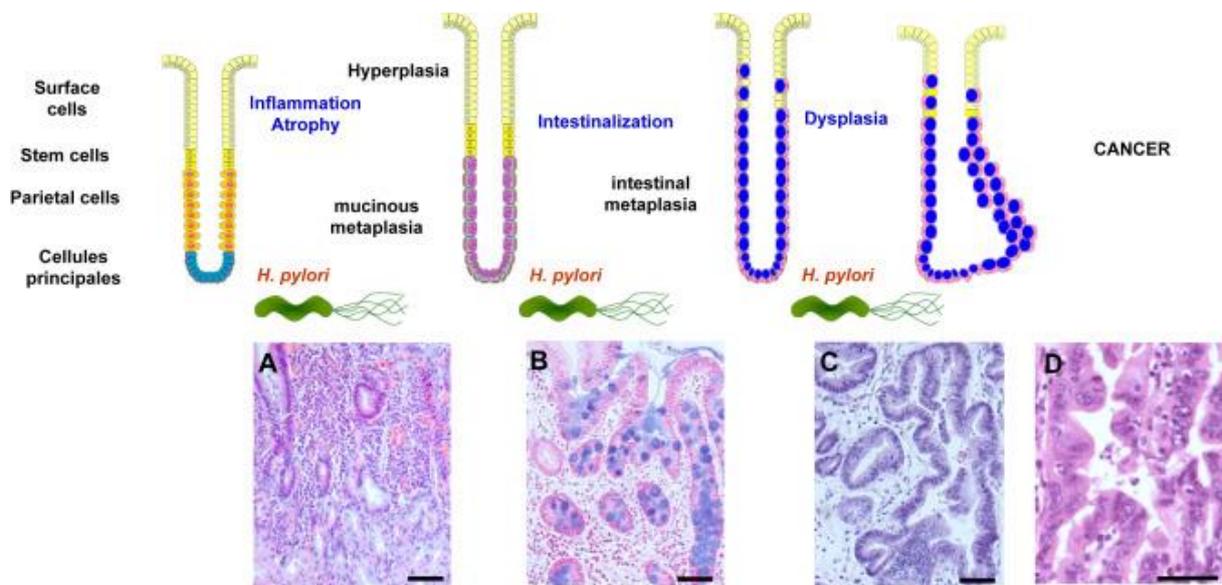


Figure 11 : Cascade de lésions induites par *H. pylori* conduisant à l'adénocarcinome gastrique de type intestinal.

Lors de la gastrite aiguë, l'épaisseur de la muqueuse augmente (hyperplasie). A. La gastrite chronique induit une dilatation des glandes et peut évoluer en gastrite atrophique avec une perte des cellules pariétales et des glandes gastriques. B. La métaplasie intestinale correspond à l'acquisition d'un phénotype intestinal avec l'apparition des cellules caliciformes. C. La métaplasie intestinale peut évoluer en dysplasie caractérisée par des glandes de formes et de taille irrégulières. D. L'adénocarcinome gastrique est caractérisé par une invasion du stroma par les cellules néoplasiques. D'après (Mégraud *et al.*, 2015)

L'atrophie gastrique. L'inflammation chronique de la muqueuse gastrique conduit à la perte des propriétés des glandes gastriques et à une réduction des fonctions sécrétoires du fait de la perte des cellules principales et pariétales. La perte du tissu glandulaire normal est la première étape reconnaissable, spécifique de la cascade précancéreuse. Les sites d'atrophies sont situés dans la muqueuse de l'antrum gastrique et du corps, et ils s'étendent avec le temps (Dixon *et al.*, 1996).

La métaplasie intestinale. Cette lésion correspond au remplacement des cellules épithéliales gastriques par des cellules de type intestinal. Elle est caractérisée par la présence au niveau de la glande gastrique de cellules caliciformes responsables de la production du mucus (ou « goblet cells »), d'entérocytes assurant la fonction d'absorption, et de cellules de Paneth impliquées dans la défense vis-à-vis des pathogènes présents dans la lumière de l'intestin (Jass and Filipe, 1981; Correa and Piazuolo, 2012). L'atrophie et la métaplasie progressent simultanément. On peut donc distinguer le premier stade où la métaplasie intestinale se développe, avec encore la présence de cellules gastriques. Ce stade est caractérisé par l'expression de marqueurs

spécifiques de l'épithélium gastrique tel que l'expression de la mucine 5AC (Muc5AC) et l'expression de marqueurs spécifiques de l'épithélium intestinal tels que la mucine 2 (Muc2) (İlhan *et al.*, 2010) et Cdx2, un facteur de transcription impliqué dans la différenciation intestinale (Barros *et al.*, 2012). Le second stade est caractérisé par la perte des cellules épithéliales gastriques et la présence des cellules de type intestinal, avec l'expression des marqueurs intestinaux. Ce changement d'expression des mucines entraîne une élimination spontanée de *H. pylori*, capable d'infecter les cellules muqueuses de type gastrique exprimant Muc5AC mais pas les cellules muqueuses intestinales exprimant Muc2. Cette transition peut représenter le point de non-retour, au-delà duquel les traitements d'éradication de *H. pylori* ne diminuent plus autant le risque de cancer gastrique (Watari *et al.*, 2014).

La dysplasie. La dysplasie est caractérisée par la perte de l'organisation architecturale des glandes qui deviennent irrégulières (taille, forme et orientation cellulaire). On observe également un élargissement des glandes gastriques, une atypie des noyaux et une distorsion au niveau glandulaire.

L'adénocarcinome invasif. Cette dernière étape est caractérisée par l'invasion des cellules néoplasiques dans le stroma environnant grâce à l'acquisition de la capacité de dégradation de la matrice stromale par les cellules néoplasiques (Correa and Piazuelo, 2012).

ii) L'adénocarcinome gastrique de type diffus

L'adénocarcinome gastrique de type diffus est composé de cellules faiblement cohésives, ne formant pas de structure glandulaire et n'est pas associé à une métaplasie intestinale. La perte de cohésion entre les cellules épithéliales rencontrée dans le type diffus est liée à une perte de fonction de la E-cadhérine, une protéine d'adhésion impliquée dans la cohésion cellulaire des cellules épithéliales. Il a été montré que des méthylations inhibitrices du promoteur de la E-cadhérine étaient induites par l'infection par *H. pylori*, entraînant une diminution de son expression (Perri *et al.*, 2007). Des mutations inactivatrices sur le gène *cdh-1* codant pour la E-cadhérine peuvent être associées au cancer gastrique diffus héréditaire (HDGC) comme mentionné précédemment (Tableau 1) (Setia *et al.*, 2015). Les porteurs de cette mutation présentent un risque supérieur à 70% de développer un cancer gastrique.

Les cellules cancéreuses de type diffus contiennent de la mucine intracytoplasmique repoussant le noyau en périphérie de la cellule et sont connues sous le nom de « signet ring

cell » ou bague à châton (Figure 10). L'adénocarcinome gastrique de type diffus affecte plus fréquemment les personnes plus jeunes et touche autant les hommes que les femmes. Contrairement au type intestinal, l'adénocarcinome de type diffus est réparti de manière relativement homogène à travers le monde et son incidence est en augmentation (Crew and Neugut, 2006).

b. Classification moléculaire

Le cancer gastrique présente une forte diversité moléculaire conduisant à différentes anomalies génétiques et épigénétiques. Afin de déterminer une classification moléculaire robuste du cancer gastrique, « The Cancer Genome Atlas » (TCGA) a mené une étude à grande échelle sur 295 tumeurs primaires d'adénocarcinomes gastriques. Chaque échantillon a été analysé par différentes techniques : analyse du nombre de copie chromosomique, séquençage du génome, profil des méthylations de l'ADN, séquençage des ARN messagers, séquençage des microARN. Ceci a permis de proposer une classification moléculaire divisant le cancer gastrique en quatre sous-types : les tumeurs positives pour le virus d'Epstein-Barr (EBV+), les tumeurs présentant une forte instabilité microsatellite (MSI-high), les tumeurs génomiquement stables (GS), et les tumeurs présentant une instabilité chromosomique (CIN) (Figure 12a) (Cancer Genome Atlas Research Network, 2014).

Cependant, les données cliniques n'ont pas été incluses dans les analyses et la signification pronostique des divers sous-types n'a pas pu être bien établie.

Un autre groupe, l'« Asian Cancer Research Group » (ACRG), a analysé 300 tumeurs primaires de cancer gastrique pour décrire quatre sous-types moléculaires incluant des informations sur la progression de la maladie et le pronostic : les tumeurs présentant une stabilité des microsatellites avec le gène *tp53* non muté (MSS/TP53⁺), les tumeurs présentant une forte instabilité microsatellite (MSI-high), les tumeurs présentant une stabilité des microsatellites et qui expriment les marqueurs de la transition épithélio-mésenchymateuse (MSS/EMT), les tumeurs présentant une stabilité des microsatellites avec le gène *tp53* muté (MSS/TP53⁻) (Figure 12b) (Cristescu *et al.*, 2015). Le sous-typage ACRG a généralement validé les résultats de la TCGA. Il présente également des données pronostiques très utiles pour chaque groupe.

Très récemment Sohn *et al.* ont développé un modèle prédictif à partir des données de la TCGA et l'association de chaque sous-type avec la survie et le bénéfice d'une chimiothérapie adjuvante a été testée dans deux autres cohortes de patients. Ainsi le sous-type EBV est associé au meilleur pronostic et le sous-type GS est associé au pire pronostic. Les patients avec le sous-type CIN ont eu le plus grand bénéfice de la chimiothérapie adjuvante et ceux avec le sous-type GS ont eu le moins de bénéfices de la chimiothérapie adjuvante (Sohn *et al.*, 2017).

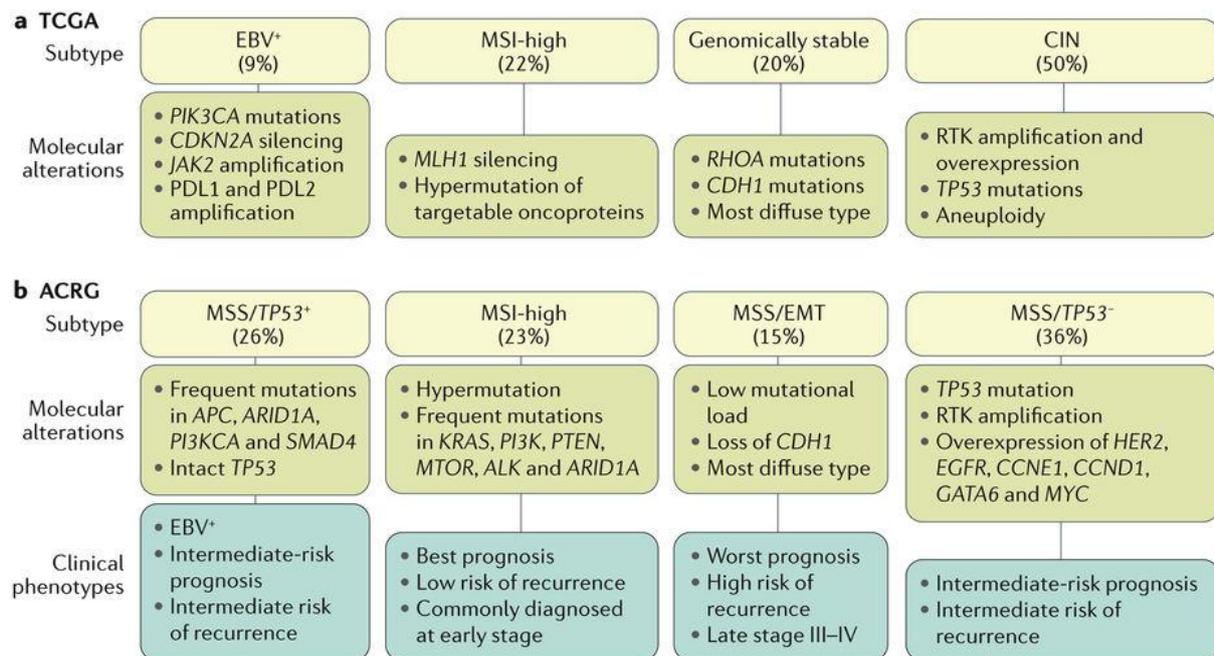


Figure 12 : Classification moléculaire du cancer gastrique selon « The Cancer Genome Atlas » (TCGA) et l'« Asian Cancer Research Group » (ACRG).

Le TCGA et l'ACRG ont identifié quatre sous-types moléculaires de cancer gastrique basés sur l'analyse de 295 (pour le TCGA) et de 300 (pour le ACRG) tumeurs primaires d'adénocarcinomes gastriques. Les altérations moléculaires propres à chaque sous-type sont indiquées. EBV : Epstein-Barr Virus ; MSI : Microsatellite instability ; MSS : Microsatellite stable ; CIN : Chromosomal instability. D'après (Ajani *et al.*, 2017)

Enfin, Wang *et al.* ont effectué le séquençage du génome entier sur 100 tumeurs et 100 échantillons de tissus sains, et ont analysé le nombre de copies d'ADN, l'expression des gènes et le profil de méthylation. Ils ont trouvé des perturbations génétiques et épigénétiques spécifiques aux sous-types et des signatures mutationnelles uniques. Les auteurs ont trouvé 3,5 millions de mutations somatiques, dont près de 18 000 prédisaient une altération des protéines. Les tumeurs MSI sont celles qui possèdent le plus de SNP (« single-nucleotide polymorphism »). Parmi les tumeurs MSS, les tumeurs de type diffus présentent les plus faibles quantités de SNP et de

délétions, qui augmentent significativement avec l'âge avancé de l'individu. Ils ont également retrouvé des mutations sur des gènes pilotes déjà connus (*TP53*, *ARID1A*, *CTNNB1* et *CDH1*) et ont identifié de nouvelles mutations sur d'autres gènes (*MUC6*, *RNF43*, *CTNNA2*, *GLI3*, *ELF3*, *ZIC4*, *TGFBR2*, *ACVR2A*, *DCLK1*, *THBS1*, *SMAD4* et *RHOA*). Plus particulièrement, ils ont trouvé des mutations du gène *RHOA* dans 14,3% des tumeurs de type diffus mais pas dans les tumeurs de type intestinal. Ces résultats permettent d'établir un profil génétique du cancer gastrique et le développement de thérapies ciblées (Wang *et al.*, 2014).

4. Diagnostic

Le développement du cancer gastrique, est généralement un processus lent qui peut prendre des décennies à se développer ; il reste généralement asymptomatique jusqu'à un stade avancé. Des symptômes peuvent ensuite apparaître et les patients peuvent présenter une perte de poids, une anémie, des vomissements récurrents, une dysphagie, une dyspepsie, une satiété précoce et de la douleur. Le diagnostic se fait alors au cours d'une endoscopie avec le prélèvement de biopsies afin d'effectuer une analyse histologique. Il est recommandé d'effectuer deux biopsies au niveau du corps, deux au niveau de l'antrum et une au niveau de l'incisure angulaire. Une fois le diagnostic de cancer gastrique établi, le stade d'avancement du cancer est évalué par des examens complémentaires dont un scanner de la poitrine, de l'abdomen et du bassin. Lors de l'endoscopie, la taille, la localisation, la forme et la rigidité de la tumeur sont enregistrées ainsi que la distance entre les frontières de la tumeur et le cardia et l'antrum. La profondeur de l'invasion tumorale est déterminée en combinant les résultats de l'endoscopie, de l'échographie endoscopique et du scanner. L'échographie endoscopique est également utile pour identifier les ganglions lymphatiques péri-gastriques de taille anormale et, le cas échéant, la présence de métastases sera confirmée par ponction. Toutes les informations recueillies vont permettre de déterminer le stade d'avancement du cancer et de définir la meilleure prise en charge possible pour le patient (Smyth *et al.*, 2016).

Une autre approche complémentaire consiste à quantifier certains biomarqueurs dans le sérum des patients, tels que le pepsinogène (PGI). Il existe deux types de pepsinogènes, le pepsinogène I et le pepsinogène II. Le développement de la gastrite atrophique entraîne une réduction de la sécrétion du PGI alors que la concentration dans le sérum du PGII reste relativement constante. Ainsi, le rapport PGI/PGII peut être utilisé comme indicateur de l'atrophie gastrique (Watabe *et al.*, 2005).

Il en est de même pour la ghréline, une hormone digestive sécrétée par la muqueuse gastrique. L'inflammation chronique et l'atrophie gastrique dues à *H. pylori* entraînent une réduction de la production de ghréline et ainsi sa concentration sérique se trouve diminuée, indiquant un fort risque de cancer gastrique (Murphy *et al.*, 2011).

5. Prise en charge du patient

Une fois le diagnostic établi, une commission pluridisciplinaire composée de chirurgiens, oncologues, pathologistes, etc., se réunit afin de définir la meilleure approche pour traiter le patient (Figure 13). Malheureusement, comme il n'existe pas de thérapie ciblée, à l'exception des cas de patients surexprimant HER-2, celle-ci fait appel à de la chirurgie et à des chimiothérapies conventionnelles.

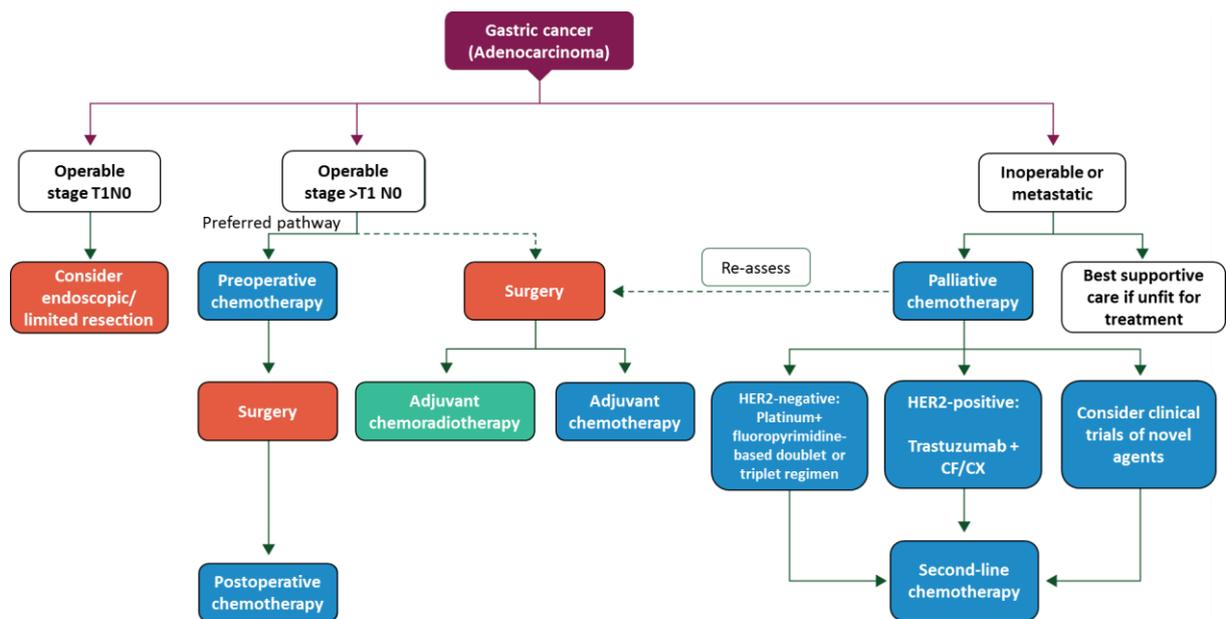


Figure 13 : Arbre décisionnel du traitement du cancer gastrique.

HER2 : « human epidermal growth factor receptor » ; CF : cisplatine et 5-fluorouracile ; CX : cisplatine et capecitabine. D'après (Smyth *et al.*, 2016)

La résection chirurgicale de la tumeur, par endoscopie, est possible à des stades précoces lorsque la zone tumorale est localisée au niveau de la muqueuse avec une taille inférieure à 2 cm et sans ulcération. Celle-ci peut alors être curative (Figure 13). Pour des stades plus avancés, une chirurgie plus invasive est requise afin d'enlever la zone où est située la tumeur, pouvant aller jusqu'à la gastrectomie. La chirurgie permet également de retirer les ganglions lymphatiques envahis par des métastases.

La chirurgie peut être curative mais la majorité des patients ont des rechutes. Ainsi, la prise en charge du patient comprend la plupart du temps une chimiothérapie pré- et/ou post-opératoire (Figure 13). Un essai clinique anglais (UK MRC MAGIC) a démontré une amélioration du taux de survie à 5 ans de 23 à 36% chez les patients traités avec six cycles (trois en pré-opératoire et trois en post-chirurgie) de chimiothérapie ECF : epirubicine, cisplatine et 5-fluorouracile (5-FU), en comparaison avec les patients traités uniquement par chirurgie (Smyth *et al.*, 2016). De nombreuses études cliniques ont testé différentes associations de chimiothérapies conventionnelles telles que : ECX (epirubicine, cisplatine, capecitabine), EOX (epirubicine, oxaliplatine, capecitabine) ou encore FLOT (fluorouracile, leucovorine, oxaliplatin, docetaxel). Cette dernière présenterait un taux de réponse supérieur aux chimiothérapies ECX et EOX (15,6% *versus* 5,8%).

Dans certains cas, chez les patients n'ayant pas reçu de chimiothérapie pré-opératoire, il est recommandé de recourir à une radiothérapie post-opératoire ou à un traitement adjuvant tel que le paclitaxel, un antinéoplasique (Figure 13). En revanche, il a été montré que si le patient a reçu une chimiothérapie pré-opératoire, alors l'utilisation de la radiothérapie en post-opératoire ne présente pas de bénéfice (Smyth *et al.*, 2016).

Dix à 15% des cas de cancers gastriques, de sous-type moléculaire CIN (Figure 12), présentent une amplification génique du gène codant pour HER2 (« human epithelial growth factor receptor 2 ») (Smyth *et al.*, 2016). Cet oncogène localisé sur le chromosome 17q21, fait partie de la famille de l'EGF (« human epidermal growth factor ») et code pour un récepteur transmembranaire à activité tyrosine kinase régulant la prolifération cellulaire, la différenciation et la survie cellulaire (Hu *et al.*, 2012). L'amplification génique de HER2 a tout d'abord été découverte dans le cancer du sein, avant d'être décrite également dans le cancer de l'estomac. La surexpression de HER2 est plus fréquente dans le type intestinal et dans les tumeurs situées au niveau du cardia et de la jonction gastro-œsophagienne (24-35%) que dans le reste de l'estomac (9,5-21%). Un récent essai clinique (ToGA) a montré que l'anticorps monoclonal anti-HER2, nommé le Trastuzumab ou Herceptine, quand il est combiné avec la chimiothérapie (cisplatine/fluoropyrimidine), améliore la réponse au traitement et peut prolonger

la survie globale des patients (Figure 13) (Hu *et al.*, 2012). Ainsi, est-il recommandé de déterminer le statut HER2 au moment du diagnostic afin de pouvoir traiter par Herceptine les patients présentant une surexpression du récepteur HER2.

Le traitement d'un adénocarcinome gastrique fait appel à de la chirurgie et à des chimiothérapies conventionnelles. Il n'y a actuellement pas de thérapies spécifiques disponibles, exceptée l'Herceptine pour seulement 10 à 15% des cas. Actuellement, le taux de survie à 5 ans est faible (25 à 30%). Le défi actuel consiste à chercher et à développer des thérapies plus efficaces, moins lourdes pour le patient (moins d'effets secondaires), qui permettront d'améliorer l'efficacité des chimiothérapies utilisées. Dans cette optique, une partie de mon projet de thèse a été de déterminer si la metformine pouvait être un adjuvant intéressant dans le traitement du cancer gastrique.

6. Modèles d'étude du cancer gastrique

Il existe différents modèles d'étude de la carcinogenèse gastrique : les cellules primaires et les lignées cancéreuses gastriques *in vitro* et des modèles animaux, principalement la souris, *in vivo*.

a. Modèles d'étude *in vitro*

Les cellules épithéliales gastriques primaires représentent un modèle intéressant et pertinent pour étudier les effets de l'infection par *H. pylori* (Schlaermann *et al.*, 2016). Cependant leur culture reste difficile : accès à un échantillon de tissu sain ou de patient souffrant d'un cancer gastrique, sélection et purification du type cellulaire d'intérêt, culture limitée dans le temps (dégénérescence des cellules, perte des propriétés cohésives...).

Par conséquent, les études *in vitro* sont communément réalisées sur des lignées cellulaires immortalisées ou des lignées cellulaires dérivées d'adénocarcinomes gastriques (Tableau 2). Même si elles sont déjà transformées, ces lignées cellulaires présentent les propriétés d'un épithélium prolifératif. C'est un modèle plus simple à mettre en place que les modèles *in vivo* et qui est accepté pour l'étude des aspects moléculaires de l'interaction hôte-pathogène et de la carcinogenèse gastrique (Barranco *et al.*, 1983; Motoyama *et al.*, 1986). De plus, ce modèle est intéressant pour détecter des drogues candidates dans le traitement du cancer avant d'en approfondir l'étude grâce à des modèles *in vivo*.

Tableau 2 : Lignées cellulaires de cancer gastrique disponibles dans le commerce

WT* : « Wild-Type »

Nom	Sexe/ âge	Origine	Sous-type	Morphologie	Caractéristiques génétiques
AGS	F/54	Estomac tumeur primaire	Intestinal	Epithéliale, adhérente, non- cohésive	Hyperploïde Mutations: <i>CDH1</i> (homozygote), <i>CTNNB1</i> (hétérozygote, gain de fonction), <i>KRAS</i> (hétérozygote), <i>PIK3CA</i> (hétérozygote)
MKN7	H/39	Métastase ganglionnaire	Très différencié (tubulaire)	Epithéliale, cohésive	Mutations: <i>TP53</i> , <i>APC</i> (silencieuse) Oncogènes: amplification de <i>c- erbB2</i>
MKN28	F/70	Métastase ganglionnaire	Moyennement différencié (tubulaire)	Epithéliale, cohésive Différenciation en cellule polarisée avec microvillosités	Mutations: <i>TP53</i> , <i>APC</i> (non- sens) Oncogènes: <i>bcl-2</i> surexprimé <i>CD44</i> non exprimé (promoteur hyperméthylé)
MKN45	F/62	Métastase hépatique	Faiblement différencié	Potentialité de différenciation	Mutations: <i>CDH1</i> (délétion au niveau de la jonction exon 6- intron 6) Oncogènes: amplification de <i>c- met</i> , faible expression de <i>bcl-2</i>
MKN74	H/37	Métastase hépatique	Intestinal	Epithéliale, cohésive	Oncogènes: <i>c-src</i> (forte activité kinase)
NCI- N87	H/?	Métastase hépatique	Intestinal	Epithéliale, cohésive Différenciation en cellule polarisée avec microvillosités	Diploïde Mutations: <i>TP53</i> (homozygote), <i>SMAD4</i> (homozygote) Oncogènes: <i>myc</i> , <i>erb2</i>

b. Modèles d'étude *in vivo*

i) Modèle de la gerbille de Mongolie

Le modèle de la gerbille de Mongolie est le seul modèle animal permettant le développement d'un adénocarcinome gastrique suite à une infection par *H. pylori*. Watanabe *et al.* ont été les premiers en 1998 à démontrer *in vivo*, qu'une infection chronique par *H. pylori* pouvait induire un adénocarcinome gastrique dans le modèle de la gerbille de Mongolie. Ils ont infecté oralement 55 gerbilles avec une souche de *H. pylori* exprimant CagA et VacA. Après 26 semaines, ils ont observé chez ces animaux une gastrite chronique sévère, des ulcères et une métaplasie intestinale. Après 62 semaines d'infection, 37% des animaux avaient développé un adénocarcinome avec une métaplasie intestinale (Watanabe *et al.*, 1998). Depuis, plusieurs études utilisant le même modèle ont confirmé ces résultats après 62 à 90 semaines d'infection (Hirayama *et al.*, 1999; Zheng *et al.*, 2004). Cependant, d'autres études n'ont pas confirmé le développement d'un adénocarcinome mais juste de gastrites, ulcères gastriques, ou lésions précancéreuses, même après 18 mois d'infection (Elfvin *et al.*, 2005). Ces différences dans les résultats peuvent être expliquées en partie par le fond génétique des gerbilles, leur microbiote et l'évaluation anatomo-pathologique réalisée (Elfvin *et al.*, 2005). Les différentes souches de *H. pylori* utilisées peuvent elles aussi participer à cette disparité.

Des modèles murins alternatifs ont par la suite été développés plus faciles à mettre en place, limitant l'utilisation de la gerbille de Mongolie.

ii) Modèles de souris non génétiquement modifiées

Les souris sont relativement résistantes à la colonisation de l'estomac par *H. pylori* (Zhang and Moss, 2012). Lee *et al.* ont réussi en 1997 à infecter des souris avec une souche de *H. pylori* isolée à partir d'une biopsie gastrique d'un patient infecté. Cette souche nommée SS1, pour « Sydney strain », exprime CagA et VacA et est capable de fortement coloniser la muqueuse gastrique de souris C57BL/6 et, dans une moindre mesure, celle des souris BALB/C, DBA/2 et C3H/He (Lee *et al.*, 1997). Par la suite d'autres souches de *H. pylori* ont été adaptées à la souris. Après plusieurs mois d'infection, *H. pylori* entraîne l'apparition d'une gastrite, plus ou moins sévère selon la souche, d'une atrophie et le développement d'un lymphome du MALT mais n'induit pas d'adénocarcinome gastrique (Lee *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2003).

iii) Modèles de souris génétiquement modifiées

Afin d'obtenir un modèle développant un adénocarcinome gastrique, différentes stratégies de souris transgéniques ont été développées. Les souris déficientes pour le TGF- β , p27 ou TFF2, ou surexprimant la gastrine (modèle INS-GAS) ou l'IL-1 β , et infectées par *H. pylori*, développent des lésions dysplasiques et un adénocarcinome gastrique (Fox *et al.*, 2007; Zhang and Moss, 2012; Ding *et al.*, 2016).

iv) Carcinogénèse chimique

L'apport alimentaire en sel et nitrate, combiné à une infection par *H. pylori*, peut augmenter le risque de développer un cancer gastrique. Il est ainsi possible de recourir à des agents chimiques carcinogènes tels que les composés N-nitrosés. La N-méthyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) a été la première nitrosamine utilisée par des chercheurs pour induire des tumeurs de l'estomac chez le rat. Le N-méthyl-N-Nitrosourea (MNU) a par la suite été développé comme carcinogène gastrique dans le modèle de la souris (Zhang and Moss, 2012; Ding *et al.*, 2016).

Ces différents modèles peuvent être utilisés pour étudier les conséquences histologiques, fonctionnelles et cellulaires d'une infection chronique de la muqueuse gastrique par *H. pylori* mais aussi pour tester l'efficacité de drogues agissant soit sur les lésions cancéreuses soit directement sur la bactérie comme cela a été le cas au cours de mes travaux de thèse.

v) Modèles permettant la greffe de matériel humain

Des modèles de souris immunodéficientes, permettant la greffe de cellules et tissus humains ont été développés (Tableau 3). La souche la plus utilisée pour réaliser les xéno greffes est la souche NSG ou NOD/SCID (« Nonobese Diabetic / Severe Combined Immunodeficiency »), caractérisée par un dysfonctionnement du système immunitaire adaptatif (défaut en lymphocytes T et B) et inné (défiance en cellules NK et défaut des cytokines), entraînant donc une incapacité à engendrer une réponse immunitaire (Shultz *et al.*, 2014). Ce modèle permet de réaliser des greffes de cellules tumorales humaines (lignées cellulaires immortalisées ou cellules primaires) et ainsi de tester l'efficacité de drogues anti-cancéreuses sur du matériel humain, au sein d'un organisme (Sausville and Burger, 2006).

Tableau 3 : Souches de souris immunodéficientes permettant de greffer des tumeurs humaines.
D'après (Shultz *et al.*, 2014)

Nom de la souche	Gène mutant	Lignées cellulaires	Tumeurs solides primaires
nudea ^a nu/nu	<i>Foxn1^{nu}</i>	+	+/-
C.B17- <i>scid</i> BALB/c- <i>scid</i>	<i>Prkdc^{scid}</i>	+	+
NOD- <i>scid</i> NOD- Rag1^{null}	<i>Prkdc^{scid} Rag1^{tm1Mom}</i>	++	++
NSG	<i>Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}</i>	+++	+++

La greffe peut être orthotopique, mais est techniquement assez difficile à réaliser. Ainsi, la greffe en sous-cutanée, ou xénogreffe, est plus largement utilisée, bien que celle-ci crée un compartiment artificiel qui limite la génération de métastases, contrairement à la greffe orthotopique (Hoffman, 2015). Cependant la xénogreffe sous-cutanée permet la mesure de la croissance des tumeurs formées après la greffe, ce qui représente un bon indicateur d'efficacité des traitements testés.

Un modèle de xénogreffes a été mis au point chez des souris NOD/SCID à partir de tissus obtenus chirurgicalement chez des patients atteints de cancer gastrique, que l'on appelle des « Patient-Derived gastric carcinoma Xenografts » ou PDXs. Bien que le pourcentage de prise de greffe soit modéré (24.2% (Choi *et al.*, 2016) et 34.1% (Zhu *et al.*, 2015)), ce modèle offre la possibilité de disposer et d'amplifier des tumeurs de patients, avec une bonne conservation des caractéristiques génétiques et histologiques au cours des passages par rapport à la tumeur primaire (Nguyen *et al.*, 2017). Ce modèle constitue un outil très pertinent pour les tests précliniques des médicaments anticancéreux et le développement de thérapies ciblées.

III. Les cellules souches et les cellules souches cancéreuses

1. Les cellules souches

a. Définition d'une cellule souche

Les cellules souches sont définies comme des cellules possédant la capacité à s'auto-renouveler et à générer des cellules matures d'un tissu particulier après différenciation (Reya *et al.*, 2001).

Les différents types de cellules souches sont classés en fonction de leur potentialité de différenciation. Au cours de l'embryogenèse, l'œuf fécondé ou zygote, issu de la fusion d'un ovule et d'un spermatozoïde est considéré comme totipotent, c'est-à-dire capable de générer toutes les cellules d'un organisme, y compris les annexes embryonnaires. La masse cellulaire interne du blastocyste, est formée par les cellules souches embryonnaires pluripotentes qui sont capables de produire toutes les cellules de l'organisme y compris les cellules germinales, et sont dites pluripotentes. Au cours du développement, les cellules souches pluripotentes de la masse cellulaire interne du blastocyste, sont de plus en plus restreintes dans leur potentiel de lignage et génèrent des cellules souches multipotentes spécifiques aux tissus. Ces cellules souches adultes multipotentes génèrent des cellules spécialisées, spécifiques d'un tissu, après différenciation. Elles sont retrouvées au sein de différents organes et sont responsables de l'homéostasie tissulaire (Reya *et al.*, 2001; Eckfeldt *et al.*, 2005).

L'auto-renouvellement est la division avec maintien de la multipotence et de l'état indifférencié. C'est l'une des propriétés les plus importantes des cellules souches, car elle permet de maintenir le contingent de cellules souches tout au long de la vie. Ainsi pour maintenir et réparer les tissus, les cellules souches adultes utilisent trois différents types de division cellulaire: 1) la division asymétrique, générant une cellule souche et une cellule progénitrice, 2) la division cellulaire générant deux cellules souches filles pour augmenter la population de cellules souches, ou 3) la division symétrique, sans auto-renouvellement, entraînant la génération de deux progéniteurs qui pourront se différencier en une ou plusieurs cellules spécialisées de l'organe (He *et al.*, 2009; Eckfeldt *et al.*, 2005; Vries *et al.*, 2010). Ces processus d'auto-renouvellement et de pluripotence sont très régulés par un ensemble de facteurs de transcription de « stemness », incluant Oct4, Sox2 et Nanog. Ces facteurs de transcription sont essentiels au maintien du phénotype des cellules souches embryonnaires pluripotentes (Boyer *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2015).

Les cellules souches existent *in vivo* dans un microenvironnement complexe, ou niche, composé de cellules somatiques différenciées et de matrice extracellulaire, ainsi que des cellules souches et de leur descendance. La niche fournit des facteurs qui maintiennent la capacité d'auto-renouvellement des cellules souches et empêchent leur différenciation (Eckfeldt *et al.*, 2005).

b. Les cellules souches gastriques

L'épithélium gastrique est un tissu dynamique présentant un taux d'auto-renouvellement rapide (cycles de 2 à 7 jours). Ce processus est soutenu par une sous-population de cellules souches adultes localisées au niveau des glandes gastriques, mais leur localisation dans la glande varie en fonction de la zone anatomique (corps ou antre/pylore).

Grâce à des techniques de radio-marquage et de microscopie électronique développées par Karam et Leblond en 1960, un groupe de petites cellules indifférenciées et sans granules, correspondant à des cellules souches/progénitrices multipotentes qui se divisent activement, a été identifié. Ces cellules sont localisées au niveau de l'isthme. L'isthme est situé dans le premier tiers de la glande gastrique au niveau du corps de l'estomac, en revanche il est situé dans le tiers inférieur de la glande gastrique dans l'antre de l'estomac (Figure 14). Les cellules souches vont constamment donner naissance à des cellules qui vont migrer vers la surface et vers le fond de la glande où elles vont se différencier en cellules matures de la glande gastrique (Karam and Leblond, 1993; Karam *et al.*, 2003).

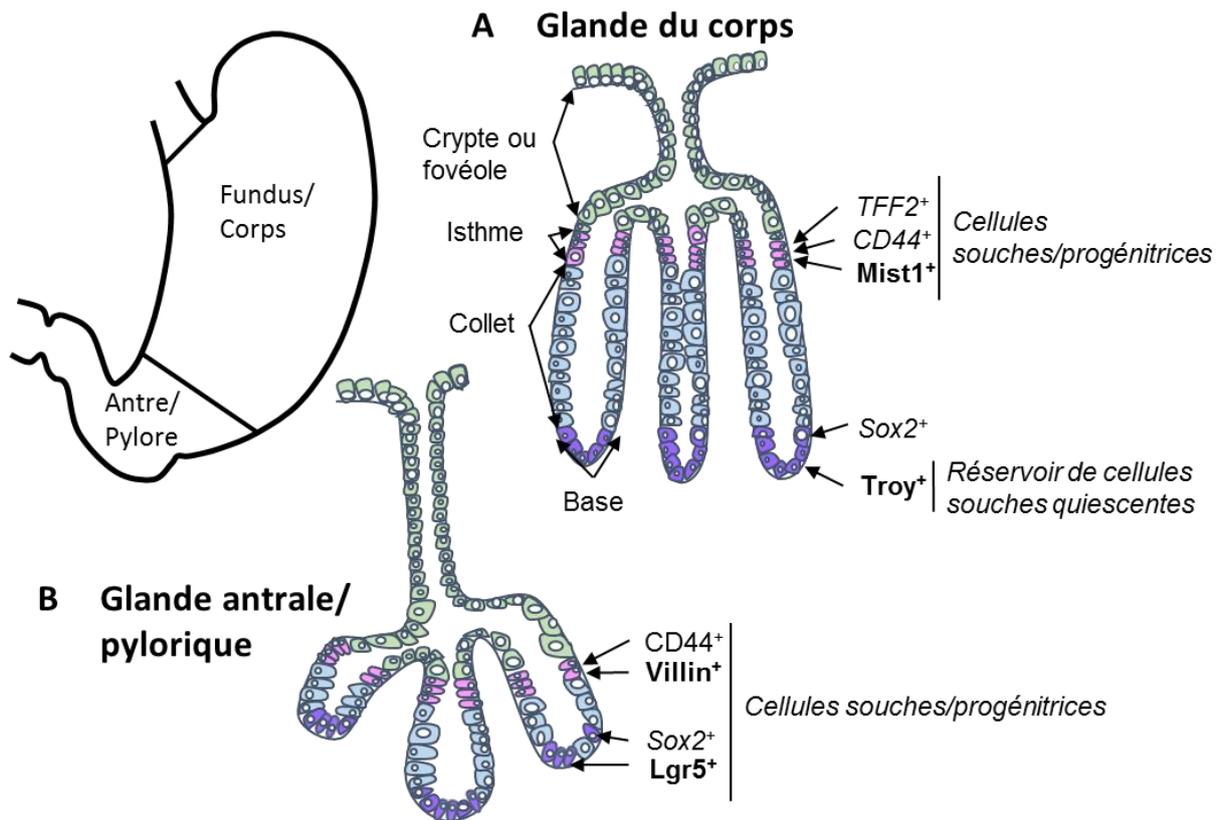


Figure 14 : Architecture des glandes gastriques et localisation des cellules souches/progénitrices gastriques.

(A) Glandes localisées au niveau du fundus et du corps de l'estomac. (B) Glandes localisées au niveau de l'antra et du pylore. Les marqueurs exprimés par les cellules souches/progénitrices sont indiqués en gras. D'après (Giraud *et al.*, 2017)

Plus tard, d'autres preuves de l'existence de cellules souches multipotentes dans les glandes gastriques de souris adultes ont été trouvées grâce à une stratégie de traçage de lignée induite par mutagenèse chimique. Bjerknes et Cheng ont utilisé le modèle de souris ROSA26, qui exprime le gène de la β -galactosidase (lacZ) dans tous les tissus. Ils ont utilisé un agent chimique mutagène pour induire des mutations aléatoires et inactiver le gène de la β -galactosidase. Si la cellule mutée est un progéniteur, toute sa descendance héritera de l'allèle non fonctionnel et sera donc non colorée et ainsi différente des cellules colorées voisines. Cela permet d'identifier les clones de cellules apparentées. Ainsi ont-ils démontré l'existence d'une population de cellules progénitrices capables de s'auto-renouveler, dans l'épithélium gastrique adulte (Bjerknes and Cheng, 2002).

D'autres techniques de traçage de lignées plus sophistiquées ont permis d'identifier des marqueurs spécifiques des cellules souches gastriques (Tableau 4 ; Figure 15) (Qiao and Gumucio, 2011). La coexistence d'une double population de cellules souches quiescentes et actives a été démontrée dans différents tissus. Il est supposé que ces deux populations ont des rôles complémentaires. Les cellules souches actives seraient responsables du renouvellement physiologique du tissu, tandis que les cellules souches quiescentes serviraient en cas de réparation tissulaire suite à des lésions (Li and Clevers, 2010).

Tableau 4 : Marqueurs des cellules souches gastriques identifiées par traçage de lignée.

Lgr5 : « Leucine-rich G protein-coupled receptor 5 », Tff2 : « trefoil factor family 2 », eR1 : « Runx1 enhancer element » D'après (Zhao *et al.*, 2015; Giraud *et al.*, 2017)

Marqueurs	Localisation	Caractéristiques des cellules souches
Villin	Partie inférieure des glandes antrales Isthme des glandes du corps	Réservoir de cellules souches quiescentes présentant un fort potentiel prolifératif après activation en cas de lésion de l'épithélium
Lgr5	Partie inférieure des glandes antrales	Fort potentiel de prolifération et de différenciation, responsable du renouvellement tissulaire physiologique
Sox2	Isthme et base des glandes du corps	Impliquées dans le renouvellement tissulaire physiologique
Tff2	Isthme des glandes du corps	Progéniteurs donnant naissance aux cellules du collet, aux cellules principales et pariétales
Troy	Base des glandes du corps	Cellules présentant une division cellulaire lente, et activée en cas de lésion tissulaire
Mist1	Partie inférieure des glandes du corps	Cellules principales quiescente « stem-like »
eR1	Isthme	Petite population de cellules principales quiescentes

2. Les cellules souches cancéreuses

Les cellules souches cancéreuses (CSC) correspondent à une sous-population au sein de la tumeur définie par : 1) des propriétés d'auto-renouvellement, 2) des propriétés de division et différenciation asymétrique donnant lieu à des cellules plus ou moins différenciées composant la masse tumorale, 3) l'expression de marqueurs spécifiques, 4) leur résistance aux chimiothérapies et radiothérapies, 5) leur capacité à former de nouvelles tumeurs. Elles sont donc responsables de la formation de métastases et des rechutes (Figure 15).

Toutes ces informations suggèrent que les stratégies thérapeutiques doivent reposer sur l'utilisation de thérapies conventionnelles ciblant les cellules tumorales, combinées à des thérapies capables de cibler spécifiquement les CSC.

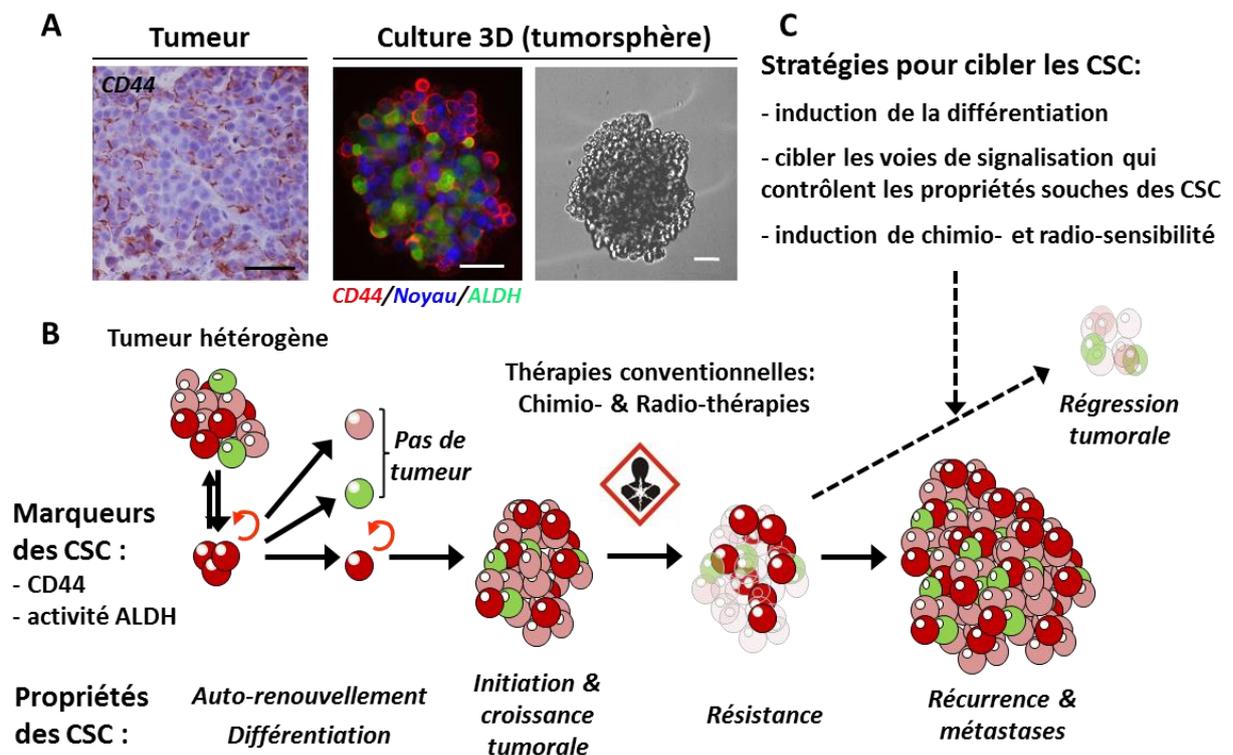


Figure 15 : Propriétés des cellules souches cancéreuses gastriques et stratégies thérapeutiques.

(A) Détection par immunohistochimie du CD44 sur une coupe de tumeur (panel gauche), et détection du CD44 et de l'activité ALDH sur des tumorsphères de la lignée cellulaire gastrique MKN45. Barre d'échelle : 50 μ m. (B) Propriétés des CSC. (C) Stratégies proposées pour cibler les CSC. D'après (Giraud *et al.*, 2017)

a. Concept de la cellule souche cancéreuse

L'auto-renouvellement et les capacités de prolifération des cellules souches sont critiques pour l'organisme. Des changements génétiques et épigénétiques peuvent entraîner la perte de contrôle des cellules sur leur prolifération, responsable d'une croissance cellulaire anormale. Pour qu'une cellule devienne cancéreuse, elle doit acquérir une série d'altérations cellulaires : autosuffisance des signaux de croissance, insensibilité aux signaux inhibiteurs de croissance, évasion de la mort cellulaire programmée, potentiel répliatif illimité, angiogenèse soutenue et capacité d'invasion des tissus et formation de métastases (Hanahan and Weinberg, 2000). Deux questions restent en suspens à propos de l'initiation des cancers : 1) quelle est la cellule à l'origine du cancer, qui acquiert les altérations génétiques et devient la première cellule tumorale ? ; 2) quelles sont la/les cellules responsables de la propagation du cancer après son initiation ?

