



HAL
open science

Exploration des cytokines pro-inflammatoires et de l'inflammasome NLRP3 dans les infections intracellulaires : cas de *H. pylori* et des virus à ARN

Ahmed Outlioua

► **To cite this version:**

Ahmed Outlioua. Exploration des cytokines pro-inflammatoires et de l'inflammasome NLRP3 dans les infections intracellulaires : cas de *H. pylori* et des virus à ARN. Virologie. Université Paris-Saclay; Université Hassan II (Casablanca, Maroc). Faculté des Sciences, 2021. Français. NNT : 2021UPASL029 . tel-03222511

HAL Id: tel-03222511

<https://theses.hal.science/tel-03222511>

Submitted on 10 May 2021

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.

Exploration des cytokines pro-
inflammatoires et de l'inflammasome
NLRP3 dans les infections intracellulaires :
cas de *H. pylori* et des virus à ARN
*Exploration of pro-inflammatory cytokines and NLRP3
inflammasome in intracellular infections: cases of H.
pylori and RNA viruses*

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

Ecole Doctorale n°582 : cancérologie : biologie - médecine - santé
(CBMS)

Spécialité de doctorat : sciences de la vie et de la santé

Unité de recherche : Université Paris-Saclay, Inserm, Interactions Cellules
souches-niches : physiologie, tumeurs et réparation tissulaire, 94807, Villejuif,
France

Référent : Faculté de médecine

**Thèse présentée et soutenue à Faculté des Sciences de Casablanca,
Maroc**

le 31/03/2021, par

Ahmed OUTLIOUA

Composition du Jury

Khadija MOUNAJI

Professeur, Faculté des Sciences Ain Chock - Casablanca

Présidente

Nourredine BOURHIM

Professeur, Faculté des Sciences Ain Chock - Casablanca

Rapporteur et Examineur

Damien VITOUR

Docteur (HDR), UMR 1161, Maisons-Alfort

Rapporteur et Examineur

Hassan FELLAH

Professeur, Faculté de Médecine et de Pharmacie - Casablanca

Rapporteur et Examineur

Nolwenn JOUVENET

Docteur (HDR), Institut Pasteur de Paris - France

Examinatrice

Abdelouahed KHALIL

Professeur, Université de Sherbrooke - Canada

Examineur

Direction de la thèse

Damien ARNOULT

Docteur, INSERM U 1197

Directeur de thèse

Khadija AKARID

Professeur, Faculté des Sciences Ain Chock - Casablanca

Co-directrice de thèse

THÈSE EN COTUTELLE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT

Présentée par : Ahmed OUTLIOUA

En : Sciences Biologiques

Spécialité : Immunologie / Immunopathologie

Exploration des cytokines pro-inflammatoires et de l'inflammasome NLRP3 dans les infections intracellulaires : cas de *H. pylori* et des virus à ARN

Soutenue publiquement le 31 mars 2021 à 12h
A la Faculté des Sciences-Ain Chock devant le Jury :

Pr. Khadija MOUNAJI	Faculté des Sciences Ain Chock - Casablanca	Présidente
Pr. Nourredine BOURHIM	Faculté des Sciences Ain Chock - Casablanca	Rapporteur et Examinateur
Dr. Damien VITOUR	UMR 1161, Maisons-Alfort - France	Rapporteur et Examinateur
Pr. Hassan FELLAH	Faculté de Médecine et de Pharmacie - Casablanca	Rapporteur et Examinateur
Dr. Nolwenn JOUVENET	Institut Pasteur de Paris - France	Examinatrice
Pr. Abdelouahed KHALIL	Université de Sherbrooke - Canada	Examinateur
Dr. Damien ARNOULT	INSERM U1197, Hôpital Paul Brousse - France	Co-directeur de thèse
Pr. Khadija AKARID	Faculté des Sciences Ain Chock - Casablanca	Directrice de thèse

AVANT-PROPOS

Ce travail a été effectué sous la direction de :

Professeur Khadija AKARID,
Laboratoire Santé & Environnement
Faculté des Sciences Aïn Chock, Université Hassan II de Casablanca, Maroc

&

Docteur Damien ARNOULT,
Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM),
Laboratoire « Interactions Cellules Souches-Niches : Physiologie, Tumeurs Et Réparation
Tissulaire », Paris, France

En collaboration avec :

Le département de médecine de la Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé à
l'Université de Sherbrooke, Canada.

&

Le laboratoire de Parasitologie de la Faculté de Médecine et Pharmacie de Casablanca,
Maroc.

&

Le département de Gastroentérologie et d'Anatomie pathologique du centre hospitalier Ibn
Rochd de Casablanca, Maroc.

&

Le centre de diagnostic de l'Hôpital Militaire d'Instruction Mohammed V,
Université Mohammed V, Rabat, Maroc.

PREAMBULE

Ce travail de thèse a été initié et rentre dans le cadre d'un projet de recherche financé par AUF (Agence Universitaire de la Francophonie) en réponse à l'appel d'offre AUF-PIRAT en 2013. Ce projet associe l'équipe de recherche marocaine représentée par Pr. Khadija Akarid, l'équipe canadienne représenté par le Dr. Khalil Abdelouahed et l'équipe française représentée par le Dr. Damien Arnoult. Il avait comme objectif générale d'étudier l'interaction entre les facteurs de l'hôte et les facteurs bactériens impliqués dans le développement de la pathologie gastrique à *H. pylori* et son évolution chez les patients marocains. En effet, à l'initiation de ce travail de recherche, les données concernant la physiopathologie à *H. pylori* et son évolution au Maroc étaient très limitées.

Pour répondre à cet objectif général, des réunions entre les différentes équipes partenaires ont permis de tirer plusieurs objectifs spécifiques et qui étaient de i) Etudier la prévalence de l'infection à *H. pylori* chez les patients marocains. ii) Etudier l'expression des ARNm des cytokines pro-inflammatoire (IL-1 β , IL-8 et IL-17A) dans les biopsies gastriques des patients marocains ainsi que sa corrélation avec l'infection et/ou son évolution vers les stades de cancer gastrique. iii) Etudier la variabilité génétique du polymorphisme génétique de l'IL-1 β chez les patients marocains. iv) Etudier les voies de signalisation activées par *H. pylori* pour induire l'activation de l'inflammasome dans les cellules infectées.

Ma contribution dans ce projet de recherche était :

De coordonner la mise en place d'un réseau associant immunologiste, anatomo-pathologistes et gastroentérologues.

De contribuer à la soumission du projet au comité national d'éthique marocain du CHU Ibn Rochd de Casablanca.

De mettre en place les fiches de recueil des renseignements cliniques et consensus éthiques en collaboration avec le service gastroentérologie du Centre Hospitalier Universitaire Ibn Rochd.

De contribuer au recrutement des patients au cours des séances des fibroscopies sous la supervision du chef de service gastroentérologie (Dr. W BADRE).

D'organiser des réunions pour les recueils des comptes rendu de l'examen anatomopathologique des patients préalablement recrutés.

D'organiser une seconde lecture de l'examen anatomopathologique sur l'ensemble des biopsies gastriques pour standardiser les résultats.

De mettre en place les protocoles d'extraction des acides nucléiques (ADN et ARN) ainsi que l'identification moléculaires d'*H. pylori*.

De réaliser l'amplification des ADNs par PCR pour l'étude du polymorphisme des gènes par PCR-RFLP et des ARNs par RT-qPCR pour l'étude de l'expression génique

Et enfin, analyser les résultats obtenus en collaboration avec toutes les équipes.

En outre, au cours de ce projet, une cotutelle de thèse a été établie en 2016 entre la Faculté des Sciences Aïn Chock, Université Hassan II de Casablanca (Pr. K. AKARID) et la Faculté de Médecine Paris-Sud 11, Université Paris-Saclay (Dr. D. ARNOULT). Ce partenariat avait comme objectifs i) De continuer les travaux de recherche sur la physiopathologie à *H. pylori*. ii) Etudier l'implication des PRRs et les voies de signalisation dans la reconnaissance de cette bactérie et plus précisément l'activation de l'inflammasome dans les cellules stimulées par la bactérie et/ou des antigènes de *H. pylori*. iii) décrypter les mécanismes d'activation de l'inflammasome NLRP3 en utilisant dans un premier temps les virus à ARN qui sont des agents pathogènes définis comme des activateurs de l'inflammasome NLRP3. Ceci permettrait d'appliquer ces outils pour étudier cette voie dans le cadre de l'infection par *H. pylori*.

Ma contribution dans la cotutelle de thèse était :

De continuer et approfondir les travaux de recherche sur les mécanismes de l'activation de l'inflammasome NLRP3 par les virus à ARN.

De mettre en place les protocoles d'étude de cette voie NLRP3 dans le cas de l'infection par *H. pylori* par :

- Stimulation et transfection de BMDMs *in vitro* par le LPS de *H. pylori* et celui d'autres bactéries.
- Mise en place des protocoles de viabilité cellulaire en temps réelle après transfection de BMDMs par le LPS de *H. pylori* et celui d'autres bactéries.
- Etude de l'activation de l'inflammasome dans les BMDMs après stimulation par le LPS de *H. pylori* et celui d'autres bactéries.

REMERCIEMENTS

**AU NOM DE DIEU LE CLEMENT, LE MISECORDIEUX,
LOUANGE A DIEU SEUL
QUE LA PAIX ET LA PRIERE SOIENT SUR LE PROPHETE, SA FAMILLE ET SES
COMPAGNONS,**

Au terme de cette expérience personnelle à la fois passionnante et enrichissante, il est un devoir, voire une obligation d'exprimer mes sincères remerciements à celles et ceux qui ont contribué de près ou de loin à l'aboutissement de cet humble travail.

Ces sentiments chaleureux sont le gage et le témoignage de gratitude et de reconnaissance à vos égards.

Mes premiers remerciements s'adressent à mes deux directeurs de Thèse, le Pr Khadija AKARID et Dr. Damien ARNOULT, pour votre confiance que vous m'avez accordée, votre gentillesse, votre disponibilité et votre soutien dans les moments difficiles. Merci pour votre humour, votre optimisme infailible et vos encouragements. Votre intuition scientifique et votre humanité sont pour moi des exemples. Je vous remercie vivement de m'avoir confié ce sujet de thèse passionnant et de m'avoir accompagné tout au long de ce projet.

Merci aux membres du jury, Pr. *Khadija MOUNAJI* (Présidente du jury), Dr. *Damien VITOUR* (Rapporteur de thèse), Pr. *Hassan FELLAH* (Rapporteur de thèse), Pr. *Noureddine BOURHIM* (Rapporteur de thèse), Dr. *Nolwenn JOUVENET* (Examinatrice de thèse) et Pr. *Abdelouahed KHALIL* (Examineur de thèse) pour avoir accepté d'évaluer et de juger mon travail.

Un autre grand merci au Pr *Abdelouahed KHALIL* (Université de Sherbrooke - Canada) pour ton aide très précieuse, ta disponibilité, tes conseils ainsi que ta bonne humeur pendant mon stage et séjour au Canada.

Merci à *Zerif ECHARKI* pour ta contribution dans ce projet, pour ta grande aide tout au long de mon séjour au Canada mais aussi pour tout ton humour et ta chaleureuse amitié.

Merci au Pr. *Myriam RIYAD* pour m'avoir accueilli au sein du laboratoire de Parasitologie de la Faculté de Médecine et Pharmacie de Casablanca et pour m'avoir soutenue et encouragé. Merci d'avoir trouvé les mots qu'il faut aux moments qu'il faut.

Merci au Pr. *Wafaa BADRE* (Service de gastroentérologie et hépatologie au CHU - Casablanca) et au Pr. *Monsef RABHI* (Centre de diagnostic, Hôpital Militaire d'Instruction

Mohammed V - Rabat) pour leur contribution dans la réalisation du travail relatif à *H. pylori*.

Merci à Dr. *Nadira EL HAMMANI* pour ton accompagnement pendant les longues séances de fibroscopie au service de gastro-entérologie.

Merci au Pr. *Mehdi KARKOURI* (Service central d'anatomie pathologique au CHU – Casablanca) et au Dr *Christophe DESTERKE* (Faculté de médecine du Kremlin-Bicêtre - France) pour leur précieuse contribution dans ce travail.

Un grand merci à mes amis thésards *Mouad AIT KBAICH* et *Idriss MHAIDI* pour votre amitié chaleureuse, votre disponibilité et votre soutien. Je n'oublierais jamais nos discussions interminables et nos aventures tout au long de notre cursus.

Merci aux jeunes thésards du laboratoire de parasitologie, pour toutes les blagues, les discussions, les fous rires et tous les agréables moments, même quand les expériences foirent...

Un grand merci à mes amis thésards, jeunes docteurs (et autres) multinationaux et pluridisciplinaires.

Je dédie ce travail :

À MES PARENTS

C'est avec admiration et considération que je salue votre abnégation et votre vaillance, vous qui m'avez inculqué les valeurs fondamentales, morales et humaines, vous qui m'avez toujours entouré de votre affection bienveillante, vous qui m'avez prodigué vos précieux conseils de tolérance et de respect d'autrui.

Qu'il me soit permis de vous témoigner mon indéfectible dévouement et ma profonde reconnaissance.

A MA CHERE EPOUSE, *FATIMAZAHRA*

Toujours disponible, généreuse et consolante, que mon affection profonde et mon attachement indéfectible soient le témoignage de ma reconnaissance et mon dévouement infaillibles.

À MES BEAUX PARENTS, Mr *IDRISS* ET Mme *NAJAT*

Votre sympathie et votre vaillance n'ont d'égal pour moi que mon grand respect et ma profonde admiration

À MA SŒUR *SAFAA* ET MON FRÈRE *YOUSSEF*

En témoignage de notre complicité d'enfance et en reconnaissance de notre fraternité d'aujourd'hui

A TOUTE MA FAMILLE

D'ici et d'ailleurs.

RESUME

Helicobacter pylori (*H. pylori*) est une bactérie qui infecte l'estomac et induit une gastrite inflammatoire, qui peut être chronique et évoluer vers un cancer gastrique. La sévérité de l'infection et son évolution clinique sont associées aux différents facteurs notamment le statut immunitaire de l'hôte. La réponse inflammatoire initiale à l'infection à *H. pylori* entraîne la sécrétion d'un large panel de cytokines, notamment l'interleukine-1 β (IL-1 β), l'IL-8 et l'IL-17A, qui semblent jouer un rôle clé dans l'initiation et la progression du cancer gastrique. Parmi ces cytokines, l'IL-1 β est une cytokine clé au cours de l'infection à *H. pylori* dont l'expression est étroitement associée à l'inflammation gastrique et à la carcinogenèse. La production de cette cytokine dépend de l'activation de l'inflammasome, en particulier l'inflammasome NLRP3. Ce dernier, responsable de l'activation des processus inflammatoires, est essentiel pour le maintien de l'homéostasie contre diverses infections pathogènes telles les infections bactérienne et virale.

L'objectif général de ce travail est i) d'étudier l'expression et le polymorphisme des gènes de cytokines comme IL-1 β , IL-17 et IL-8 chez des patients marocains infectés par *H. pylori*. ii) explorer l'activation de l'inflammasome NLRP3 par *H. pylori* et déterminer les mécanismes impliqués dans l'activation de ce complexe par des virus à ARN ; connus comme des activateurs définis de NLRP3.

Nos résultats ont souligné une prévalence élevée de *H. pylori* et ont mis en évidence une signature cytokinique : elle peut prédire la métaplasie au cours de la progression de l'infection à *H. pylori* impliquant une diminution de l'expression de l'IL17A dans l'antrum et une augmentation de l'expression de l'IL-1 β dans le fundus. Plus particulièrement, les polymorphismes génétiques de l'IL-1 β (IL-1 β -31 et -511) ne semblent pas influencer l'expression de l'IL-1 β de manière significative.

Au regard des difficultés rencontrés pour l'isolement et la culture de *H. pylori*, nous avons utilisé le LPS de *H. pylori* pour stimuler l'inflammasome. Nos résultats montrent que la transfection des cellules *in vitro* par le LPS bactérien induit la production de l'IL-1 β qui semble être modulée par la caspase 4, NOD1 et NOD2. Par ailleurs, bien qu'il soit clairement établi que les virus à ARN induisent l'activation de l'inflammasome NLRP3, les mécanismes par lesquels ces virus induisent la production d'IL-1 β ne sont pas bien compris et restent à confirmer. Les résultats de cette partie du travail ont montré que la réplication des virus à ARN cytopathogènes tels que le virus de la stomatite vésiculaire (VSV) ou le virus de l'encéphalomyocardite (EMCV) induit une mort cellulaire lytique conduisant à un efflux de potassium qui déclenche l'activation de l'inflammasome NLRP3. Ainsi, les virus à forte capacité de réplication et qui ont un effet cytopathique sont capables d'induire l'activation de la caspase-1 conduisant à la production d'IL-1 β . A l'inverse, les virus qui induisent une très bonne réponse IFN de type I sont de très mauvais inducteurs de l'inflammasome NLRP3.

Une meilleure compréhension de l'activation de l'inflammasome pourrait aider dans la mise au point de stratégies thérapeutiques ciblées utilisables dans la lutte contre les infections bactérienne et virale.

Mots clés : *Helicobacter pylori*, inflammation, inflammasome NLRP3, IL-1 β , virus à ARN.

ABSTRACT

Helicobacter pylori (*H. pylori*) is a bacteria that infects the stomach and induces inflammatory gastritis, which can be chronic and progress to gastric cancer. The severity of the infection and its clinical course are associated with various factors including the immune status of the host. The initial inflammatory response to *H. pylori* infection results in the secretion of a wide range of cytokines, including interleukin-1 β (IL-1 β), IL-8 and IL-17A. which appear to play a key role in the initiation and progression of gastric cancer. Among these cytokines, IL-1 β is a key cytokine during *H. pylori* infection whose expression is associated with gastric inflammation and carcinogenesis. The production of this cytokine depends on the activation of the inflammasome, in particular the NLRP3 inflammasome. The latter, responsible of the activation of inflammatory processes, is essential for the maintenance of homeostasis against various pathogenic infections such as bacterial and viral infections.

The general objective of this work is i) to study the expression and polymorphism of genes for cytokines such as IL-1 β , IL-17 and IL-8 in Moroccan patients infected with *H. pylori*. ii) explore the activation of the NLRP3 inflammasome by *H. pylori* and determine the mechanisms involved in the activation of this complex by RNA viruses; known as defined activators of NLRP3.

Our results underlined a high prevalence of *H. pylori* and demonstrated a cytokine signature: it can predict metaplasia during the progression of *H. pylori* infection involving a decrease in IL17A expression in the antrum and increased expression of IL-1 β in the fundus. In particular, the genetic polymorphisms of IL-1 β (IL-1 β -31 and -511) do not appear to influence IL-1 β expression significantly.

In view of the difficulties encountered in isolating and culturing *H. pylori*, we used LPS from *H. pylori* to stimulate the inflammasome. Our results show that the transfection of cells *in vitro* with bacterial LPS induces the production of IL-1 β which appears to be modulated by caspase 4, NOD1 and NOD2. Furthermore, while it is clearly established that RNA viruses induce activation of the NLRP3 inflammasome, the mechanisms by which these viruses induce IL-1 β production are not well understood and remain to be confirmed. The results of this part of the work showed that the replication of cytopathogenic RNA viruses such as vesicular stomatitis virus (VSV) or encephalomyocarditis virus (EMCV) induces lytic cell death leading to an efflux of potassium which triggers activation of the NLRP3 inflammasome. Thus, viruses with a high replication capacity and which have a cytopathic effect are capable of inducing the activation of caspase-1 leading to the production of IL-1 β . Conversely, viruses which induce type I IFN response are very poor inducers of the NLRP3 inflammasome.

A better understanding of the activation of the inflammasome could help in the development of targeted therapeutic strategies for use in the fight against bacterial and viral infections.

Key words: *Helicobacter pylori*, inflammation, NLRP3 inflammasome, IL-1 β , RNA virus.

PRODUCTION SCIENTIFIQUES

Publications :

- Ahmed Outlioua, Marie Pourcelot et Damien Arnoult. « **The Role of Optineurin in Antiviral Type I Interferon Production** » Front. Immunol. Volume 9, Article 853 April 2018.

- Leandro Silva da Costa, Ahmed Outlioua, Adrienne Anginot, Khadija Akarid et Damien Arnoult. « **RNA viruses promote activation of the NLRP3 inflammasome through cytopathogenic effect-induced potassium efflux.** » Cell Death & Disease Volume 10, Article number: 346 April 2019.

- Mena Abdel-Nour, Leticia A. M. Carneiro, Jeffrey Downey, Jessica Tsalikis, Ahmed Outlioua, Dave Prescott, Leandro Silva Da Costa, Elise S. Hovingh, Armin Farahvash, Ryan G. Gaudet, Raphael Molinaro, Rob van Dalen, Charles C. Y. Lau, Farshad C. Azimi, Nichole K. Escalante, Aaron Trotman-Grant, Jeffrey E. Lee, Scott D. Gray-Owen, Maziar Divangahi, Jane-Jane Chen, Dana J. Philpott, Damien Arnoult, Stephen E. Girardin. «**The heme-regulated inhibitor is a cytosolic sensor of protein misfolding that controls innate immune signaling.**» Science Volume 365, 47 July 2019.

- Outlioua A, Badre W, Desterke C, Echarki Z, El Hammani N, Rabhi M, Riyad M, Karkouri M, Arnoult D, Khalil A, Akarid K. “ **Gastric IL-1 β , IL-8, and IL-17A expression in Moroccan patients infected with Helicobacter pylori may be a predictive signature of severe pathological stages.**” Cytokine, Volume 126, February 2020.

- Baghdad B, Razanapinaritra R, Maksouri H, El Bouri H, Outlioua A, Fellah H, Lemrani M, Akarid K, Martin-Sanchez J, Chiheb S, Riyad M. “**Possible introduction of Leishmania tropica to urban areas determined by epidemiological and clinical profiles of patients with cutaneous leishmaniasis in Casablanca (Morocco).**” Parasite Epidemiol Control. May 2020.

Communications affichées:

- **Ahmed Outlioua**, Leandro Silva Da Costa, Khadija Akarid, Damien Arnoult. « RNA viruses-induced cytopathic effect triggers nlrp3 inflammasome activation. » 14ème Journées scientifiques de l'Ecole doctorale de Cancérologie - 22 - 24 MAI 2018, Station biologique de ROSCOFF, France.

- **Ahmed Outlioua**, Wafaa Badre, Christophe Desterke, Zerif Echarki, Nadira El Hammani, Moncef Rabhi, Myriam Riyad, Mehdi Karkouri, Damien Arnoult, Abdelouahed Khalil, Khadija Akarid. "Gastric IL-1 β , IL-8, and IL-17A expression in Moroccan patients infected with Helicobacter pylori may be a predictive signature of severe pathological stages" The First International Congress of the Moroccan Society of Genomic and Human Genetics and the third edition of the School of immunogenetics: 19-21 December, 2019 Agadir, Morocco.

Communications orales :

- **Ahmed OUTLIOUA**, Khadija AKARID, Damien ARNOULT. « Voie de signalisation pour la production d'interféron de type I : régulation par ubiquitination/deubiquitination » 3ème Congrès Magrèbin & 6ème Journées de la SMI, 25-28 Novembre 2014, MARRAKECH.

- Hasnaa MAKSOURI, **Ahmed OUTLIOUA**, Nora ELKHALFAOUI, Myriam RIYAD et Khadija AKARID « Rôle de la NO synthase inductible (iNOS) dans l'infection in vivo par deux souches autochtones dermatropes de Leishmania. » 7ème Journées Scientifiques de la SMI, 9-10 Décembre 2016, Mohammedia.

- **Ahmed Outlioua**, Leandro Silva Da Costa, Khadija Akarid et Damien Arnoult. « La mort cellulaire et l'efflux des ions K⁺ induits par les virus à ARN déclenchent l'activation de l'inflammasome NLRP3. ». 5ème Cours Méditerranéen Supérieur d'Immunologie Et Les 9èmes Journées Scientifiques de la SMI, 10-15 décembre 2018, Marrakech.

TABLES DES MATIÈRES

AVANT-PROPOS	I
PREAMBULE	II
REMERCIEMENTS.....	IV
RESUME.....	VIII
PRODUCTION SCIENTIFIQUES	X
TABLES DES MATIÈRES	XII
LISTES DES ABREVIATIONS :.....	XVI
TABLE DES FIGURES :	XIX
TABLES DES TABLEAUX :.....	XXII
INTRODUCTION GENERALE	1
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	5
CHAPITRE I : ETUDE DE LA PHYSIOPATHOLOGIE A <i>HELICOBACTER PYLORI</i>	
I- Rappel anatomique et physiologique de l'estomac.....	6
I-1) Anatomie de l'estomac.....	6
I- 2) Physiologie de l'estomac.....	7
II) Infection par <i>Helicobacter pylori</i> (<i>H. pylori</i>).....	11
II-1) Historique.....	11
II- 2- Epidémiologie	11
II- 3) Interaction bactérie-hôte	12
III) Pathologies gastriques associées à l'infection par <i>H. pylori</i>.....	18
III- 1) Gastrites aiguë et chronique	19
III- 2) Ulcères peptiques.....	19
III-3) Atrophie gastrique (Perte de glandes gastriques)	20
III-4) Métaplasie Intestinale	21
III-5) Cancer gastrique et lymphome du MALT.....	21
IV) Réponse immunitaire contre <i>H. pylori</i>.....	22
IV- 1- Immunité innée.....	23
IV-2) Réponse immunitaire acquise contre <i>H. pylori</i> : les sous populations Th1/Th2/Th17	35
IV-3) Rôle des cytokines inflammatoires IL-8, IL-1 β et IL17A dans l'infection par <i>H.</i> <i>pylori</i>	39
CHAPITRE II. ROLE DE L'INFLAMMASOME NLRP3 DANS LES INFECTIONS A GERMES INTRACELLULAIRES : CAS DES VIRUS à ARN ET DE <i>H. PYLORI</i>.	44
I) Généralités sur les inflammasomes.....	44

II) L'Inflammasome NLRP3	47
II-1) Activation de l'inflammasome NLRP3	47
II-2) Régulation de l'amorçage	49
II-3) Régulation post-transcriptionnelle	50
II-4) Modulation post-traductionnelle	51
II-5) Régulation négative de l'activation de l'inflammasome NLRP3	52
III) Inflammasome NLRP3 et infection virale	53
IV) Inflammasome NLRP3 et infection par <i>H. pylori</i>	54
Matériel et méthodes	56
I - Les patients	57
II- Analyses histopathologiques	58
III- Etude de l'ADN génomique	58
III- 1 : Extraction de l'ADN génomique	58
III-2 : Identification de <i>H. pylori</i>	60
III-3 : Restriction enzymatique (PCR-RFLP)	61
IV- Etude de l'expression génique	62
IV-1 : Extraction de l'ARN total	62
IV-2 : Transcription inverse	63
IV-3 : PCR en temps réel	65
V) Etude fonctionnelle : Culture cellulaire	65
V-1) Préparation des cellules	65
V-2) Stimulation des cellules par le LPS de <i>H. pylori</i>	66
V-3) Transfection des cellules par le LPS bactérien	66
V-4) Test de mort cellulaire en temps réel	67
V-5) Détection de l'IL-18 humaine grâce aux cellules « HEK-Blue IL-18 ».....	68
V-6) Infections virales et traitements cellulaires.....	68
V-7) Quantification virale	69
V-8) Test de libération de la lactate déshydrogénase (LDH).....	69
V-9) Quantifications des cytokines par le test d'immunoabsorption par enzyme liée (ELISA).....	70
V-10) Extraction de protéines et analyse par Western Blot (WB).....	70
V-11) Transfection des siRNA.....	71
V-12) Immunofluorescence des Speck d'ASC	71
V-13) Oligomérisation d'ASC	72
V-14) Génération des cellules THP-1 exprimant un shRNA.....	72

V-15) Stimulation des macrophages THP-1	72
VI) Analyses statistiques	73
RESULTATS ET DISCUSSION	74
PARTIE I : ETUDE DE LA PHYSIOPATHOLOGIE A <i>H. PYLORI</i>	75
A. Résultats :	75
I - Etude de l'expression des gènes des cytokines	75
1) Prévalence de l'infection à <i>H. pylori</i> et répartition des patients selon l'âge, le sexe et les paramètres du mode de vie :	75
2) L'expression de l'ARNm des gènes des cytokines IL-1 β , IL-8 et IL-17A dans l'antra et le fundus de l'estomac :	76
3) L'expression de l'ARNm des cytokines selon les stades pathologiques gastriques :	77
4) Prédiction de survenue de métaplasie gastrique par la triade d'interleukine dans les échantillons gastriques antrales et fundiques des patients infectés par <i>H. pylori</i> :	81
II - Etude du polymorphisme génétique	83
1) L'expression relative d'IL-1 β selon les polymorphismes nucléotidiques -511 C/T et -31 C/T du promoteur du gène IL-1 β chez les patients infectés par <i>H. pylori</i> dans l'antra et le fundus	83
2) L'expression relative d'IL-1 β selon les génotypes combinés des polymorphismes nucléotidiques -511 C/T et -31 C/T du promoteur du gène d'IL-1 β chez les patients infectés par <i>H. pylori</i> dans l'antra et le fundus de l'estomac.	86
3) L'expression relative d'IL-1 β selon les VNTR dans l'intron 2 du gène de l'IL1Ra chez les patients infectés par <i>H. pylori</i> dans l'antra et le fundus de l'estomac	87
III- Etude des voies de signalisation après stimulation des cellules par le LPS de <i>H. pylori</i>	89
1) Activation des voies de signalisation en aval des récepteurs de l'immunité innée suite à la stimulation <i>in vitro</i> de BMDMs de souris par le LPS de <i>H. pylori</i>	90
2) Libération de l'IL-1 β suite à la transfection des BMDMs par le LPS de <i>H. pylori</i>	92
3) Activation de l'inflammasome suite à la transfection <i>in vitro</i> des cellules HCT116 humaine par le LPS de <i>H. pylori</i>	96
4) Caspase-4, NOD1 et NOD2 modulent l'activation de l'inflammasome suite à la transfection des cellules par du LPS de <i>H. pylori</i>	98
B. Discussion	99
PARTIE II : ETUDE DES MECANISMES D'ACTIVATION DE L'INFLAMMASOME NLRP3 PAR LES VIRUS à ARNs	106
A. Résultats	106
1) Les virus à ARNs cytopathogènes stimulent l'activation de l'inflammasome NLRP3	106

2) Les virus à ARNs cytopathogènes favorisent l'efflux de potassium pour activer l'inflammasome NLRP3.....	113
3) Les RLR, MAVS et DHX33 ne sont pas nécessaires pour l'activation de l'inflammasome NLRP3 par les virus à ARNs	116
4) La machinerie de la nécroptose et Drp1 ne sont pas indispensables pour l'activation de l'inflammasome induit par les virus à ARNs.....	121
5) La réplication virale et la mort cellulaire qui s'ensuit sont nécessaires à l'activation de inflammasome NLRP3.....	125
B. DISCUSSION	128
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	131
REFERENCES ET WEBOGRAPHIES	135
ANNEXES.....	171

LISTES DES ABREVIATIONS :

ACh : Acétylcholine
ADN : Acide désoxyribonucléique
AGS : Adenocarcinoma of the stomach
AIM2 : Absent In Melanoma 2
ALR : Les récepteurs de type AIM2
AP-1 : La protéine activatrice-1
APA : Antagoniste de la pompe d'acide
ARIH2 : L'homologue d'Ariane 2
ARN : Acide ribonucléique
ARNm : Acide ribonucléique messenger
ASC : Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD domain
AUF : Agence Universitaire de la Francophonie
BabA : Blood group antigen binding adhesion
BCAP : L'adaptateur de cellules B pour la phosphoinositide-3-kinase
BHB : β -hydroxybutyrate du corps cétonique
BHK-21 : Baby Hamster Kidney
BIR : Baculovirus Inhibitor of apoptosis protein Repeat
BIRC3 : Baculoviral IAP repeat-containing protein 3
BMDMs : Bone Marrow-Derived Macrophage
Cag PAI : L'îlot de pathogénicité Cag
CagA : Cytotoxin-associated gene A
CAPE : Caffeic acid phenetyl ester
CARD : Caspase-activation and recruitment domain
CCR2 : C-C chemokine receptor 2
CD : Cellules dendritiques
CINCA : Syndrome chronique, infantile, neurologique, cutané et articulaire
CLEC5A : Le membre A de la famille 5 du domaine des lectines de type
CLR : Les récepteurs de type C lectine
COX-2 : Cyclooxygénase-2
CR : Récepteurs du complément
Csk : C-terminal Src kinase
DAMP : Damage Associated Molecular Pattern
DRP1 : Dynamin-related protein 1
DupA : Duodenal ulcer promoting gene A
ECL : Cellules Entérochromaffines
EDTA : Éthylènediaminetétraacétique
ELISA : Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
EMCV : Encephalomyocarditis virus
ENS : Système nerveux entérique
ERK : Extracellular signaling regulating kinase
FCAS : Syndrome de l'urticaire familiale au froid
Gast : Gastrine
GEC : Cellules épithéliales gastriques
GM-CSF : Facteur de stimulation des colonies de granulocytes- macrophages
GSDMD : Gasdermine-D
H. pylori : *Helicobacter pylori*
Hcl : Acide chlorhydrique

HEK-293 : Les cellules embryonnaires humaines du rein 293
HES : Hématéine Eosine Safran
Hist : Histamine
HRP : Horse Radish Peroxydase
HSV-1 : Le virus 1 de l'herpès simplex
HtrA : High Temperature Requirement A
IAPP : Islet Amyloid PolyPeptide ou amyline
IceA : Induced by contact with epithelium
Ig : Immunoglobulines
IL-1 β : L'interleukine-1 β
iNOS : Oxyde Nitrique Synthase
IPP : Inhibiteurs de la pompe à protons
IRF3 : Interferon Regulatory Factor 3
ISGF3 : IFN-stimulated gene factor 3
JAM : Junctional adhesion molecule
JEV : Le virus de l'encéphalite japonaise
l'IFN- γ : Interféron-gamma
LDH : Lactate deshydrogenase
LGP2: Laboratory of genetics and physiology 2
LPS : Lipopolysaccharide
LRR : Leucine Riche Repeat
MA : Macrophage activé
MAA : Macrophage alternativement activé
MALT : Mucosa-associated lymphoid tissue
MAPK : Activation de la protéine kinase activée par un mitogène
MARK : Microtubules affinity regulating kinases
MAVS : Mitochondrial antiviral-signaling protein
MDA: Melanoma differentiation-associated gene 5
MMP : Les métalloprotéases matricielles
MO : Moelle osseuse
MSU : Des cristaux d'acide urique
MUC : Gastric mucin
NF- κ B: Facteur de transcription nucléaire kappa B
NK : Natural Killer
NEK-7 : NIMA-related kinase 7
NLR : Récepteurs de type NOD
NLRP3 : NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3
NO : Nitric oxide
NOD : Nucleotide-Binding Oligomerization Domain
NOD1 : Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 1
NS : Non spécifiques
ODC : Ornithine décarboxylase
OipA : Outer inflammatory protein
OMS : L'Organisation mondiale de la santé
PaCS : Structure cytoplasmique riche en particules
PAMP : Pathogen Associated Molecular Patterns
PAR1 : Partitioning-defective 1
PBS : Phosphate buffered saline
PCR : Polymerase Chain Reaction
PG : Peptidoglycane

PI : L'iodure de propidium
PKC : Protéine kinase C
PKD : Protéine kinase D
POP: PYRIN domain-only protein
PRR : Pattern Recognition Receptors
PTGS2 : Prostaglandin endoperoxide synthase 2
PUD : Peptic ulcer disease
PYD : Domaine pyrin N-terminal
RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphism
RIG-I : Retinoic Acid-Inducible Gene I
RIP1 : Receptor interacting protein kinase 1
RISC : RNA Induced Silencing Complex
ROR γ t : RAR-related orphan receptor gamma
ROS : Reactive oxygen species
RVFV : Le virus de la fièvre de la vallée du Rift
SabA : Sialic acid binding adhesin
SEAP : Phosphatase Alcaline Embryonnaire Sécrétée
SeV M : Virus Sendai Mutant
SH2 : Src homology 2
SHP : SH2 domain-containing protein tyrosine phosphatase
SindV : Virus Sindbis
SiRNA : Small interfering RNA
SNPs : Single nucleotide polymorphisms
SPM : Système phagocytaire mononucléaire
SST : Somatostatine
SSTIV : Système de sécrétion de type IV
SVF : Sérum de Vœu Fœtal
TAK1 : Transforming growth factor β activated kinase 1
TBK1 : Kinase responsable de la phosphorylation d'IRF3
Th1 : Lymphocytes T auxiliaires
TLR: Récepteurs de type Toll
TNF- α : Facteur de nécrose tumorale- α
TRAF6 : TNF receptor associated factor 6
Treg : Lymphocytes T régulateurs
TRX : Thiorédoxine
UV : Ultraviolet
VacA : Vacuolating cytotoxin
VEGF : Vascular endothelial growth factor
VNTR : Variable Number of Tandem Repeats
VSV : Le virus de la stomatite vésiculeuse
WB : Western Blot
ZO : Zonula occludens-1
 α -CA : L'anhydrase alpha-carbonique

TABLE DES FIGURES :

Figure 1 : Estomac.....	7
Figure 2 : Les différentes cellules constituant les glandes gastriques.....	9
Figure 3 : Modulation de la sécrétion d'acide gastrique.	10
Figure 4 : Structure d' <i>H. pylori</i>	15
Figure 5 : Différents domaines caractéristiques de la structure des TLRs.....	25
Figure 6 : Voies de signalisation en aval des TLRs conduisant à l'activation de NF- κ b.....	27
Figure 7 : Récepteurs de la famille NLR.....	27
Figure 8 : La phagocytose d'une bactérie par le macrophage.....	33
Figure 9 : Polarisation de la réponse immunitaire.....	35
Figure 10 : Polarisation de la réponse Th17 et Treg lors de l'infection par <i>H. pylori</i>	38
Figure 11 : Modèle des stimuli et d'activation des inflammasomes.....	44
Figure 12 : Activation de l'inflammasome NLRP3 via les deux signaux.....	48
Figure 13 : Régulation de l'activation de l'inflammasome NLRP3.....	51
Figure 14 : Activation de l'inflammasome NLRP3 induit par <i>H. pylori</i>	55
Figure 15 : Différents sites de prélèvement de biopsies gastriques. Site 1, 3 et 4 : petite courbure. Site 2 et 5 grande courbure.	57
Figure 16 : Extraction de l'ADN au phénol-chloroforme.....	60
Figure 17 : Schéma illustratif du protocole de la transcriptase inverse.	64
Figure 18 : Expression du gène rapporteur « Phosphatase Alkaline Embryonnaire Sécrétée » (SEAP) via la voie de signalisation NF- κ B.....	68
Figure 19 : Diagnostic de l'infection à <i>H. pylori</i> par PCR et analyses histopathologiques.....	76
Figure 20 : Expression de l'ARNm des gènes de cytokines IL-1 β , IL-8 et IL-17A dans l'antra et le fundus de l'estomac.....	77
Figure 21 : Niveaux d'expression de l'ARNm des cytokines en fonction des stades pathologiques.	79
Figure 22 : Niveaux d'expression des gènes des cytokines dans les régions antrale (A) et fundique (B).	80
Figure 23 : Métaplasie gastrique prédite par la triade d'interleukine dans des échantillons gastriques antraux et fundiques infectés par <i>H. pylori</i>	82
Figure 24 : L'expression relative d'IL-1 β selon les SNP -511 C/T et -31 C/T chez les patients infectés par <i>H. pylori</i> dans l'antra et le fundus de l'estomac.	85

Figure 25 : : L'expression relative d'IL-1 β selon les géotypes des SNP -511 C/T et -31 C/T combinés chez les patients infectés par <i>H. pylori</i> dans l'antrum et le fundus de l'estomac.....	87
Figure 26 : L'expression relative d'IL-1 β selon les VNTR dans l'intron 2 du gène de l'IL1Ra chez les patients infectés par <i>H. pylori</i> dans l'antrum et le fundus de l'estomac.....	89
Figure 27 : Cinétique de stimulation des BMDMs de souris par le LPS de <i>H. pylori</i>	91
Figure 28 : Libération d'IL-1 β par les cellules BMDMs suite à la transfection du LPS bactérien de <i>H.pylori</i>	92
Figure 29 : La mort cellulaire induite suite à la transfection des cellules par le LPS De <i>H. pylori</i>	93
Figure 30 : Libération d'IL-1 β par les cellules BMDMs suite à leur transfection par des LPS bactériens différents.....	94
Figure 31 : La mort cellulaire induite suite à la transfection des cellules par les différents LPS bactériens.....	95
Figure 32 : La mort cellulaire en temps réel suite à la transfection des cellules BMDM par les différents LPS bactériens.....	96
Figure 33 : Production d'IL-18 par les cellules HCT116 suite à leur transfection par les LPS bactériens de <i>H. pylori</i> et de <i>E. coli</i>	97
Figure 34 : Les virus à ARN qui se répliquent et qui sont cytopathogènes déclenchent l'activation des inflammasomes.....	107
Figure 35 : les virus Sendai et Sindbis n'induisent pas d'inhibition de la voie de signalisation TLR4.....	108
Figure 36 :	109
Figure 37 : Le VSV et l'EMCV favorisent l'activation de l'inflammasome NLRP3 et la mort cellulaire indépendante de l'inflammasome.....	111
Figure 38 : La nigéricine et l'ATP déclenchent l'activation de l'inflammasome NLRP3.....	112
Figure 39 : L'infection par VSV ou EMCV favorise la rupture de la membrane plasmique, ce qui entraîne la libération des protéines cytosoliques.....	112
Figure 40 : La réplication du VSV et du EMCV favorise la mort cellulaire indépendante de la caspase-3 et l'activation de l'inflammasome NLRP3 par l'efflux de potassium K ⁺	113
Figure 41 : L'inhibition de la nécroptose et/ou de l'apoptose n'empêche pas l'activation de l'inflammasome NLRP3 après une infection par le virus EMCV.....	115
Figure 42 : L'activation des inflammasomes induite par le virus est indépendante de la détection de l'ARN par RIG-I, MDA-5 ou DXH33.....	117
Figure 43 : MAVS n'est pas impliqué dans l'inflammasome canonique NLRP3.....	119

Figure 44 : L'élimination de DHX33, RIPK1 ou Drp1 n'a pas d'impact sur la réplication virale.....	120
Figure 45 : L'extinction du DHX33 inhibe la libération d'IL-1 β après une transfection des cellules THP-1 par le poly(I:C) mais pas après une infection par le VSV ou le EMCV.	120
Figure 46 : L'activation des inflammasomes induite par le virus est indépendante de la machinerie de nécroptose et du Drp1.....	123
Figure 47 : Contrôle de l'extinction de RIPK1 ou Drp1 avec des siRNAs dans les BMDMs.	124
Figure 48 : La réplication virale est nécessaire pour l'activation de l'inflammasome NLRP3.	126

TABLES DES TABLEAUX:

Tableau 1 : Les différents composants des sécrétions gastriques	8
Tableau 2 : Les trois catégories de facteurs de virulence de H. pylori et leurs fonctions	12
Tableau 3 : Les différents PRRs et leurs ligands respectifs	24
Tableau 4 : Fragments issues suites à la digestion enzymatique des deux polymorphismes nucléotidiques IL-1B -31 C/T et IL-1B -511 T/C.	62
Tableau 5 : Volumes utilisés pour chacun des composants de la réaction de la transcription inverse.	65
Tableau 6 : Caractéristiques des patients participant à l'étude.	75
Tableau 7 : Stades pathologiques de la cascade précancéreuse :	77

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

Si l'inflammation est essentielle à la résistance de l'hôte aux infections, elle est préjudiciable lorsqu'elle est produite de manière chronique ou en excès et est liée à diverses maladies, notamment les maladies auto-immunes, le cancer et le choc septique. Cette inflammation est un acteur de la réponse immunitaire innée, qui représente la première ligne de défense contre les agents infectieux. La réponse inflammatoire est caractérisée par l'implication d'une composante cellulaire et d'une composante vasculaire. Cette dernière est sous le contrôle de plusieurs médiateurs notamment les cytokines pro-inflammatoires.

Helicobacter pylori (*H. pylori*) est une bactérie gram négatif qui infecte l'estomac de la moitié de la population mondiale et induit une gastrite inflammatoire. Cette infection présente une incidence élevée dans les pays en voie de développement : elle représente un problème majeur de santé public au Maroc, avec une prévalence de l'ordre de 80%. L'Organisation mondiale de la santé (OMS) a classé cette espèce bactérienne comme le principal agent étiologique des cancers liés aux infections bactériennes (1994). L'infection persistante à *H. pylori* induit une inflammation chronique de la muqueuse gastrique qui, chez les individus susceptibles, peut évoluer vers un cancer gastrique. La sévérité de l'infection et son évolution clinique sont associées aux différents facteurs de l'hôte notamment son statut immunitaire, les facteurs environnementaux, et les facteurs de virulences bactériens. La migration initiale et l'activation des cellules inflammatoires dans la muqueuse gastrique dépendent de la production de diverses cytokines pro-inflammatoires.

La réponse inflammatoire initiale à l'infection à *H. pylori* entraîne la sécrétion d'un large panel de cytokines par les cellules épithéliales et les cellules immunitaires, notamment l'interleukine-1 β (IL-1 β), le facteur de nécrose tumorale- α (TNF- α), l'IL-6, l'IL-8 et l'IL-17. Ces cytokines pro-inflammatoires semblent jouer un rôle clé dans l'initiation et la progression du cancer gastrique : elles ont des effets pléiotropes tels que la régulation de la mort, la prolifération, la différenciation et la migration cellulaire. Parmi ces cytokines, l'IL-1 β est connue pour être l'une des cytokines clés au cours de l'infection à *H. pylori* car les niveaux d'IL-1 β sont étroitement associés à l'inflammation gastrique et à la carcinogénèse. De plus, il a été décrit que les polymorphismes du gène de l'IL-1 β sont associés aux niveaux de production élevés d'IL-1 β lors d'une infection à *H. pylori*, alors que l'IL-1 β joue un rôle crucial dans la carcinogénèse gastrique. L'utilisation de modèles expérimentaux d'infection par *H. pylori* a montré que la production locale d'IL-1 β dans la muqueuse gastrique influence la croissance tumorale et la métastase en potentialisant la prolifération cellulaire ou en induisant l'inflammation et l'angiogénèse. Par ailleurs, l'IL-1 β est un puissant inhibiteur de la sécrétion d'acide gastrique, favorisant l'hypochlorhydrie, la colonisation par *H. pylori* et les gastrites plus graves. Cette cytokine peut activer directement les lymphocytes, les cellules épithéliales et les cellules endothéliales, ce qui entraîne le recrutement de polynucléaires neutrophiles et de cellules inflammatoires au site de l'infection. L'IL-1 β peut également

induire sa propre expression et l'expression de gènes codant pour d'autres cytokines créant ainsi une véritable cascade inflammatoire.

La production d'IL-1 β mature dépend de l'activation de l'inflammasome, en particulier l'inflammasome NLRP3. L'inflammasome est un complexe multiprotéique de l'immunité innée : il reconnaît et répond aux motifs moléculaires caractéristiques des micro-organismes (PAMPs : Pathogen Associated Molecular Patterns) et aux motifs moléculaires associés aux dommages tissulaires (DAMP, Damage Associated Molecular Pattern). L'activation de l'inflammasome nécessite la reconnaissance des signaux de danger par ses récepteurs tels que les récepteurs de type NOD (Nucleotide-binding Oligomerization Domain) et les récepteurs de type AIM2 (Absent In Melanoma 2), le recrutement de la protéine adaptatrice ASC (Apoptosis-associated Speck-like protein containing a CARD) et la caspase-1 effectrice qui va cliver les pro-cytokines inflammatoires IL-1 β et IL-18 en formes matures. L'importance de l'activation de l'inflammasome dans la lutte contre les infections résulte des trois activités de la caspase-1 : (1) la pyroptose, qui permet la suppression des niches de réplication des micro-organismes intracellulaires ; (2) la production d'IL-1 β , qui entraîne le recrutement des cellules inflammatoires au site de l'infection ; et (3) la production d'IL-18, qui induit la cascade de l'IFN- γ et l'activation des mécanismes bactéricides cellulaires. Par ailleurs, l'inflammasome est un inducteur très puissant de réponses inflammatoires dont les effets peuvent être aussi dévastateurs.

Au regard des difficultés rencontrés pour l'isolement et la culture de *H. pylori* et donc l'étude de son implication dans l'activation de l'inflammasome, d'autres microgrammes sont de bons activateurs de l'inflammasome NLRP3 notamment les virus à ARNs. Bien qu'il soit clairement établi que les virus à ARN induisent l'activation de l'inflammasome NLRP3 qui conduit à la production d'IL-1 β , les mécanismes par lesquels ces virus induisent la production d'IL-1 β ne sont pas bien compris et restent à confirmer. Il a été proposé que les virus à ARN induisent l'activation de l'inflammasome NLRP3 via une voie de signalisation impliquant RIP1 (Receptor interacting protein)-RIP3-DRP1 (dynamain-related protein 1) or les conclusions de ces données ont été remises en cause par des études très récentes. Il a également été proposé que RIG-I (Retinoic Acid-Inducible Gene I) pouvait activer la caspase-1 en s'associant directement à ASC mais les conclusions de cette étude n'ont pas été confirmées par d'autres.

Bien que la réponse immunitaire soit considérée comme un déterminant dans la pathogenèse à *H. pylori*, à notre connaissance, aucune étude n'a été réalisée sur la réponse immunitaire chez des patients marocains infectés par *H. pylori*. La détermination des niveaux d'expression des cytokines pro-inflammatoires, l'IL-1 β , l'IL-8 et l'IL-17A dans les biopsies de patients infectés par *H. pylori* présente un intérêt dans le développement d'un outil pronostique pour comprendre la progression de la gastrite vers des stades pathologiques plus sévères et permettrait une meilleure prise en charge des patients infectés par *H. pylori*. Par ailleurs, l'inflammasome NLRP3, responsable de l'activation des processus

inflammatoires, est essentiel pour le maintien de l'homéostasie contre diverses infections pathogènes telles les infections bactérienne et virale. Les recherches présentes et futures devraient permettre le décryptage complet des voies de l'inflammasome et de ses fonctions physiopathologiques et entraîner, *de facto*, la mise au point de thérapies ciblées contre ces infections.

Ainsi, l'objectif général de notre travail est d'une part étudier l'expression et le polymorphisme de gènes de l'immunité notamment l'IL-1 β , l'IL-17 et l'IL-8, impliqués dans la physiopathologie à *H. pylori* chez des patients marocains. D'autre part, explorer l'activation de l'inflammasome NLRP3 par *H. pylori* et déterminer les mécanismes impliqués dans l'activation de ce complexe de l'immunité innée par des virus à ARN ; des activateurs définis de NLRP3.

Plusieurs objectifs spécifiques ont été définis :

- Déterminer la prévalence de l'infection à *H. pylori* dans un échantillon de la population marocaine.
- Etudier l'expression des ARNm des cytokines pro-inflammatoire (IL-1 β , IL-8 et IL-17A) dans les biopsies gastriques des patients marocains ainsi que sa corrélation avec l'infection et/ou son évolution vers les stades de cancer gastrique.
- Déterminer une signature cytokinique de chaque stade pathologique gastrique associée à l'infection par *H. pylori*.
- Etudier l'impact du polymorphisme génétique de ces gènes sur leur expression chez des patients marocains.
- Etudier l'activation de l'inflammasome après stimulation *in vitro* des cellules par le LPS de *H. pylori*.
- Décrypter et comprendre les mécanismes d'activation de l'inflammasome NLRP3 par les virus à ARNs.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I : ETUDE DE LA PHYSIOPATHOLOGIE A *HELICOBACTER PYLORI*

I- Rappel anatomique et physiologique de l'estomac

Le système digestif ou tractus digestif est constitué d'un groupe d'organes (bouche, le pharynx, l'œsophage, l'estomac et les intestins) qui transforment les aliments en nutriments pouvant être utilisés par le corps. Pour atteindre les parties les plus profondes du corps, les nutriments doivent quitter le système digestif et pénétrer dans la circulation sanguine. Pour ce faire, les aliments doivent être décomposés en molécules suffisamment petites pour passer dans le tractus intestinal, où elles sont absorbées par des capillaires. La fonction principale du système digestif est de transférer les nutriments ingérés de l'extérieur vers l'intérieur du corps d'une part et d'éliminer les matières non digérées et les autres déchets d'autres part. Pour accomplir ces tâches (la décomposition de l'aliment en petites molécules, son absorption et l'expulsion de ce qui reste ingéré), un cheminement des aliments à travers un certain nombre de compartiments anatomiquement et histologiquement différents ainsi qu'un nombre de processus physiques et chimiques doivent être réalisés.

I-1) Anatomie de l'estomac

L'estomac est un organe creux qui permet de stocker les aliments, d'amorcer leur digestion et de les délivrer progressivement au duodénum. Il s'agit d'un segment dilaté du tube digestif faisant suite à l'œsophage, il est situé dans l'étage sus-mésocolique de la cavité péritonéale, dans la loge sous-phrénique gauche. Du fait de sa situation anatomique, l'estomac est aisément accessible à l'endoscopie (Gelberg 2014). Morphologiquement, l'estomac est composé de deux faces, antérieure et postérieure, et deux bords, les grandes et petites courbures. Dans un plan sagittal, il est orienté selon un axe oblique en avant et en bas. Vide, il est aplati d'avant en arrière. Il est divisé au niveau de l'incisure angulaire (figure 1) :

- Fundus ou portion verticale (2/3 de l'estomac), comportant la grosse tubérosité et le corps séparés par une ligne horizontale passant par le cardia ;
- Une portion horizontale ou antrum pré-pylorique, séparée du fundus par une ligne tirée de l'incisure angulaire.

La paroi de l'estomac est constituée de l'intérieur à l'extérieur, d'une muqueuse glandulaire rosée plissée, une sous-muqueuse, une musculuse (musculature lisse) oblique interne, circulaire moyenne et longitudinale externe. L'ensemble est recouvert d'une séreuse (péritoine viscéral) (Ellis 2011).

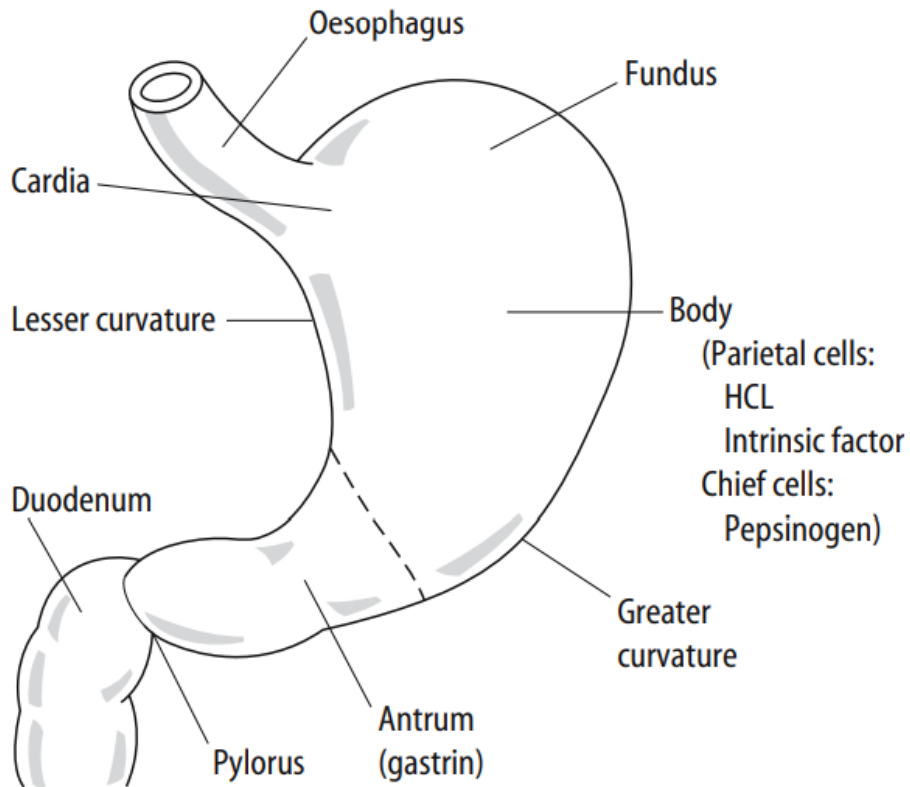


Figure 1 : Estomac (Ian R. Daniels 2005).

I- 2) Physiologie de l'estomac

Les premières étapes de digestion des aliments commencent avant même la prise de la première bouchée du repas. En effet, les facteurs environnementaux comme la perception ou les odeurs des aliments, stimulent le cerveau à anticiper le processus de digestion en stimulant la sécrétion de la salive par les glandes salivaires et la sécrétion de l'acide par l'estomac (Kopic and Geibel 2013). L'estomac sécrète un certain nombre de substances qui facilitent la digestion, notamment l'acide chlorhydrique et les enzymes digestives (Tableau 1). L'estomac agite ces aliments, en les mélangeant avec de l'acide digestif et les enzymes, ce qui permet de les décomposer chimiquement en petites particules (Martinsen, Fossmark et al. 2019).

Tableau 1 : Les différents composants des sécrétions gastriques (Ian R. Daniels 2005) :

Composé	Origine	Fonction
Acide chlorhydrique	Cellules pariétales	Convertit le pepsinogène en pepsine, et tue les agents pathogènes.
Pepsinogène	Cellules principales	Précurseur de la pepsine.
Pepsine	Produit à partir du pepsinogène en présence d'HCl	Protéase : Dégrade les protéines du bol alimentaire
Mucus	Cellules à mucus	Protège la muqueuse.
Facteur intrinsèque	Cellules pariétales	Favorise l'absorption de la vitamine B12.
Sérotonine et histamine	Cellules endocrines	Régulation autocrine.
Gastrine	Cellules G	Stimule la sécrétion d'HCl et de pepsine.

Lors de la stimulation par le cerveau et / ou de l'arrivée d'aliments dans l'estomac, les cellules de l'estomac sécrètent des hormones, de l'acide et des enzymes. Les cellules G, produisent une hormone appelée gastrine. Cette dernière est absorbée dans le sang et acheminée vers d'autres cellules sécrétoires de l'estomac (figure 2), ce qui les stimule à augmenter la production d'acide gastrique et d'enzymes digestives. L'acide gastrique est produit par un type particulier de cellules situées dans la muqueuse du corps de l'estomac, appelée cellule pariétale. Cet acide agit directement pour décomposer les aliments, mais également indirectement en activant le pepsinogène, une enzyme produite par les cellules principales, qui participe à la dégradation des protéines (Fleming 2007).

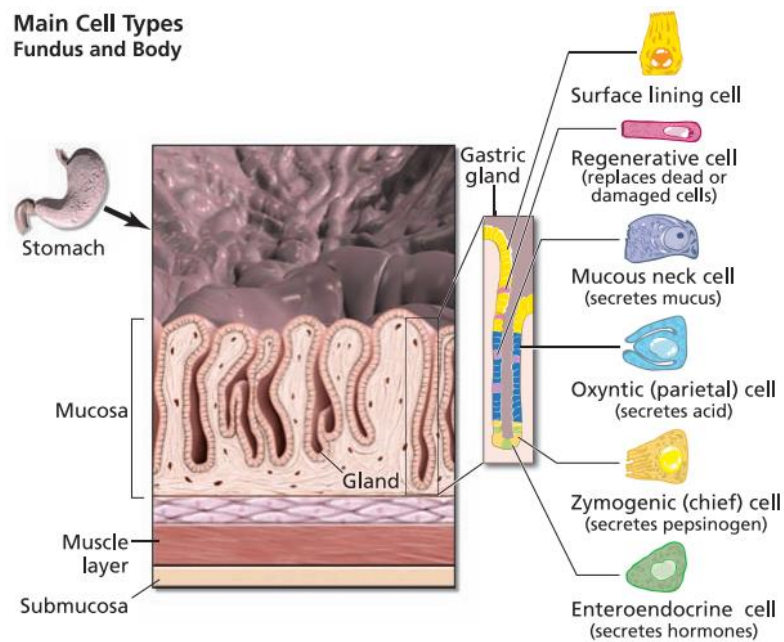


Figure 2 : Les différentes cellules constituant les glandes gastriques (Fleming 2007).

Le pepsinogène sécrété sous forme d'enzyme inactive par les cellules principales, est converti sous sa forme active appelée pepsine par exposition à l'acide gastrique. La sécrétion d'une enzyme inactive est un mécanisme de protection de l'estomac, car sa nature inactive empêche les cellules productrices de pepsinogène d'être digérées par leurs propres sécrétions. La muqueuse de l'estomac est également protégée par une épaisse couche de mucus, produite par les cellules caliciformes de l'estomac. Une fois que les aliments sont suffisamment décomposés par le brassage et le mélange avec l'acide et les enzymes, ils pénètrent dans le duodénum qui régule le flux de chyme de l'estomac dans l'intestin grêle (Ian R. Daniels 2005, Fleming 2007). La sécrétion d'acide chlorhydrique détermine le débit sécrétoire gastrique : cette sécrétion est assurée par les pompes $H^+ / K^+ -ATPase$ des cellules pariétales, qui permettent de concentrer plus d'un million de fois les ions H^+ entre l'intérieur (pH voisin de 7) et l'extérieur (pH entre 0,8 et 1) de la cellule pariétale. La sécrétion concomitante de chlore se fait par l'ouverture de canaux ioniques perméables au chlore et au potassium, qui amorce l'action des pompes H^+ / K^+ (Kopic and Geibel 2013). La sécrétion de l'acide gastrique est modulée en permanence par voie endocrine (gastrine), paracrine (histamine, somatostatine) et nerveuse (acétylcholine) (Figure 3). La gastrine est sécrétée au pôle basal des cellules G des glandes pyloriques de l'antrum dans la circulation sanguine. Elle agit par la liaison aux récepteurs membranaires des cellules entérochromaffines (ECL), en stimulant la sécrétion de l'histamine, et aux récepteurs membranaires des cellules pariétales en stimulant la sécrétion d'acide chlorhydrique. La sécrétion de gastrine est stimulée par la distension gastrique et la présence d'aliments dans la cavité gastrique, et est inhibée par l'augmentation de la concentration en ions H^+ dans la cavité gastrique, via la somatostatine. L'histamine stimule la sécrétion de HCl par action sur les récepteurs histaminiques de type H_2 des cellules pariétales. L'acétylcholine,

libérée par les neurones postganglionnaires du système parasympathique, stimule la sécrétion des cellules pariétales, la sécrétion de gastrine et la sécrétion d’histamine. La somatostatine est le principal agent inhibiteur de la sécrétion d’acide gastrique: sa sécrétion par les cellules D est stimulée par l’augmentation de la concentration en ions H^+ dans la cavité gastrique. La sécrétine, hormone digestive duodénale, participe également dans l’inhibition de la sécrétion pariétale acide. Elle est libérée dans la circulation sanguine en réponse à l’arrivée de nutriments dans le duodénum (Kopic and Geibel 2013).

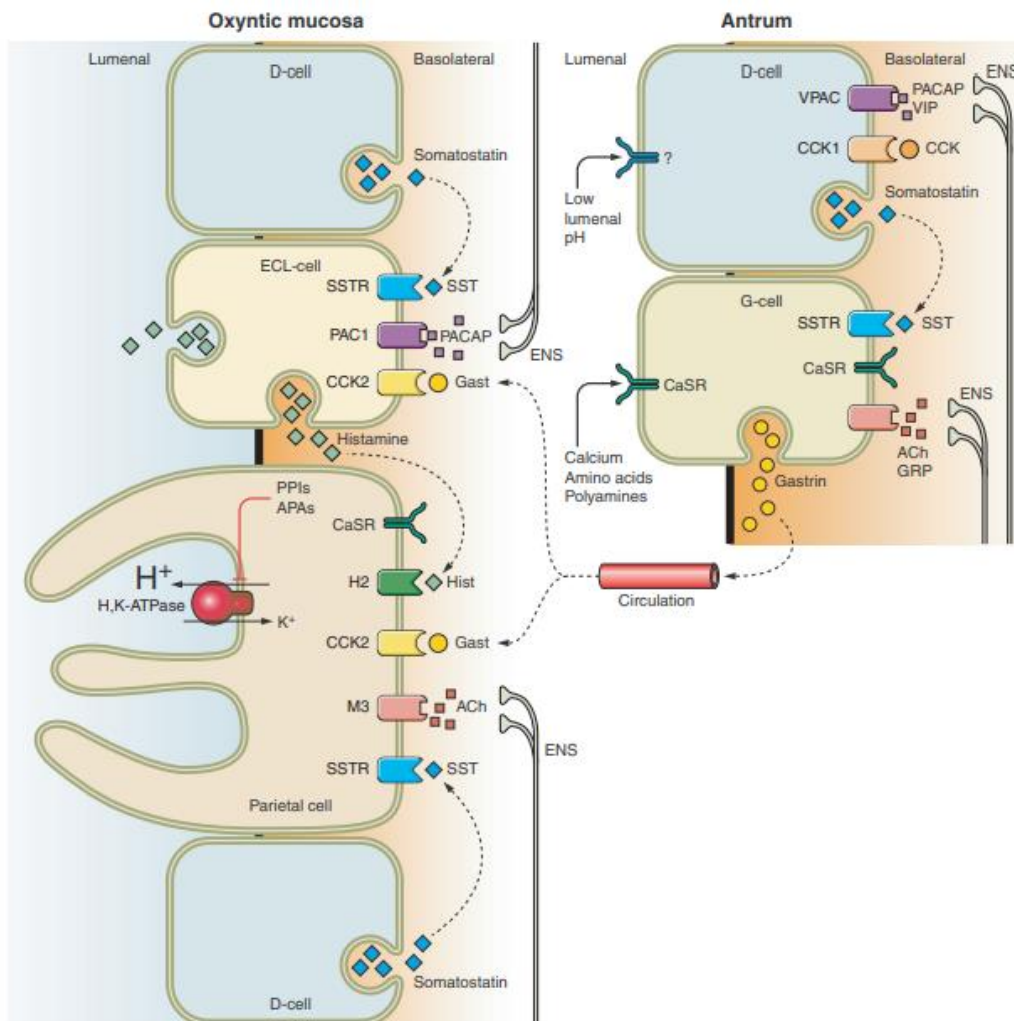


Figure 3 : Modulation de la sécrétion d’acide gastrique (Kopic and Geibel 2013).

En plus de la régulation neuronale directe, la cellule pariétale reçoit des signaux paracrines des cellules ECL et D voisines. La gastrine est produite dans la muqueuse antrale de l’estomac et atteint la muqueuse oxyntique via la circulation (régulation endocrinienne). La libération de l’histamine par voie gastro-intestinale représente l’une des principales voies de stimulation conduisant à la sécrétion d’acide gastrique (axe gastrine-histamine). La sécrétion de gastrine est étroitement liée au pH intragastrique (via la somatostatine), créant ainsi une boucle de rétroaction négative. ACh : acétylcholine, APA :

antagonistes de la pompe d'acide, ENS : système nerveux entérique, Gast : gastrine, Hist : histamine, IPP : inhibiteurs de la pompe à protons, SST : somatostatine.

II) Infection par *Helicobacter pylori* (*H. pylori*)

H. pylori est une bactérie spiralée, gram négative et microaérophile. Elle est assez petite (3,5 µm x 0,5 µm) et est transmise par voie oro-fécale et, éventuellement, par voie orale-orale (Kusters, van Vliet et al. 2006).

II-1) Historique

En 1982, à Perth (Australie), Robin Warren a isolé une bactérie semblable à *Campylobacter* à partir de biopsies gastriques appartenant à des patients atteints de gastrite et l'a baptisé *Campylobacter pylori*. Par la suite, Barry Marshall, en laissant accidentellement des boîtes de Pétri dans l'incubateur pendant cinq jours, a réussi à la cultiver. Enfin pour différencier cette bactérie du genre *Campylobacter*, elle a été nommée « *Helicobacter pylori* » (Marshall and Warren 1984). Barry Marshall et son collègue Arthur Morris ont volontairement ingéré une suspension très concentrée de *H. pylori*. Ils ont tous les deux développés des signes de gastrite aiguë et leurs biopsies témoignent de la présence de la bactérie dans leur estomac. Toutefois, l'infection et la gastrite ont disparu après la prise des antibiotiques, démontrant que *H. pylori* est l'agent étiologique de la gastrite aiguë et que cette pathologie doit être considérée comme une maladie infectieuse. En 2005, Marshall et Warren reçoivent le prix Nobel de physiologie ou de médecine pour cette découverte (Hellstrom 2006).

II- 2- Epidémiologie

H. pylori est présente dans tous les pays : elle est endémique en particulier au Japon, en Corée et en Chine et a une incidence élevée dans les pays en voie de développement. Il est reporté que plus de la moitié de la population mondiale est infectée par *H. pylori* : 70% des personnes infectées sont asymptomatiques ou présentent une « gastrite bénigne » caractérisée par une pangastrite légère avec peu ou pas de lésions des cellules pariétales dans le corpus de l'estomac (Siavoshi, Malekzadeh et al. 2005). 15% des patients infectés ont un phénotype clinique caractérisé par la formation d'ulcères duodénaux et prépyloriques avec une production élevée d'acide, un niveau élevé de gastrine et une gastrite antrale. 5 à 10% des patients infectés présentent une dyspepsie fonctionnelle. Enfin, 1% des patients présentent un phénotype plus grave caractérisé par une atrophie gastrique multifocale, une métaplasie intestinale (transformation néoplasique de cellules épithéliales gastriques en un type cellulaire ressemblant à l'épithélium intestinal), une achlorhydrie et la formation ultérieure d'un adénocarcinome gastrique et 0,1%

des patients développent le lymphome du MALT (Tissu lymphoïde associé à la muqueuse) (Mégraud, Bessède et al. 2015).

Le cancer gastrique est considéré comme la deuxième cause de mortalité par cancer dans le monde après le carcinome du poumon, avec environ 800 000 décès par an comme indiqué en février 2009 par l'Organisation mondiale de la santé (OMS, 2009). En 1994, et après avoir évalué plusieurs études d'association entre le cancer gastrique et *H. pylori*, l'OMS a désigné cette bactérie comme agent carcinogène bactérien de classe I (Eidt and Stolte 1995, Suerbaum and Michetti 2002, Sugiyama and Asaka 2004).

Au Maroc, la prévalence de l'infection d'*H. pylori* est élevée. Selon des études marocaines, cette prévalence est de l'ordre de 80% (Alaoui Boukhris, Benajah et al. 2012, Alaoui Boukhris, Amarti et al. 2013).

II- 3) Interaction bactérie-hôte

Les interactions entre la bactérie et la réponse de l'hôte déterminent les caractéristiques anatomopathologiques et fonctionnelles (sécrétion acide) et le développement de pathologies principalement digestives (ulcères gastroduodénaux et néoplasies gastriques), mais dont l'expression peut être aussi extra-digestive (déficit en fer et en vitamine B12).

a) Facteurs de virulences majeurs

Comme plusieurs microorganismes unicellulaires, *H. pylori* contient plusieurs facteurs de virulence nécessaires à sa survie au niveau de l'estomac et au maintien de l'infection. Ces facteurs de virulence sont groupés en trois catégories et sont reportés associés à la sévérité et au développement des pathologies gastrique allant d'une simple gastrite chronique jusqu'au cancer (Tableau 2) (Knorr, Ricci et al. 2019).

Tableau 2 : Les trois catégories de facteurs de virulence de *H. pylori* et leurs fonctions (Chang, Yeh et al. 2018).

Les trois catégories de facteurs de virulence	Fonctions biologiques ou maladies associées
Colonisation	Fonctions biologiques
Urease	Neutralise l'acide gastrique
Flagelle et système de chimiotaxie	Mouvement bactérien vers la surface épithéliale
Adhésines	Adhérence aux cellules épithéliales gastriques
<ul style="list-style-type: none"> • BabA • SabA • Lewis antigens 	

- OipA

Évasion immunitaire	Fonctions biologiques
LPS et Flagelle	Faible immunogénicité Mimétisme moléculaire
CagA et T4SS	Induire une réponse anti-inflammatoire Supprimer la phagocytose Diminuer les peptides antimicrobiens Induction tolérogène d'une cellule dendritique Réponse des cellules T effectrices en bloc
VacA	Supprimer la phagocytose Induction tolérogène d'une cellule dendritique Réponse des cellules T effectrices en bloc
Gamma-glutamyl transpeptidase	Supprimer la phagocytose Induction tolérogène une cellule dendritique Réponse des cellules T effectrices en bloc
Cholesterol- α -glucosyltransferase	Supprimer la phagocytose
Catalase Superoxide dismutase	Supprimer les ROS et NO
Arginase	Supprimer les ROS et NO Réponse des cellules T effectrices en bloc
Induction de la maladie	Maladies associées
CagA & T4SS	Adénocarcinome gastrique, MALToma & PUD
VacA	Adénocarcinome gastrique & PUD
BabA	Adénocarcinome gastrique & PUD
HtrA	Adénocarcinome gastrique
DupA	L'ulcère duodéal
IceA	PUD
OipA	PUD

b) Colonisation de l'estomac par *H. pylori*

H. pylori arrive à l'estomac par ingestion. Cependant, l'estomac est un environnement hostile, constitué essentiellement d'un bain d'acide contenant des enzymes digestives, ce qui rend difficile la survie d'un organisme sans être digéré vivant. En effet, bien que *H. pylori* habite l'estomac, il préfère nettement les régions les moins acides. Dans les conditions normales, l'antrum de l'estomac est la région la moins concentrée en acide par rapport au corps et il représente souvent le site de colonisation par *H. pylori* chez les personnes infectées (Lee, Dixon et al. 1995). Dans des circonstances normales, le corps de l'estomac (trop acide) est hostile pour le développement (ou multiplication) de la bactérie. De plus, les enfants ayant moins d'acidité gastrique que les adultes, s'infectent facilement suggérant en outre que l'acidité gastrique est une barrière à la croissance de *H. pylori* (Waldum, Kleveland et al. 2016). L'intolérance de *H. pylori* à l'acide l'a conduit à occuper une niche unique dans l'estomac. Plutôt que

de vivre dans la lumière de l'estomac, où les concentrations d'acide sont élevées, *H. pylori* vit profondément dans la couche de mucus (liquide épais et visqueux composé de glycoprotéines qui neutralisent efficacement l'acide présent dans l'environnement au voisinage de la paroi de l'estomac) adjacent à la muqueuse gastrique. Ce tampon protège le tissu gastrique de ses propres sécrétions d'acide et constitue donc un habitat extrêmement commode pour cette bactérie (Hazell, Lee et al. 1986, Tricottet, Bruneval et al. 1986).

La plupart des bactéries sont incapables de coloniser cette couche à cause de la viscosité de la mucine. Cependant, *H. pylori* est équipé d'une touffe composée de quatre à sept structures en forme de fouet (Figure 4) (appelées flagelles ; singulier = flagellum) qui battent en arrière, la propulsant vers l'avant et lui permettant de nager dans des environnements liquides. Ceci, combiné à sa forme en tire-bouchon, permet à *H. pylori* de s'enfouir profondément dans la couche de mucus de l'estomac, échappant ainsi à l'acidité de la lumière gastrique (Gu 2017). *H. pylori* produit également une protéine ; la collagénase qui l'aide à pénétrer dans la couche de mucine. Cette protéine digère ou liquéfie partiellement la mucine, réduisant ainsi sa viscosité et permettant à la bactérie de se déplacer plus librement. *H. pylori* est très efficace pour localiser et coloniser la cible visée (Rahimkhani M 2019). Le modèle de mouvement présenté par *H. pylori* n'est pas aléatoire. Cette bactérie se déplace de manière dirigée vers la mucine, ce qui signifie qu'elle possède une certaine intelligence lui permettant de « détecter » les produits chimiques qui composent la mucine et de suivre le cheminement chimique menant à la couche de mucus. Cependant, cette bactérie doit survivre à l'acidité de l'estomac au moins temporairement avant d'atteindre la couche de mucine. Les systèmes directs de chimiotaxie attirent *H. pylori* vers certains acides aminés, le bicarbonate et le cholestérol alors que le pH acide sert de répulsif. Ce système maintient la bactérie dans un milieu favorable près de l'épithélium de surface : *H. pylori* glycosyle le cholestérol de l'hôte et l'insère dans sa membrane externe. La fonction du cholestérol glycosylé n'est pas entièrement connue, mais lorsque *H. pylori* manque de cholestérol, elle devient plus sensible au stress environnemental. De ce fait en modifiant la composition de son espace périplasmique, elle forme une bulle autour d'elle créant une zone tampon entre le monde extérieur et ses organites (McGee, George et al. 2011, Wang, Cheng et al. 2012).

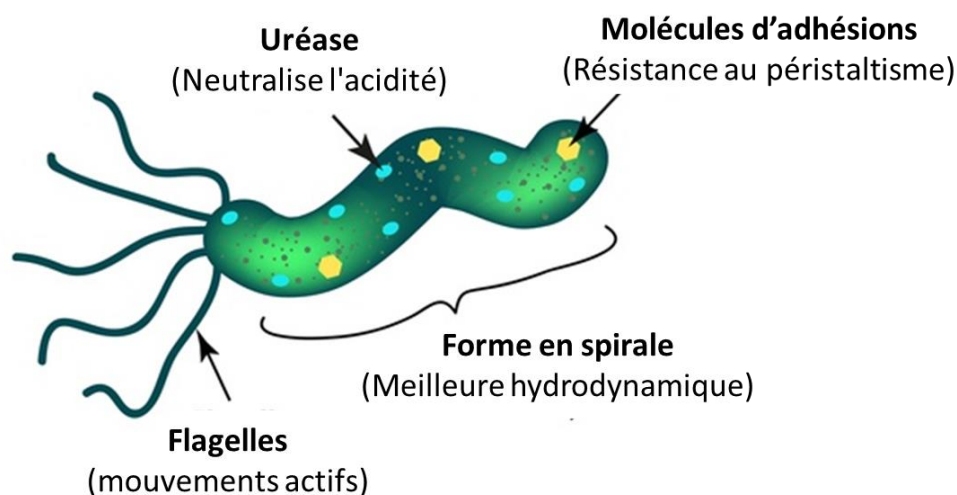


Figure 4 : Structure de *H. pylori*. (<http://www.medexpert.sg/en/medical-specialities/gastroenterology/helicobacter-pylori-infection/>)

H. pylori se protège contre l'agressivité de l'acide en produisant une enzyme appelée « uréase » qui convertit l'urée, produit sécrété par les cellules de l'estomac, en ammoniac et en dioxyde de carbone. L'ammoniac est une substance faiblement basique qui neutralise l'acidité de l'estomac autour de la bactérie (Dunn and Phadnis 1998, Waskito, Salama et al. 2018). En outre, *H. pylori* produit une autre enzyme, l'anhydrase alpha-carbonique (α -CA), qui contribue également à ce processus de désacidification. Dans ce sens, l' α -CA agit avec l'uréase en convertissant le dioxyde de carbone produit par l'uréase en bicarbonate (un composé similaire au bicarbonate de soude), faiblement basique et qui neutralise l'acidité de l'estomac. L'importance de ces enzymes a été démontrée par des études menées sur des souches de *H. pylori* dépourvues d'uréase ou d' α -CA : Les souches uréase négatives ont été particulièrement inefficaces pour coloniser l'estomac et incapables de provoquer des ulcères chez les animaux de laboratoire. Des effets similaires ont été obtenus par l'administration de composés inhibant l'enzyme uréase. De même, des études menées avec des souches dépourvues d' α -CA ont démontré que les mutants étaient beaucoup moins tolérants aux acides que les souches contenant l' α -CA (Bury-Moné, Mendz et al. 2008).

Le mucus est en constant renouvellement à l'intérieur de l'estomac, et les bactéries doivent répéter cette étape de colonisation et creuser dans le mucus nouvellement formé chaque fois que la couche de mucus est libérée de la paroi de l'estomac. Une fois que l'infection est établie, *H. pylori* a besoin uniquement de certaines de ces mesures d'adaptation à l'acide, ce qui suggère que le maintien de l'infection par *H. pylori* est plus compliqué. Après la colonisation, par exemple, le besoin en uréase diminue, même si la bactérie continue à en produire en grande quantité. L'expression de l'uréase n'est pas liée au maintien de l'infection ou aux pathologies associées : Les produits chimiques qui inhibent l'activité de l'uréase ne guérissent pas l'infection à *H. pylori*, et ne préviennent pas la formation d'ulcères.

Ceci suggère que l'enzyme uréase a pour fonction principale de protéger la bactérie jusqu'à la colonisation de la couche de mucus de l'estomac (Fleming 2007). On ignore si ce mécanisme adaptatif est activé ou désactivé lors de la libération de la couche de mucus.

Le détournement de l'acide n'est qu'un moyen par lequel *H. pylori* conserve son ancrage dans l'estomac. Sans aucun autre moyen de se fixer au tissu, l'organisme serait emporté dans le duodénum chaque fois que la couche de mucus serait perdue (une situation qui se produit chez les individus infectés, étant donné que le duodénum est un site majeur de formation d'ulcère par *H. pylori*). Pour prévenir son détachement, *H. pylori* produit d'autres types de protéines d'adhésion appelées adhésines. Ces protéines adhèrent à des lipides et glucides spécifiques normalement présents à la surface des cellules tapissant l'estomac, empêchant ainsi de déloger la bactérie par des actions mécaniques de l'estomac (brassage des aliments ou perte de la couche de mucus). Un grand nombre de gènes d'adhésines ont été identifiés chez *H. pylori* : des souches expérimentales de *H. pylori* dans lesquelles ces gènes ont été inactivés ont démontré que ces gènes sont essentiels à la survie de la bactérie. Les protéines d'adhésions sont exprimées sur la membrane externe de la bactérie et servent d'ancrage pour fixer l'organisme à la surface de l'estomac. Leur interaction avec les molécules des cellules de l'estomac ressemble au velcro quand les deux molécules (une à la surface de la bactérie et une sur la cellule muqueuse de l'estomac) se collent étroitement en s'adhérant physiquement l'une à l'autre. Ces interactions sont très spécifiques ; toute adhésine exprimée sur la surface de *H. pylori* n'a d'affinité que pour une molécule spécifique à la surface externe de la cellule de l'estomac (Evans, Evans et al. 1988, Doig, Austin et al. 1992, Piotrowski, Majka et al. 1994, Huesca, Borgia et al. 1996, Namavar, Sparrius et al. 1998, Odenbreit, Till et al. 1999, Peck, Ortkamp et al. 1999, Edwards, Monteiro et al. 2000). Bien que les adhésines puissent être bénéfiques pour *H. pylori*, certaines de ces adhésines endommagent la muqueuse de l'estomac. BabA, une adhésine, est particulièrement remarquable en raison de son rôle dans la formation des ulcères. BabA reconnaît une protéine modifiée par le polysaccharide présent à la surface des cellules de la muqueuse, appelée antigène de Lewis b. Cet antigène est présent dans une grande variété de cellules, en particulier les cellules caliciformes et les cellules sanguines. L'attachement de *H. pylori* à l'antigène Lewis b augmente la réponse immunitaire, ce qui entraîne la formation d'anticorps dirigés contre les cellules pariétales de l'estomac (réponse auto-immune) ; cela endommage les tissus de l'estomac et réduit les cellules pariétales. Bien que toutes les souches de *H. pylori* n'expriment pas la protéine BabA, cette protéine BabA est associée à la sévérité des pathologies dues à *H. pylori* (Borén, Falk et al. 1993, Falk, Roth et al. 1993, Falk, Bry et al. 1995, Ilver, Arnqvist et al. 1998).

Une fois que *H. pylori* est attachée aux cellules épithéliales, l'organisme fabrique d'autres produits ayant des conséquences plus graves sur le tissu. Certaines, mais pas toutes les souches de *H. pylori*, expriment une protéine appelée CagA (gène A associé à la cytotoxine) codé par l'îlot de pathogénicité cag (cag PAI). Il est suggéré que le cag PAI a été inséré dans le génome de *H. pylori* par

transfert horizontal d'une autre espèce après la spéciation, tôt au cours de l'évolution de l'espèce (Gressmann, Linz et al. 2005, Olbermann, Josenhans et al. 2010). Les souches qui expriment cette protéine sont fortement associées au développement de maladies telles que les ulcères et le cancer de l'estomac. La bactérie injecte directement cette protéine dans les cellules épithéliales à l'aide d'une structure bactérienne ressemblant à une seringue appelée système de sécrétion de type 4 qui lui aussi est codé par *cag PAI* (Hatakeyama 2017). Les travaux de Wiedemann en 2009 ont permis de mieux préciser le rôle du T4SS dans l'évolution de la maladie gastro-duodénale en utilisant un modèle animal (gerbille) sur une longue période (2-64 semaines) (Wiedemann, Loell et al. 2009). Le T4SS est essentiel pour l'induction d'une inflammation précoce et sévère du corps de l'estomac, caractérisée par une augmentation de l'expression de cytokines pro-inflammatoires ainsi que des changements histologiques avec la survenue d'une atrophie gastrique et d'une métaplasie intestinale (de Brito, da Silva et al. 2019). En occident, de nombreuses études ont montré une corrélation entre une infection par des bactéries possédant un *cag PAI* fonctionnel et la survenue d'ulcères peptiques ou de cancer gastrique (Huang, Zheng et al. 2003). Après sa translocation, CagA peut avoir un effet sur les cellules sous sa forme phosphorylée et non phosphorylée. CagA est phosphorylée sur des résidus tyrosines présents au niveau de motifs Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala (EPIYA) à l'extrémité C-terminale de la protéine, par des kinases cellulaires de la famille Src et Abl (Higashi, Tsutsumi et al. 2002). Selon la séquence peptidique entourant le motif EPIYA, quatre types de segments ont été définis, EPIYA-A, EPIYA-B, EPIYA-C et EPIYA-D. Les segments EPIYA-A et EPIYA-B sont toujours présents quel que soit l'origine géographique des patients chez qui les souches ont été isolées. Le segment EPIYA-C est caractéristique des souches d'Afrique, d'Amérique et d'Europe « Western CagA » tandis que le motif EPIYA-D est présent quasiment uniquement chez les souches isolées de patients vivant dans l'est de l'Asie « East Asian CagA » (Hatakeyama 2009).