Deux modèles sont proposés pour expliquer l'initiation et l'hétérogénéité tumorale : le modèle stochastique ou d'évolution clonale, et le modèle hiérarchique, ou de cellules souches cancéreuses (Figure 16) (Lobo *et al.*, 2007). Dans le modèle stochastique, toutes les cellules ont une probabilité égale d'acquérir une anomalie génétique conduisant à une prolifération incontrôlée, ou expansion clonale. De ce fait, toute cellule a la capacité d'initier une tumeur. L'instabilité génétique de ces cellules conduit à l'accumulation d'anomalies génétiques supplémentaires. Ainsi de nouvelles cellules tumorales peuvent-elles émerger. Si l'une d'entre elle présente un avantage sélectif par rapport aux cellules tumorales originales, alors cette nouvelle cellule tumorale devient le précurseur d'une nouvelle population dominante. Ce modèle explique l'hétérogénéité tumorale (Nowell, 1976). Ceci implique que pour traiter la tumeur, toutes les cellules tumorales doivent être éliminées, car chacune d'entre elle possède la capacité d'initier une nouvelle tumeur (Vries *et al.*, 2010).

Au contraire, dans le modèle de cellule souche cancéreuse (CSC), la croissance de la tumeur est initiée par une petite sous-population cellulaire possédant des propriétés de cellules souches (Figure 16) : longévité, possibilité infinie de proliférer, capacité à se différencier pour former une population cellulaire hétérogène. Ainsi les CSC sont-elles au sommet de la hiérarchie cellulaire tumorale. Ces cellules se divisent pour générer des CSC identiques (auto-renouvellement) et des progéniteurs qui se différencient en cellules tumorales phénotypiquement hétérogènes, et généralement moins prolifératives (Zhao *et al.*, 2015). Ce modèle implique de cibler par des thérapies spécifiques les CSC afin d'éradiquer la tumeur et de diminuer le risque de récurrence (He *et al.*, 2009; Vries *et al.*, 2010).

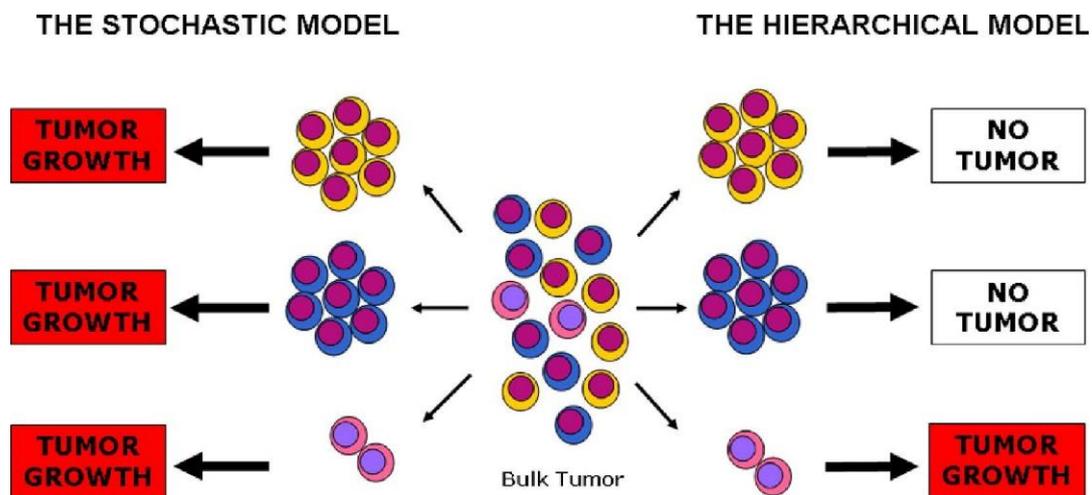


Figure 16 : Modèles stochastique et hiérarchique expliquant l'hétérogénéité tumorales

Le modèle stochastique ou d'évolution clonale soutient que toute cellule a la capacité d'initier une tumeur. Au contraire, dans le modèle hiérarchique ou de cellules souches cancéreuses, la croissance de la tumeur est initiée par une petite sous-population cellulaire possédant des propriétés de cellules souches. D'après (O'Brien *et al.*, 2009)

Enfin, Kreso et Dick ont proposé que les deux modèles puissent être intégrés dans un modèle plus complet, dans lequel des mutations avantageuses s'accumulent dans la population de CSC dans la tumeur à mesure qu'elle se développe, générant des sous-clones dont certains développent une capacité d'auto-renouvellement plus importante (Kreso and Dick, 2014). Des mutations pourraient également se produire et s'accumuler dans des cellules sans capacités initiatrices de tumeurs et leur conférer des propriétés de cellules souches. Ainsi ce modèle considère-t-il que les cellules initiatrices de tumeurs ne sont pas des entités statiques, mais capables d'évoluer. Ce modèle unifié intègre l'influence d'autres facteurs tels que l'épigénétique et le microenvironnement tumoral (Y. Song *et al.*, 2017).

b. Origines des cellules souches cancéreuses gastriques

Il est maintenant admis que le cancer est une maladie des CSC. Dans le cancer gastrique, les CSC peuvent dériver : i) des cellules souches gastriques, ii) de cellules dérivant de la moelle osseuse (BMDC pour « bone marrow-derived cells »), iii) de cellules épithéliales composant les glandes gastriques qui se dédifférencient (Figure 17).

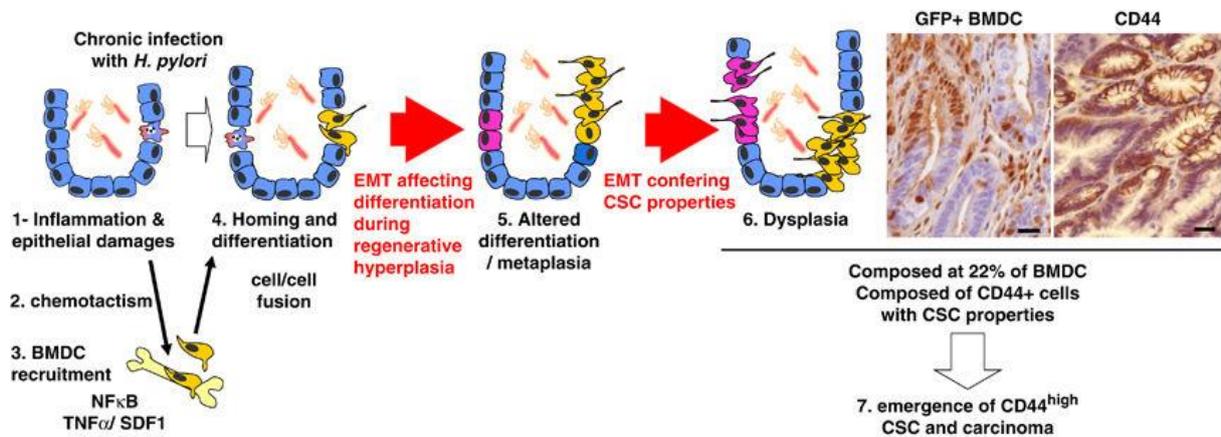


Figure 17 : Différentes étapes de la carcinogénèse gastrique induite par *H. pylori* et origine des cellules souches cancéreuses.

(1) L'infection chronique par *H. pylori* induit une inflammation chronique et des lésions de la muqueuse gastrique. (2) Ceci entraîne le recrutement par chimiotactisme, *via* l'activation de la voie du $\text{NF}\kappa\text{B}$ et (3) la sécrétion de chimiokines telles que le $\text{TNF}\alpha$ et le $\text{SDF1}\alpha$, de cellules dérivées de la moelle osseuse (BMDC pour « bone marrow-derived cells ») au sein de la muqueuse gastrique. (4) Une fois recrutées, ces cellules se différencient par la fusion cellule-cellule avec les cellules épithéliales gastriques locales, afin de pallier la défaillance des cellules souches gastriques et participer à la régénération tissulaire. (5) Le contexte d'infection et d'inflammation chronique dues à *H. pylori* induit une transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) et altère la régénération tissulaire et la différenciation des cellules souches locales et des BMDC, conduisant au développement d'une métaplasie intestinale puis (6) d'une dysplasie. (7) L'EMT induit l'émergence de cellules exprimant le CD44 et possédant des propriétés de cellules souches cancéreuses (CSC), à l'origine du développement d'un adénocarcinome gastrique. Immunohistochimies réalisées sur des coupes d'estomacs de souris C57BL/6 infectées par *H. pylori* et marquant les BMDC $\text{GFP}^{\text{+}}$ et les cellules $\text{CD44}^{\text{+}}$. Barre d'échelle : 20 μm . D'après (Bessède *et al.*, 2015)

i) Les CSC proviennent d'une transformation maligne des cellules souches gastriques

Sur les 3 hypothèses proposées concernant l'origine des CSC, celle selon laquelle les CSC peuvent dériver d'une cellule souche gastrique ayant subi une mutation est la plus probable, car elle fait intervenir un nombre moins important d'évènements. Les premiers éléments à l'origine de cette hypothèse ont été apportés par McDonald *et al.* qui ont montré, par la détection d'une mutation dans l'ADN mitochondrial, que plusieurs glandes gastriques voisines avaient été entièrement colonisées par une même cellule (McDonald *et al.*, 2008). Par la suite, avec l'identification de marqueurs spécifiques des cellules souches gastriques, de nombreuses mutations impliquées dans la progression tumorale des cellules souches gastriques ont été analysées. Ainsi, par exemple, une étude a montré que l'inactivation du gène suppresseur de tumeur « Krüppel-like-factor 4 » (*KLF4*) dans des cellules gastriques présentant des propriétés de cellules souches et exprimant la Villin, accélère la transformation maligne de la muqueuse gastrique chez les souris Villin-Cre⁺; Klf4^{fl/fl} (Li *et al.*, 2012; Y. Song *et al.*, 2017). Une autre étude a montré que la délétion de Smad4 et PTEN dans les cellules souches gastriques exprimant Lgr5, induit le développement d'un cancer invasif de type intestinal (X.-B. Li *et al.*, 2016).

ii) Les CSC proviennent de cellules dérivées de la moelle osseuse (BMDC)

Il a été montré qu'en cas de lésions tissulaire et inflammation trop importante, induisant une apoptose excessive des cellules épithéliales, qui submerge le pouvoir régénérant des cellules souches locales, alors des BMDC peuvent être recrutées. Ces cellules présentent une plasticité leur permettant de régénérer le tissu lésé. Dans le cadre de la carcinogenèse gastrique, le rôle des BMDC a été étudié sur des modèles de souris C57BL/6 transplantées avec la moelle osseuse de souris ROSA26 (exprimant la β -galactosidase), et infectées avec *H. felis*. A partir de 20 semaines d'infection, les glandes endommagées ont progressivement été repeuplées par les BMDC, visualisées par l'expression de la β -galactosidase dans les cellules épithéliales composant les glandes gastriques. Cette étude a montré que les BMDC pouvaient se différencier en cellules épithéliales gastriques. L'infection et l'inflammation chronique dues à *H. felis* altèrent la régénération tissulaire et la différenciation des cellules souches locales et des BMDC, entraînant le développement d'une métaplasie intestinale (Houghton *et al.*, 2004). Dans un autre modèle de souris C57BL/6 femelles transplantées avec la moelle osseuse de souris mâle C57BL/6 GFP⁺, et infectées par *H. pylori*, Varon *et al* ont montré que 25% des lésions

dysplasiques induites par *H. pylori* incluent des cellules originaires de la moelle osseuse (Figure 17) (Varon *et al.*, 2012). Ces approches ont mis en évidence l'implication des BMDC dans la carcinogénèse gastrique.

iii) Les CSC proviennent d'une dédifférenciation des cellules épithéliales

L'infection chronique par *H. pylori* induit une dédifférenciation puis une « intestinalisation » des cellules épithéliales gastriques (Correa and Piazzuelo, 2012). Il a été démontré sur des lignées cellulaires épithéliales gastriques par Bessède *et al.* que *H. pylori* provoque l'émergence de cellules avec des propriétés de CSC *via* l'induction d'une transition épithélio-mésenchymateuse (EMT pour « epithelial-to-mesenchymal transition ») des cellules épithéliales gastriques (Figure 17) (Bessède *et al.*, 2014).

Initialement décrite par Elisabeth Hay (Hay, 1995), la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) est un processus biologique, réversible, qui permet à une cellule épithéliale polarisée de subir de multiples changements biochimiques lui permettant d'adopter un phénotype de cellule mésenchymateuse.

Les cellules épithéliales sont des cellules cohésives caractérisées par une polarisation apico-basale, une répartition localisée des molécules d'adhésion (intégrines et cadhérines), une latéralisation des jonctions intercellulaires, une polarisation des filaments d'actine et elles reposent sur une lame basale à leur pôle basal. Lors de l'EMT ces caractéristiques phénotypiques sont progressivement perdues au profit des caractéristiques phénotypiques des cellules mésenchymateuses. Ces dernières ne sont pas polarisées, ne reposent pas sur une lame basale, et présentent de rares contacts focaux avec les autres cellules. En culture, elles sont très mobiles et ont une forme allongée, qui les apparente à des fibroblastes, alors que les cellules épithéliales de forme cubique, poussent en groupes de cellules cohésives. De plus, les cellules mésenchymateuses possèdent des capacités de migration et d'invasion prononcées, une résistance élevée à l'apoptose et une production accrue des composants de la matrice extracellulaire.

De nombreux processus moléculaires jouent un rôle dans l'initiation de l'EMT. Parmi ces processus on peut noter : l'activation de certains facteurs de transcription, l'expression de protéines spécifiques de surface cellulaire, la réorganisation des protéines du cytosquelette, la production d'enzymes dégradant la matrice extracellulaire et des changements dans l'expression de microARNs spécifiques. Dans de nombreux cas, tous ces marqueurs protéiques

sont également utilisés comme des biomarqueurs de l'EMT, témoins du passage d'une cellule épithéliale vers une cellule mésenchymateuse (Figure 18) (Kalluri and Weinberg, 2009). Fait important, les cellules cancéreuses peuvent subir l'EMT à des degrés divers, certaines cellules conservant de nombreux caractères épithéliaux tout en acquérant quelques caractères mésenchymateux, et d'autres cellules devenant complètement mésenchymateuses.

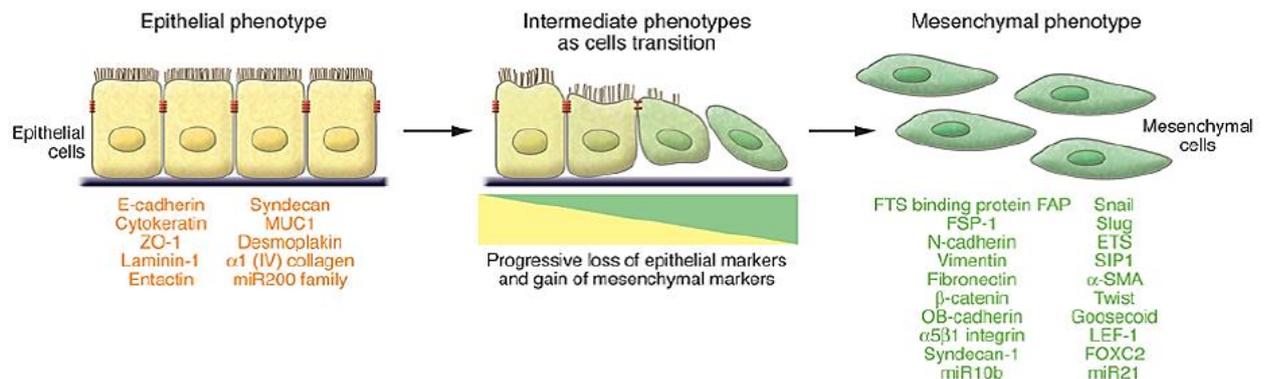


Figure 18 : Modifications cellulaires structurales et protéiques retrouvées au cours de l'EMT.

L'EMT induit une transition fonctionnelle de cellules épithéliales polarisées vers des cellules de type mésenchymateuses sécrétrices de composants de la matrice extracellulaire. Les marqueurs des différents types cellulaires classiquement utilisés, sont listés et présentés sur la figure. Une co-expression de 2 types de marqueurs définit un phénotype cellulaire intermédiaire entre le phénotype épithélial et le phénotype mésenchymateux. ZO-1 : zona occludens 1 ; MUC1 : mucine 1 ; miR200 : microRNA 200 ; SIP1 : « survival of motor neuron protein interacting protein 1 » ; FOXC2 : « forkhead box C2 ». D'après (Kalluri and Weinberg, 2009)

L'EMT se rencontre dans 3 types de circonstances biologiques qui vont avoir des conséquences fonctionnelles différentes. L'EMT de type 1 concerne les processus d'implantation, d'embryogénèse et de développement d'organes. L'EMT de type 2 est associée à la régénération tissulaire et à la fibrose. Enfin l'EMT de type 3 concerne le développement de cellules néoplasiques qui ont préalablement acquis des changements génétiques et épigénétiques spécifiquement dans des gènes qui favorisent la croissance clonale et le développement de tumeurs localisées. Ces cellules ayant subi une EMT possèdent des propriétés d'invasion accrues et peuvent être à l'origine de la formation des métastases.

Ainsi l'EMT de type 3 est un processus qui participe activement à la progression tumorale. De plus, Mani *et al.* ont démontré que l'induction de l'EMT dans des cellules mammaires immortalisées génère des cellules mésenchymateuses CD44^{high}/CD24^{low}, possédant des propriétés de CSC (Mani *et al.*, 2008).

Dans le cancer gastrique, les travaux de Baud *et al.* ont démontré que l'infection de lignées cellulaires gastriques par *H. pylori* induit une EMT caractérisée notamment par l'augmentation de l'expression du facteur de transcription Zeb1, un marqueur mésenchymateux (Baud *et al.*, 2013). De plus, les travaux de Bessède *et al.* ont démontré que c'est *via* l'oncoprotéine CagA que *H. pylori* induit l'EMT, caractérisée par une diminution de l'expression des marqueurs épithéliaux (cytokératine-7) et une augmentation de l'expression des marqueurs mésenchymateux (Snail1, Vimentine, Zeb1). L'infection augmente également les capacités de migration, d'invasion, de formation des tumorsphères et augmente l'expression du marqueur connu des CSC gastriques, le CD44 (Takaishi *et al.*, 2009). Ces résultats ont permis de conclure que l'infection des cellules épithéliales gastriques par *H. pylori* conduit à l'émergence de cellules présentant des propriétés de CSC (Bessède *et al.*, 2014).

c. Méthodes d'identification et propriétés des cellules souches cancéreuses

i) Expression de marqueurs spécifiques

Les CSC expriment des marqueurs de surface spécifiques qui peuvent être utilisés pour les étudier et les isoler à l'aide d'anticorps spécifiques, couplés à un fluorochrome ou une bille magnétique. Il est possible de réaliser des tris par FACS (« fluorescence-activated cell sorting ») pour combiner plusieurs fluorochromes différents et ainsi trier les cellules suivant l'expression de multiples marqueurs. Différents marqueurs de surface ont été proposés pour identifier les CSC gastriques tels que les « clusters » de différenciation (CD) CD24, CD133, CD166 et CD44.

En particulier, le CD44 a été utilisé par Takaishi *et al.* pour isoler et caractériser les CSC gastriques. C'est donc le marqueur le plus pertinent pour l'étude des CSC gastriques (Takaishi *et al.*, 2009; Nguyen *et al.*, 2017). D'autant plus que l'expression de ce marqueur est augmentée en réponse à l'infection par *H. pylori*, et est corrélée avec l'apparition de cellules aux propriétés de CSC (Bessède *et al.*, 2014).

Le CD44 est une glycoprotéine transmembranaire, initialement identifiée dans les lymphocytes, et impliquée dans l'adhésion cellulaire. Depuis, le CD44 a été identifié dans divers autres types cellulaires tels que les cellules endothéliales, les hépatocytes et les cellules mésenchymateuses. En 1989, Stamenkovic *et al.* ont constaté qu'une variété de lignées cellulaires de carcinomes et de tumeurs solides exprimait le CD44. En 1991, Günthert *et al.* ont découvert que l'induction de l'expression du CD44, dans des cellules composant une tumeur non métastatique, leur conférait la capacité à former des métastases. Ces découvertes initiales ont entraîné de nombreux travaux de recherche sur les mécanismes possibles et le rôle du CD44 dans la carcinogenèse (Sneath and Mangham, 1998).

Cette protéine est codée par un gène très conservé, constitué de 20 exons (Figure 19). Dix de ces exons (1 à 5 et 16 à 20) sont exprimés dans toutes les isoformes, et considérés comme les exons « constants ». Ces dix exons codent pour la forme standard (CD44s) de 85 kDa. Les 10 exons au centre (6 à 15) subissent un épissage alternatif, à l'origine de multiples variants du CD44 (CD44v) (Figure 19). Les variants sont spécifiques de différents types cellulaires. Par exemple, le variant comprenant les exons 8 à 10 correspond à l'isoforme épithélial CD44E. Les différents variants peuvent avoir des fonctions différentes voir supplémentaires par rapport à l'isoforme standard. L'étude actuelle des différents variants a pour but d'identifier le/les variants spécifiques des CSC et pouvant être utilisés comme cible thérapeutique et comme marqueur pronostique.

Le CD44 intervient dans les interactions cellule-cellule et cellule-matrice extracellulaire. C'est le récepteur de l'acide hyaluronique, un composant majeur de la matrice extracellulaire, et un corécepteur pour de nombreux facteurs de croissance et cytokines. Il peut aussi lier d'autres éléments du cytosquelette : collagène, fibronectine, laminine et le chondroïtine sulfate. Le CD44 joue un rôle dans l'initiation de la tumeur et la croissance tumorale, le cycle cellulaire et la prolifération, l'adhésion et la migration cellulaire, la formation de métastases. Il va réguler des voies de signalisation intracellulaire impliquant notamment les Rho GTPases (contrôle du cytosquelette d'actine), les MAPK (prolifération cellulaire) et l'activation de la voie PI3K/AKT (survie cellulaire, efflux de drogues) (Yan *et al.*, 2015).

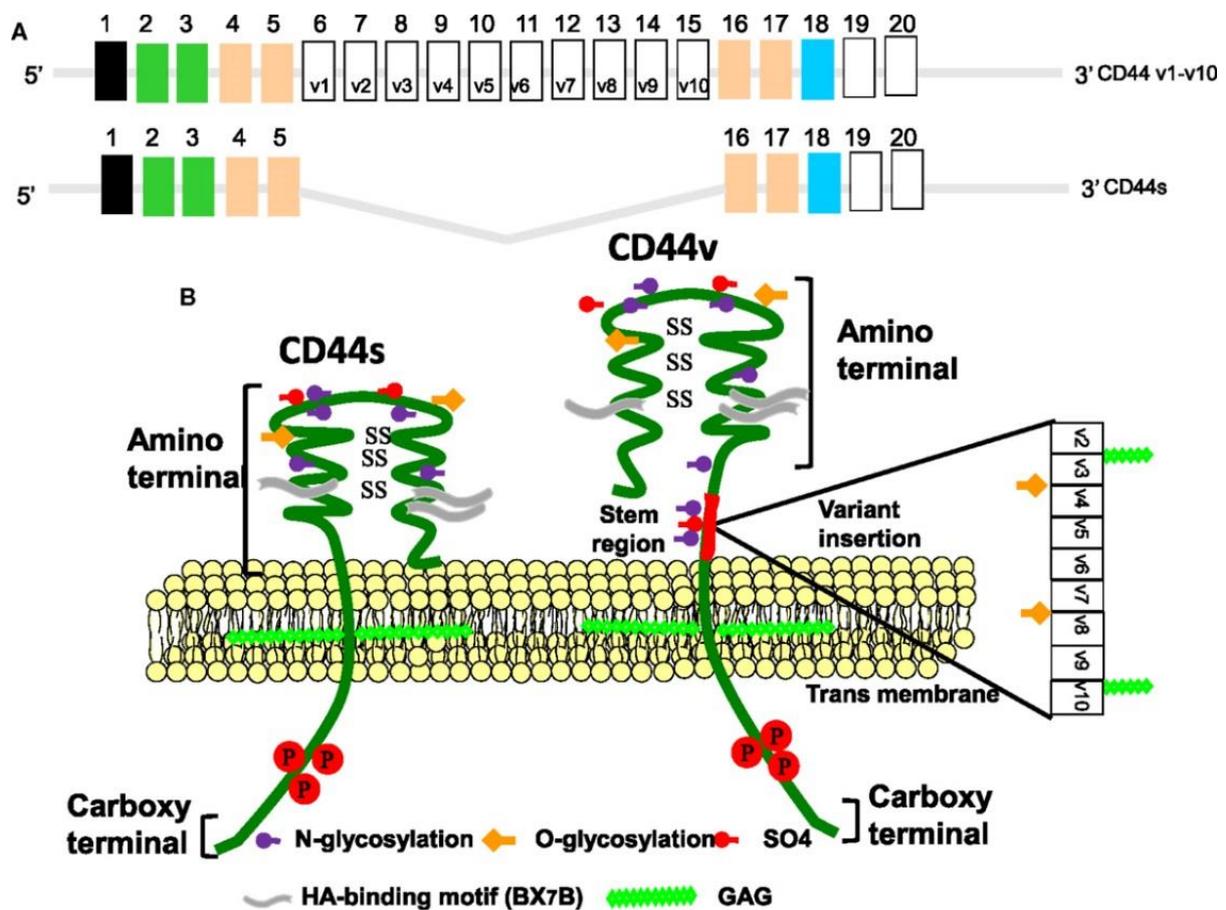


Figure 19 : Gène codant pour le CD44 et structure de la protéine.

(A) Structure du gène et représentation de ses différents exons, codant pour les différents variants du CD44 (CD44v) et la forme standard du CD44 (CD44s). (B) Structure de la protéine, forme standard et variants. D'après (Misra *et al.*, 2015)

ii) « Side-population »

Les CSC sont des cellules résistantes aux chimiothérapies conventionnelles, et sont donc responsables des rechutes. L'étude des mécanismes à l'origine de ces résistances est primordiale afin de développer de nouvelles thérapies capables de cibler ces cellules. Ces mécanismes sont multiples et comprennent entre autre l'efflux des drogues hors de la cellule, par l'intermédiaire de transporteurs ABC (transporteurs à « ATP Binding Cassette »). Cette famille de transporteur comprend 49 protéines et 3 d'entre elles sont particulièrement étudiées pour leur implication dans les résistances multiples aux drogues : MDR1 pour « multi-drug resistance protein 1 » aussi connue sous le nom de P-glycoprotéine et ABCB1, MRP1 pour « MDR-associated protein 1 » aussi connue sous le nom de ABCC1, et BCRP pour « breast cancer resistance protein » aussi connue sous le nom de ABCG2 (Gottesman *et al.*, 2002). Bien

que les transporteurs ABC aient été identifiés pour leur rôle dans la résistance aux drogues, ils sont aussi exprimés dans les tissus sains. Ils sont exprimés au niveau du cerveau, des testicules et du placenta pour les protéger des cytotoxines, mais également au niveau du foie, du tube digestif et des reins pour excréter les toxines et protéger l'organisme.

Ces transporteurs, surexprimés dans les cellules souches normales et tumorales, sont impliqués dans les résistances à la doxorubicine, au cisplatine, au 5-fluorouracile, au paclitaxel, à l'imatinib, etc (Dean *et al.*, 2005). Dans le cadre du cancer gastrique, ils seraient impliqués dans les résistances au 5-fluorouracile (Li *et al.*, 2013) et aux inhibiteurs de topoisomérases (Yashiro *et al.*, 2013). Aussi, des inhibiteurs de ces transporteurs sont développés et testés en combinaison avec les chimiothérapies pour augmenter leur efficacité. C'est le cas par exemple du vérapamil (Dean *et al.*, 2005).

Cette propriété d'efflux des drogues est utilisée en cytométrie en flux pour identifier les CSC, en utilisant la « side population » (Goodell *et al.*, 1996). Les cellules de la « side population » correspondent aux CSC, capables de relarguer des colorants tels que le Hoechst 33342 ou la rhodamine *via* les transporteurs ABC. Ainsi ces cellules n'apparaissent pas fluorescentes, contrairement aux autres cellules. L'utilisation du vérapamil bloque l'efflux des colorants, et les cellules de la « side population » deviennent fluorescentes.

iii) L'aldéhyde déshydrogénase (ALDH)

Les protéines de la famille ALDH sont des enzymes impliquées dans l'oxydation de l'aldéhyde intracellulaire en acide carboxylique et contribuent à la synthèse de l'acide rétinoïque et de l'acide γ -aminobutyrique (GABA), qui jouent tous deux un rôle dans la maintenance et la différenciation des cellules souches normales et cancéreuses. Différentes études ont démontré que l'activité ALDH est plus élevée dans les CSC. En particulier, dans le cancer gastrique, Nguyen *et al.* ont montré qu'une forte activité ALDH représentait un marqueur intéressant pour caractériser et isoler les CSC (Nguyen *et al.*, 2017). Les fonctions enzymatiques et non enzymatiques de l'ALDH1 et de l'ALDH3A1 jouent un rôle clé dans la réponse cellulaire au stress oxydatif en éliminant les radicaux libres induits par rayonnement, ou en produisant l'antioxydant NAD(P)H. Ces données suggèrent que l'activité ALDH peut jouer un rôle important dans la radiosensibilité des cellules. En effet, une forte activité ALDH a été corrélée avec la radio- et chimio-résistance des CSC dans différents types de cancers, y compris dans le cancer gastrique (résistance au 5-fluorouracile et cisplatine) (Nishikawa *et al.*, 2013; Cojoc *et al.*, 2015). L'expression et l'activité de l'ALDH peuvent être régulées par une concentration

intracellulaire élevée d'acide rétinoïque, qui est un produit de la réaction enzymatique de l'ALDH. Ainsi, le traitement des cellules tumorales avec l'acide transrétinoïque ou ATRA pourrait être une stratégie thérapeutique prometteuse. En effet, Nguyen *et al.* ont montré que l'administration d'ATRA pouvait inhiber efficacement la croissance tumorale et cibler les CSC gastriques (Nguyen *et al.*, 2016).

Le dosage de l'activité de l'ALDH permet d'identifier les CSC et est réalisé en cytométrie en flux à l'aide d'un kit ALDEFLUOR®. Le principe est le suivant : le substrat de l'ALDH, le BODIPY-aminoacétaldéhyde (BAAA), est ajouté dans le milieu des cellules. Celui-ci est converti par l'ALDH en BODIPY-aminoacétate (BAA-), qui est fluorescent et permet de classer et trier les cellules souches. La présence d'ALDH peut également être détectée par immunohistochimie dans les tissus tumoraux. La détection de l'activité ALDH peut être combinée avec des marqueurs de surface cellulaire, tels que CD44, en cytométrie de flux pour avoir une identification plus spécifique des CSC gastriques (Nguyen *et al.*, 2017).

iv) Formation de tumorsphères

Le test de formation de tumorsphères est utilisé pour étudier les cellules souches/progénitrices *in vitro* dans de nombreux type de cancers différents, y compris le cancer gastrique. Cette propriété *in vitro* est comparable à la capacité des CSC à former de nouvelles tumeurs *in vivo*. Pour générer des tumorsphères, les cellules sont cultivées dans des conditions de non adhérence, dans un milieu sans sérum et supplémenté en facteurs de croissances, tels que le FGF ou l'EGF, et en insuline. Dans ces conditions la plupart des cellules meurent. Seules certaines cellules survivent, puis s'auto-renouvellent et se divisent pour former des tumorsphères. Celles-ci sont des colonies composées de cellules qui dérivent toutes d'une seule cellule souche. C'est en 1992 que Reynolds et Weiss ont pour la première fois utilisé cette technique pour identifier des cellules neuronales indifférenciées. De nos jours, cette technique est reconnue pour identifier et caractériser les CSC *in vitro* (D'Angelo and Wicha, 2010). Il existe cependant certaines limites qui doivent être prises en compte lors de l'interprétation des résultats : certaines lignées cellulaires ont une capacité à proliférer dans des conditions non adhérentes et en absence de sérum ; de fortes densités de cellules peuvent favoriser la formation d'agrégats qui peuvent être confondus avec des vraies sphères ; cette technique ne permet pas non plus de détecter les CSC quiescentes.

v) Greffes *in vivo*

Une des principales propriétés des CSC est la capacité à former de nouvelles tumeurs. Ainsi, la xéno greffe de cellules chez des souris immunodéficientes (souche NSG, par exemple) permet d'évaluer cette capacité. C'est la meilleure approche pour l'identification des CSC. Cette approche permet également d'estimer la proportion de CSC présentes dans une tumeur, en utilisant la méthode de xéno greffe en dilution limite. Pour cela, des quantités de plus en plus réduites de cellules sont greffées jusqu'à déterminer le nombre minimal de cellules nécessaires pour former une tumeur. Dans une étude récente de Nguyen *et al*, la fréquence des cellules initiateuses de tumeur a été calculée entre 1/29 et 1/1020 dans les cellules exprimant le CD44 pour 3 cas d'adénocarcinomes gastriques (deux types intestinaux et un type diffus) en utilisant cette méthode (Nguyen *et al.*, 2017).

IV. Metformine

1. Historique

L'histoire de la metformine est liée à celle de la *Galega officinalis*, une plante médicinale utilisée depuis le Moyen-Age. Les parties aériennes de la plante étaient utilisées pour traiter la peste, la fièvre, les vers, les morsures de serpents, les miasmes, la dysurie et la danse St Guy ou chorée. Elle a également été utilisée dans le traitement des symptômes attribués maintenant au diabète de type 2 (Bailey and Day, 2004; Bailey, 2017).

Au milieu du XIX^{ème} siècle, des analyses chimiques réalisées par Strecker ont révélé que la plante était riche en guanidine (Figure 20). En 1918, Watanabe a rapporté que la guanidine réduisait la concentration de glucose dans le sang d'animaux. Cependant, cette molécule était trop toxique pour l'utilisation clinique. Des dérivés moins toxiques de la guanidine, la galegine (mono-guanidine) et les synthalines (diguanide) furent développés et utilisés en traitement anti-diabétique dans les années 1920 (Figure 20). Cependant, l'insuline, découverte en 1921, était de plus en plus disponible et la toxicité et l'efficacité limitée des dérivés hypoglycémiantes de la guanidine ont conduit à l'arrêt des synthalines au début des années 1930 (Bailey and Day, 2004; Bailey, 2017).

Les origines chimiques de la metformine sont dues à Rathke qui réussit à fusionner 2 guanidines ensemble pour former un biguanide en 1879. Ce qui permit par la suite la synthèse de metformine (dimethylbiguanide) par Werner et Bell en 1922. En 1929, des études sur la metformine et d'autres biguanides ont montré que ces composés pouvaient diminuer la glycémie chez des animaux. De plus, ces molécules, notamment la metformine, étaient nettement moins toxiques que les mono- et diguanides. Cependant, le potentiel réel de ces molécules a été sous-évalué à l'époque en raison de la nécessité de recourir à des doses élevées pour obtenir des effets modestes d'abaissement du glucose chez des animaux non-diabétiques (contrairement à ce qui sera démontré plus tard sur des modèles de diabète). Aussi, les biguanides ne furent à cette époque pas développés pour leur effet antidiabétique.

Enfin, en 1957, le français Jean Sterne en collaboration avec Denise Duval, explora les propriétés anti-diabétiques des biguanides. Il sélectionna la metformine pour un développement clinique et proposa le nom de « Glucophage » utilisé pour sa mise sur le marché (Bailey, 2017). Au même moment, Ungar publia une étude sur la phenformine et Mehnert sur la buformine, d'autres biguanides (Figure 20) (Bailey, 2017). La phenformine et la buformine étaient plus efficaces et ont été mis en avant et plus utilisés que la metformine. Cependant, leur association

avec de fortes acidoses lactiques a entraîné l'arrêt de leur utilisation dans la plupart des pays à la fin des années 1970. En revanche, la metformine démontra des propriétés hypoglycémiantes intéressantes, en diminuant la résistance à l'insuline, sans entraîner de gain de poids ou de risque accru d'hypoglycémie. Ces propriétés en ont fait un antidiabétique de premier ordre dans la prise en charge du diabète de type 2.

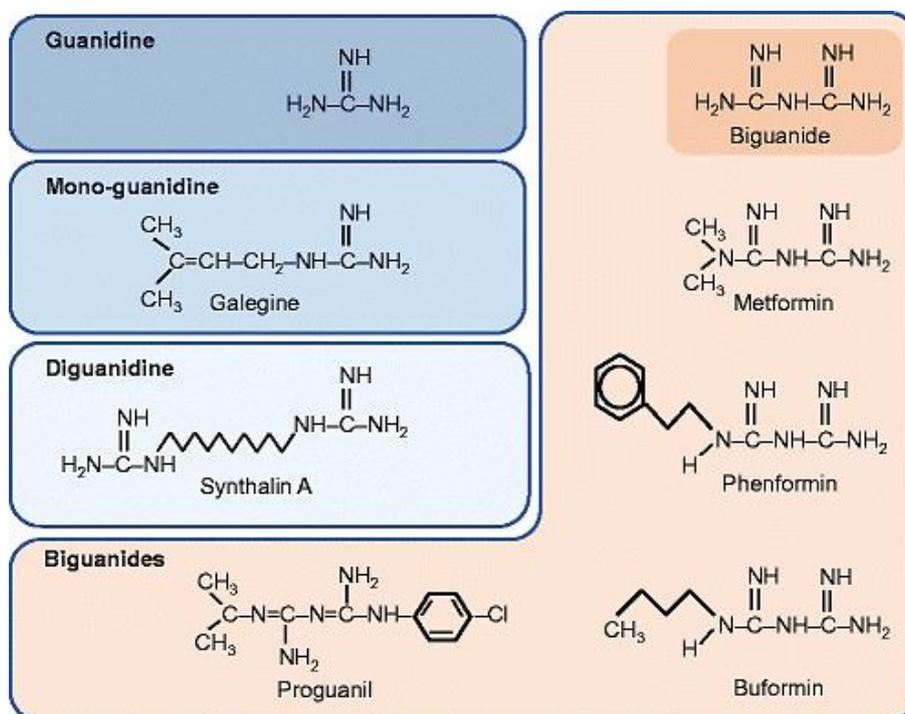


Figure 20 : Structure de la guanidine et de ses dérivés.
D'après (Bailey, 2017)

2. Utilisation de la metformine dans le diabète non insulino-dépendant

Le diabète de type 2, dit non insulino-dépendant, est caractérisé par une insulino-résistance, acquise notamment sous l'effet de l'obésité ou de la sédentarité. Quand les cellules deviennent résistantes à l'insuline, en particulier les cellules du foie, du muscle et du tissu adipeux, l'hormone ne parvient plus à générer un signal efficace pour assurer l'entrée du glucose dans celles-ci. Pour répondre à la demande accrue en insuline qui en découle, les cellules β du pancréas produisent davantage d'insuline (hyperinsulinisme) jusqu'à ce qu'elles ne puissent plus répondre ou finissent par s'épuiser. La production d'insuline devient alors insuffisante conduisant à une accumulation de glucose dans le sang.

Différents traitements sont disponibles : les biguanides, les sulfamides hypoglycémiantes et les glinides (qui stimulent la sécrétion d'insuline par le pancréas), les inhibiteurs de l'alpha-glucosidase (ralentissent l'absorption des glucides). La metformine est l'antidiabétique le plus utilisé pour traiter le diabète de type 2, en particulier chez les patients en surpoids. Elle favorise l'action de l'insuline dans l'organisme, diminue la production de sucre par le foie ainsi que l'absorption intestinale du glucose. Elle n'a pas d'action directe sur la sécrétion d'insuline par le pancréas. Elle peut donc être associée à des injections d'insuline. Dans le foie, qui est l'organe cible de la metformine, celle-ci inhibe la gluconéogenèse hépatique et augmente la sensibilité à l'insuline dans le foie et dans les tissus périphériques (McIntyre *et al.*, 1991).

La prise de metformine est associée à des troubles digestifs (nausées, crampes épigastriques, inconfort abdominal, diarrhées) chez 20-30% des patients. Mais seulement 5% des patients souffrent d'effets secondaires sévères, conduisant à l'arrêt du traitement. L'acidose lactique est une complication métabolique grave (mortalité qui peut atteindre 50%), qui résulte d'une accumulation d'acide lactique. Elle reste heureusement rare chez les patients sous metformine, avec une fréquence très faible (environ 0,03 cas pour 1000 patients-année, et environ 0,015 décès pour 1000 patients-année) (Sanduloviciu and Jornayvaz, 2015).

a. Pharmacocinétique

La metformine se présente sous forme d'un comprimé, pris oralement par les patients. La posologie initiale habituelle est de 500 mg ou de 850 mg de metformine en 2 ou 3 prises par jour au cours ou à la fin des repas. Au bout de 10 à 15 jours, la posologie est adaptée en fonction de la glycémie. L'augmentation progressive de la dose prise peut permettre d'améliorer la tolérance gastro-intestinale. La dose efficace habituelle est de 1500 à 2000 mg par jour. La dose maximale recommandée est de 3 g/jour, en 3 prises distinctes (Sanduloviciu and Jornayvaz, 2015).

Du fait de son administration orale, la metformine est absorbée par l'intestin pour rejoindre la circulation sanguine. Une étude sur la distribution de la metformine dans les différents tissus a été réalisée chez des souris après gavage avec de la metformine marquée au ¹⁴C, et a montré une accumulation de metformine principalement au niveau de l'intestin, du foie, et des reins (Wilcock and Bailey, 1994). La metformine n'est pas métabolisée. Elle est éliminée dans les urines et a une demi-vie d'environ 5h (Graham *et al.*, 2011).

Du fait de sa nature polaire, la metformine est dépendante de transporteurs membranaires pour entrer et sortir de la cellule. Au niveau de l'intestin, l'absorption de la

metformine est médiée par le PMAT (« plasma membrane monoamine transporteur ») exprimé au niveau apical des entérocytes, du côté de la lumière intestinale. Le transporteur de cation organique OCT1 (« Organic cation transporter 1 ») est exprimé sur la membrane basolatérale des entérocytes et peut être responsable du transport de la metformine vers le liquide interstitiel. Le principal transporteur de la metformine au niveau du foie est OCT1, exprimé au niveau de la membrane basolatérale des hépatocytes (Gong *et al.*, 2012). Wang *et al.* ont injecté par voie intraveineuse une solution de metformine (5 mg/kg) à des souris *oct1*^{-/-}. Dix min après l'injection, la concentration en metformine dans le foie des souris était 30 fois supérieure chez les souris exprimant OCT1 par rapport à celles n'exprimant pas OCT1. De plus, la metformine était 3 à 7 fois plus concentrée dans l'intestin des souris exprimant OCT1 que dans l'intestin des souris n'exprimant pas OCT1 (Wang *et al.*, 2002). Chez l'homme, la présence de polymorphisme non-synonyme, qui change la séquence protéique, au niveau du gène *OCT1* peut affecter l'entrée de metformine dans le foie et diminuer les effets de la metformine sur la phosphorylation de l'AMPK et de la gluconéogenèse. Chez des souris, la délétion de *oct1*, abolit l'effet hypoglycémiant de la metformine (Shu *et al.*, 2007).

b. Mécanismes d'action de la metformine dans le traitement du diabète

Les mécanismes d'action de la metformine ne sont pas clairement décrits, mais de nombreux éléments peuvent expliquer les effets hypoglycémiants de la metformine.

En 2000, deux études ont rapporté que la metformine diminue la respiration cellulaire. Après son entrée dans la cellule, la metformine va s'accumuler dans la matrice mitochondriale. La metformine inhibe partiellement mais spécifiquement le complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale ou NADH déshydrogénase, par un mécanisme mal décrit (Figure 21). Ceci entraîne une diminution de l'oxydation du NADH en NAD⁺, du transport d'électrons à travers la membrane interne de la mitochondrie et de la consommation d'oxygène (Owen, 1998; El-Mir *et al.*, 2000). Les conséquences sont une diminution du gradient de protons et donc une réduction de la synthèse d'ATP par l'ATP synthase (Figure 21).

La diminution de l'ATP qui en résulte, s'accompagne d'une augmentation des ratios ADP/ATP et AMP/ATP, et entraîne deux réponses majeures : i) dépendante de l'activation de l'AMPK (« AMP-activating protein kinase ») ou ii) indépendante de l'activation de l'AMPK et liée à l'inhibition de la synthèse d'AMPc.

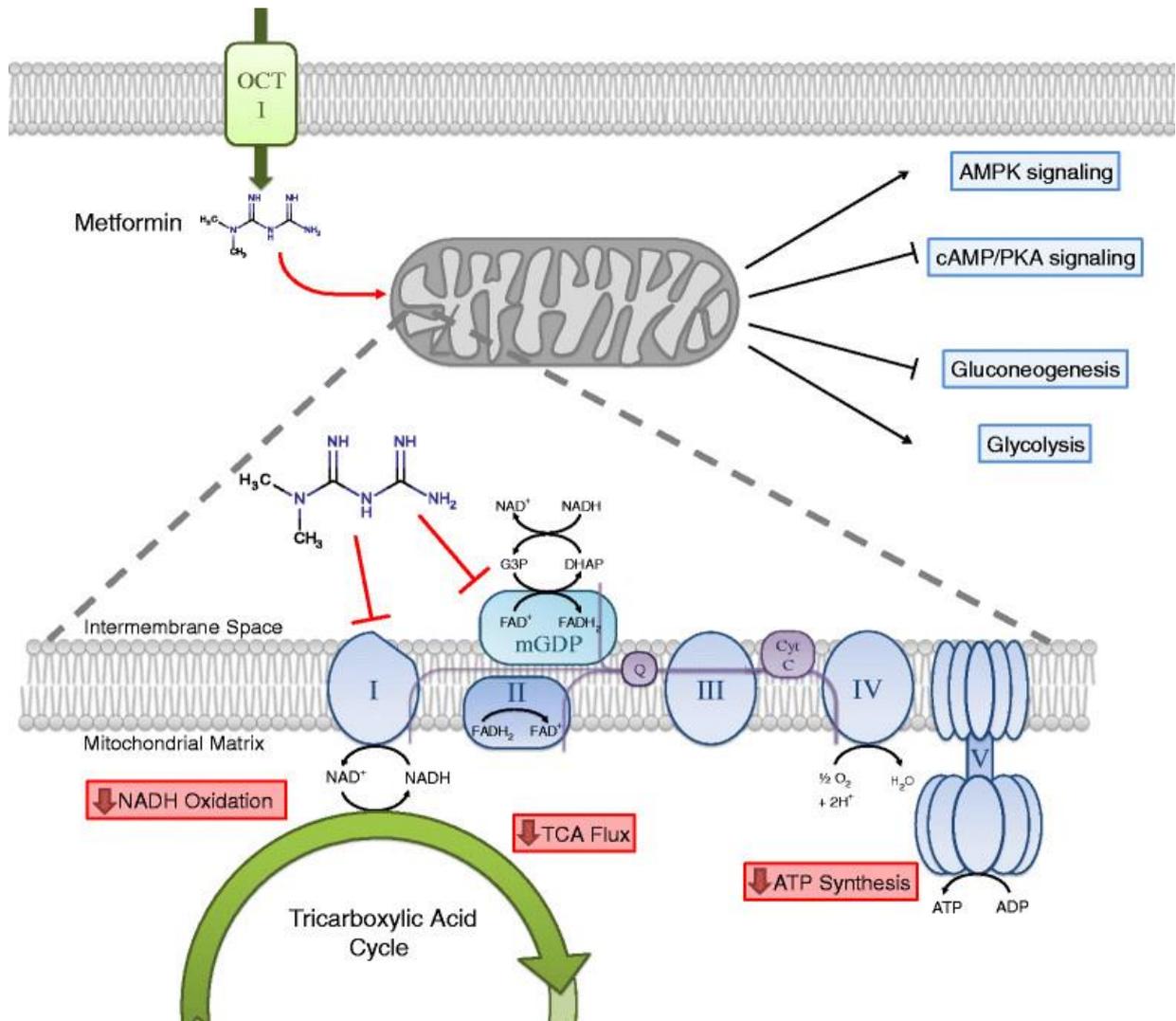


Figure 21 : Inhibition du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale par la metformine.
 La metformine entre dans la cellule par le transporteur OCT1 puis s'accumule dans la mitochondrie où elle inhibe le complexe I de la chaîne respiratoire. Ceci entraîne une diminution de l'oxydation du NADH, inhibe le cycle de Krebs et diminue la production d'ATP. Il en résulte une activation des voies de signalisation contrôlées par l'AMPK et AMPc/PKA, une diminution de la gluconéogenèse et une augmentation de la glycolyse. D'après (Luengo *et al.*, 2014)

i) Effets dépendants de l'AMPK

Présentation de l'AMPK

L'AMPK est une sérine/thréonine kinase composée d'une sous-unité α catalytique et de 2 sous-unités β régulatrices (Figure 22). C'est un senseur énergétique crucial pour la cellule, capable de réguler de très nombreuses voies cellulaires.

Cette kinase est activée de manière allostérique par l'AMP, d'où son nom. Sa sous-unité catalytique possède un domaine sérine/thréonine kinase qui peut être phosphorylé (Thréonine 172) par les kinases régulatrices en amont : LKB1 (au sein du complexe LKB1/STRAD/MO25) et la CaMKK2 (« Ca²⁺/calmodulin-activated protein kinase kinase ») (Figure 22). LKB1 est responsable de la phosphorylation activatrice sur la thréonine 172 de l'AMPK, qui est modulée par la liaison de l'AMP sur sa sous-unité γ , qui favorise la phosphorylation et inhibe la déphosphorylation. La CaMKK2 est une voie alternative d'activation de l'AMPK en réponse à une augmentation intracellulaire de Ca²⁺, sans forcément nécessiter des changements des niveaux d'AMP et ADP (Hardie *et al.*, 2012).

Le rôle de l'AMPK est de maintenir l'homéostasie énergétique de la cellule. Ainsi, lorsque l'AMPK est activée, elle va activer les voies cataboliques pour produire de l'ATP et au contraire inhiber les voies anaboliques pour stopper la consommation d'ATP (Figure 22).

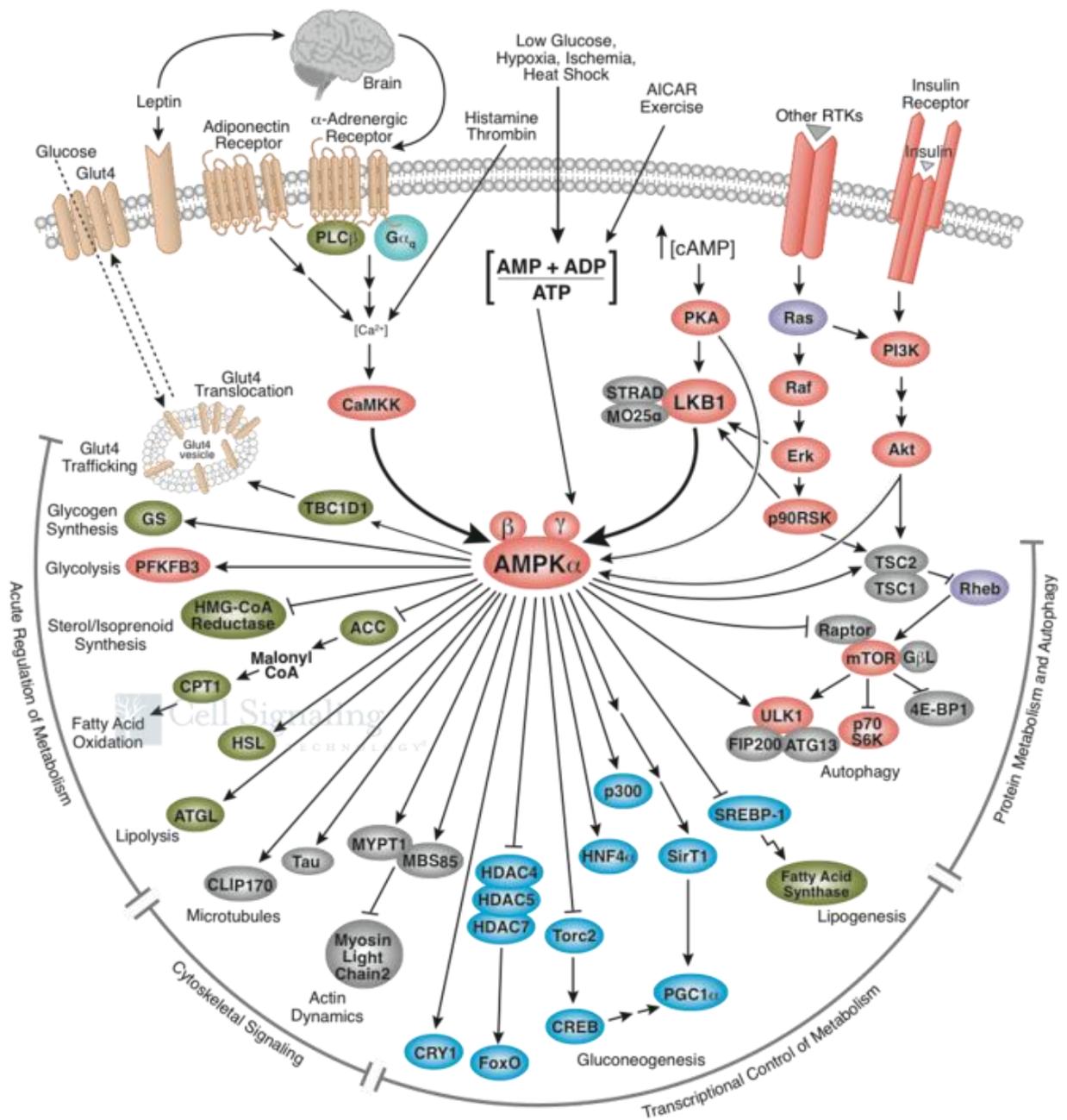


Figure 22: Voie de signalisation de l'AMPK.

L'AMPK régule différentes voies métaboliques comprenant entre autres la gluconéogénèse, la voie de signalisation mTOR et l'autophagie. D'après le site internet (www.cellsignal.com/)

Inhibition de l'expression des gènes de la gluconéogenèse

L'AMPK est capable d'inhiber l'expression de la glucose 6-phosphatase (G6Pase) et de la phosphoénolpyruvate carboxykinase (PEPCK, qui transforme l'oxaloacétate en phosphoénolpyruvate), deux enzymes clés de la gluconéogenèse (Foretz *et al.*, 2010). Il a été montré que cet effet de l'AMPK est dépendant de LKB1. L'axe LKB1/AMPK phosphoryle le coactivateur transcriptionnel « CREB-regulated transcription coactivator 2 » (CRTC2, aussi connu sous le nom de TORC2) sur la sérine 171 (Shaw *et al.*, 2005). Cette phosphorylation recrute la protéine 14-3-3 qui séquestre TORC2 dans le cytoplasme (Figure 23). Ainsi, TORC2 ne se lie plus au facteur de transcription CREB (« cAMP-response element-binding protein ») et n'induit pas l'expression de PGC-1 α . L'absence de PGC-1 α diminue l'expression de la G6Pase et PEPCK (Koo *et al.*, 2005). De plus, l'activation de l'AMPK par la metformine est aussi capable d'induire l'expression du récepteur nucléaire orphelin SHP (« small heterodimer partner ») qui va inhiber lui aussi l'expression des gènes codant pour la G6Pase et PEPCK (Figure 23).

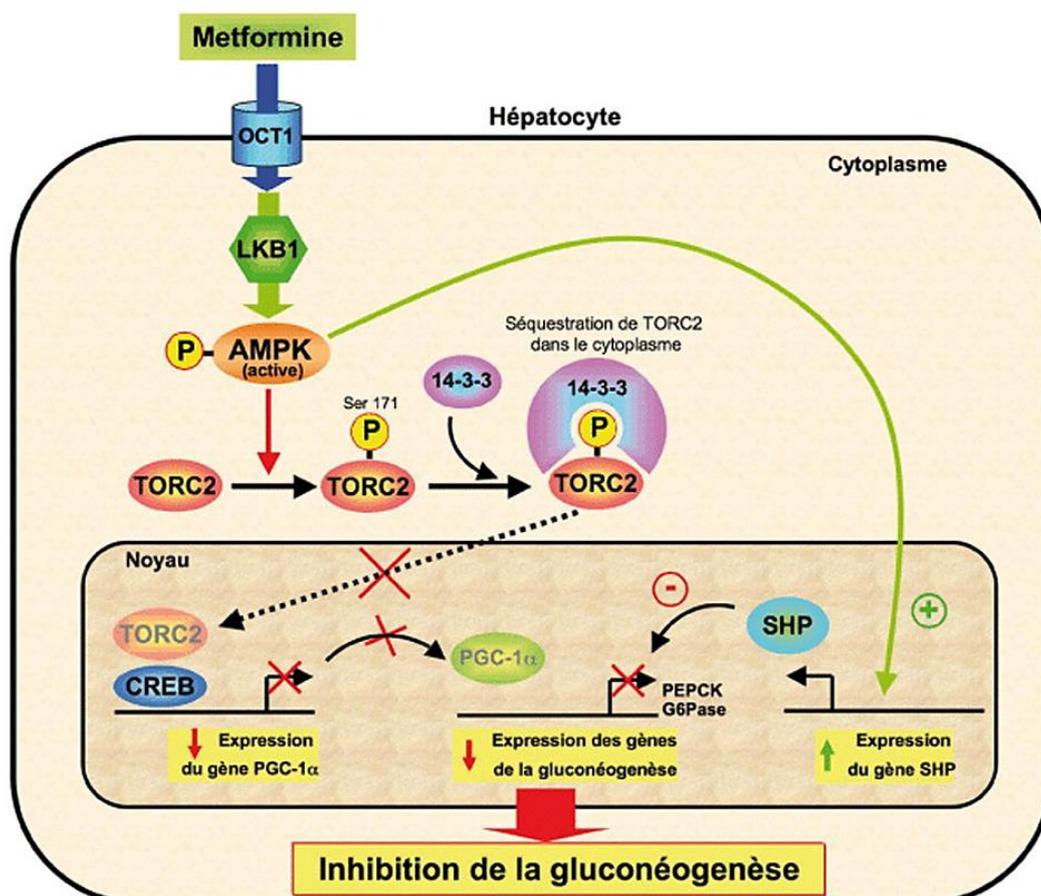


Figure 23 : La metformine contrôle l'expression des gènes de la gluconéogenèse via l'activation de l'AMPK.

CREB : CRE binding protein ; G6Pase : glucose 6-phosphatase ; OCT1 : organic cation transporter 1 ; PEPCK : phosphoénolpyruvate carboxykinase ; PGC-1 α : PPAR gamma coactivator 1 α ; SHP : small heterodimer partner ; TORC2 : transducer of regulated CREB activity 2. D'après (Foretz and Viollet, 2009)

Cet effet de l'AMPK vient contre les effets du glucagon, l'hormone hyperglycémiant produite par les cellules α du pancréas. Lorsque celui-ci se fixe sur son récepteur transmembranaire, il active l'adénylate cyclase qui produit l'AMPc à partir d'ATP (Figure 24). L'AMPc active alors la PKA (« cAMP-dépendent protein kinase ») qui phosphoryle la sérine 133 de CREB permettant ainsi la transcription des gènes impliqués dans la néoglucogénèse (Koo *et al.*, 2005). Il en découle une augmentation du glucose sanguin.

Par ailleurs, l'accumulation d'AMP à elle seule, indépendamment de l'AMPK, inhibe l'adénylate cyclase, réduisant ainsi le niveau d'AMPc, ce qui inhibe l'activité de la PKA et des protéines cibles de la PKA impliquées dans la réponse au glucagon (Figure 24) (Miller *et al.*, 2013).

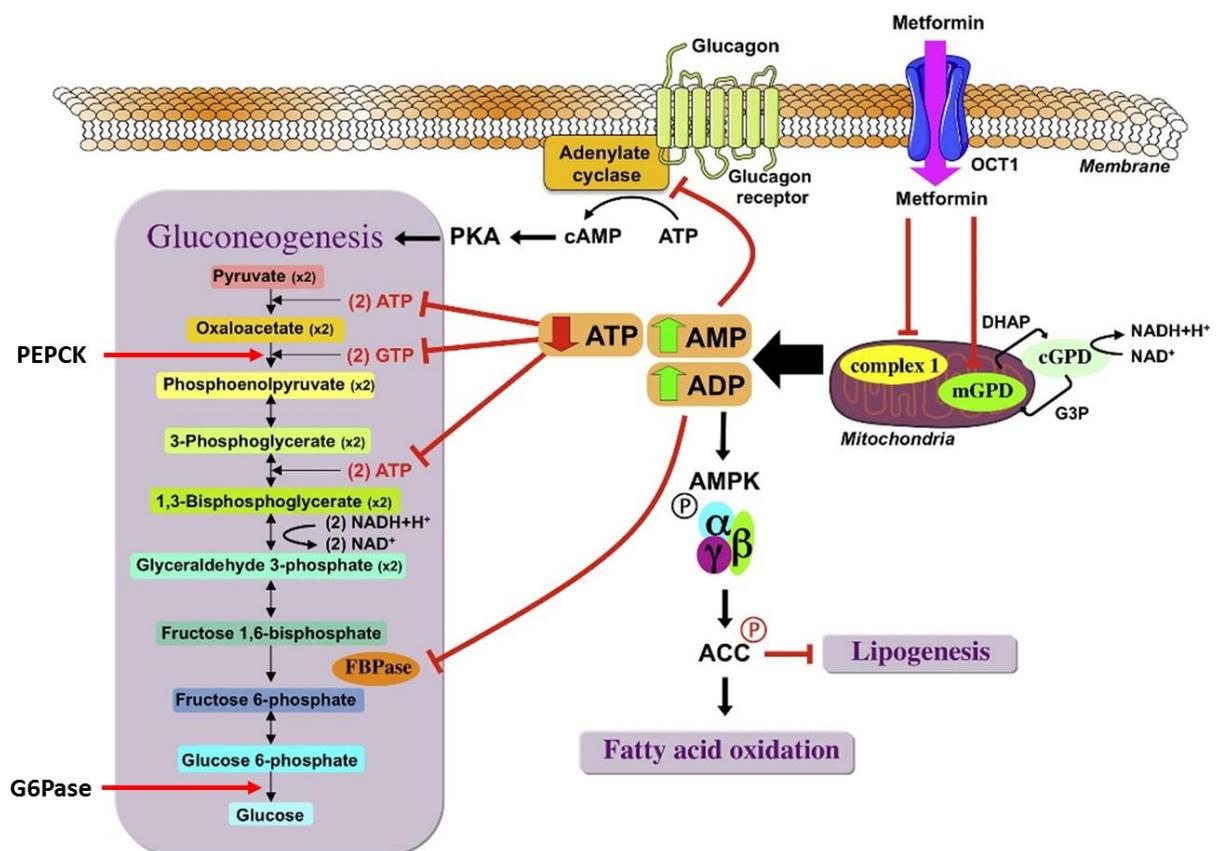


Figure 24 : Mécanismes moléculaires induits par la metformine dans la cellule hépatique.

La metformine entre par le transporteur OCT1 et inhibe le complexe I de la chaîne respiratoire, entraînant une diminution de la production d'ATP et donc une augmentation du ratio AMP/ATP et ADP/ATP. Ceci entraîne l'activation de l'AMPK et l'inhibition de l'adénylate cyclase et de la gluconéogenèse. G6Pase (glucose 6-phosphatase) et PEPCK (phosphoenolpyruvate carboxykinase) sont des protéines impliquées dans la gluconéogenèse et sont inhibées par l'AMPK. D'après (Foretz *et al.*, 2014)

Régulation du métabolisme lipidique : inhibition de la lipogenèse et activation de la β -oxydation.

L'AMPK activée phosphoryle et inactive l'acétyl-CoA carboxylase (ACC), une enzyme clé de la synthèse des acides gras. Son inhibition permet l'entrée des acides gras dans la mitochondrie entraînant ainsi la stimulation de la β -oxydation et la production d'ATP. De plus, l'AMPK supprime l'expression de SREBP-1, un facteur de transcription clé de la lipogenèse (Zhou *et al.*, 2001). De ce fait, la diminution du contenu lipidique dans le foie limite le phénomène de lipo-toxicité et contribue à améliorer la transduction du signal de l'insuline.

Absorption du glucose

Gunton *et al.* ont montré que, dans les hépatocytes, la metformine augmente l'activité du récepteur à l'insuline et de son substrat IRS-2 (« insulin receptor substrates »). Ceci se traduit par la translocation du transporteur de glucose GLUT1 au niveau de la membrane plasmique, augmentant ainsi l'entrée du glucose dans la cellule (Gunton *et al.*, 2003).

De plus, il a été montré dans des cellules de muscle strié, que la metformine entraîne une translocation des transporteurs de glucose GLUT4 vers la membrane plasmique (Fischer *et al.*, 1995). Lorsque l'AMPK est activée, elle induit la translocation du transporteur GLUT4 vers la membrane plasmique et l'entrée de glucose dans la cellule (Figure 22) (Ha *et al.*, 2015). Ceci contribue à la diminution du glucose sanguin.

ii) Effets indépendants de l'AMPK

Foretz *et al.* ont démontré que la metformine pouvait inhiber la production de glucose dans des hépatocytes de souris délétés pour l'AMPK ou le LKB1. Ceci suggère l'existence de mécanismes indépendants de l'AMPK, mais corrélés avec la diminution de la production d'ATP (Foretz *et al.*, 2010).

Inhibition de la glycérophosphate déshydrogénase (mGDP)

Magiraju *et al.* ont démontré que la metformine inhibe l'activité enzymatique de la mGDP (« mitochondrial glycerol 3-phosphate dehydrogenase »), qui bloque le transport du NADH du cytoplasme vers la mitochondrie. Ce mécanisme d'action de la metformine peut être important pour la suppression de la production de glucose hépatique chez les patients atteints de diabète qui ont des taux élevés de lactate sérique, car la conversion du lactate en pyruvate conduit à la génération de NADH. L'inhibition de la mGDP entraînera une augmentation des niveaux de NADH et une diminution des niveaux de NAD⁺, ce qui conduira à un manque de

NAD⁺ pour convertir le lactate en pyruvate. Par la suite, cette action stoppe la production de glucose par le lactate et donc diminue la gluconéogenèse (Madiraju *et al.*, 2014).

Effets de la diminution de l'ATP et de l'augmentation de l'AMP

La gluconéogenèse est une voie métabolique très consommatrice en énergie puisqu'elle nécessite 4 ATP et 1 GTP par molécule de glucose formée. Par conséquent, la diminution du contenu intracellulaire en ATP, du fait de l'inhibition du complexe I de la chaîne respiratoire, réduit le flux gluconéogénique (Figure 24) (Foretz *et al.*, 2014). De plus, l'augmentation des concentrations intracellulaires de l'AMP inhibe de manière allostérique la fructose-1,6-biphosphatase, une enzyme clé de la gluconéogenèse, contribuant à l'inhibition de la production de glucose.

Par ailleurs, comme décrit précédemment, l'augmentation des niveaux d'AMP entraîne l'inhibition des effets induits par le glucagon (Miller *et al.*, 2013).

Pour résumer, la metformine inhibe la néoglucogenèse, active la glycolyse, augmente l'entrée du glucose dans les cellules, diminue la lipogenèse et donc augmente la sensibilité des cellules à l'insuline. Ces effets passent par une inhibition du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale, ce qui diminue la production d'ATP et augmente l'AMP. Deux voies sont alors identifiées, une en réponse à l'augmentation de l'AMP, qui inhibe la voie glucagon-adénylate cyclase-PKA, et l'autre dépendante de l'AMPK. L'augmentation de l'AMP inhibe la voie glucagon-adénylate cyclase-PKA, ce qui a pour conséquence l'inhibition des enzymes de la gluconéogenèse. L'AMPK va inhiber les voies anaboliques (lipogenèse, gluconéogenèse) et activer les voies cataboliques (β -oxydation, autophagie).

3. Effets antitumoraux de la metformine dans le cancer gastrique

a. Etudes épidémiologiques

La metformine prescrite chez les patients diabétiques type 2 est donc connue pour activer l'AMPK. La sérine/thréonine kinase LKB1, régulateur en amont de l'AMPK qui participe à son activation, est connue comme étant un suppresseur de tumeur majeur (Yoo *et al.*, 2002). Evans *et al.* ont été les premiers à émettre l'hypothèse que la metformine, pouvait réduire le risque de cancer (Evans *et al.*, 2005). Ils ont donc réalisé une étude pilote cas-témoins

sur des patients diabétiques traités ou non par metformine. Ils ont montré que l'incidence de cancer était de 36,4% pour les patients diabétiques contre 39,7% pour le groupe témoin non traité par metformine (Evans *et al.*, 2005). Depuis, de nombreuses études épidémiologiques ont été réalisées sur différents types de cancer. Gandini *et al.* ont réalisé une méta-analyse démontrant une réduction de l'incidence de 31% et de la mortalité de 34% (tous cancers confondus) chez les patients diabétiques traités par metformine par rapport à ceux non traités par metformine (Gandini *et al.*, 2014).

Très récemment, Zhou *et al.*, ont publié une méta-analyse réalisée sur 7 études de cohorte incluant un total de 591 077 patients diabétiques (type 2). D'après cette étude, le risque de développer un cancer gastrique chez les patients diabétiques traités par metformine est significativement diminué (rapport de risque de 0,76) (Zhou *et al.*, 2017).

b. Propriétés antitumorales

Les potentiels effets antitumoraux de la metformine dans le cancer gastrique ont été très peu étudiés, contrairement à certains autres types de tumeurs. Les régulations identifiées, induites par la metformine dans le modèle du cancer gastrique, sont résumées Figure 26.

Kato *et al.* ont été les premiers à étudier les effets de la metformine *in vitro* et *in vivo* sur des lignées cellulaires de cancer gastrique (MKN1, MKN45 et MKN74). Ils ont montré que des doses croissantes de metformine diminuent la prolifération cellulaire *in vitro* (1 à 10 mM de metformine pendant 24, 48 et 72h). Cet effet a été confirmé *in vivo* sur des souris BALB/c-*nu/nu* par xénogreffes en sous-cutanée de cellules MKN74. Les souris ont été traitées par injection intrapéritonéale de 1 ou 2 mg de metformine par souris par jour (5 fois par semaine) pendant 4 semaines. A la fin du traitement, les tumeurs des souris traitées par metformine étaient significativement plus petites que dans le groupe contrôle (PBS). Ces effets *in vitro* et *in vivo* ont été mis en relation avec un arrêt du cycle cellulaire (lignée MKN74) (Kato *et al.*, 2012). Pour compléter cette étude, ils ont analysé les différences d'expression de mi-RNA en réponse à la metformine *in vitro* et *in vivo*. Les mi-RNA de la famille let-7, connus pour leurs effets anti-tumoraux, sont surexprimés en réponse au traitement, expliquant en partie l'inhibition de la prolifération et de la croissance tumorale (Kato *et al.*, 2012). Ils ont ainsi démontré pour la première fois le potentiel antitumoral de la metformine dans un modèle de cancer gastrique.

Plusieurs études ont suivi pour déterminer les mécanismes d'action impliqués dans la carcinogenèse gastrique, pouvant être ciblés par la metformine.

En 2015, Chia *et al.* ont montré que les facteurs de transcription KLF5 et GATA4/GATA6 sont amplifiés et co-exprimés dans 30% des cancers gastriques. La délétion de ces facteurs, seuls ou en combinaison, diminue la prolifération *in vitro* et *in vivo*. Au contraire, la surexpression simultanée des trois facteurs augmente la prolifération *in vitro* et *in vivo*. KLF5 interagit physiquement avec les facteurs GATA et des techniques de ChIp (« chromatin immunoprecipitation ») indiquent que ces facteurs interagissent fortement avec des séquences promotrices. Une de leurs cibles directes est HNF4 α (« hepatocyte nuclear factor-4 α ») connu pour être surexprimé dans de nombreux types de cancer, et impliqué dans la prolifération. Lorsque KLF5 ou GATA6 sont inhibés par l'utilisation de siRNA, l'expression de HNF4 α est significativement diminuée. De plus, lorsque l'expression de HNF4 α est inhibée, la prolifération cellulaire est inhibée elle aussi. Enfin, l'expression de HNF4 α est connue pour être sous le contrôle (répression) de l'AMPK. Ainsi, ils ont montré que le traitement *in vitro* par la metformine diminue l'expression de HNF4 α et diminue la prolifération cellulaire (Chia *et al.*, 2015).

En 2016, Chang *et al.* ont confirmé la surexpression de HNF4 α dans le cancer gastrique par une analyse des profils transcriptomiques de 22 tumeurs gastriques (en comparaison à une zone non-tumorale). Des techniques d'inhibition de HNF4 α , shRNA ou antagonistes pharmacologiques tels que BL6015 ou metformine, ont montré des effets antinéoplasiques *in vitro* ou *in vivo* sur des lignées cancéreuses gastriques. Ainsi, comme montré précédemment, la metformine active l'AMPK qui inhibe à son tour l'activité de HNF4 α . Les conséquences sont : une diminution de cyclines, un arrêt du cycle cellulaire ainsi qu'une inhibition de la croissance tumorale. Enfin, un des gènes cible de HNF4 α est le gène codant pour WNT5A. Lorsque l'expression de HNF4 α est inhibée, celle de WNT5A est diminuée, suggérant que l'inhibition de HNF4 α inhibe la voie WNT, connue pour être impliquée dans la carcinogenèse gastrique (Chang *et al.*, 2016).

Ces deux précédentes études démontrent un mécanisme d'action intéressant de la metformine à travers sa capacité à activer l'AMPK qui vient contrer les effets positifs de KLF5/GATA4/GATA6 sur l'expression de HNF4 α et la voie WNT (Figure 26).

La voie WNT/ β -caténine est connue pour être dérégulée avec une surexpression de la β -caténine dans le cancer gastrique. Cette voie est impliquée dans l'induction de la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) et dans les propriétés d'auto-renouvellement des CSC. D'après les résultats de l'étude précédente de Chang *et al.*, on peut suggérer que la metformine

est capable de reverser l'EMT dans le cancer gastrique. C'est ce qu'ont montré les études récentes de Valaee *et al.* et Jun *et al.* sur la lignée cellulaire gastrique AGS. En effet, le traitement de la lignée AGS avec la metformine diminue l'expression de la β -caténine et de la vimentine (Valaee *et al.*, 2017) ainsi que du MMP9 (« matrix metalloproteinase-9 ») et du VEGF (« Vascular endothelial growth factor ») (Jun *et al.*, 2015). Au contraire, l'expression de la E-cadhérine est augmentée en réponse au traitement (Jun *et al.*, 2015; Valaee *et al.*, 2017). Au niveau fonctionnel, la metformine diminue la viabilité cellulaire et les capacités de migration et d'invasion (Valaee *et al.*, 2017).

Huang *et al.* ont identifié un autre mécanisme moléculaire impliqué dans la réponse à la metformine et pouvant inhiber l'EMT. Celui-ci passe par l'inhibition de la surexpression de l'oncogène Bmi-1 rencontré dans de nombreux types de cancer, dont le cancer gastrique. L'activation de l'AMPK par la metformine (10 mM), et dépendamment de LKB1, diminue l'expression de Bmi-1 dans les cellules cancéreuses (lignée AGS). Cet effet est dépendant de LITAF (« lipopolysaccharide-induced TNF α factor ») qui est un facteur de transcription impliqué dans la réponse inflammatoire. En réponse au LPS, LITAF est transloqué dans le noyau et induit l'expression de cytokines pro-inflammatoires telle que le TNF α . LITAF induit l'expression de différents miRNA : hsa-miR-15a, hsa-miR-194, hsa-miR-128, hsa-miR-192. Chacun de ces miRNA diminue l'expression de Bmi-1. Au niveau fonctionnel, l'inhibition de LITAF par l'utilisation d'un shRNA, augmente la formation de colonies et la migration cellulaire, qui sont des caractéristiques induites par l'EMT. Cette étude présente donc un nouvel axe de régulation de l'EMT, *via* l'activation de l'AMPK-LITAF-miRNA qui va inhiber l'expression de l'oncogène Bmi-1 (Huang *et al.*, 2016).

Song *et al.* ont très récemment mis en évidence que la metformine pouvait aussi réguler une autre voie de signalisation connue pour son implication dans la carcinogenèse gastrique, la voie Sonic hedgehog (Shh). Son activation est essentielle au maintien des CSC gastriques (Song *et al.*, 2011). Dans des lignées cellulaires gastriques (HGC-27 et MKN-45), l'expression (ARNm et protéine) de Shh et de Gli-1, Gli-2 et Gli-3 est diminuée en réponse à la metformine. Cet effet disparaît lorsque l'AMPK est inhibée par l'utilisation d'un siRNA. Ainsi, la metformine, *via* l'AMPK, inhibe la voie de signalisation Sonic hedgehog (Z. Song *et al.*, 2017).

En 2015, Han *et al.* ont étudié les effets apoptotiques de la metformine dans des lignées de cancer gastrique ainsi que dans une lignée non-cancéreuse épithéliale gastrique (GES-1). Dans les lignées cancéreuses uniquement, la metformine (48h - 5mM) induit l'expression et

l'activité des Caspases 3 et 7 et de PARP. Cet effet est combiné avec une diminution de l'expression de la survivine (Han *et al.*, 2015). La survivine est une protéine membre de la famille des inhibiteurs d'apoptose (IAP), qui régulent deux processus cellulaires essentiels : l'inhibition de l'apoptose et l'induction de la prolifération cellulaire (Ryan *et al.*, 2009). La survivine, connue pour être surexprimée dans de nombreux types de cancer, est considérée comme marqueur pronostique pertinent, comme c'est le cas dans le cancer gastrique (Liu *et al.*, 2013), et représente une cible thérapeutique intéressante. Han *et al.* ont montré que l'effet de la metformine sur la survivine et l'induction de l'apoptose passe par l'activation de l'AMPK et l'inhibition de mTOR (« mammalian Target Of Rapamycin »), un effecteur de l'AMPK (Han *et al.*, 2015).

La voie de signalisation mTOR intègre à la fois des signaux intracellulaires et extracellulaires et sert de régulateur central du métabolisme cellulaire, de la croissance, de la prolifération et de la survie. mTOR est une sérine/thréonine kinase organisée au sein de 2 complexes : mTORC1 et mTORC2. mTORC2 est impliqué dans la régulation de la survie cellulaire, de la prolifération, du métabolisme et dans l'organisation du cytosquelette et de la mobilité cellulaire. Il est régulé par la voie PI3K et active Akt et PKC (Figure 25). mTORC1 est régulé positivement par les voies PI3K/Akt et MAP Kinases, et négativement par l'AMPK (Laplante and Sabatini, 2009). Afin de se développer et de se diviser, les cellules doivent augmenter la production de protéines, de lipides et de nucléotides tout en supprimant les voies cataboliques telles que l'autophagie. mTORC1 joue un rôle central dans la régulation de tous ces processus et contrôle donc l'équilibre entre l'anabolisme et le catabolisme en réponse aux conditions environnementales (disponibilité en acides aminés et en ATP) (Figure 25). La dérégulation de mTORC1 est impliquée dans divers processus cellulaires tels que la formation de tumeurs ou l'angiogenèse (Saxton and Sabatini, 2017). L'activation de mTORC1 a été démontrée dans divers types de cancer, y compris le cancer gastrique (Yu *et al.*, 2015). Ces observations ont suscité un large intérêt scientifique et clinique pour mTOR, d'où l'utilisation croissante des inhibiteurs de mTOR comme la rapamycine ou ses analogues (rapalogues), dans le traitement des tumeurs solides. Aussi, la capacité de la metformine à inhiber mTORC1 est particulièrement intéressante et révélatrice de ses propriétés antitumorales.

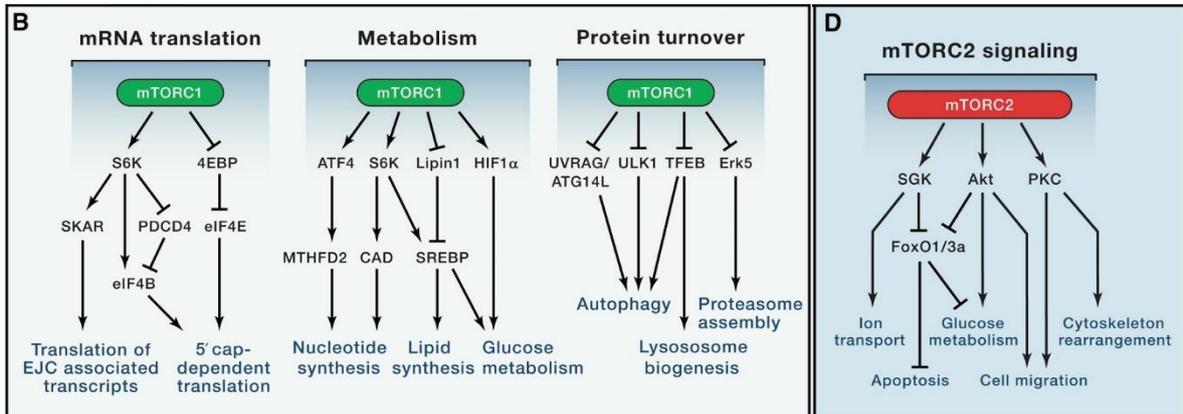
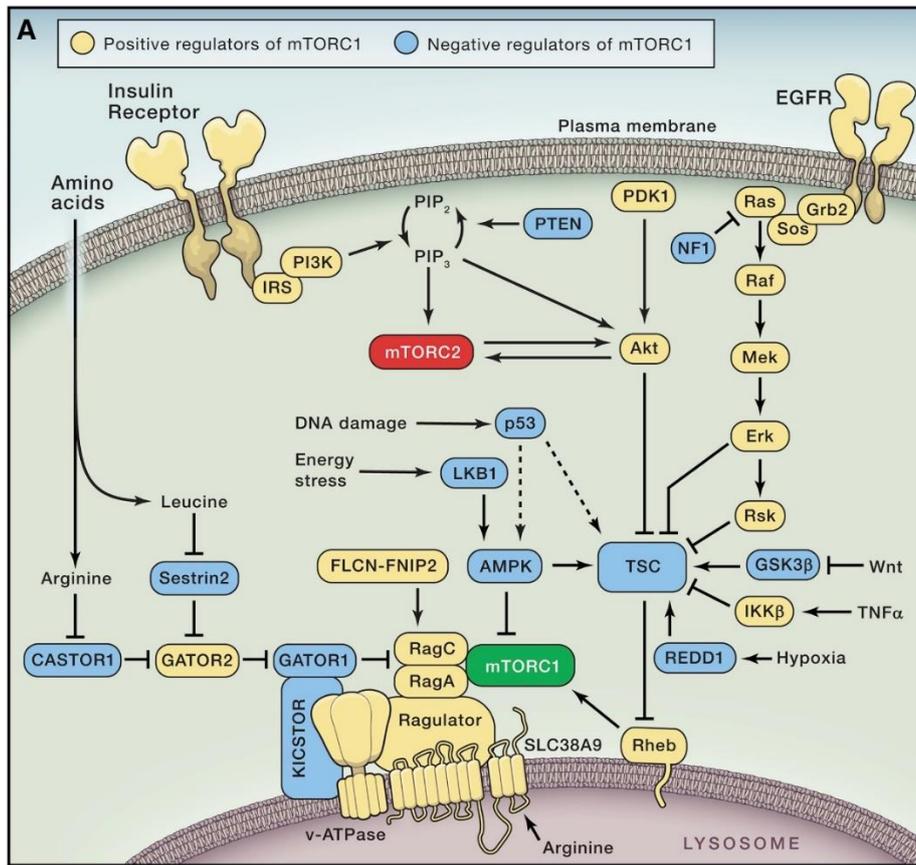


Figure 25 : Voies de signalisation mTORC1 et mTORC2.

(A) Voies de signalisation régulant mTORC1 et mTORC2. Les régulateurs positifs sont indiqués en jaune, tandis que les régulateurs négatifs sont affichés en bleu. (B) Effecteurs régulés par mTORC1 et (D) mTORC2. D'après (Saxton and Sabatini, 2017)

Dans leur modèle (lignées cancéreuses gastriques), Chen *et al.* ont montré que la metformine (10 à 50 mM) diminue la prolifération, induit l'apoptose et diminue les capacités de migration et d'invasion des cellules. Ces données sont en accord avec les études citées précédemment. Ils ont aussi démontré que cette action de la metformine est liée à l'inhibition de HIF1 α et PKM2 qui sont surexprimés dans les tumeurs de patients atteints de cancer gastrique, et cette surexpression est corrélée avec le stade du cancer (Chen *et al.*, 2015).

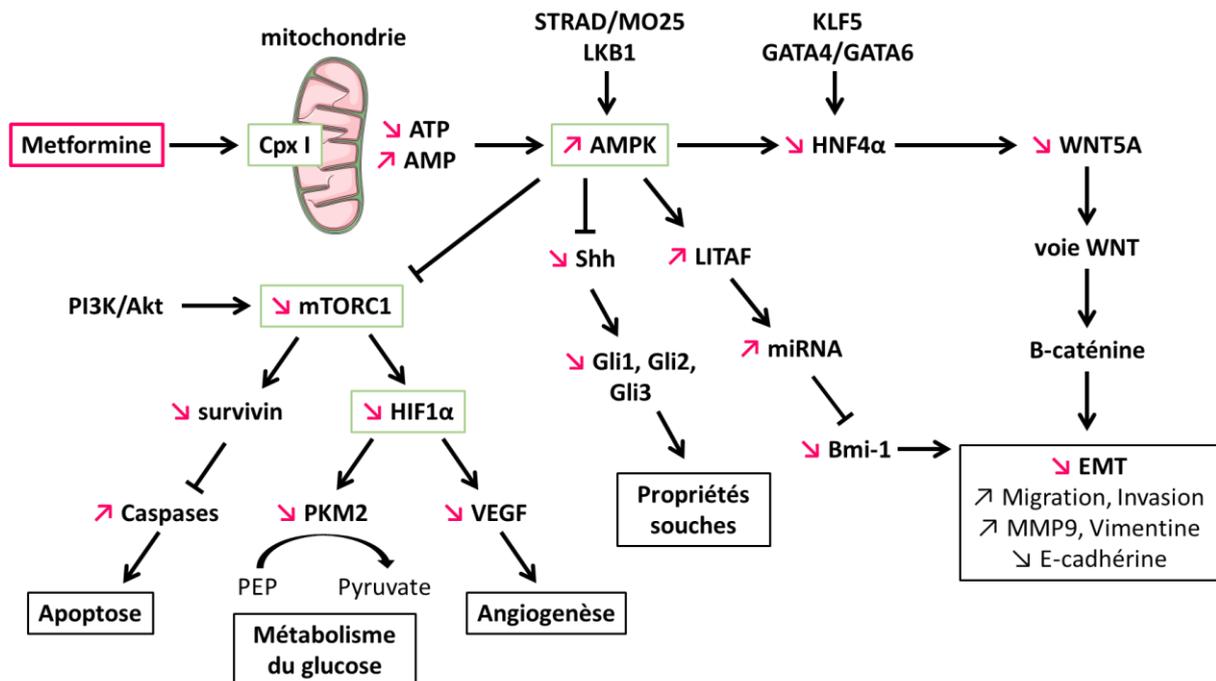


Figure 26 : Mécanismes moléculaires identifiés dans la réponse à la metformine dans le modèle de cancer gastrique.

Les flèches colorées indiquent les régulations induites par la metformine.

Enfin, des études *in vivo* ont été menées par Yu *et al.* afin de tester l'efficacité de la metformine sur la croissance tumorale. L'inhibition de la croissance tumorale, sur un modèle de xénogreffe, en réponse à la metformine seule avait déjà été démontrée par Kato *et al.* (Kato *et al.*, 2012). Cependant dans le modèle de Yu *et al.* (lignée MKN45), même si la metformine diminue la taille des tumeurs, cette différence n'est pas significative (Yu *et al.*, 2015). Ils ont également étudié les effets de la metformine seule ou en combinaison avec la cisplatine (chimiothérapie conventionnelle) ou la rapamycine (inhibiteur de mTORC1). La combinaison des 2 molécules diminue significativement le volume et le poids des tumeurs, par rapport à la condition non traitée (Yu *et al.*, 2015). Cependant, une autre étude réalisée par Lesan *et al.*,

remet en question cette synergie entre la metformine et la cisplatine. La cisplatine est une chimiothérapie largement utilisée dans le traitement de divers types de cancer, y compris le cancer gastrique, comme nous l'avons précédemment présenté. Son activité anticancéreuse repose sur sa capacité d'interaction avec les bases puriques de l'ADN induisant la formation d'interactions ADN-protéines intra et inter-brins, qui bloquent la transcription, et la réplication cellulaire et induisent l'apoptose.

In vitro, la metformine et la cisplatine, de manière séparée diminuent la prolifération cellulaire et induisent l'apoptose de la lignée MKN45. Cependant, l'association des deux molécules diminue significativement les effets de la cisplatine seule. L'augmentation de l'expression de la survivine, de mTOR et de Akt, rencontrée lors de l'utilisation combinée des 2 molécules, en serait la cause. Cependant, il n'y a pas eu d'étude *in vivo* qui a été réalisée (Lesan *et al.*, 2014).

Toutes ces études prouvent et confirment les propriétés antitumorales de la metformine dans le cancer gastrique.

4. Ciblage des CSC par la metformine

Hirsch *et al.* ont été les premiers à étudier les effets de la metformine sur la population de cellules souches dans le modèle du cancer du sein. Ils ont démontré que la metformine, à faible dose, diminue *in vitro* le nombre de mammosphères (ou tumorsphères à partir de lignées cellulaires mammaires). De plus, la proportion de CSC (CD44^{high}/CD24^{low}) dans les lignées mammaires est diminuée en présence de metformine et non en présence de tamoxifène seul. Le pré-traitement des cellules avec la metformine une heure avant leur xéno greffe chez la souris a inhibé totalement la formation de tumeurs. De plus, l'utilisation combinée des 2 molécules diminue *in vitro* la quantité totale de cellules cancéreuses et diminue aussi la quantité de CSC. *In vivo* la combinaison des 2 molécules inhibe la rechute après l'arrêt du traitement (Hirsch *et al.*, 2009).

Depuis, plusieurs études ont également démontré un effet anti-CSC de la metformine dans d'autres types de cancers tels que le cancer des ovaires (Shank *et al.*, 2012), du pancréas (Bao *et al.*, 2012) ou le cancer colorectal (Zhang *et al.*, 2013). Mais jusqu'à présent, aucune étude n'a été menée afin d'étudier la capacité de la metformine à cibler les CSC gastriques.

Objectifs

Les objectifs de ma thèse ont été dans un premier temps d'évaluer la capacité de la metformine à cibler les CSC gastriques (Article 1).

Au cours de ce travail, nous avons découvert fortuitement une propriété antibactérienne de la metformine vis à vis de *H. pylori*. L'objectif du second article était donc de confirmer cette activité antibactérienne *in vitro* et *in vivo* (Article 2).

Enfin, le dernier axe de recherche consistait à caractériser les effets de l'infection par *H. pylori* sur la voie de signalisation mTOR, et ses conséquences dans la carcinogenèse gastrique (Article 3).

Résultats expérimentaux

Article 1

Article 1 : La metformine est capable de cibler les CSC gastriques

La découverte des cellules souches cancéreuses (CSC), capables de générer de nouvelles tumeurs et de résister aux chimiothérapies et aux radiothérapies conventionnelles, a bouleversé le domaine de la recherche sur le cancer, entraînant le développement de nouvelles thérapies ciblant ces CSC.

Parmi les molécules ciblant les CSC, la metformine a retenu notre attention. En effet, la metformine a été décrite dans d'autres modèles de carcinogénèse (cancers du sein, de la prostate, des ovaires, cancer colorectal et glioblastomes) comme étant capables de cibler les CSC. Au moment où ce travail a été initié aucune étude ne rapportait un éventuel effet de la metformine sur les CSC dans le cancer gastrique.

Comme nous l'avons vu, le traitement de l'adénocarcinome gastrique repose sur l'utilisation de chimiothérapies conventionnelles combinée à la chirurgie. Il n'existe pas de traitement spécifique, exception faite pour les cancers gastriques de sous-type CIN, présentant une amplification génique du gène codant pour HER2, et pouvant être traités avec l'herceptine. Ainsi, de nouvelles stratégies thérapeutiques sont nécessaires. Dans ce contexte nous nous sommes intéressées à la metformine, cet antidiabétique aux propriétés anti-tumorales. Le but de cette étude a donc été de confirmer les effets anti-tumoraux de la metformine dans le cancer gastrique et surtout, de déterminer si cette molécule était capable de cibler les CSC gastriques.

Ainsi, les effets de la metformine ont été évalués sur des lignées cellulaires cancéreuses gastriques et sur des tumeurs de patients amplifiées par xénogreffes chez la souris (patient-derived primary tumour xenografts PDXs). Chacun de ces deux modèles comprend des cellules avec des propriétés de CSC, exprimant le CD44 et capables de former des tumeurs *in vivo* et des tumorsphères *in vitro*. La prolifération et le cycle cellulaire ont été évalués en présence de différentes concentrations de metformine. Celle-ci diminue la prolifération cellulaire et entraîne un arrêt du cycle avec accumulation des cellules en phase G2/M. La metformine est également capable d'inhiber la formation de tumorsphères *in vitro*, et diminue l'expression des marqueurs de cellules souches (CD44 et Sox2) et augmente l'expression des marqueurs de différenciations (KLF4 et Muc5AC). Enfin, *in vivo*, la metformine diminue la croissance tumorale et la capacité d'auto-renouvellement des CSC. Ces données nous ont permis de conclure que la metformine possède des propriétés antitumorales et est capable de cibler les CSC gastriques.

Ce travail a été publié en 2017 dans European Journal of Cancer.



Original Research

Metformin targets gastric cancer stem cells



Sarah Courtois^a, Raúl V. Durán^{b,c,d}, Julie Giraud^a, Elodie Sifré^a,
Julien Izotte^{a,e}, Francis Mégraud^{a,f}, Philippe Lehours^{a,f},
Christine Varon^a, Emilie Bessède^{a,f,*}

^a INSERM, Univ. Bordeaux, UMR1053 Bordeaux Research in Translational Oncology, BaRITOn, F-33000 Bordeaux, France

^b Institut Européen de Chimie et Biologie, 2 Rue Robert Escarpit, 33607 Pessac, France

^c INSERM U1218 Unit, Institut Bergonié, 229 Cours de l'Argonne, 33076 Bordeaux, France

^d University of Bordeaux, 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux, France

^e Animal Facilities, University of Bordeaux, 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux, France

^f CHU de Bordeaux, Laboratoire de bactériologie, Place Amélie Raba Léon, 33076 Bordeaux, France

Received 26 April 2017; received in revised form 14 July 2017; accepted 18 July 2017

KEYWORDS

Gastric carcinoma;
CD44;
Primary tumour;
Xenograft;
Self-renewal;
Tumourspheres

Abstract Gastric cancer is the third leading cause of cancer-related deaths worldwide and has still a poor prognosis. Therefore, new therapeutic strategies are needed: among them, targeting cancer stem cells (CSCs) could offer new opportunities. The aim of our study was to evaluate the anti-tumoural effect of metformin on gastric cancer *in vitro* and *in vivo* and especially, to determine whether this molecule could target the gastric CSCs. Metformin effects were evaluated on the proliferation and tumorigenic properties of the gastric CSCs from patient-derived primary tumour xenografts (PDXs) and cancer cell lines (MKN45, AGS and MKN74) *in vitro* in conventional 2 dimensional (2D) and in 3 dimensional (3D) culture systems, in which only CSCs are able to form tumourspheres and in mouse xenograft models *in vivo*. Metformin induced a cell cycle arrest, which decreased cell proliferation in the 2D cultures. In a 3D culture system, metformin decreased the number of tumourspheres, revealing its capacity to target the CSCs. This effect was confirmed by the study of the expression of CSC markers (CD44 and Sox2) and differentiation markers (Kruppel-like factor 4 and MUC5AC), which were decreased or increased in response to metformin, respectively. Finally, *in vivo* treatment of PDXs with metformin led to a tumour growth delay and decreased the self-renewal ability of the CSCs. These results suggest that the use of metformin could represent an efficient strategy to inhibit tumour growth by targeting gastric CSCs.
© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

* Corresponding author.

E-mail address: emilie.bessede@u-bordeaux.fr (E. Bessède).