CagA sous sa forme phosphorylée (CagA-P) interagit avec des facteurs de l'hôte contenant un domaine SH2 (Src homology 2) comme la tyrosine phosphatase SHP-2, la tyrosine kinase Csk et la protéine adaptatrice Crk (Higashi, Tsutsumi et al. 2002, Tsutsumi, Higashi et al. 2003, Suzuki, Nishizawa et al. 2005). La combinaison de ces trois facteurs est responsable de remaniement du cytosquelette et d'une augmentation de la mobilité cellulaire. Sous forme non phosphorylée, CagA peut aussi induire des réponses cellulaires de l'hôte telles qu'une perturbation des jonctions serrées et d'adhésion, une perte de polarité cellulaire, une activité mitogène et pro-inflammatoire (Backert and Selbach 2008). CagA s'associe avec ZO (zonula occludens-1) et JAM (junctional adhesion molecule) et altère l'organisation et la fonction des jonctions serrées (Amieva, Vogelmann et al. 2003). De plus, CagA inhibe l'activité kinase de la partitioning-defective 1 (PAR1), membre de la famille des « microtubules affinity regulating kinases » (MARK), entraînant une perturbation des jonctions serrées et de la polarité cellulaire des cellules épithéliales (Saadat, Higashi et al. 2007, Umeda, Murata-Kamiya et al. 2009). La

formation du complexe CagA/PAR1 augmente la stabilité de la protéine CagA dans la cellule épithéliale (Ishikawa, Ohta et al. 2009). CagA interagit également avec la protéine d'adhésion intercellulaire E-cadhérine, détériorant le complexe E-cadhérine–béta-caténine et activant de façon aberrante la béta-caténine (Murata-Kamiya, Kurashima et al. 2007, Kurashima, Murata-Kamiya et al. 2008). La conséquence de l'ensemble de ces processus est une déstabilisation de l'épithélium gastrique qui contribue potentiellement au processus carcinogène de *H. pylori* *in vivo*. Récemment, Lamb *et al.* ont démontré que CagA s'associait physiquement à la protéine kinase TAK1 (Transforming growth factor β Activated Kinase 1), entraînant l'activation de TAK1 par ubiquitination en Lys63 médiée par la protéine TRAF6 (Tumour necrosis factor Receptor-Associated Factor 6) conduisant à l'activation du facteur de transcription nucléaire kappa B (NF- κ B), qui active à son tour la transcription des gènes codant pour les cytokines inflammatoires (Lamb, Yang et al. 2009). De façon intéressante, l'inoculation intragastrique de CAPE (caffeic acid phenetyl ester), un inhibiteur du NF- κ B, à des gerbilles infectées par *H. pylori*, diminuait significativement l'infiltration inflammatoire de la muqueuse gastrique et le relargage de médiateurs de l'inflammation (Toyoda, Tsukamoto et al. 2009). En détruisant les jonctions serrées, *H. pylori* obtient les nutriments tels que les protéines et les polysaccharides dont elle a besoin pour sa croissance et sa survie. Cependant, cela détruit l'architecture du tissu et endommage la couche protectrice du tissu gastrique.

H. pylori possède une autre protéine VacA associée à la formation d'ulcères. Cette protéine a un mécanisme par lequel *H. pylori* peut accéder à des nutriments qui seraient autrement indisponibles (Chmiela and Kupcinskis 2019). Le VacA est libéré à l'extérieur de la bactérie puis se lie à la membrane externe d'une cellule de l'estomac : il forme soit des pores à travers lesquels les nutriments peuvent fuir, soit de grandes structures en forme de vacuoles à l'intérieur de la cellule. Ces vacuoles peuvent également contenir un certain nombre de substances utiles pour la bactérie, telles que des protéines, des polysaccharides, des ions et des sels. VacA peut également former des vacuoles à l'intérieur de la mitochondrie : VacA s'insère dans la membrane mitochondriale, ce qui provoque le déversement du contenu de la mitochondrie et la destruction de la cellule (McClain, Beckett et al. 2017). Cette destruction cellulaire alerte le système immunitaire et des messagers chimiques, appelés cytokines, produits par des cellules infectées et entraîne une infiltration de cellules immunitaires dans le tissu provoquant une inflammation appelée gastrite (Blaser, Backert et al. 2019).

III) Pathologies gastriques associées à l'infection par *H. pylori*

L'infection chronique à *H. pylori* est fortement associée à plusieurs pathologies gastriques notamment la gastrite active chronique, l'ulcère peptique, l'adénocarcinome gastrique et le lymphome du tissu lymphoïde associé aux muqueuses (lymphome MALT). Un modèle de cascade précancéreuse a

été proposé en 1992 par Correa et Blanca décrivant que la gastrite superficielle représente le point de départ du processus cancéreux (Correa 1992). Cette gastrite est suivie d'une atrophie multifocale, une métaplasie intestinale de type incomplet, une dysplasie de bas grade, une dysplasie de haut grade jusqu'à l'apparition de l'adénocarcinome invasif. L'adénocarcinome gastrique est le plus important en terme de mortalité. Des méta-analyses suggèrent que le risque relatif à développer un cancer gastrique est de deux à trois fois plus élevé chez les personnes infectées par *H. pylori* que chez des personnes non infectées (Danesh 1999, 2001). La compréhension de ces différentes pathologies est cruciale et permettra aux scientifiques chercheurs d'élaborer des nouvelles stratégies préventives pour le contrôle de cette infection.

III- 1) Gastrites aiguë et chronique

La gastrite est la première conséquence de l'infection par *H. pylori*. Elle est caractérisée par une inflammation de la muqueuse gastrique. Chez les individus indemnes, la muqueuse gastrique contient un faible amont de cellules inflammatoires mononuclées. La gastrite aiguë est caractérisée par une infiltration massive de polynucléaires neutrophiles (aussi dite activité de la gastrite) et des leucocytes mononuclés dans la lamina propria (témoignant de la chronicité de la gastrite). L'infiltration accrue de ces cellules inflammatoires provoque des micro-abcès (collections de neutrophiles dans la lumière glandulaire ou fovéolaire) (Bacha, Walha et al. 2018). L'inflammation ainsi que la persistance de la bactérie sont des facteurs importants dans le passage de la gastrite aiguë vers une gastrite chronique (Kusters, van Vliet et al. 2006). A ce stade, une forte corrélation existe entre le niveau de sécrétion d'acide, la distribution de la gastrite et l'évolution vers l'ulcère ou le cancer (Rugge and Genta 2005). La gastrite touchant l'ensemble de l'estomac (pangastrite) est généralement associée à une hypochlorhydrie et peut évoluer vers une atrophie puis un cancer gastrique. La gastrite touchant l'antrum de l'estomac est généralement associée à une forte sécrétion d'acide (hyperchlorhydrie) qui mène par la suite à l'apparition d'ulcères gastriques ou duodénaux. Une autre caractéristique de la gastrite chronique associée à *H. pylori* est la présence d'agrégats lymphoïdes à centres germinaux (Atherton 2006).

III- 2) Ulcères peptiques

Les ulcères gastriques et duodénaux se caractérisent par des lésions d'au moins 0.5 cm de diamètre pénétrant jusqu'à la couche musculaire.

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

L'ulcère duodéal est localisé au niveau du bulbe duodéal qui est le plus exposé à l'acidité

gastrique. La gastrite à prédominance antrale associée à une hyperchlorhydrie entraîne le développement de l'ulcère duodénal (Atherton 2006). Les patients atteints d'ulcère duodénal présentent des scores d'inflammation très élevés, des niveaux élevés de gastrine et d'acidité (el-Omar, Penman et al. 1995, el-Omar, Penman et al. 1995).

L'ulcération induite par *H. pylori* survient dans le contexte d'une gastrite superficielle chronique préexistante. En dehors de la réponse immune contre la colonisation de la muqueuse gastrique par *H. pylori*, la bactérie en elle-même provoque plusieurs dégâts au niveau de l'estomac par ces deux facteurs de virulences ; CagA et VacA. Ces facteurs de virulence, induisent une destruction de l'architecture du tissu et endommage la couche protectrice de l'estomac (Nejati, Karkhah et al. 2018). Les cytokines (chimiokine) inflammatoires ainsi produites accentuent ce dommage sans pour autant éliminer la bactérie. Ces cycles de colonisation et d'inflammation répétée entraînent la perte des cellules de la muqueuse qui devient atrophique et caractérisée par une réduction des cellules caliciformes sécrétrice du mucus gastrique. Il en résulte une zone affaiblie dans la couche épithéliale protectrice de la muqueuse qui permet à l'acide gastrique et aux enzymes digestives de pénétrer dans la muqueuse située sous les cellules épithéliales. L'acide et les enzymes irritent et dégradent la membrane de soutien sous la couche épithéliale des muqueuses et provoquent la formation d'une plaie ouverte appelé ; un ulcère (Fleming 2007). Les personnes colonisées avec *H. pylori* présentent un risque 6 à 8 fois plus élevé de contracter les ulcères gastroduodénaux par rapport aux personnes non infectés (Li, Zou et al. 2010). La réduction de l'incidence de l'infection à *H. pylori* est associée avec une réduction des ulcères gastroduodénaux (Groenen, Kuipers et al. 2009).

III-3) Atrophie gastrique (Perte de glandes gastriques)

Les foyers d'atrophie sont présents dans la muqueuse de l'antré, du corps gastrique et leur extension progresse avec le temps. Habituellement, il résulte d'un processus inflammatoire prolongé et a tendance à être multifocal, donnant naissance à ce que l'on appelle la gastrite atrophique multifocale (Correa and Piazuelo 2012). Une muqueuse atrophique est caractérisée par la perte de ses glandes et donc la perte des cellules spécialisées. Cette perte de glandes peut être suivie d'une fibrose de la lamina propria et a des complications importantes sur la fonction gastrique ; l'hypochlorhydrie étant l'une des plus reconnues. Dans cet état, la perte de production d'acide et l'augmentation du pH gastrique ont des effets sur l'absorption des nutriments (comme le fer) et sur le microbiome gastrique (Parsons, Ijaz et al. 2017) . La perte de tissu glandulaire normal est la première étape reconnaissable spécifique de la cascade précancéreuse (Correa and Piazuelo 2012).

III-4) Métaplasie Intestinale

La métaplasie intestinale est considérée comme le stade avancé de l'atrophie. Elle est caractérisée par une transformation phénotypique des cellules de la muqueuse gastrique en cellules intestinales (Correa and Piazzuelo 2012). Cette transformation survient après un long processus d'inflammation chronique de la muqueuse gastrique. Les foyers de métaplasie intestinale s'amplifient au cours du temps et augmentent considérablement le risque de cancer gastrique en fonction de la sévérité de l'atrophie (El-Omar, Oien et al. 1997). La métaplasie est histologiquement classée en deux types : métaplasie intestinale complète et métaplasie intestinale incomplète.

La métaplasie intestinale complète ressemble à l'épithélium de l'intestin grêle avec des cellules caliciformes, des cellules de Paneth, des entérocytes éosinophiles et une bordure en brosse (Jass and Filipe 1979). Elle est associée à la perte de marqueurs de la mucine gastrique (MUC1, MUC5AC, MUC6) et à l'expression de la mucine sialique intestinale, MUC2 (Reis, David et al. 1999). Une métaplasie intestinale incomplète ressemble plus étroitement à l'épithélium du gros intestin avec des cellules cylindriques ressemblant à des cellules fovéolaires gastriques et elle est dépourvue de cellules absorbantes. Elle maintient l'expression des marqueurs de la mucine gastrique (MUC1, MUC5AC, MUC6) généralement associée à un gain de MUC2 (Reis, David et al. 1999).

Dans le contexte d'une infection à *H. pylori* à long terme, la métaplasie intestinale se développe probablement en tant que lésion adaptative et protectrice (Giroux and Rustgi 2017). De nombreux travaux ont été menés pour déterminer comment une infection par *H. pylori* conduisait à une métaplasie intestinale avec un certain nombre de gènes impliqués, notamment SOX2 et CDX2 (Mutoh, Sakurai et al. 2004, Mutoh, Sakurai et al. 2004). SOX2 est un facteur de transcription impliqué dans la différenciation gastrique qui régule négativement la différenciation intestinale, tandis que CDX2 est un facteur clé de transcription intestinale impliqué dans l'établissement et le maintien de la métaplasie intestinale. SOX2 et CDX2 semblent être inversement régulés par *H. pylori* (Camilo, Barros et al. 2012). Il a été démontré que la métaplasie intestinale complète est principalement négative pour SOX2 et incomplète principalement positive pour SOX2 (Camilo, Garrido et al. 2015). De plus, l'expression de CDX2 est également induite en partie par un mécanisme dépendant de NF- κ B suite à l'infection par *H. pylori* (Asano, Imatani et al. 2016).

III-5) Cancer gastrique et lymphome du MALT

Près d'un million de cas de cancer gastrique sont diagnostiqués chaque année, faisant de cette maladie le quatrième cancer le plus répandu dans le monde. Il s'agit de la deuxième cause de mortalité liée au cancer et environ 700 000 personnes succombent chaque année à un adénocarcinome gastrique (Parkin, Bray et al. 2005). Dans certaines régions du monde, le cancer gastrique est la tumeur maligne

la plus répandue, et au Japon, l'incidence du cancer gastrique est près de 10 fois supérieure à celle observée aux États-Unis. Le diagnostic de cancer gastrique est retardé car les stades précoces sont généralement asymptomatiques ou associés à des symptômes non spécifiques tels que la dyspepsie. Généralement les patients sont diagnostiqués après que le cancer a envahi la muqueuse.

Histologiquement, deux types de carcinomes gastriques ont été identifiés : le cancer gastrique de type diffus qui consiste en une infiltration individuelle de cellules néoplasiques ne formant pas de structures glandulaires et l'adénocarcinome de type intestinal qui progresse par une série d'étapes histologiques bien définies et qui a été décrit pour la première fois en 1975 par Correa (Correa, Haenszel et al. 1975).

L'adénocarcinome de type intestinal est provoqué par la transition d'une muqueuse normale à une gastrite chronique suivie par une cascade précancéreuse. Cette forme de cancer gastrique touche les hommes deux fois plus souvent que les femmes et survient chez les hommes de 50,4 ans en moyenne et de 47,7 ans en moyenne chez les femmes (Hatakeyama 2004, Correa and Houghton 2007). L'infection du fundus par *H. pylori* prédispose les personnes au cancer gastrique, ce qui serait en partie dû à une diminution de la sécrétion d'acide. En revanche, l'infection de l'antrum gastrique est associée d'une part à l'augmentation de la production d'acide et prédispose les individus à l'ulcère duodénal et de l'autre part à une diminution du risque de cancer gastrique (Atherton 2006).

Outre l'adénocarcinome gastrique, il existe d'autres cancers associés à l'infection à *H. pylori*. Le plus important d'entre eux est le lymphome du MALT, qui est une tumeur du tissu lymphoïde associé aux muqueuses. Il consiste essentiellement en une accumulation de cellules immunitaires réparties dans l'épithélium de l'estomac lors d'infections à *H. pylori* à long terme (Salar 2019). Il semble que la formation du lymphome du MALT associé à *H. pylori* se produit de manière similaire à celle de l'adénocarcinome gastrique. Tout comme la formation d'adénocarcinomes, la présence de la bactérie entraîne une inflammation à long terme du tissu. Cette inflammation entraîne des modifications des lymphocytes résidents (cellules T ou B principalement) et modifie l'équilibre entre la division cellulaire et l'apoptose, de sorte que les lymphocytes s'accumulent fortement et anormalement à certains endroits. Ces concentrations élevées de lymphocytes déplacent les cellules normales, provoquant des zones de tissu anormal à fonction réduite. Une augmentation de l'expression d'oncogènes, qui favorisent la croissance cellulaire et une apoptose réduite ont été reporté dans des échantillons prélevés chez des patients atteints de cette affection (Sagaert, Van Cutsem et al. 2010).

IV) Réponse immunitaire contre *H. pylori*

L'infection à *H. pylori* est particulière à de nombreux égards. La bactérie entraîne constamment une inflammation de la muqueuse gastrique et n'est généralement pas éliminée par les mécanismes de

défense immunitaire. Cette réponse immunitaire est une épée à double tranchant: elle combat l'infection et elle entraîne des lésions variables qui évoluent de la simple gastrite chronique au cancer ou au lymphome gastrique comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent. Cette évolution de l'infection est dépendante de plusieurs paramètres comme la souche bactérienne et /ou la réponse immunitaire de l'hôte. Plusieurs études ont montré la capacité de cette bactérie à envahir les cellules épithéliales *in vitro* et *in vivo* chez l'homme, la souris et le singe (Amieva, Salama et al. 2002, Semino-Mora, Doi et al. 2003, Oh, Karam et al. 2005, Chu, Wang et al. 2010). Elle peut aussi entrer en contact direct avec les cellules immunitaires de la lamina propria dans la majorité des cas de gastrite et de cancer gastrique (Moese, Selbach et al. 2004).

L'infection par *H. pylori* induit chez l'hôte, l'activation des réponses immunitaires innée et acquise. L'immunité innée est la première ligne de défense vis-à-vis des agents infectieux et pathogènes. L'immunité adaptative, grâce aux cellules spécifiques, est dotée de mémoire et vient compléter et activer l'immunité innée. Plusieurs médiateurs solubles comme les chimiokines, et les cytokines sont impliqués dans la modulation de ces réponses innée et adaptatives.

IV- 1- Immunité innée

a) Généralités

L'immunité innée est une réponse collective de plusieurs acteurs immunitaires, réagissant rapidement lors d'une infection microbienne dans le but de l'éliminer. Elle utilise une composante cellulaire et une humorale. L'immunité innée est induite par un signal de danger émis suite à l'interaction spécifique entre des récepteurs appelés PRRs (*Pattern Recognition Receptors*) et des molécules du non-soi appelées PAMPs (*Pathogen Associated Molecular Patterns*) présent au niveau des microorganismes qu'ils soient pathogènes ou non pathogènes (Kubelkova and Macela 2019).

Les PRRs sont des récepteurs très conservés entre les espèces, dont les gènes ne sont pas polymorphes. Ces récepteurs sont exprimés au niveau de différentes cellules : les macrophages, les cellules dendritiques (CD), les cellules NK (*Natural Killer*), les polynucléaires, les mastocytes et les cellules résidentes (fibroblastes, cellules musculaires cellules épithéliales...). Les mammifères possèdent plusieurs classes distinctes de PRR, notamment les récepteurs de type Toll (TLRs), les récepteurs de type RIG-I (RLRs), les récepteurs de type Nod (NLRs), les récepteurs de type AIM2 (ALRs), les récepteurs de type C-lectine (CLRs) et des capteurs d'ADN intracellulaires tels que cGAS (Brubaker, Bonham et al. 2015) (Tableau 3).

Parmi les PRRs, les TLRs et les NLRs sont les récepteurs de l'immunité innée les plus impliqués

dans la reconnaissance d'*H. pylori* et sont de ce fait les plus étudiés.

Les récepteurs de l'immunité innée TLR (Toll-like receptors) sont parmi les acteurs potentiels qui conduisent à la production de cytokines pro-inflammatoires suite à leurs interactions avec *H. pylori*. Le contact bactérien avec les monocytes et d'autres cellules présentatrices d'antigènes (CPA) entraîne la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α , l'IL-1 β , l'IL-8, l'IL-18 et l'IL-6. L'infection par *H. pylori* a été associée à une augmentation des taux de ces cytokines, qui agissent à leur tour comme agents chimioattractants locaux, induisant une infiltration granulocytaire au site de l'infection (Crabtree 1996).

Les NLR les plus étudiés au cours de l'infection à *H. pylori* sont NOD1 et NOD2, qui sont exprimés dans les cellules épithéliales et les cellules présentatrices d'antigènes, et sont connus pour reconnaître spécifiquement les peptides dérivés de peptidoglycanes (acide γ -D-glutamyl-mésodiaminopimélique et muramyl dipeptide, respectivement) (Philpott and Girardin 2010).

Tableau 3 : Les différents PRRs et leurs ligands respectifs (Kawashima, Tanigawa et al. 2011).

PRR	Localisation	Ligands respectifs
TLR		
TLR1/TLR2	Membrane cytoplasmique	Peptidoglycane, triacyl lipoprotéine, acide lipotéichoïque (Bactéries à Gram positif)
TLR3	Endolysosome	dsRNA (Réovirus, Poly IC)
TLR4	Membrane cytoplasmique	LPS (Bactéries Gram-négatives)
TLR5	Membrane cytoplasmique	Flagelline (Bactéries flagellées)
TLR6/TLR2	Membrane cytoplasmique	Diacyl lipoprotéine (Mycobactéries)
TLR7 (Souris), TLR8 (Humain)	Membrane cytoplasmique	ARNs (Virus de la grippe, virus de la stomatite vésiculaire), composants antiviraux (imiquimod)
TLR9	Endolysosome	ADN bactérien (ADN CpG non méthylé), Hémozoïne (<i>Plasmodium falciparum</i>)
TLR10	Endolysosome	
TLR11	Endolysosome Membrane cytoplasmique	Molécule de type profiline (<i>Toxoplasma gondii</i> , <i>Plasmodium falciparum</i>)
NLR		
NOD1	Cytoplasme	Muramyl tripeptide (Bactéries à Gram négatif)
NOD2	Cytoplasme	Muramyl dipeptide (Bactéries à Gram positif)
RLR		
RIG-I	Cytoplasme	Court dsRNA, 5 triphosphate dsRNA (Paramyxovirus)
MDA5	Cytoplasme	Long dsRNA (Picornavirus, réovirus, PolyIC)
LGP2	Cytoplasme	
CLR		
Dectin-1	Membrane cytoplasmique	Champignons
Dectin-2	Membrane cytoplasmique	Champignons

Récepteurs d'ADN		
AIM2	Cytoplasme	ADNdb (Virus de la vaccine, ADN du thymus de veau, PolydAdT)
Histone H2B	Cytoplasme	ADNdb (Adénovirus, ADN génomique, PolydAdT)
IFI16	Cytoplasme	ADNdb (Virus de la vaccine, PolydAdT)
Ku70	Cytoplasme	ADNsb, ADNdb (ADN plasmidique)
LFRIP1	Cytoplasme	ADNdb (Virus de la stomatite vésiculaire, <i>Listeria monocytogenes</i>)
RIG-I	Cytoplasme	ADNdb (Virus de l'herpès simplex-1, PolydAdT)
ZBP1	Cytoplasme	ADNdb (Virus de la vaccine, ADN stimulateur de l'IFN)

b) Récepteurs de l'immunité innée (PRRs) : Cas des TLRs et des NLRs

Les TLRs sont des PRRs caractérisés par un domaine extracellulaire riche en leucine (LRR : Leucine Riche Repeat) impliqué dans la reconnaissance du ligand, une région transmembranaire suivie par un domaine de signalisation cytoplasmique, le domaine TIR (Toll/IL-1 receptors), homologue au récepteur de l'IL-1 responsable de la transduction du signal (Figure 5) (Brubaker, Bonham et al. 2015).

10 TLRs ont été identifiés chez l'homme et 13 chez la souris : ils sont divisés en deux groupes selon leur localisation cellulaire et les PAMPs qu'ils reconnaissent. Le premier groupe est composé du : TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 et TLR11 qui sont exprimés à la surface cellulaire et reconnaissent principalement les composantes des membranes microbiennes comme les lipides, les lipoprotéines et les protéines. Le deuxième groupe est composé du TLR3, TLR7, TLR8 et TLR9 que l'on trouve exprimés à la surface des compartiments endosomaux où ils reconnaissent les acides nucléiques des microorganismes (Kawai and Akira 2010, Takeuchi and Akira 2010).

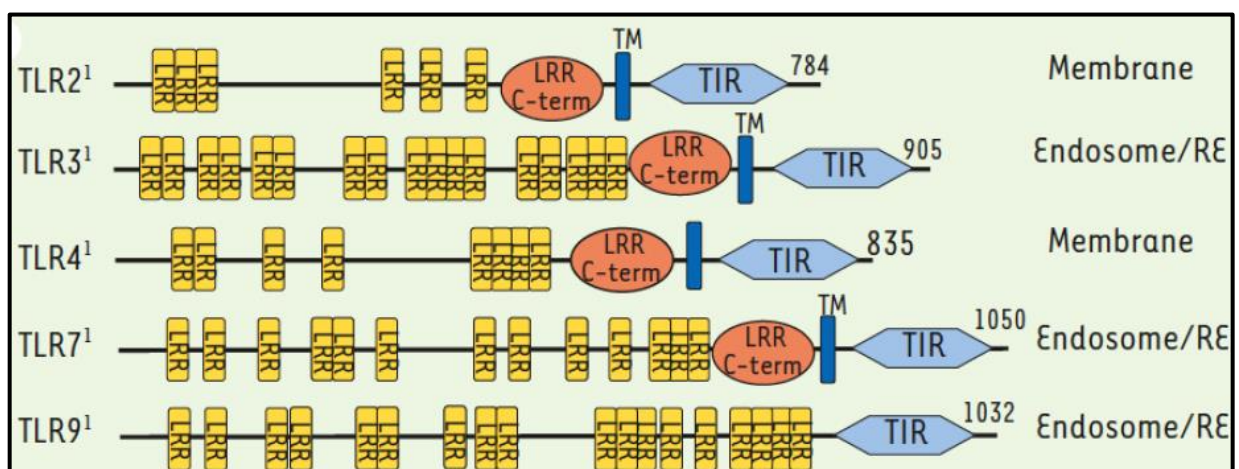


Figure 5 : Différents domaines caractéristiques de la structure des TLRs. (Georgel and Bahram 2006)

De nombreuses études sur les réponses immunitaires innées vis à vis de *H. pylori* dans les cellules

épithéliales se sont concentrées sur le TLR4 spécifique au LPS (lipopolysaccharide) des bactéries à Gram négatif. Cependant, des lignées de cellules épithéliales gastriques ne répondaient pas au LPS de *H. pylori*, même lorsque des concentrations relativement élevées de cette endotoxine avaient été ajoutées aux cellules (Bäckhed, Rokbi et al. 2003). En accord avec cet effet, l'utilisation d'un anticorps bloquant le TLR4 dans les cellules AGS « Adenocarcinoma of the stomach » n'a pas bloqué la sécrétion de l'IL-8 ; la cytokine pro-inflammatoire induite par *H. pylori* (Su, Ceponis et al. 2003). Cependant, Ishihara et al. ont attribué à TLR4 un rôle dans la reconnaissance du LPS de *H. pylori* (Ishihara, Rumi et al. 2004). Par ailleurs, Il a été rapporté que deux autres TLRs, TLR2 et TLR5, participaient activement dans la réponse immunitaire innée contre les bactéries Gram négatif en reconnaissant respectivement les lipoprotéines et la flagelline. La signalisation via ces deux TLRs a été déterminée en transfectant les cellules HEK-293 par TLR2, TLR4 ou TLR5 puis en les infectant par *H. pylori*. L'infection de ces cellules a induit une activation de NF- κ B dans les cellules transfectées avec TLR2 et TLR5, mais pas avec TLR4 (Smith, Mitchell et al. 2003). Cependant, d'autres groupes ont démontré que les lignées de cellules épithéliales sensibles à la flagelline ne détectent pas la flagelline de *H. pylori* native ou recombinante, ce qui suggère que la flagelline de *H. pylori* échappe à la reconnaissance par TLR5 (Gewirtz, Yu et al. 2004). Plusieurs études ont démontré que le contact entre *H. pylori* et les cellules épithéliales gastriques entraînait une activation rapide de NF- κ B, suivie d'une expression accrue de l'IL-8 (Sharma, Tummuru et al. 1998). La capacité de *H. pylori* à activer la voie NF- κ B, *in vitro*, a également été confirmé *in vivo* par la détection de NF- κ B activé dans les cellules épithéliales gastriques de patients infectés par cette bactérie ce qui explique l'expression élevée de l'IL-8 dans la muqueuse colonisée (Keates, Hitti et al. 1997). En plus du facteur NF- κ B, des MAPK (protéine kinases activées par un mitogène) ont été également impliquées dans l'expression de l'IL-8 induite par *H. pylori*. Des études réalisées *in vitro* ont montré que l'expression du gène de l'IL-8 après infection par *H. pylori* était dépendante de l'activation de NF- κ B et de AP-1 via l'activation de MAPK, soulignant la nécessité des interactions synergiques entre AP-1 et NF- κ B sur le promoteur de l'IL-8 et donc sur la production de cette cytokine (Aihara, Tsuchimoto et al. 1997) (Figure 6).

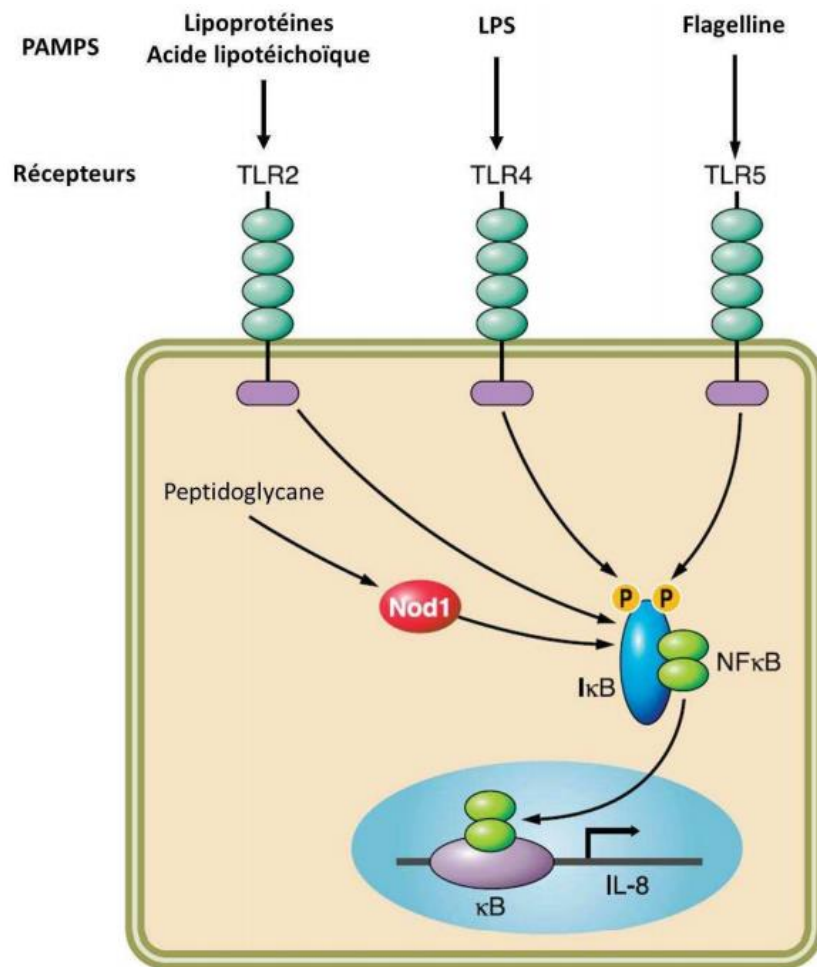


Figure 6 : Voies de signalisation en aval des TLRs conduisant à l'activation de NF- κ B. (Peek, Fiske et al. 2010).

Les récepteurs de la famille NLR se composent d'un domaine central NOD (Nucleotide-binding Oligomerization Domain), d'une partie C-terminale riche en répétition Leucine et de la partie N-terminale. Cette dernière est un domaine variable pouvant comprendre soit un domaine CARD, un domaine pyrine ou un domaine BIR (Baculovirus Inhibitor of apoptosis protein Repeat) (Figure 7) (Takeuchi and Akira 2010).



Figure 7 : Récepteurs de la famille NLR. (Takeuchi and Akira 2010).

Les NOD1 et NOD2 contiennent un domaine CARD dans leur extrémité N-terminal et reconnaissent les composantes bactériennes via leur domaine LRR. Par interaction du domaine CARD avec l'adaptateur RIP2/RICK (Receptor-interacting serine-threonine protein kinase-2), Ils induisent

l'activation du facteur de transcription NF- κ B et par conséquent, l'expression de cytokine pro-inflammatoires (Keestra-Gounder and Tsolis 2017).

NOD1 est un récepteur de l'immunité innée prototypique de la famille des NLRs. Il est exprimé par les cellules présentatrices d'antigènes et les cellules épithéliales exposées aux microorganismes (Akira, Uematsu et al. 2006, Strober, Murray et al. 2006, Watanabe, Asano et al. 2017). Il reconnaît les composantes des bactéries à Gram négatif, particulièrement le Peptidoglycane (PG), et conduit à l'induction des mécanismes antimicrobiens de l'hôte (Kim, Lee et al. 2004, Fukazawa, Alonso et al. 2008). En 2004, Viala et *al.* ont montré que la défense de la muqueuse gastrique de l'hôte contre *H. pylori* dépend de l'activation de NOD1 dans les cellules épithéliales gastriques (Viala, Chaput et al. 2004). Les gastroentérologues, les microbiologistes et les immunologistes ont fait de nombreux efforts pour élucider les mécanismes moléculaires par lesquels *H. pylori* induit l'activation de NOD1 et les réponses immunitaires antimicrobiennes (Watanabe, Asano et al. 2017). L'injection du PG par le SSTIV (Système de sécrétion de type 4) au sein des cellules épithéliales est cruciale à la reconnaissance du PG par NOD1. Cette reconnaissance induit deux voies différentes de signalisation qui aboutissent à la production des peptides antimicrobiens et de chimiokines (Viala, Chaput et al. 2004, Boughan, Argent et al. 2006).

Les défensines sont des peptides antimicrobiens qui exercent une action antimicrobienne contre plusieurs pathogènes notamment *H. pylori*. Grubman et son équipe ont rapporté que la régulation de l'expression génétique de la défensine ; hBD2, dans les cellules épithéliales gastriques est dépendante de NOD1/cagPAI (Grubman, Kaparakis et al. 2010). Les auteurs suggèrent que l'induction de hBD2 par NOD1 pourrait être médiée par l'activation de NF- κ B ou AP1 via les MAPKs. De plus, *H. pylori* induit l'activation de la voie de ERK (Extracellular signal-regulated kinases) via NOD1 et d'une manière dépendante de cag PAI (Grubman, Kaparakis et al. 2010). Par ailleurs, des auteurs, ont précédemment rapporté que des souris déficientes en NOD1 présentent une diminution de l'expression de l'homologue murin de hBD2 dans la muqueuse gastrique (Boughan, Argent et al. 2006). Ensemble, ces travaux soulignent la nécessité de cag PAI pour l'activation de NOD1 et que l'expression de la défensine dépend de ces deux molécules.

Au cours de l'infection par *H. pylori*, NOD1 induit l'activation de la voie de signalisation ISGF3 (IFN-stimulated gene factor 3) et la production d'IFNs de type I, entraînant ainsi la génération d'une réponse Th1 protectrice. L'activation de NF- κ B induite par *H. pylori* est indépendante de NOD1 (Watanabe, Asano et al. 2010). Une autre équipe a montré que *H. pylori* active NF- κ B dans les lignées épithéliales par des mécanismes dépendants de MyD88 et indépendants de NOD1 (Hirata, Ohmae et al. 2006). L'équipe de Viala et *al.* a également rapporté que des cellules épithéliales gastriques primaires infectées par *H. pylori* produisent des chimiokines indépendamment de la translocation nucléaire de la

sous-unité p65 de NF- κ B (Viala, Chaput et al. 2004). L'augmentation du taux de colonisation de l'estomac des souris déficientes en NOD1 par *H. pylori*, est corrélée avec une diminution de la production de cytokines et chimiokines associées à ISGF3 telles que l'IFN-I, l'IP-10 et l'IFN- γ et non à celles associées à la voie NF- κ B comme le TNF (Watanabe, Asano et al. 2010). Les auteurs suggèrent que l'activation de ISGF3 et de l'IFN de type 1 par NOD1 pourrait jouer un rôle protecteur contre l'infection par *H. pylori* (Watanabe, Asano et al. 2010). Il a été également montré que la reconnaissance du PG de *H. pylori* par NOD1 et son activation sont essentielles à l'induction des réponses immunitaires T spécifiques telles que les Th1, Th2 et Th17 soulignant ainsi l'implication de ce récepteur dans la réponse immunitaire de l'hôte (Fritz, Le Bourhis et al. 2007).

Une étude a mis en évidence que *H. pylori* délivre le peptidoglycane à NOD1 cytosolique de la cellule hôte via le SSTIV (Viala, Chaput et al. 2004). Hutton *et al.* ont montré, pour la première fois, que les micro-domaines riches en cholestérol, appelés radeaux lipidiques, sont importants pour la délivrance du peptidoglycane dépendant du SSTIV et l'activation ultérieure de NF- κ B et la production d'IL-8, médiée par NOD1 (Hutton, Kaparakis-Liaskos et al. 2010). Fait intéressant, des auteurs ont rapporté un nouveau mécanisme utilisé par les bactéries à Gram négatif, y compris *H. pylori*, dans la délivrance du peptidoglycane à NOD1 cytosolique dans les cellules hôtes : elle se fait via des vésicules de membrane cellulaire externe qui pénètrent dans les cellules épithéliales par les radeaux lipidiques (Karakakis, Turnbull et al. 2010). De plus, Necchi *et al.* ont montré la formation d'une structure cytoplasmique riche en particules (PaCS) dans l'épithélium gastrique humain infecté par *H. pylori* ayant des foyers métaplasiques ou dysplasiques, où VacA, CagA, uréase, les protéines de la membrane externe, le récepteur NOD1, l'enzyme E1 activant l'ubiquitine, des protéines polyubiquitinées, des composants du protéasome et des protéines potentiellement oncogènes comme SHP-2 et ERK sont colocalisées. Ceci laisse supposer que cette structure est susceptible de moduler les réponses inflammatoires et prolifératives pendant l'infection à *H. pylori* (Necchi, Sommi et al. 2010).

L'activation de NOD1 induit la translocation de NF- κ B et AP-1 au noyau : NOD1 est essentiel pour l'induction de l'activation de NF- κ B et AP-1 pendant l'infection à *H. pylori* (Allison, Kufer et al. 2009). Des études ont montré une régulation positive de l'expression de NOD1 dans diverses lignées cellulaires humaines stimulées par *H. pylori* d'une manière dépendante du cag PAI (Grubman, Kaparakis et al. 2010, Allison, Ferrand et al. 2013, Boonyanugomol, Chomvarin et al. 2013). En outre, il a récemment été démontré que les souches *H. pylori* cag PAI positive activent la voie NOD1 via deux composants de la voie de signalisation IFN- γ , et qui sont STAT1 et IRF1 (Allison, Ferrand et al. 2013). De même, il a été démontré que la surexpression de NOD2 sensibilise de manière significative les cellules HEK293 à l'activation de NF- κ B par *H. pylori* d'une manière dépendante du cagPAI (Rosenstiel,

Hellmig et al. 2006). En outre, NOD2, et non NOD1, semble être nécessaire pour l'induction de la pro-IL-1 β et de NLRP3 dans les cellules dendritiques infectées par *H. pylori* (Kim, Park et al. 2013). Plusieurs études, ont souligné un rôle important des NLRPs et des molécules liées aux inflammasomes dans l'infection à *H. pylori*. Il a été démontré que le LPS de *H. pylori* pouvait activer la caspase-1 via la signalisation Rac1/PAK1, et que la caspase-1 activée joue un rôle dans la maturation de l'IL-1 β induite par le LPS (Basak, Pathak et al. 2005). De plus, des souris déficientes en composants des inflammasomes, infectées par *H. pylori* semblent présenter des charges bactériennes plus élevées par rapport aux souris de type sauvage. En plus, ces souris étaient incapables de produire IL-1 β ou IL-18 et produisent moins d'IFN- γ en réponse à l'infection par *H. pylori* (Benoit, Kobayashi et al. 2009). En outre, Hitzler *et al.* ont montré que l'infection à *H. pylori* à la fois dans les cellules dendritiques en culture et *in vivo* active la caspase-1, conduisant à la maturation et à la sécrétion d'IL-1 β et d'IL-18 (Hitzler, Sayi et al. 2012). De manière cohérente, trois études utilisant des lignées cellulaires de cancer gastrique humain, du tissu gastrique et des modèles murins, ont confirmé cette expression accrue de la caspase-1, de l'IL-1 β et de l'IL-18 après infection par *H. pylori* (Chen, Wang et al. 2005, Shimada, Ando et al. 2008, Yang, Yang et al. 2013). De plus, Jiang *et al.* ont rapporté que l'expression des molécules liées à l'inflammasome NLRP3 ainsi que les taux sériques d'IL-1 β , IL-18 et IL-33 étaient significativement augmentés chez les souris infectées par *H. pylori* (Jiang, Liu et al. 2013).

L'analyse de l'expression génique de molécules impliquées dans les voies de signalisation des NLRs, dans des macrophages infectés par deux souches de *H. pylori*, GC026 (cancer gastrique) et 26695 (gastrite), a montré que cinq gènes codant pour les NLRs NLRC4, NLRC5, NLRP9, NLRP12 et NLRX1 étaient régulés de manière significative (Castaño-Rodríguez, Kaakoush et al. 2014). De manière intéressante les deux gènes NLRP12 et NLRX1, deux régulateurs négatifs connus de NF- κ B, étaient faiblement exprimés. Le NF- κ B et plusieurs gènes cibles de NF- κ B codant pour des cytokines pro-inflammatoires comme l'IFNB1, IL12A, IL-12B, IL6 et TNF, des chimiokines comme le CXCL1, CXCL2 et CCL5, et les molécules impliquées dans la cancérogenèse comme l'PTGS2 et BIRC3, étaient significativement up-régulées, dans les cellules THP-1 infectées par une souche de *H. pylori* hautement virulente isolée d'un patient atteint de cancer gastrique. Ces résultats mettent en évidence l'importance des voies de signalisation NLR dans la cancérogenèse gastrique et son interaction étroite avec NF- κ B (Castaño-Rodríguez, Kaakoush et al. 2014). Ces faits montrent clairement qu'en réponse à *H. pylori*, les membres des sous-familles NOD et NLRP sont essentiels pour produire des cytokines et chimiokines pro-inflammatoires matures qui sont cruciales pour les réponses Th1 et conduisent à l'aggravation des pathologies gastriques liés à *H. pylori*. Le rôle des voies de signalisation NLR dans le continuum biologique qui caractérise le cancer gastrique reste relativement inexploré. Des auteurs ont montré que l'expression de NOD1 était significativement augmentée dans les biopsies gastriques humaines

présentant une gastrite sévère, par rapport à celles ayant une gastrite nulle ainsi que dans les tissus tumoraux gastriques, par rapport aux tissus non tumoraux (Allison, Ferrand et al. 2013). En revanche, Jee *et al.* ont analysé les tissus et les lignées cellulaires humaines du cancer gastrique, et ont montré une diminution significative de l'expression de la caspase-1 associée à une mauvaise survie des patients (Jee, Lee et al. 2005).