1. Introduction

Gastric cancer is the third leading cause of cancer-related deaths worldwide (World Health Organisation, 2012). Gastric carcinoma (GC) constitutes the majority of the cases. Based on histological criteria, they are mainly classified in two subtypes: diffuse and intestinal [1]. This cancer has a poor prognosis. The current treatment is essentially based on surgery combined with conventional chemotherapies [2], which can reduce the tumour burden, but their effects are usually transient because resistance to chemotherapy lies mainly in the cancer stem cell (CSC) population [3]. These CSCs are characterised by self-renewal and asymmetrical division properties, as well as their ability to generate tumour cells with different phenotypes [4]. They are at the origin of the differentiated cells composing the tumour mass. Therefore, targeting CSCs is a rational approach to prevent tumour recurrence.

Metformin, a well-known anti-diabetic drug, inhibits hepatic gluconeogenesis and enhances glucose uptake in skeletal muscles [5]. In addition to its anti-diabetic properties, epidemiological studies have shown that patients treated with metformin for their diabetes developed significantly less cancer than those not treated [6,7]. Following this finding, several publications on different types of cancer concluded that metformin possesses an anti-cancer activity [8–11]. Concerning GC, metformin is known to inhibit the proliferation of tumour cells *in vitro* and *in vivo* [12,13]. However, no studies addressed the role of metformin in targeting gastric CSCs. In this context, the aim of our study was to evaluate the anti-tumoural effect of metformin on GC *in vitro* and *in vivo* and especially, to determine whether this molecule could target the gastric CSCs.

Our results confirmed the anti-proliferative effect of metformin on GC cell lines. We also show that metformin decreases the number of tumourspheres in curative and preventive treatments. This effect correlates with a decrease in the expression of CSC markers and an increase in the expression of the differentiation markers. Finally, *in vivo* treatment with metformin induces a tumour growth delay and decreases the tumourigenic properties of the residual GC.

2. Materials and methods

2.1. Gastric cancer cell lines and patient-derived tumour xenografts

The gastric epithelial cell lines AGS, MKN45 and MKN74 were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)/F12 media for AGS or Roswell Park Memorial Institute (RPMI)-1640 media for the two others, supplemented with GlutaMAX, 10% heat-inactivated foetal bovine serum, penicillin and

streptomycin (all from Invitrogen, Cergy-Pontoise, France), at 37 °C in a humidified 5% CO₂ atmosphere.

GC04, GC06, GC07 and GC10 are patient-derived primary tumour xenografts (PDXs), which were established by serial transplantation in NOD scid gamma (NSG) mice as previously described [14].

2.2. Tumoursphere culture and treatment

To evaluate the capacity of cells to form tumourspheres, cells were seeded in non-adherent plates (previously coated with a 10% poly-2-hydroxyethylmethacrylate [polyHEMA, Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France]) in a serum-free medium containing 3 or 6 g/l of glucose. Cell lines and PDXs were treated with 0–50 mM of metformin, and the number of tumourspheres formed was determined after 12 days of treatment.

2.3. RNA extraction and quantitative reverse transcription quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR)

Total cellular RNAs were extracted using TRIZOL reagent (Invitrogen). Retrotranscription was performed with 1 µg of total RNA using the QuantiTect Reverse Transcription kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's recommendations. Quantitative polymerase chain reaction (PCR) was performed using the SYBR qPCR Premix Ex Taq (TAKARA Bio, Japan) with specific primers at 0.2 µM.

2.4. Flow cytometry analysis

A propidium iodide solution was used to study the cell cycle as previously described [15]. Cells were stained with anti-CD44-APC antibody (1:25 each, BD Pharmingen, San Jose, CA, USA) [14,16].

2.5. Ethics statement

Animal experiment procedures were performed with the agreement of the local Ethics Committee on Animal Experiments CEEA50 of Bordeaux (agreement number 50120151-A) and the French Committee of Genetic Engineering (approval number 4608).

2.6. *In vivo* xenograft experiments

GC cell lines MKN45 and MKN74 and PDX GC10 cells (1×10^5 cells) were suspended in 100 µl of 7 mg/ml ice-cold Matrigel (BD Biosciences) and subcutaneously injected into the dorsal flank of the 7-week-old NSG mice. When the tumour size reached 200 mm³, a daily intraperitoneal injection of 200 µl of phosphate buffered saline (PBS) (control group) or metformin solution at a dose of 250 mg/kg per mouse was performed.

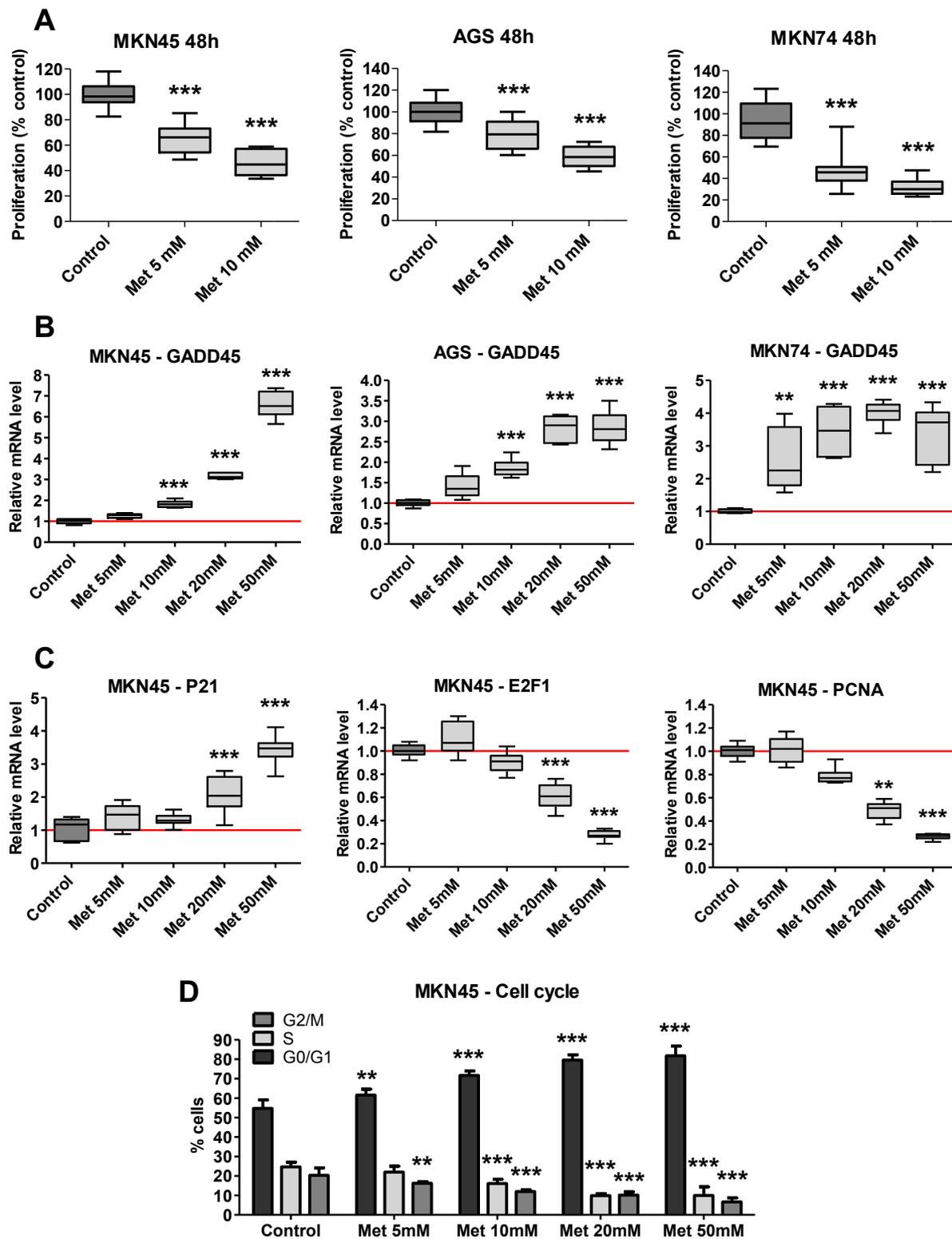


Fig. 1. Metformin inhibits cellular proliferation of cultured gastric cancer cells. (A) Cell lines were seeded in 24-well plates and treated with 0–10 mM of metformin. After 48 h, the number of cells was determined for each condition. The results are expressed as percentages of cells compared with control (0 mM). Data represent the mean and the interval of values ($6 < n < 15$). *** $p < 0.001$ versus control; One-way ANOVA with Bonferroni post-test. (B, C) Cell lines were treated with 0–50 mM of metformin for 48 h. Relative mRNA level of GADD45, P21, E2F1 and PCNA, determined by RT-qPCR (relative to control and to housekeeping genes mRNA HPRT1 and TBP). Data represent the mean and the interval of values ($n = 3$). ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$ versus control; One-way ANOVA with Bonferroni post-test. (D) Propidium iodide staining and flow cytometry analysis of MKN45 cell line after 72 h of treatment with 0–50 mM of metformin. Data represent the mean and the interval of values ($n = 3$). ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$ versus control; One-way ANOVA with Bonferroni post-test. PCNA, proliferating cell nuclear antigen.

The mice were euthanised after 12 days of treatment. Tumours were collected. One part was embedded in paraffin, following standard procedures for immunohistochemical studies. Another part was dissociated with collagenase IV and hyaluronidase after mechanical mincing to study the self-renewal capacities and the CD44 expression.

2.7. Histology and immunohistochemistry

Tissue sections, 3- μ m thick, were prepared from formalin-fixed paraffin-embedded tissues and submitted to standard immunohistochemistry (IHC) protocols with mouse anti-CD44 (1:100, G44-26, BD Pharmingen) antibody.

2.8. Statistical analysis

Quantification values represent the mean and the interval of values. Statistics were performed using the Mann & Whitney test or One-Way analysis of variance (ANOVA) for multiple comparisons on GraphPad Prism, version 7.02 (La Jolla, CA, USA). Differences were considered significant at $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Metformin has an anti-proliferative effect

To evaluate the inhibitory effect of metformin in tumour growth, three GC cell lines were included in our study (MKN45 and AGS of the diffuse type; MKN74 of the intestinal type). The proliferation of the cells in 2 dimensional culture and in the presence or absence of metformin was evaluated (Fig. 1A). After 48 h of metformin treatment, the percentage of cells was significantly decreased in all cell lines from a concentration of 5 mM. Cell proliferation was reduced to an extent of more than half when MKN74 and MKN45 were treated with 10 mM of metformin (Fig. 1A).

The expression of GADD45, a stress sensor and a cell-cycle regulator [17], was significantly increased in a dose-dependent manner by metformin in the three cell lines (Fig. 1B). This results correlated in MKN45 cells with i) an increase in the expression of the cyclin-dependent kinase inhibitor P21, implicated in cell-cycle G1/S checkpoint regulation and ii) a decrease in expression of the pro-proliferating transcription factor E2F1 and the proliferating cell nuclear antigen (PCNA), for the most part observed with the highest doses of metformin (20 and 50 nM) (Fig. 1C). These changes revealed a cell cycle arrest in response to metformin treatment confirmed by the flow cytometry cell-cycle analysis of the MKN45 cell line (Fig. 1D). Indeed, the percentage of cells in the G0/G1 phase increased from 55% to 82% in a dose-

dependent manner, whereas the percentage of cells in the S phase decreased from 25% to 10% and the percentage in the G2/M phase from 20% to 7%.

These data confirm the anti-proliferative effect of metformin on GC cell lines *in vitro*.

3.2. Metformin reduces tumoursphere formation in 3D cultures of GC cell lines and PDXs

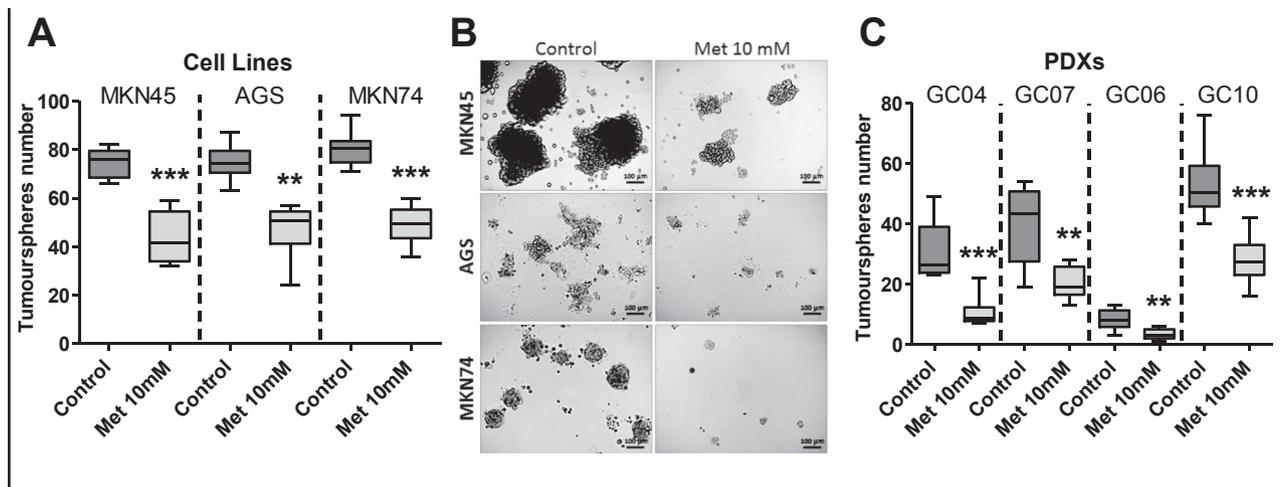
The capacity of cells to form tumourspheres in a 3 dimensional (3D) culture system reflects the self-renewal capacities of the CSCs and is a way to evaluate the presence of CSC-like cells. Thus, tumoursphere formation experiments were performed with the three GC cell lines, as well as cells from four PDXs (GC04, GC07, GC06 and GC10). The effects of metformin treatment on tumoursphere formation and on the regression of pre-established tumourspheres were evaluated as previously described [18].

Addition of metformin to the culture medium at the time of cell plating prevented the formation of tumourspheres (Fig. 2A). This decrease was observed in all three GC cell lines in a dose-dependent manner (Supplemental Fig. S1A). In addition, the size of the remaining tumourspheres treated with metformin was significantly reduced in contrast to the untreated tumourspheres (Fig. 2B and Supplemental Fig. S1B).

GC cells were dissociated from freshly collected PDXs, amplified in immunodeficient mice and submitted to the *in vitro* tumoursphere assay in the presence of 10 mM of metformin. With metformin, a decrease in the number of tumourspheres was observed in the four PDXs and associated with a decrease in the tumoursphere size (Fig. 2C and Supplemental Fig. S1C). For the three intestinal type (GC04, GC07 and GC10), the decrease was two- to three-fold. For the diffuse type GC06, even though the number of tumourspheres was globally low compared with the other three PDXs, the decrease was nonetheless significant.

To evaluate the curative effect of metformin treatment, metformin was added to the culture medium of already formed tumourspheres after 5 days of culture. The number of tumourspheres was followed until the 12th day. A decrease in the number and size of the tumourspheres was observed in all the cell lines (Fig. 2D and E). For MKN45 and MKN74, the decrease was significant at low metformin concentrations, whereas for AGS, the effect was significant only at 20 mM and 50 mM (Supplemental Fig. S1D). Considering the PDXs, the number of tumourspheres decreased by half with the metformin treatment in all of the different PDX cells (Fig. 2F). To determine if the metformin anti-tumoursphere activity was due to its hypoglycemic effect, a tumoursphere formation assay has been performed in a medium containing high glucose

Preventive treatment



Curative treatment

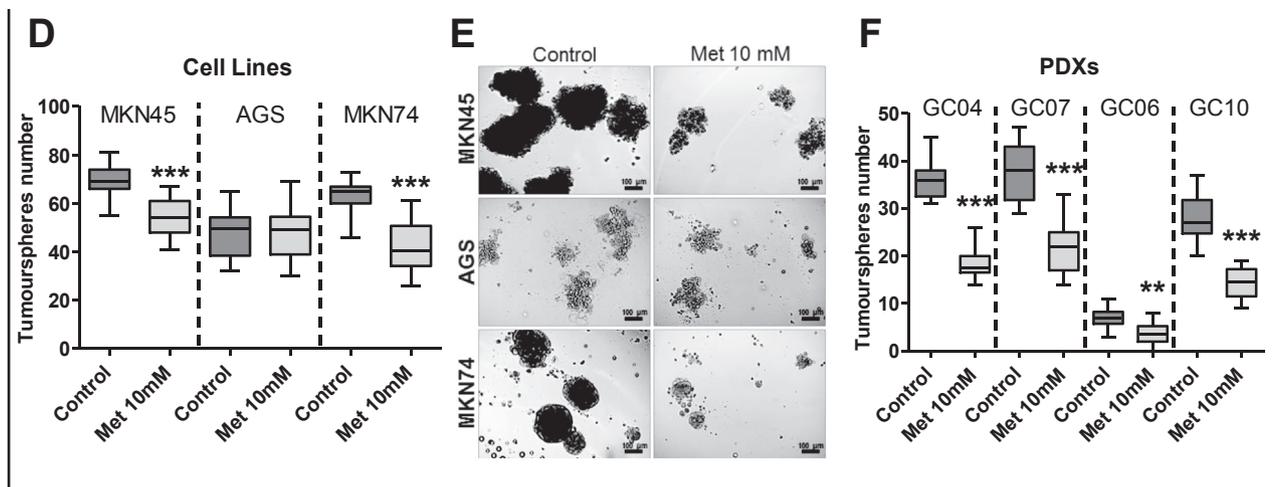


Fig. 2. Metformin inhibits tumourspheres formation and growth. Cell lines and PDXs were cultured under non-adherent conditions. Preventive treatment: A, B, C. To study the effect of metformin on the tumoursphere formation, cell lines and PDXs were treated with 10 mM of metformin at day 0 and the tumourspheres formed were counted at day 12. (A) Quantification of tumourspheres of cell lines MKN45, AGS and MKN74 cell lines, 200, 1000 and 500 seeded cells per wells, respectively. (B) Representative images of cell lines tumourspheres. (C) Quantification of tumourspheres formed by PDXs (1000 seeded cells). Curative treatment: D, E, F. Tumourspheres at day 5 of culture were treated with 10 mM of metformin. (D, F) Quantification of remaining tumourspheres at day 12 after treatment. (E) Representative images of cell lines tumourspheres. Data represent the mean and the interval of values ($10 < n < 20$). * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$ versus control; Mann & Whitney test. PDXs, patient-derived primary tumour xenografts.

concentration. In the presence of high glucose concentration, the number of tumoursphere was increased (Fig. S2), as already described by others [19].

These results show that metformin prevents tumoursphere formation and is able to suppress tumoursphere growth.

3.3. Metformin represses the expression of CSC markers and upregulates the expression of differentiation markers

The expression of the cell surface marker CD44, considered as a CSC marker in GC [18,20], was

evaluated by flow cytometry in response to metformin in AGS and MKN45 cells only because MKN74 expresses CD44 at very low level [16]. The percentage of cells highly expressing CD44 and corresponding to the CSC population, decreased in response to metformin. In AGS cells, the decrease was dose dependent and significant from 5 mM of metformin upward. In MKN45, the decrease was significant for the highest doses of metformin only (20 and 50 mM; Fig. 3A).

To confirm the effect of metformin on gastric CSC markers, RT-qPCR was performed on CD44 and on the transcription factor Sox2. Sox2 is known to sustain stem

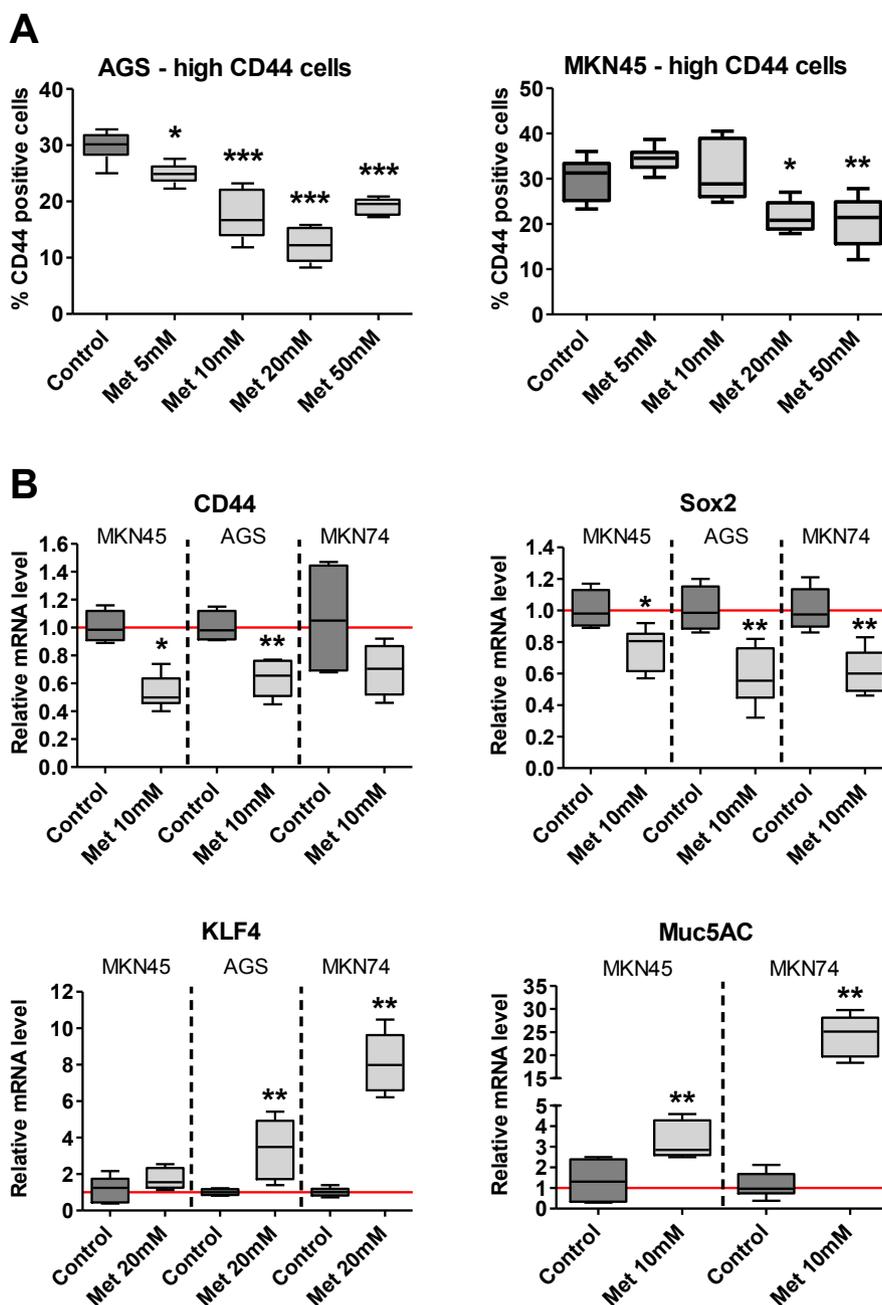


Fig. 3. Metformin decreases the expression of CSC markers and increases the expression of differentiation markers in cell lines. (A) AGS and MKN45 cell lines were treated with 0–50 mM of metformin for 48 h. Then cells were stained with anti-CD44-APC antibody and analysed by flow cytometry. (A) represents the percentage of cells strongly expressing CD44. Data represent the mean and the interval of values ($n = 6$). * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$ versus control; One-way ANOVA with Bonferroni post-test. (B) Cell lines were treated with 10 mM of metformin for 48 h. Relative mRNA level of CD44, Sox2, KLF4 and Muc5AC determined by RT-qPCR (relative to control [PBS] and to housekeeping genes mRNA HPRT1 and TBP). Data represent the mean and the interval of values ($n = 3$). * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$ versus control; Mann & Whitney test. KLF4, Kruppel-like factor 4.

cell properties (and, in particular, to maintain self-renewal and pluripotency) and to be a potential target in GC therapy [21]. Consistent with previous results, CD44 expression significantly decreased in AGS and MKN45 cell lines treated with 10 mM of metformin (Fig. 3B). Expression of Sox2 decreased in response to metformin in the three cell lines after 48 h (Fig. 3B). To

confirm our results, the expression of other markers was also studied. First, the expression level of Kruppel-like factor 4 (KLF4), a marker associated with the ability of cells to differentiate and downregulated in GC, was investigated as it may contribute to malignancy and cellular hyperproliferation. In response to metformin, KLF4 was upregulated significantly in AGS and

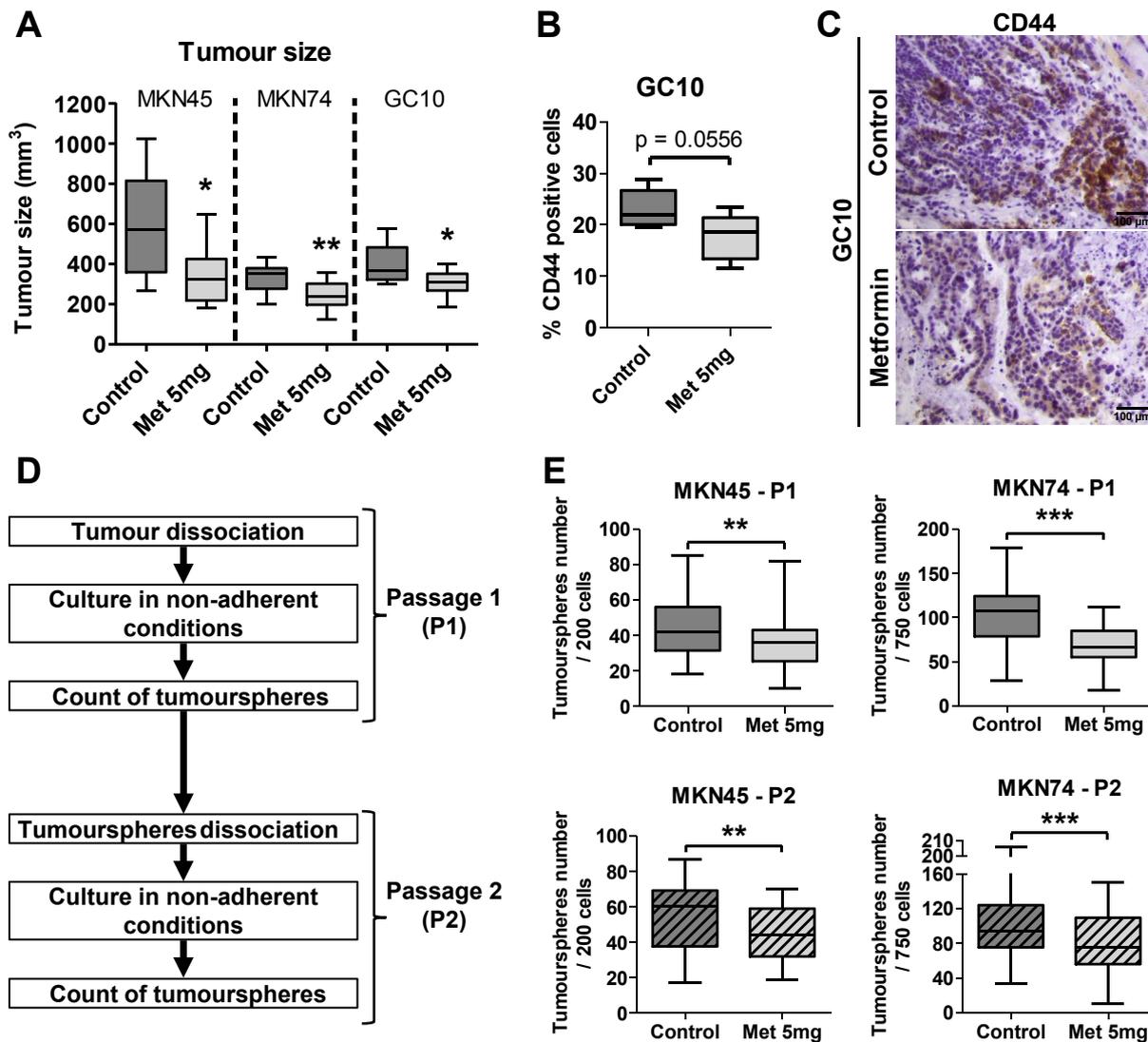


Fig. 4. Inhibitory effect of metformin on gastric tumours in a murine xenograft model. 1×10^5 cells from MKN45 and MKN74 cancer cell lines and GC10 primary tumour were subcutaneously xenografted into NSG mice. When the tumour size reached 200 mm³, daily intraperitoneal injection of 200 μ l of PBS or 5 mg of metformin were performed for 12 days. (A) Tumour size at day 12 of treatment. Data represent the mean and the interval of values ($7 < n < 20$; two independent experiments). * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$ versus control; Mann & Whitney test. (B) GC10 tumours were dissociated, and cells were stained with anti-CD44-APC antibody and analysed by flow cytometry. (C) Immunohistochemistry analyses on paraffin-embedded tissue sections of GC10 tumour xenografts, representative image of CD44 (membrane staining) in brown (haematoxylin counterstaining). (D, E) MKN45 and MKN74 tumours were dissociated and cells were cultured under non-adherent conditions. Number of tumourspheres formed after 12 days: passage 1 (P1). MKN45 and MKN74 tumourspheres were dissociated and cells were cultured under non-adherent conditions. Number of tumourspheres formed after 12 days: passage 2 (P2). Data represent the mean and the interval of values ($5 < n < 11$). * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$ versus control; Mann & Whitney test.

MKN74. Second, the expression of the differentiation marker MUC5AC was evaluated. In response to metformin, MUC5AC was significantly and highly overexpressed in MKN45 and MKN74 cells (it was not expressed in AGS cells, data not shown) (Fig. 3B).

Considered together, these results suggest that gastric CSC markers decrease in response to metformin, whereas differentiation markers increase.

3.4. Metformin induces an inhibition of tumour growth and CSC capacities in a mouse xenograft model

To determine whether metformin could affect tumour growth *in vivo*, mice were subcutaneously xenografted with 1×10^5 MKN45, MKN74 or GC10 cells. After 12 days of treatment, the mice were euthanised and the tumours were measured. Tumour size was significantly

decreased in the treated mice compared with the control mice with all three cell lines tested (Fig. 4A). Expression of CD44 from the xenografted GC10 tumours was evaluated by flow cytometry and IHC analysis (Fig. 4B and C). The percentage of cells expressing CD44 decreased in the cells dissociated from the metformin-treated tumours compared with the control tumours. This tendency was also visible on IHC staining of xenografted GC10 tumours.

To evaluate whether metformin was able to interfere with the self-renewal capacity of the CSC, self-renewal assays were performed. Thus, the tumours remaining after treatment were dissociated (P1), and the corresponding cells were placed under non-adherent culture conditions so that their capacity to initiate tumourspheres could be evaluated. A second round of dissociation (P2) was performed from the resulting tumourspheres (Fig. 4D). After the first round of dissociation (P1), the number of tumourspheres was significantly higher with the cells from the untreated tumours compared with those obtained from the metformin-treated tumours (Fig. 4E). This was observed with the two xenograft cell lines and was more pronounced after two rounds of dissociation (P2). Thus, the number of tumourspheres generated after tumour dissociation was lower with metformin, revealing the capacity of metformin to target and inhibit CSCs *in vivo* as well.

4. Discussion

Our present study confirms the anti-proliferative effect of metformin *in vitro* on GC cell lines. This effect was first described by Kato *et al.* who showed that metformin blocks the cell cycle [13]. We show here that metformin regulates the expression of genes implicated in cell-cycle regulation (GADD45, p21, E2F1 and PCNA), explaining the cell cycle arrest with an accumulation of cells in G0/G1 phase *in vitro*. These results can explain the decrease in tumour volume in mice treated with metformin compared with control mice, confirming the anti-tumoural effect of metformin in our GC xenograft models.

The originality of our study is the demonstration of a potential anti-CSC effect of metformin for the first time in the context of GC both *in vitro* and *in vivo* (cell lines and PDXs). The PDX model, elaborated in our laboratory [14], mimics what happens in patients with GC, since it uses primary human GC cells reproducing the histopathology of the patients' primary tumour [14].

The different doses of metformin used in our study were chosen based on previous studies published on other models. We tested metformin concentrations between 5 and 50 mM. Even if an anti-CSC effect was observed with the highest doses (20 and 50 mM), these doses were certainly cytotoxic because in some *in vitro* experiments an important percentage of cell deaths was observed. Accordingly, the dose of 10 mM of metformin corresponds to the dose with the highest effect without

toxicity. *In vivo*, the dose administered by intraperitoneal injection in mice (250 mg/kg) corresponds to approximately 1400 mg/day in humans, which is a dose known to be well tolerated.

In addition to previous publications showing the anti-tumoural efficiency of metformin in GC, we show here that metformin targets gastric CSCs. The most important evidence is the decrease in tumoursphere formation in a 3D culture system, revealing the presence of CSC-like cells. Indeed, in all cell lines and PDXs tested, the number of tumourspheres was significantly lower in response to metformin *in vitro* both by preventive or curative treatment. The same effect was also observed *in vivo* with a decrease in both tumour size and self-renewal capacities of the residual CSCs isolated from metformin-treated tumours compared with the controls. Anti-CSC metformin mechanism is not elucidated, but its hypoglycemic activity certainly plays an indirect role [10].

This functional evidence was confirmed by the decrease in expression of CSC and stem cell markers, CD44 and Sox2 [20–23]. KLF4, which plays a role in growth inhibition and cell cycle arrest [24–26], increases in response to metformin, as well as the differentiation marker MUC5AC [27], whose expression is significantly associated with patient survival [28,29]. These results confirm at the molecular level that metformin i) decreases the pool of CSCs in favour of differentiated cells and ii) is able to induce the differentiation of CSCs.

Metformin represents a promising anti-cancer drug, known to be well tolerated. Its use in combination with conventional chemotherapies, to improve treatment efficacy and reduce doses currently used in chemotherapy for better tolerance, is currently being tested in clinical trials on breast, pancreatic, colorectal and ovarian cancers, and so forth [30]. This molecule has not yet revealed its full potential, as recent studies also show that it has an anti-ageing effect [31].

Our study proves the anti-CSC effect of the metformin in GC. The combination of metformin with other drugs used in conventional chemotherapies could lead to a better survival rate of GC patients.

Conflict of interest statement

None declared.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejca.2017.07.020>.

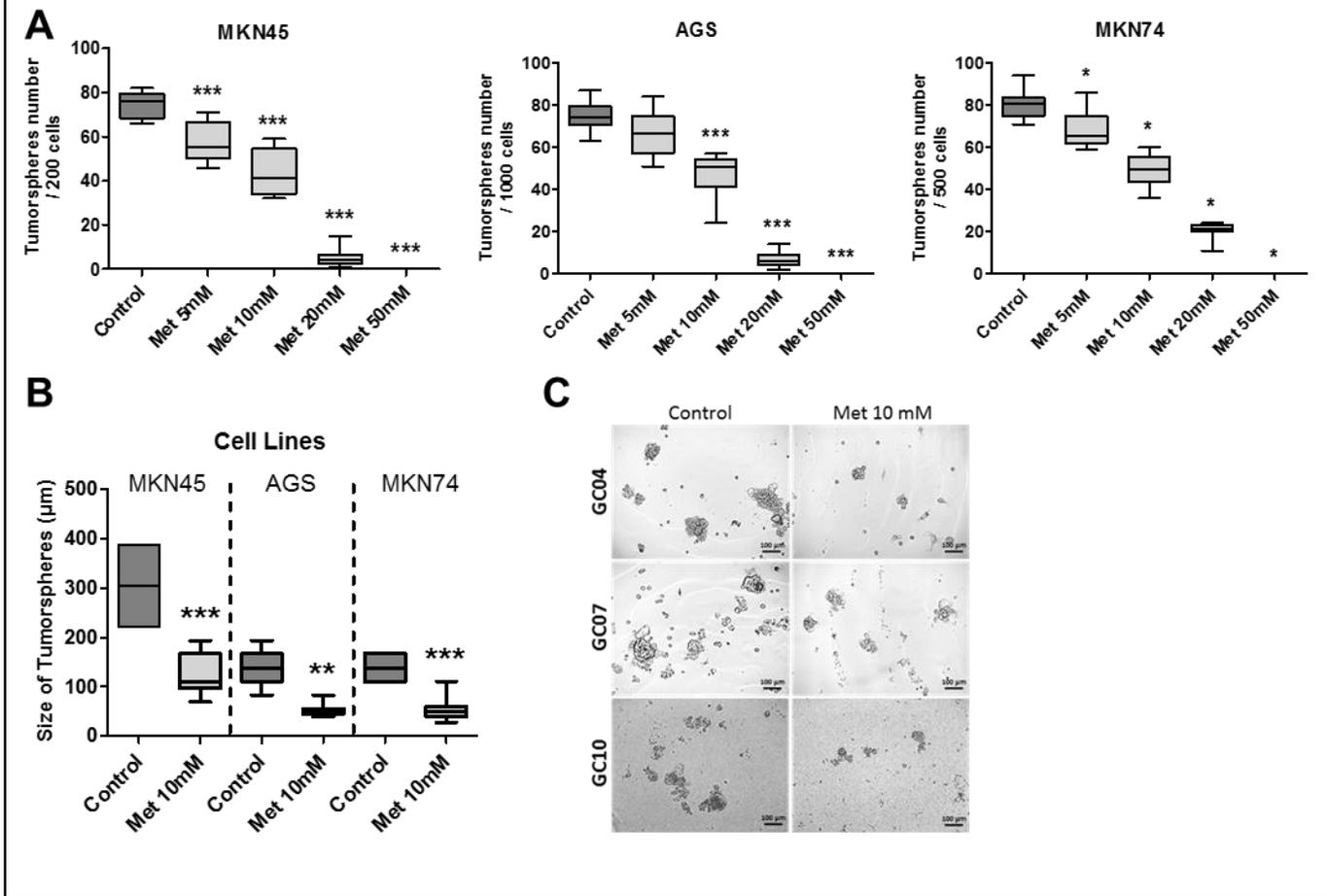
References

- [1] Lauren P. The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. An attempt at a

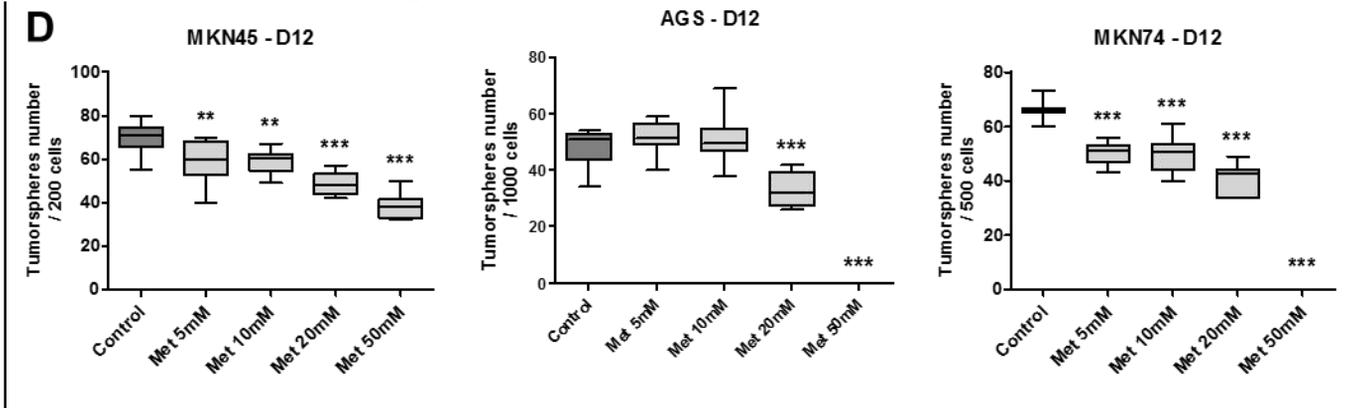
- histo-clinical classification. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1965;64: 31–49.
- [2] Ajani JA, D'Amico TA, Almhanna K, Bentrem DJ, Chao J, Das P, et al. Gastric cancer, version 3.2016, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Cancer Netw* Oct. 2016;14(10):1286–312.
- [3] Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* Nov. 2001;414(6859): 105–11.
- [4] Adams JM, Strasser A. Is tumor growth sustained by rare cancer stem cells or dominant clones? *Cancer Res* Jun. 2008;68(11): 4018–21.
- [5] Zhou G, Myers R, Li Y, Chen Y, Shen X, Fenyk-Melody J, et al. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest* Oct. 2001;108(8):1167–74.
- [6] Decensi A, Puntoni M, Goodwin P, Cazzaniga M, Gennari A, Bonanni B, et al. Metformin and cancer risk in diabetic patients: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Prev Res (Phila)* Nov. 2010;3(11):1451–61.
- [7] Evans JMM, Donnelly LA, Emslie-Smith AM, Alessi DR, Morris AD. Metformin and reduced risk of cancer in diabetic patients. *BMJ* Jun. 2005;330(7503):1304–5.
- [8] Dowling RJO, Niraula S, Stambolic V, Goodwin PJ. Metformin in cancer: translational challenges. *J Mol Endocrinol* Jun. 2012; 48(3):R31–43.
- [9] Del Barco S, Vazquez-Martin A, Cufi S, Oliveras-Ferraros C, Bosch-Barrera J, Joven J, et al. Metformin: multi-faceted protection against cancer. *Oncotarget* Dec. 2011;2(12):896–917.
- [10] Martin-Castillo B, Vazquez-Martin A, Oliveras-Ferraros C, Menendez JA. Metformin and cancer: doses, mechanisms and the dandelion and horsetail phenomena. *Cell Cycle* Mar. 2010;9(6): 1057–64.
- [11] Emami Riedmaier A, Fisel P, Nies AT, Schaeffeler E, Schwab M. Metformin and cancer: from the old medicine cabinet to pharmacological pitfalls and prospects. *Trends Pharmacol Sci* Feb. 2013;34(2):126–35.
- [12] Lee C, Jung M, Jung I, Heo SJ, Jeong YH, An JY, et al. Cumulative metformin use and its impact on survival in gastric cancer patients after gastrectomy. *Ann Surg* Jan. 2016;263(1): 96–102.
- [13] Kato K, Gong J, Iwama H, Kitanaka A, Tani J, Miyoshi H, et al. The antidiabetic drug metformin inhibits gastric cancer cell proliferation in vitro and in vivo. *Mol Cancer Ther* Mar. 2012;11(3): 549–60.
- [14] Nguyen PH, Giraud J, Chambonnier L, Dubus P, Wittkop L, Belleannée G, et al. Characterization of biomarkers of tumorigenic and chemoresistant cancer stem cells in human gastric carcinoma. *Clin Cancer Res* Mar. 2017;23(6):1586–97.
- [15] Riccardi C, Nicoletti I. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nat Protoc* 2006;1(3):1458–61.
- [16] Bessède E, Staedel C, Acuña Amador LA, Nguyen PH, Chambonnier L, Hatakeyama M, et al. *Helicobacter pylori* generates cells with cancer stem cell properties via epithelial-mesenchymal transition-like changes. *Oncogene* Aug. 2014; 33(32):4123–31.
- [17] Tamura RE, de Vasconcellos JF, Sarkar D, Libermann TA, Fisher PB, Zerbini LF. GADD45 proteins: central players in tumorigenesis. *Curr Mol Med* Jun. 2012;12(5):634–51.
- [18] Nguyen PH, Giraud J, Staedel C, Chambonnier L, Dubus P, Chevret E, et al. All-trans retinoic acid targets gastric cancer stem cells and inhibits patient-derived gastric carcinoma tumor growth. *Oncogene* Oct. 2016;35(43):5619–28.
- [19] Liu P-P, Liao J, Tang Z-J, Wu W-J, Yang J, Zeng Z-L, et al. Metabolic regulation of cancer cell side population by glucose through activation of the Akt pathway. *Cell Death Differ* Jan. 2014;21(1):124–35.
- [20] Takaishi S, Okumura T, Tu S, Wang SS, Shibata W, Vigneshwaran R, et al. Identification of gastric cancer stem cells using the cell surface marker CD44. *Stem Cells Dayt Ohio* May 2009;27(5):1006–20.
- [21] Tian T, Zhang Y, Wang S, Zhou J, Xu S. Sox2 enhances the tumorigenicity and chemoresistance of cancer stem-like cells derived from gastric cancer. *J Biomed Res* Sep. 2012;26(5): 336–45.
- [22] Wang W, Dong L-P, Zhang N, Zhao C-H. Role of cancer stem cell marker CD44 in gastric cancer: a meta-analysis. *Int J Clin Exp Med* Dec. 2014;7(12):5059–66.
- [23] Zhao Y, Feng F, Zhou Y-N. Stem cells in gastric cancer. *World J Gastroenterol* Jan. 2015;21(1):112–23.
- [24] Wei D, Gong W, Kanai M, Schlunk C, Wang L, Yao JC, et al. Drastic down-regulation of Krüppel-like factor 4 expression is critical in human gastric cancer development and progression. *Cancer Res* Apr. 2005;65(7):2746–54.
- [25] Katz JP, Perreault N, Goldstein BG, Actman L, McNally SR, Silberg DG, et al. Loss of Klf4 in mice causes altered proliferation and differentiation and precancerous changes in the adult stomach. *Gastroenterology* Apr. 2005;128(4):935–45.
- [26] Choi BJ, Cho YG, Song JW, Kim CJ, Kim SY, Nam SW, et al. Altered expression of the KLF4 in colorectal cancers. *Pathol Res Pract* 2006;202(8):585–9.
- [27] Boltin D, Niv Y. Mucins in gastric cancer – an update. *J Gastrointest Dig Syst* Jul. 2013;3(123):15519.
- [28] Zhang C-T, He K-C, Pan F, Li Y, Wu J. Prognostic value of Muc5AC in gastric cancer: a meta-analysis. *World J Gastroenterol* Sep. 2015;21(36):10453–60.
- [29] Kim DH, Shin N, Kim GH, Song GA, Jeon TY, Kim DH, et al. Mucin expression in gastric cancer: reappraisal of its clinicopathologic and prognostic significance. *Arch Pathol Lab Med* Aug. 2013;137(8):1047–53.
- [30] Zhang H-H, Guo X-L. Combinational strategies of metformin and chemotherapy in cancers. *Cancer Chemother Pharmacol* Jul. 2016;78(1):13–26.
- [31] Barzilay N, Crandall JP, Kritchevsky SB, Espeland MA. Metformin as a tool to target aging. *Cell Metab* Jun. 2016;23(6): 1060–5.

Supplementary Figure S1

Preventive treatment

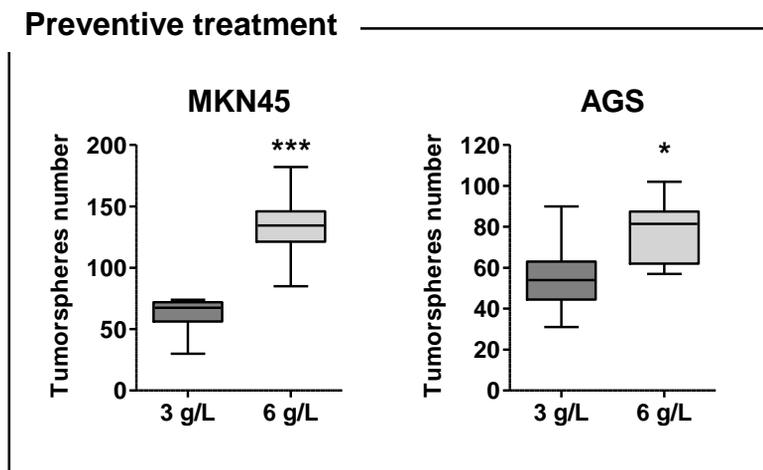


Curative treatment



Supplementary Fig. S1. Metformin inhibits tumourspheres formation and growth with a dose-dependent effect. Cell lines were cultured under non-adherent conditions. (A, B) Cell lines were treated with 0–50 mM of metformin at day 0 and the tumourspheres formed were counted at day 12. (A) Quantification of tumourspheres formed by 200 (MKN45) or 1000 (AGS) or 500 (MKN74) seeded cells per wells. (B) Quantification of tumoursphere diameters at day 12. (C) Representative images of tumourspheres formed by PDXs (1000 seeded cells). (D) Tumourspheres at day 5 of culture were treated with 0–50 mM of metformin and the remaining tumourspheres were count after 12 days of treatment. Data represent the mean and the interval of values (n = 10). * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$ versus control; (A, D) One-way ANOVA with Bonferroni post-test. (B) Mann & Whitney test.

Supplementary Figure S2



Supplementary Fig. S2. High glucose concentration increases tumoursphere formation. Cell lines were cultured under non-adherent conditions. Cell lines were cultured in a medium containing 3 or 6 g/l of glucose and the tumourspheres formed were counted at day 12. Data represent the mean and the interval of values ($10 < n < 20$). * $p < 0.05$ *** $p < 0.001$ versus control; Mann & Whitney test.

Article 2

Article 2 : La metformine est capable d'inhiber la croissance de *H. pylori*

Les travaux de thèse d'E. Bessède avaient montré que l'infection par *H. pylori* était à l'origine de l'émergence de cellules possédant des propriétés de CSC *via* une transition épithélio-mésenchymateuse. En perspective de ces résultats, j'ai dans un premier temps cherché à déterminer si la metformine pouvait inhiber l'EMT induite par *H. pylori*. Les premiers résultats étaient très convaincants et montraient que la metformine était capable de réverser très efficacement le processus de l'EMT. En effet, les cellules mésenchymateuses ou en « hummingbird » apparues au cours de l'infection par *H. pylori* disparaissaient avec le traitement par metformine. Après plusieurs expériences, je me suis aperçue que les bactéries présentes dans les puits contenant les cellules traitées par metformine n'étaient plus mobiles et étaient en fait mortes. Ainsi, un nouvel effet antibactérien de la metformine a été découvert.

Ce second article prêt à être soumis rapporte donc les différentes expériences menées *in vitro* et *in vivo* pour démontrer l'effet antibactérien de la metformine vis-à-vis de *H. pylori*.

Ces travaux font par ailleurs l'objet d'une demande de dépôt de brevet.

An unexpected effect of metformin against *Helicobacter pylori* growth

Sarah Courtois¹, Lucie Bénéjat^{1,2}, Julien Izotte³, Francis Mégraud^{1,2}, Christine Varon¹, Philippe Lehours^{1,2} and Emilie Bessède^{1,2}

¹ INSERM, University of Bordeaux, UMR1053 Bordeaux Research In Translational Oncology, BaRITOn, F-33000 Bordeaux, France.

² French National Reference Center for Campylobacters and Helicobacters in Bordeaux (CNRCH), University Hospital of Bordeaux, France

³ Animal facilities, University of Bordeaux, 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux, France.

Contact: Dr. Emilie Bessède, INSERM, University of Bordeaux, UMR1053 Bordeaux Research In Translational Oncology, BaRITOn, F-33000 Bordeaux, France. Email: emilie.bessede@u-bordeaux.fr.

Keywords: epithelial-to-mesenchymal transition, bacterial growth, antimicrobial effect, infected mouse model

Abstract

Helicobacter pylori infection is a worldwide infection which causes gastritis, peptic ulcer disease, and gastric cancers. The first line treatment consists of eradicating *H. pylori*. However, eradication rates with conventional therapies have fallen to unacceptable levels, due to the increase of antibiotic resistance and potential new therapies can still be interesting to consider. Here, we demonstrate an unexpected effect of the metformin, a well-known anti-diabetes drug, on *H. pylori* growth *in vitro* and *in vivo*. The bacterial survival and growth were studied *in vitro* using antimicrobial susceptibility tests. They revealed the ability of metformin to directly inhibit *H. pylori* survival and growth. Furthermore, our *in vivo* *H. pylori*-infected mice model has shown that metformin treated mice had significantly less bacteria in their stomach than the untreated mice. Our work is the first to demonstrate a direct antimicrobial effect of metformin on a bacterium, revealing that this molecule has not yet revealed all of its full potential.

Introduction

Helicobacter pylori is a worldwide infection which affects nearly 4.4 billion people, more than half of the world's population (1). This bacterium has been classified as a Group I carcinogen by the International Agency for Research on Cancer in 1994. This infection is the main known cause of gastritis, peptic ulcer disease, and gastric cancers. Approximately 89% of all gastric cancers can be attributable to *H. pylori* infection. Among them, gastric adenocarcinoma is the fifth most common cancer after lung, breast, colorectal and prostate cancers (1) Prognosis is poor with only 1 in 5 patients surviving longer than 5 years after diagnosis. *H. pylori* eradication has been associated with a reduction of gastric cancer incidence and confirms that it is necessary to have performant eradication treatments (2).

Despite more than 30 years of experience in *H. pylori* treatment, recent studies suggest that eradication rates with conventional therapies have fallen to unacceptable levels due to the increase in antibiotic resistances. Large clinical trials and meta-analyses have shown that the most commonly used first-line therapies (a proton- pump inhibitor (PPI) plus two antibiotics) fail in approximately 20% to 30% of patients and, in clinical practice, this rate may be even higher (3). As a consequence, new therapeutics are still emerging like the bismuth-containing quadruple therapy which is now available in several countries. This new treatment offers a better eradication rate but some eradication failure has already been shown (4). Furthermore, this therapy is accompanied by a higher rate of side effects. Thus, *H. pylori* eradication still remains imperfect and new treatment opportunities should be continually sought.

Our group works on gastric carcinogenesis linked to the infection with *H. pylori*. In this context previous works have shown that *H. pylori* induced an epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) leading to the emergence of cells with CSC properties. Thus, the EMT induced by *H. pylori* appeared to be an interesting target to inhibit, in perspective of an anticancer therapy.

Metformin is a biguanide family molecule which is able to regulate the glucose metabolism. Thus, is an old molecule, prescribed in type 2 diabetes and used extensively in clinical practice since the 1950's. Metformin. Since 2005, this molecule is intensively studied for its antitumoral properties in different types of cancer (5), and for its ability to target the cancer stem cells, including in gastric cancer (6). In this context we decided to test the potential effect of metformin on the *H. pylori* induced-EMT. By this way, we discovered that metformin could have a direct bactericidal effect on *H. pylori*. This article reports experiments performed *in vitro* and *in vivo* to confirm this unexpected metformin anti-*H. pylori* property.

Materials and Methods

Epithelial cell culture

Human gastric adenocarcinoma cell line AGS was cultured in DMEM/F12 medium (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France), supplemented with GlutaMAX, 10% heat-inactivated fetal bovine serum, and vancomycin (50 µg/ml) (Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France) or penicillin-streptomycin (P/S) (100 U/ml) (Thermo Fisher Scientific, Villebon-sur-Yvette, France), at 37°C in a humidified 5% CO₂ atmosphere.

Bacterial culture

H. pylori strains were obtained from the French National Reference Center for Campylobacters and Helicobacters in Bordeaux (CNRCH). Bacteria were cultured at 35°C on Wilkins-Chalgren agar plates (Thermo Fisher Diagnostics, Dardilly, France) supplemented with human blood (10% v/v) and antibiotics (10 µg/ml of vancomycin, 2 µg/ml of cefsulodin, 5 µg/ml of trimethoprim, and 1 µg/ml of amphotericin B) named in-house Pylo medium, under microaerobic conditions (5% O₂, 10% CO₂, and 85% N₂) in a microaerobic workstation. *H. pylori* strains used were: 3 *H. pylori* reference strains (*H. pylori* 7.13 (8), *H. pylori* SS1 (9) and *H. pylori* B47 (10)) and 4 *H. pylori* strains randomly selected (*H. pylori* 1, *H. pylori* 2, *H. pylori* 3 and *H. pylori* 4), isolated from gastric biopsies of patients which were received at the CNRCH for *H. pylori* detection. These 4 strains were sensitive to amoxicillin, clarithromycin, rifampicin and tetracyclin and resistant to levofloxacin and metronidazole.

Helicobacter felis CS1 (11), *Helicobacter canadensis* CCUG 47163 and *Helicobacter bizzozeronii* CIP 105233T were cultured at 37°C on Mueller Hinton agar plates (Becton Dickinson Bioscience, Le Pont de Claix, France) supplemented with defibrinated sheep blood (Thermo Fisher Scientific) and red blood cell extract (Biorad, Marnes-la-Coquette, France) under microaerobic conditions. *Helicobacter pullorum* CCUG 33840 was cultured at 35°C on Schaedler agar plates (Oxoid, Dardilly, France) under microaerobic conditions.

Campylobacter jejuni NTCT 11168 and *Campylobacter coli* CCUG 11283 strains were cultured at 35°C on TSH agar plates (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) under microaerobic conditions.

Escherichia coli isolated from a patient urine culture, was cultured at 35°C on bromo cresol purple (BCP) agar plates (bioMérieux) and *Staphylococcus aureus* isolated from a blood sample of a patient was cultured at 37°C on blood agar plates (bioMérieux) under enriched atmosphere with 5% CO₂.

For coculture experiments, *H. pylori* strain 7.13 was grown at 35°C for 24 h. Then the bacteria were resuspended in phosphate saline buffer (PBS) and the suspension was adjusted to an optical density of 1 at a wavelength of 600 nm, corresponding to 2×10^8 colony forming units (CFU)/ml in PBS. The bacteria were added at a multiplicity of infection (MOI) of 25 to AGS cultures, in culture medium without penicillin/streptomycin and with 50 µg/ml of vancomycin. For survival curves, *H. pylori* strains were cultured in brucella broth (Becton Dickinson Bioscience), in the presence of different metformin concentrations (2, 5 or 10mM) (Sigma). After 5, 10 and 24 h of treatment, a supernatant aliquot was successively diluted and cultured on *H. pylori* medium. After a 3-day-incubation period, the colonies present on agar plates were counted.

For antimicrobial susceptibility testing (AST), strains were resuspended in brucella broth at a concentration equivalent to a McFarland 3 opacity standard and the solution was plated on *H. pylori* medium. Blotting papers discs were impregnated with 30µL of a metformin solution at different concentrations (0.1, 0.5 or 1.0 M) and were deposited on the plates and incubated for 48 h.

Animal experiments

Five-week old C57Bl6J female mice were food-deprived for 14 h prior to infection. Using a 20-gauge ballpoint metal feeding tube (Harvard Apparatus, Inc., Holliston, MA, USA), mice

were infected intragastrically, on 3 consecutive days, with 0.1 mL of a highly concentrated suspension of the mouse adapted *H. pylori* strains SS1 and B47 in brucella broth (greater than McFarland 7 opacity standard). Three days after the end of the infection, mice were divided into two groups: an infected group treated with PBS (Control), n = 28, and an infected group treated with metformin at 10 mg/mouse (Met), n = 30. Each group received a daily treatment (0.1 mL) for 12 days by gavage (except Saturdays and Sundays). During this period all mice had *ad libitum* access to water and feeding. At the end of the treatment, mice were euthanized by cervical dislocation; stomachs were collected aseptically, opened along the greater curvature, washed in PBS and sectioned longitudinally into 2 pieces along the smaller curvature from the squamocolumnar junction through the pylorus. The first part of the stomach was fixed for 24 h in 3.7% neutral-buffered formalin (Sigma), followed by paraffin embedding and standard histological processing. The second part was homogenized in 200 μ L of brucella broth to detect *H. pylori* colonization by bacterial culture on selective blood agar media GSSA incubated under microaerobic conditions at 35°C for 3 to 5 days (1).

Ethic Statement

Experiments on mice were carried out in Level 2 animal facilities at the University of Bordeaux in agreement with the local Ethics Committee on Animal Experiments CEEA50 of Bordeaux (approval number 10174).

Histology and Immunohistochemistry

Sections of 3 μ m thickness from paraffin-embedded tissues were rehydrated, washed and heated to 100°C for 40 min for antigen retrieval using Tris (10 mM)-EDTA (1 mM) buffer pH9. Endogenous peroxidases were inhibited with 3% hydrogen peroxide (Sigma) in H₂O for 5 min. After blocking with VECTASTAIN® Elite® ABC-HRP Reagent, R.T.U. (Peroxidase, Ready-to-Use, PK-7100) (Vector Laboratories, Burlingame, USA), slides were incubated with primary mouse anti-Hp antibody 1:100 (B0471 Dako, Glostrup, Denmark) for 1 h at room temperature,

followed by 30 min incubation at room temperature with horse anti-rabbit secondary antibodies (VECTASTAIN® Elite® ABC-HRP Reagent, R.T.U.) and revealed by an additional 10 min incubation with Liquid DAB Substrate-Chromogen System (DAKO) at room temperature. Slides were counterstained with hematoxylin, dehydrated and mounted with Eukitt-mounting medium (Eurobio, Courtaboeuf, France).

Statistical analysis

The Mann & Whitney test or One-Way ANOVA for multiple comparisons on GraphPad Prism 7.02 (La Jolla, CA, USA) were used. Differences were considered significant at $p < 0.05$.

Results

Metformin decreases the *H. pylori*-induced “hummingbird” phenotype of the infected cells

Co-cultures of AGS cells and *H. pylori* 7.13 were performed. Twenty-four hours post-infection, bacteria induced an epithelial-to-mesenchymal transition (EMT), characterized by an elongation of epithelial cells, known as the “hummingbird” phenotype, and corresponding to a mesenchymal phenotype (Figure 1A), as previously described (12, 13). In infected conditions, bacteria were visible and formed heaps of bacteria attached on cells (Figure 1A, white arrows). When the hummingbird phenotype was clearly induced, metformin (10 mM) was added in the wells. Twenty-four hours later, in wells containing metformin, visible bacteria and heaps were decreased (Figure 1A, white arrows).

Addition of metformin in the medium significantly decreased the hummingbird phenotype from 90% for the infected and untreated condition to 25% for the infected and treated condition after 24 h (Figure 1B).

An aliquot of the different supernatants was inoculated on Pylo medium. For the untreated condition, a thick layer of bacteria had grown after 24 h, while no colonies grew under the metformin treated conditions (Figure 1C).

This first observation led us to believe that metformin could have an effect on *H. pylori*.

Metformin directly inhibits *H. pylori* in vitro

In order to determine whether metformin had a direct or an indirect effect on *H. pylori*, AGS cells were initially cultured in medium with PBS or metformin (10 mM) or penicillin-streptomycin (P/S) (100 U/ml) (Figure 2A). Then, 24 h later, medium supernatants were taken and plated. In parallel, some new fresh medium was also plated with PBS or metformin (10 mM) or P/S. *H. pylori* was then inoculated in each well for 24 h (Figure 2A).

An aliquot of each condition was plated on Pylo medium (Figure 2A). Pictures of the agar plates show a thick layer of bacteria for the untreated conditions, whereas no bacterial growth was observed under treated conditions (Figure 2C). As no bacterial growth was observed in both in AGS supernatant and in medium alone conditions, in the presence of metformin, we can conclude that metformin has a direct inhibitory effect on *H. pylori*.

Metformin has an antimicrobial effect against *H. pylori*

To confirm the metformin *H. pylori* inhibition property, antimicrobial susceptibility tests were performed.

Survival of *H. pylori* strain SS1 was studied in liquid medium with different metformin concentrations (0, 2, 5 or 10 mM). After 5, 10 and 24 h, living bacteria were quantified for each condition and expressed in in CFU (Figure 3A). Under the control conditions (without metformin), bacteria grew from less than $2 \cdot 10^5$ to more than $7 \cdot 10^5$ CFU, whereas under the treated conditions, the number of CFU after 24 h was significantly decreased to less than 10^5 CFU of *H. pylori* with 10 mM of metformin. A dose effect was observed in this survival curve assay (Figure 3A). The same effect was observed on the *H. pylori* strain 7.13 (data not shown).

Metformin susceptibility was also studied by disk diffusion method on different *H. pylori* strains, including 4 strains isolated from patient gastric biopsies (Figure 3B). After 48h of incubation, inhibition diameters were observed around disks impregnated of 0.5 and 1M of metformin. All of the different *H. pylori* strains tested were susceptible to metformin and a dose effect was observed (Figure 3B-C).

In order to determine whether metformin could inhibit other bacteria, antimicrobial susceptibility tests were also performed on other *Helicobacter* species (*H. felis*, *H. pullorum*, *H. canadensis*, *H. hepaticus* and *H. bizzozeronii*) and on *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* (Supplementary Table S1). Among these

bacteria, inhibition diameters were observed only for *H. felis* showing that the metformin effect seems quite specific for Helicobacter species.

These results confirm that metformin has an antimicrobial effect against *H. pylori*.

Metformin inhibits *H. pylori* growth *in vivo*

To test if metformin could inhibit *H. pylori* growth *in vivo*, mice were infected with *H. pylori* by oral gavage. Then, mice were treated 12 days with metformin (10 mg/mouse/day) or with PBS as a control (Figure 4A) administered by gavage. At the end of the treatment, half of the stomach was crushed, successively diluted in physiological water and seeded on selective agar plates. Three days after, the number of colonies was counted. The number of CFU/mg of stomach was significantly decreased, by approximately 40%, in the treated group compared to the control group (Figure 4B). This decrease was also visible after IHC staining (Figure 4C).

These results confirm the anti-*H. pylori* activity of metformin *in vivo* in our model of *H. pylori* infection.

Discussion

This study reports for the first time that metformin is able to inhibit *H. pylori* growth *in vitro* and *in vivo*. Thus, survival curve assays of *H. pylori* and antimicrobial susceptibility test have shown that in presence of metformin, *H. pylori* was significantly less growing. Furthermore, our *in vivo* *H. pylori*-infected mice model led to the conclusion that mice treated with metformin per os were less colonized by the bacteria than those untreated.

This study reports an unexpected property of metformin. This specific metformin activity corresponds to *H. pylori* growth inhibition both *in vitro* and *in vivo*. This discovery could offer a new and possibly efficient therapeutic option to eradicate *H. pylori*: metformin could be for example used as an adjuvant to the existing treatment. Obviously further experiments in humans

are required, including clinical trials, but the initial results obtained in our study are promising. The *in vivo* experiment did not allow a complete *H. pylori* inhibition but the selected doses were chosen at random based on the metformin anti-diabetic activity. Thus, it is likely that a potentially complete inhibition of the bacteria could be observed with higher doses of metformin, and an update of the treatment conditions (doses and duration) will be necessary to improve the drug's efficiency.

The potential pathway involved in this anti-*H. pylori* activity has not been elucidated. In eukaryotic cells, it is known that metformin is able to inhibit the complex I of the mitochondrial respiratory chain (14). The consequence is a decrease in the ATP production leading to an activation of AMP-activated protein kinase (AMPK). In prokaryotes, and particularly in *H. pylori* (15), the homologous protein of complex I is NADH dehydrogenase I (NDH-1) of the bacterial respiratory chain (16). Our main hypothesis is that, as in eukaryotic cells, metformin could inhibit NDH-1, resulting in the disruption of energy production and finally death. However, this hypothesis can't totally explain the antimicrobial effect of metformin against *H. pylori*, considering that other bacteria testing, *Campylobacter jejuni* and *Escherichia coli*, also express NDH-1 (17) but are not sensitive to metformin. One explanation would be that this enzyme is essential for *H. pylori* survival and growth.

Furthermore, metformin has been described to modify the gut microbiota of diabetic patients treated with this molecule (18). A recent article showed that gut microbiota alterations contribute to the therapeutic effects of the drug via regulated bacterial genes encoding metalloproteins or metal transporters, implying that there is a link between metformin and metal-binding proteins produced by the gut microbiota. Other studies have shown that metformin is associated with a higher relative abundance of mucin-degrading *Akkermansia*

muciniphila (19). These different experiments revealed that metformin could indirectly facilitate bacterial growth but did not show any bacterial inhibition.

Our work is indeed the first to demonstrate a direct antimicrobial effect of metformin on a bacterium, opening potentially new roads to treat *H. pylori* infected patients, and revealing that this molecule has not yet revealed its full potential.

Conflict of interest statement

None declared.

References

1. J. K. Y. Hooi, W. Y. Lai, W. K. Ng, M. M. Y. Suen, F. E. Underwood, D. Tanyingoh, P. Malfertheiner, D. Y. Graham, V. W. S. Wong, J. C. Y. Wu, F. K. L. Chan, J. J. Y. Sung, G. G. Kaplan, S. C. Ng, Global Prevalence of *Helicobacter pylori* Infection: Systematic Review and Meta-Analysis, *Gastroenterology* **153**, 420–429 (2017).
2. K. M. Fock, Review article: the epidemiology and prevention of gastric cancer, *Aliment. Pharmacol. Ther.* **40**, 250–260 (2014).
3. P. Malfertheiner, F. Megraud, C. A. O’Morain, J. P. Gisbert, E. J. Kuipers, A. T. Axon, F. Bazzoli, A. Gasbarrini, J. Atherton, D. Y. Graham, R. Hunt, P. Moayyedi, T. Rokkas, M. Rugge, M. Selgrad, S. Suerbaum, K. Sugano, E. M. El-Omar, European Helicobacter and Microbiota Study Group and Consensus panel, Management of *Helicobacter pylori* infection—the Maastricht V/Florence Consensus Report, *Gut* **66**, 6–30 (2017).
4. S. Di Caro, L. Fini, Y. Daoud, F. Grizzi, A. Gasbarrini, A. De Lorenzo, L. Di Renzo, S. McCartney, S. Bloom, Levofloxacin/amoxicillin-based schemes vs quadruple therapy for *Helicobacter pylori* eradication in second-line, *World J. Gastroenterol.* **18**, 5669–5678 (2012).
5. D. R. Morales, A. D. Morris, Metformin in cancer treatment and prevention, *Annu. Rev. Med.* **66**, 17–29 (2015).
6. S. Courtois, R. V. Durán, J. Giraud, E. Sifré, J. Izotte, F. Mégraud, P. Lehours, C. Varon, E. Bessède, Metformin targets gastric cancer stem cells, *Eur. J. Cancer Oxf. Engl. 1990* **84**, 193–201 (2017).
7. N. Barzilai, J. P. Crandall, S. B. Kritchevsky, M. A. Espeland, Metformin as a Tool to Target Aging, *Cell Metab.* **23**, 1060–1065 (2016).
8. M. Asim, S. K. Chikara, A. Ghosh, S. Vudathala, J. Romero-Gallo, U. S. Krishna, K. T. Wilson, D. A. Israel, R. M. Peek, R. Chaturvedi, Draft Genome Sequence of Gerbil-Adapted Carcinogenic *Helicobacter pylori* Strain 7.13, *Genome Announc.* **3** (2015), doi:10.1128/genomeA.00641-15.

9. A. Lee, J. O'Rourke, M. C. De Ungria, B. Robertson, G. Daskalopoulos, M. F. Dixon, A standardized mouse model of *Helicobacter pylori* infection: introducing the Sydney strain, *Gastroenterology* **112**, 1386–1397 (1997).
10. D. Chrisment, P. Dubus, L. Chambonnier, A. Hocès de la Guardia, E. Sifré, A. Giese, M. Capone, C. Khairallah, P. Costet, B. Rousseau, C. Hubert, O. Burlen-Defranoux, C. Varon, A. Bandeira, F. Mégraud, P. Lehours, Neonatal thymectomy favors *Helicobacter pylori*-promoted gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma lesions in BALB/c mice, *Am. J. Pathol.* **184**, 2174–2184 (2014).
11. J. G. Fox, X. Li, R. J. Cahill, K. Andrutis, A. K. Rustgi, R. Odze, T. C. Wang, Hypertrophic gastropathy in *Helicobacter felis*-infected wild-type C57BL/6 mice and p53 hemizygous transgenic mice, *Gastroenterology* **110**, 155–166 (1996).
12. E. Bessède, C. Staedel, L. A. Acuña Amador, P. H. Nguyen, L. Chambonnier, M. Hatakeyama, G. Belleannée, F. Mégraud, C. Varon, *Helicobacter pylori* generates cells with cancer stem cell properties via epithelial-mesenchymal transition-like changes, *Oncogene* **33**, 4123–4131 (2014).
13. J. Baud, C. Varon, S. Chabas, L. Chambonnier, F. Darfeuille, C. Staedel, *Helicobacter pylori* initiates a mesenchymal transition through ZEB1 in gastric epithelial cells, *PLoS One* **8**, e60315 (2013).
14. M. R. Owen, E. Doran, A. P. Halestrap, Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain, *Biochem. J.* **348 Pt 3**, 607–614 (2000).
15. J. F. Tomb, 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, J. C. Venter, The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*, *Nature* **388**, 539–547 (1997).
16. T. Yagi, T. Yano, S. Di Bernardo, A. Matsuno-Yagi, Procaryotic complex I (NDH-1), an overview, *Biochim. Biophys. Acta* **1364**, 125–133 (1998).
17. M. A. Smith, M. Finel, V. Korolik, G. L. Mendz, Characteristics of the aerobic respiratory chains of the microaerophiles *Campylobacter jejuni* and *Helicobacter pylori*, *Arch. Microbiol.* **174**, 1–10 (2000).
18. H. Wu, E. Esteve, V. Tremaroli, M. T. Khan, R. Caesar, L. Mannerås-Holm, M. Ståhlman, L. M. Olsson, M. Serino, M. Planas-Fèlix, G. Xifra, J. M. Mercader, D. Torrents, R. Burcelin, W. Ricart, R. Perkins, J. M. Fernández-Real, F. Bäckhed, Metformin alters the gut microbiome of individuals with treatment-naïve type 2 diabetes, contributing to the therapeutic effects of the drug, *Nat. Med.* **23**, 850–858 (2017).
19. J. de la Cuesta-Zuluaga, N. T. Mueller, V. Corrales-Agudelo, E. P. Velásquez-Mejía, J. A. Carmona, J. M. Abad, J. S. Escobar, Metformin Is Associated With Higher Relative Abundance of Mucin-Degrading *Akkermansia muciniphila* and Several Short-Chain Fatty Acid-Producing Microbiota in the Gut, *Diabetes Care* **40**, 54–62 (2017).

Figures legends

Figure 1: Decrease of the *H. pylori* induced-“hummingbird” phenotype and of the visible amount of bacteria by metformin.

A AGS cells were seeded in 6-well plates and infected with *H. pylori* (MOI 25). 24h after the infection, when the “hummingbird” phenotype was induced by the bacteria, metformin (10 mM) was added to the medium for 24 h (photos). **B** Quantification of the “hummingbird” phenotype 24 h after the addition of metformin. Data represent the mean \pm SEM (n=6). **p<0.01 vs non-infected control; ##p<0.01 vs infected control; Mann & Whitney test. **C** An 200 μ L aliquot of the infected conditions treated or not with metformin was inoculated on Pylo medium and incubated for 24 h.

Figure 2: Direct inhibition of *H. pylori* by metformin.

A *H. pylori* was inoculated in liquid medium: DMEM/F12 medium with PBS or metformin (10 mM) or penicillin-streptomycin (P/S) (100 U/mL); or a medium provided from cell culture of AGS in the presence of PBS or metformin (10 mM) or P/S during 24 h (AGS supernatant). **B** Inoculation of 200 μ l of each condition tested on Pylo medium and incubated for 24 h to study bacterial growth.

Figure 3: Antimicrobial effect of metformin against *H. pylori* .

A Survival curve of *H. pylori* strain SS1 performed with different concentrations of metformin (0, 2, 5, 10 mM). After 5, 10 and 24 h, living bacteria were quantified for each condition. Data represent the mean \pm SEM (n=5). ##p<0.01 Met 10 mM vs control ***p<0.001 vs control; One-way ANOVA with Bonferroni post-test. **B** Inhibition diameters of antimicrobial susceptibility tests performed on *H. pylori* reference strains (7.13 and SS1) and on 4 *H. pylori* strains isolated from patients. **C** Antimicrobial susceptibility results on *H. pylori* 7.13 and on *H. pylori* 2.

Figure 4: *In vivo* treatment with metformin.

A Kinetics of infection with *H. pylori* and treatment with metformin or PBS (see Materials and Methods). **B** Quantification of CFU normalized on the weight of the stomach. Data represent the mean and the interval between values ($28 < n < 30$). *** $p < 0.001$ vs control; Mann & Whitney test. **C** IHC staining of *H. pylori* in the stomach. White arrows show *H. pylori* bacteria on the gastric glands.

Figure 1

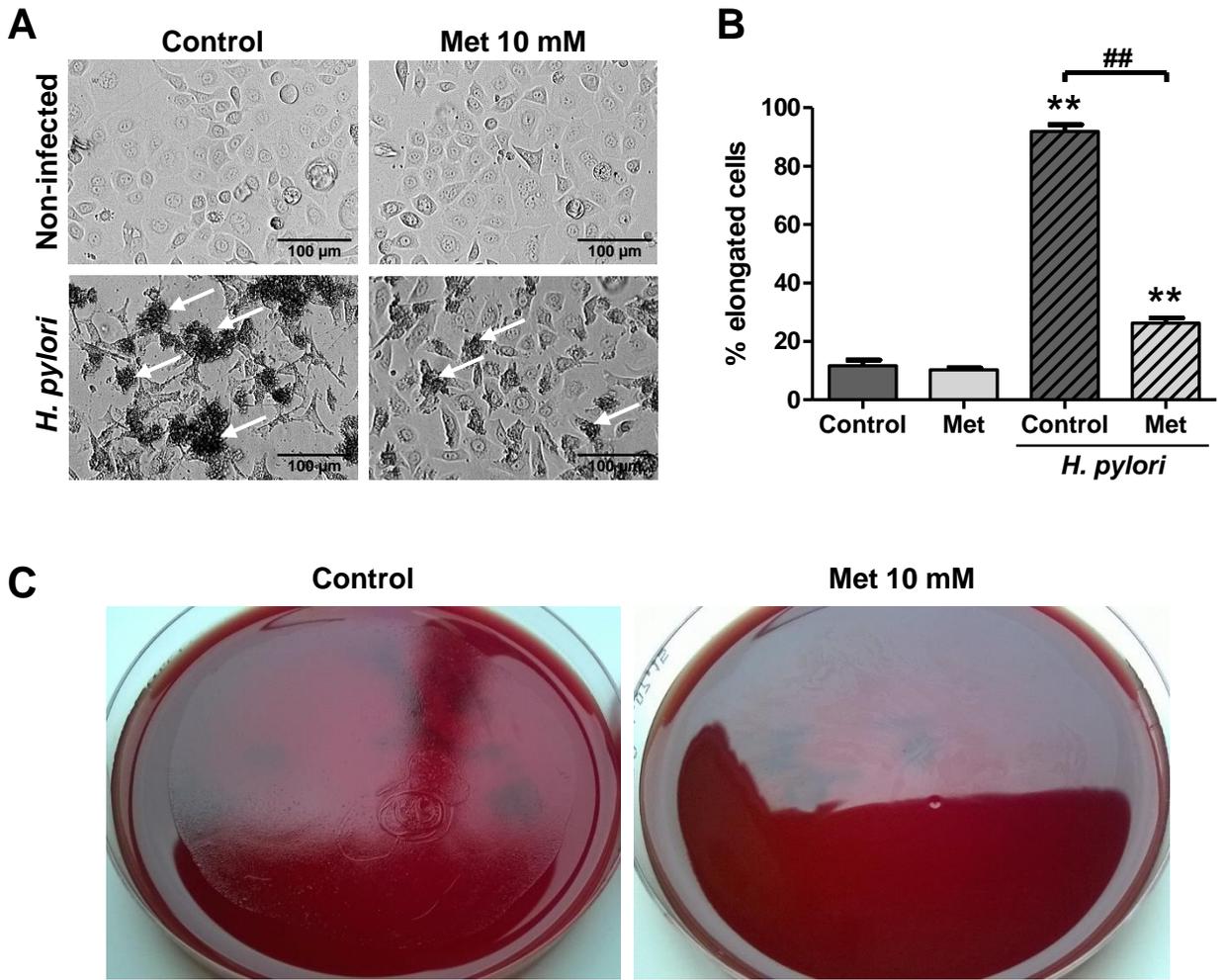
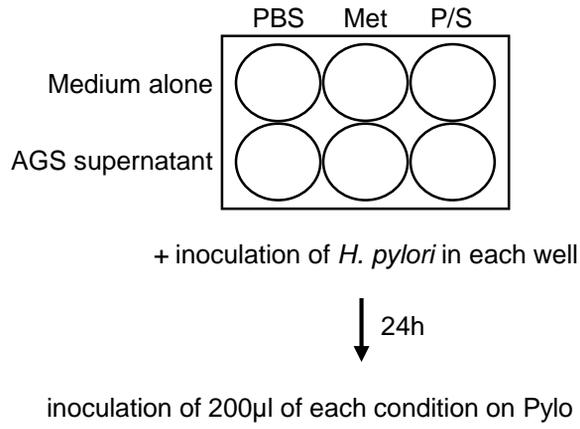


Figure 2

A



B

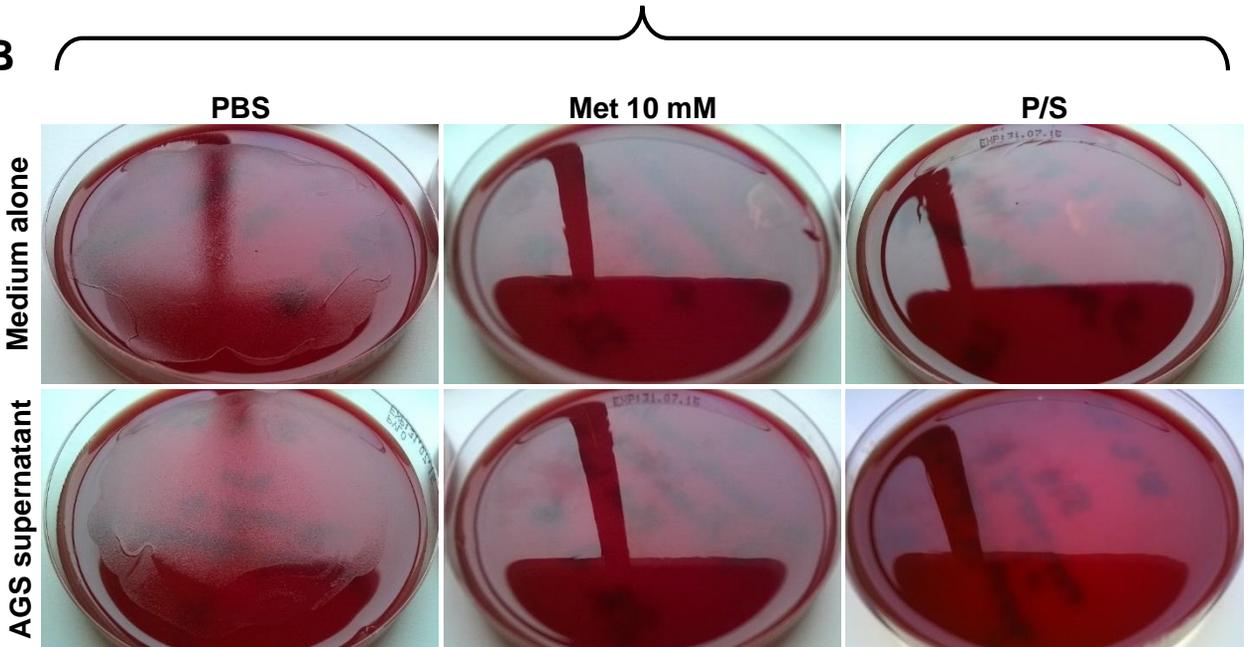
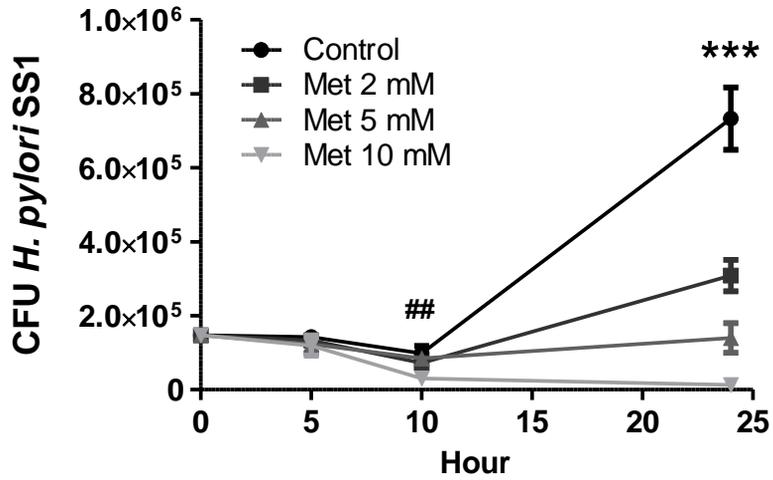


Figure 3

A

Survival Curve



B

Bacteria	Inhibition diameters (mm)		
	0.1 M	0.5 M	1 M
<i>H. pylori</i> 7.13	0	11	21
<i>H. pylori</i> SS1	0	12	27
<i>H. pylori</i> 1	0	18	28
<i>H. pylori</i> 2	0	17	24
<i>H. pylori</i> 3	0	15	30
<i>H. pylori</i> 4	0	24	44

C

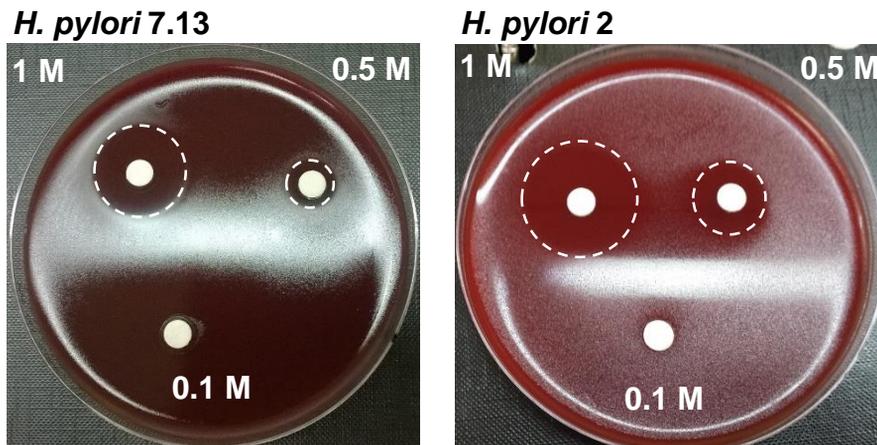
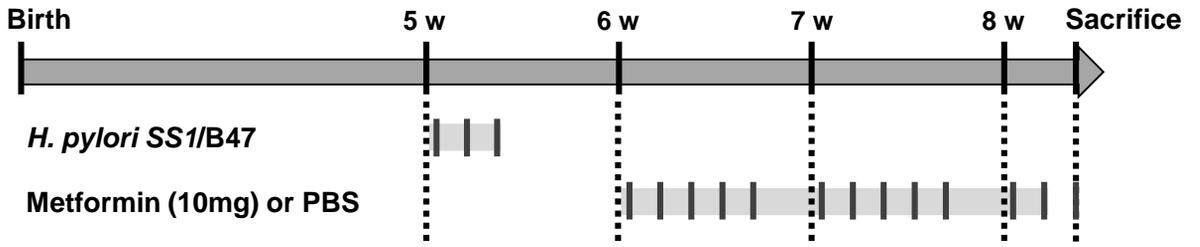


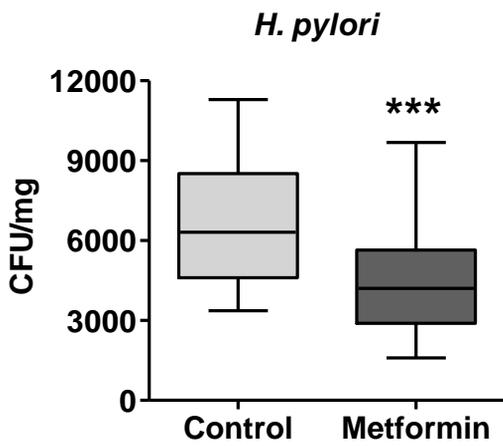
Figure 4

A

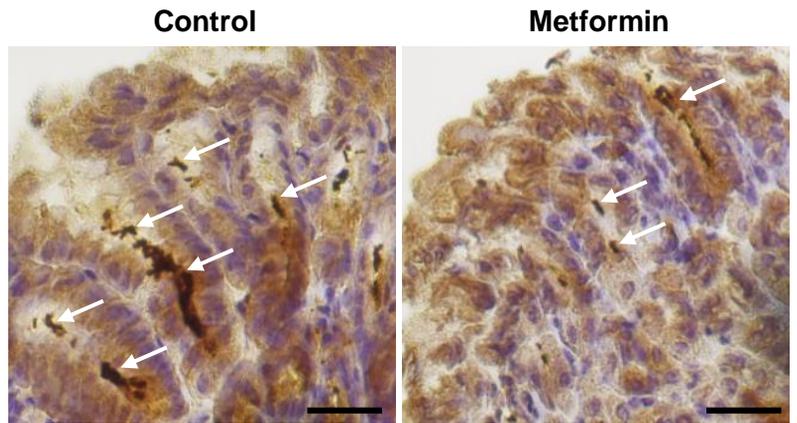
C57Bl6J female mice



B



C



Supplementary Table S1

Bacteria	Inhibition diameters (mm)		
	0.1 M	0.5 M	1 M
<i>Helicobacter felis</i>	0	14	24
<i>Helicobacter pullorum</i>	0	0	0
<i>Helicobacter canadensis</i>	0	0	8
<i>Helicobacter hepaticus</i>	0	0	0
<i>Helicobacter bizzozeroni</i>	0	0	0
<i>Campylobacter jejuni</i>	0	0	0
<i>Campylobacter coli</i>	0	0	0
<i>Escherichia coli</i>	0	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	0	0

Article 3

Article 3 : L'infection par *Helicobacter pylori* inhibe mTORC1

mTOR est une sérine/thréonine kinase organisée au sein de 2 complexes : mTORC1 et mTORC2. mTORC1 régule de nombreux processus cellulaires essentiels tels que la croissance cellulaire, la survie, l'autophagie et le métabolisme cellulaire. Des dérégulations de cette voie sont fréquemment observées dans de nombreux types de cancers.

De plus, différentes études ont établi un lien entre mTOR et l'EMT. Si la majorité des études démontrent que l'inhibition de mTORC1 inhibe l'EMT (Gulhati *et al.*, 2011; Shorning *et al.*, 2011; Zong *et al.*, 2014), quelques études ont démontré l'effet inverse (Mikaelian *et al.*, 2013). Il est connu que l'infection par *H. pylori* induit une EMT (Baud *et al.*, 2013; Bessède *et al.*, 2014), mais les voies de signalisation impliquées ne sont pas clairement décrites. Nous nous sommes donc intéressées aux régulations de la voie de signalisation mTORC1 dans la carcinogenèse gastrique et plus particulièrement suite à l'infection par *H. pylori*.

Dans ce cadre nous avons analysé le transcriptome de 2 lignées cellulaires gastriques infectées par *H. pylori*. L'analyse de ces données indique que l'infection inhibe la voie de signalisation mTORC1. Cet effet a été confirmé fonctionnellement par l'étude de la phosphorylation des effecteurs de mTORC1. Finalement, nous nous sommes intéressées aux conséquences de cette inhibition sur l'autophagie, déjà décrite comme étant inhibée par *H. pylori*, et surtout sur l'induction de l'EMT par *H. pylori*.

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

Généralités sur l'autophagie

1. Définition

Le concept d'autophagie est apparu dans les années 1960. Les connaissances sur ce sujet sont restées très limitées jusqu'aux travaux de Yoshinori Ohsumi au début des années 1990 (Takeshige *et al.*, 1992). L'identification des mécanismes de l'autophagie et des 15 gènes clés impliqués dans ce processus, lui ont valu le prix Nobel de médecine en 2016.

L'autophagie est un processus homéostatique de dégradation intracellulaire, qui agit comme un mécanisme de survie dans des conditions de stress, maintenant l'intégrité cellulaire en régénérant les précurseurs métaboliques et en éliminant les débris subcellulaires (Choi *et al.*, 2013).

Des études récentes ont identifié la sélectivité dans la reconnaissance des substrats d'autophagie (précédemment considérée comme se produisant par la séquestration non spécifique d'éléments du cytosol), qui est orchestrée par des facteurs spécifiques (Johansen and Lamark, 2011). L'autophagie agit comme un mécanisme de contrôle de la qualité cytoplasmique, éliminant les agrégats de protéines et les organites endommagés afin de maintenir l'homéostasie cellulaire. L'autophagie participe au renouvellement des mitochondries (par le processus sélectif de mitophagie) et autres organites (Wang and Klionsky, 2011). De même, l'autophagie est impliquée dans l'élimination des agrégats protéiques poly-ubiquitinés (nommée « aggrephagy »), qui s'accumulent pendant le stress, le vieillissement et la maladie en raison des perturbations du repliement des protéines (Lamark and Johansen, 2012).

Les événements cellulaires de ce processus ancien et hautement conservé ont été bien caractérisés : le matériel cytoplasmique (protéines, organites) est entouré d'une membrane d'isolement, appelée phagophore, qui s'allonge pour former une vacuole à double membrane, appelée autophagosome. L'autophagosome fusionne avec le lysosome pour former un autolysosome et dégrader les éléments séquestrés dans l'autophagosome (Figure 27) (Mostowy, 2013).

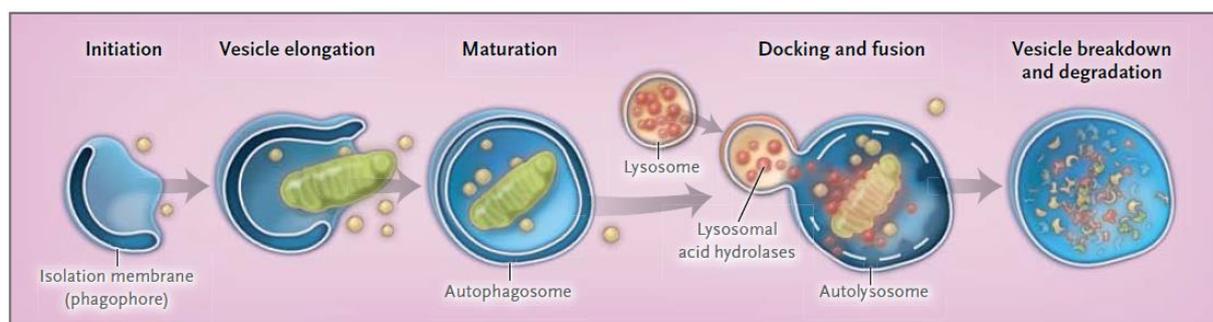


Figure 27 : Etapes de l'autophagie.

La voie autophagique passe par plusieurs phases : l'initiation avec la formation d'une membrane d'isolement ou phagophore, l'élongation des vésicules, la maturation de l'autophagosome et la fusion autophagosome-lysosome. Au stade final, le contenu de l'autophagosome est dégradé par les hydrolases de l'acide lysosomales et le contenu de l'autolysosome est libéré pour le recyclage métabolique. D'après (Choi et al., 2013)

2. Régulation de l'autophagie

L'autophagie permet ainsi de maintenir les activités cellulaires essentielles et la viabilité en réponse à la limitation des nutriments. L'autophagie est donc activée par l'AMPK, qui est un capteur d'énergie clé et régule le métabolisme cellulaire pour maintenir l'homéostasie énergétique. Inversement, l'autophagie est inhibée par le complexe mTORC1, le régulateur de croissance cellulaire central qui intègre les facteurs de croissance et les signaux nutritifs.

Chaque étape de l'autophagie est régulée par les Atg (« autophagy-related genes ») initialement identifiés chez les levures (Figure 28) (Suzuki *et al.*, 2004).

La phosphatidylinositol-3-kinase de classe I (PI3K) -AKT active mTORC1 en réponse à l'insuline et à d'autres signaux de croissance, agissant comme un régulateur négatif de l'autophagie. mTORC1 va donc inhiber l'autophagie en régulant directement le complexe constitué de UNC-51-like kinase 1 (ULK1), ATG13, ATG101, et FIP200. AKT peut également réguler négativement l'autophagie en phosphorylant Beclin1 (Figure 28) (Kim *et al.*, 2011; Choi *et al.*, 2013).

Par ailleurs, l'AMPK, en réponse au niveau d'AMP, régule négativement mTORC1 et phosphoryle également directement la kinase ULK1, agissant ainsi comme un régulateur positif de l'autophagie en réponse au manque d'énergie (Figure 28) (Kim *et al.*, 2011).