Des études approfondies et fonctionnelles sur l'interaction de *H. pylori* avec les NLR, leur importance dans le développement de l'inflammation gastrique et de la carcinogenèse subséquente, ainsi que de la production de DAMPs pendant la gastrite atrophique, la métaplasie intestinale, la dysplasie et la formation de tumeurs sont recommandées.

c) Rôle des macrophages dans l'infection par *H. pylori*.

Les neutrophiles, les monocytes et les macrophages, ainsi que les cellules dendritiques (CDs) sont les premières cellules recrutées dans la lamina propria gastrique au cours de l'infection par *H. pylori*. Sur le site de l'infection, les macrophages produisent des cytokines inflammatoires qui augmentent le flux sanguin localisé dans la zone de l'infection et la perméabilité des vaisseaux sanguins favorisant ainsi le recrutement et le passage trans-endothéliale des globules blancs en faveur de la réponse inflammatoire.

Les macrophages sont des cellules phagocytaires par excellence qui éliminent les microorganismes comme les bactéries. Elles sont identifiées à l'origine par Metchnikoff par leur nature phagocytaire, et sont des cellules anciennes de la phylogénie métazoaire. Chez les mammifères adultes, on les retrouve dans tous les tissus où ils présentent une grande diversité anatomique et fonctionnelle. Dans les tissus, ils sont organisés en motifs définis à savoir chaque cellule occupe son propre territoire. Bien que plusieurs tentatives aient été faites pour classifier les macrophages, la définition la plus réussie est le système phagocytaire mononucléaire (SPM). Ce système regroupe les cellules hautement phagocytaires et leurs progéniteurs de la moelle osseuse (MO). Dans la classification SPM, les macrophages adultes sont définis comme des cellules terminales de la lignée phagocytaire mononucléaire avec des macrophages tissulaires dérivant de monocytes circulants qui proviennent de la MO. Cependant, cette définition est inadéquate car les macrophages ont plusieurs origines au cours de l'ontogenèse et chacune des différentes lignées persiste à l'âge adulte où elles présentent une grande diversité. D'autres classifications ont inclus des classifications binaires qui se réfèrent à des états inflammatoires. Elles comprennent le macrophage activé (MA) et le macrophage alternativement activé (MAA) ou M1 et M2 définis par la réponse à la IFN γ et l'activation des TLRs et la réponse aux cytokines IL-4 et IL-13 respectivement (Wynn, Chawla et al. 2013).

Les phagocytes doivent reconnaître un grand nombre de particules différentes susceptibles d'être ingérées, y compris toutes sortes d'agents pathogènes et également des cellules apoptotiques. Cette

reconnaissance se fait par une variété de récepteurs, qui induisent une cascade de signalisation favorisant la phagocytose. Les récepteurs membranaires des phagocytes sont divisés en récepteurs d'endocytose et récepteurs pour opsonines. Les récepteurs d'endocytose peuvent reconnaître directement des groupes moléculaires à la surface des cibles. Parmi ces récepteurs, des molécules de reconnaissance de type lectine, telles que CD169 et CD33 ; également des récepteurs lectines de type C, telles que Dectin-2, Mincle ou DNGR-1 ; des récepteurs éboueurs « récepteur Scavenger » (Canton, Neculai et al. 2013); et la Dectine-1, qui est un récepteur du bêta-glucane fongique (Dambuza and Brown 2015). D'autres récepteurs, tels que SR-A ou CD36, peuvent reconnaître à la fois des ligands polyanioniques apoptotiques et microbiens, mais leur rôle dans la signalisation n'est pas bien décrit (Canton, Neculai et al. 2013). Les récepteurs pour opsonines reconnaissent les opsonines dérivées de l'hôte qui se lient aux particules du non soi et les ciblent pour ingestion. Les opsonines comprennent les anticorps, le complément, la fibronectine et la lectine se liant au mannose (Flannagan, Jaumouillé et al. 2012). Les récepteurs pour opsonines les mieux caractérisés et peut-être les plus importants sont les récepteurs Fc (FcR) et les récepteurs du complément (CR). Les FcR se lient à la portion constante Fc des immunoglobulines (Ig) G (Carlos Rosales 2013) ou IgA (Bakema and van Egmond 2011). Les récepteurs du complément, tels que CR3, se lient à iC3b accroché sur la particule du non soi après activation du complément (van Lookeren Campagne, Wiesmann et al. 2007). Après reconnaissance de la particule cible, les récepteurs phagocytaires initient des cascades de signalisation qui remodelent les lipides dans la membrane cellulaire et régulent le cytosquelette d'actine afin d'étendre la membrane cellulaire autour de la particule (Freeman and Grinstein 2014). Au cours de cette partie du processus, les récepteurs phagocytaires s'engagent également dans un ordre séquentiel et coopèrent pour achever la formation du phagosome (Ostrowski, Grinstein et al. 2016).

Une fois la particule internalisée à l'intérieur du phagosome, cette vacuole peut fusionner avec des vésicules provenant du réticulum endoplasmique et du complexe de Golgi pour former un phagosome intermédiaire. Plus tard, ce phagosome intermédiaire se transforme en vacuole microbicide, le phagolysosome, en fusionnant avec les lysosomes et en modifiant sa membrane et ses caractéristiques intérieures par un processus appelé maturation des phagolysosomes (Ndjamen, Kang et al. 2010, Wähe, Kasmajpour et al. 2010, Campbell-Valois, Trost et al. 2012, Nunes, Cornut et al. 2012, Nair-Gupta, Baccarini et al. 2014, Guido, Demaurex et al. 2015, Vashi, Andrabi et al. 2017).

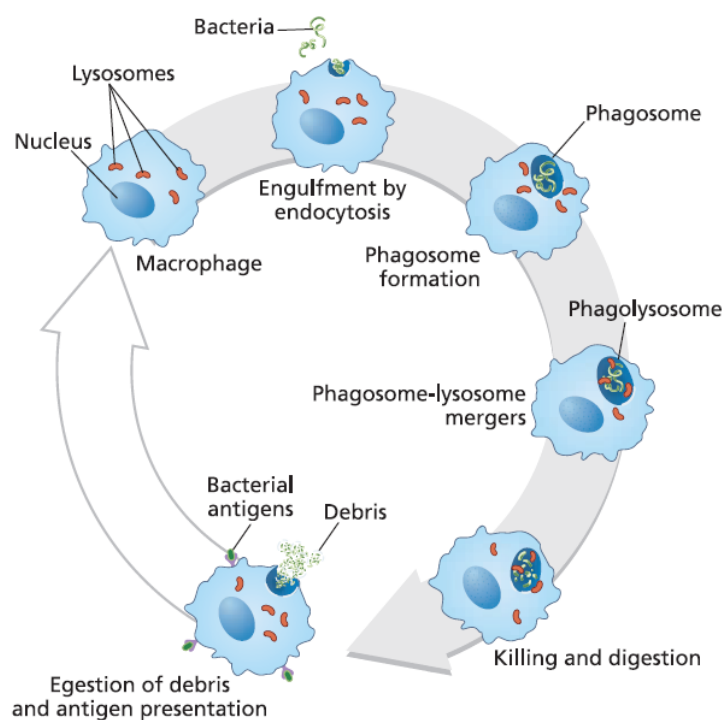


Figure 8 : La phagocytose d'une bactérie par le macrophage (Fleming 2007).

Les mêmes étapes de la phagocytose précédemment décrites se produisent pour *H. pylori*. Après sa reconnaissance, le macrophage encercle la bactérie et l'enferme dans le phagosome (Figure 8). La bactérie est ensuite dégradée par une série d'enzymes digestives puissantes et d'autres produits chimiques contenus dans des granules. Ces granules fusionnent au phagosome et y déversent leur contenu avec la bactérie, provoquant sa dégradation. Toutefois, *H. pylori* peut échapper à la phagocytose par les macrophages entraînant un échec de la réponse immunitaire innée contre cette bactérie (Allen, Schlesinger et al. 2000, Zheng and Jones 2003). Les phagosomes peuvent fusionner entre eux et former des mégasomes contenant un grand nombre de bactéries vivantes. Les souches Cag PAI positives capables de produire une protéine VacA fonctionnelle peuvent interrompre la maturation des phagosomes ainsi que leur fusion avec les lysosomes empêchant ainsi l'élimination de la bactérie (Zheng and Jones 2003). La bactéricidie des mégasomes est en partie due à l'acidification de leur contenu et la production des ROS. Les macrophages produisent le NO (monoxyde d'azote) à partir de la L-Arginine (L-Arg) via l'enzyme inductible iNOS (Oxyde Nitrique Synthase). L'expression de cette enzyme est induite par *H. pylori* dans les macrophages *in vivo* et *in vitro* (Mannick, Bravo et al. 1996, Wilson, Ramanujam et al. 1996, Fu, Ramanujam et al. 1999, Gobert, McGee et al. 2001, Gobert, Cheng et al. 2002, Bussière, Chaturvedi et al. 2005). La mise en culture des macrophages avec *H. pylori* montre que la bactérie peut être éliminée par les macrophages via la production de NO (Gobert, McGee et al. 2001, Bussière, Chaturvedi et al. 2005). D'autre part, *H. pylori* possède une arginase capable d'entrer en compétition avec le substrat de l'iNOS, la L-Arg : la production de NO est ainsi diminuée entraînant la survie et la persistance de *H. pylori* (Gobert, McGee et al. 2001). De plus, cette compétition peut réguler

négativement l'expression de l'iNOS puisque sa translation est fortement dépendante de la disponibilité de la L-Arg dans le macrophage (Chaturvedi, Asim et al. 2007). L'arginase bactérienne est également impliquée dans la génération d'urée à partir de la L-Arg. L'hydrolyse de l'urée par l'uréase bactérienne entraîne la production d'ammoniac qui va tamponner l'environnement proche de la bactérie et lui permettre de survivre à l'acidité gastrique comme nous l'avons vu dans le chapitre précédant. D'autres mécanismes biochimiques médiés par *H. pylori* ont également lieu afin de limiter la production de NO par les macrophages, ce qui lui permet de persister et d'augmenter le risque de développement de transformation néoplasique (Wroblewski, Peek et al. 2010). L'équipe de Arnold *et al.* a observé une inhibition de recrutement des macrophages et des CD⁺ CD11b chez des souris dépourvues de CCR2, un récepteur de la protéine chimioattractante monocyttaire 1. Cependant, cette déficience n'a pas affecté le recrutement des neutrophiles et de cellules T CD4⁺ (Arnold, Zhang et al. 2017). De plus, des auteurs ont montré que l'arginase II et l'ornithine décarboxylase (ODC) sont induites par *H. pylori* dans les macrophages (Gobert, Cheng et al. 2002) : l'arginase convertit la L-arginine en L-ornithine, qui est métabolisée par l'ODC pour produire la polyamine putrescine qui est convertie en polyamines spermidine et spermine. Lorsque la spermine est métabolisée par la spermine oxydase (SMO ; polyamine oxydase 1), elle génère du H₂O₂ qui provoque l'apoptose cellulaire (Chaturvedi, Cheng et al. 2004). L'activité de l'ODC peut être régulée à plusieurs niveaux, y compris l'activation du promoteur (Bello-Fernandez, Packham et al. 1993). Il a été démontré que la surexpression du facteur de transcription c-Myc active le promoteur ODC et le LPS bactérien induit l'expression de c-Myc et d'ODC. Gobert *et al.* ont démontré que *H. pylori* induit l'ODC et provoque l'apoptose par l'activation du promoteur ODC et que ce processus dépend de l'expression et de la liaison de c-Myc (Introna, Hamilton et al. 1986, Packham and Cleveland 1997, Salimuddin, Nagasaki et al. 1999, Gobert, Cheng et al. 2002).

Les macrophages sont également des cellules présentatrices d'antigènes et sont à l'interface entre les réponses immunitaires innée et acquise (Figure 9). Au cours de l'infection par *H. pylori*, les macrophages et les CD⁺ activent la mise en place de la réponse immunitaire acquise en produisant des médiateurs cytokiniques tels que l'IL-12 (Haeberle, Kubin et al. 1997, Meyer, Wilson et al. 2000, Meyer, Ramanujam et al. 2003) qui polarisent la réponse T CD4 vers les cellules Th1, induisant ainsi la production de cytokines notamment l'IFN- γ (Haeberle, Kubin et al. 1997, Meyer, Wilson et al. 2000, Meyer, Ramanujam et al. 2003). Les macrophages sont aussi impliqués dans l'amplification de la réponse inflammatoire par la production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 β et l'IL-6 (Harris, Ernst et al. 1998, Gobert, Bambou et al. 2004, Lytton, Fischer et al. 2005).

Lorsque la CPA, notamment le macrophage, interagit avec une cellule T CD4 qui reconnaît l'antigène grâce à son TCR, le lymphocyte T devient activé. Sous l'action de plusieurs paramètres, les cellules T activées peuvent être polarisées en différentes populations effectrices impliquées dans

l'immunité cellulaire et humorale ainsi que des cellules T régulatrices (Figure : 9) (Bagheri, Salimzadeh et al. 2018).

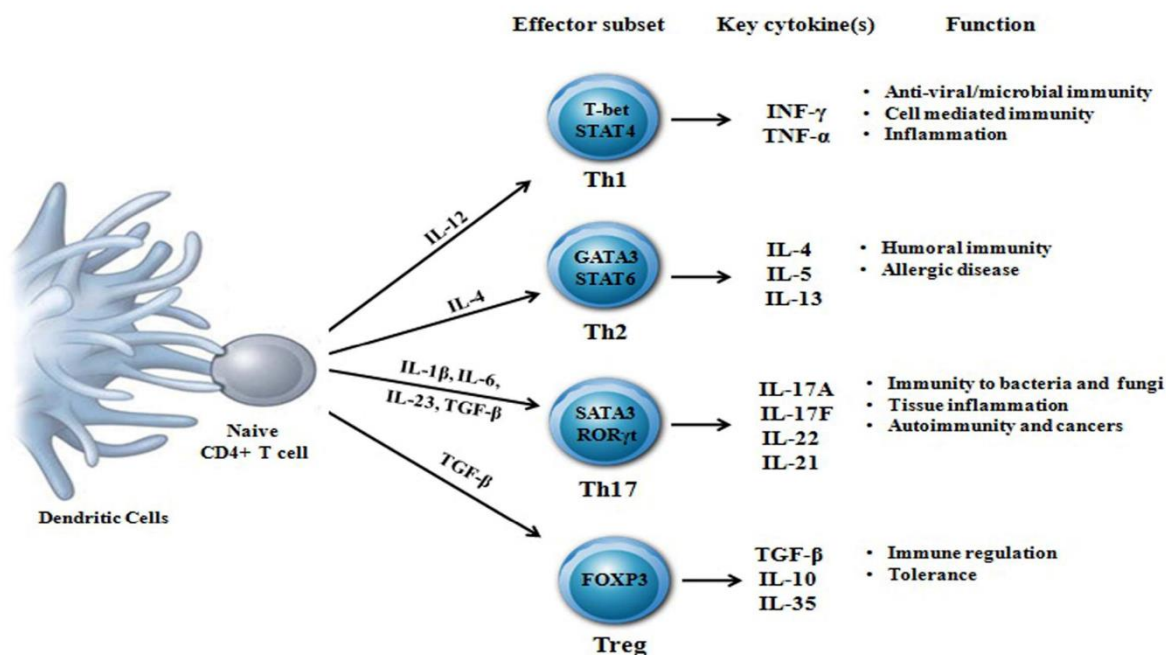


Figure 9 : Polarisation de la réponse immunitaire. (Bagheri, Salimzadeh et al. 2018)

IV-2) Réponse immunitaire acquise contre *H. pylori* : les sous populations Th1/Th2/Th17

La réponse immunitaire adaptative est moins rapide que la réponse innée mais se caractérise par sa spécificité et sa mémoire. Les lymphocytes, qui constituent 20 à 40% des globules blancs ou leucocytes, sont les principales cellules responsables de l'immunité adaptative. Elles sont regroupées en lymphocytes B et T : les cellules B sont responsables de l'immunité humorale tandis que les cellules T assurent l'immunité cellulaire et régulent la réponse humorale (Nicholson 2016).

Une fois activé par un antigène, les cellules T CD4 + helper (T CD4 +) peuvent se différencier en plusieurs populations effectrices et régulatrices. Pour les effecteurs, les T CD4 peuvent se différencier en cellules notamment les Th1, Th2 et Th17 selon la nature de l'antigène, l'intensité du signal et l'environnement cytokinique (Zhu, Yamane et al. 2010).

Les cellules Th1 sont impliquées dans la réponse immunitaire à médiation cellulaire. Elles sont caractérisées par le facteur de transcription T-bet (T-box) qui est nécessaire pour leur différenciation et par les cytokines qu'elles produisent. La population Th1 contribue à l'élimination de nombreux agents pathogènes, principalement les pathogènes intracellulaires en fournissant une source de cytokines comme l'IFN- γ . En effet, l'IFN- γ est une cytokine caractéristique du phénotype Th1 et joue un rôle important dans l'activation de différentes cellules notamment le macrophage et les T CD8 (Eaton, Benson et al. 2006).

Les cellules Th2 sécrètent des cytokines de type Th2 notamment l'IL-4, l'IL-5, l'IL-6 et l'IL-10 et favorisent la réponse à médiation humorale. Ces populations sont caractérisées par l'expression de GATA3 qui est un facteur de transcription nécessaire à leur différenciation. En général, les agents pathogènes extracellulaires stimulent les réponses de type Th2 et sont surtout impliquées dans la réponse anti-parasitaire (Nakayama, Hirahara et al. 2017).

Le paradigme des cellules Th1 / Th2 a été enrichi avec d'autres sous-ensembles de cellules T auxiliaires notamment les Th17 qui ont été identifiées comme la source d'IL-17. Ces cellules produisent de l'IL-17A, l'IL-17F, l'IL-21 et l'IL-22 et sont impliquées dans les mécanismes de défense de l'hôte contre diverses infections, en particulier les infections bactériennes extracellulaires et les champignons. Ces cellules expriment le récepteur orphelin lié à l'acide rétinoïque gamma-t (ROR γ t) comme facteur de transcription clé pour leur différenciation (Harrington, Hatton et al. 2005).

Par ailleurs, l'induction des populations effectrices est associée au développement des lymphocytes T régulateurs (Treg) capables de supprimer la prolifération des lymphocytes T effecteurs notamment par la production des cytokines régulatrices. Elles sont caractérisées par l'expression du marqueur CD25 et de Foxp3 qui est un facteur de transcription nécessaire à leur différenciation. Les cellules Treg jouent ainsi un rôle essentiel dans le maintien de la tolérance périphérique, et modèrent la réponse immunitaire aux agents pathogènes en régulant l'équilibre entre l'immunité protectrice et l'inflammation (Sakaguchi, Miyara et al. 2010).

La gastrite antrale chronique, induite suite à l'infection par *H. pylori*, est caractérisée par un infiltrat cellulaire inflammatoire contenant des acteurs de la réponse immunitaire innée et adaptative. Parmi ces derniers, les cellules T CD4 + sont considérées comme les principaux acteurs de la mise en place d'une inflammation chronique (Zhang, Yamada et al. 2005). Il a été montré que la réponse immunitaire adaptative développée par l'hôte contre *H. pylori* comprend à la fois les cellules Th1 et Th17, impliqués dans le contrôle de l'infection par de multiples mécanismes. Cependant, les cytokines de type Th2, ont été détectées suite à l'infection par *H. pylori* mais leur rôle n'est pas bien compris (Wilson and Crabtree 2007).

a- La réponse Th1 dans l'infection par *H. pylori*

Bien que la réponse immunitaire acquise vis-à-vis de *H. pylori* soit composée à la fois de cellules de type Th1 et Th2, les profils de cytokines indiquent la prédominance d'une réponse Th1 (Meyer, Wilson et al. 2000). La prolifération des cellules Th1 dans la muqueuse gastrique infectée par *H. pylori* implique des signaux fournis par des cellules présentatrices d'antigène et des cytokines produites en réponse aux composants bactériens, tels que le LPS, résultant en une sécrétion élevée d'IFN- γ , d'IL-12, et d'IL-18 (Berenson, Ota et al. 2004). Les patients infectés par *H. pylori* montrent des taux élevés de

cellules T productrice d'IFN- γ et les clones T spécifiques de *H. pylori* présentent un profil Th1 chez les sujets atteints d'ulcère gastro-duodéal. La sévérité de la gastrite est fortement corrélée avec l'expression de TNF- α et d'IFN- γ chez les sujets infectés par *H. pylori* (Lehmann, Terracciano et al. 2002). Le T-bet qui est nécessaire pour la différenciation des cellules T CD4 + en Th1 et la sécrétion d'IFN- γ joue un rôle central dans le développement de la gastrite due à *H. pylori*. En effet, l'utilisation de modèles de souris a montré que les cellules T CD4 + de souris dépourvues de T-bet n'expriment pas d'IFN- γ et sont limitées à des réponses de type non Th1 (Eaton, Benson et al. 2006). La production d'IL-12 par les macrophages, les CD8 et les monocytes est cruciale pour l'induction de la réponse Th1 (Haeberle, Kubin et al. 1997, Meyer, Wilson et al. 2000, Guiney, Hasegawa et al. 2003, Hafsi, Volland et al. 2004, Kranzer, Eckhardt et al. 2004). Les cellules épithéliales gastriques semblent jouer un rôle important dans l'activation des cellules Th CD4+ (Ye, Barrera et al. 1997). Plusieurs facteurs de virulence bactériens sont impliqués dans la polarisation des cellules Th1, notamment la protéine activatrice des neutrophiles (NAP) de *H. pylori*, qui stimule la sécrétion de l'IL-12 et de l'IL-23 par les neutrophiles et les monocytes (Amedei, Cappon et al. 2006). Des travaux réalisés sur des modèles murins ont montré que l'activation insuffisante de la réponse Th1 est associée à une colonisation plus violente de la muqueuse par *H. pylori*. Cela suggère que le développement d'une très forte réponse Th1 présente un effet protecteur et pourrait atténuer la colonisation de la muqueuse par cette bactérie (Eaton, Mefford et al. 2001, Akhiani, Pappo et al. 2002).

b- La réponse Th2 dans l'infection par *H. pylori*

Certains rapports ont indiqué un rôle de la réponse Th2 dans la protection contre l'infection à *H. pylori* : une augmentation de la charge bactérienne a été notée chez les souris déficientes en IL-4 (Mohammadi, Nedrud et al. 1997). Il a été prouvé que l'immunisation thérapeutique des muqueuses des souris avec l'uréase B de *H. pylori* induit progressivement une réponse cellulaire Th2 entraînant l'élimination du pathogène. Néanmoins, les souris ont développé une gastrite sévère au cours de l'infection, compatible avec la réponse pro-inflammatoire Th1, diminuant ainsi le rôle supposé de la réponse Th2 dans la prévention des maladies liées à *H. pylori* (Saldinger, Porta et al. 1998). L'équipe de Garhart *et al.* a démontré que la protection induite par le vaccin contre *H. pylori* est obtenue chez les souris déficientes en IL-4, suggérant ainsi que la réponse Th2 n'est pas nécessaire pour la protection contre l'infection (Garhart, Nedrud et al. 2003).

c- La réponse Th17 dans l'infection par *H. pylori*.

De nombreux rapports soutiennent l'implication des cellules Th17 dans l'inflammation chronique induite par *H. pylori* chez l'homme et la souris. L'équipe de Gray et al. a montré que le transfert de cellules T CD4 + à partir de souris déficientes en IFN- γ ou T-bet induit une gastrite chez les souris

C57BL/6 par rapport aux souris contrôles (Gray, Fontaine et al. 2013). Ainsi, alors que l'IFN- γ contribue clairement au développement de la gastrite, les cellules Th1 ne semblent pas être essentielles, soutenant le rôle pro-inflammatoire de l'IL-17. Chez l'homme infecté par *H. pylori*, la production accrue d'IL-17 régule positivement la production de l'IL-8; la cytokine chimioattractante des neutrophiles qui semble jouer un rôle majeur dans la réponse inflammatoire aiguë associée à l'infection. Par ailleurs, la neutralisation de l'IL-17 inhibe la production d'IL-8 (Luzza, Parrello et al. 2000). De plus, la neutralisation de l'IL-10 et du TGF- β (deux cytokines régulatrices) augmente l'induction des cellules Th17 et diminue celle des Treg, indiquant une corrélation négative entre la génération de Th17 et de Treg. La déplétion des Treg CD25+ pendant la phase aiguë de l'infection à *H. pylori* réduit la colonisation de la muqueuse gastrique par la bactérie et est corrélée avec une augmentation de Th17 spécifique à *H. pylori* (Kao, Zhang et al. 2010). Il a été montré que *H. pylori* est capable de stimuler les cellules dendritiques gastriques humaines pour produire de l'IL-10, induisant la suppression de l'inflammation dans la muqueuse gastrique par les Treg (Serrano, Wright et al. 2013). La réponse Th17 spécifique à *H. pylori* est supprimée, ce qui conduit à la persistance de *H. pylori* dans l'estomac Figure (10). Ces résultats suggèrent que les cellules dendritiques stimulées par *H. pylori* impactent l'équilibre Th17 / Treg et orientent la réponse vers une réponse Treg supprimant la réponse Th17 via un mécanisme dépendant du TGF- β et IL-10 et indépendant de CagA et VacA (Zhang, Liu et al. 2010).

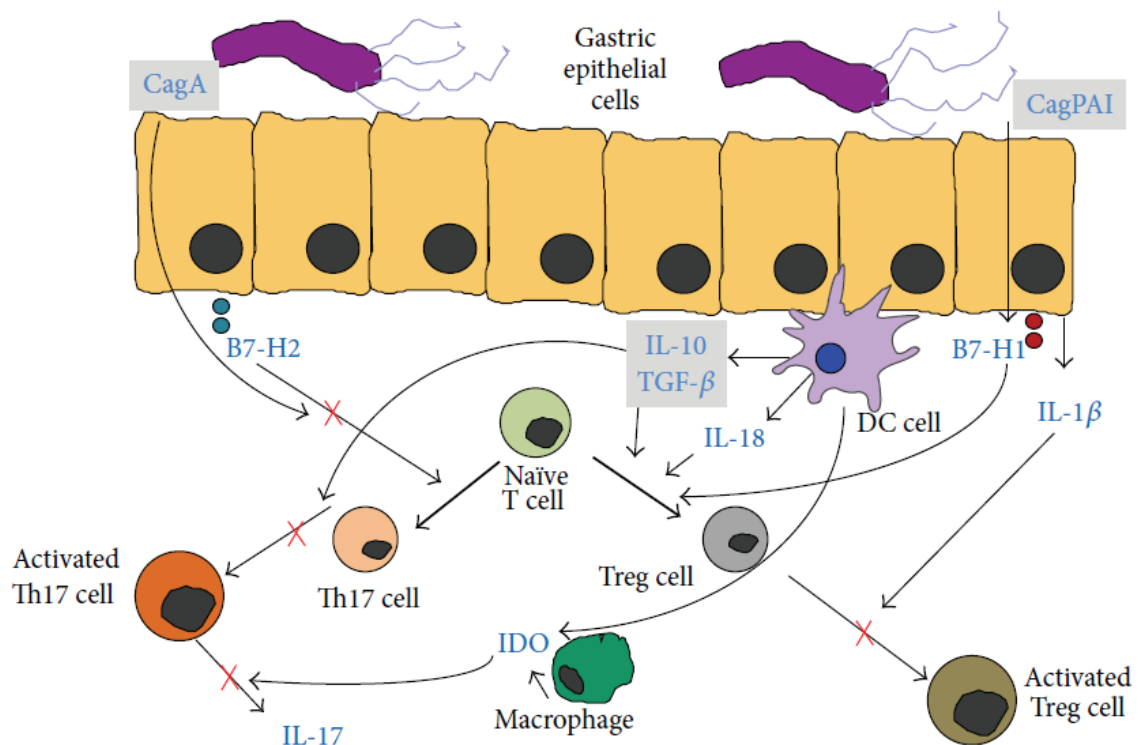


Figure 10 : Polarisation de la réponse Th17 et Treg lors de l'infection par *H. pylori*. (Larussa, Leone et al. 2015)

IV-3) Rôle des cytokines inflammatoires IL-8, IL-1 β et IL17A dans l'infection par *H. pylori*.

Les cytokines représentent un groupe diversifié de protéines qui agissent en tant que médiateurs entre les cellules. Elles ont été initialement identifiées comme des produits des cellules immunitaires qui régulent des processus immunitaires. Toutefois, de nombreuses cytokines sont maintenant connues pour être produites par des cellules autres que les cellules immunitaires et peuvent avoir des effets sur des cellules hors système immunitaire. Par ailleurs, les cytokines sont actuellement utilisées en clinique pour moduler la réponse biologique dans le cadre du traitement de divers troubles de santé (Borish and Steinke 2003).

L'infection par *H. pylori* est associée à une gastrite et une inflammation aigüe initiale touchant tout l'estomac. Cette inflammation est caractérisée par une infiltration considérable de la muqueuse gastrique par des neutrophiles, des monocytes et des lymphocytes. L'activation de ces cellules inflammatoires dans la muqueuse gastrique est associée à l'augmentation de la production des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 β , l'IL-8 et l'IL-17A. Plusieurs études ont montré le rôle important que pourraient jouer ces trois cytokines dans l'infection par *H. pylori* et dans l'évolution des pathologies liées à cette infection (Figueiredo, Marques et al. 2014).

a- Interleukine -8

L'interleukine 8 (IL-8) est une chimiokine sécrétée par les monocytes, les macrophages, les lymphocytes T, les neutrophiles, les fibroblastes, les kératinocytes et les hépatocytes. Elle agit comme un facteur chimiotactique pour les neutrophiles, les différentes populations des lymphocytes T et les basophiles. Elle active les neutrophiles pour libérer les enzymes lysosomales et induit principalement l'adhésion des neutrophiles aux cellules endothéliales (Lee, Khoi et al. 2013). Un certain nombre d'études ont exploré le rôle de l'IL-8 dans l'infection par *H. pylori* et ont montré une association entre les niveaux d'expression de l'ARNm d'IL-8 et l'infection à *H. pylori* (Shimada and Terano 1998). L'IL-8 attire les neutrophiles qui migrent des capillaires, à travers la lamina propria et émergent entre les cellules épithéliales : la migration de ces nombreux neutrophiles et la libération de leur contenu est la cause la plus fréquente de l'ulcère gastro-duodéal (Michetti and Svennerholm 2003).

H. pylori régule positivement l'expression d'IL-8 dans des cellules de cancer de l'estomac mais le mécanisme moléculaire impliqué n'est pas complètement élucidé. Les analyses de la structure génomique d'IL-8 ont révélé de nombreuses cibles potentielles pour sa régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle. Le gène contient plusieurs éléments cis comprenant une boîte CCAAT, l'élément cortico-sensible, l'élément nucléaire du facteur hépatocytaire 1, deux facteur-1 régulateurs d'interféron, des sites de liaison pour un activateur de régulation de protéine-1 (AP-1), CCAAT / activateur de protéine de liaison et NF- κ B. Ces éléments sont tous impliqués dans la régulation de la transcription du gène IL-8 (Yasumoto, Okamoto et al. 1992). *H. pylori* induit une multitude de signaux intracellulaires associés

à la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), et l'activation du facteur de transcription NF- κ B, AP-1 et MAP kinases (MAPK) (Lee, Khoi et al. 2013). Les souches présentant un « East Asian CagA » induisent une sécrétion plus importante d'IL-8 *in vitro*, par les cellules d'adénocarcinomes gastriques (AGS) par comparaison avec les souches avec un « Western CagA ». De plus, plus le nombre de motifs EPIYA-C (motifs Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala (EPIYA) sur l'extrémité C-terminale de la protéine) chez ces dernières était important, plus la sécrétion d'IL-8 était importante (Argent, Hale et al. 2008). Dans un modèle de souris transgénique, le « East Asian CagA » a été décrit comme plus carcinogène que le « Western CagA » (Miura, Ohnishi et al. 2009). Cependant, des études ultérieures sont nécessaires pour confirmer ce résultat puisque des tumeurs étaient également développées dans des organes autres que l'estomac. L'équipe de Sirikan Yamada *et al.* a reporté que l'expression élevée du gène de l'IL-8 au niveau de la muqueuse gastrique corrèle significativement avec le risque du développement du cancer gastrique (Yamada, Kato et al. 2013). L'augmentation de l'expression d'ARNm d'IL-8 dans les biopsies gastriques des patients cancéreux a été associée avec un mauvais pronostic (Lee, Bae et al. 2004). Les souris transgéniques, exprimant IL-8, montrent une augmentation des tumeurs gastriques ce qui suggère que l'IL-8 peut jouer un rôle crucial dans le cancer gastro-intestinal. Les souris qui expriment l'IL-8 humaine subissent une mobilisation accrue des cellules myéloïdes immatures, ce qui aggrave l'inflammation et accélère la cancérogenèse colique. Ces observations indiquent que des niveaux élevés d'IL-8 peuvent être associés à un mauvais pronostic et que l'IL-8 peut être un marqueur immunitaire des cancers gastriques agressifs (Asfaha, Dubeykovskiy et al. 2013).

Le rôle de l'IL-8 dans l'angiogenèse au cours du cancer gastrique a suscité beaucoup d'intérêt. L'invasion cellulaire et l'angiogenèse sont toutes impliquées dans le processus métastatique : l'expression de l'IL-8 dans le cancer gastrique peut influencer ces deux capacités métastatiques. La régulation positive de l'IL-8 dans les cancers gastriques humains est en étroite corrélation avec l'angiogenèse. Des auteurs ont rapporté que l'expression d'IL-8 est en corrélation directe avec la vascularisation des cancers gastriques humains. En outre, des lignées cellulaires de carcinome gastrique traitées par IL-8 produisent des néoplasmes très vascularisés par rapport aux cellules non traitées. En revanche, l'inhibition de l'IL-8 induit la diminution de l'angiogenèse dans le cancer gastrique (Kitadai, Haruma et al. 1998).

b- Interleukine-1 β

L'interleukine-1 β (IL-1 β) est une cytokine pro-inflammatoire codée par le gène IL-1B situé sur le chromosome 2q13–14 humain. Shigematsu *et al.* ont démontré que l'infection des souris sauvages par

H. pylori induit une inflammation sévère de la muqueuse gastrique et la production d'IL-1 β . Cependant, les souris déficientes en IL-1 β , recrutent moins de neutrophiles et de macrophages au site de l'infection ce qui se traduit par la suppression des tumeurs gastriques chez ces souris par comparaison aux souris sauvages. En théorie, ceci est expliqué par l'activation du facteur NF- κ B dans les cellules épithéliales et inflammatoires des souris sauvages induisant ainsi l'augmentation de la prolifération et une inhibition de l'apoptose cellulaire (Shigematsu, Niwa et al. 2013). L'utilisation de modèles expérimentaux a montré que la production locale d'IL-1 β dans la muqueuse gastrique influence la croissance tumorale et la métastase en potentialisant la prolifération cellulaire ou en induisant l'inflammation et l'angiogénèse. Mitchell et al. ont rapporté que les cellules dendritiques stimulées par *H. pylori* induisent la prolifération des Tregs et l'altération de leur capacité suppressive. Cet effet semble être médié par l'IL-1 β produite par les cellules dendritiques stimulées par *H. pylori* (Mitchell, Afzali et al. 2012).

Plusieurs études ont montré une association entre le risque de développer un cancer et les polymorphismes génétiques des gènes liés aux interleukines IL-1 β , IL1RN, IL10 et le facteur de nécrose tumorale- α , le TNF- α . L'allèle IL-1B -511T est un facteur de risque d'adénocarcinome gastrique (Figueiredo, Machado et al. 2002). Le gène IL-1B possède trois polymorphismes bialléliques aux positions -511, -31 et +3954 pb du site de départ transcriptionnel, tandis que le gène IL-1RN a un nombre variable de répétitions en tandem identiques de 86 pb dans l'intron (Persson, Engstrand et al. 2009). Il est reporté que les niveaux d'IL-1 β diffèrent significativement entre les génotypes IL-1B-511, -31 et IL-1RN. De plus, les porteurs des polymorphismes IL-1B-511 T, -31 C et IL-1RN *2 (allèle avec deux répétitions) ont une production importante d'IL-1 β par rapport aux porteurs des autres génotypes (Hwang, Kodama et al. 2002). L'IL-1 β est également un puissant inhibiteur de la sécrétion d'acide gastrique; c'est un inhibiteur 100 fois plus puissant que les inhibiteurs de la pompe à protons et 6000 fois plus puissant que les antagonistes des récepteurs H2 sur une base molaire. Théoriquement, une production accrue d'IL-1 β dans la muqueuse gastrique entraînerait une suppression accrue de la sécrétion d'acide gastrique ainsi qu'une augmentation de l'inflammation, permettant l'expansion de la colonisation de *H. pylori* dans l'antra gastrique de l'estomac et à la progression de l'atrophie gastrique (Sugimoto, Furuta et al. 2007). Furuta et al. ont rapporté des différences dans les niveaux de pH intra gastrique à jeun entre les individus infectés par *H. pylori* portant l'allèle IL-1B-511 T comparés à ceux portant l'allèle IL-1B-511 C. De plus, l'infiltration des cellules inflammatoires est significativement plus élevée chez les porteurs du génotype IL-1B-511 T / T que chez ceux du génotype C / T ou C / C (Furuta, El-Omar et al. 2002). Des données similaires en ce qui concerne le score d'infiltration des neutrophiles a également été trouvé entre les individus portant les génotypes IL-1RN *1/*1 (*1 allèle avec 4 répétitions) et IL-1RN *1/*2 (Furuta, El-Omar et al. 2002). Plusieurs études épidémiologiques ont révélé que les individus portant la combinaison génétique d'IL-1B-511 T et d'IL-1B-31 C ou d'IL-1RN *2/*2 (2 répétitions de

86 pb), ont un risque plus élevé de développer une atrophie gastrique, l'ulcère gastroduodénale et le cancer gastrique que les individus portant les allèles IL-1B-511 C, IL-1B-31 T ou non IL-1RN*2 (Furuta, El-Omar et al. 2002, Furuta, Shirai et al. 2002, Hwang, Kodama et al. 2002). Chakravorty et al (Chakravorty, Ghosh et al. 2006) ont rapporté une fréquence significativement plus élevée de génotypes IL-1B-511 T/T et -31 C/C chez les individus infectés par *H. pylori* ayant des ulcères duodénaux par rapport aux individus infectés avec une muqueuse normale. L'haplotype C/T des polymorphismes IL-1B-511 et IL-1B-31 est également présent à une fréquence significativement plus élevée chez les patients ayant des ulcères duodénaux infectés par *H. pylori* que chez les témoins infectés. Une analyse quantitative de l'IL-1B au niveau de la muqueuse gastrique a révélé que parmi les individus infectés par *H. pylori*, les porteurs du génotype -31 C/C avaient des taux de transcription IL-1B significativement plus faibles que les porteurs des génotypes C/T et T/T.

c- Interleukine -17A

Plusieurs études ont mis en évidence le rôle de l'IL-17A dans l'infection par *H. pylori* et dans les pathologies associées. Cette cytokine contribue au recrutement des cellules immunitaires innées au site de l'infection, et est associée à des réponses antimicrobiennes avec le contrôle de la colonisation de la muqueuse par *H. pylori* dans plusieurs modèles animaux (Shiomi, Toriie et al. 2008, Otani, Watanabe et al. 2009).

IL17A ; une protéine de 155 acides aminés, est sécrétée sous forme de glycoprotéine avec une masse moléculaire de 35 kDa. Elle appartient à une famille de cytokines qui comprend six membres dont Il-17A, Il-17B, Il-17C, Il-17D, Il-17E (IL-25) et Il-17F (Moseley, Haudenschild et al. 2003). L'IL-17A, communément appelée IL-17, joue un rôle crucial dans le système immunitaire des mammifères. Il a été établi que les lymphocytes T CD4⁺ qui produisent préférentiellement IL-17A et IL-17F pourraient être générés et former une lignée distincte de cellules Th17 (Harrington, Hatton et al. 2005, Park, Li et al. 2005). En plus de la sécrétion de l'IL-17, les cellules Th17 peuvent également produire de l'IL-22 et de l'IL-21 (Ouyang, Kolls et al. 2008). Parmi la famille IL-17, l'IL-17F possède la plus grande homologie de séquence d'acides aminés (60%) avec l'IL-17A (Hymowitz, Filvaroff et al. 2001). L'IL-17 est capable d'induire la production de facteur de stimulation des colonies de granulocytes-macrophages (GM-CSF), de peptides antimicrobiens par des cellules endothéliales et épithéliales, de cytokines, de chimiokines et de métalloprotéinases matricielles à partir de fibroblastes. Après l'infection par *H. pylori*, la voie IL-23/IL17 favorise le recrutement des neutrophiles, conduisant à la clairance des bactéries extracellulaires (Iwakura and Ishigame 2006). Aux premiers stades de l'infection par *H. pylori*, les macrophages et les CD4⁺ produisent de l'IL-23 déclenchant la sécrétion de l'IL-17 par les cellules T résidentes dans les tissus. L'IL-17 agit par la suite sur les cellules endothéliales, épithéliales et stromales, ainsi que sur des monocytes qui produisent diverses cytokines et chimiokines pro-inflammatoires, comme le TNF- α , l'IL-

1 β , l'IL-6, l'IL-8 et le ligand CXCL 1 qui recrutent rapidement des neutrophiles sur le site de l'infection (Iwakura and Ishigame 2006). Il a été démontré que les taux d'IL-17A augmentaient dans la muqueuse gastrique des patients infectés par *H. pylori* (Caruso, Fina et al. 2008). Cette étude a indiqué que les niveaux gastriques d'IL-17A dans l'antrum étaient augmentés chez les patients infectés par *H. pylori*, en particulier dans la phase chronique de l'infection. En outre, le recrutement et l'activation des neutrophiles induite par l'IL17, est un élément cellulaire clé dans l'induction des lésions inflammatoires associées à l'infection par *H. pylori* (Fox and Wang 2007). Il a été montré qu'au cours des premiers stades de l'infection à *H. pylori*, il y a une augmentation significative de l'IL-17A et de l'IFN- γ . Cette étude a suggéré que l'infection bactérienne induit une réponse cellulaire mixte Th17 / Th1 et que la voie Th17 / IL-17 module les réponses des cellules Th1 et contribue à la pathologie. Le traitement des souris avec un anticorps anti-IL-17 a réduit significativement la charge bactérienne et l'inflammation dans l'estomac (Shi, Liu et al. 2010). Le rôle de l'IL-17A dans la défense contre la prolifération de *H. pylori* n'a pas été complètement élucidé. Les études concernant les souris IL-17RA^{-/-} suggèrent que la signalisation d'IL-17A est nécessaire pour le contrôle de la charge bactérienne (Algood, Allen et al. 2009).

CHAPITRE II. ROLE DE L'INFLAMMASOME NLRP3 DANS LES INFECTIONS A GERMES INTRACELLULAIRES : CAS DES VIRUS à ARN ET DE *H. PYLORI*.

I) Généralités sur les inflammasomes

La fonction la plus caractérisée de la famille NLR (membre de la famille des PRRs) est la formation de certains inflammasomes (Broz and Dixit 2016). Cinq membres de la famille NLRs (NLRP1, NLRP3, NLRC4, NLRP6 et pyrin) et un membre de la famille PYHIN (AIM2) forment des complexes multi-protéiques élevés appelés inflammasomes (Figure :11). Les inflammasomes sont généralement des complexes tripartites composés d'un NLR, de l'adaptateur ASC (apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD domain) et de la caspase-1. L'ordre précis des événements conduisant à l'activation des inflammasomes reste ambigu pour tous les inflammasomes. A l'état basal les différents composants du complexe ne sont pas assemblés et les caspases sont inactives. L'assemblage ne s'effectue que si le récepteur détecte un activateur ce qui permet le recrutement de la protéine adaptatrice ASC puis de la protéine effectrice en particulier la caspase-1 responsable du clivage des zymogènes pro-IL-1 β et pro-IL-18 en leurs formes biologiquement actives, et initie une forme de mort cellulaire pro-inflammatoire programmée appelée pyroptose (Broz and Dixit 2016). Toutefois l'IL-1 β et IL-18 sont de puissantes cytokines pro-inflammatoires, qui sont importantes pour stimuler les réponses immunitaires adaptatives spécifiques à l'antigène et pour réparer les tissus (Dinarello 2009). Cependant, une sécrétion non contrôlée d'IL-1 β peut entraîner une fibrose ainsi que des troubles auto-inflammatoires (Fink and Cookson 2005).

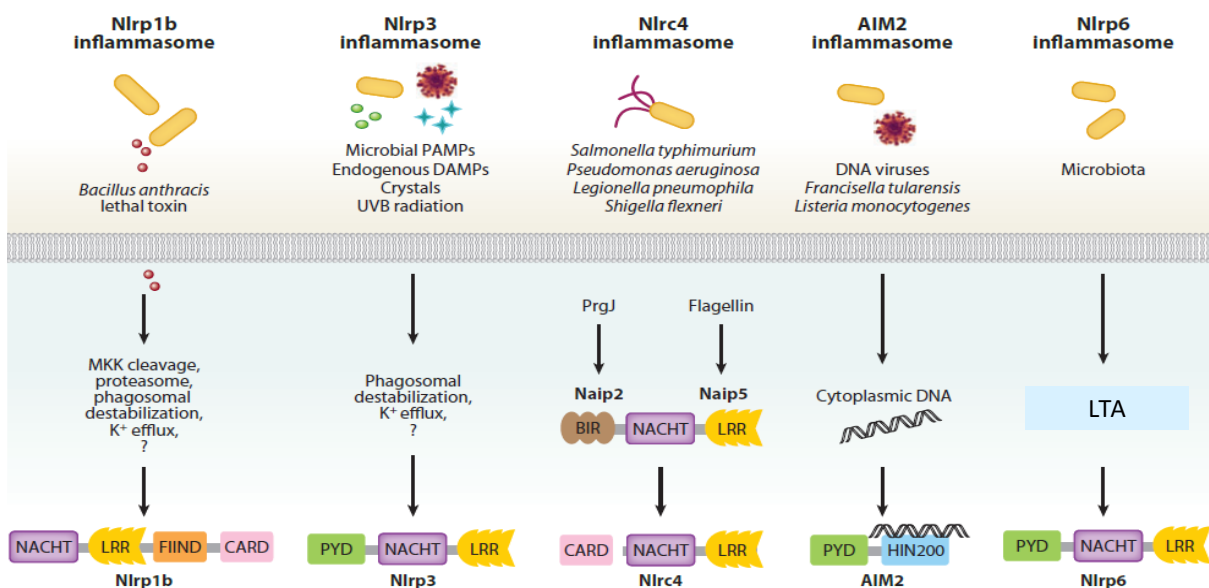


Figure 11 : Modèle des stimuli et d'activation des inflammasomes. Référence modifiée d'après

(Lamkanfi and Dixit 2012).

L'activation des inflammasomes nécessite deux signaux. Le premier signal « priming » (ou amorçage en français) entraîne l'activation du facteur de transcription NF- κ B et provoque la production de pro-IL-1 β et régule positivement la transcription et la traduction de NLRP3 (Bauernfeind, Horvath et al. 2009). De nombreux signaux inflammatoires, y compris la stimulation des TLRs comme le TLR4 ainsi que l'activation de récepteurs de cytokines pro-inflammatoires, notamment les récepteurs pour le TNF- α ou IL-1 β sont capables de fournir ce premier signal (Bauernfeind, Horvath et al. 2009, Franchi, Eigenbrod et al. 2009). Initialement, on pensait que l'amorçage ne servait qu'à augmenter les niveaux de pro-IL-1 β , augmentant ainsi la disponibilité du substrat pour la caspase-1. Néanmoins des travaux sur l'exigence d'amorçage de l'inflammasome NLRP3 ont démontré que l'amorçage régule l'expression de NLRP3 et que cette expression accrue est requise pour l'activation de l'inflammasome NLRP3 (Swanson, Deng et al. 2019).

Des études ont montré que l'amorçage induit diverses modifications post-traductionnelles des composants des inflammasomes, qui permettent l'activation de ces derniers. Dans les conditions basales, NLRP3 est polyubiquitinylé en K63. Cependant, lors du traitement au LPS, NLRP3 est rapidement deubiquitinylé par BRCC3, un membre de la famille des enzymes de dé-ubiquitinylation contenant des domaines JAMM, qui est essentiel pour l'activation de l'inflammasome NLRP3 (Juliana, Fernandes-Alnemri et al. 2012, Py, Kim et al. 2013). De plus, la phosphorylation de ASC a été associée à l'activation des inflammasomes NLRP3 et AIM2 : Hara *et al.* ont démontré que la phosphorylation Y144 de l'ASC par les kinases Syk et Jnk est nécessaire pour l'activation des inflammasomes (Hara, Tsuchiya et al. 2013). Ensemble, ces données mettent en évidence l'importance de l'amorçage dans la régulation de l'activation des inflammasomes via des mécanismes transcriptionnels et post-traductionnels.

Le deuxième signal provoque l'assemblage et l'activation de l'inflammasome et peut être fourni par une variété de stimuli (Schroder and Tschopp 2010). Les quatre PRRs connus pour former des inflammasomes répondent chacun à des stimuli spécifiques. Le NLRP1 humain, est le NLR qui a défini l'inflammasome pour la première fois (Martinon, Burns et al. 2002). Il est unique dans sa structure de domaine contenant un domaine pyrin N-terminal (PYD), une fonction C-terminale (FIIND), et un domaine CARD (Martinon, Mayor et al. 2009). Il a été démontré que l'inflammasome NLRP1b s'active en réponse à la toxine de *Bacillus anthracis* (Boyden and Dietrich 2006, Hsu, Ali et al. 2008, Kovarova, Hesker et al. 2012). Le NLRP1b, en conjonction avec le NOD2, a également été impliqué dans la sécrétion d'IL-1 β en réponse au dipeptide muramyl (MDP) bactérien (Hsu, Ali et al. 2008), mais ces données ont été remises en question par d'autres chercheurs qui n'ont pas pu reproduire ces résultats (Kovarova, Hesker et al. 2012).

NLRC4 est activé par les systèmes de sécrétion bactérienne de type 3 et de type 4 ou par la

flagelline cytosolique via l'utilisation des membres de la famille NLR, NAIP2 ou NAIP5, respectivement (Miao, Alpuche-Aranda et al. 2006, Zamboni, Kobayashi et al. 2006, Miao, Mao et al. 2010, Zhao, Yang et al. 2011). NLRC4 est unique parmi les NLRs, car il est le seul membre identifié à ce jour qui ne reconnaît pas directement son ligand. La phosphorylation de NLRC4 à la Ser 533 par la protéine kinase C (PKC) δ est importante pour l'activation de l'inflammasome NLRC4 (Qu, Misaghi et al. 2012). Cependant, le rôle précis de la phosphorylation Ser 533 dans l'activation de l'inflammasome NLRC4 reste incertain. Le mécanisme par lequel NLRC4 et les NAIPs interagissent et activent la caspase-1 n'est pas encore clairement défini.

Le membre de la famille PYHIN, AIM2, forme également un inflammasome. AIM2 est composé d'un domaine PYD et d'un HIN-200C. AIM2 sert de PRR majeur pour la reconnaissance de l'ADN cytosolique d'origine microbienne. L'activation de AIM2 par l'ADN cytosolique provoque la formation d'un inflammasome contenant AIM2, ASC et la caspase-1 (Ludlow, Johnstone et al. 2005, Muruve, Pétrilli et al. 2008, Fernandes-Alnemri, Yu et al. 2009, Hornung, Ablasser et al. 2009, Roberts, Idris et al. 2009, Schattgen and Fitzgerald 2011). Cette activation est importante dans la défense de l'hôte contre divers virus et les bactéries à Gram négatif (Fernandes-Alnemri, Yu et al. 2010, Jones, Kayagaki et al. 2010, Rathinam, Jiang et al. 2010, Ulland, Janowski et al. 2013).

Le NLRP6, membre de la famille des récepteurs de type NOD, est le moins caractérisé. Il forme un inflammasome impliqué dans la reconnaissance des microbes et de l'homéostasie intestinale (Wlodarska, Thaiss et al. 2014). Dans l'intestin, le NLRP6 est exprimé dans les cellules épithéliales intestinales et favorise la production d'IL-18 et la réparation des cellules épithéliales en réponse aux lésions intestinales induites chimiquement (Huber, Gagliani et al. 2012). Le NLRP6 agit également au sein des cellules caliciformes intestinales pour réguler la production de mucus (Birchenough, Nyström et al. 2016). De plus, le NLRP6 fonctionne au sein des macrophages pour limiter l'inflammation causée par les bactéries commensales dans l'intestin et pour réguler l'infection systémique par des agents pathogènes bactériens (Seregin, Golovchenko et al. 2017). Bien que le NLRP6 puisse s'associer à la caspase-1 et à l'adaptateur ASC dans les études de surexpression (Levy, Thaiss et al. 2015), la nature de l'activation de l'inflammasome NLRP6 et de son agoniste reste incertaine. Il est démontré que LTA (l'Acide Lipotéichoïque), une molécule produite par des bactéries Gram-positives, se lie et active NLRP6 conduisant au recrutement et à l'activation de la caspase-11 via l'adaptateur ASC. Lors d'une infection à *Listeria monocytogenes* ou de la présence de LTA cytosolique, le NLRP6 forme un complexe protéique contenant la caspase-11 et la caspase-1 qui régule la sécrétion d'IL-18 dans les macrophages (Hara, Seregin et al. 2018).

II) L'Inflammasome NLRP3

II-1) Activation de l'inflammasome NLRP3

À ce jour, l'inflammasome NLRP3 est le mieux caractérisé des récepteurs connus pour former des inflammasomes, et semble être le plus étudié en terme de mécanismes d'activation. NLRP3 a été identifié à l'origine comme un gain de mutation fonctionnelle associé aux troubles auto-inflammatoires du syndrome de l'urticaire familiale au froid (FCAS), du syndrome CINCA (chronique, infantile, neurologique, cutané et articulaire) et du syndrome de Muckle-Wells. Ensemble ces maladies sont maintenant connues sous le nom de syndromes périodiques associés à la cryopyrine (Hoffman, Mueller et al. 2001, Agostini, Martinon et al. 2004).

Le récepteur NLRP3 peut être activé par une très grande variété d'agonistes, comme des composants issus d'infections, de dommages tissulaires ou de désordres métaboliques. L'activation de l'inflammasome NLRP3 permet l'assemblage des récepteurs NLRP3, des protéines adaptatrices ASC et de la caspase-1 effectrice, et nécessite également deux signaux : D'une part, une induction de la transcription, dépendante de la voie NF- κ B, qui requiert la fixation de ligands de TLR ou de NLR ou des cytokines inflammatoires, comme mentionné dans la partie précédente. D'autre part, un activateur qui permet l'oligomérisation de NLRP3.

Contrairement à NLRP1b, NLRC4 et aux NAIP, l'inflammasome NLRP3 n'est pas, ou peu, exprimé de façon constitutive dans la plupart des cellules résidentes comme les macrophages et les cellules dendritiques. Un premier signal fourni par les activateurs de la voie NF- κ B, comme l'activation du TLR4 par le LPS est nécessaire mais pas suffisant pour l'activation de NLRP3 (Bauernfeind, Horvath et al. 2009). Le NF- κ B permet la synthèse et l'accumulation de pro-IL-1 β et de NLRP3. Un deuxième signal, comme l'amiante, la silice (Dostert, Pétrilli et al. 2008), les adjuvants d'aluminium (« Alum ») (Eisenbarth, Colegio et al. 2008), l'ATP (Adénosine Tri-Phosphate) via la signalisation par le récepteur purinergique P2X7 (Mariathasan, Weiss et al. 2006), des infections virales (Ichinohe and Iwasaki 2009), des produits de champignons (Gross, Poeck et al. 2009). En effet, il a été montré que les champignons induisent généralement des ROS, un efflux de K⁺ et une libération d'IL-1 β dépendant de la rupture lysosomale. Le deuxième signal peut être aussi des ARN ou ADN bactériens (Kanneganti, Ozören et al. 2006, Muruve, Pétrilli et al. 2008) : la toxine bactérienne nigéricine permet l'oligomérisation de NLRP3 et la formation de l'inflammasome (Pelegriin and Surprenant 2007). Lorsqu'il est activé, l'inflammasome NLRP3 recrute la protéine adaptatrice ASC qui recrute à son tour la pro-caspase-1 qui va alors s'activer. La caspase-1 « active » peut induire une mort cellulaire ou la maturation des cytokines pro-inflammatoires IL-1 β et IL-18 (figure 12). Des molécules endogènes en excès constituent aussi des signaux de danger et peuvent déclencher une inflammation dite stérile (absence de pathogènes) notamment l'amiante, la silice, l'aluminium etc. L'inflammasome NLRP3 est ainsi impliqué dans la

pathogénèse de maladies inflammatoires stériles comme la goutte, l'athérosclérose, les diabètes de type 2 et la maladie d'Alzheimer. Ces maladies sont causées respectivement par des cristaux d'acide urique (MSU) dans les articulations (Martinon, Pétrilli et al. 2006), du cholestérol (Düwell, Kono et al. 2010), des agrégats d'IAPP (Islet Amyloid PolyPeptide ou amyline) dans le pancréas (Masters, Dunne et al. 2010) et des agrégats de fibres de peptides d'amyloïde- β dans le cerveau (Halle, Hornung et al. 2008). Récemment, la kinase 7 liée à NIMA (NEK7), une sérine-thréonine kinase connue pour son implication dans la mitose, s'est avérée essentielle pour l'activation de l'inflammasome NLRP3. NEK7 interagit spécifiquement avec NLRP3, mais pas les autres capteurs d'inflammasome NLRC4 (NOD, LRR et CARD contenant 4) ou la protéine inductible par interféron AIM2. Lors de l'activation de l'inflammasome, l'interaction NEK7-NLRP3 augmente et NEK7 s'oligomérisse avec NLRP3 en un complexe essentiel pour la formation de speck d'ASC et l'activation de la caspase 1. Ainsi, NEK7 semble être un composant central spécifique de l'inflammasome NLRP3 (Swanson, Deng et al. 2019).

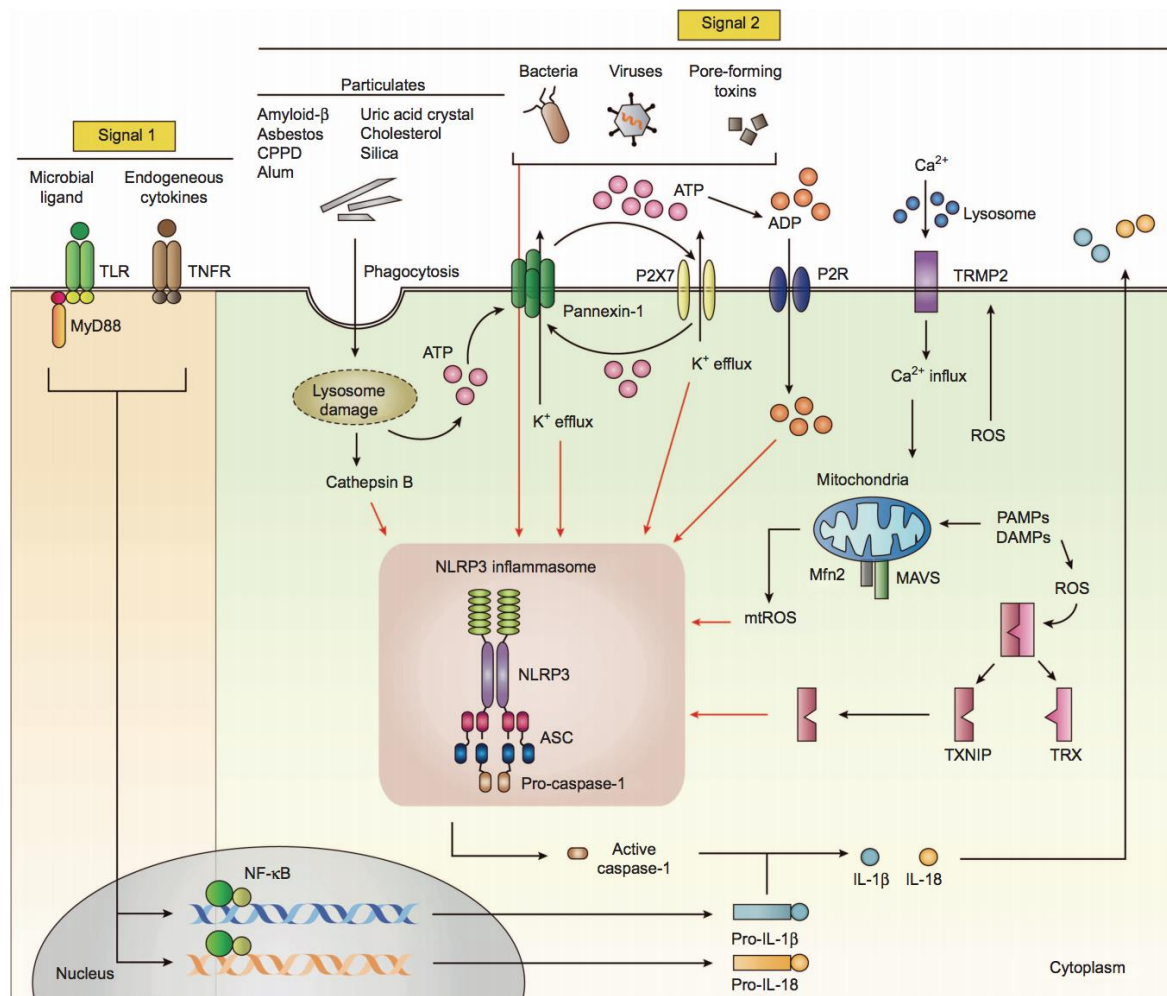


Figure 12 : Activation de l'inflammasome NLRP3 via les deux signaux. (Jo, Kim et al. 2016) :

Dans des conditions non infectieuses, l'efflux extracellulaire d'ATP et de K^+ conduit à l'activation de l'inflammasome NLRP3 via le récepteur P2X7 et la pannexine-1. Diverses particules endogènes et exogènes, y compris les

cristaux MSU, les cristaux CPPD, les cristaux de cholestérol, l'amyloïde- β , les cristaux de silice, l'amiante et l'alum, favorisent les lésions lysosomales et libèrent la cathepsine B dans le cytosol, conduisant à l'activation de l'inflammasome NLRP3. L'acide urique, silice et alum sont également capables de déclencher l'assemblage de l'inflammasome par la signalisation de plusieurs récepteurs purinergiques. De plus, l'efflux de calcium via TRPM2 active l'inflammasome NLRP3 via les ROS mitochondriales. Le TXNIP dissocié, qui est déclenché par des ROS intracellulaires, active également l'inflammasome NLRP3. L'ADP, adénosine diphosphate; ATP, adénosine triphosphate; K⁺, potassium; ASC, protéine de type speck associée à l'apoptose contenant un domaine de recrutement de caspase C-terminal; CPPD, pyrophosphate de calcium déshydraté; DAMP, motifs moléculaires associés aux dommages; P2X7, P2X purinoceptor 7; P2R, récepteur purinergique; PAMP, motifs moléculaires associés aux agents pathogènes; ROS, espèces réactives de l'oxygène; TLR, récepteurs de type péage; TNF- α , facteur de nécrose tumorale- α ; TXNIP, protéine d'interaction avec la thiorédoxine (TRX).

De nombreuses études ont confirmé que l'efflux de potassium, une augmentation du calcium intracellulaire et des espèces réactives de l'oxygène (ROS) sont nécessaires pour l'activation de l'inflammasome NLRP3 (Cruz, Rinna et al. 2007, Pétrilli, Papin et al. 2007, Cassel, Eisenbarth et al. 2008, Dostert, Pétrilli et al. 2008). La nécessité d'efflux de potassium *in vitro* a été démontré, indirectement, par l'utilisation de fortes concentrations de potassium extracellulaire qui perturbent le gradient de concentration de potassium entre les espaces intra et extracellulaires, ainsi que directement par l'inhibition pharmacologique des canaux potassiques (Cassel, Eisenbarth et al. 2008, Dostert, Pétrilli et al. 2008, Eisenbarth, Colegio et al. 2008, Franchi and Núñez 2008, Gross, Poeck et al. 2009, Ritter, Gross et al. 2010, Muñoz-Planillo, Kuffa et al. 2013). Bien qu'il soit connu que l'efflux de potassium est nécessaire pour l'activation de l'inflammasome NLRP3, son rôle précis dans l'activation de l'inflammasome NLRP3 reste incertain.

L'activité de l'inflammasome NLRP3 est étroitement régulée pour empêcher son activation incontrôlée, car une signalisation aberrante est associée à diverses maladies auto-immunes et métaboliques y compris la goutte, l'induction du syndrome périodique associé à la cryopyrine (CAPS) chez les individus sensibles, à l'obésité, le diabète de type 2 et la maladie d'Alzheimer (MA) (Menu and Vince 2011). Par conséquent, la régulation de l'axe NLRP3 IL-1 β / IL-18 avec cette multitude de maladies métaboliques et dégénératives peut avoir un rôle potentiel thérapeutique dans le traitement de ces maladies.

II-2) Régulation de l'amorçage

L'étape d'amorçage de l'inflammasome NLRP3 implique généralement une régulation positive de NLRP3 dépendant de NF- κ B cellulaire, une transcription du pro-IL-1 β et une synthèse protéique *de novo* lors de la reconnaissance de stimuli pro-inflammatoires (ligands des TLR) (Bauernfeind, Horvath et al. 2009). Cet amorçage dépendant de la transcription pour activer NF- κ B est médié par le domaine de mort associé à Fas (FADD) et plus tard par la caspase-8 (Gurung, Anand et al. 2014). D'autres données

ont révélé des mécanismes plus rapides d'amorçage de l'inflammasome NLRP3, qui sont indépendants de la transcription. Par exemple, la signalisation LPS – TLR4 – MyD88 dans les macrophages peut amorcer NLRP3 sans transcription en stimulant sa dé-ubiquitination (Juliana, Fernandes-Alnemri et al. 2012). Au-delà de TLR4, la liaison du TLR3 à l'ARNdb favorise l'amorçage post-traductionnel de l'inflammasome NLRP3 par les voies dépendantes de TRIF / RIPK1 / FADD dans les phases intermédiaires et tardives, qui nécessitent toutes les deux la fonction d'échafaudage FADD / caspase-8 (Kang, Fernandes-Alnemri et al. 2015).

II-3) Régulation post-transcriptionnelle

Des preuves émergentes montrent que l'inflammasome NLRP3 peut également être régulé au niveau post-transcriptionnel (Figure 13). Il a été démontré que des facteurs épigénétiques, notamment la méthylation de l'ADN et l'acétylation des histones, régulent l'expression de l'ARNm de NLRP3 en réponse à l'infection à *Mycobacterium tuberculosis* (Wei, Wang et al. 2016) et à la neuropathie douloureuse induite par le bortézomib (Liu, Huang et al. 2018). Jusqu'à présent, les microARN sont les régulateurs post-transcriptionnels les plus étudiés de l'inflammasome NLRP3. Parmi ces microARN on retrouve le miR-223 qui régule négativement l'activité de l'inflammasome NLRP3 en ciblant les sites de liaison UTR de NLRP3 dans les cellules myéloïdes (Bauernfeind, Rieger et al. 2012). Il a été proposé que miR-223 module les réponses immunitaires innées lors de l'inflammation intestinale et des lésions pulmonaires aiguës induites par les DAMPs (Neudecker, Haneklaus et al. 2017). L'expression aberrante des autres microARN cible et inhibe également l'inflammasome NLRP3 dans diverses situations pathologiques, comme le microARN-7 dans la neuroinflammation (Zhou, Lu et al. 2016), le microARN-30e dans la maladie de Parkinson (Li, Yang et al. 2018) et le microARN22 dans la maladie coronarienne (Huang, Wei et al. 2017) et le carcinome épidermoïde oral (Feng, Luo et al. 2018). Des études plus récentes commencent à éclaircir un rôle jusqu'alors imprévu des longs ARN non codants (lncRNA) dans l'orchestration de l'activation de l'inflammasome NLRP3. Parmi ceux-ci, l'ARN non codant antisens dans le locus INK4 (ANRIL) peut neutraliser miR-122-5p pour améliorer l'activation de l'inflammasome NLRP3 dans la néphropathie à l'acide urique (Hu, Wu et al. 2019). Il a été rapporté que d'autres lncRNA favorisaient ou atténuaient la signalisation de l'inflammasome, y compris Neat1 (Zhang, Cao et al. 2019) et Gm15441 (Brocker, Kim et al. 2020).

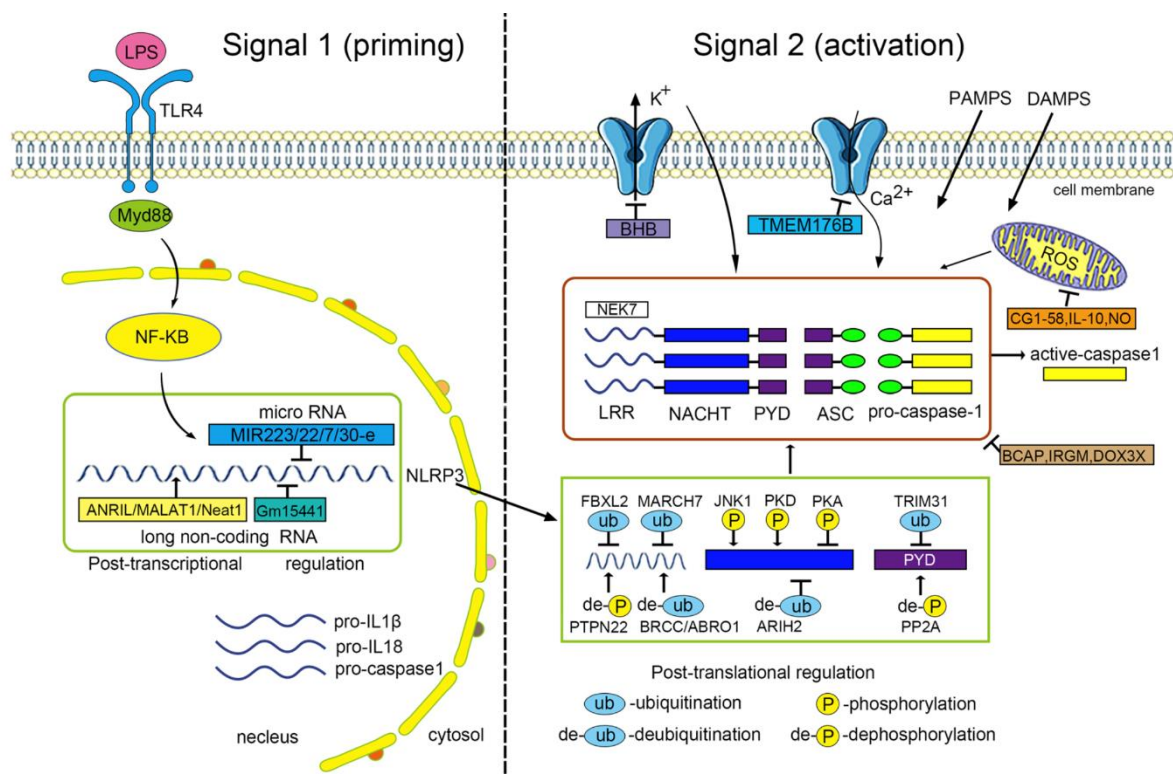


Figure 13 : Régulation de l'activation de l'inflammasome NLRP3. (Zheng, Liwinski et al. 2020)

II-4) Modulation post-traductionnelle

La régulation de l'inflammasome NLRP3 par des modifications post-traductionnelles, y compris la phosphorylation et la désubiquitination, est de plus en plus étudiée. La phosphorylation médiée par JNK1 de NLRP3 sur la Ser194 (correspondant à Ser198 humaine) est un événement clé d'amorçage non transcriptionnel provoquant l'auto-association de NLRP3 et l'assemblage ultérieur de l'inflammasome (Song, Liu et al. 2017). En outre, l'ubiquitine ligase Pellino2 d'E3 favorise l'ubiquitination de NLRP3 dans l'étape d'amorçage non transcriptionnel et facilite l'activation de l'inflammasome NLRP3, tandis que l'ubiquitination et la dégradation de NLRP3 médiées par la ligase FBXL2 E3 jouent un rôle régulateur négatif dans cette activation de l'inflammasome (Humphries, Bergin et al. 2018). Au cours de l'étape d'activation, la phosphorylation de NLRP3 par la protéine kinase D (PKD) sur la Ser293 (ou Ser295 humaine) est suffisante pour déclencher l'assemblage de l'inflammasome (Zhang, Meszaros et al. 2017). En revanche, la phosphorylation induite par PKA de NLRP3 au niveau de la Ser 291 chez la souris induit la régulation négative de l'inflammasome NLRP3 (Guo, Xie et al. 2016). La déphosphorylation du domaine PYD du NLRP3 par la phosphatase 2A (PP2A) (Stutz, Kolbe et al. 2017), ou Tyr861 du NLRP3 par la protéine tyrosine phosphatase non-récepteur 22 (PTPN22) (Spalinger, Kasper et al. 2016) favorise également l'activation de NLRP3. Outre la phosphorylation, l'enzyme de déubiquitination BRCA1 / BRCA2 (BRCC3) contenant la sous-unité complexe 3 favorise une activation de l'inflammasome en déubiquitinant NLRP3 au niveau de son domaine LRR (Py, Kim et al. 2013).

ABRO1, un composant du complexe BRCC3, améliore l'activation de l'inflammasome NLRP3 en régulant la déubiquitination de NLRP3 après l'amorçage par le LPS (Ren, Zhang et al. 2019). D'autres exemples de régulation négative médiée par l'ubiquitination de l'inflammasome NLRP3 sont la ligase E3 induite par la dopamine MARCH7 (Yan, Jiang et al. 2015), l'homologue d'Ariane 2 (ARIH2) (Kawashima, Karasawa et al. 2017) et TRIM31 (Song, Liu et al. 2016). L'oxyde nitrique (NO), atténue l'activité de l'inflammasome NLRP3 au niveau post-traductionnel par S-nitrosylation directe (Mishra, Rathinam et al. 2013).

II-5) Régulation négative de l'activation de l'inflammasome NLRP3

En plus de la régulation post-transcriptionnelle et post-traductionnelle, un certain nombre de molécules peuvent interagir directement ou indirectement avec les composantes de l'inflammasome NLRP3, et inhibent l'assemblage de NLRP3 avec ASC et caspase-1. Par exemple, l'adaptateur de cellules B pour la phosphoinositide-3-kinase (BCAP) interagit avec l'inhibiteur du pseudo-substrat de la caspase-1 « Flightless-1 », inhibant ainsi le recrutement et l'activation de la pro-caspase-1 dans le « pré-inflammasome » contenant uniquement NLRP3 et ASC provoquant un retard dans l'élimination des pathogènes (Carpentier, Ni et al. 2019). Le facteur de risque IRGM de la maladie de Crohn interagit directement avec NLRP3 et ASC, bloque leur oligomérisation et empêche l'assemblage de l'inflammasome. Il intervient aussi alternativement dans l'autophagie sélective de NLRP3 et ASC assurant ainsi une protection contre les troubles inflammatoires intestinaux (Mehto, Jena et al. 2019). Les membres de la famille des protéines à Pyrin unique (POP), y compris POP1 (de Almeida, Khare et al. 2015) et POP2 (Ratsimandresy, Chu et al. 2017), bloquent l'assemblage de l'inflammasome en se liant à ASC et en inhibant le recrutement de ASC vers NLRP3. La protéine de granule de stress DDX3X, impliquée à la fois dans l'inflammasome NLRP3 et dans l'assemblage des granules de stress, régule l'activation de l'inflammasome NLRP3 en constituant un point de contrôle critique dans les cellules stressées (Samir, Kesavardhana et al. 2019). D'autres molécules inhibant l'interaction NLRP3–ASC comprennent le récepteur nucléaire orphelin (Yang, Kim et al. 2015), la protéine de choc thermique 70 (Martine, Chevriaux et al. 2019) et la famille NLR contenant le domaine CARD 3 (NLRC3) (Eren, Berber et al. 2017).

D'autres molécules régulatrices ciblant l'efflux d'ions, la fonction mitochondriale et la signalisation des ROS bloquent également l'activation de l'inflammasome NLRP3. Le β -hydroxybutyrate du corps cétonique (BHB) (Youm, Nguyen et al. 2015) inhibe l'inflammation induite par l'inflammasome NLRP3 en empêchant l'efflux de K^+ . La protéine transmembranaire 176B (TMEM176B) inhibe l'inflammasome NLRP3 en contrôlant le Ca^{2+} cytosolique, tandis que le blocage de TMEM176B peut améliorer l'activité anti-tumorale grâce à une activation accrue de l'inflammasome

(Segovia, Russo et al. 2019). Les récepteurs couplés aux protéines G, une classe diversifiée de récepteurs membranaires, initient mais suppriment également l'activation de l'inflammasome NLRP3 en régulant les flux ioniques et la production de mtROS (Tang, Gong et al. 2018). Le NO est également considéré comme un régulateur négatif crucial de l'inflammasome NLRP3 en induisant la stabilisation des mitochondries (Mishra, Rathinam et al. 2013). L'IL-10 inhibe l'activation de l'inflammasome NLRP3 en réduisant la production des ROS par les mitochondries (Ip, Hoshi et al. 2017).

III) Inflammasome NLRP3 et infection virale

Plusieurs virus activent l'inflammasome NLRP3. L'infection par le virus 1 de l'herpès simplex (HSV-1) de fibroblastes du prépuce humain déclenche l'association de ASC avec le NLRP3 ainsi que la production de caspase-1 et d'IL-1 β matures (Johnson, Chikoti et al. 2013). Le virus de la stomatite vésiculeuse (VSV), mais pas le VSV irradié aux UV, induit la libération d'IL-1 β via une voie dépendant de l'inflammasome NLRP3 et indépendamment de RIG-I (Rajan, Rodriguez et al. 2011). L'infection par le virus du Nil occidental (WNV) induit l'expression d'ASC, de la caspase-1 mature et la production d'IL-1 β chez les individus et les souris infectés. Les souris déficientes en composantes de l'inflammasome NLRP3 ; *Il-1r*^{-/-}, *Nlrp3*^{-/-}, *Casp-1*^{-/-} et *Asc*^{-/-} infectées par WNV présentent des taux de mortalité plus élevés que les souris WT infectées par le même virus (Ramos, Lanteri et al. 2012, Kumar, Roe et al. 2013). Le virus de la rage et le virus de la vaccine modifié (VACV) peuvent également déclencher la production d'IL-1 β via l'activation de l'inflammasome NLRP3 (Delaloye, Roger et al. 2009, Lawrence, Hudacek et al. 2013); cependant, le mécanisme d'activation de l'inflammasome reste non élucidé. L'infection par le virus de l'encéphalite japonaise (JEV) induit l'activation de la caspase-1 et la production d'IL-1 β et d'IL-18 dans les cellules BV-2 d'une manière dépendante de NLRP3. Le traitement au chlorure de potassium (pour inhiber l'activation du modèle de canal ionique de NLRP3) et d'un inhibiteur de ROS peut inhiber la maturation des interleukines et de la caspase-1 induite par le JEV (Kaushik, Gupta et al. 2012). Le virus de la fièvre de la vallée du Rift (RVFV) induit la libération d'IL-1 β grâce à l'activation de l'inflammasome NLRP3 et à la présence de l'adaptateur MAVS. La production de l'IL-1 β par les BMDC dérivés des souris *Mavs*^{-/-} est inhibée après infection par RVFV et cette dernière déclenche la co-localisation de MAVS et de NLRP3 (Ermler, Traylor et al. 2014). Le membre A de la famille 5 du domaine des lectines de type C (CLEC5A), qui est une lectine de type C, est importante pour l'activation de l'inflammasome NLRP3 induite par le virus de la dengue (Wu, Chen et al. 2013). La libération d'IL-1 β et d'IL-18, induite par le virus de la dengue et dépendante de NLRP3, est bloquée par le traitement avec du Glibenclamide (Inhibiteur de l'efflux de potassium), ou avec du CA-074-Me (un inhibiteur de Syk) ou l'utilisation de l'anticorps monoclonal antagoniste anti-CLEC5A. Il a été suggéré que CLEC5A interagit directement avec le virus de la dengue pour activer

l'inflammasome NLRP3. Le CLEC5A peut également être une cible possible pour de nouveaux médicaments antiviraux de la dengue. De plus la viroporine 2B de l'EMCV, et non l'ARN viral, joue un rôle dans l'activation de l'inflammasome NLRP3 induit par l'EMCV (Ito, Yanagi et al. 2012). L'expression de la protéine 2B induit la libération d'IL-1 β et la redistribution de NLRP3 dans la région périnucléaire où elle colocalise alors avec la protéine 2B. L'activité des canaux ioniques de la protéine 2B, qui réduit la concentration en ions calcium dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi, est impliquée de manière significative dans la sécrétion d'IL-1 β . La Thapsigargin (TG) et l'Ionomycine Ionophore Ca²⁺ (qui augmente les concentrations de Ca²⁺ cytoplasmique) induisent également la libération d'IL-1 β alors que le chélateur du Ca²⁺, BAPTA-AM, inhibe la libération d'IL-1 β induite par l'EMCV intact et par la protéine EMCV 2B (Ito, Yanagi et al. 2012).

IV) Inflammasome NLRP3 et infection par *H. pylori*

Des études ont identifié l'inflammasome NLRP3 comme étant activé lors de l'exposition des cellules dendritiques murines à *H. pylori* (Kim, Park et al. 2013, Semper, Mejías-Luque et al. 2014). L'activation du TLR2 est une condition préalable de l'activation de l'inflammasome NLRP3, car les cellules dendritiques déficientes en TLR (*TLR2*^{-/-}) sont incapables d'activer la caspase-1 et de sécréter des cytokines dépendantes de la caspase-1. En revanche, tous les autres TLR (TLR4, 5, 9) et le récepteur à IL-1 β sont dispensables pour l'activation de l'inflammasome NLRP3. Des travaux supplémentaires ont révélé que la signalisation TLR2 induite par *H. pylori* conduit à l'activation transcriptionnelle de NLRP3, qui est une étape régulatrice pour l'activation de cet inflammasome (Figure 14). L'expression de NLRP3 dépend de NF- κ B : l'inhibiteur de la translocation nucléaire de NF- κ B bloque à la fois l'expression transcriptionnelle de NLRP3, le clivage et la sécrétion des cytokines dépendantes de la caspase-1. Le rôle putatif d'une voie d'activation de l'inflammasome non canonique récemment identifiée qui implique la production et la signalisation des IFNs de type I via TRIF, IRF3/7 et la caspase-11 a été étudié (Rathinam, Vanaja et al. 2012). Cette voie ne semble pas être nécessaire pour l'activation de la caspase-1 par *H. pylori*. Un dysfonctionnement dans l'un des facteurs de l'axe TLR2 / NLRP3 / caspase-1 / IL-18 produit un phénotype qui rappelle la déplétion des Treg ou des cellules dendritiques, ce qui conduit à un meilleur contrôle des infections, une inflammation chronique et une immunopathologie plus prononcée (Arnold, Lee et al. 2011, Hitzler, Oertli et al. 2011, Oertli, Sundquist et al. 2012).

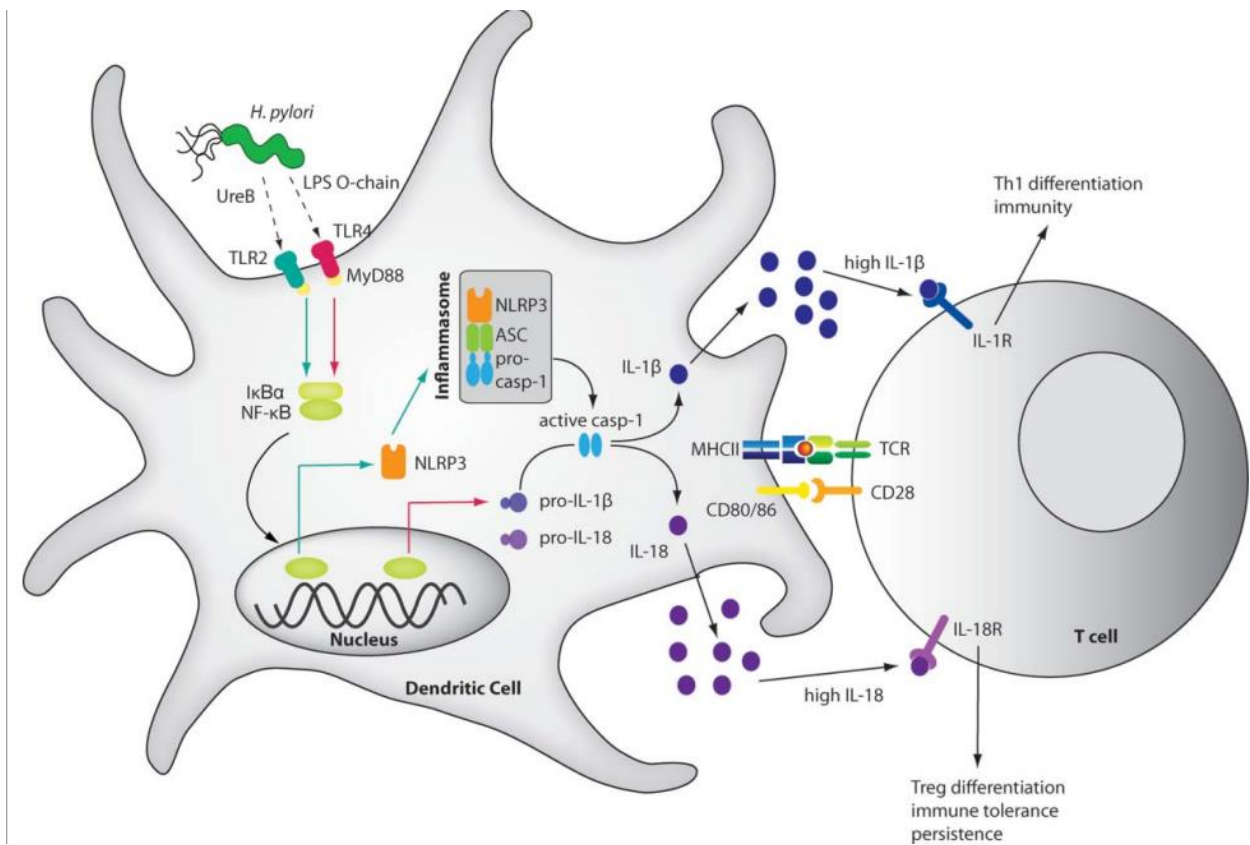


Figure 14 : Activation de l'inflammasome NLRP3 induit par *H. pylori*. (Koch and Müller 2015)

Enfin, Kim *et al.* ont montré que la sécrétion d'IL-1 β par les cellules dendritiques infectées par *H. pylori* nécessite TLR2, NOD2 et l'inflammasome NLRP3 (Kim, Park et al. 2013). Deux facteurs distincts et non redondants de la bactérie contribuent à l'activation des inflammasomes et à la production de cytokines dépendantes de la caspase-1 : l'axe LPS / TLR4 / MyD88 favorisant l'expression de la pro-IL-1 β et l'axe uréase / TLR2 / MyD88 favorisant l'expression de NLRP3 (Koch and Müller 2015).