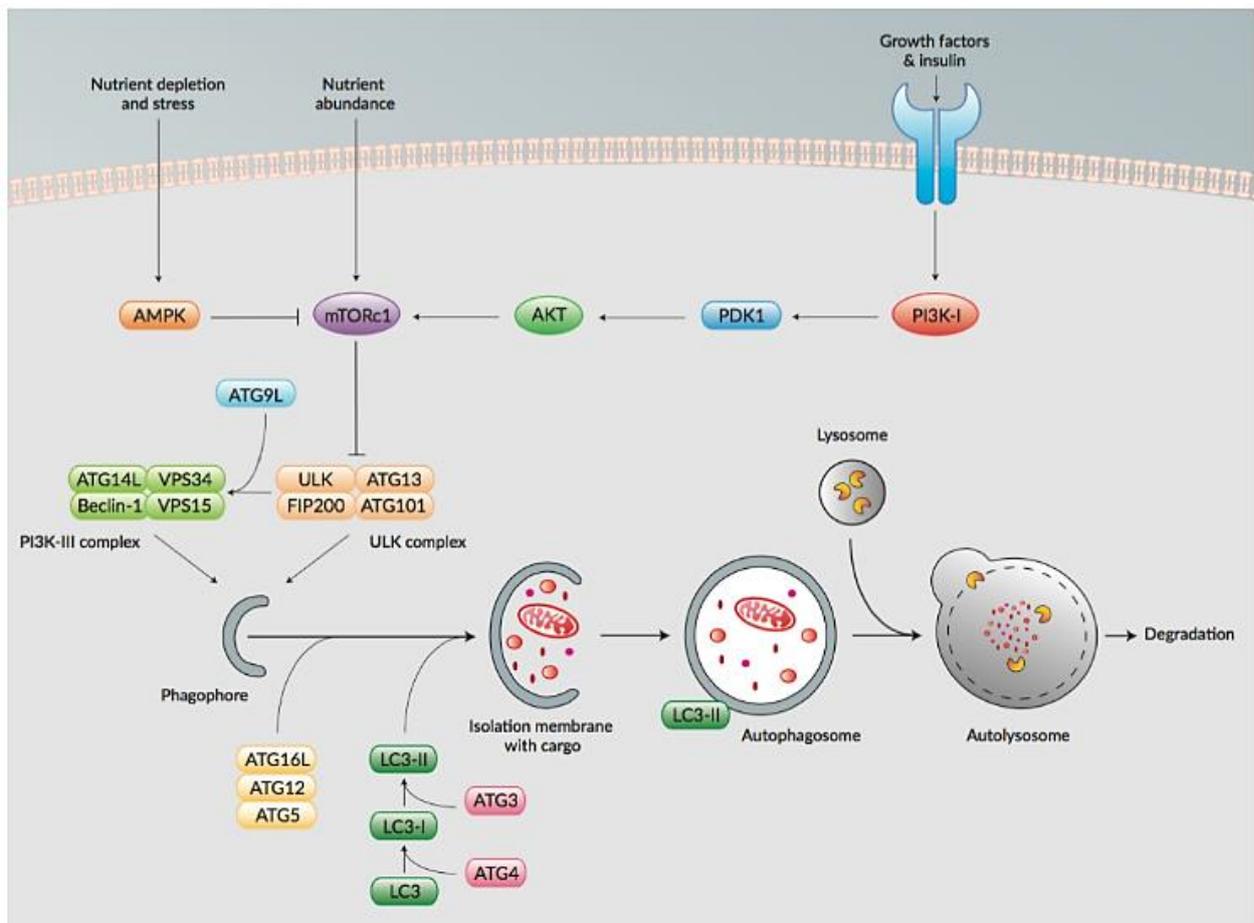


Figure 28 : Voies de régulation et acteurs de l'autophagie.
D'après le site internet (www.invivogen.com/autophagy)

3. Implication de l'autophagie dans les processus physiopathologiques

L'autophagie est maintenant un processus très étudié et est connue pour être largement impliquée dans les processus physiopathologiques (par exemple, le cancer, les troubles métaboliques et neurodégénératifs, et les maladies cardiovasculaires et pulmonaires) et dans les réponses physiologiques à l'exercice et au vieillissement (Figure 29) (Choi *et al.*, 2013).

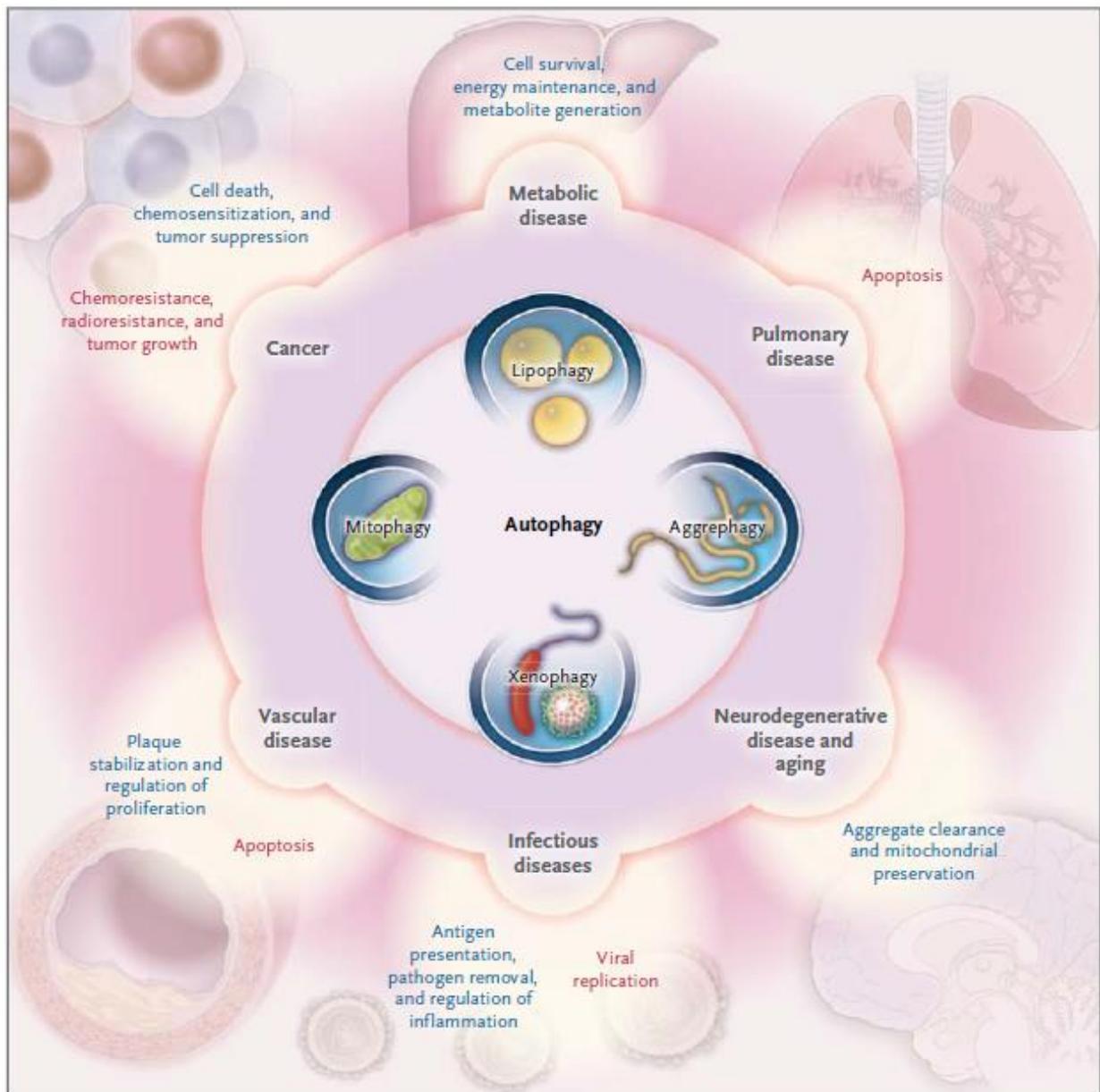


Figure 29 : Implication de l'autophagie dans les processus physiopathologiques.
D'après (Choi *et al.*, 2013)

Dans le cancer, l'autophagie inhibe ou favorise la prolifération des cellules cancéreuses ou la tumorigenèse, ce qui suggère que le rôle de l'autophagie dans le cancer dépend du contexte. L'autophagie peut donc avoir deux fonctions dans le cancer : une fonction en tant que suppresseur de tumeur grâce à l'élimination des substrats protéiques oncogéniques, des protéines toxiques non repliées et des organites endommagés ; ou, au contraire, une fonction pro-tumorale en fournissant des substrats pour le métabolisme et en maintenant l'activité des mitochondries (Figure 29) . Par conséquent, définir le rôle de l'autophagie dans le cancer, suivant le contexte, ainsi que les mécanismes impliqués, est important afin de déterminer le type de thérapie, ciblant l'autophagie, à appliquer.

Dans les maladies infectieuses, l'autophagie contribue à la régulation et à la fonction des réponses immunitaires innées et adaptatives. Plusieurs pathogènes humains importants sur le plan médical sont dégradés *in vitro* par l'autophagie, y compris les bactéries. Cette forme sélective d'autophagie est nommée xénophagie (Bauckman *et al.*, 2015).

Des données émergentes indiquent que la xénophagie, joue un rôle crucial dans la pathogenèse du cancer gastrique induit par l'EBV et *H. pylori*. La xénophagie reconnaît spécifiquement *H. pylori* et l'EBV et cible ces pathogènes afin de les dégrader. Or, il a été montré que *H. pylori*, bien qu'il n'empêche pas la formation des autophagosomes, est capable, *via* VacA, d'altérer fortement la dégradation du contenu des autophagosomes en bloquant la fusion avec le lysosome (Zhang *et al.*, 2013). Ainsi, la dérégulation de la xénophagie induite par *H. pylori* peut être liée à la tumorigenèse gastrique et peut donc représenter une cible thérapeutique intéressante.

***Helicobacter pylori* infection induces mTORC1 inhibition in human gastric cancer cells**

Sarah Courtois¹, Clément Bodineau², Philippe Lehours^{1,3}, Francis Mégraud^{1,3}, Christine Varon¹, Raúl V. Durán², and Emilie Bessède^{1,3}

1 INSERM, Univ. Bordeaux, UMR1053 Bordeaux Research In Translational Oncology, BaRITOn, F-33000 Bordeaux, France.

2 Institut Européen de Chimie et Biologie, 2 Rue Robert Escarpit, 33607 Pessac, France; INSERM U1218 Unit, Institut Bergonié, 229 Cours de l'Argonne, 33076 Bordeaux, France; University of Bordeaux, Bordeaux, France.

3 French National Reference Center for Campylobacters and Helicobacters in Bordeaux (CNRCH), University Hospital of Bordeaux, France

Contact: Dr. Emilie Bessède, INSERM, Univ. Bordeaux, UMR1053 Bordeaux Research In Translational Oncology, BaRITOn, F-33000 Bordeaux, France. Email: emilie.bessede@u-bordeaux.fr.

Keywords: gastric adenocarcinoma, transcriptomic analysis, autophagy

Abstract

Gastric cancer is the third leading cause of cancer-related deaths worldwide and has still a poor prognosis. The main known cause is the bacterium *Helicobacter pylori* which infects more than half of the world's population. This bacterium has been classified as a Group I carcinogen and induces an epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) leading to the emergence of cells with cancer stem cell properties. The underlying mechanisms are not well characterized. The mammalian target of rapamycin (mTOR) is a central regulator of many fundamental cell processes such as protein synthesis, autophagy, cellular metabolism, growth and survival. Deregulations have been shown to be implicated in numerous human cancers. The aim of this study was to evaluate the effect of the *H. pylori* infection on the mTOR pathway. Here, we showed that mTORC1 pathway was inhibited in response to *H. pylori* infection. This effect was combined with an activation of autophagy pathway (transcriptomic analysis) and a regulation of EMT.

Introduction

Gastric cancer is the third leading cause of cancer-related death worldwide. Gastric adenocarcinoma (GC) represents the majority of the cases. This cancer has a poor prognosis with only 1 in 5 patients surviving longer than 5 years after diagnosis. The main known cause is the chronic infection with *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), a worldwide infection which affects nearly 4.4 billion people, more than half of the world's population [1]. Approximately 1% of infected people develop a gastric adenocarcinoma (in Japan, approximately 10% of the infected individuals develop gastric cancers), and this bacterium has been classified as a Group I carcinogen by the World Health Organisation in 1994. Thus, it is very important to investigate how the bacterial infection can lead to gastric adenocarcinoma.

H. pylori is a Gram-negative bacterium and acts via several virulence factors: CagA is the most implicated in gastric carcinogenesis [2]. Previous studies have demonstrated that *H. pylori* induced an epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) characterized by a change in cells' phenotype from an epithelial cubic phenotype to elongated cells corresponding to mesenchymal phenotype [3]. These cells acquire migratory and invasive properties and express transcriptomic factors, Snail1, Zeb1 and Vimentin, considered as EMT markers [4]. Moreover, EMT induced emergence of cells with cancer stem cell (CSC) properties and expressing the gastric CSC marker CD44 [5]. Thus, it is necessary to understand the signalling pathways implicated in the EMT responsible for the gastric carcinogenesis in order to identify new potential therapeutic targets.

The mammalian target of rapamycin (mTOR) is a serine/threonine kinase organised within two distinct complexes, mTORC1 and mTORC2, and integrates both intracellular and extracellular signals. mTOR is a central regulator of many fundamental cell processes as protein synthesis, autophagy, cellular metabolism, growth, survival. Deregulated mTOR signalling is implicated in several human diseases and particularly in the progression of cancer [6]. Indeed, increased

activation of mTORC1 is observed in numerous human cancers [7]. Thus, rapamycin, a specific inhibitor of mTOR, is used in cancer treatment [8]. However, targeting mTOR using rapamycin has a limited outcome in patients. Recent elements highlight an additional role of mTOR as a tumor suppressor [9], explaining the modest efficiency of rapamycin in the clinical setting. Different studies have shown a link between mTOR and EMT. The majority of studies have shown that mTOR inhibition leads to an EMT inhibition [10]–[12]. However, another study have shown that mTOR inhibition could lead to an EMT activation [13], indicating that mTOR inhibition consequences have not totally been elucidated.

Previous studies have shown a high mTOR expression and activation in gastric carcinoma biopsies [14], [15]. Despite this fact, there are few reports about the effect of the *H. pylori* infection on the regulation of the mTOR pathway.

The aim of this study was to investigate the effects of *H. pylori* and its virulence factors on the mTOR pathway, and the consequences of its potential regulation on EMT.

Materials and Methods

GC cell lines

The gastric epithelial cell lines AGS, MKN45, MKN74 were cultured in DMEM/F12 media (AGS) or RPMI-1640 media (MKN45 and MKN74) supplemented with GlutaMAX, 10% heat-inactivated fetal bovine serum, penicillin and streptomycin (all from Invitrogen, Cergy-Pontoise, France), at 37°C in a humidified 5% CO₂ atmosphere.

Bacterial culture

All *H. pylori* strains (7.13 and 7.13 deleted for CagA) were cultured in the National Reference Center for Campylobacters and Helicobacters of Bordeaux. Bacteria were cultured at 35 °C on Wilkins-Chalgren agar plates (Thermo Fisher Diagnostics, Dardilly, France) supplemented with human blood (10% v/v) and antibiotics (10 µg/ml of vancomycin, 2 µg/ml of cefsulodin, 5 µg/ml of trimethoprim, and 1 µg/ml of amphotericin B) named Pylo medium, under microaerobic conditions (5% O₂, 10% CO₂, and 85% N₂) in a microaerobic workstation.

For coculture experiments, *H. pylori* strains were grown at 35 °C for 24 h. Bacteria were then resuspended in phosphate saline buffer (PBS) and the suspension was adjusted to an OD_{600 nm} = 1 (corresponding to 2 × 10⁸ CFU/ml). The bacteria were added at a multiplicity of infection (MOI) of 25 to AGS cells and 50 to MKN45 cells for 24 h.

Transfection and plasmids

The plasmid transfections were carried out using the transfection reagent Jetpei (Polyplus Transfection, Illkirch, France) according to the manufacturer's instructions. Cells were transfected with pcDNA3-FLAG-Rheb (Plasmid #19996), coding for the wild-type (WT) form of Rheb or pcDNA3-FLAG-Rheb-N153T (Plasmid #19997) coding for the constitutively active form of Rheb, always linked to GTP (Addgene, Cambridge, England). Twenty-four hours later cells were infected with *H. pylori* for 24 additional hours.

Immunoblots

After the respective treatments, cells were washed two times with PBS and lysed with RIPA buffer containing a cocktail of protease inhibitor (P8340) (Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France), inhibitors of phosphatases (P0044 and P5726) (Sigma) and PMSF 1 mM. Protein quantification was performed using Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Villebon-sur-Yvette, France). After the electrophoresis, the proteins were transferred to a nitrocellulose membrane (midi kit, Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) with Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad). Finally, membranes were imaged using the ChemiDoc MP imager (Bio-Rad).

Antibodies against S6 (#2217, dilution 1:1,000), phospho-S6 (Ser235/236) (#4856, dilution 1:1,000), S6K (#2708, dilution 1:1,000), phospho-S6K(T389) (#9205, dilution 1:1,000), phospho-4EBP1(T37/46) (#2855, dilution 1:1,000), LC3 AB (#12741, dilution 1:1,000) were obtained from Cell Signaling Technology. Antibody against α -tubulin (T9026, dilution 1:1,5000) was obtained from Sigma. The secondary antibodies anti-mouse (#7076, dilution 1:1,000) and anti-rabbit (#7074, dilution 1:1,000) were obtained from Cell Signaling Technology.

Immunofluorescence

25,000 cells cultured on glass coverslips were fixed with 4% paraformaldehyde solution for 10 minutes and processed for immunofluorescent staining as previously described [16]. Phosphorylation of Phospho-S6 Ribosomal Protein (Ser235/236) was assessed by immunofluorescence with Phospho-S6 Ribosomal Protein (Ser235/236) antibody (Cell Signaling) at a 1:100 dilution and anti-rabbit Alexa-488-labelled secondary antibody (1:300, Molecular Probes). F-Actin (in red) was marked with Alexa-546-labelled phalloidin (1:250, Molecular Probes) and nuclei (in blue) with DAPI. Images were taken using an Eclipse 50i

epi-fluorescence microscope (Nikon Instruments, Champigny sur Marne, France) with Nis Element acquisition software and x40 oil immersion objective.

RNA extraction, transcriptome and RT-qPCR

Total cellular RNAs were extracted using Trizol reagent (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) and quantified by their absorbance at 260 nm.

For the transcriptome, RNAs were extracted using RNeasy (Qiagen), and the RNA Integrity Number (RINs) were determined on the TapeStation (Agilent). The transcriptome was performed at the GeTrix Platform (Toulouse, France) with the G3 HE 8x0 microarrays (Agilent). Gene expression was analysed using the KEGG pathway database.

For RT-qPCR, reverse-transcription was performed with 1 µg of total RNA using the Quantitect Reverse Transcription kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's recommendations. Quantitative PCR was performed using the SYBR qPCR Premix Ex Taq (TAKARA Bio, Japan) with specific primers at 0.2 µM (HPRT1 and TBP were used as internal control genes).

Statistical analysis

Quantification values represent the mean and the interval of values. Statistics were performed using One-Way ANOVA for multiple comparisons on GraphPad Prism 7.02 (La Jolla, CA, USA). Differences were considered significant at $p < 0.05$.

Results and discussion

H. pylori inhibits mTORC1 pathway

A transcriptomic analysis was performed on AGS and MKN45 cell lines infected or not with *H. pylori* for 24 h. Expression of genes implicated in the mTOR pathway were analysed using the KEGG pathway database. We retained only genes whose expression was significantly regulated in the 2 cell lines in response to the infection: *HRAS*, *AKT2*, *PIK3CD*, *PIK3CA*, *PIK3C3*, *CAB39*, *CAB39L*, *PRKAG2*, *TSC1*, *RHEB*, *MLST8*, *EIF4EBP2*, *EIF4E*, *RPS6KB1*, *ULK1* (Figure 1A).

Expression of genes *CAB39*, *CAB39L*, *PRKAG2* and *TSC1*, known to be implicated in a negative regulation of mTORC1 [7], [17] was significantly increased. The *CAB39* and *CAB39L* genes' expression, implicated in the complex LKB1/STK11/Mo25 which activates the AMP-activated protein kinase (AMPK) [18] was significantly increased with the infection. Furthermore, the expression of AMPK gamma 2 subunit, *PRKAG2*, was also significantly increased with the infection.

Expression of subunits (*PIK3CD*, *PIK3CA*, *PIK3C3*) composing the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) was significantly increased with the infection. PI3K is known to activate Akt, resulting in a positive regulation of mTORC1. However, our transcriptomic analysis has revealed that *AKT2* expression was significantly decreased with the infection. Moreover, expression of *HRAS*, another activator of mTORC1, was also significantly decreased with the infection.

These 3 pathways, AMPK, PI3K/Akt and Ras, converge toward the complex TSC1/TSC2, responsible for the GTP/GDP exchange of Rheb. When Rheb is linked to GTP, it can activate mTORC1, in contrast, Rheb-GDP is inactive and cannot activate mTORC1. Expression of *TSC1* gene was significantly increased with the infection. In contrast, *RHEB* expression was

significantly decreased with the infection. These results suggest that the infection activates the inhibitor complex TSC1/TSC2, and thus inhibits Rheb.

mLST8 is a common subunit of both complexes mTORC1 and mTORC2, and is necessary for activation of the mTOR kinase [19]. mLST8 directly stabilizes the active site of mTOR, supporting the idea that mLST8 plays a critical role in mTOR kinase activity [19]. In both cell lines, expression of *MLST8*, coding for mLST8 protein, was significantly decreased with the infection (Figure 1A), suggesting an inhibition of mTORC1.

Expression of downstream effectors positively regulated by mTORC1 was significantly decreased with the infection (*EIF4EBP2*, *EIF4E* and *RPS6KB1*) while expression of *ULK1* gene, coding for a downstream effector negatively regulated by mTORC1 [17], was significantly increased (Figure 1A).

Thus, our transcriptomic data have shown that mTORC1 pathway is inhibited in response to *H. pylori* infection.

To confirm the transcriptomic data, western-blot analysis was performed on AGS cells infected or not with *H. pylori* 7.13 in order to study the phosphorylation status of downstream effectors S6K, S6 and 4EBP1, revealing the mTORC1 activation status (Figure 1B). Independently of the infection, cells were treated with rapamycin, a well-known inhibitor of mTORC1, and used as a positive control. In AGS cells, in response to the infection, the phosphorylation of the 3 effectors of mTORC1 (S6K, S6 and 4EBP1), was strongly decreased (Figure 1B). Same results were obtained with MKN45 cell line (data not shown).

Immunofluorescence performed on AGS cells has shown a decrease of the phosphorylation of S6 when cells were infected with *H. pylori* confirming the previous results (Figure 3C). Furthermore, infection with *H. pylori* deleted for CagA did not decrease the S6 phosphorylation, implying that mTORC1 inhibition seems to be CagA dependent.

The mTORC1 inhibition in response to *H. pylori* infection was a surprising result. Indeed, the few existing studies relating a *H. pylori* impact on mTORC1 have reported an activation of PI3K/Akt/mTOR signalling pathway with the infection [20]–[22]. However, these results were obtained from 0.5 to 9 hours post-infection with a maximum of the mTOR activation (S6 phosphorylation status) around 6h post-infection, while our study was performed after 24h of infection. It is therefore necessary to perform kinetics of infection from 0.5 to 24h or more, in order to study the mTORC1 variations in response to *H. pylori* infection. It is also necessary to test different strains of *H. pylori* and different mutants, to confirm the role of CagA in the inhibition of mTORC1.

Our study reports for the first time an mTORC1 inhibition in response to *H. pylori* in an *in vitro* model of co-culture. In order to understand the consequences of this inhibition we looked two pathways known to be regulated by mTORC1: autophagy pathway [17] and EMT [10]–[13].

***H. pylori* infection activates autophagy**

Our previous results were not incoherent with the possible consequences of a mTORC1 inhibition, particularly on autophagy. Indeed, mTORC1 is known to be a major regulator of autophagy [23]. Depending on the nutrients' availability, mTORC1 negatively phosphorylates ULK1 to inhibit autophagy initiation [24]. Under energy depletion conditions, nutrient starvation, mTORC1 inhibition allows ULK1 activation and the phagophore initiation which corresponds to the first step of autophagy.

A transcriptomic analysis was performed on AGS, MKN45 and MKN74 cell lines infected or not with *H. pylori* for 24 h. Expression of genes implicated in autophagy were analysed using the KEGG pathway database and only genes which expression was significantly regulated in the 3 cell lines in response to the infection were retained. Thus, upon 36 genes coding for

autophagy machinery components, 14 genes were significantly regulated in the 3 gastric cancer cell lines in response to *H. pylori* infection: *RB1CC1*, *SQSTM1/p62*, *NFKB1*, *NPC1*, *DRAM1*, *ATG16L2*, *WIPI1*, *ULK1*, *MAP1LC3B*, *GABARAPL1*, *GABARAP*, *BECN1*, *ATG4C*, *AMBRA1* (Figure 3A). Except for *ATG4C*, they were all upregulated in response to the infection, suggesting an activation of autophagy. Among them, *ULK1* expression, a downstream effector of TORC1, was increased. Moreover, western blots have shown an increase in the expression of the microtubule-associated protein light chain (LC3) with the infection (Figure 3B). This protein is used to monitor autophagy. The cytosolic version of LC3 is named LC3-I. When autophagy is active, LC3-I is conjugated to phosphatidylethanolamine to form LC3-phosphatidylethanolamine conjugate (LC3-II), which is recruited to autophagosomal membranes. Thus, relative amount of LC3 can be compared with LC3-I as an indication of autophagosomes' quantity. Moreover, it is necessary to complete this experiment by an analysis of LC3-II levels in the presence and absence of lysosomal inhibitors, to differentiate whether LC3-II accumulation is due to an increase in autophagic flux or to failed autophagosome maturation.

It has been previously shown that *H. pylori* induced autophagosomes' formation and therefore autophagy, depending on the vacuolating cytotoxin (VacA) [25]. Induction of autophagy may serve as a host defence to eliminate invading bacteria. Indeed, intracellular survival of bacteria was increased when autophagy was disrupted [26]. Furthermore, it was also shown that prolonged exposure to the toxin VacA disrupts autophagosomes' maturation [27]. To conclude, it seems that the infection activates autophagy, then in response to a prolonged exposure to VacA, autophagy is disrupted. Surprisingly, all these studies demonstrate that regulation of autophagy is due to VacA. However, in our model, *H. pylori* 7.13 strain does not express VacA (personal data). Moreover, a recent study revealed that CagA could in fact be implicated in the negative regulation of autophagy [20].

Here also, our results are contradicting with previously published works, and it will be interesting to test different strains and mutants of *H. pylori* to clarify the different virulence factors implicated in the autophagy induction.

Finally, it will be interesting to perform kinetics of infection to study the regulation of autophagy and to determine if the induction/inhibition of autophagy can be correlated with the regulation of mTOR. It will also be really interesting to determine if the induction of autophagy is related to the inhibition of mTOR and if, when mTOR is re-activated, the induction of autophagy could be blocked.

Moreover, mechanisms implicated in the regulation of autophagy in response to the infection are not clearly identified.

Implication of mTORC1 in *H. pylori* induced-EMT

As previous studies in other cancer models have shown, that the mTOR signalling pathway was implicated in EMT related to carcinogenesis [10]–[13], and as *H. pylori* induces an EMT, another aim of this study was to investigate if there is a link between mTORC1 and *H. pylori* induced-EMT. Thus as *H. pylori* inhibits mTORC1, we asked if the reactivation of mTORC1 could block *H. pylori* induced-EMT. To answer this question, cells were transfected with plasmids expressing Rheb wild-type (WT), able to exchange its GDP and GTP and used as a control condition, or plasmids expressing mutated Rheb, constitutively active, i.e. always linked to GTP and able to activate mTORC1.

Western-blot analysis was performed to evaluate the activation status of mTORC1 in the different conditions (Figure 3A). Rapamycin treatment served as control for the mTORC1 inhibition. Surprisingly, inhibition of mTORC1 in response to the infection was lost when cells were transfected with the plasmid expressing Rheb WT. As shown in Figure 1, expression of Rheb was decreased with the infection. Therefore, it is possible that the induced expression of Rheb

WT was sufficient to activate mTORC1. Depending on the activation of the upstream pathways, Rheb WT was able to link GTP and in turn to activate mTORC1. It is necessary to perform a transfection with the empty plasmid as control.

mRNA expression of EMT markers *Zeb1*, *Snail1*, β -catenin and N-cadherin were studied in order to determine if regulation of mTORC1 was implicated in *H. pylori* induced-EMT (Figure 3B). As our transfection model needs to be improved, it was not possible to answer this question. However, it is possible to affirm that inhibition of mTORC1 is not sufficient to induce EMT. Indeed, rapamycin treatment inhibits mTORC1 (Figure 3A) but does not induce EMT, as shown by the expression of EMT markers which was not increased (Figure 3B). Moreover, mTORC1 status seems implicated in the regulation of EMT given that significant differences in EMT markers expression were observed between both infected and transfected conditions.

Conclusion

This work revealed that 24 h infection of gastric cancer cell lines with *H. pylori* leads to an inhibition of mTORC1 pathway, both transcriptionally and functionally. Surprisingly, this fact is contradicting other studies describing an mTORC1 activation in response to *H. pylori* after 6 h of infection [20]–[22]. Supplementary experiments are necessary to determine the impact of the infection on the mTOR pathway at different time points and to define the virulence factors implicated.

Nevertheless, our results are coherent with cellular processes already described in response to the infection, especially with the activation of autophagy. Finally, mTOR regulation seems implicated in the *H. pylori* induction of EMT.

Conflict of interest statement

None declared.

References

- [1] J. K. Y. Hooi *et al.*, ‘Global Prevalence of *Helicobacter pylori* Infection: Systematic Review and Meta-Analysis’, *Gastroenterology*, vol. 153, no. 2, pp. 420–429, Aug. 2017.
- [2] M. Hatakeyama, ‘*Helicobacter pylori* CagA and gastric cancer: a paradigm for hit-and-run carcinogenesis’, *Cell Host Microbe*, vol. 15, no. 3, pp. 306–316, Mar. 2014.
- [3] J. Baud, C. Varon, S. Chabas, L. Chambonnier, F. Darfeuille, and C. Staedel, ‘*Helicobacter pylori* initiates a mesenchymal transition through ZEB1 in gastric epithelial cells’, *PloS One*, vol. 8, no. 4, p. e60315, 2013.
- [4] R. Kalluri and R. A. Weinberg, ‘The basics of epithelial-mesenchymal transition’, *J. Clin. Invest.*, vol. 119, no. 6, pp. 1420–1428, Jun. 2009.
- [5] E. Bessède *et al.*, ‘*Helicobacter pylori* generates cells with cancer stem cell properties via epithelial-mesenchymal transition-like changes’, *Oncogene*, vol. 33, no. 32, pp. 4123–4131, Aug. 2014.
- [6] R. A. Saxton and D. M. Sabatini, ‘mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease’, *Cell*, vol. 168, no. 6, pp. 960–976, Mar. 2017.
- [7] M. Laplante and D. M. Sabatini, ‘mTOR signaling in growth control and disease’, *Cell*, vol. 149, no. 2, pp. 274–293, Apr. 2012.
- [8] J. Li, S. G. Kim, and J. Blenis, ‘Rapamycin: one drug, many effects’, *Cell Metab.*, vol. 19, no. 3, pp. 373–379, Mar. 2014.
- [9] V. H. Villar, T. L. Nguyen, S. Terés, C. Bodineau, and R. V. Durán, ‘Escaping mTOR inhibition for cancer therapy: Tumor suppressor functions of mTOR’, *Mol. Cell. Oncol.*, vol. 4, no. 3, p. e1297284, 2017.
- [10] B. Y. Shorning, D. Griffiths, and A. R. Clarke, ‘Lkb1 and Pten synergise to suppress mTOR-mediated tumorigenesis and epithelial-mesenchymal transition in the mouse bladder’, *PloS One*, vol. 6, no. 1, p. e16209, Jan. 2011.
- [11] P. Gulhati *et al.*, ‘mTORC1 and mTORC2 regulate EMT, motility, and metastasis of colorectal cancer via RhoA and Rac1 signaling pathways’, *Cancer Res.*, vol. 71, no. 9, pp. 3246–3256, May 2011.
- [12] H. Zong, B. Yin, H. Zhou, D. Cai, B. Ma, and Y. Xiang, ‘Inhibition of mTOR pathway attenuates migration and invasion of gallbladder cancer via EMT inhibition’, *Mol. Biol. Rep.*, vol. 41, no. 7, pp. 4507–4512, Jul. 2014.
- [13] I. Mikaelian *et al.*, ‘Genetic and pharmacologic inhibition of mTORC1 promotes EMT by a TGF- β -independent mechanism’, *Cancer Res.*, vol. 73, no. 22, pp. 6621–6631, Nov. 2013.
- [14] I. Riquelme *et al.*, ‘The Gene Expression Status of the PI3K/AKT/mTOR Pathway in Gastric Cancer Tissues and Cell Lines’, *Pathol. Oncol. Res. POR*, vol. 22, no. 4, pp. 797–805, Oct. 2016.
- [15] D. M. Badary, M. Z. A. A. Rahma, A. M. Ashmawy, and M. Z. Hafez, ‘H. pylori infection increases gastric mucosal COX2 and mTOR expression in chronic gastritis: Implications for cancer progression?’, *Pathophysiol. Off. J. Int. Soc. Pathophysiol.*, vol. 24, no. 3, pp. 205–211, Sep. 2017.

- [16] E. Bessède *et al.*, ‘Deletion of IQGAP1 promotes *Helicobacter pylori*-induced gastric dysplasia in mice and acquisition of cancer stem cell properties in vitro’, *Oncotarget*, vol. 7, no. 49, pp. 80688–80699, 06 2016.
- [17] M. Laplante and D. M. Sabatini, ‘mTOR signaling at a glance’, *J. Cell Sci.*, vol. 122, no. Pt 20, pp. 3589–3594, Oct. 2009.
- [18] M. M. Mihaylova and R. J. Shaw, ‘The AMPK signalling pathway coordinates cell growth, autophagy and metabolism’, *Nat. Cell Biol.*, vol. 13, no. 9, pp. 1016–1023, Sep. 2011.
- [19] K. Kakumoto, J.-I. Ikeda, M. Okada, E. Morii, and C. Oneyama, ‘mLST8 Promotes mTOR-Mediated Tumor Progression’, *PLoS One*, vol. 10, no. 4, p. e0119015, 2015.
- [20] N. Li *et al.*, ‘*Helicobacter pylori* CagA Protein Negatively Regulates Autophagy and Promotes Inflammatory Response via c-Met-PI3K/Akt-mTOR Signaling Pathway’, *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, vol. 7, p. 417, 2017.
- [21] J. Canales *et al.*, ‘*Helicobacter pylori* Induced Phosphatidylinositol-3-OH Kinase/mTOR Activation Increases Hypoxia Inducible Factor-1 α to Promote Loss of Cyclin D1 and G0/G1 Cell Cycle Arrest in Human Gastric Cells’, *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, vol. 7, p. 92, 2017.
- [22] O. Sokolova, M. Vieth, T. Gnad, P. M. Bozko, and M. Naumann, ‘*Helicobacter pylori* promotes eukaryotic protein translation by activating phosphatidylinositol 3 kinase/mTOR’, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 55, pp. 157–163, Oct. 2014.
- [23] J. D. Rabinowitz and E. White, ‘Autophagy and metabolism’, *Science*, vol. 330, no. 6009, pp. 1344–1348, Dec. 2010.
- [24] J. Kim, M. Kundu, B. Viollet, and K.-L. Guan, ‘AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1’, *Nat. Cell Biol.*, vol. 13, no. 2, pp. 132–141, Feb. 2011.
- [25] M. R. Terebiznik *et al.*, ‘Effect of *Helicobacter pylori*’s vacuolating cytotoxin on the autophagy pathway in gastric epithelial cells’, *Autophagy*, vol. 5, no. 3, pp. 370–379, Apr. 2009.
- [26] B. Tang *et al.*, ‘Compromised autophagy by MIR30B benefits the intracellular survival of *Helicobacter pylori*’, *Autophagy*, vol. 8, no. 7, pp. 1045–1057, Jul. 2012.
- [27] D. Raju *et al.*, ‘Vacuolating cytotoxin and variants in Atg16L1 that disrupt autophagy promote *Helicobacter pylori* infection in humans’, *Gastroenterology*, vol. 142, no. 5, pp. 1160–1171, May 2012.
- [28] Z. Wang, W. Jin, H. Jin, and X. Wang, ‘mTOR in viral hepatitis and hepatocellular carcinoma: function and treatment’, *BioMed Res. Int.*, vol. 2014, p. 735672, 2014.

Figures legends

Figure 1: mTORC1 inhibition by *H. pylori* infection

A Significant mRNA relative expression of genes implicated in mTORC1 pathway on *H. pylori*-infected cells compared to non-infected cells. Schematic diagram depicting main molecular actors of the mTOR pathway [28]. **B** Protein levels and phosphorylation status of the effectors S6K, S6 and 4EBP1 measured by western-blot performed on AGS cell lines infected or not with *H. pylori* 7.13 for 24h or treated with the mTORC1 inhibitor rapamycin. **C** Phosphorylation status of S6 studied by immunofluorescence on AGS cells infected with *H. pylori* 7.13 wild-type (*H. pylori* 7.13 WT) or with CagA-deficient strain (*H. pylori* 7.13 Δ CagA), or treated with rapamycin.

Figure 2: Autophagy activation by *H. pylori* infection

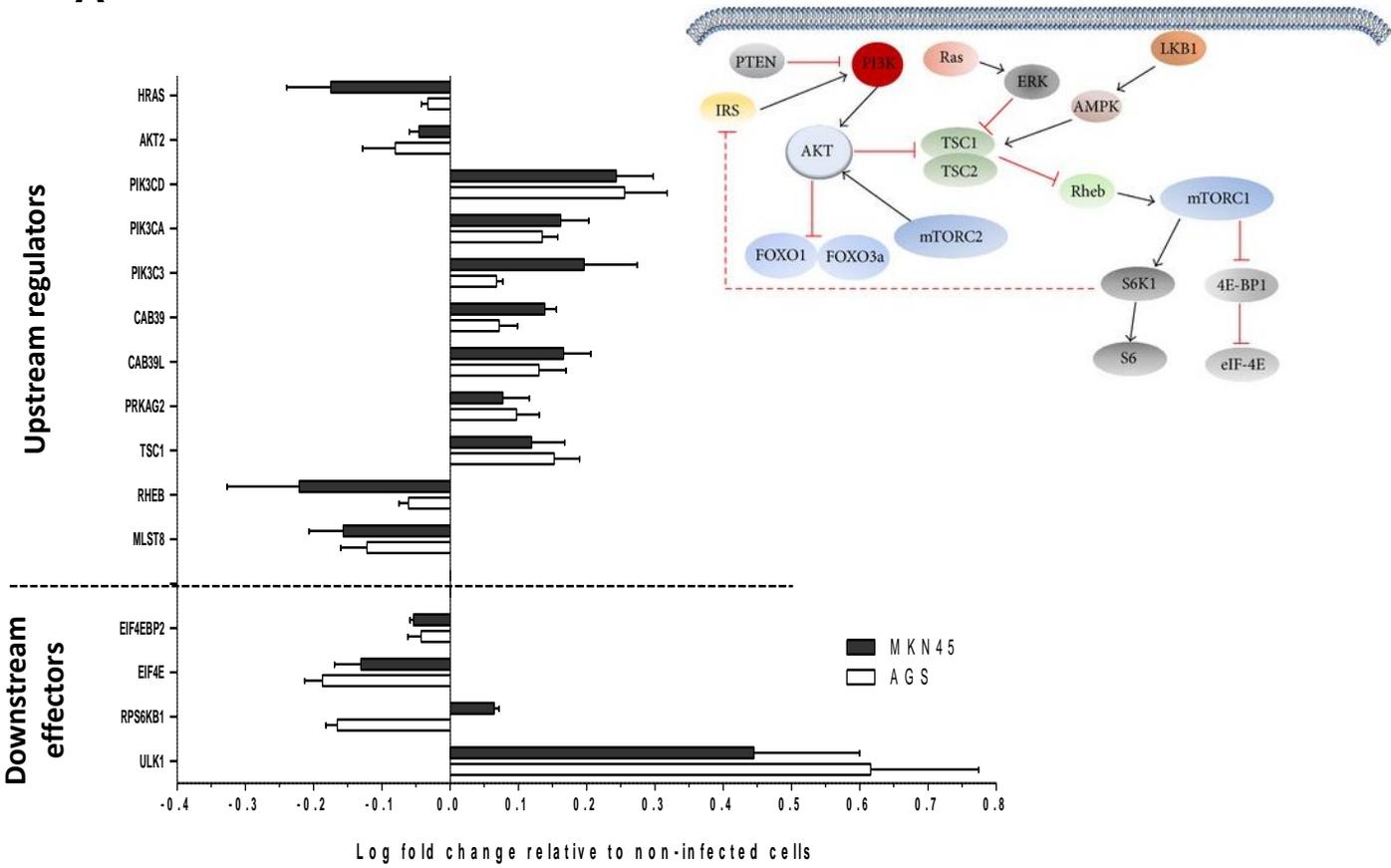
A mRNA relative expression of autophagy machinery components on *H. pylori*-infected cells compared to non-infected cells. **B** Protein level of LC3-I and LC3-II were measured by western-blot on AGS and MKN45 cell lines infected for 24h with *H. pylori* 7.13 wild-type (*H. p.* WT) or with CagA-deficient strain (*H. p.* Δ CagA), or treated with rapamycin.

Figure 3: Impact of mTORC1 on *H. pylori*-induced EMT

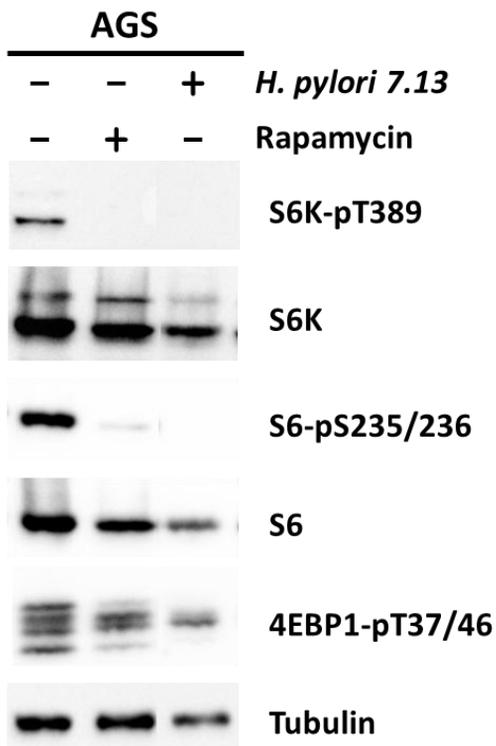
AGS and MKN45 cell lines transfected to express rheb wild type (Rheb-WT) or the constitutively active form of rheb (Rheb-GTP) (see Materials and Methods). 24 h later cells were infected with *H. pylori* 7.13 wild-type for 24 h. **A** Protein levels and phosphorylation status of the effectors S6K and S6 measured by western-blot. **B** mRNA relative expression of the EMT markers Zeb1, Snail1, β -catenin and N-cadherin. Data represent the mean and the interval of values. * $p < 0.05$ *** $p < 0.001$ vs control; # $p < 0.05$ ### $p < 0.001$ vs indicated condition. One-way ANOVA with Bonferroni post-test.