Matériel et méthodes

I - Les patients

71 patients sont inclus dans cette étude concernant l'infection par *H. pylori* : ils sont de nationalité marocaine, résidents au Maroc et appartiennent à différentes ethnies. Les patients sont recrutés au niveau de l'hôpital Ibn Rochd de Casablanca au Maroc et de l'Hôpital Militaire d'Instruction Mohamed V rabat. Ces patients sont soit en consultation externe en Gastro-entérologie, soit des patients hospitalisés à l'hôpital.

Les patients ayant des douleurs épigastriques et référés pour une endoscopie gastro-intestinale supérieure sont recrutés. Les patients qui ont déjà subi une chirurgie gastroduodénale, ou traités contre l'infection à *H. pylori* ou qui ont pris des inhibiteurs de la pompe à protons ou des anti-inflammatoires au cours des 3 mois précédant l'endoscopie sont exclus de notre étude. Les antécédents médicaux sont obtenus auprès de chaque patient inclus dans notre étude. Les données personnelles et cliniques de chaque patient inclus dans l'étude sont collectées sur des fiches cliniques (Annexe 1) après avoir signé une fiche de consentement (Annexe 2).

Fibroscope et Biopsies gastriques

Les fibroscopes, majoritairement de la marque Fujinon®, permettent la réalisation de biopsies gastriques au moyen d'une pince à biopsie. La fibroscopie a été réalisée dans le service de gastroentérologie par un Gastro-entérologue.

Six biopsies d'environ 2mm chacune sont prélevées de l'estomac de chaque patient, trois au niveau de l'antra et trois au niveau du fundus (figure 15).

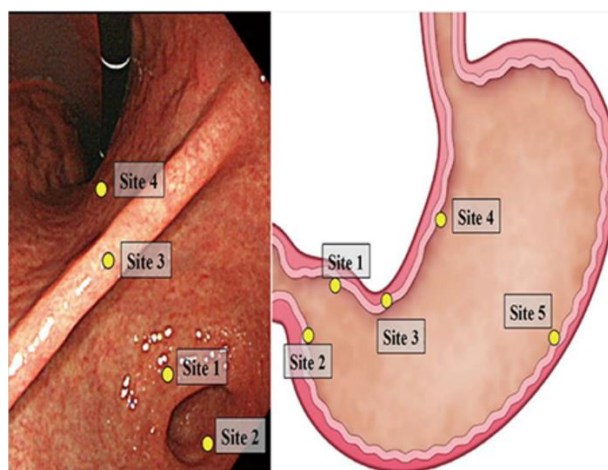


Figure 15 : Différents sites de prélèvement de biopsies gastriques. Site 1, 3 et 4 : petite courbure. Site 2 et 5 grande courbure (Matthew Banks et al. 2019).

Les biopsies prélevées sont ensuite soit mise dans un tube Eppendorf vide, soit plongées dans du RNA Later (Invitrogen) et sont destinées à l'étude moléculaire, soit plongées dans du formol pour l'étude histologique. Les 3 biopsies de chaque localité de l'estomac sont utilisées séparément : Une a servis à

l'extraction de l'ADN génomique, une à l'extraction des ARN totaux et la dernière a servi pour l'analyse histopathologique. Les procédures d'échantillonnage des biopsies ainsi que la méthode de manipulation des échantillons sont identiques pour les biopsies de l'antré et du fundus.

II- Analyses histopathologiques

L'analyse histopathologique a été réalisée dans le laboratoire du service d'anatomo-pathologie de l'hôpital Ibn Rochd de Casablanca.

Les biopsies gastriques sont fixées dans du formol à 10% pendant 24 h puis sont incluses dans de la paraffine. Des coupes séquentielles de 3 à 5 μm sont réalisées au microtome et colorées à l'hématoxyline-éosine et au Giemsa modifié pour les analyses histopathologiques de routine. L'analyse histopathologique a été réalisée selon le système de Sydney (Dixon, Genta et al. 1996).

L'examen anatomopathologique consiste à analyser au microscope des cellules ou des tissus prélevés sur un organe ; on parle aussi d'examen histopathologique. L'examen histopathologique est le plus classique et nécessite des prélèvements de bonne qualité et un observateur expérimenté. La détection de bactéries spirales se fait en surface après coloration par Hématéine Eosine Safran (HES) ou Giemsa, voire par réaction immunoenzymatique.

III- Etude de l'ADN génomique

III- 1 : Extraction de l'ADN génomique

Les biopsies destinées à l'extraction de l'ADN génomique sont broyées à l'aide d'une spatule dans des tubes eppendorfs stériles puis lysées dans du tampon de lyse contenant de la protéinase K à 200mg/ml (Annexe 3) pendant toute la nuit à 56°C. L'ADN génomique est extrait des lysats cellulaires en utilisant le protocole standard phénol-chloroforme.

Pour ce faire, 500 μl de phénol sont ajoutés aux lysats cellulaires pour séparer la phase organique de la phase aqueuse. Les ADN sont des molécules chargées négativement en raison des groupements phosphate dans leur structure. Ils sont insolubles dans les solvants organiques hydrophobes et solubles dans les solutions aqueuses hydrophiles. Après traitement par le phénol l'homogénat est centrifugé à 1600 g pendant 5 minutes. Les surnageants sont ensuite récupérés dans des tubes eppendorfs 1,5 ml auxquels on additionne 250 μl de chloroforme/isoamyl alcohol (25 :1). Le mélange est délicatement agité puis centrifugé à 1600 g pendant 3 minutes. Les surnageants sont directement récupérés dans des nouveaux tubes eppendorfs 1,5 ml puis mélangés avec 250 μl de chloroforme pur. Les surnageants récupérés après centrifugation à 2100g pendant 2 minutes, sont transférés dans des nouveaux tubes

eppendorfs 1,5 ml. 50µl de l'acétate de sodium [3M] + 500 µl Isopropanol 100% sont ajouté aux surnageants récupérés. Ensuite les surnageant sont laissés incuber à -20°C pendant 30 minutes puis centrifugés à 2100g pendant 45 minutes. Le culot est récupéré dans 250 µl d'éthanol 70%, centrifugé à 2100g pendant 10 minutes. A la fin, l'éthanol est éliminé et les tubes sont laissé sécher à température ambiante. Pour éluer l'ADN, le culot est mélangé avec 50 µl de H₂O stérile puis chauffé pendant 1heure à 60°C. La qualité des ADNs est contrôlée sur un gel d'agarose 0,8% sous rayons ultras violets ou par Nanodrop. Les ADNs sont ensuite aliquotés dans des tubes eppendorfs puis stokés à -20°C jusqu'à utilisation (Figure 16)

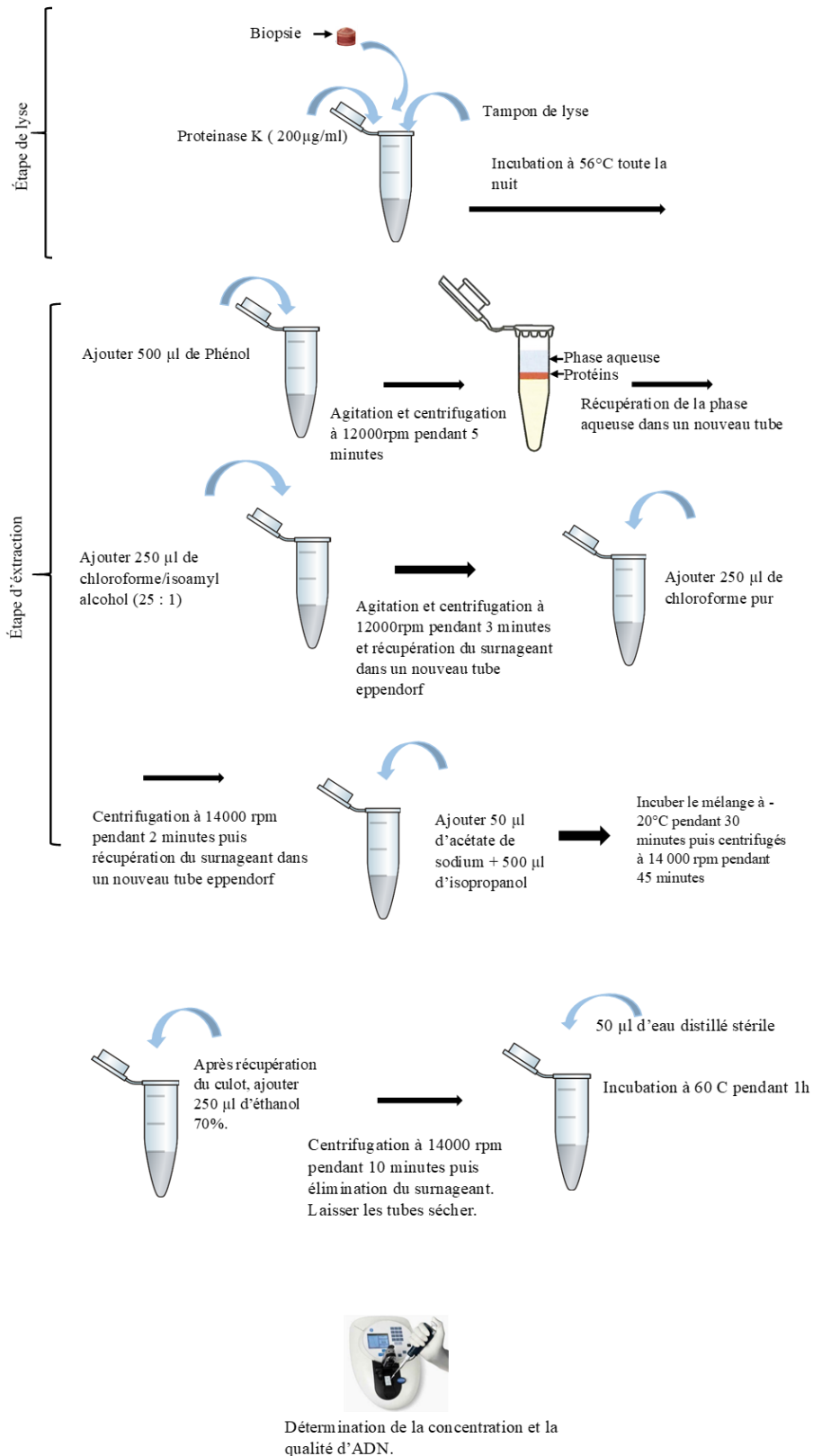


Figure 16 : Extraction de l'ADN au phénol-chloroforme.

III-2 : Identification de *H. pylori*

La présence de *H. pylori* a été évaluée par deux techniques : par examen anatomopathologique

(décrit ci-dessus) et par PCR (Polymerase Chain Reaction).

La PCR est une technique d'amplification d'ADN *in vitro* qui permet d'obtenir un très grand nombre de copies d'une séquence d'ADN choisie. Chaque cycle de PCR est constitué de trois étapes : une dénaturation de l'ADN par chauffage pour séparer les deux brins qui le composent, une hybridation des amorces aux extrémités de la séquence recherchée, puis une élongation grâce à l'action d'une ADN polymérase. Ce cycle est répété un grand nombre de fois pour obtenir une multiplication exponentielle de la séquence d'ADN cible (la durée d'un cycle est de l'ordre de la minute). Les amorces utilisées pour la PCR sont les amorces du gène d'ARNr 23S : sens 3'-GGA GCT GTC GTC TCA ACC AGA TTC-5' et anti-sens 3'-CGC ATG ATA TTC CCA TTA GCA G-5'.

Brièvement, 200 ng d'ADN total sont mélangés avec 1,5 mM de MgCl₂, 10 mM de dNTP, 10 µM de chaque amorce et 1 U de la Taq polymérase (Invitrogen, Canada) dans un volume final de 25 µL. Le mélange est soumis à 40 cycles d'amplification de 3 min à 94 °C, 45 s à 94 °C, 30 s à 55 °C et 90 s à 72 °C suivis d'une extension finale de 10 min à 72 °C dans un thermocycleur (Thermocycleur Biometra). Les amplicons sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose 3% et visualisés avec du bromure d'éthidium.

III-3 : Restriction enzymatique (PCR-RFLP)

L'étude des polymorphismes des gènes des cytokines a été réalisée par restriction enzymatique (PCR-RFLP). Dans cette étude seule le polymorphisme du gène de l'IL-1β a été présenté, le polymorphisme des gènes IL8 et IL17A sont en cours de réalisation par notre laboratoire.

Les polymorphismes du gène IL-1β à la position -31 et -511 sont des changements de nucléotides uniques dans la région promotrice. Le polymorphisme de l'IL-1RN est une répétition en tandem dans l'intron 2.

La PCR a été effectuée dans un volume final de 25 µl contenant 150 ng d'ADN, 1 µl de chaque amorce (New England Biolabs) et 1 U Taq-polymerase (One Taq, New England biolab). Le programme de PCR pour l'amplification des deux SNPs a été comme suivant : une dénaturation à 94°C pendant 5 min ; 94°C pendant 30 secondes, 56°C pendant 30s, 72°C pendant 30s (35 cycles) ; et enfin à 72°C pendant 5 minutes.

La digestion enzymatique a été réalisée pour les amplifiats des deux polymorphismes nucléotidiques par les enzymes de restriction suivant : *avaI* (C|YCGRG) pour le SNP à la position -511 et par *aluI* (AG|CT) pour le SNP à la position -31. 15 µl des produits amplifiés ont été digérés avec 5U de l'une des enzymes de restriction (New England Biolabs) à 37°C pendant 3 heures jusqu'à 12h.

La visualisation est réalisée sur gel d'agarose 3%. Les fragments trouvés analysés suivant le tableau 4.

Tableau 4 : Fragments issues suites à la digestion enzymatique des deux polymorphismes nucléotidiques IL-1 β -31 C/T et IL-1 β -511 T/C.

	TT	CT	CC
IL-1B -31 C/T	137 pb + 102 pb	238 pb + 137 pb + 102 pb	238 pb
IL-1B -511 T/C	304 pb	304 pb + 190 pb + 114 pb	190 pb + 114 pb

L'analyse des répétitions en tandem à nombre variable (VNTR) de l'intron 2 du gène IL1RN a été aussi réalisé par PCR en utilisant les amorces sens 5'-CCTCAGCAACACTCCTAT-3' et anti-sens 5'-TCCTGGTCTGCAGGTAA-3' selon le programme suivant : dénaturation à 95°C pendant 5 minutes suivi de 35 cycles à 95°C pendant 30 secondes, à 50°C pendant 30 secondes et à 72°C pendant 30 secondes et enfin l'élongation à 72°C pendant 5 minutes. Les différents allèles ont été identifiés selon la taille du fragment amplifié. La bande de 410 pb a été classée comme allèle 1, la bande de 240 pb a été classée comme allèle 2, la bande de 500 pb comme allèle 3, la bande de 325 pb a été classée comme allèle 4, et la bande de 595 pb a été classée comme allèle 5.

Les amplifias ont été visualisés sur gel d'électrophorèse à 2% d'agarose en présence de 2 μ l BET sous ultraviolet.

IV- Etude de l'expression génique

Cette étude a été réalisée pour l'expression des cytokines IL1- β , IL-8, IL-17A dans les biopsies gastriques.

IV-1 : Extraction de l'ARN total

Les biopsies gastriques destinées à l'extraction d'ARNm totaux ont été conservés dans du RNA Later (QIAGEN, Canada) à -80 °C jusqu'à utilisation. L'ARNm total est extrait des biopsies en utilisant 1ml de TRIZOL selon le protocole du fabricant.

Les biopsies sont homogénéisées à l'aide d'une seringue, puis incubées pendant 5 minutes dans 1ml de TRIZOL. 200 μ l de chloroforme sont ajoutés aux homogénats puis incubés pendant 2 à 3 minutes à 4°C. Les tubes sont ensuite centrifugés à 4°C, pendant 15 minutes à 12 000 g. La centrifugation permet d'obtenir 3 phases distinctes : la phase supérieure (aqueuse incolore) est transférée dans un nouveau tube eppendorf. 500 μ l d'isopropanol est ajouté à la phase aqueuse puis incubé pendant 10 minutes à 4°C.

Le mélange est centrifugé à 4°C pendant 10 minutes à 12 000 g. Le culot est ensuite lavé avec 1 ml d'éthanol 75% en mélangeant et centrifugeant le tube à 7500 g à 4°C. Le culot est ensuite séché entièrement puis élué avec 50 µl d'H₂O stérile. L'incubation des tubes à 55°C pendant 10 minutes permet une meilleure élution. La qualité des ARNm est contrôlée par l'utilisation d'un NANODROP (Thermo Scientific).

IV-2 : Transcription inverse

1 µg d'ARNm total est inversement transcrit en utilisant la transcriptase inverse (QuantiTect Reverse Transcription Kit, QIAGEN) selon le protocole du fabricant (Figure 17). La transcriptase inverse, ou rétro-transcriptase, est une enzyme qui permet de convertir l'ARN en ADN. Le brin d'ADN résultant de cette réaction est appelé ADN complémentaire (ADNc).

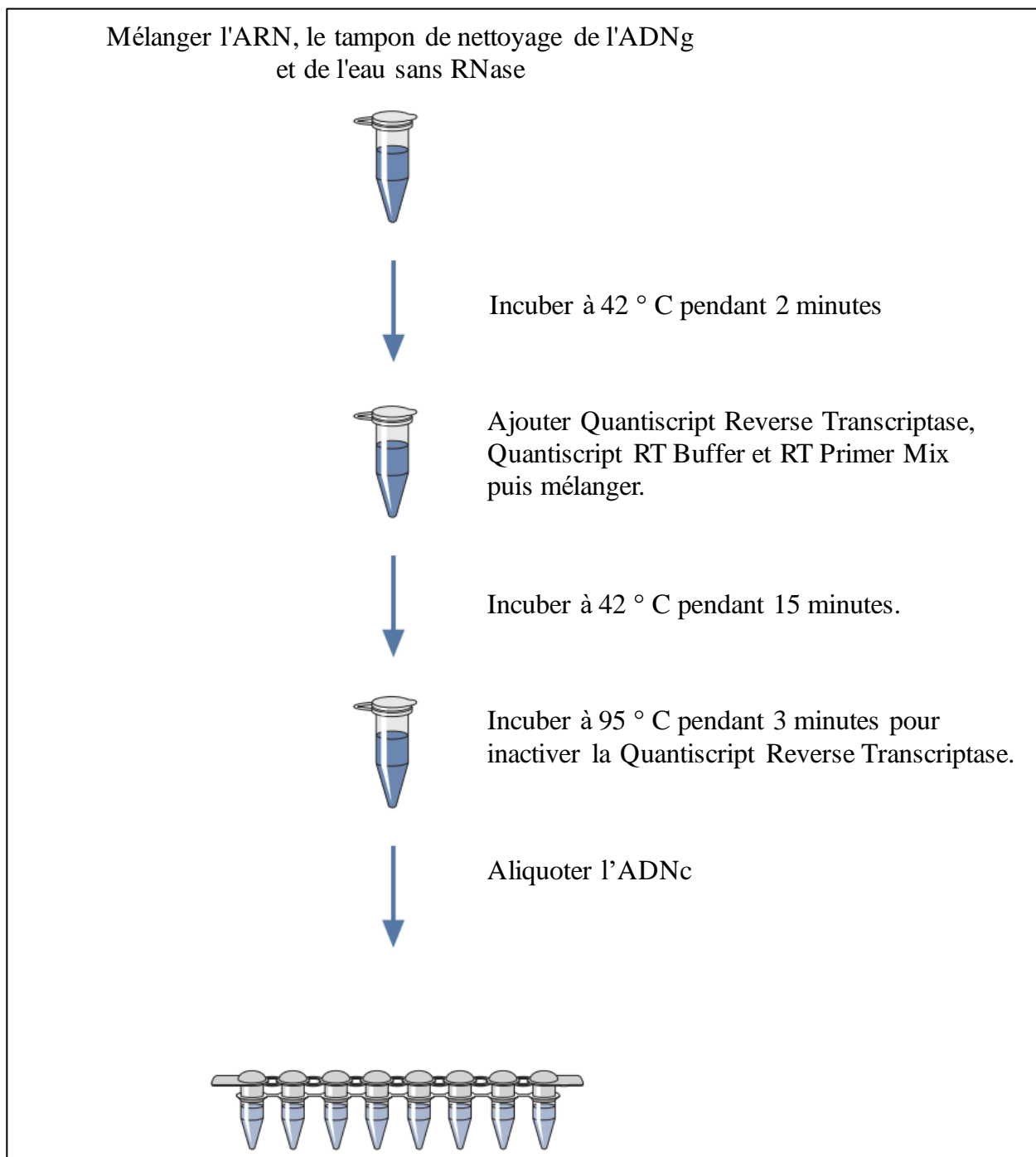


Figure 17 : Schéma illustratif du protocole de la transcriptase inverse. (QuantiTect Reverse Transcription Kit, QIAGEN)

Pour ce faire, le volume correspondant à 1 μg d'ARN est mélangé avec 2 μl du suppresseur d'ADN génomique (gDNA Wipeout Buffer 7x) et de l'eau stérile puis incubé pendant 2 minutes à 42°C. Les échantillons sont ensuite directement mis dans de la glace. La réaction de la transcription inverse se fait selon le tableau 5. Le mélange est incubé pendant 15 minutes à 42°C puis à 90°C pendant 3 minutes pour inactiver la transcriptase inverse puis les cDNA sont stockés à -20°C jusqu'à utilisation.

Tableau 5 : Volumes utilisés pour chacun des composants de la réaction de la transcription inverse.

Composants	Volumes
Reverse-transcription master mix. Quantiscript Reverse Transcriptase	1 µl
Quantiscript RT Buffer 5x	4 µl
Mixte contenant les amorces de la transcription inverse	1 µl
Echantillons issues de l'élimination de l'ADN génomique	14 µl
Volume total de la réaction	20 µl

IV-3 : PCR en temps réel

La technologie de PCR en temps réel devient de plus en plus populaire dans différents secteurs d'activité. Cette technologie est basée sur la détection et la quantification d'un reporter fluorescent dont l'émission est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés pendant la réaction de PCR. Étant donné qu'elle utilise généralement des systèmes en tubes fermés et que la quantification ne requiert aucune manipulation post-amplification, les problèmes de contamination post-PCR par les amplicons sont significativement réduits. Le processus complet est automatisé du début à la fin rendant cette technologie très performante pour des applications d'analyses à grande échelle.

L'ADNc obtenue de la transcription inverse est ensuite amplifiée pendant 40 cycles à une température d'élongation de 60 °C en utilisant les conditions standard. Les conditions des réactions de la PCR en temps réelle sont les suivantes : une étape initiale de dénaturation de 3 min à 95 °C, suivie de cycles de 40 s à 95 °C, 60 °C et 72 °C. La PCR en temps réelle est réalisée avec le système QxR Mx3005Pw (Agilent Technologies, Canada) et Brilliant II SYBR Green QPCR Master Mix. Les niveaux d'ARNm d'IL1-β, IL-8, IL-17A et β-actine sont quantifiés en utilisant le système QPCR Agilent Mx3000P. La β-actine est utilisé comme gène endogène. Les résultats obtenus sont calculés en utilisant la méthode de quantification relative $2^{-\Delta\Delta Ct}$ normalisées à la β-actine.

V) Etude fonctionnelle : Culture cellulaire

V-1) Préparation des cellules

Plusieurs types de cellules ont été utilisés dans cette partie : Deux lignées cellulaires (BHK-21) et (L929) d'une part et une culture primaire ; les BMDMs (Bone Marrow-Derived Macrophage) d'autre part.

Les cellules BHK-21 (Baby Hamster Kidney) et L929 (Mouse fibroblast cell line clone 929) sont

des lignées cellulaires, et sont cultivées dans du DMEM riche en glucose avec 10% de SVF (Sérum de Vœu Fœtal).

Les BMDMs sont isolés à partir de souris (C57bl/6) : la moelle osseuse est extraite par rinçage des fémurs et tibias des souris par du milieu DMEM complet à 10% de SVF. La moelle collectée est ensuite incubée dans du DMEM avec 30% de milieu des cellules L929 (source de facteur de croissance MCSF), 10% de SVF, 1% de pénicilline/streptomycine et 2 mM de L-glutamine pendant 7 jours pour permettre la différenciation des cellules en macrophages.

La moelle osseuse de souris déficientes NLRP3^{-/-}, RIPK3^{-/-} ou MLKL^{-/-} ont été obtenues auprès du Dr. James Vince (WEHI Institute, Melbourne, Australie), IFNAR^{-/-} du Dr. Damien Vitour (LabEx IBEID, Maisons-Alfort, France), CASP-1^{-/-} et CASP-11^{-/-} du Dr. Richard Flavell (Département d'immunobiologie, École de médecine de l'Université de Yale, États-Unis), MAVS^{-/-} du Dr. Marie-Cécile Michallet (Centre International de Recherche en Infectiologie, INSERM U1111-CNRS UMR5308, Lyon, France), ASC^{-/-} du Dr. Ronan Le Goffic (Unité de Virologie et Immunologie Moléculaires, UR 892 INRA, Jouy-en-Josas, France), GSDMD^{-/-} du Dr. Petr Broz (Faculté de biologie et de médecine, Département de biochimie, Université de Lausanne, Suisse), RIG-I^{-/-} du Dr. Winfried Barchet (Institut d'immunologie translationnelle de chimie clinique et de pharmacologie clinique, Université de Bonn, Allemagne) et MDA5^{-/-} du Jackson Laboratory. Toutes les souris sont du fond génétique C57Bl/6 à l'exception des souris RIG-I qui sont de fond CD1 (ICR).

D'autres lignées cellulaires (les cellules HCT116) sont utilisées dans cette étude et sont fournies par le Dr. Stephen Girardin de l'université de Toronto. Les cellules HEK-Blue IL-18 sont achetées chez Invivogen. Les cellules HCT116 et les cellules HEK Blue IL-18 sont cultivées dans du DMEM complet à 10% SVF, 1% de pénicilline/streptomycine et 0,1% de normocine.

V-2) Stimulation des cellules par le LPS de *H. pylori*

Les BMDMs sont cultivés dans du RPMI complet à 10% SVF et réparties dans des plaques 48 puits à raison de 1×10^6 cellules/puit pendant toute la nuit à 37°C et 5% de CO₂. Les cellules sont ensuite stimulées par 100 ng/ml du LPS de *H. pylori* (purifié et fournit par le Dr. Catherine Werts de l'institut Pasteur de Paris) à différent temps : 0, 30, 60, 90, 120 minutes. Une fois le temps écoulé, les cellules sont directement lysées dans du tampon de lyse et les lysats sont analysés par Western Blot (WB).

V-3) Transfection des cellules par le LPS bactérien

Les cellules HCT116 sont utilisées pour la transfection du LPS bactérien : Elles sont cultivées dans du RPMI complété avec 10% SVF, 1 % pénicilline/streptomycine et 0,1 % normocine. Les cellules sont réparties dans des plaques de 24 puits à raison de 1×10^5 cellule/puit, puis elles sont incubées toute

la nuit à 37°C et 5% de CO₂. Le lendemain (jour de l'expérience), le milieu complet est remplacé par 200 µL d'OPTIMEM contenant du PAM3CSK (invivogen) à 1 µg/ml, utilisé pour l'amorçage des cellules. Après 4 heures d'amorçage, 25 µl d'OPTIMEM (ThermoFisher) et 4 µl de FUGENE HD (Promega) par réaction sont mélangés dans un nouveau tube eppendorf et laissé reposer à température ambiante pendant 5 minutes. Par la suite différentes concentrations du LPS (selon le type de LPS), sont ajoutées au mélange FUGENE + OPTIMEM et incubées à température ambiante pendant 15 minutes. Ensuite chaque mélange est totalement ajouté dans le puit contenant les cellules, puis ensuite incubées pendant 40 heures à 37°C, 5% de CO₂. Après 40 heures de transfection, la mort cellulaire est évaluée par le test LDH et libération d'IL-18.

Pour la transfection des cellules BMDMs, les cellules sont cultivées dans du RPMI complété avec 10% SVF, 1 % pénicilline/streptomycine et réparties dans des plaques à 48 puits à raison de 1 x 10⁶ cellules/puit, puis incubées toute la nuit à 37°C et 5% de CO₂. Le lendemain, le milieu complet est remplacé par 200 µL d'OPTIMEM contenant du PAM3CSK à 1 µg/ml. Après 4 heures d'amorçage, 50 µl d'OPTIMEM et 1 µl de FUGENE HD par réaction sont mélangés dans un nouveau tube eppendorf et laissé reposer à température ambiante pendant 5 minutes. Différentes concentrations du LPS (selon le type de LPS), sont ajoutées par la suite au mélange FUGENE + OPTIMEM et incubées à température ambiante pendant 15 minutes. Ensuite chaque mélange est entièrement ajouté dans le puit contenant les cellules. Les cellules sont ensuite incubées pendant 16 heures à 37°C, 5% de CO₂. Après 16 heures de transfection la mort cellulaire est évalué par le test LDH (Promega), la pyroptose par WB et dosage de l'IL-1β par ELISA (Thermo Fisher Scientific).

V-4) Test de mort cellulaire en temps réel

L'iodure de propidium (IP) est un réactif standard utilisé pour évaluer la viabilité cellulaire. Le IP se lie à l'ADN double brin dans des cellules non vivantes, dont les membranes plasmiques sont intactes.

Les BMDMs (10⁴ à 10⁵ cellules par puits) sont cultivées dans des plaques opaques 96 puits, à fond plat (Corning Costar # 3916), puis incubées à 37°C, 5% de CO₂. Trois puits dans une autre plaque transparente à 96 puits sontensemencés avec le même nombre de cellules pour pouvoir visualiser et vérifier l'état des cellules. Après 24 heures, si l'état des cellules est parfait, les cellules sont amorcées avec 1 µg/ml de PAM3CSK pendant 4 heures, ensuite transfectées avec différents LPS bactériens à différentes concentrations puis incubées pendant 4 heures à 37°C, 5% de CO₂. Après incubation, les cellules sont lavées avec du PBS, et 100 µl de milieu Gibco 18045-54 indépendant du CO₂ contenant 10% de SVF et 5 µg/ml de IP sont ajoutés aux cellules. La plaque est directement mise dans un lecteur de plaque à 37°C suivant cette configuration : Excitation à 535 nm, bande passante 15 minutes, émission 635 nm, bande passante 15 minutes avec un Gain de 1400 manuel. La lecture de fluorescence est laissée

généralement fonctionner toute la nuit pendant 16 heures.

V-5) Détection de l'IL-18 humaine grâce aux cellules « HEK-Blue IL-18 »

Les cellules « HEK-Blue IL-18 » (Invivogen) possèdent spécifiquement le récepteur à l'IL-18 humaine. En présence d'IL-18, les cellules vont exprimer le gène rapporteur « Phosphatase Alcaline Embryonnaire Sécrétée » (SEAP), via la voie de signalisation NF- κ B (Figure 18). Dans le milieu « Quanti-Blue » (Invivogen), l'enzyme SEAP va catalyser une réaction chromogène détectée en mesurant l'absorbance à 640 nm.

Les échantillons à tester sont des surnageants de cellules HCT116 cultivées dans différentes conditions. 100 μ l de chacun des échantillons sont introduits dans les puits d'une plaque de 96 puits à fond plat (ThermoFisher). Puis 200 μ L de culture de « HEK-Blue IL-18 » est ajouté à 280.000 cellules/ml. Après 24h d'incubation à 37°C et 5% de CO₂, 200 μ l de « Quanti-Blue » sont mis dans des puits vierges de la plaque précédemment utilisée et y sont ajoutés 100 ml de surnageant des cultures de « HEK-Blue IL-18 ». L'absorbance à 640 nm est ensuite déterminée au bout d'une heure.

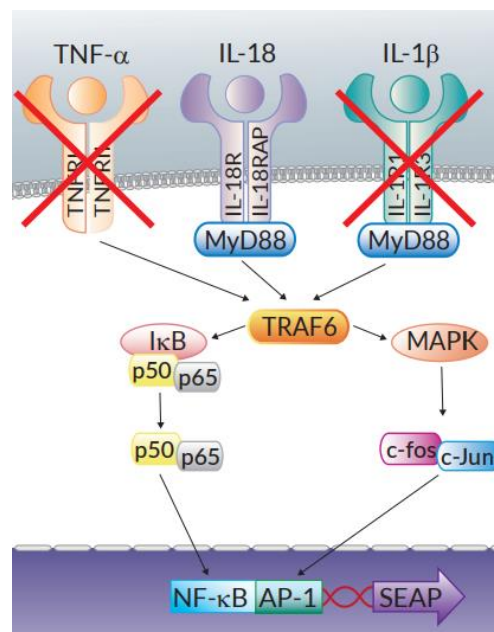


Figure 18 : Expression du gène rapporteur « Phosphatase Alcaline Embryonnaire Sécrétée » (SEAP) via la voie de signalisation NF- κ B (Invivogen).

V-6) Infections virales et traitements cellulaires

Le SeV M (Virus Sendai Mutant) et le VSV sauvage (Virus de la stomatite vésiculaire) et mutant (VSV M) sont fournis par le Dr. Dominique Garcin (Département de microbiologie et de médecine moléculaire, Faculté de médecine, Université de Genève, Genève, Suisse). Le SindV (Virus Sindbis) est fourni par le Dr. Marco Vignuzzi (Institut Pasteur, Paris, France).

Les cellules BMDMs sont lavées avec du PBS 1x et incubées avec les virus suivants : VSV, VSV-M, EMCV, SeV, SeV-M et SindV à une MOI de 5 pendant 2 h à 37 °C dans 5% de CO₂. Ensuite, le milieu non adsorbé contenant les virus est éliminé par lavage, les cellules sont lavées avec un milieu sans sérum et cultivées dans du DMEM avec 5% de SVF, dans 5% de CO₂ à 37 °C. Après différents temps post-infection, les surnageants cellulaires sont récupérés pour la titration virale, l'analyse de la nécrose, la quantification des cytokines et analyse des lysats cellulaires par Western-blot. Pour contrôler la réplication des virus, les virus sont inactivés par irradiation aux UV pendant 5 min dans Stratagene 2400 UV cross-linker. Dans certaines expériences, les BMDMs sont traitées avec du zVAD-fmk (inhibiteur à spectre large des caspases ; 10 µM) (Invivogen), de la Nigéricine (10 µM) (Invivogen), de l'ATP (5 mM) (Invivogen) et du Glyburide (25 µg/ml) (Invivogen). Les BMDMs sont amorcées avec du LPS ultra pur (100 ng/ml) (Invivogen).

V-7) Quantification virale

Les particules infectieuses SindV, EMCV et VSV libérées à partir des cellules infectées ont été quantifiées en déterminant la charge virale dans le milieu de culture par dosage des plaques de lyse dans des cellules BHK-21. Les cellules ont étéensemencées dans des boîtes à 12 puits dans du milieu α -MEM supplémenté avec 10% de SVF et incubées à 37 °C et 5% de CO₂ pendant 1 jour. A l'état de confluence, le milieu est retiré et la monocouche est infectée avec 200 µl de milieu de culture dilué en série, recueilli à partir de cellules infectées. Les boîtes ont été incubées pendant 1 heure à 37 °C pour l'adsorption du virus. Ensuite, 2 ml de carboximéthylcellulose (CMC) à 1% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) sont mélangés avec du α -MEM additionné de 5% de SVF puis ajoutés à chaque puits. Les boîtes ont été maintenues dans un incubateur humidifié à 37 °C, 5% de CO₂ pendant 2 jours. Les cellules sont fixées avec 10% de formaldéhyde à température ambiante et le CMC est enlevés par lavage à l'eau. Les plaques ont été visualisées par coloration avec du cristal violet à 1% dans une solution d'éthanol à 20%. La réplication du SeV a été évaluée par cytométrie en flux car le virus contient un tag GFP (Protéine fluorescente verte).

V-8) Test de libération de la lactate déshydrogénase (LDH)

Le lactate deshydrogénase (LDH) est une enzyme exclusivement cytoplasmique. Son augmentation dans le milieu extracellulaire témoigne d'un dommage tissulaire ou de la mort cellulaire.

La mort cellulaire est évaluée par l'analyse de lactate déshydrogénase (LDH) libérée par les BMDMs infectées. La libération de LDH est déterminée par le kit de dosage Promega CytoTox 96 (Promega) conformément aux instructions du fabricant.

V-9) Quantifications des cytokines par le test d'immunoabsorption par enzyme liée (ELISA)

L'ELISA ou « Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay » est une technique immuno-enzymatique sur support solide pour détecter et quantifier la présence d'un analyte dans un échantillon. L'analyte peut être une cytokine soluble, une chimiokine, un facteur de croissance ou même une hormone présente à de très faibles concentrations (du nanogramme au picogramme/ml) dans du plasma, du sérum, des surnageants de culture cellulaire ou dans d'autres fluides biologiques. L'ELISA repose sur le principe de fixation spécifique d'un anticorps à un antigène et la détection en utilisant la réaction enzymatique. C'est une technique hautement sensible et spécifique, fiable et reproductible.

Le dosage des cytokines dans les surnageants des BMDMs a été déterminé par ELISA. Les concentrations d'IL-1 β (Thermo Fisher Scientific), d'IL-18 (MBL International) et d'IFN- β (PBL Assay Science) sont quantifiées à l'aide des kits standards développés pour l'ELISA selon le protocole de chaque fabricant.

V-10) Extraction de protéines et analyse par Western Blot (WB)

Le WB est une technique couramment utilisée en biologie cellulaire permettant la détection et l'identification de l'expression protéique dans un échantillon biologique. Les échantillons sont dosés, dénaturés et séparés par électrophorèse. Les protéines séparées sont transférées sur une membrane de nitrocellulose où elles sont spécifiquement reconnues par les anticorps.

Les cellules sont lysées dans un tampon de lyse contenant 50 mM de Tris – HCl pH 7.4, 150 mM de NaCl, 1% de Triton X-100, 2 mM d'EDTA, 2 mM de pyrophosphate de sodium, 25 mM de β -glycérophosphate, 1 mM d'orthovanadate de sodium et un cocktail d'inhibiteur de protéase (Thermo Fisher Scientific). Par la suite les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation à 10 000 \times g à 4 °C pendant 10 minutes.

Après dosage de protéines par la méthode BCA (BiCinchoninic acid Assay), 5 à 10 μ g de protéines sont diluées dans 10 μ l de tampon Laemmli 2X 10% β -mercaptoéthanol (Invitrogene), puis dénaturées pendant 5 min à 99°C. Le mélange est ensuite déposé et migré sur gel de polyacrylamide de 5-20% (gel de séparation : H₂O, Acrylamide/Bis 29/1 40%, 10% Glycérol, Tampon Tris à pH 8,5, SDS à 10 %, APS et Temed. Gel de concentration : H₂O, Acrylamide/ Bis 29/1 40%, Tampon Tris pH à 6,8, SDS à 10 %, APS et Temed), en condition dénaturante en présence de β -mercapto-ethanol. Après migration, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose (Hybond-ECL, Amersham). Les sites non spécifiques sont saturés avec du PBS Tween 20 à 0,1% et du lait en poudre 5% pendant 20 min à température ambiante. Les membranes sont incubées pendant une heure à température ambiante ou toute

la nuit à 4°C avec l'anticorps primaire (Annexe 3) spécifique de notre protéine d'intérêt. Après trois lavages avec du PBS Tween 20 0,1%, la membrane est incubée pendant 45 min avec un anticorps secondaire (Annexe 4) ayant comme cible la partie Fc de l'anticorps primaire et couplé à la HRP (Horse Radish Peroxydase). Après 3 nouveaux lavages, la membrane est mise en présence du substrat de la HRP (Chemiluminescence HRP Substrate Millipore). Ceci provoque un signal lumineux qui sera détecté par une caméra (Fuji 4000) ou bien développé sur films auto-radiographiques (Castanier et al., 2012).

V-11) Transfection des siRNA

Au niveau de la cellule, les ARNs double brin sont clivés par une ribonucléase appelée Dicer en petits ARNs interférents (siRNA pour Small Interference RNA) de 21 à 25 paires de base. Ces siRNA sont ensuite pris en charge par un complexe RISC (RNA Induced Silencing Complex) qui élimine un brin passager et garde un brin guide. Les ARNm complémentaires au brin guide sont ensuite éliminés sans être traduits en protéines. A partir de cette notion de base, les chercheurs ont élaboré la technique de transfection des siRNAs pour éteindre l'expression de la protéine d'intérêt au sein de la cellule.

Les BMDMs sont ensemencés dans des plaques à 48 puits (à une densité de 5×10^5 cellules par puits). Après 24h d'incubation, le milieu de culture est remplacé par du milieu contenant 25 μ M de chloroquine puis incubation 15 minutes à 37°C avec 5% de CO₂. Les siRNAs sont préparés dans une solution contenant : 108,5 μ l d'H₂O stérile, 115 μ l de CaCl₂, 125 μ l d'HBS 2X, siRNA (50nM), puis 80 μ l du mélange est rajouté à chaque puit correspondant. Après 6 à 8h d'incubation, le milieu est remplacé par du milieu dépourvu de chloroquine.

Des siRNA non spécifiques témoins et des siRNA spécifiques sont utilisés (Sigma-Aldrich). Les siRNA utilisés sont cités dans l'annexe 5.

V-12) Immunofluorescence des Speck d'ASC

Le principe de cette technique repose sur l'émission de la lumière par un fluorochrome excité à une certaine longueur d'onde et qui se trouve couplé à un anticorps dirigé contre la protéine d'intérêt.

Les cellules BMDMs sont cultivées dans des plaques 24 puits, à raison de 5×10^5 cellules/puit puis plaquées sur des lamelles de verre stériles (Lamelles Couvre-Objets. 15mm \varnothing VWR). Les cellules sont ensuite lavées avec du PBS 1X, fixées avec du paraformaldehyde à 4% dans du PBS 1X pendant 15 min. Les cellules sont ensuite lavées 3 fois au PBS 1X et perméabilisées au triton 0,15% dans du PBS 1X. Les sites de fixation aspécifique sont saturés par une solution de BSA 2% pendant une heure. L'anticorps du lapin, mAb anti-ASC spécifique de souris (D2W8U) (Cell Signaling, # 67824, dilution 1/400), dilué dans de la BSA 2% est incubé 1 h à température ambiante ou toute la nuit à 4°C. Les

cellules sont lavées trois fois, pendant 5 minutes dans du PBS puis incubées pendant 1 heure avec les anticorps secondaires conjugués Alexa Fluor spécifiques (Invitrogen). Les noyaux sont colorés avec du DAPI (Sigma) et les cellules sont de nouveau lavées trois fois avec du PBS. Les images sont générées avec un microscope confocal Leica SP5 (Leica Microsystems) équipé d'un objectif de fluorescence à immersion $\times 63$.

V-13) Oligomérisation d'ASC

Les cellules BMDMs sont cultivées dans des plaques 24 puits à raison de 10^6 cellules / puits. Après des traitements appropriés, les cellules sont lysées avec du PBS froid contenant 0,5% de Triton X-100 et les lysats cellulaires sont centrifugés à 6000 g pendant 15 min à 4°C. Les culots sont lavés deux fois avec du PBS puis remis en suspension dans 200 μ l de PBS. Du Suberate de Disuccinimidyle (DSS) fraîchement préparé (2 mM) est ajouté aux culots re-suspendus et la suspension est incubée à température ambiante pendant 30 minutes en rotation. Les culots réticulés sont collectés par centrifugation à 6000 g pendant 15 minutes à 4 °C puis dissous dans 25 μ l du tampon de charge $1 \times$ SDS–PAGE. Les échantillons sont dénaturés pendant 5 minutes puis soumis à l'analyse par WB.

V-14) Génération des cellules THP-1 exprimant un shRNA

Les petit ARNs en épingle à cheveux ciblant l'ARNm de DHX33 proviennent de Sigma. shDHX33 1 : CATTTCCTTTAGAACCCAAAT; shDHX33 2 : GTTGACACGGGCATGGTTAAA.

Un vecteur PLKO.1 codant pour le shARN (Sigma) ou DHX33 sont transfectés ensemble dans des cellules HEK293T avec psPAX2, un emballage plasmidique et pMD2. G, une enveloppe plasmidique, pour produire des particules virales et la Lipofectamine 2000 (Life Technologies). Les surnageants des cultures sont collectés 48 heures après la transfection, filtrés à travers un filtre de 0,45 nm et concentrés avec du PEG-IT (Cell Signaling). Les cellules THP-1 sont infectées avec les surnageants collectés contenant des particules lentivirales en présence de 4 μ g/ml de polybrène (Sigma). Après 48 heures de culture, les cellules infectées par les lentivirus sont sélectionnées par 5 μ g/ml de puromycine (Invivogen).

V-15) Stimulation des macrophages THP-1

Les cellules THP-1 sont différenciées en macrophages avec 60 nM de phorbol 12-myristate 13-acétate (PMA ; Sigma) pendant 16 heures. Ensuite les cellules sont cultivées pendant 48 heures supplémentaires sans PMA. Les cellules différenciées sont stimulées pendant 15 heures avec 1 μ g/ml de poly (I: C) (Invivogen) plus Lipofectamine 2000 (Invivogen) ou infectées par les virus VSV ou EMCV.

VI) Analyses statistiques

Les résultats sont analysés en utilisant le test Mann-Whitney U pour les données non paramétriques. Toutes les analyses sont effectuées à l'aide du logiciel GraphPad Prism et de la version 3.4.3 de l'environnement R. Une analyse des composants principaux non supervisée est construite dans la version 1.40 du package FactoMineR R pour la quantification d'IL-1 β , IL-8 et IL-17A (Lê, Josse et al. 2008). Des boîtes à moustaches sont réalisées en utilisant la définition graphique de ggplot2 (Wickham 2016), et la signification statistique entre les groupes a été évaluée en utilisant le test de classement de Kruskal-Wallis. Le t-test avec l'analyse post hoc de Tukey sont utilisés pour évaluer la signification statistique des différences. Les différences étaient considérées comme significatives si $P < 0,05$. Ns : non significatif. Les données montrées dans chaque histogramme sont les moyennes \pm SD de trois expériences indépendantes.

RESULTATS ET DISCUSSION

PARTIE I : ETUDE DE LA PHYSIOPATHOLOGIE A *H. PYLORI*

A. Résultats :

I - Etude de l'expression des gènes des cytokines

1) Prévalence de l'infection à *H. pylori* et répartition des patients selon l'âge, le sexe et les paramètres du mode de vie :

La répartition des 71 patients en fonction de l'infection à *H. pylori* et des paramètres d'âge, de sexe et de mode de vie est présentée dans le tableau 6.

Les patients étaient considérés comme infectés *par H. pylori* lorsque la PCR et/ou les analyses histologiques étaient positives.

Tableau 6 : Caractéristiques des patients participant à l'étude.

	<i>H. pylori</i> positif	<i>H. pylori</i> négatif
Âge moyen	46,18 ±17,30	42,5 ±21,95
Sexe		
Femmes	29 (40,84 %)	3 (4,22 %)
Hommes	33 (46,47 %)	6 (8,45 %)
Mode de vie		
Fumeurs	14 (19,71 %)	2 (2,81 %)
Urbain	56 (78,87 %)	8 (11,26 %)
Rural	6 (8,45 %)	1 (1,40 %)
Total (n = 71)	62 (87,32 %)	9 (12,67 %)

Soixante-deux patients (87,32%) ont été diagnostiqués comme étant infectés *par H. pylori* (Figure 19). Les neuf patients diagnostiqués comme étant non infectés *par H. pylori* ont été utilisés comme groupe de contrôle. Aucune différence n'a été constatée entre les deux groupes en ce qui concerne l'âge, le sexe ou le mode de vie.

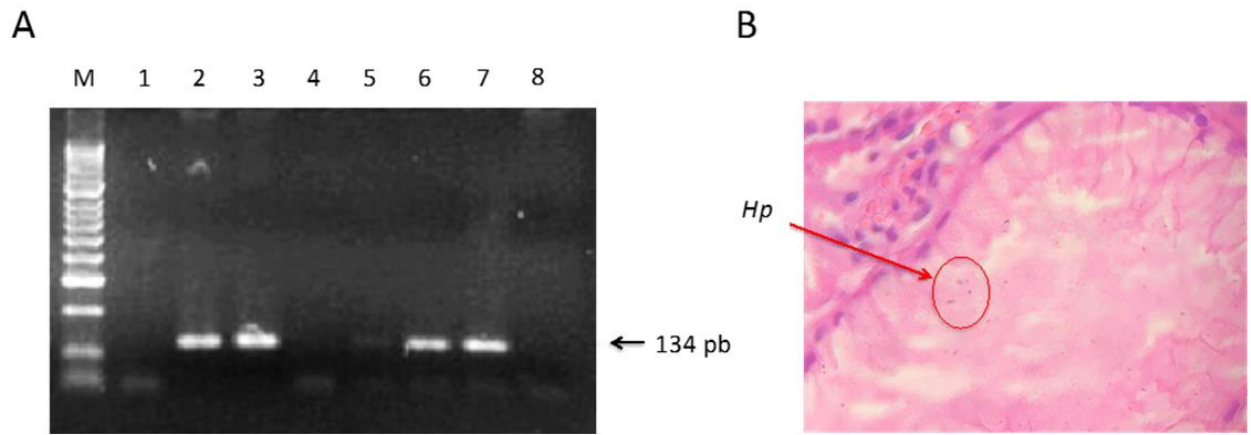


Figure 19 : Diagnostic de l'infection à *H. pylori* par PCR et analyses histopathologiques. (A) Gel d'agarose montrant les amplicons du gène ARNr 23S de *H. pylori* (134 pb). Les amplicons ont été visualisés avec du bromure d'éthidium. Ligne M : Marqueur du poids moléculaire d'ADN de 50 pb ; lignes 1, 4 et 8 : échantillons *H. pylori* négatifs ; lignes 2, 3, 5, 6 et 7 : échantillons *H. pylori* positifs. (B) Les biopsies ont été fixées dans du formol tamponné à 10%, incluses dans de la paraffine, découpées en sections séquentielles et colorées avec de l'hématoxyline-éosine et du Giemsa modifié. Grossissement $\times 50$. La pointe de la flèche indique les bacilles de *H. pylori*.

2) L'expression de l'ARNm des gènes des cytokines IL-1 β , IL-8 et IL-17A dans l'antrum et le fundus de l'estomac :

Des biopsies appariées de l'antrum et du fundus de patients infectés par *H. pylori* ($n = 62$) et non infectés par *H. pylori* ($n = 9$) ont été analysées pour l'expression des gènes IL-1 β , IL-8 et IL-17A (Figure 20A et 20B).

L'expression de l'ARNm de l'IL-1 β était significativement plus faible dans l'antrum des patients infectés par *H. pylori* par rapport aux patients non infectés par *H. pylori* ($p = 0,003$). Il n'y avait pas de différence significative dans les niveaux d'expression de l'IL-8 et de l'IL-17A dans l'antrum des patients infectés et des patients non infectés par *H. pylori* (Figure 20A). Dans le fundus, l'expression des ARNm de l'IL-8 et de l'IL-17A était significativement plus élevée chez les patients infectés par *H. pylori* par rapport aux patients non infectés ($p = 0,04$ et $p = 0,02$ respectivement). L'expression de l'ARNm de l'IL-1 β dans le fundus des patients infectés par *H. pylori* était légèrement plus élevée que chez les patients non infectés. Cependant, cette différence n'a pas atteint des niveaux significatifs (Figure 20B).

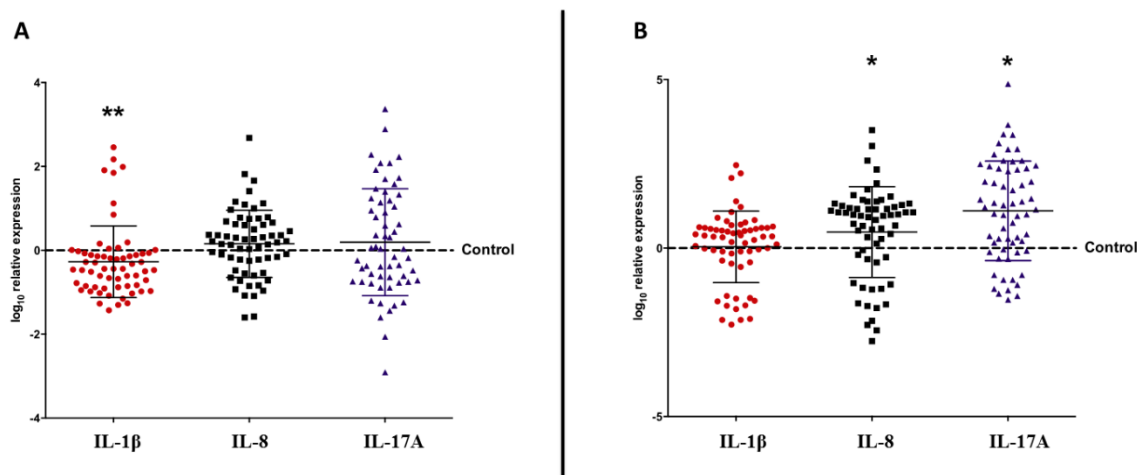


Figure 20 : Expression de l'ARNm des gènes de cytokines IL-1 β , IL-8 et IL-17A dans l'antrum et le fundus de l'estomac. L'expression relative des gènes IL-1 β , IL-8 et IL-17A a été analysée par qRT-PCR dans des biopsies antrale (A) et fundique (B) des patients infectés par *H. pylori*. Les niveaux d'expression des ARNm de l'IL-1 β , de l'IL-8 et de l'IL-17A par rapport au gène de β -actine sont indiqués sur l'axe des y. Les 62 patients infectés ont été normalisés par rapport aux 9 patients non infectés (contrôles) comme indiqué par les lignes pointillées. Les résultats sont exprimés avec des écarts-types. Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du test de Mann-Whitney pour les données non paramétriques. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

3) L'expression de l'ARNm des cytokines selon les stades pathologiques gastriques :

Afin de comprendre l'implication de ces cytokines dans l'issue des infections à *H. pylori*, les patients ont été stratifiés en stades pathologiques selon des résultats endoscopiques basés sur la classification de Sydney (Tableau 7).

Selon la classification du système de Sydney mis à jour et de la cascade de Correa (Correa and Piazzuelo 2012), chaque patient a été affecté à l'un des trois stades pathologiques : gastrite (n = 38), atrophie (n = 17) ou métaplasie (n = 5).

Tableau 7 : Stades pathologiques de la cascade précancéreuse :

Stades pathologiques	Gastrite	Atrophie	Métaplasie
Patients infectés par <i>H. pylori</i>	38(61,29 %)	17 (27,41 %)	5 (8,06 %)

L'expression relative de l'IL-1 β était significativement sous exprimée dans l'antra des patients souffrant de gastrite, d'atrophie ou de métaplasie par rapport aux patients non infectés (Figure 21A). Cependant, l'expression de l'IL-1 β était significativement plus élevée dans le fundus des patients atteints de métaplasie par rapport aux patients non infectés et aux autres stades pathologiques (Figure 21B). Il n'y avait pas de différence significative entre l'expression de l'IL-8 dans l'antra des patients atteints de gastrite, d'atrophie ou de métaplasie et des patients non infectés par *H. pylori* (Figure 21A). L'expression de l'IL-8 dans le fundus était significativement plus élevée chez les patients atteints de gastrite et de métaplasie. Elle était également légèrement plus élevée chez les patients atteints d'atrophie par rapport aux patients non infectés par *H. pylori*, mais la différence n'était pas significative (Figure 21B).

Comme pour l'IL-1 β , nous avons constaté une diminution significative de l'expression de l'IL-17A dans l'antra des patients atteints de métaplasie par rapport aux patients non infectés et aux patients atteints de gastrite ou d'atrophie (Figure 21A). Cependant, l'expression relative de l'IL-17A dans le fundus était significativement plus élevée chez les atteints de gastrite ou de métaplasie. L'expression de l'IL-17A était également plus élevée dans la muqueuse du fundus des patients atteints d'atrophie, mais la différence n'était pas significative (Figure 21B). L'expression de l'IL-17A au niveau du fundus était plus élevée chez les patients atteints de métaplasie que chez les patients atteints de gastrite ou d'atrophie. En résumé, nos résultats montrent que l'expression de l'IL-1 β et de l'IL-17A est sous exprimée dans l'antra des patients atteints de métaplasie et que les trois cytokines étudiées (IL-1 β , IL-8 et IL-17A) sont surexprimées dans le fundus de ces patients.

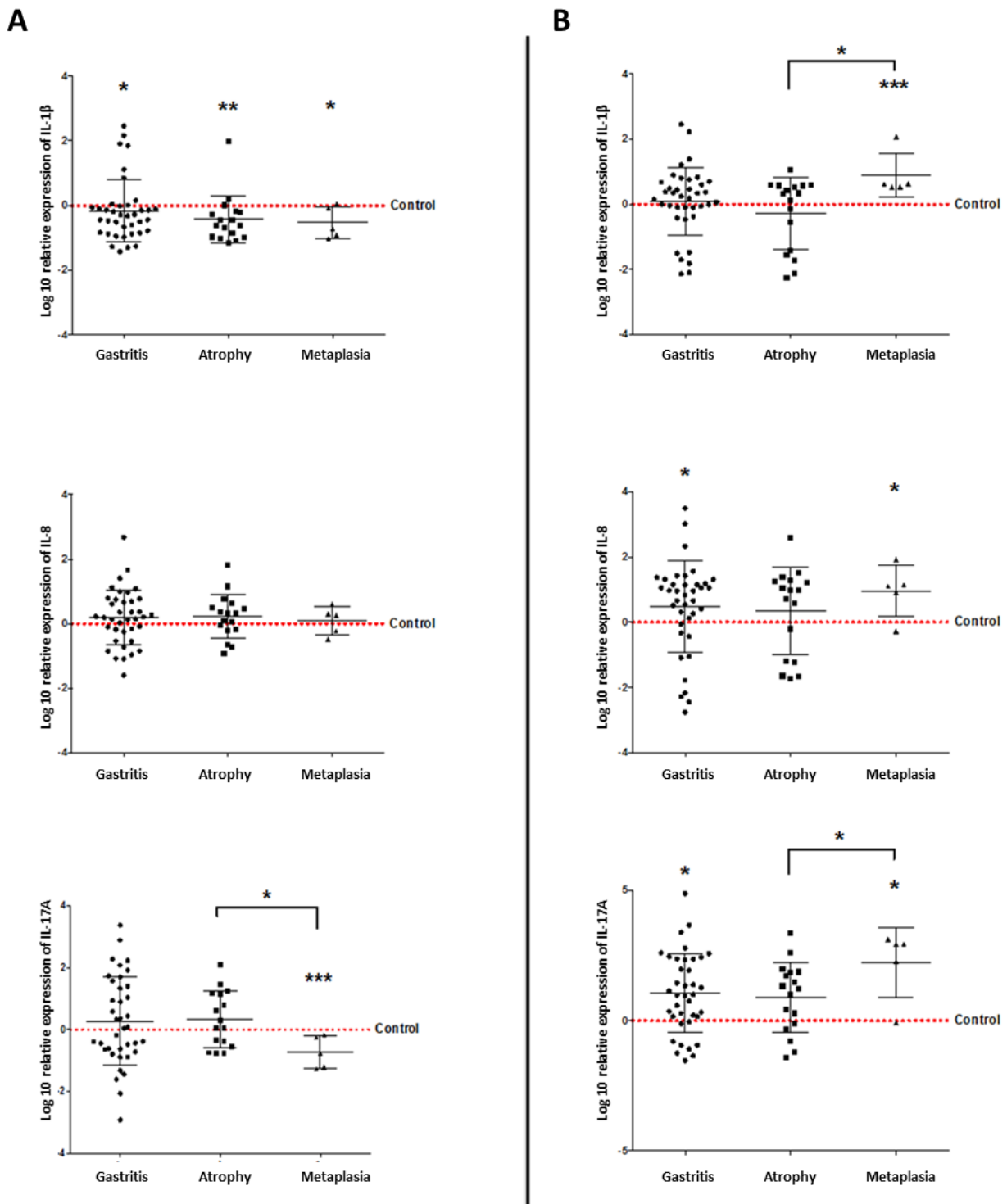


Figure 21 : Niveaux d'expression de l'ARNm des cytokines en fonction des stades pathologiques. Nous avons stratifié les patients en trois stades pathologiques sur la base de la classification du système Sydney mis à jour et de la cascade Correa. Les niveaux d'expression des cytokines IL-1 β , IL-8 et IL-17 dans l'antrum (A) et le fundus (B) en fonction des stades pathologiques ont été normalisés par rapport aux 9 témoins, comme l'indiquent les pointillés rouges. Gastrite ($n = 38$), atrophie ($n = 17$) et métaplasie ($n = 5$). * $p < 0,5$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Des corrélations significatives ont également été trouvées entre l'expression de l'IL-1 β , l'IL-17, et de l'IL-8 dans l'antré (Figure 22A) et dans le fundus (Figure 22B). L'expression des gènes IL-1 β , IL-8 et IL-17A chez les patients infectés par *H. pylori* a été corrélée positivement et significativement à la fois dans l'antré (Figure 22A) et dans le fundus de l'estomac (Figure 22B).

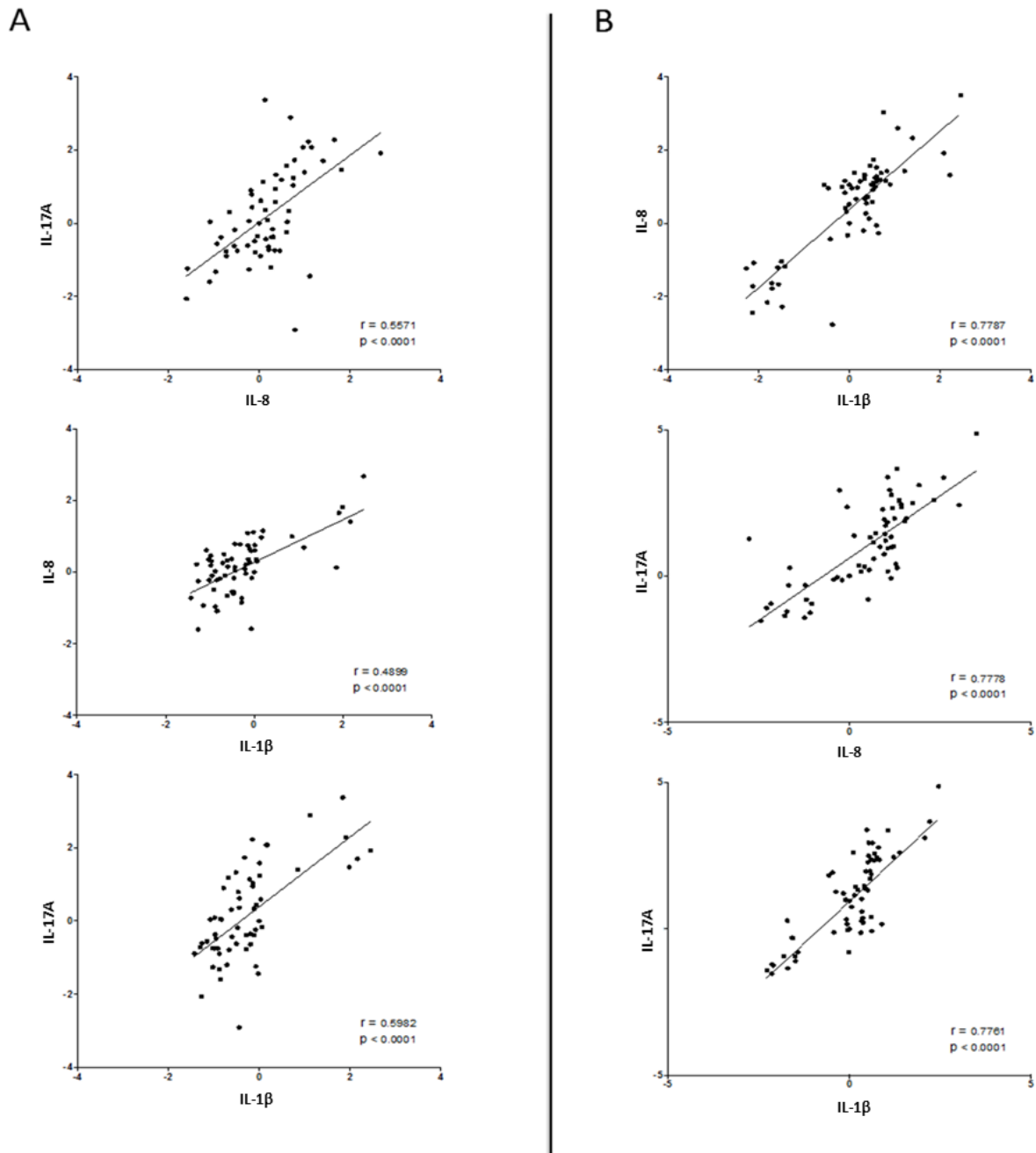


Figure 22 : Niveaux d'expression des gènes des cytokines dans les régions antrale (A) et fundique (B). Nous avons corrélé les niveaux d'expression de l'ARNm des cytokines (IL-1, IL-8, IL-17A) des patients infectés par *H. pylori* dans les régions antrale (A) et fundique (B) : Corrélation : IL-1vs IL-8 ; IL-1vs IL-17A ; IL-17A vs IL-8. *** $p < 0.001$.

4) Prédiction de survenue de métaplasie gastrique par la triade d'interleukine dans les échantillons gastriques antrales et fundiques des patients infectés par *H. pylori* :

Les niveaux d'expression d'IL-1 β , d'IL-8 et d'IL-17A ont été quantifiés dans des échantillons antral et fundique d'estomac de patients infectés par *H. pylori* à différents stades pathologiques : gastrite, atrophie et métaplasie. Soixante et onze échantillons ont été inclus dans un modèle prédictif multivarié. Une analyse en composantes principales non supervisée des niveaux de ces trois interleukines a permis d'obtenir une représentation efficace de tous les échantillons de la première carte principale, avec des valeurs propres pour les deux premières dimensions de 82,85 % et 10,48 %, respectivement (Figure 23A). La discrimination des groupes d'échantillons dans cette analyse a montré une corrélation positive significative de la métaplasie fundique sur le premier axe principal (Figure 23A, corrélation de Pearson, $p = 0,025$) et une corrélation négative significative de la métaplasie antrale sur le deuxième axe principal (Figure 23A, corrélation de Pearson, $p = 0,029$). Ces résultats suggèrent que la triade d'interleukine a permis de distinguer le stade de la métaplasie des autres stades de la maladie (atrophie, gastrite) et de distinguer la métaplasie fundique de la métaplasie antrale, ce qui indique qu'il est important d'analyser les biopsies des deux régions pour diagnostiquer cette pathologie.

Pour déterminer quelles interleukines permettraient de prédire la métaplasie antrale, les coefficients de Pearson des interleukines ont été analysés lors de l'analyse en composantes principales. L'IL-17A était significativement et négativement corrélée avec le second axe (Figure 23B), ce qui permettait de prédire qu'elle serait sous exprimée dans la métaplasie antrale par rapport aux autres échantillons infectés par *H. pylori* (Figure 23C, $p = 0,02$). Pour déterminer quelles interleukines permettraient de prédire la métaplasie fundique, les coefficients de Pearson des interleukines ont été analysés lors de l'analyse en composantes principales. L'IL-1 β était positivement corrélée de manière significative avec le premier axe (Figure 23D), ce qui permettait de prédire qu'elle serait surexprimée dans la métaplasie fundique par rapport aux autres échantillons infectés par *H. pylori* ($p = 0,009$, Figure 23E).

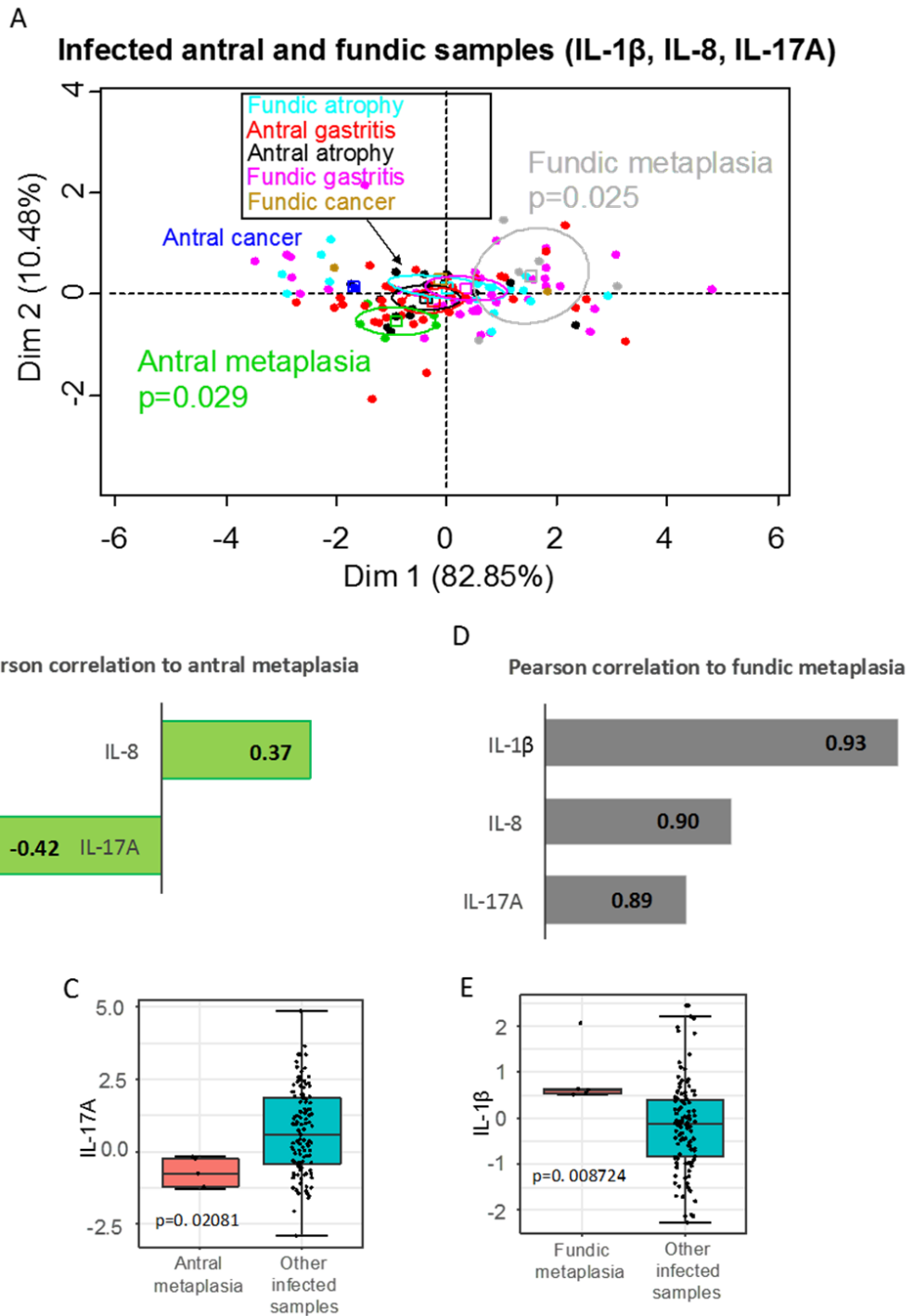


Figure 23 : Métaplasie gastrique prédite par la triade d'interleukine dans des échantillons gastriques antraux et fundiques infectés par *H. pylori*. (A) Analyse en composantes principales non supervisée effectuée avec la triade d'interleukines (IL-1 β , IL-8, IL-17A) sur des biopsies gastriques antrales et fundiques de patients infectés par *H. pylori* (les valeurs *p* pour la discrimination de groupe sont indiquées) ; (B) Barplot des coefficients de corrélation de Pearson pour les interleukines qui sont corrélées avec la métaplasie antrale ; (C) Boxplot des niveaux d'IL-17A dans la métaplasie antrale par rapport aux autres échantillons infectés (les valeurs *p* ont été calculées à l'aide du test de Kruskal-Wallis) ; (D) Barplot des coefficients de corrélation de Pearson pour les interleukines corrélées avec la

métaplasie fundique ; (E) Boxplot des niveaux d'IL-1 β dans la métaplasie fundique par rapport aux autres échantillons infectés (les valeurs p ont été calculées à l'aide du test de Kruskal-Wallis).

II - Etude du polymorphisme génétique

La famille du gène IL-1 sur le chromosome 2q comprend 3 gènes apparentés l'IL-1A, l'IL1- β et l'IL-1RN, qui codent respectivement pour IL-1 α , IL-1 β et leur antagoniste du récepteur endogène (IL-1RA) (Hurme, Lahdenpohja et al. 1998). Les échanges de base aux positions -31 et -511 du promoteur de l'IL-1 β ont été associés à une liaison accrue du facteur nucléaire et à une sécrétion élevée d'IL-1 β (Prinz, Neumayer et al. 1997, Beales and Calam 1998, Hurme, Lahdenpohja et al. 1998, Schepp, Dehne et al. 1998, Mahr, Neumayer et al. 2000). Le gène IL-1RN contient une répétition en tandem penta-allélique de 86 pb dans l'intron 2, dont l'allèle 2 (IL-1RN * 2) est également associé à une production accrue de l'IL-1 β aussi bien *in vivo* que *in vitro* (Hurme, Lahdenpohja et al. 1998, Hwang, Kodama et al. 2002).

Les polymorphismes du gène IL-1 β ont montré une synergie avec l'infection à *H. pylori* et une association avec le cancer gastrique (Chen B et al. 2016, Hong JB et al 2016 Park MJ et al 2016). Plusieurs études ont reporté que le polymorphisme du gène IL-1 β dans la région promotrice peut influencer l'expression de l'IL-1 β . Notre objectif était d'étudier l'association de la variabilité génétique du polymorphisme du gène de l'IL-1 β chez les patients marocains avec les différents stades pathologiques. En raison du faible nombre des patients négatifs recrutés dans notre étude (problème de signification statistique) cette partie d'étude est en cours de finalisation. Toutefois, nous avons orienté notre objectif sur comment les deux polymorphismes nucléotidiques à la position -31 et -511 du promoteur du gène de l'IL-1 β modulent l'expression de l'IL-1 β .

1) L'expression relative d'IL-1 β selon les polymorphismes nucléotidiques -511 C/T et -31 C/T du promoteur du gène IL-1 β chez les patients infectés par *H. pylori* dans l'antre et le fundus.

Les échanges de bases aux positions -31 et -511 du promoteur IL-1 β ont été associés à une sécrétion plus élevée d'IL-1 β . Les niveaux accrus d'IL-1 β sont associés à une inflammation intense et à la présence de métaplasie intestinale et cancer gastrique au cours d'une infection à *H. pylori*. Or, plusieurs études ont rapporté que cette expression d'IL-1 β peut varier selon l'origine ethnique. De ce fait, nous avons étudié l'expression relative du gène d'IL-1 β selon les SNPs -511C/T et -31C/T indépendamment dans l'antre et le fundus des patients marocains infectés par *H. pylori*.

Dans l'antre nous avons constaté une diminution significative de l'expression relative du gène

d'IL-1 β des patients infectés par *H. pylori* ayant les génotypes -511 CC et CT par rapport aux patients non infectés. Une différence significative ($p=0,05$) a été observée entre les 3 génotypes (CC, CT, TT) des patients infectés par *H. pylori* (figure 24A). Entre ces 3 génotypes le génotype TT présentait le niveau d'expression d'IL-1 β le plus élevé tandis que le génotype CC présentait le niveau d'expression le plus faible.

Les patients infectés par *H. pylori*, porteurs du génotype -31 TT et CT ont montré une diminution significative du niveau d'expression du gène IL-1 β par rapport aux patients non infectés (Figure 24B). Aucune différence significative n'a été observé chez les porteurs du génotype CC infectés par *H. pylori* par rapport aux patients non infectés. Entre les trois génotypes, nous avons constaté que les patients porteurs du génotype CC présentait le niveau d'expression du gène IL-1 β le plus élevé tandis que les porteurs du génotype CT présentait le plus faible niveau d'expression. Toutefois, cette différence reste non significative.

Dans le fundus, l'expression du gène de l'IL-1 β des patients infectés par *H. pylori* et porteurs du génotype CC était sous-exprimée par rapport aux contrôles ($p=0,06$) (figure 24C). Nous avons constaté une différence de l'expression du gène d'IL-1 β significative entre les 3 groupes de patients porteurs des génotypes -511 CC, CT et TT infectés par *H. pylori*. Le groupe porteur du génotype CT avait l'expression du gène IL-1 β la plus élevée.

Aucune différence significative entre les niveaux d'expression du gène d'IL-1 β des génotype -31 CC, CT et TT des patients infectés par *H. pylori* et les patients non infectés n'a été observé (Figure 24D).

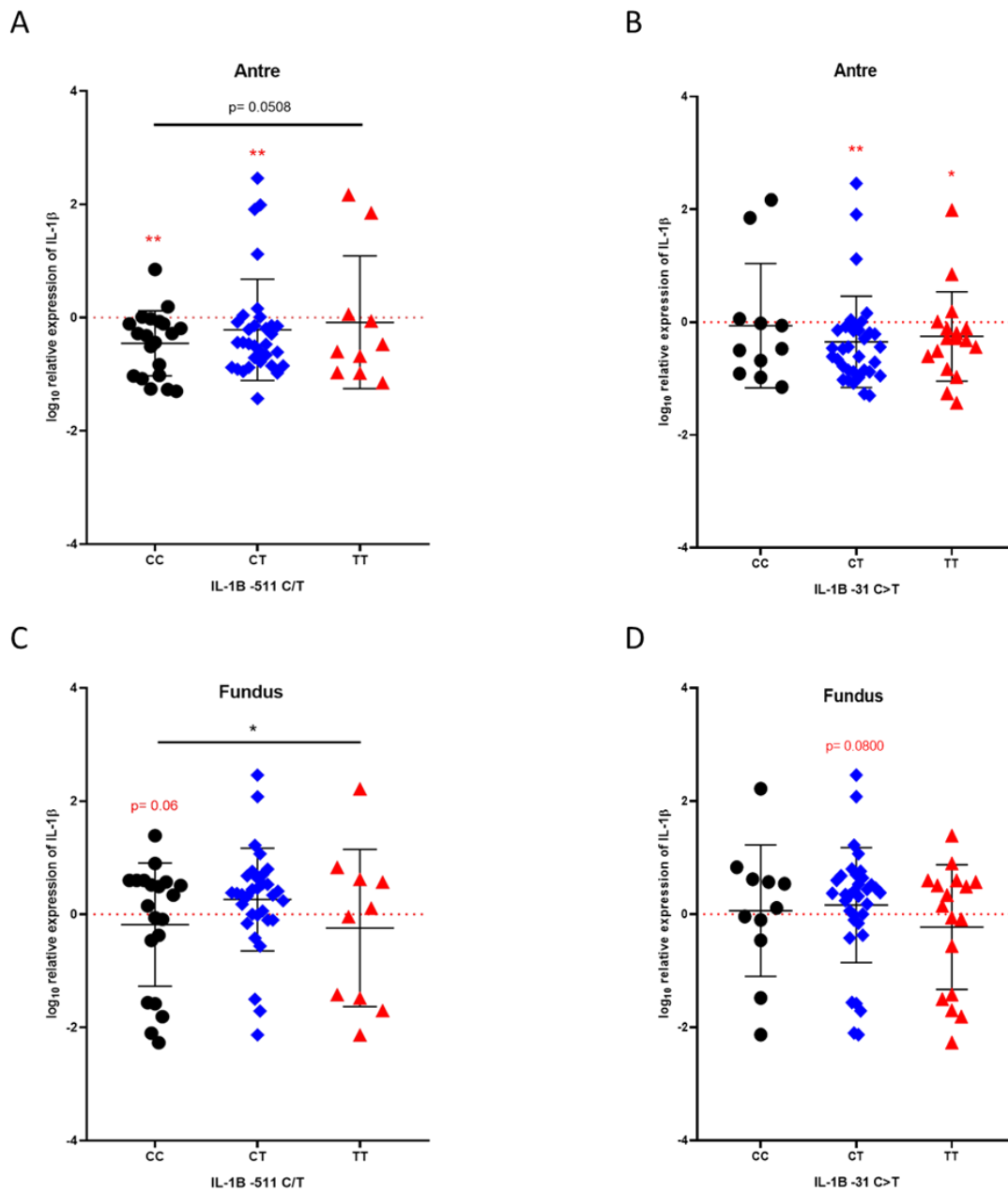


Figure 24 : L'expression relative d'IL-1β selon les SNP -511 C/T et -31 C/T chez les patients infectés par *H. pylori* dans l'antrum et le fundus de l'estomac. L'expression relative des gènes *IL-1β* a été analysée par qRT-PCR dans des biopsies antrales (A) et (B) et fundiques (C) et (D) des patients infectés par *H. pylori*. Les niveaux d'expression des ARNm de l'*IL-1β* par rapport au gène de l' β -actine sont indiqués sur l'axe des y. L'identification des SNPs aux positions -31 et -511 du promoteur du gène d'*IL-1B* a été effectuée par RFLP. Les 62 patients infectés ont été normalisés par rapport aux 9 patients non infectés (contrôles) comme indiqué par les lignes pointillées. Les résultats sont exprimés avec des écarts-types. Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du test de Mann-Whitney et ANOVA pour les

données non paramétriques. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

2) L'expression relative d'IL-1 β selon les génotypes combinés des polymorphismes nucléotidiques -511 C/T et -31 C/T du promoteur du gène d'IL-1 β chez les patients infectés par *H. pylori* dans l'antre et le fundus de l'estomac.

Nous avons combiné les différents génotypes possibles du gène d'IL-1 β -511 SNP et -31 SNP (à savoir : -31CC / -511 TT, -31TT / -511CC, -31 CT / -511CT, -31CC / -511 CT, -31 CT / -511CC, -31 TT / -511 CT, -31TT / -511 TT, -31 CC / -511 CC) pour évaluer l'influence potentielles de ces génotypes sur l'expression du gène d'IL-1 β .

Au niveau de l'antre, les patients infectés par *H. pylori* et porteurs des génotypes -31 CT/-511 CC, 31 CT/-511 CT et CT -31 TT/ -511 CC ont montré une diminution significative du niveau d'expression d'IL-1 β par rapport aux patients non infectés (Figure 25A). Une différence significative a été constatée en comparant le niveau d'expression d'IL-1 β chez les patients infectés par *H. pylori* et porteurs des génotypes -31 CC/ -511 TT, -31 TT/ -511 CC, -31 CT/-511 CT et -31 CT/ -511 CC (figure 25B). Les patients ayant les génotypes -31 CT/-511 CC ont montré le niveau d'expression d'IL-1 β le plus faible par rapport aux autres groupes.

La combinaison des génotypes a également été étudiée au niveau du fundus. Seuls les patients infectés par *H. pylori* et porteur du génotype -31CT/-511 CT ont présenté un niveau d'expression d'IL-1 β significativement élevé par rapport aux patients non infectés (Figure 25C). La comparaison des combinaisons génotypiques, -31 CC/-511 TT, -31 TT/-511 CC, -31 CT/-511 CT et -31 CC/ -511 CC a montré une différence significative (Figure 25D). Les patients porteurs de génotypes -31 CT/-511 CC ont montré le niveau d'expression d'IL-1 β le plus faible.