Figure 1

A



B



C

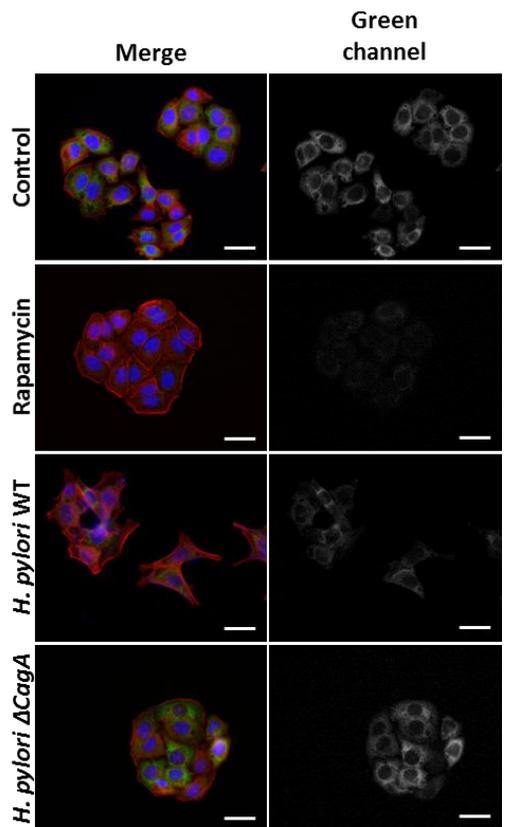


Figure 2

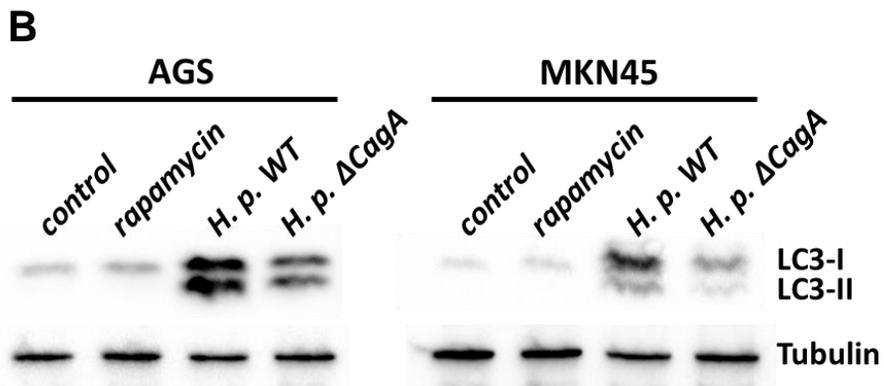
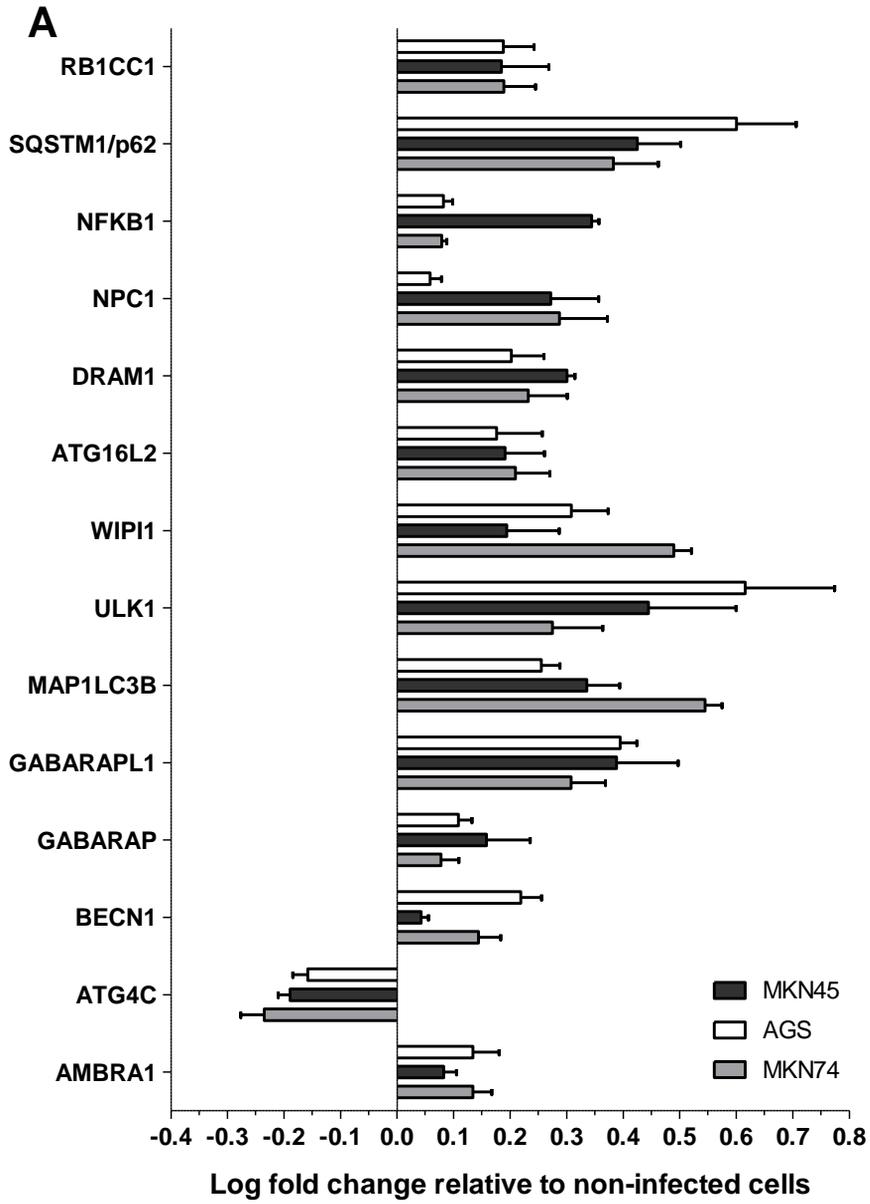
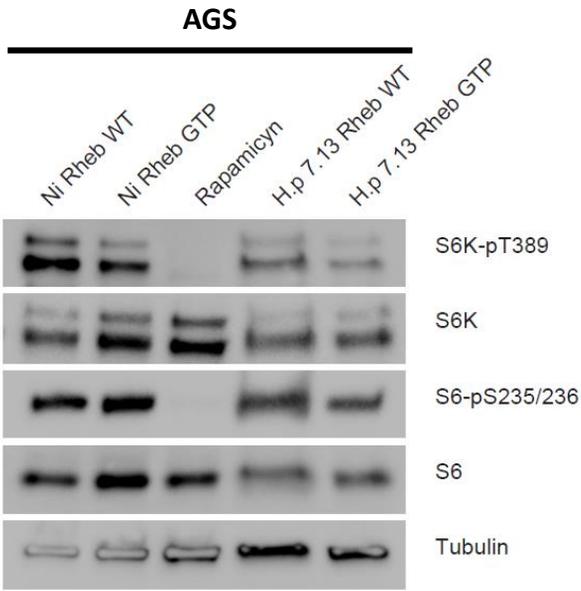
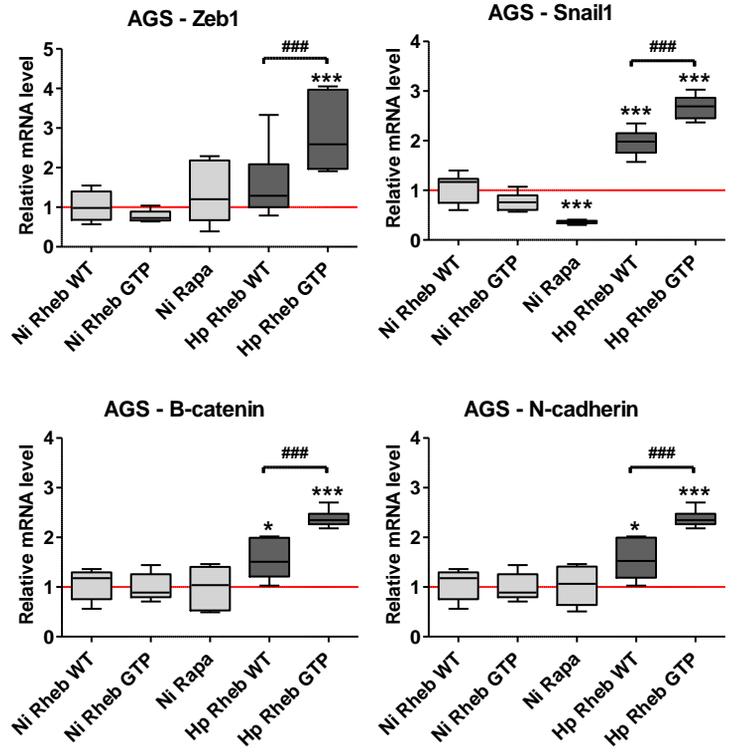


Figure 3

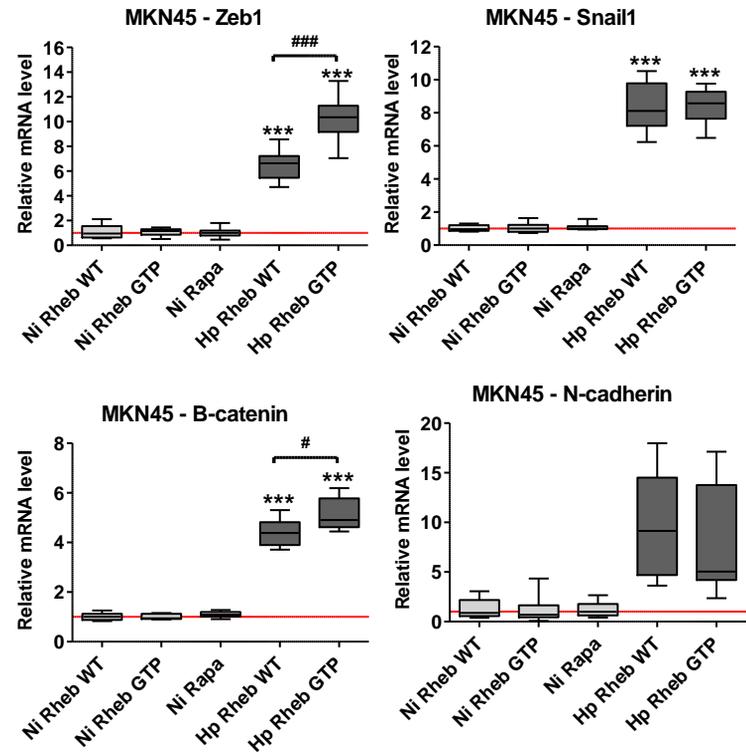
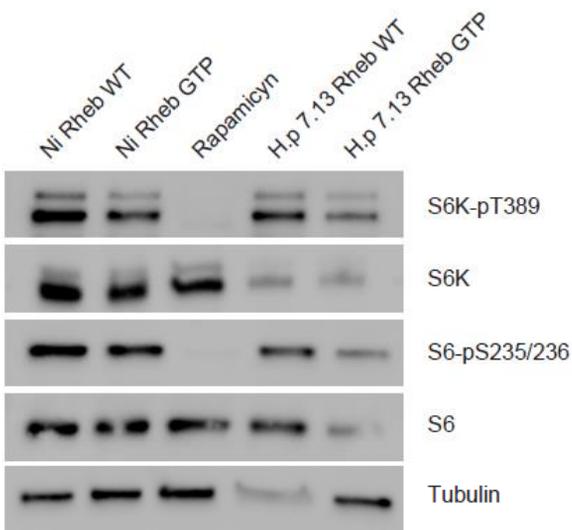
A



B



MKN45



Discussion

La première partie de mes travaux de thèse a permis de confirmer que la metformine possède des propriétés anti-tumorales et de démontrer, à partir de modèles mis au point au laboratoire, qu'elle est capable de cibler les CSC dans le cancer gastrique.

Les effets antitumoraux de la metformine ont été confirmés *in vitro* sur les lignées cellulaires par l'étude de la prolifération cellulaire qui est inhibée en réponse à la metformine du fait d'un arrêt du cycle cellulaire en phase G0/G1. Cet effet a été confirmé *in vivo* après xénotransferts en sous-cutané de deux lignées cellulaires et d'une tumeur de patient, chez des souris traitées quotidiennement par metformine, et qui présentaient un retard de croissance.

Les effets anti-CSC ont été démontrés *in vitro* au niveau fonctionnel par une diminution de la capacité de formation de tumorsphères en présence de metformine et au niveau transcriptionnel par la diminution de l'expression des marqueurs de CSC CD44, et du marqueur de cellules souche Sox2. Au contraire, la metformine augmente l'expression de KLF4, connu pour être diminué dans les cellules souches cancéreuses, et augmente l'expression du marqueur de différenciation Muc5AC, laissant supposer que la metformine pourrait induire une différenciation des CSC. *In vivo*, l'analyse de l'expression du marqueur CD44 indique que celui-ci diminue lorsque les souris sont traitées quotidiennement par de la metformine. De plus, les capacités d'auto-renouvellement des cellules isolées des tumeurs sont diminuées. Ces résultats ont permis de conclure que la metformine est capable de cibler les CSC gastriques *in vivo*.

Cet effet anti-CSC de la metformine avait déjà été démontré dans d'autres types de cancer. En particulier, dans le cancer du sein, Hirsch *et al.* ont été les premiers à démontrer la capacité de la metformine à tuer les CSC mammaires. *In vitro* ils avaient démontré que le traitement de lignées cellulaires mammaires diminuait la formation de mammosphères (tumorsphères formées par des lignées cellulaires cancéreuses mammaires) ainsi que la proportion de cellules exprimant le marqueur de CSC CD44. Ils avaient également démontré que le pré-traitement par la metformine d'une lignée cellulaire avant la xénotransfert chez la souris, bloquait la formation de tumeurs *in vivo* (Hirsch *et al.*, 2009).

Notre travail est cependant le premier à étudier l'impact de la metformine sur les CSC dans le contexte du cancer gastrique. Les données obtenues au cours de ma thèse ouvrent de nouvelles perspectives de recherche notamment dans l'utilisation de la metformine dans le traitement du cancer gastrique, en combinaison avec les thérapies existantes.

En effet, il serait intéressant de tester l'efficacité de la metformine en combinaison avec des chimiothérapies conventionnelles, dans le modèle du cancer gastrique. Ce qui permettrait de déterminer si la metformine peut supprimer les phénomènes de résistance et si elle peut augmenter l'efficacité de ces chimiothérapies. Ainsi, ces chimiothérapies pourraient être utilisées à des doses plus faibles, limitant l'apparition d'effets secondaires.

Yu *et al.* et Lesan *et al.* ont déjà étudié les effets d'une combinaison de la metformine avec la cisplatine (Lesan *et al.*, 2014; Yu *et al.*, 2015). Cependant ces deux études présentaient des résultats contradictoires, indiquant que la cisplatine ne semble pas être le candidat idéal à utiliser en combinaison avec la metformine dans le traitement du cancer gastrique.

La doxorubicine ou le 5-fluorouracile pourraient être des candidats intéressants. Ainsi, ai-je réalisé un premier test combinant la metformine à la doxorubicine dans notre modèle de formation de tumorsphères à partir des PDX (Figure 30). La capacité de formation de tumorsphères des PDX (« patient-derived gastric carcinoma xenografts ») traitées en curatif avec du PBS, de la metformine seule, de la doxorubicine seule ou avec de la metformine ET de la doxorubicine a été évaluée. Pour les GC06 et GC10 le nombre de tumorsphères présentes après les différents traitements n'est pas significativement diminué en cas d'association de la metformine avec la doxorubicine par rapport à la doxorubicine seule. En revanche, pour les GC04 et GC07, le nombre de tumorsphères est significativement plus faible en présence de l'association metformine et doxorubicine par rapport au traitement par doxorubicine seule. Dans ces 2 cas, l'utilisation combinée de la metformine et de la doxorubicine semble augmenter l'efficacité de la doxorubicine seule. Des tests complémentaires doivent être réalisés mais ces premiers résultats sont très prometteurs et renforcent la perspective d'une utilisation clinique de la metformine, seule ou en combinaison avec d'autres thérapies dans le traitement du cancer gastrique.

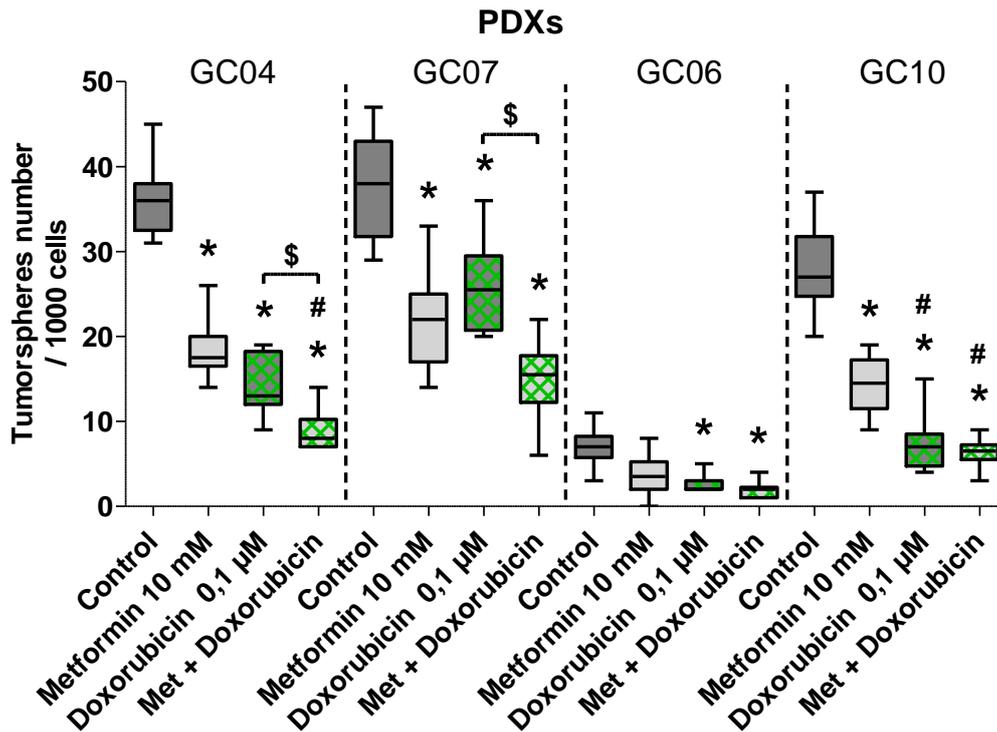


Figure 30 : Evaluation du nombre de tumorsphères restantes après un traitement curatif par metformine seule, doxorubicine seule et par la metformine associée à la doxorubicine.

Les PDX ont été cultivés en condition de non-adhérence pendant 5 jours, puis traitées par PBS (Control), metformine (10 mM) et/ou doxorubicine (0,1 µM). Le nombre de tumorsphères restant a été compté après 12 jours de traitement. Le graphique représente la moyenne ainsi que l'intervalle des valeurs (n=10). One-way ANOVA avec post-test de Bonferroni. *p<0,05 vs contrôle ; #p<0,05 vs Metformine 10mM seule ; \$p<0,05 vs traitement indiqué.

Actuellement, plus de 30 essais cliniques (phases I et II) combinant la metformine avec une autre molécule (doxorubicine, paclitaxel, rapamycine...) sont en cours dans de nombreux types de cancer, notamment dans le cancer colorectal en combinaison avec l'irinotecan, ou dans le cancer rectal en combinaison avec le 5-FU (Zhang and Guo, 2016). En revanche, aucun essai clinique sur l'utilisation de la metformine dans le cancer gastrique n'est rapporté à ce jour, montrant ainsi que nos travaux ouvrent potentiellement vers de nouvelles perspectives intéressantes à considérer.

Une autre perspective intéressante à considérer est d'identifier les mécanismes d'action de la metformine responsables de son effet « anti-CSC ». Dans ce but, après la soumission de mon premier article, j'ai réalisé quelques travaux qui devront être poursuivis. La metformine est connue pour inhiber le complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale induisant une diminution de la production d'ATP. Afin de vérifier si dans notre modèle la metformine diminue la production d'ATP, j'ai mesuré le ratio ATP/ADP dans des cellules traitées par metformine pendant 24 h et réalisé des « westerns blots » pour évaluer l'état d'activation de l'AMPK en réponse à la metformine (Figure 31). Les ratios ATP/ADP montrent que la metformine diminue la production d'ATP (Figure 31A), ce qui active l'AMPK visible par une augmentation de la forme phosphorylée de l'AMPK (Figure 31B).

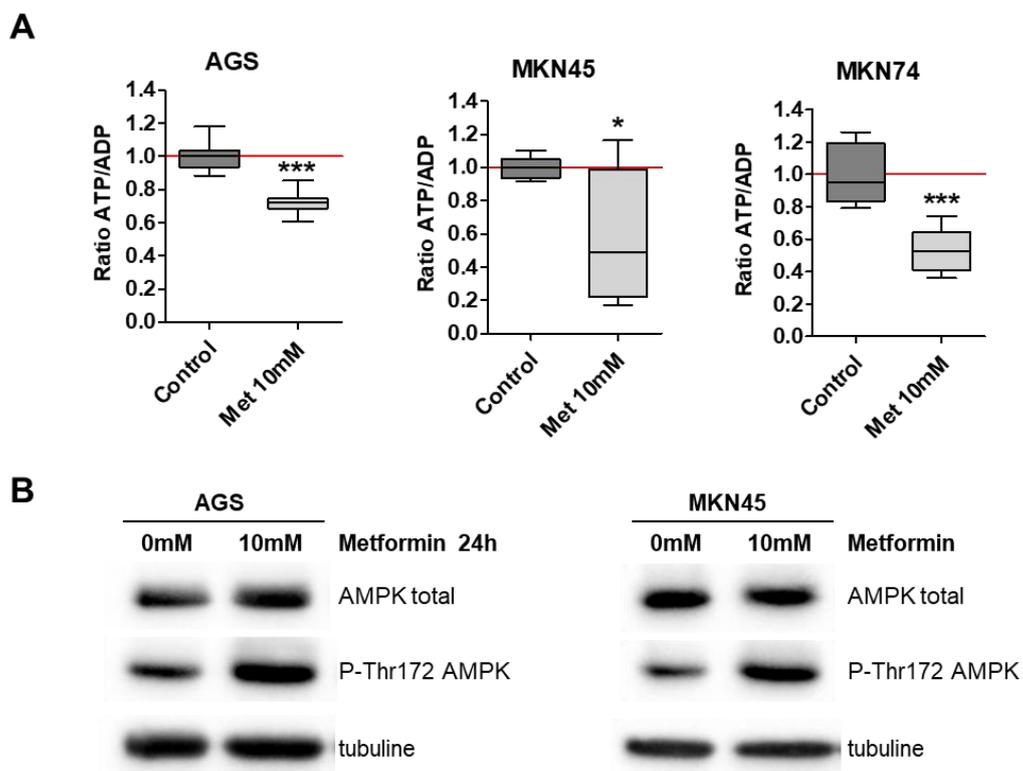


Figure 31 : La metformine diminue la production d'ATP et active l'AMPK.

Les lignées cellulaires AGS, MKN45 et MKN74 ont été cultivées 24h en présence de metformine à 10 mM. (A) Le ratio ATP/ADP a ensuite été dosé à l'aide du kit ADP/ATP Ratio Assay Kit (mak135 Sigma). Test Mann & Whitney ($2 < n < 3$) * $p < 0.05$ *** $p < 0.001$ vs contrôle. (B) L'état de phosphorylation, révélateur de l'état d'activation de l'AMPK, a été évalué par western-blot. La phosphorylation augmente en présence de metformine.

L'AMPK est connue pour inhiber mTORC1. mTORC1 est reconnu comme étant suractivé dans le cancer gastrique (Riquelme *et al.*, 2016; Badary *et al.*, 2017). Ces données nous ont conduites à nous demander si la metformine pouvait inhiber mTORC1, expliquant ainsi ces propriétés antitumorales. J'ai donc réalisé des « western blots » à partir de lignées cellulaires traitées par différentes concentrations de metformine afin d'évaluer l'état de phosphorylation des effecteurs de la voie mTOR en réponse à la metformine. Les résultats montrent que mTORC1 n'est pas inhibé en réponse à la metformine (Figure 32). Il semblerait donc que l'effet anti-CSC de la metformine n'implique pas la voie de signalisation mTORC1.

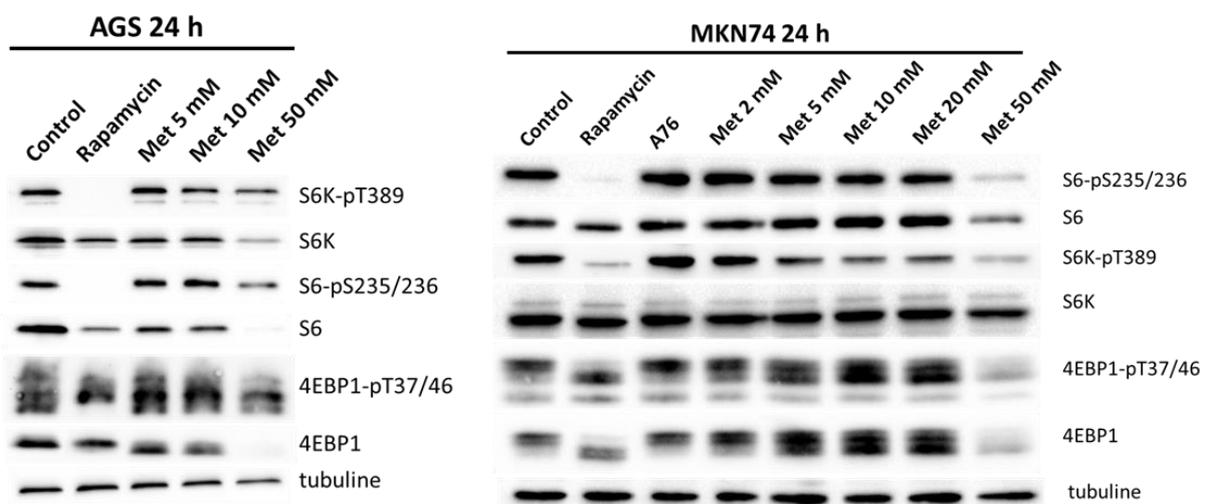


Figure 32 : La metformine n'inhibe pas la voie de signalisation mTORC1.

Les lignées cellulaires AGS et MKN74 ont été traitées 24h avec différentes concentrations de metformine (2, 5, 10, 20 ou 50 mM) ou avec la rapamycine (10 μ M) ou le composé A-769662 (A76) (10 μ M) un activateur direct de l'AMPK (Abcam ab120335). L'état de phosphorylation des effecteurs de mTORC1 indique l'état d'activation de mTORC1.

Une autre possibilité expliquant les effets anti-CSC de la metformine, pourrait impliquer la diminution de la production d'ATP en elle-même, qui aurait un rôle sur le métabolisme cellulaire des CSC. En effet, pour faire face à leur taux de prolifération élevé les cellules cancéreuses adaptent leur métabolisme cellulaire et, au lieu d'utiliser la phosphorylation oxydative (OXPHOS), c'est-à-dire le cycle de Krebs et la chaîne respiratoire mitochondriale, elles utilisent la glycolyse pour produire leur ATP, même en présence d'oxygène. Ce « switch » métabolique est connu sous le nom d'effet Warburg, du nom de celui-ci qui l'a décrit pour la première fois (Warburg, 1925). Contrairement aux cellules tumorales différenciées, les CSC présentent un phénotype métabolique distinct qui, selon le type de cancer, peut être fortement glycolytique ou dépendant de l'OXPHOS. Les caractéristiques métaboliques des CSC sont encore très discutées et étudiées : plusieurs études indiquent qu'elles sont principalement glycolytiques et d'autres considèrent que le métabolisme mitochondrial est leur principale source d'énergie. Dans les deux cas, la fonction mitochondriale est critique et prend une place centrale dans la fonctionnalité des CSC (Peiris-Pagès *et al.*, 2016; Sancho *et al.*, 2016). Ainsi, l'inhibition de la chaîne respiratoire et par conséquent l'inhibition de l'OXPHOS par la metformine induit une crise énergétique dans les CSC, et peut entraîner leur apoptose (Kim *et al.*, 2014; Sancho *et al.*, 2015). Il serait intéressant de déterminer dans notre modèle de carcinogenèse gastrique si la metformine induit une apoptose des CSC, dépendamment des régulations métaboliques entraînées par celle-ci.

Ces informations font penser que les effets de la metformine sur les CSC gastriques pourraient être dus à un stress énergétique et à des régulations métaboliques. Dans ce contexte de stress il est intéressant d'étudier, dans notre modèle, les conséquences de la metformine sur l'autophagie.

L'autophagie est un processus de dégradation essentiel au bon fonctionnement de la cellule en dégradant les composants cellulaires endommagés dans les lysosomes afin de préserver le bon fonctionnement cellulaire. Par ailleurs, l'autophagie peut être activée en cas de stress énergétique pour fournir les substrats nécessaires au métabolisme et ainsi participer au maintien de la fonction métabolique des mitochondries. Dans certains cas l'autophagie peut avoir un rôle antitumoral, mais dans la plupart des cas, ce processus favorise le cancer (White, 2015). En effet, dans les CSC, l'autophagie joue un rôle essentiel dans le maintien de l'état « souche » des cellules souches et les préserve des stress métaboliques (Guan *et al.*, 2013; Warr *et al.*, 2013; Ho *et al.*, 2017). L'autophagie est également connue pour favoriser la chimiorésistance des CSC (Wu *et al.*, 2013; Wei *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2015). Les efforts

visant à inhiber l'autophagie pour améliorer la thérapie contre le cancer ont ainsi suscité un grand intérêt.

Il est connu que la metformine peut activer l'autophagie dans différents contextes (Shi *et al.*, 2012; Feng *et al.*, 2014; J. Li *et al.*, 2016). Dans notre modèle, nous avons montré que la metformine active l'AMPK (Figure 31 B). Ainsi, nous avons commencé à étudier l'impact de l'activation de l'AMPK par la metformine sur l'autophagie. J'ai ainsi observé l'état de phosphorylation de ULK1 sur la sérine 555, cible directe de l'AMPK, dans notre modèle de lignées cellulaires en réponse à la metformine en réalisant des « western blots » (Figure 33A). La metformine augmente l'expression et la phosphorylation de ULK1, correspondant certainement à une activation de l'autophagie. Dès lors, nous avons cherché à déterminer les conséquences de l'induction de l'autophagie sur la capacité de formation de tumorsphères des PDX (« patient-derived gastric carcinoma xenografts ») en réponse à la metformine. Pour cela, nous avons traité les PDX avec un inhibiteur de l'autophagie, la bafilomycine seule ou en combinaison avec la metformine et avons compté le nombre de tumorsphères présentes dans les différentes conditions à la fin du traitement. La bafilomycine seule diminue légèrement, mais de manière significative, le nombre de tumorsphères par rapport à la condition non traitée. Son utilisation combinée avec la metformine potentialise les effets de la metformine puisque le nombre de tumorsphères est significativement diminué par rapport au traitement avec la metformine seule (Figure 33B). Ces résultats semblent indiquer que l'autophagie pourrait être utilisée par les CSC gastriques comme un mécanisme de survie et de résistance à la metformine pour restaurer les fonctions métaboliques. Afin de vérifier cette hypothèse, j'ai mesuré les ratios ATP/ADP dans des cellules traitées par metformine seule, bafilomycine seule ou par la combinaison metformine et bafilomycine pendant 24 h (Figure 33C). Le ratio ATP/ADP est encore plus diminué lorsque les cellules sont traitées avec la metformine et la bafilomycine ensemble. Ainsi, l'inhibition de l'autophagie par la bafilomycine semble aggraver le stress métabolique induit par la metformine étant donné que le ratio ATP/ADP est d'avantage diminué lorsque les deux molécules sont combinées (Figure 33C).

L'autophagie semble être un processus cellulaire très impliqué dans la carcinogenèse gastrique, aussi bien au niveau de l'infection par *H. pylori* qu'au niveau de la résistance des CSC gastriques (Qian and Yang, 2016). Il semble donc important de comprendre la régulation et le rôle de l'autophagie dans la carcinogenèse gastrique.

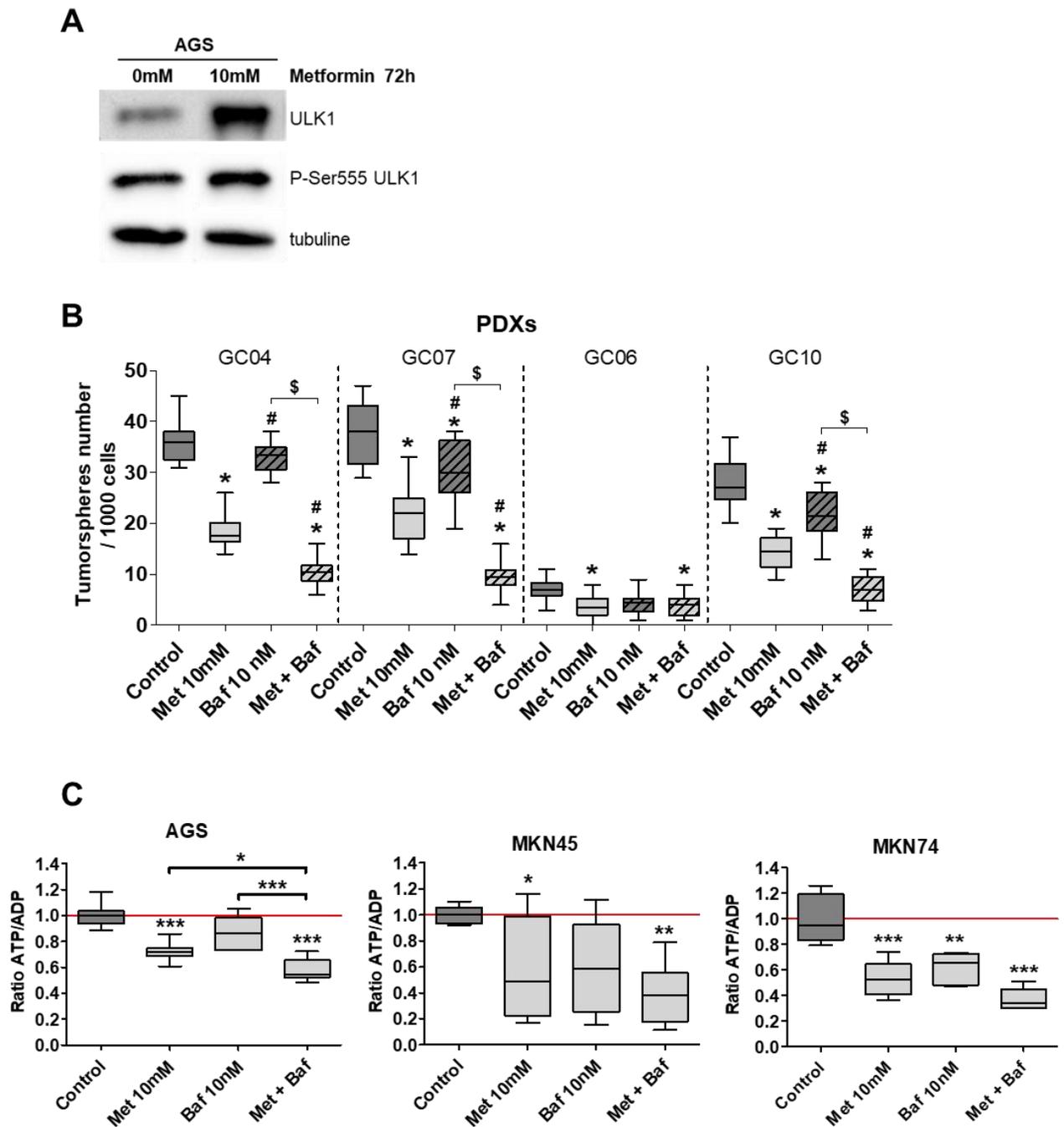


Figure 33 : Evaluation du rôle de l'autophagie dans les CSC gastriques, en réponse à la metformine

(A) La lignée cellulaire AGS a été traitée par metformine pendant 24 h. L'expression de ULK1 ainsi que son état de phosphorylation ont été analysés par « western blot ». (B) Les PDX ont été cultivées en condition de non-adhérence pendant 5 jours, puis traitées par metformine (10 mM) et/ou la bafilomycine (10 nM). Le nombre de tumorsphères restant a été compté après 12 jours de traitement. Le graphique représente la moyenne ainsi que l'intervalle des valeurs (n=10). One-way ANOVA avec post-test de Bonferroni. * $p < 0,05$ vs contrôle ; # $p < 0,05$ vs Metformine 10mM seule ; \$ $p < 0,05$ vs traitement indiqué. (C) Les lignées cellulaires AGS, MKN45 et MKN74 ont été cultivées 24 h en présence de metformine seule, bafilomycine seule ou par la combinaison metformine et bafilomycine. Le ratio ATP/ADP a ensuite été dosé à l'aide du kit ADP/ATP Ratio Assay Kit (mak135 Sigma). Test Mann & Whitney (2 < n < 3) * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ vs contrôle.

Dans la seconde partie de ce travail de thèse, nous avons découvert par hasard une nouvelle propriété antimicrobienne de la metformine dirigée contre *H. pylori*. Nous avons pu confirmer cette propriété par la réalisation de tests utilisés en bactériologie pour étudier la sensibilité de souches bactériennes aux antibiotiques (courbes de survie et antibiogrammes). De plus, des souris infectées par *H. pylori* et traitées ou non par metformine ont apporté la preuve que cet effet existe *in vivo*, même si aux doses utilisées dans notre expérience, *H. pylori* n'a pas été totalement éradiqué chez les souris traitées. Cette découverte a fait l'objet d'une demande de brevet. En effet, un effet antibactérien direct de la metformine n'avait jamais été rapporté auparavant. Seuls des effets en tant qu'adjuvant dans le traitement de la tuberculose et des effets sur le microbiote de patients diabétiques avaient été rapportés.

Les conditions de traitements (dose, durée, méthode d'administration) utilisées ont été déterminées suivant les doses et durées de traitement recommandées dans le traitement du diabète. Aussi, ces conditions de traitement doivent être optimisées afin de déterminer s'il est possible d'obtenir une meilleure efficacité de la metformine *in vivo*.

Par ailleurs, il serait intéressant de tester l'efficacité de la metformine sur des souches de *H. pylori* présentant différents profils de résistance aux antibiotiques utilisés pour éradiquer la bactérie. De plus, l'utilisation combinée de la metformine avec ces antibiotiques pourrait être testée afin de déterminer si la metformine peut augmenter l'efficacité des antibiotiques, dans l'optique d'une utilisation de la metformine en association avec d'autres traitements existants. En complément de ce travail, il serait intéressant dans un premier temps de déterminer grâce à des données épidémiologiques si les patients diabétiques traités par metformine sont moins infectés par *H. pylori*. Pour répondre à cette question, l'analyse de cohorte pourrait apporter des premières indications. Ainsi, nous proposons d'étudier la cohorte AMI (Approche Multidisciplinaire intégrée, Cohorte de retraités inscrits à la mutualité sociale agricole / Agrica MSA IFR Santé publique 99) qui est une cohorte de 1000 retraités d'une activité agricole, hommes et femmes de 65 ans et plus, vivant en Aquitaine Limousin Poitou-Charentes et pour lesquels les traitements médicamenteux sont disponibles. Au sein de cette cohorte 695 patients ont une sérologie positive à *H. pylori*. Cette analyse permettrait de déterminer si une corrélation existe entre les patients infectés ou non par *H. pylori* et traités ou non par la metformine.

Le mécanisme d'action de la metformine sur *H. pylori* n'a pas été identifié. Il sera intéressant dans un futur proche d'identifier sa cible et son mécanisme d'action. Parmi les possibilités, l'hypothèse selon laquelle la metformine agirait sur *H. pylori* via une inhibition de NDH-1 (protéine homologue du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale) nous

paraît pertinente, même si d'autres bactéries exprimant cette enzyme se sont révélées insensibles à la metformine. Il est possible de mesurer *in vitro* l'activité de NDH-1 et ainsi de déterminer si la metformine est capable d'inhiber cette enzyme. Pour cela, NDH-1 doit être isolée. Puis son substrat Nhdh est ajouté dans le milieu. NDH-1 transforme le Nhdh en Ndh, dont le pouvoir réducteur peut être mesuré par colorimétrie en présence de DCIP, un composé coloré bleu qui perd sa coloration une fois réduit.

Différentes données dans la littérature mentionnent un effet de la metformine sur le microbiote intestinal. Une étude très récente rapporte en particulier que la metformine altère la composition du microbiote intestinal de patients diabétiques traités par metformine, et que ces changements seraient en partie responsables des effets antidiabétiques de la metformine (Wu *et al.*, 2017). Au moment du sacrifice de nos souris infectées et traitées par metformine, le contenu intestinal et caecal des souris a été récupéré, ainsi que les selles des souris à différents temps de l'expérience. Nous pourrions ainsi réaliser une étude des modifications du microbiote intestinal de ces souris en réponse à la metformine afin de définir si d'autres espèces bactériennes pourraient être sensibles à la metformine.

A la fin de ma thèse j'ai initié un projet visant à étudier les régulations de la voie de signalisation mTOR dans la carcinogenèse gastrique en réponse à l'infection par *H. pylori*. La voie de signalisation mTOR est connue pour être fréquemment impliquée dans la carcinogenèse et la régulation de l'EMT. De plus, il a été montré qu'elle est suractivée dans les tumeurs gastriques. Notre hypothèse de départ était que la metformine pouvait inhiber mTORC1, expliquant ainsi ses propriétés antitumorales. Cependant nous n'avons pas observé d'inhibition de cette voie en réponse à la metformine. Nous avons également testé un activateur direct de l'AMPK sur la lignée MKN74 : le A-769662 (noté A76) (Figure 32). Celui-ci n'a pas non plus inhibé la voie mTORC1, indiquant peut-être une indépendance des voies AMPK et mTORC1 ou bien démontrant une activation constitutive de mTORC1 dans nos modèles d'étude.

Afin d'étudier l'implication de cette voie dans la carcinogenèse gastrique nous avons donc réalisé une analyse transcriptomique et fonctionnelle de la voie mTORC1 dans le contexte de l'infection par *H. pylori*. De manière très surprenante, après 24h d'infection nous avons observé une inhibition de mTORC1, tandis que les précédents travaux publiés indiquaient plutôt une inhibition de cette voie. Des expériences complémentaires sont nécessaires afin de confirmer les effets de *H. pylori* sur mTORC1. De plus, nous voulons étudier l'implication de

la voie mTOR dans l'induction de l'EMT par la bactérie. Pour cela, des activateurs et inhibiteurs de mTORC1 seront utilisés dans le contexte de l'infection. Ces données permettront de mieux comprendre les mécanismes et voies de signalisation impliquées dans l'induction de l'EMT et de la carcinogenèse gastrique et ainsi d'identifier de nouvelles potentielles cibles thérapeutiques.

En conclusion, ces travaux réalisés au cours de ma thèse ont permis de mettre en évidence des propriétés de la metformine jusqu'alors non décrites. En effet, la metformine est capable de cibler les CSC gastriques. De plus, la metformine est capable d'inhiber la croissance d'*H. pylori*. Cette propriété antibactérienne a été découverte fortuitement et ouvre potentiellement à de nouvelles applications de la metformine qui apparaît vraiment être une molécule hors du commun.

Bibliographie

- Ajani, J.A., Lee, J., Sano, T., Janjigian, Y.Y., Fan, D., and Song, S. (2017) Gastric adenocarcinoma. *Nat. Rev. Dis. Primer* **3**: 17036.
- Akopyants, N.S., Clifton, S.W., Kersulyte, D., Crabtree, J.E., Youree, B.E., Reece, C.A., *et al.* (1998) Analyses of the cag pathogenicity island of *Helicobacter pylori*. *Mol. Microbiol.* **28**: 37–53.
- Amieva, M.R., Vogelmann, R., Covacci, A., Tompkins, L.S., Nelson, W.J., and Falkow, S. (2003) Disruption of the epithelial apical-junctional complex by *Helicobacter pylori* CagA. *Science* **300**: 1430–1434.
- Appelmek, B.J., Monteiro, M.A., Martin, S.L., Moran, A.P., and Vandenbroucke-Grauls, C.M. (2000) Why *Helicobacter pylori* has Lewis antigens. *Trends Microbiol.* **8**: 565–570.
- Appelmek, B.J., Simoons-Smit, I., Negrini, R., Moran, A.P., Aspinall, G.O., Forte, J.G., *et al.* (1996) Potential role of molecular mimicry between *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide and host Lewis blood group antigens in autoimmunity. *Infect. Immun.* **64**: 2031–2040.
- Atherton, J.C. (2006) The pathogenesis of *Helicobacter pylori*-induced gastro-duodenal diseases. *Annu. Rev. Pathol.* **1**: 63–96.
- Atherton, J.C., Peek, R.M., Tham, K.T., Cover, T.L., and Blaser, M.J. (1997) Clinical and pathological importance of heterogeneity in vacA, the vacuolating cytotoxin gene of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* **112**: 92–99.
- Backert, S., Moese, S., Selbach, M., Brinkmann, V., and Meyer, T.F. (2001) Phosphorylation of tyrosine 972 of the *Helicobacter pylori* CagA protein is essential for induction of a scattering phenotype in gastric epithelial cells. *Mol. Microbiol.* **42**: 631–644.
- Backert, S. and Selbach, M. (2008) Role of type IV secretion in *Helicobacter pylori* pathogenesis. *Cell. Microbiol.* **10**: 1573–1581.
- Backert, S., Tegtmeyer, N., and Fischer, W. (2015) Composition, structure and function of the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island encoded type IV secretion system. *Future Microbiol.* **10**: 955–965.
- Backert, S., Ziska, E., Brinkmann, V., Zimny-Arndt, U., Fauconnier, A., Jungblut, P.R., *et al.* (2000) Translocation of the *Helicobacter pylori* CagA protein in gastric epithelial cells by a type IV secretion apparatus. *Cell. Microbiol.* **2**: 155–164.
- Badary, D.M., Rahma, M.Z.A.A., Ashmawy, A.M., and Hafez, M.Z. (2017) H. pylori infection increases gastric mucosal COX2 and mTOR expression in chronic gastritis: Implications for cancer progression? *Pathophysiol. Off. J. Int. Soc. Pathophysiol.* **24**: 205–211.
- Bailey, C. and Day, C. (2004) Metformin: its botanical background. *Pract. Diabetes Int.* **21**: 115–117.
- Bailey, C.J. (2017) Metformin: historical overview. *Diabetologia*.
- Bao, B., Wang, Z., Ali, S., Ahmad, A., Azmi, A.S., Sarkar, S.H., *et al.* (2012) Metformin inhibits cell proliferation, migration and invasion by attenuating CSC function mediated by deregulating miRNAs in pancreatic cancer cells. *Cancer Prev. Res. Phila. Pa* **5**: 355–364.
- Barranco, S.C., Townsend, C.M., Casartelli, C., Macik, B.G., Burger, N.L., Boerwinkle, W.R., and Gourley, W.K. (1983) Establishment and characterization of an in vitro model system for human adenocarcinoma of the stomach. *Cancer Res.* **43**: 1703–1709.
- Barros, R., Freund, J.-N., David, L., and Almeida, R. (2012) Gastric intestinal metaplasia revisited: function and regulation of CDX2. *Trends Mol. Med.* **18**: 555–563.
- Bauckman, K.A., Owusu-Boaitey, N., and Mysorekar, I.U. (2015) Selective autophagy: xenophagy. *Methods San Diego Calif* **75**: 120–127.
- Baud, J., Varon, C., Chabas, S., Chambonnier, L., Darfeuille, F., and Staedel, C. (2013) *Helicobacter pylori* initiates a mesenchymal transition through ZEB1 in gastric epithelial cells. *PloS One* **8**: e60315.

- Bayerdörffer, E., Neubauer, A., Rudolph, B., Thiede, C., Lehn, N., Eidt, S., and Stolte, M. (1995) Regression of primary gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue type after cure of *Helicobacter pylori* infection. MALT Lymphoma Study Group. *Lancet Lond. Engl.* **345**: 1591–1594.
- Beier, D., Spohn, G., Rappuoli, R., and Scarlato, V. (1997) Identification and characterization of an operon of *Helicobacter pylori* that is involved in motility and stress adaptation. *J. Bacteriol.* **179**: 4676–4683.
- Bessède, E., Arantes, V., Mégraud, F., and Coelho, L.G. (2017) Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* **22 Suppl 1**:
- Bessède, E., Dubus, P., Mégraud, F., and Varon, C. (2015) *Helicobacter pylori* infection and stem cells at the origin of gastric cancer. *Oncogene* **34**: 2547–2555.
- Bessède, E., Staedel, C., Acuña Amador, L.A., Nguyen, P.H., Chambonnier, L., Hatakeyama, M., *et al.* (2014) *Helicobacter pylori* generates cells with cancer stem cell properties via epithelial-mesenchymal transition-like changes. *Oncogene* **33**: 4123–4131.
- Bjerknes, M. and Cheng, H. (2002) Multipotential stem cells in adult mouse gastric epithelium. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **283**: G767-777.
- Blanchard, T.G. and Nedrud, J.G. (2012) Laboratory maintenance of *Helicobacter* species. *Curr. Protoc. Microbiol.* **Chapter 8**: Unit8B.1.
- Boyer, L.A., Lee, T.I., Cole, M.F., Johnstone, S.E., Levine, S.S., Zucker, J.P., *et al.* (2005) Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell* **122**: 947–956.
- Brown, L.M. (2000) *Helicobacter pylori*: epidemiology and routes of transmission. *Epidemiol. Rev.* **22**: 283–297.
- Burucoa, C., Delchier, J.-C., Courillon-Mallet, A., de Korwin, J.-D., Mégraud, F., Zerbib, F., *et al.* (2013) Comparative evaluation of 29 commercial *Helicobacter pylori* serological kits. *Helicobacter* **18**: 169–179.
- Calvet, X., Ramírez Lázaro, M.-J., Lehours, P., and Mégraud, F. (2013) Diagnosis and epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* **18 Suppl 1**: 5–11.
- Cancer Genome Atlas Research Network (2014) Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature* **513**: 202–209.
- Censini, S., Lange, C., Xiang, Z., Crabtree, J.E., Ghiara, P., Borodovsky, M., *et al.* (1996) *cag*, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**: 14648–14653.
- Chang, H.R., Nam, S., Kook, M.-C., Kim, K.-T., Liu, X., Yao, H., *et al.* (2016) HNF4 α is a therapeutic target that links AMPK to WNT signalling in early-stage gastric cancer. *Gut* **65**: 19–32.
- Chaput, C. and Boneca, I.G. (2006) Bases moléculaires de l'interaction de *Helicobacter pylori* avec les cellules épithéliales gastriques. *Hépatogastro Oncol. Dig.* **13**: 379–388.
- Chen, G., Feng, W., Zhang, S., Bian, K., Yang, Y., Fang, C., *et al.* (2015) Metformin inhibits gastric cancer via the inhibition of HIF1 α /PKM2 signaling. *Am. J. Cancer Res.* **5**: 1423–1434.
- Chia, N.-Y., Deng, N., Das, K., Huang, D., Hu, L., Zhu, Y., *et al.* (2015) Regulatory crosstalk between lineage-survival oncogenes KLF5, GATA4 and GATA6 cooperatively promotes gastric cancer development. *Gut* **64**: 707–719.
- Choi, A.M.K., Ryter, S.W., and Levine, B. (2013) Autophagy in human health and disease. *N. Engl. J. Med.* **368**: 651–662.
- Choi, Y.Y., Lee, J.E., Kim, H., Sim, M.H., Kim, K.-K., Lee, G., *et al.* (2016) Establishment and characterisation of patient-derived xenografts as preclinical models for gastric cancer. *Sci. Rep.* **6**: 22172.

- Cojoc, M., Mäbert, K., Muders, M.H., and Dubrovskaya, A. (2015) A role for cancer stem cells in therapy resistance: cellular and molecular mechanisms. *Semin. Cancer Biol.* **31**: 16–27.
- Correa, P., Haenszel, W., Cuello, C., Tannenbaum, S., and Archer, M. (1975) A model for gastric cancer epidemiology. *Lancet Lond. Engl.* **2**: 58–60.
- Correa, P. and Piazzuelo, M.B. (2012) The gastric precancerous cascade. *J. Dig. Dis.* **13**: 2–9.
- Cover, T.L. (1996) The vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori*. *Mol. Microbiol.* **20**: 241–246.
- Crew, K.D. and Neugut, A.I. (2006) Epidemiology of gastric cancer. *World J. Gastroenterol.* **12**: 354–362.
- Cristescu, R., Lee, J., Nebozhyn, M., Kim, K.-M., Ting, J.C., Wong, S.S., *et al.* (2015) Molecular analysis of gastric cancer identifies subtypes associated with distinct clinical outcomes. *Nat. Med.* **21**: 449–456.
- D’Angelo, R.C. and Wicha, M.S. (2010) Stem cells in normal development and cancer. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* **95**: 113–158.
- Dean, M., Fojo, T., and Bates, S. (2005) Tumour stem cells and drug resistance. *Nat. Rev. Cancer* **5**: 275–284.
- Delchier, J.-C. (2008) Le lymphome gastrique du MALT, une infection maligne potentiellement curable par l’éradication de *Helicobacter pylori*. *Datareves0399832000273-C2453*.
- Ding, L., El Zaatari, M., and Merchant, J.L. (2016) Recapitulating Human Gastric Cancer Pathogenesis: Experimental Models of Gastric Cancer. *Adv. Exp. Med. Biol.* **908**: 441–478.
- Dixon, M.F., Genta, R.M., Yardley, J.H., and Correa, P. (1996) Classification and grading of gastritis. The updated Sydney System. International Workshop on the Histopathology of Gastritis, Houston 1994. *Am. J. Surg. Pathol.* **20**: 1161–1181.
- Ducournau, A., Bénéjat, L., Sifré, E., Bessède, E., Lehours, P., and Mégraud, F. (2016) *Helicobacter pylori* resistance to antibiotics in 2014 in France detected by phenotypic and genotypic methods. *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **22**: 715–718.
- Dunn, B.E., Campbell, G.P., Perez-Perez, G.I., and Blaser, M.J. (1990) Purification and characterization of urease from *Helicobacter pylori*. *J. Biol. Chem.* **265**: 9464–9469.
- Eaton, K.A., Morgan, D.R., and Krakowka, S. (1992) Motility as a factor in the colonisation of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori*. *J. Med. Microbiol.* **37**: 123–127.
- Eckfeldt, C.E., Mendenhall, E.M., and Verfaillie, C.M. (2005) The molecular repertoire of the “almighty” stem cell. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**: 726–737.
- Elfvin, A., Bölin, I., Von Bothmer, C., Stolte, M., Watanabe, H., Fändriks, L., and Vieth, M. (2005) *Helicobacter pylori* induces gastritis and intestinal metaplasia but no gastric adenocarcinoma in Mongolian gerbils. *Scand. J. Gastroenterol.* **40**: 1313–1320.
- El-Mir, M.Y., Nogueira, V., Fontaine, E., Avéret, N., Rigoulet, M., and Leverve, X. (2000) Dimethylbiguanide inhibits cell respiration via an indirect effect targeted on the respiratory chain complex I. *J. Biol. Chem.* **275**: 223–228.
- Evans, J.M.M., Donnelly, L.A., Emslie-Smith, A.M., Alessi, D.R., and Morris, A.D. (2005) Metformin and reduced risk of cancer in diabetic patients. *BMJ* **330**: 1304–1305.
- Falk, P.G., Bry, L., Holgersson, J., and Gordon, J.I. (1995) Expression of a human alpha-1,3/4-fucosyltransferase in the pit cell lineage of FVB/N mouse stomach results in production of Leb-containing glycoconjugates: a potential transgenic mouse model for studying *Helicobacter pylori* infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**: 1515–1519.
- Fang, C., Huang, Q., Lu, L., Shi, J., Sun, Q., Xu, G.F., *et al.* (2015) Risk factors of early proximal gastric carcinoma in Chinese diagnosed using WHO criteria. *J. Dig. Dis.* **16**: 327–336.

- Feng, Y., Ke, C., Tang, Q., Dong, H., Zheng, X., Lin, W., *et al.* (2014) Metformin promotes autophagy and apoptosis in esophageal squamous cell carcinoma by downregulating Stat3 signaling. *Cell Death Dis.* **5**: e1088.
- Fischer, Y., Thomas, J., Rösen, P., and Kammermeier, H. (1995) Action of metformin on glucose transport and glucose transporter GLUT1 and GLUT4 in heart muscle cells from healthy and diabetic rats. *Endocrinology* **136**: 412–420.
- Fock, K.M. (2014) Review article: the epidemiology and prevention of gastric cancer. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **40**: 250–260.
- Foegeding, N.J., Caston, R.R., McClain, M.S., Ohi, M.D., and Cover, T.L. (2016) An Overview of *Helicobacter pylori* VacA Toxin Biology. *Toxins* **8**.
- Ford, A.C., Forman, D., Hunt, R., Yuan, Y., and Moayyedi, P. (2015) *Helicobacter pylori* eradication for the prevention of gastric neoplasia. *Cochrane Database Syst. Rev.* CD005583.
- Foretz, M., Guigas, B., Bertrand, L., Pollak, M., and Viollet, B. (2014) Metformin: from mechanisms of action to therapies. *Cell Metab.* **20**: 953–966.
- Foretz, M., Hébrard, S., Leclerc, J., Zarrinpashneh, E., Soty, M., Mithieux, G., *et al.* (2010) Metformin inhibits hepatic gluconeogenesis in mice independently of the LKB1/AMPK pathway via a decrease in hepatic energy state. *J. Clin. Invest.* **120**: 2355–2369.
- Foretz, M. and Viollet, B. (2009) Mécanisme d'action hépatique de la metformine dans le diabète de type 2. *Médecine Mal. Métaboliques* **3**: 48–54.
- Fox, J.G., Rogers, A.B., Whary, M.T., Ge, Z., Ohtani, M., Jones, E.K., and Wang, T.C. (2007) Accelerated progression of gastritis to dysplasia in the pyloric antrum of TFF2 *-/-* C57BL6 x Sv129 *Helicobacter pylori*-infected mice. *Am. J. Pathol.* **171**: 1520–1528.
- Gandini, S., Puntoni, M., Heckman-Stoddard, B.M., Dunn, B.K., Ford, L., DeCensi, A., and Szabo, E. (2014) Metformin and cancer risk and mortality: a systematic review and meta-analysis taking into account biases and confounders. *Cancer Prev. Res. Phila. Pa* **7**: 867–885.
- Geis, G., Leying, H., Suerbaum, S., Mai, U., and Opferkuch, W. (1989) Ultrastructure and chemical analysis of *Campylobacter pylori* flagella. *J. Clin. Microbiol.* **27**: 436–441.
- Giraud, J., Bessède, E., Mégraud, F., and Varon, C. (2017) Gastric Cancer: A Stem Cell Disease?
- Gong, L., Goswami, S., Giacomini, K.M., Altman, R.B., and Klein, T.E. (2012) Metformin pathways: pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Pharmacogenet. Genomics* **22**: 820–827.
- González, C.A., Megraud, F., Buissonniere, A., Lujan Barroso, L., Agudo, A., Duell, E.J., *et al.* (2012) *Helicobacter pylori* infection assessed by ELISA and by immunoblot and noncardia gastric cancer risk in a prospective study: the Eurgast-EPIC project. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* **23**: 1320–1324.
- Goodell, M.A., Brose, K., Paradis, G., Conner, A.S., and Mulligan, R.C. (1996) Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *J. Exp. Med.* **183**: 1797–1806.
- Goodwin, C.S., Armstrong, J.A., Chilvers, T., Peters, M., Collins, M.D., Sly, L., *et al.* (1989) Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen. nov. as *Helicobacter pylori* comb. nov. and *Helicobacter mustelae* comb. nov., Respectively. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **39**: 397–405.
- Gottesman, M.M., Fojo, T., and Bates, S.E. (2002) Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat. Rev. Cancer* **2**: 48–58.
- Graham, G.G., Punt, J., Arora, M., Day, R.O., Doogue, M.P., Duong, J.K., *et al.* (2011) Clinical pharmacokinetics of metformin. *Clin. Pharmacokinet.* **50**: 81–98.
- Guan, J.-L., Simon, A.K., Prescott, M., Menendez, J.A., Liu, F., Wang, F., *et al.* (2013) Autophagy in stem cells. *Autophagy* **9**: 830–849.

- Gulhati, P., Bowen, K.A., Liu, J., Stevens, P.D., Rychahou, P.G., Chen, M., *et al.* (2011) mTORC1 and mTORC2 regulate EMT, motility, and metastasis of colorectal cancer via RhoA and Rac1 signaling pathways. *Cancer Res.* **71**: 3246–3256.
- Gunton, J.E., Delhanty, P.J.D., Takahashi, S.-I., and Baxter, R.C. (2003) Metformin rapidly increases insulin receptor activation in human liver and signals preferentially through insulin-receptor substrate-2. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **88**: 1323–1332.
- Guruge, J.L., Falk, P.G., Lorenz, R.G., Dans, M., Wirth, H.P., Blaser, M.J., *et al.* (1998) Epithelial attachment alters the outcome of *Helicobacter pylori* infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**: 3925–3930.
- Ha, J., Guan, K.-L., and Kim, J. (2015) AMPK and autophagy in glucose/glycogen metabolism. *Mol. Aspects Med.* **46**: 46–62.
- Ha, N.C., Oh, S.T., Sung, J.Y., Cha, K.A., Lee, M.H., and Oh, B.H. (2001) Supramolecular assembly and acid resistance of *Helicobacter pylori* urease. *Nat. Struct. Biol.* **8**: 505–509.
- Han, G., Gong, H., Wang, Y., Guo, S., and Liu, K. (2015) AMPK/mTOR-mediated inhibition of survivin partly contributes to metformin-induced apoptosis in human gastric cancer cell. *Cancer Biol. Ther.* **16**: 77–87.
- Hanahan, D. and Weinberg, R.A. (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* **100**: 57–70.
- Hardie, D.G., Ross, F.A., and Hawley, S.A. (2012) AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13**: 251–262.
- Hatakeyama, M. (2009) *Helicobacter pylori* and gastric carcinogenesis. *J. Gastroenterol.* **44**: 239–248.
- Hatakeyama, M. (2017) Structure and function of *Helicobacter pylori* CagA, the first-identified bacterial protein involved in human cancer. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.* **93**: 196–219.
- Hay, E.D. (1995) An overview of epithelio-mesenchymal transformation. *Acta Anat. (Basel)* **154**: 8–20.
- He, S., Nakada, D., and Morrison, S.J. (2009) Mechanisms of stem cell self-renewal. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **25**: 377–406.
- Higashi, H., Tsutsumi, R., Muto, S., Sugiyama, T., Azuma, T., Asaka, M., and Hatakeyama, M. (2002) SHP-2 tyrosine phosphatase as an intracellular target of *Helicobacter pylori* CagA protein. *Science* **295**: 683–686.
- Hirayama, F., Takagi, S., Iwao, E., Yokoyama, Y., Haga, K., and Hanada, S. (1999) Development of poorly differentiated adenocarcinoma and carcinoid due to long-term *Helicobacter pylori* colonization in Mongolian gerbils. *J. Gastroenterol.* **34**: 450–454.
- Hirsch, H.A., Iliopoulos, D., Tschlis, P.N., and Struhl, K. (2009) Metformin selectively targets cancer stem cells, and acts together with chemotherapy to block tumor growth and prolong remission. *Cancer Res.* **69**: 7507–7511.
- Ho, T.T., Warr, M.R., Adelman, E.R., Lansinger, O.M., Flach, J., Verovskaya, E.V., *et al.* (2017) Autophagy maintains the metabolism and function of young and old stem cells. *Nature* **543**: 205–210.
- Hoffman, R.M. (2015) Patient-derived orthotopic xenografts: better mimic of metastasis than subcutaneous xenografts. *Nat. Rev. Cancer* **15**: 451–452.
- Hooi, J.K.Y., Lai, W.Y., Ng, W.K., Suen, M.M.Y., Underwood, F.E., Tanyingoh, D., *et al.* (2017) Global Prevalence of *Helicobacter pylori* Infection: Systematic Review and Meta-Analysis. *Gastroenterology* **153**: 420–429.
- Houghton, J., Stoicov, C., Nomura, S., Rogers, A.B., Carlson, J., Li, H., *et al.* (2004) Gastric cancer originating from bone marrow-derived cells. *Science* **306**: 1568–1571.
- Hu, B., El Hajj, N., Sittler, S., Lammert, N., Barnes, R., and Meloni-Ehrig, A. (2012) Gastric cancer: Classification, histology and application of molecular pathology. *J. Gastrointest. Oncol.* **3**: 251–261.

- Huang, D., He, X., Zou, J., Guo, P., Jiang, S., Lv, N., *et al.* (2016) Negative regulation of Bmi-1 by AMPK and implication in cancer progression. *Oncotarget* **7**: 6188–6200.
- Huang, G., Ye, S., Zhou, X., Liu, D., and Ying, Q.-L. (2015) Molecular basis of embryonic stem cell self-renewal: from signaling pathways to pluripotency network. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **72**: 1741–1757.
- İlhan, Ö., Han, Ü., Önal, B., and Çelik, S.Y. (2010) Prognostic significance of MUC1, MUC2 and MUC5AC expressions in gastric carcinoma. *Turk. J. Gastroenterol. Off. J. Turk. Soc. Gastroenterol.* **21**: 345–352.
- Jass, J.R. and Filipe, M.I. (1981) The mucin profiles of normal gastric mucosa, intestinal metaplasia and its variants and gastric carcinoma. *Histochem. J.* **13**: 931–939.
- Johansen, T. and Lamark, T. (2011) Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins. *Autophagy* **7**: 279–296.
- Jun, K.-H., Lee, J.E., Kim, S.H., Jung, J.-H., Choi, H.-J., Kim, Y.I., *et al.* (2015) Clinicopathological significance of N-cadherin and VEGF in advanced gastric cancer brain metastasis and the effects of metformin in preclinical models. *Oncol. Rep.* **34**: 2047–2053.
- Kalali, B., Mejías-Luque, R., Javaheri, A., and Gerhard, M. (2014) H. pylori virulence factors: influence on immune system and pathology. *Mediators Inflamm.* **2014**: 426309.
- Kalluri, R. and Weinberg, R.A. (2009) The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J. Clin. Invest.* **119**: 1420–1428.
- Kao, C.-Y., Sheu, B.-S., and Wu, J.-J. (2016) *Helicobacter pylori* infection: An overview of bacterial virulence factors and pathogenesis. *Biomed. J.* **39**: 14–23.
- Karam, S.M. and Leblond, C.P. (1993) Dynamics of epithelial cells in the corpus of the mouse stomach. I. Identification of proliferative cell types and pinpointing of the stem cell. *Anat. Rec.* **236**: 259–279.
- Karam, S.M., Straiton, T., Hassan, W.M., and Leblond, C.P. (2003) Defining epithelial cell progenitors in the human oxyntic mucosa. *Stem Cells Dayt. Ohio* **21**: 322–336.
- Kato, K., Gong, J., Iwama, H., Kitanaka, A., Tani, J., Miyoshi, H., *et al.* (2012) The antidiabetic drug metformin inhibits gastric cancer cell proliferation in vitro and in vivo. *Mol. Cancer Ther.* **11**: 549–560.
- Kidd, M. and Modlin, I.M. (1998) A century of *Helicobacter pylori*: paradigms lost-paradigms regained. *Digestion* **59**: 1–15.
- Kim, D.H., Kim, S.W., Song, Y.J., Oh, T.Y., Han, S.U., Kim, Y.B., *et al.* (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.
- Kim, J., Kundu, M., Viollet, B., and Guan, K.-L. (2011) AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat. Cell Biol.* **13**: 132–141.
- Kim, T.H., Suh, D.H., Kim, M.-K., and Song, Y.S. (2014) Metformin against cancer stem cells through the modulation of energy metabolism: special considerations on ovarian cancer. *BioMed Res. Int.* **2014**: 132702.
- Konturek, S.J., Konturek, P.C., Konturek, J.W., Plonka, M., Czesnikiewicz-Guzik, M., Brzozowski, T., and Bielanski, W. (2006) *Helicobacter pylori* and its involvement in gastritis and peptic ulcer formation. *J. Physiol. Pharmacol. Off. J. Pol. Physiol. Soc.* **57 Suppl 3**: 29–50.
- Koo, S.-H., Flechner, L., Qi, L., Zhang, X., Sreaton, R.A., Jeffries, S., *et al.* (2005) The CREB coactivator TORC2 is a key regulator of fasting glucose metabolism. *Nature* **437**: 1109–1111.
- Kostrzynska, M., Betts, J.D., Austin, J.W., and Trust, T.J. (1991) Identification, characterization, and spatial localization of two flagellin species in *Helicobacter pylori* flagella. *J. Bacteriol.* **173**: 937–946.

- Kreso, A. and Dick, J.E. (2014) Evolution of the Cancer Stem Cell Model. *Cell Stem Cell* **14**: 275–291.
- Lamark, T. and Johansen, T. (2012) Aggrephagy: selective disposal of protein aggregates by macroautophagy. *Int. J. Cell Biol.* **2012**: 736905.
- Lamarque, D., Burucoa, C., Courillon-Mallet, A., Korwin, J.-D. de, Delchier, J.-C., Heluwaert, F., *et al.* (2017) Recommendations for treatment of *Helicobacter pylori* infection in adults. *Hépatogastro Oncol. Dig.* **24**: 157–170.
- Laplante, M. and Sabatini, D.M. (2009) mTOR signaling at a glance. *J. Cell Sci.* **122**: 3589–3594.
- 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.
- Lee, A., O'Rourke, J., De Ungria, M.C., Robertson, B., Daskalopoulos, G., and Dixon, M.F. (1997) A standardized mouse model of *Helicobacter pylori* infection: introducing the Sydney strain. *Gastroenterology* **112**: 1386–1397.
- Lee, Y.-C., Chiang, T.-H., Chou, C.-K., Tu, Y.-K., Liao, W.-C., Wu, M.-S., and Graham, D.Y. (2016) Association Between *Helicobacter pylori* Eradication and Gastric Cancer Incidence: A Systematic Review and Meta-analysis. *Gastroenterology* **150**: 1113–1124.e5.
- Lesan, V., Ghaffari, S.H., Salaramoli, J., Heidari, M., Rostami, M., Alimoghaddam, K., and Ghavamzadeh, A. (2014) Evaluation of Antagonistic Effects of Metformin with Cisplatin in Gastric Cancer Cells. *Int. J. Hematol.-Oncol. Stem Cell Res.* **8**: 12–19.
- Li, J., Gui, Y., Ren, J., Liu, X., Feng, Y., Zeng, Z., *et al.* (2016) Metformin Protects Against Cisplatin-Induced Tubular Cell Apoptosis and Acute Kidney Injury via AMPK α -regulated Autophagy Induction. *Sci. Rep.* **6**: 23975.
- Li, L. and Clevers, H. (2010) Coexistence of quiescent and active adult stem cells in mammals. *Science* **327**: 542–545.
- Li, Q., Jia, Z., Wang, L., Kong, X., Li, Q., Guo, K., *et al.* (2012) Disruption of Klf4 in villin-positive gastric progenitor cells promotes formation and progression of tumors of the antrum in mice. *Gastroenterology* **142**: 531–542.
- Li, R., Wu, X., Wei, H., and Tian, S. (2013) Characterization of side population cells isolated from the gastric cancer cell line SGC-7901. *Oncol. Lett.* **5**: 877–883.
- Li, X.-B., Yang, G., Zhu, L., Tang, Y.-L., Zhang, C., Ju, Z., *et al.* (2016) Gastric Lgr5(+) stem cells are the cellular origin of invasive intestinal-type gastric cancer in mice. *Cell Res.* **26**: 838–849.
- Liu, J.L., Gao, W., Kang, Q.M., Zhang, X.J., and Yang, S.G. (2013) Prognostic value of survivin in patients with gastric cancer: a systematic review with meta-analysis. *PLoS One* **8**: e71930.
- Ljungh, A., Moran, A.P., and Wadström, T. (1996) Interactions of bacterial adhesins with extracellular matrix and plasma proteins: pathogenic implications and therapeutic possibilities. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **16**: 117–126.
- Lobo, N.A., Shimono, Y., Qian, D., and Clarke, M.F. (2007) The biology of cancer stem cells. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **23**: 675–699.
- Lu, B. and Li, M. (2014) *Helicobacter pylori* eradication for preventing gastric cancer. *World J. Gastroenterol.* **20**: 5660–5665.
- Luengo, A., Sullivan, L.B., and Heiden, M.G.V. (2014) Understanding the complex-ity of metformin action: limiting mitochondrial respiration to improve cancer therapy. *BMC Biol.* **12**: 82.
- Madiraju, A.K., Erion, D.M., Rahimi, Y., Zhang, X.-M., Braddock, D.T., Albright, R.A., *et al.* (2014) Metformin suppresses gluconeogenesis by inhibiting mitochondrial glycerophosphate dehydrogenase. *Nature* **510**: 542–546.
- Mahdavi, J., Sondén, B., Hurtig, M., Olfat, F.O., Forsberg, L., Roche, N., *et al.* (2002) *Helicobacter pylori* SabA adhesin in persistent infection and chronic inflammation. *Science* **297**: 573–578.

- Malfertheiner, P., Megraud, F., O'Morain, C.A., Gisbert, J.P., Kuipers, E.J., Axon, A.T., *et al.* (2017) Management of *Helicobacter pylori* infection-the Maastricht V/Florence Consensus Report. *Gut* **66**: 6–30.
- Mandell, L., Moran, A.P., Cocchiarella, A., Houghton, J., Taylor, N., Fox, J.G., *et al.* (2004) Intact gram-negative *Helicobacter pylori*, *Helicobacter felis*, and *Helicobacter hepaticus* bacteria activate innate immunity via toll-like receptor 2 but not toll-like receptor 4. *Infect. Immun.* **72**: 6446–6454.
- Mani, S.A., Guo, W., Liao, M.-J., Eaton, E.N., Ayyanan, A., Zhou, A.Y., *et al.* (2008) The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* **133**: 704–715.
- Marshall, B.J., Barrett, L.J., Prakash, C., McCallum, R.W., and Guerrant, R.L. (1990) Urea protects *Helicobacter* (*Campylobacter*) *pylori* from the bactericidal effect of acid. *Gastroenterology* **99**: 697–702.
- Marshall, B.J. and Warren, J.R. (1984) Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet Lond. Engl.* **1**: 1311–1315.
- Mazzarello, P., Calligaro, A.L., and Calligaro, A. (2001) Giulio Bizzozero: a pioneer of cell biology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**: 776–781.
- McDonald, S.A.C., Greaves, L.C., Gutierrez-Gonzalez, L., Rodriguez-Justo, M., Deheragoda, M., Leedham, S.J., *et al.* (2008) Mechanisms of field cancerization in the human stomach: the expansion and spread of mutated gastric stem cells. *Gastroenterology* **134**: 500–510.
- McIntyre, H.D., Ma, A., Bird, D.M., Paterson, C.A., Ravenscroft, P.J., and Cameron, D.P. (1991) Metformin increases insulin sensitivity and basal glucose clearance in type 2 (non-insulin dependent) diabetes mellitus. *Aust. N. Z. J. Med.* **21**: 714–719.
- Mégraud, F. (2017) La résistance aux antibiotiques de *Helicobacter pylori*. *Hépto-Gastro Oncol. Dig.* **24**: 179–181.
- Mégraud, F. (2003) Quand et comment s'infecte-t-on par *Helicobacter pylori*? *Datarevues0399832000273-C2374*.
- Mégraud, F., Bessède, E., and Varon, C. (2015) *Helicobacter pylori* infection and gastric carcinoma. *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **21**: 984–990.
- Mégraud, F., Bonnet, F., Garnier, M., and Lamouliatte, H. (1985) Characterization of “*Campylobacter pyloridis*” by culture, enzymatic profile, and protein content. *J. Clin. Microbiol.* **22**: 1007–1010.
- Ménard, A., Buissonnière, A., Prouzet-Mauléon, V., Sifré, E., and Mégraud, F. (2016) The GyrA encoded gene: A pertinent marker for the phylogenetic revision of *Helicobacter* genus. *Syst. Appl. Microbiol.* **39**: 77–87.
- Mentis, A., Lehours, P., and Mégraud, F. (2015) Epidemiology and Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* **20 Suppl 1**: 1–7.
- Mikaelian, I., Malek, M., Gadet, R., Viallet, J., Garcia, A., Girard-Gagnepain, A., *et al.* (2013) Genetic and pharmacologic inhibition of mTORC1 promotes EMT by a TGF- β -independent mechanism. *Cancer Res.* **73**: 6621–6631.
- Miller, R.A., Chu, Q., Xie, J., Foretz, M., Viollet, B., and Birnbaum, M.J. (2013) Biguanides suppress hepatic glucagon signalling by decreasing production of cyclic AMP. *Nature* **494**: 256–260.
- Misra, S., Hascall, V.C., Markwald, R.R., and Ghatak, S. (2015) Interactions between Hyaluronan and Its Receptors (CD44, RHAMM) Regulate the Activities of Inflammation and Cancer. *Front. Immunol.* **6**: 201.
- Moodley, Y., Linz, B., Bond, R.P., Nieuwoudt, M., Soodyall, H., Schlebusch, C.M., *et al.* (2012) Age of the association between *Helicobacter pylori* and man. *PLoS Pathog.* **8**: e1002693.
- Mostowy, S. (2013) Autophagy and bacterial clearance: a not so clear picture. *Cell. Microbiol.* **15**: 395–402.

- Motoyama, T., Hojo, H., and Watanabe, H. (1986) Comparison of Seven Cell Lines Derived from Human Gastric Carcinomas. *Pathol. Int.* **36**: 65–83.
- Murphy, G., Kamangar, F., Dawsey, S.M., Stanczyk, F.Z., Weinstein, S.J., Taylor, P.R., *et al.* (2011) The relationship between serum ghrelin and the risk of gastric and esophagogastric junctional adenocarcinomas. *J. Natl. Cancer Inst.* **103**: 1123–1129.
- Murphy, G., Pfeiffer, R., Camargo, M.C., and Rabkin, C.S. (2009) Meta-analysis shows that prevalence of Epstein-Barr virus-positive gastric cancer differs based on sex and anatomic location. *Gastroenterology* **137**: 824–833.
- Nguyen, P.H., Giraud, J., Chambonnier, L., Dubus, P., Wittkop, L., Belleannée, G., *et al.* (2017) Characterization of Biomarkers of Tumorigenic and Chemoresistant Cancer Stem Cells in Human Gastric Carcinoma. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **23**: 1586–1597.
- Nguyen, P.H., Giraud, J., Stadel, C., Chambonnier, L., Dubus, P., Chevret, E., *et al.* (2016) All-trans retinoic acid targets gastric cancer stem cells and inhibits patient-derived gastric carcinoma tumor growth. *Oncogene* **35**: 5619–5628.
- Nishikawa, S., Konno, M., Hamabe, A., Hasegawa, S., Kano, Y., Ohta, K., *et al.* (2013) Aldehyde dehydrogenase high gastric cancer stem cells are resistant to chemotherapy. *Int. J. Oncol.* **42**: 1437–1442.
- Nowell, P.C. (1976) The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* **194**: 23–28.
- O’Brien, C.A., Kreso, A., and Dick, J.E. (2009) Cancer stem cells in solid tumors: an overview. *Semin. Radiat. Oncol.* **19**: 71–77.
- Odenbreit, S. (2005) Adherence properties of *Helicobacter pylori*: impact on pathogenesis and adaptation to the host. *Int. J. Med. Microbiol. IJMM* **295**: 317–324.
- O’Rourke, J. and Bode, G. (2001) Morphology and Ultrastructure. In, Mobley, H.L., Mendz, G.L., and Hazell, S.L. (eds), *Helicobacter pylori: Physiology and Genetics*. ASM Press, Washington (DC).
- Owen, R.J. (1998) *Helicobacter*--species classification and identification. *Br. Med. Bull.* **54**: 17–30.
- Parsonnet, J., Friedman, G.D., Vandersteen, D.P., Chang, Y., Vogelman, J.H., Orentreich, N., and Sibley, R.K. (1991) *Helicobacter pylori* infection and the risk of gastric carcinoma. *N. Engl. J. Med.* **325**: 1127–1131.
- Peek, R.M. and Blaser, M.J. (2002) *Helicobacter pylori* and gastrointestinal tract adenocarcinomas. *Nat. Rev. Cancer* **2**: 28–37.
- Peek, R.M., Fiske, C., and Wilson, K.T. (2010) Role of innate immunity in *Helicobacter pylori*-induced gastric malignancy. *Physiol. Rev.* **90**: 831–858.
- Peiris-Pagès, M., Martinez-Outschoorn, U.E., Pestell, R.G., Sotgia, F., and Lisanti, M.P. (2016) Cancer stem cell metabolism. *Breast Cancer Res. BCR* **18**: 55.
- Perri, F., Cotugno, R., Piepoli, A., Merla, A., Quitadamo, M., Gentile, A., *et al.* (2007) Aberrant DNA methylation in non-neoplastic gastric mucosa of H. Pylori infected patients and effect of eradication. *Am. J. Gastroenterol.* **102**: 1361–1371.
- Qian, H. and Yang, Y. (2016) Functional role of autophagy in gastric cancer. *Oncotarget* **7**: 17641–17651.
- Qiao, X.T. and Gumucio, D.L. (2011) Current molecular markers for gastric progenitor cells and gastric cancer stem cells. *J. Gastroenterol.* **46**: 855–865.
- Quigley, E.M. and Turnberg, L.A. (1987) pH of the microclimate lining human gastric and duodenal mucosa in vivo. Studies in control subjects and in duodenal ulcer patients. *Gastroenterology* **92**: 1876–1884.
- Raetz, C.R.H. and Whitfield, C. (2002) Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu. Rev. Biochem.* **71**: 635–700.

- Reya, T., Morrison, S.J., Clarke, M.F., and Weissman, I.L. (2001) Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* **414**: 105–111.
- Rieder, G., Fischer, W., and Haas, R. (2005) Interaction of *Helicobacter pylori* with host cells: function of secreted and translocated molecules. *Curr. Opin. Microbiol.* **8**: 67–73.
- Riquelme, I., Tapia, O., Espinoza, J.A., Leal, P., Buchegger, K., Sandoval, A., *et al.* (2016) The Gene Expression Status of the PI3K/AKT/mTOR Pathway in Gastric Cancer Tissues and Cell Lines. *Pathol. Oncol. Res. POR* **22**: 797–805.
- Ruskoné-Fourmestraux, A. (2004) Les lymphomes gastriques du MALT. *Rev. Médecine Interne* **25**: 573–581.
- Ryan, B.M., O'Donovan, N., and Duffy, M.J. (2009) Survivin: a new target for anti-cancer therapy. *Cancer Treat. Rev.* **35**: 553–562.
- Sancho, P., Barneda, D., and Heeschen, C. (2016) Hallmarks of cancer stem cell metabolism. *Br. J. Cancer* **114**: 1305–1312.
- Sancho, P., Burgos-Ramos, E., Tavera, A., Bou Kheir, T., Jagust, P., Schoenhals, M., *et al.* (2015) MYC/PGC-1 α Balance Determines the Metabolic Phenotype and Plasticity of Pancreatic Cancer Stem Cells. *Cell Metab.* **22**: 590–605.
- Sanduloviciu, M. and Jornayvaz, F.R. (2015) [Metformin: new data for an old molecule]. *Rev. Med. Suisse* **11**: 1222–1226.
- Sausville, E.A. and Burger, A.M. (2006) Contributions of human tumor xenografts to anticancer drug development. *Cancer Res.* **66**: 3351–3354, discussion 3354.
- Saxton, R.A. and Sabatini, D.M. (2017) mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell* **168**: 960–976.
- Schlaermann, P., Toelle, B., Berger, H., Schmidt, S.C., Glanemann, M., Ordemann, J., *et al.* (2016) A novel human gastric primary cell culture system for modelling *Helicobacter pylori* infection in vitro. *Gut* **65**: 202–213.
- Scott, D.R., Marcus, E.A., Wen, Y., Singh, S., Feng, J., and Sachs, G. (2010) Cytoplasmic histidine kinase (HP0244)-regulated assembly of urease with UreI, a channel for urea and its metabolites, CO₂, NH₃, and NH₄(+), is necessary for acid survival of *Helicobacter pylori*. *J. Bacteriol.* **192**: 94–103.
- Segal, E.D., Cha, J., Lo, J., Falkow, S., and Tompkins, L.S. (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**: 14559–14564.
- Selbach, M., Moese, S., Backert, S., Jungblut, P.R., and Meyer, T.F. (2004) The *Helicobacter pylori* CagA protein induces tyrosine dephosphorylation of ezrin. *Proteomics* **4**: 2961–2968.
- Setia, N., Clark, J.W., Duda, D.G., Hong, T.S., Kwak, E.L., Mullen, J.T., and Lauwers, G.Y. (2015) Familial Gastric Cancers. *The Oncologist* **20**: 1365–1377.
- Shank, J.J., Yang, K., Ghannam, J., Cabrera, L., Johnston, C.J., Reynolds, R.K., and Buckanovich, R.J. (2012) Metformin targets ovarian cancer stem cells in vitro and in vivo. *Gynecol. Oncol.* **127**: 390–397.
- Shaw, R.J., Lamia, K.A., Vasquez, D., Koo, S.-H., Bardeesy, N., Depinho, R.A., *et al.* (2005) The kinase LKB1 mediates glucose homeostasis in liver and therapeutic effects of metformin. *Science* **310**: 1642–1646.
- Shi, W.-Y., Xiao, D., Wang, L., Dong, L.-H., Yan, Z.-X., Shen, Z.-X., *et al.* (2012) Therapeutic metformin/AMPK activation blocked lymphoma cell growth via inhibition of mTOR pathway and induction of autophagy. *Cell Death Dis.* **3**: e275.
- Shibata, D. and Weiss, L.M. (1992) Epstein-Barr virus-associated gastric adenocarcinoma. *Am. J. Pathol.* **140**: 769–774.

- Shikata, K., Doi, Y., Yonemoto, K., Arima, H., Ninomiya, T., Kubo, M., *et al.* (2008) Population-based prospective study of the combined influence of cigarette smoking and *Helicobacter pylori* infection on gastric cancer incidence: the Hisayama Study. *Am. J. Epidemiol.* **168**: 1409–1415.
- Shikata, K., Kiyohara, Y., Kubo, M., Yonemoto, K., Ninomiya, T., Shirota, T., *et al.* (2006) A prospective study of dietary salt intake and gastric cancer incidence in a defined Japanese population: the Hisayama study. *Int. J. Cancer* **119**: 196–201.
- Shorning, B.Y., Griffiths, D., and Clarke, A.R. (2011) Lkb1 and Pten synergise to suppress mTOR-mediated tumorigenesis and epithelial-mesenchymal transition in the mouse bladder. *PloS One* **6**: e16209.
- Shu, Y., Sheardown, S.A., Brown, C., Owen, R.P., Zhang, S., Castro, R.A., *et al.* (2007) Effect of genetic variation in the organic cation transporter 1 (OCT1) on metformin action. *J. Clin. Invest.* **117**: 1422–1431.
- Shultz, L.D., Goodwin, N., Ishikawa, F., Hosur, V., Lyons, B.L., and Greiner, D.L. (2014) Human cancer growth and therapy in immunodeficient mouse models. *Cold Spring Harb. Protoc.* **2014**: 694–708.
- Slomiany, B.L., Piotrowski, J., Sengupta, S., and Slomiany, A. (1991) Inhibition of gastric mucosal laminin receptor by *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **175**: 963–970.
- Smyth, E.C., Verheij, M., Allum, W., Cunningham, D., Cervantes, A., Arnold, D., and ESMO Guidelines Committee (2016) Gastric cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* **27**: v38–v49.
- Sneath, R.J. and Mangham, D.C. (1998) The normal structure and function of CD44 and its role in neoplasia. *Mol. Pathol. MP* **51**: 191–200.
- Sohn, B.H., Hwang, J.-E., Jang, H.-J., Lee, H.-S., Oh, S.C., Shim, J.-J., *et al.* (2017) Clinical Significance of Four Molecular Subtypes of Gastric Cancer Identified by The Cancer Genome Atlas Project. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.*
- Song, Y., Wang, Y., Tong, C., Xi, H., Zhao, X., Wang, Y., and Chen, L. (2017) A unified model of the hierarchical and stochastic theories of gastric cancer. *Br. J. Cancer* **116**: 973–989.
- Song, Z., Wei, B., Lu, C., Huang, X., Li, P., and Chen, L. (2017) Metformin suppresses the expression of Sonic hedgehog in gastric cancer cells. *Mol. Med. Rep.* **15**: 1909–1915.
- Song, Z., Yue, W., Wei, B., Wang, N., Li, T., Guan, L., *et al.* (2011) Sonic hedgehog pathway is essential for maintenance of cancer stem-like cells in human gastric cancer. *PloS One* **6**: e17687.
- Stein, M., Bagnoli, F., Halenbeck, R., Rappuoli, R., Fantl, W.J., and Covacci, A. (2002) c-Src/Lyn kinases activate *Helicobacter pylori* CagA through tyrosine phosphorylation of the EPIYA motifs. *Mol. Microbiol.* **43**: 971–980.
- Stein, M., Rappuoli, R., and Covacci, A. (2001) The cag Pathogenicity Island. In, Mobley, H.L., Mendz, G.L., and Hazell, S.L. (eds), *Helicobacter pylori: Physiology and Genetics*. ASM Press, Washington (DC).
- Stein, S.C., Faber, E., Bats, S.H., Murillo, T., Speidel, Y., Coombs, N., and Josenhans, C. (2017) *Helicobacter pylori* modulates host cell responses by CagT4SS-dependent translocation of an intermediate metabolite of LPS inner core heptose biosynthesis. *PLoS Pathog.* **13**: e1006514.
- Suzuki, K., Noda, T., and Ohsumi, Y. (2004) Interrelationships among Atg proteins during autophagy in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast Chichester Engl.* **21**: 1057–1065.
- Takaishi, S., Okumura, T., Tu, S., Wang, S.S.W., Shibata, W., Vigneshwaran, R., *et al.* (2009) Identification of gastric cancer stem cells using the cell surface marker CD44. *Stem Cells Dayt. Ohio* **27**: 1006–1020.
- Takeshige, K., Baba, M., Tsuboi, S., Noda, T., and Ohsumi, Y. (1992) Autophagy in yeast demonstrated with proteinase-deficient mutants and conditions for its induction. *J. Cell Biol.* **119**: 301–311.

- Terry, K., Williams, S.M., Connolly, L., and Ottemann, K.M. (2005) Chemotaxis plays multiple roles during *Helicobacter pylori* animal infection. *Infect. Immun.* **73**: 803–811.
- Torre, L.A., Bray, F., Siegel, R.L., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J., and Jemal, A. (2015) Global cancer statistics, 2012. *CA. Cancer J. Clin.* **65**: 87–108.
- Tsugane, S. and Sasazuki, S. (2007) Diet and the risk of gastric cancer: review of epidemiological evidence. *Gastric Cancer Off. J. Int. Gastric Cancer Assoc. Jpn. Gastric Cancer Assoc.* **10**: 75–83.
- Valaee, S., Yaghoobi, M.M., and Shamsara, M. (2017) Metformin inhibits gastric cancer cells metastatic traits through suppression of epithelial-mesenchymal transition in a glucose-independent manner. *PloS One* **12**: e0174486.
- Valkonen, K.H., Wadström, T., and Moran, A.P. (1994) Interaction of lipopolysaccharides of *Helicobacter pylori* with basement membrane protein laminin. *Infect. Immun.* **62**: 3640–3648.
- Van de Bovenkamp, J.H.B., Mahdavi, J., Korteland-Van Male, A.M., Büller, H.A., Einerhand, A.W.C., Borén, T., and Dekker, J. (2003) The MUC5AC glycoprotein is the primary receptor for *Helicobacter pylori* in the human stomach. *Helicobacter* **8**: 521–532.
- Varon, C., Dubus, P., Mazurier, F., Asencio, C., Chambonnier, L., Ferrand, J., *et al.* (2012) *Helicobacter pylori* infection recruits bone marrow-derived cells that participate in gastric preneoplasia in mice. *Gastroenterology* **142**: 281–291.
- Viala, J., Chaput, C., Boneca, I.G., Cardona, A., Girardin, S.E., Moran, A.P., *et al.* (2004) Nod1 responds to peptidoglycan delivered by the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island. *Nat. Immunol.* **5**: 1166–1174.
- Vilaichone, R.-K., Mahachai, V., Tumwasorn, S., Wu, J.-Y., Graham, D.Y., and Yamaoka, Y. (2004) Molecular epidemiology and outcome of *Helicobacter pylori* infection in Thailand: a cultural cross roads. *Helicobacter* **9**: 453–459.
- Vries, R.G.J., Huch, M., and Clevers, H. (2010) Stem cells and cancer of the stomach and intestine. *Mol. Oncol.* **4**: 373–384.
- Wang, D.-S., Jonker, J.W., Kato, Y., Kusuhara, H., Schinkel, A.H., and Sugiyama, Y. (2002) Involvement of organic cation transporter 1 in hepatic and intestinal distribution of metformin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **302**: 510–515.
- Wang, K. and Klionsky, D.J. (2011) Mitochondria removal by autophagy. *Autophagy* **7**: 297–300.
- Wang, K., Yuen, S.T., Xu, J., Lee, S.P., Yan, H.H.N., Shi, S.T., *et al.* (2014) Whole-genome sequencing and comprehensive molecular profiling identify new driver mutations in gastric cancer. *Nat. Genet.* **46**: 573–582.
- Wang, M.-Y., Liu, X.-F., and Gao, X.-Z. (2015) *Helicobacter pylori* virulence factors in development of gastric carcinoma. *Future Microbiol.* **10**: 1505–1516.
- Wang, X., Willén, R., Svensson, M., Ljungh, A., and Wadström, T. (2003) Two-year follow-up of *Helicobacter pylori* infection in C57BL/6 and Balb/cA mice. *APMIS Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.* **111**: 514–522.
- Warburg, O. (1925) The Metabolism of Carcinoma Cells. *J. Cancer Res.* **9**: 148–163.
- Warr, M.R., Binnewies, M., Flach, J., Reynaud, D., Garg, T., Malhotra, R., *et al.* (2013) FOXO3A directs a protective autophagy program in haematopoietic stem cells. *Nature* **494**: 323–327.
- Watabe, H., Mitsushima, T., Yamaji, Y., Okamoto, M., Wada, R., Kokubo, T., *et al.* (2005) Predicting the development of gastric cancer from combining *Helicobacter pylori* antibodies and serum pepsinogen status: a prospective endoscopic cohort study. *Gut* **54**: 764–768.
- Watanabe, T., Tada, M., Nagai, H., Sasaki, S., and Nakao, M. (1998) *Helicobacter pylori* infection induces gastric cancer in mongolian gerbils. *Gastroenterology* **115**: 642–648.

- Watari, J., Chen, N., Amenta, P.S., Fukui, H., Oshima, T., Tomita, T., *et al.* (2014) *Helicobacter pylori* associated chronic gastritis, clinical syndromes, precancerous lesions, and pathogenesis of gastric cancer development. *World J. Gastroenterol. WJG* **20**: 5461.
- Weeks, D.L., Eskandari, S., Scott, D.R., and Sachs, G. (2000) A H⁺-gated urea channel: the link between *Helicobacter pylori* urease and gastric colonization. *Science* **287**: 482–485.
- Wei, M.-F., Chen, M.-W., Chen, K.-C., Lou, P.-J., Lin, S.Y.-F., Hung, S.-C., *et al.* (2014) Autophagy promotes resistance to photodynamic therapy-induced apoptosis selectively in colorectal cancer stem-like cells. *Autophagy* **10**: 1179–1192.
- White, E. (2015) The role for autophagy in cancer. *J. Clin. Invest.* **125**: 42–46.
- WHO (2012) Cancer today.
- Wilcock, C. and Bailey, C.J. (1994) Accumulation of metformin by tissues of the normal and diabetic mouse. *Xenobiotica Fate Foreign Compd. Biol. Syst.* **24**: 49–57.
- Wu, H., Esteve, E., Tremaroli, V., Khan, M.T., Caesar, R., Mannerås-Holm, L., *et al.* (2017) Metformin alters the gut microbiome of individuals with treatment-naïve type 2 diabetes, contributing to the therapeutic effects of the drug. *Nat. Med.* **23**: 850–858.
- Wu, S., Wang, X., Chen, J., and Chen, Y. (2013) Autophagy of cancer stem cells is involved with chemoresistance of colon cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **434**: 898–903.
- www.cellsignal.com/AMPK_Signaling_Interactive_Pathway | Cell Signaling Technology.
- www.invivogen.com/autophagy Autophagy Activator, Inhibitors, genes and cell-based assays.
- Yan, Y., Zuo, X., and Wei, D. (2015) Concise Review: Emerging Role of CD44 in Cancer Stem Cells: A Promising Biomarker and Therapeutic Target. *Stem Cells Transl. Med.* **4**: 1033–1043.
- Yang, H.-Z., Ma, Y., Zhou, Y., Xu, L.-M., Chen, X.-J., Ding, W.-B., and Zou, H.-B. (2015) Autophagy contributes to the enrichment and survival of colorectal cancer stem cells under oxaliplatin treatment. *Cancer Lett.* **361**: 128–136.
- Yashiro, M., Nishii, T., Hasegawa, T., Matsuzaki, T., Morisaki, T., Fukuoka, T., and Hirakawa, K. (2013) A c-Met inhibitor increases the chemosensitivity of cancer stem cells to the irinotecan in gastric carcinoma. *Br. J. Cancer* **109**: 2619–2628.
- Yau, T.O., Tang, C.-M., and Yu, J. (2014) Epigenetic dysregulation in Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma: disease and treatments. *World J. Gastroenterol.* **20**: 6448–6456.
- Yong, X., Tang, B., Li, B.-S., Xie, R., Hu, C.-J., Luo, G., *et al.* (2015) *Helicobacter pylori* virulence factor CagA promotes tumorigenesis of gastric cancer via multiple signaling pathways. *Cell Commun. Signal. CCS* **13**: 30.
- Yoo, L.I., Chung, D.C., and Yuan, J. (2002) LKB1--a master tumour suppressor of the small intestine and beyond. *Nat. Rev. Cancer* **2**: 529–535.
- Yu, G., Fang, W., Xia, T., Chen, Y., Gao, Y., Jiao, X., *et al.* (2015) Metformin potentiates rapamycin and cisplatin in gastric cancer in mice. *Oncotarget* **6**: 12748–12762.
- Zabala Torres, B., Lucero, Y., Lagomarcino, A.J., Orellana-Manzano, A., George, S., Torres, J.P., and O’Ryan, M. (2017) Prevalence and dynamics of *Helicobacter pylori* infection during childhood. *Helicobacter*.
- Zhang, H.-H. and Guo, X.-L. (2016) Combinational strategies of metformin and chemotherapy in cancers. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **78**: 13–26.
- Zhang, S. and Moss, S.F. (2012) Rodent models of *Helicobacter* infection, inflammation, and disease. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **921**: 89–98.
- Zhang, Y., Guan, M., Zheng, Z., Zhang, Q., Gao, F., and Xue, Y. (2013) Effects of metformin on CD133+ colorectal cancer cells in diabetic patients. *PLoS One* **8**: e81264.

- Zhao, J., Liang, Q., Cheung, K.-F., Kang, W., Lung, R.W.M., Tong, J.H.M., *et al.* (2013) Genome-wide identification of Epstein-Barr virus-driven promoter methylation profiles of human genes in gastric cancer cells. *Cancer* **119**: 304–312.
- Zhao, Y., Feng, F., and Zhou, Y.-N. (2015) Stem cells in gastric cancer. *World J. Gastroenterol. WJG* **21**: 112–123.
- Zheng, Q., Chen, X.Y., Shi, Y., and Xiao, S.D. (2004) Development of gastric adenocarcinoma in Mongolian gerbils after long-term infection with *Helicobacter pylori*. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **19**: 1192–1198.
- Zhou, G., Myers, R., Li, Y., Chen, Y., Shen, X., Fenyk-Melody, J., *et al.* (2001) Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J. Clin. Invest.* **108**: 1167–1174.
- Zhou, X.-L., Xue, W.-H., Ding, X.-F., Li, L.-F., Dou, M.-M., Zhang, W.-J., *et al.* (2017) Association between metformin and the risk of gastric cancer in patients with type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis of cohort studies. *Oncotarget* **8**: 55622–55631.
- Zhu, Y., Tian, T., Li, Z., Tang, Z., Wang, L., Wu, J., *et al.* (2015) Establishment and characterization of patient-derived tumor xenograft using gastroscopic biopsies in gastric cancer. *Sci. Rep.* **5**: 8542.
- Zimmermann, S., Pfannkuch, L., Al-Zeer, M.A., Bartfeld, S., Koch, M., Liu, J., *et al.* (2017) ALPK1- and TIFA-Dependent Innate Immune Response Triggered by the *Helicobacter pylori* Type IV Secretion System. *Cell Rep.* **20**: 2384–2395.
- Zong, H., Yin, B., Zhou, H., Cai, D., Ma, B., and Xiang, Y. (2014) Inhibition of mTOR pathway attenuates migration and invasion of gallbladder cancer via EMT inhibition. *Mol. Biol. Rep.* **41**: 4507–4512.