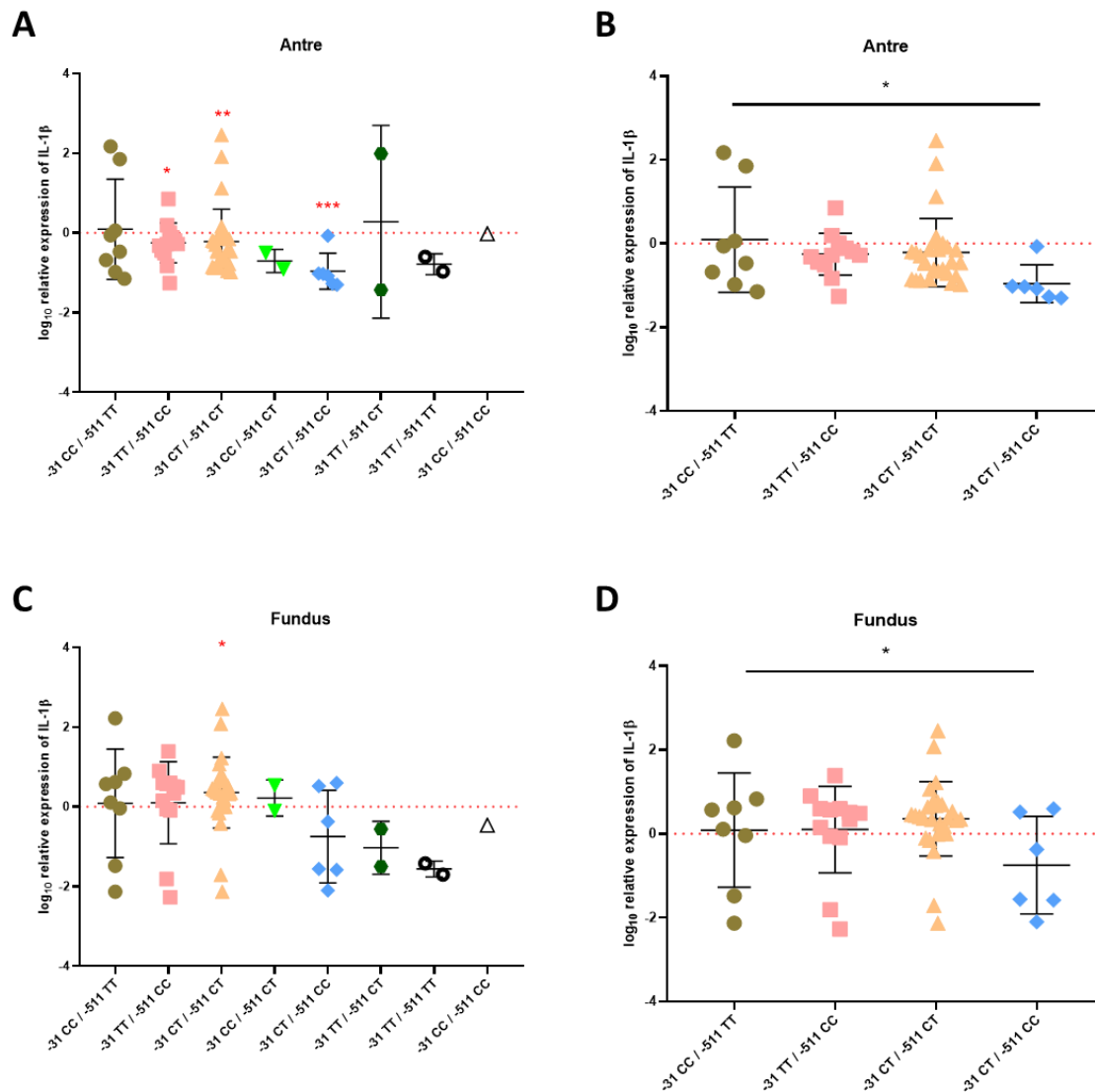


Figure 25 : : L'expression relative d'IL-1 β selon les génotypes des SNP -511 C/T et -31 C/T combinés chez les patients infectés par *H. pylori* dans l'antrum et le fundus de l'estomac. L'expression relative des gènes *IL-1 β* a été analysée par qRT-PCR dans des biopsies antrale (A) et (B) et fundique (C) et (D) des patients infectés par *H. pylori*. Les niveaux d'expression des ARNm de l'*IL-1 β* par rapport au gène de l' β -actine sont indiqués sur l'axe des y. L'identification des SNPs aux positions -31 et -511 du promoteur du gène d'*IL-1B* a été effectuée par RFLP. Les 62 patients infectés ont été normalisés par rapport aux 9 patients non infectés (contrôles) comme indiqué par les lignes pointillées. Les résultats sont exprimés avec des écarts-types. Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du test de Mann-Whitney et ANOVA pour les données non paramétriques. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

3) L'expression relative d'IL-1 β selon les VNTR dans l'intron 2 du gène de l'IL1Ra chez les patients infectés par *H. pylori* dans l'antrum et le fundus de l'estomac.

Le gène *IL-1RN* contient une répétition en tandem penta allélique de 86 pb dans l'intron 2, dont

l'allèle 2 (IL-1RN * 2) est également associé à une forte production de l'IL-1 β aussi bien *in vivo* qu'*in vitro*.

Au niveau de l'antré, les patients infectés par *H. pylori* et porteurs du génotype d'IL1RN*440/*356 ont montré une augmentation significative du niveau d'expression de l'IL-1 β par rapport aux patients non infectés (Figure 26A). Pour les patients infectés par *H. pylori* et porteurs du génotype IL1RN*440/*440 nous avons observé une sous expression significative du niveau d'expression de l'IL-1 β par rapport aux contrôles non infectés. Les groupes de patients infectés par *H. pylori* et porteurs des génotypes IL1RN*440/*270, IL1RN*440/*356 et IL1RN*440/*440 ont montré une différence significative (Figure 26B). Le niveau d'expression du gène d'IL-1 β le plus élevé a été observé chez les patients porteurs d'IL1RN*440/*356 et le plus faible a été observé chez les patients porteurs du génotype IL1RN*440/*440.

Dans le fundus, nous avons observé une augmentation significative de l'expression du gène d'IL-1 β chez les patients infectés par *H. pylori* porteurs des génotypes IL1RN*440/*356 et IL1RN*440/*270 par rapport aux patients non infectés (Figure 26C). Une différence significative de l'expression d'IL-1 β a également été observée en comparant les génotypes IL1RN*440/*270, IL1RN*440/*356 et IL1RN*440/*440 des patients infectés par *H. pylori* (Figure 26D). Les patients porteurs du génotype IL1RN*440/*356 présentaient le niveau d'expression du gène d'IL-1 β le plus élevé.

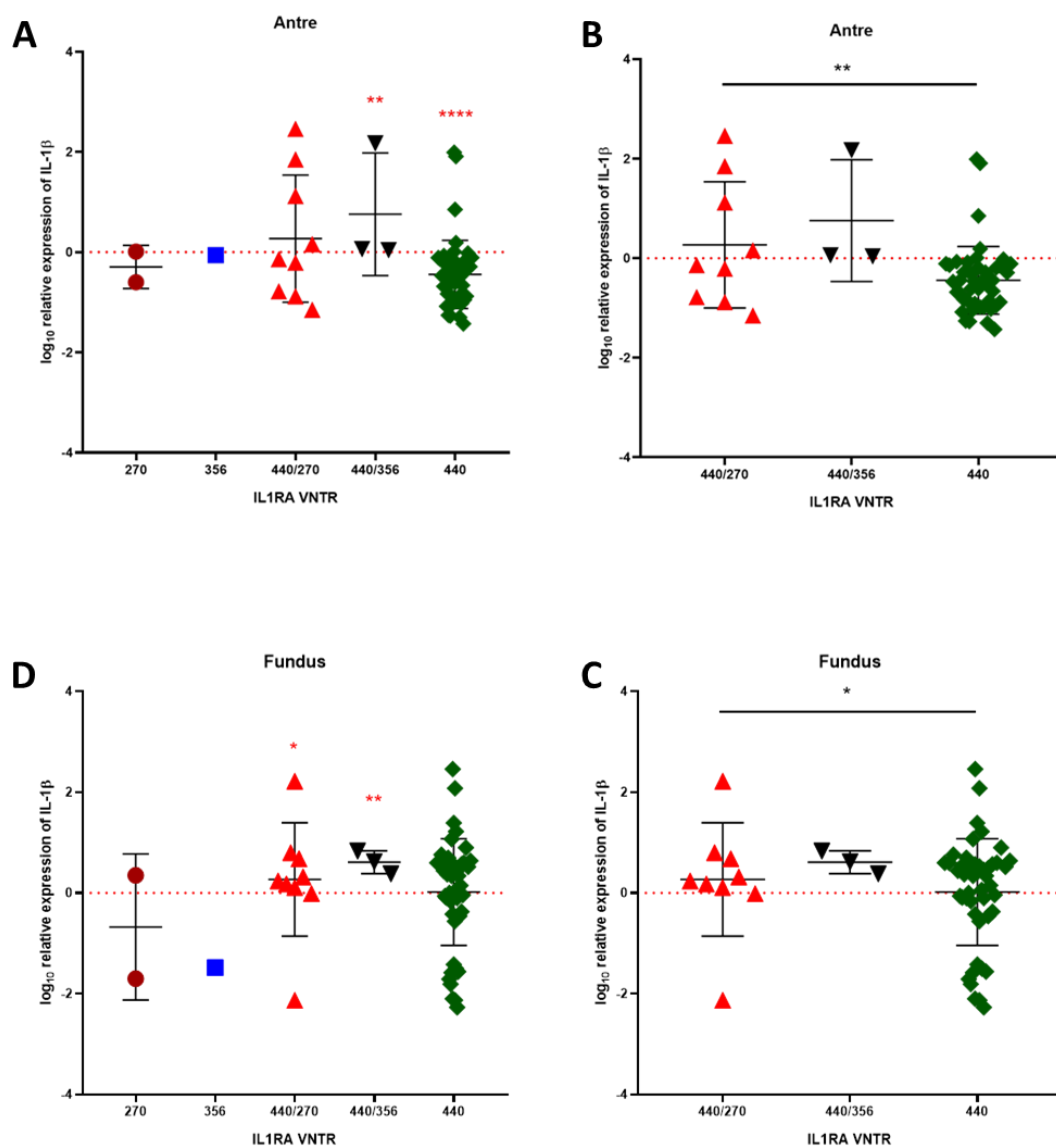


Figure 26 :

L'expression relative d'IL-1β selon les VNTR dans l'intron 2 du gène de l'IL1Ra chez les patients infectés par *H. pylori* dans l'antrum et le fundus de l'estomac. L'expression relative des gènes *IL-1β* a été analysée par qRT-PCR dans des biopsies antrale (A) et (B) et fundique (C) et (D) des patients infectés par *H. pylori*. Les niveaux d'expression des ARNm de l'*IL-1β* par rapport au gène de l' β -actine sont indiqués sur l'axe des y. L'identification des VNTR dans l'intron 2 du gène de l'IL1Ra a été effectuée par PCR. Les 62 patients infectés ont été normalisés par rapport aux 9 patients non infectés (contrôles) comme indiqué par les lignes pointillées. Les résultats sont exprimés avec des écarts-types. Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du test de Mann-Whitney et ANOVA pour les données non paramétriques. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

III- Etude des voies de signalisation après stimulation des cellules par le LPS de *H. pylori*

Suite aux difficultés rencontrées quant à l'isolement de la bactérie *H.pylori* et sa culture, nous

avons opté pour l'utilisation du LPS de *H. pylori*. L'objectif de cette partie est d'étudier les voies de signalisation activées par *H. pylori* pour induire la production d'IL-1 β et donc l'activation d'un inflammasome dans les cellules BMDMs et les HCT116.

1) Activation des voies de signalisation en aval des récepteurs de l'immunité innée suite à la stimulation *in vitro* de BMDMs de souris par le LPS de *H. pylori*.

La troisième partie des résultats a été dédiée à l'étude de la cinétique d'activation des voies de signalisation en aval des récepteurs de l'immunité innée. Le but est de mettre en évidence les voies de signalisation activées après stimulation par le LPS de *H.pylori*.

Dans un premier temps, des BMDMs sont cultivées pendant toute la nuit à 37°C et 5% de CO₂, puis stimulées par 100ng/ml de LPS de *H. pylori*. Le LPS est un ligand décrit comme activateur du TLR4 conduisant à l'activation d'NF- κ B (un facteur de transcription des cytokines pro-inflammatoires). Après différents temps de stimulation, les cellules sont directement lysées et les lysats sont analysés par WB.

Les résultats montrent que, après stimulation des BMDMs par le LPS de *H. pylori*, la phosphorylation de I κ B α est détectée après 30 minutes de stimulation et augmente pour atteindre une valeur maximale après 60 minutes de stimulation. I κ B α est une protéine qui inhibe NF- κ B en masquant son signal de localisation nucléaire et en le gardant séquestré dans un état inactif dans le cytoplasme (figure 27). Ceci bloque la capacité de NF- κ B à se lier à l'ADN. La phosphorylation d'I κ B α permet son détachement et donc son activation.

En ce qui concerne la voie d'activation de la production de l'interféron de type I suite à la stimulation des BMDM par le LPS de *H. pylori*, la phosphorylation de TBK1 et d'IRF3 a été analysée. TBK1 est une kinase responsable de la phosphorylation d'IRF3 (Interferon Regulatory Factor 3). IRF3 un facteur de transcription permettant l'expression d'IFNs de type I. La phosphorylation de TBK1 est une modification post-traductionnelle décrite comme nécessaire à l'activation de TBK1 (Ma, Helgason et al. 2012). La phosphorylation d'IRF3 est également nécessaire à son activation et sa translocation nucléaire.

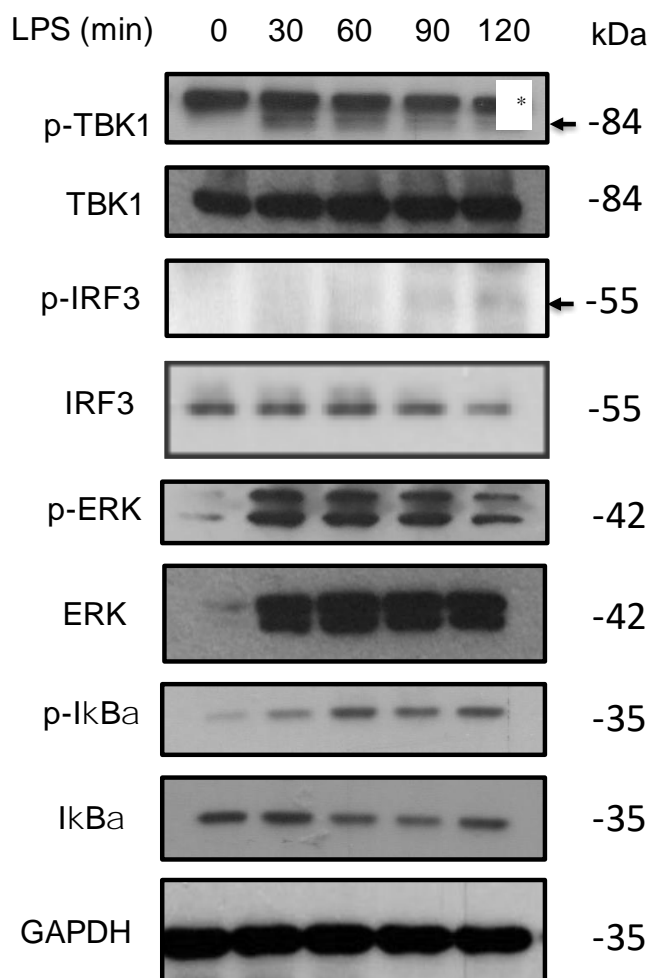


Figure 27 : Cinétique de stimulation des BMDMs de souris par le LPS de *H. pylori*. Les BMDMs sont stimulées par 100 ng/ml de LPS à différent temps : 0, 30, 60, 90 et 120 minutes. Ensuite, les lysats cellulaires ont été analysés par WB pour les protéines indiquées. * bande non spécifique..

Sur la figure, la phosphorylation de TBK1 s'observe à partir de 30 minutes de stimulation. Il y va de même pour IRF3 dont la forme phosphorylée s'observe à partir de 60 min et persiste jusqu'à 120 min (figure 27).

En outre, l'activation de la voie de signalisation Ras- ERK1/2 MAP kinase dépendante est aussi analysée par WB. Cette voie joue un rôle important dans la croissance, la prolifération et la différenciation cellulaires. L'activation de la protéine ERK (sa phosphorylation) témoigne de l'activation de cette voie de signalisation. Les résultats montrent que la forme active de ERK atteint sa valeur maximale après 30 min de stimulation par le LPS de *H. Pylori*. Par la suite la phosphorylation diminue pour presque disparaître après 120 minutes de stimulation (figure 27).

2) Libération de l'IL-1 β suite à la transfection des BMDMs par le LPS de *H. pylori*.

La stimulation des cellules BMDMs issues de la moelle osseuse des souris par le LPS bactérien active les voies de signalisation NF- κ B, TBK1/IRF3 et Ras ERK MAP kinase dépendante. Ainsi, nous avons voulu évaluer la production d'IL-1 β après stimulation par le LPS de *H. pylori*. Aucune sécrétion d'IL-1 β n'a été détecté suite à cette stimulation (résultats non présentés). Néanmoins nous avons transfectées les cellules par le LPS de *H. pylori*. Pour ce faire les cellules BMDMs sont amorcées par 100 ng/ml de LPS pendant 4h puis transfectées avec du LPS de *H. pylori* avec un agent transfectant pendant 12 heures. Les surnageants des cellules sont ensuite récupérés puis dosés par ELISA.

Les résultats montrent la présence significative de la forme active d'IL-1 β dans les surnageants des cellules stimulées par le LPS de *H. pylori* comparés aux surnageants des cellules amorcées ou non stimulées (Figure 28).

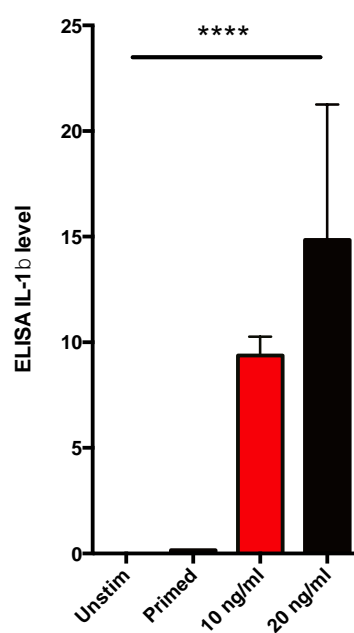


Figure 28 : Libération d'IL-1 β par les cellules BMDMs suite à la transfection du LPS bactérien de *H.pylori*. Les cellules BMDMs sont amorcées par du Pam3CSK4 (ligand de TLR2) pendant 4h puis transfectées avec du LPS de *H. pylori* avec un agent transfectant pendant 12 heures. Les surnageants des cellules sont ensuite récupérés puis analysés par ELISA. Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du test de Mann-Whitney pour les données non paramétriques. *** $p < 0,001$.

Etant donné que la libération d'IL-1 β est une conséquence d'une mort cellulaire appelée pyroptose, nous avons évalué la mort cellulaire par le test lactate déshydrogénase (LDH). Ce test se base sur l'analyse de l'enzyme LDH, normalement cytoplasmique, présente dans les surnageants des cellules. La présence de la LDH au niveau des surnageants témoigne de la mort cellulaire. Suite à ce test nous

avons noté une mort cellulaire significative chez les cellules transfectées par le LPS bactérien de *H. pylori* comparé aux cellules non transfectées (Figure 29).

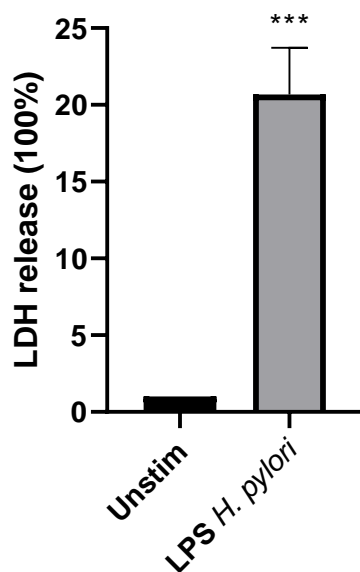


Figure 29 : La mort cellulaire induite suite à la transfection des cellules par le LPS de *H. pylori*. Les cellules BMDMs sont amorcées par du Pam3CSK4 pendant 4h puis transfectées avec du LPS de *H. pylori* avec un agent transfectant pendant 12 heures. Les surnageants des cellules sont ensuite récupérés puis la mort cellulaire a été évaluée par le test LDH. Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du test de Mann-Whitney pour les données non paramétriques. *** $p < 0,001$.

Par la suite nous avons comparé la libération d'IL-1 β suite à la transfection des BMDMs avec différents types de LPS bactérien : *H. pylori*, *L. interrogans* et *E. coli*. Nous avons noté une forte sécrétion d'IL1 β par les cellules BMDMs transfectées par le LPS de *E. coli* par rapport aux BMDMs non transfectées, ou par rapport aux cellules transfectées par le LPS de *H. pylori* et celles transfectées par le LPS de *L. interrogans* (Figure 30). Les résultats montrent que la libération d'IL-1 β est significativement différente après transfection des différents LPS : cette libération semble être modulée en fonction de l'origine bactérienne des LPS transfectés.

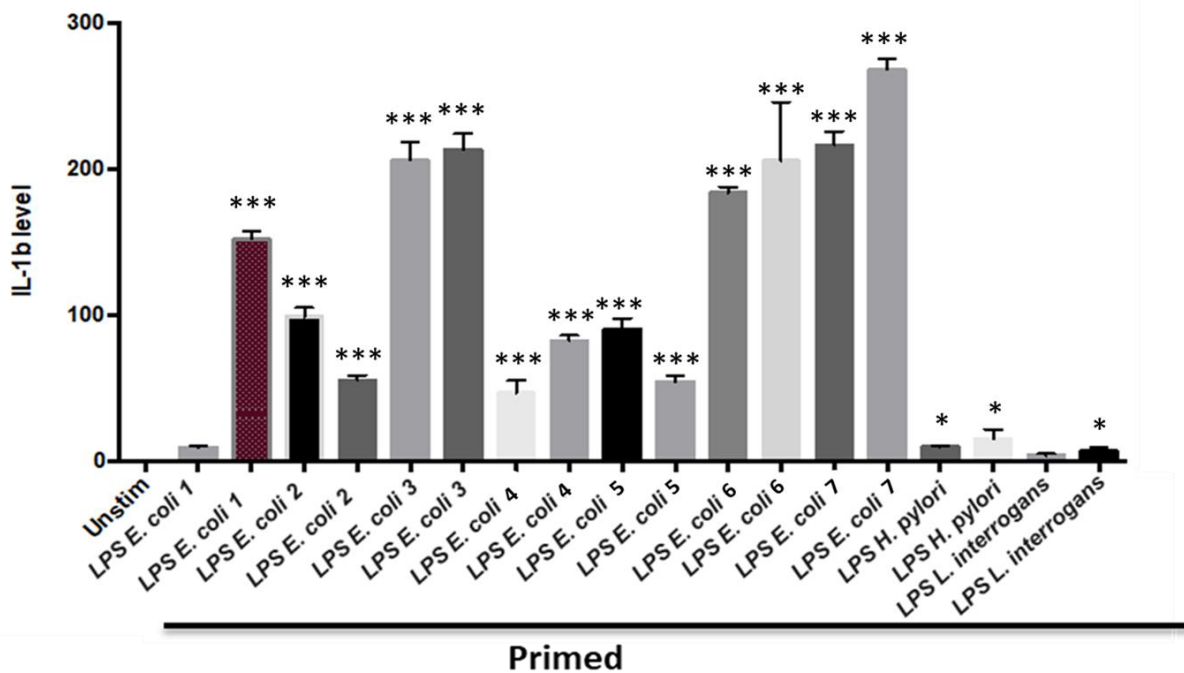


Figure 30 : Libération d'IL-1 β par les cellules BMDMs suite à leur transfection par des LPS bactériens différents. Les cellules BMDMs sont amorcées par du Pam3CSK4 pendant 4h puis transfectées avec du LPS de *H. pylori*, *L. interrogans* et *E. coli* avec un agent transfectant pendant 12 heures. Les surnageants des cellules sont ensuite récupérés puis analysés par ELISA. Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du test de Mann-Whitney pour les données non paramétriques. *** $p < 0,001$.

De la même manière le test LDH montre une différence significative de l'induction de la mort cellulaire entre les cellules BMDMs transfectées par les différents LPS bactériens (Figure 31). Les cellules transfectées par le LPS de *L. interrogans* montre une mort cellulaire moins importante que celles transfectées par le LPS de *H. pylori* et celui de *E. coli*.

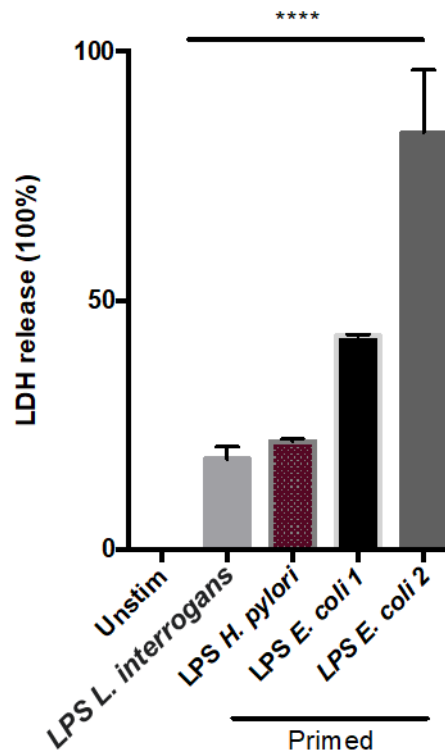


Figure 31 : La mort cellulaire induite suite à la transfection des cellules par les différents LPS bactériens. Les cellules BMDMs sont amorcées par du Pam3CSK4 pendant 4h puis transfectées avec du LPS de *H. pylori*, *L. interrogans* et *E. coli* avec un agent transfectant pendant 12 heures. Les surnageants des cellules sont ensuite récupérés puis la mort cellulaire a été évaluée par le test LDH. Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du test de Mann-Whitney pour les données non paramétriques. *** $p < 0,001$.

Nous avons par la suite évalué la mort cellulaire des cellules BMDMs après transfection des différents LPS en temps réel. Nous savons que les cellules vivantes ont des membranes intactes et excluent une variété de colorants qui pénètrent facilement par les membranes perméables endommagées des cellules non viables. La mise des cellules en plaque opaque avec l'IP dans un lecteur de plaque permet de suivre la mort cellulaire en temps réel.

Les résultats montrent que la mort cellulaire commence plus rapidement chez les cellules BMDMs transfectés par le LPS de *E. coli* par rapport aux cellules transfectés par le LPS de *H. pylori* et de *L. interrogans* (Figure 32).

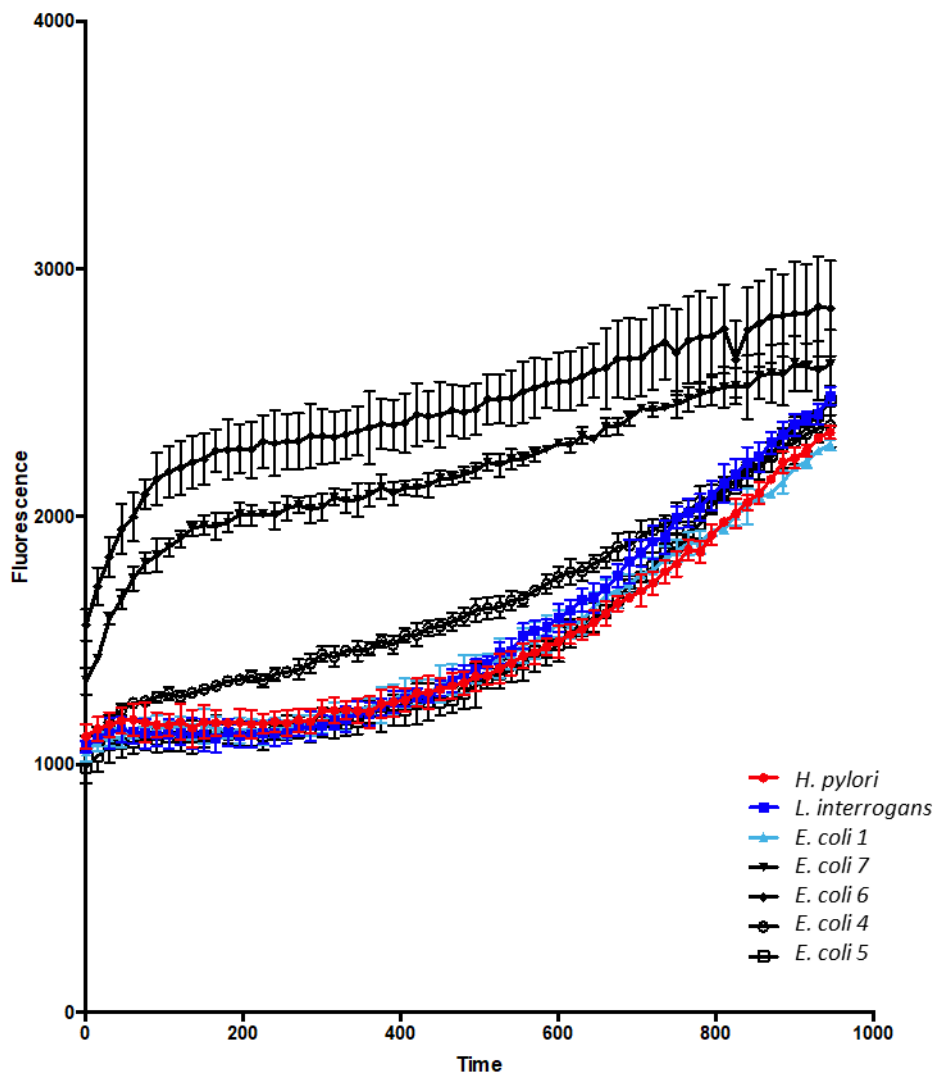


Figure 32 : La mort cellulaire en temps réel suite à la transfection des cellules BMDM par les différents LPS bactériens. Les cellules BMDMs sont amorcées du Pam3CSK4 pendant 4h puis transfectées avec du LPS de *H. pylori*, *L. interrogans* et *E. coli* avec un agent transfectant pendant 6 heures. L'évaluation de la mort cellulaire en temps réel a été effectuée par le dosage de la fluorescence émise par l'iodure de propidium pendant 16 heures.

3) Activation de l'inflammasome suite à la transfection *in vitro* des cellules HCT116 humaine par le LPS de *H. pylori*.

Comme nous avons déterminé que la transfection des BMDMs de souris par du LPS de *H. pylori* induit la libération d'IL-1 β et la mort cellulaire, nous avons essayé de reproduire nos résultats chez les cellules humaines HCT116. Les cellules HCT116 sont une lignée cellulaire de cancer du côlon humain. Nous avons évalué pour cela la production d'une autre cytokine inflammatoire ; l'IL-18 comme marqueur de l'activation de l'inflammasome.

Pour ce faire nous avons transfectées nos cellules avec différentes concentrations du LPS de *H. pylori* et de *E. coli*. Après 48 heures de transfection les surnageants des cellules HCT116 sont mis directement avec les cellules HEK-Blue IL-18. En présence d'IL-18, les cellules vont exprimer le gène rapporteur « Phosphatase Alcaline Embryonnaire Sécrétée » (SEAP), via la voie de signalisation NF- κ B. Dans le milieu « Quanti-Blue » (Invivogen), l'enzyme SEAP va catalyser une réaction chromogène détectée en mesurant l'absorbance à 640 nm.

Les résultats montrent que la transfection des HCT116 par le LPS de *H. pylori* et de *E. coli* induit la libération de l'IL-18 et donc l'activation de l'inflammasome : l'IL-18 comme l'IL-1 β est la conséquence de l'activation de l'inflammasome NLRP3. Cependant, et d'une manière intrigante nous avons observé que dans ces cellules, le LPS de *H. pylori* induit de la même manière l'activation de l'inflammasome comparé au LPS de *E. coli* (Figure 33).

HCT 116 / LPS (Hp et *E.coli*) transfection

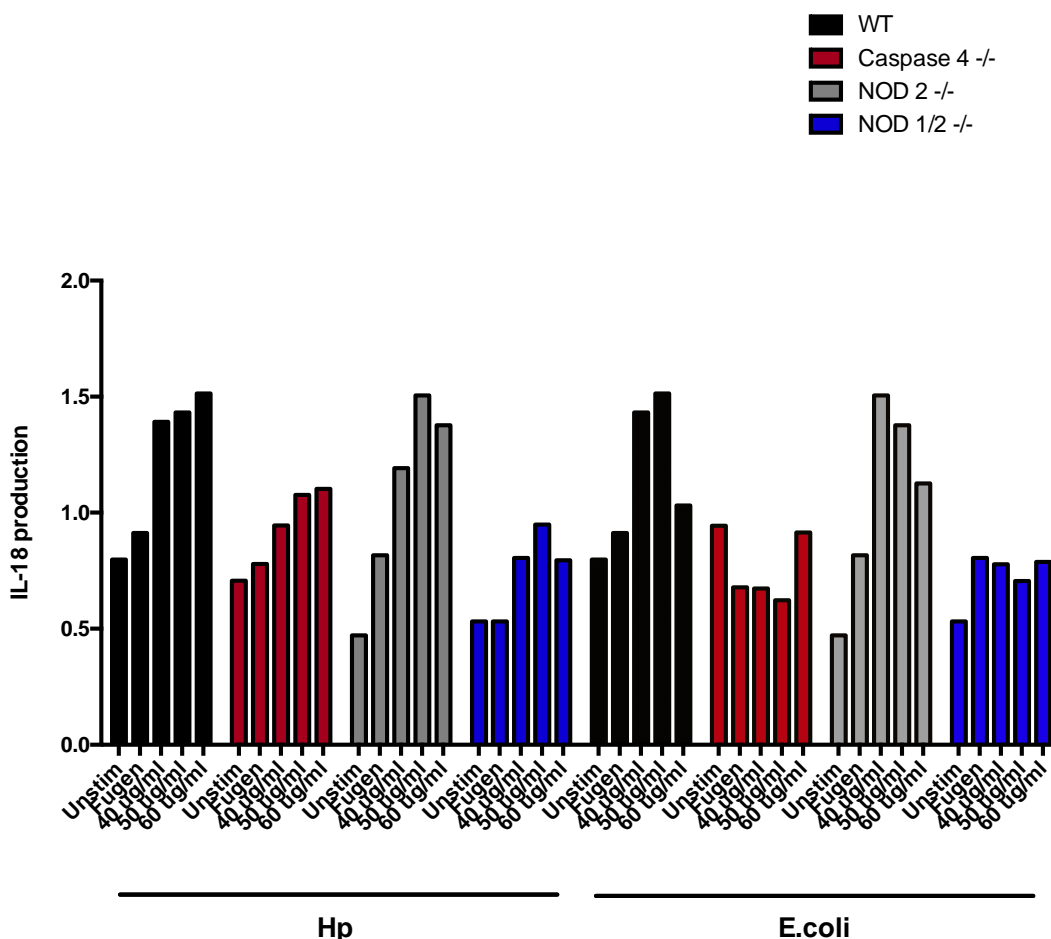


Figure 33 : Production d'IL-18 par les cellules HCT116 suite à leur transfection par les LPS bactériens de *H. pylori* et de *E. coli*. Les cellules sont transfectées avec différentes concentrations du LPS de *H. pylori* et de *E. coli*. Après 48 heures de transfection les surnageants des cellules HCT 116 sont mis directement avec les cellules HEK-Blue IL-18. En présence d'IL-18, les cellules vont exprimer

le gène rapporteur « *Phosphatase Alcaline Embryonnaire Sécrétée* » (*SEAP*), via la voie de signalisation *NF-κB*. Dans le milieu « *Quanti-Blue* », l'enzyme *SEAP* va catalyser une réaction chromogène détectée en mesurant l'absorbance à 640 nm.

4) Caspase-4, NOD1 et NOD2 modulent l'activation de l'inflammasome suite à la transfection des cellules par du LPS de *H. pylori*.

Le LPS intracellulaire interagit directement avec la caspase-4/5 humaine (caspase-1 chez la souris) conduisant à l'oligomérisation des complexes LPS-caspase-4/5 ou -11. Il s'agit d'un inflammasome non canonique. L'activation de cet inflammasome non canonique conduit au clivage par les caspases de la Gasdermine-D (*GSDMD*) au résidu Asp276 pour produire des fragments *GSDMD* N et C-terminaux. Les fragments N-terminaux *GSDMD* génèrent des pores dans la membrane cellulaire entraînant une mort cellulaire, appelée pyroptose (Liu, Zhang et al. 2016).

Nous avons donc évalué ce phénomène en utilisant des cellules HCT116 déficientes en caspase-4. Après transfection des LPS bactériens, que ce soit celui de *H. pylori* ou de *E. coli*, nous avons constaté une diminution de la sécrétion d'IL-18 par les cellules HCT116 Caspase-4^{-/-} comparé aux cellules sauvages (non déficientes en caspase 4). Ceci confirme les données reportées dans la littérature (Figure 33).

Sachant que le LPS bactérien peut interagir avec le domaine CARD des caspases -4, -5 ou -11, nous avons examiné si NOD1 et NOD2 (appartenant à la famille des NRLC et contenant un domaine CARD) pourraient jouer un rôle dans la libération d'IL-18 et donc dans l'activation de l'inflammasome. Pour y répondre, nous avons utilisé des cellules HCT116 NOD1/2^{-/-} et NOD2^{-/-}. Après transfection de ces cellules par le LPS bactérien que ce soit celui de *H. pylori* ou de *E. coli*, les résultats montrent une diminution de la production d'IL-18 chez les cellules NOD1/2^{-/-} par rapport aux cellules NOD2^{-/-} et des cellules sauvages. Ce résultat (Figure 33) montre que NOD1 (et non NOD2) pourrait être impliqué directement dans la reconnaissance du LPS bactérien de *H. pylori* et celui de *E. coli*.

B. Discussion

Dans l'estomac humain, *H. pylori* colonise la muqueuse recouvrant les cellules épithéliales de l'estomac et induit une inflammation chronique. Les cellules immunitaires sont recrutées et communiquent avec les cellules épithéliales via des médiateurs notamment les cytokines. La signalisation en aval des récepteurs de cytokines exprimés par les cellules immunes et non immunes peut favoriser l'inflammation et engager la réponse de l'hôte contre les bactéries gastro-intestinales. Diverses études ont clairement montré qu'il existe des différences ethniques et démographiques dans l'expression de ces cytokines. À notre connaissance, aucune étude concernant la réponse immune de l'hôte n'a été menée chez des patients marocains infectés par *H. pylori* lorsque nous avons entamé ce travail. Nous avons porté notre intérêt sur trois cytokines inflammatoires (IL-1 β , IL-8 et IL-17A) qui jouent un rôle important dans l'infection à *H. pylori* et dans la cascade précancéreuse gastrique induite par cette bactérie. Dans ce travail, nous avons étudié l'expression de l'ARNm des IL-1 β , IL-8 et IL-17A dans la muqueuse gastrique antrale et fundique de patients marocains infectés par *H. pylori*.

Les analyses histopathologiques et PCR ont révélé que 87,32% des patients étaient infectés par *H. pylori*. Cette prévalence est proche des autres résultats rapportés au Maroc par différentes équipes (Alaoui Boukhris, Benajah et al. 2012, Alaoui Boukhris, Amarti et al. 2013).

L'étude de l'expression des gènes de cytokines a montré que les niveaux d'expression de l'ARNm des cytokines IL-1 β , IL-8 et IL-17 étaient différents dans l'antra et le fundus des patients infectés par *H. pylori*. En effet, l'expression de l'ARNm de l'IL-1 β était significativement plus faible dans la muqueuse antrale des patients infectés par *H. pylori* par rapport à celle des patients non infectés, alors qu'il n'y avait pas de différence significative dans l'expression de l'ARNm de l'IL-8 et de l'IL-17A entre les patients infectés par *H. pylori* et les patients non infectés. L'expression des trois cytokines était plus élevée dans la muqueuse fundique des patients infectés par *H. pylori* par comparaison aux patients non infectés. De plus, l'expression des trois cytokines était significativement corrélée dans l'antra et le fundus de l'estomac, ce qui indique qu'elles sont dépendantes et qu'elles sont étroitement associées à la pathogénie de l'infection à *H. pylori*. Nous avons par la suite assigné à nos patients trois stades pathologiques en fonction de la classification du système de Sydney mis à jour (Dixon, Genta et al. 1996). Il a été suggéré que le cancer gastrique est le résultat final de modifications progressives de la muqueuse gastrique, en commençant par une gastrite chronique, suivie d'une gastrite atrophique multifocale, puis d'une métaplasie intestinale (Kusters, van Vliet et al. 2006). Nos résultats ont montré que l'expression relative de l'IL-1 β et de l'IL-17A dans l'antra des patients infectés par *H. pylori* est significativement plus faible au stade de la métaplasie par rapport aux patients non infectés et aux autres stades pathologiques. L'expression des IL-1 β , IL-8 et IL-17A dans la muqueuse fundique des patients atteints de métaplasie était plus élevée que celle des patients non infectés et des autres stades pathologiques. En outre, sur la

base d'un modèle prédictif multivarié, nos résultats suggèrent que cette triade d'interleukines peut être utilisée pour prédire le stade de la métaplasie dans la progression de la maladie, principalement par la régulation négative spécifique de l'expression de l'IL-17A dans l'antra et la régulation positive spécifique de l'IL-1 β dans le fundus. Ces cytokines pourraient ainsi être utilisées comme marqueurs de l'évolution de l'infection par *H. pylori* chez les patients marocains vers des stades pathologiques plus graves.

La sous-expression de l'IL-1 β dans l'antra des patients infectés par *H. pylori* est en accord avec les résultats rapportés par Ana Flávia Teixeira Rossi *et al.* (Rossi, Cadamuro *et al.* 2016) mais ne correspond pas à ceux de Serelli-Lee *et al.* (Serelli-Lee, Ling *et al.* 2012) qui ont rapporté des niveaux élevés d'expression de l'IL-1 β dans la muqueuse des patients infectés par *H. pylori*. De plus, nous avons montré que l'expression de l'IL-17A et de l'IL-8 dans le fundus est en accord avec celles d'études précédentes montrant que l'infection par *H. pylori* est associée à une augmentation de l'expression de l'IL-8 et de l'IL-17A dans la muqueuse gastrique. Cependant, l'expression de l'IL-17A est sous exprimée dans l'antra des patients infectés par *H. pylori*. Dans la littérature, la sur-expression de l'IL-17A, IL-8 et IL-1 β a été reportée dans les régions antrales ou fundiques alors que leur expression dans les biopsies appariées antrales et fundiques de personnes infectées par *H. pylori* n'a pas été clairement reportée. L'expression de ces cytokines dans la muqueuse gastrique suite à l'infection par *H. pylori* varie également en fonction de l'ethnie (Nagashima, Iwatani *et al.* 2015). Les divergences entre nos résultats et ceux des différentes études sur l'expression des cytokines peuvent également être dues à la taille des échantillons de chaque étude.

L'IL-1 β , une cytokine pro-inflammatoire, est un puissant inhibiteur de la sécrétion d'acide gastrique, favorisant l'hypochlorhydrie, la colonisation par *H. pylori* et les gastrites plus graves (Calam 1999). L'IL-1 β peut agir en tandem avec d'autres cytokines inflammatoires pour recruter et activer les neutrophiles dans la muqueuse gastrique, ce qui entraîne une inflammation des muqueuses. L'IL-1 β déclenche la libération d'IL-17A par les cellules Th17, qui est une autre cytokine régulée positivement lors de l'infection par *H. pylori*, ce qui suggère que cette cytokine pourrait également jouer un rôle important dans la réponse inflammatoire contre la colonisation par *H. pylori*. L'implication de l'IL-17A dans la gastrite liée à *H. pylori* est également soutenue par le fait que cette cytokine est capable de stimuler les cellules immunitaires et non-immunes pour produire de nombreux médiateurs inflammatoires, y compris le TNF α , l'IL-1 β , l'IL-6 et les métalloprotéases matricielles (MMP). En plus de leur effet inflammatoire, les MMPs peuvent également influencer l'évolution des pathologies associées à *H. pylori* (Jemilohun and Otegbayo 2016). L'IL-17A peut également stimuler la production d'IL-8 par les cellules épithéliales et les macrophages, or il a été rapporté que *H. pylori* régule positivement l'expression du gène de l'IL8 dans les cellules épithéliales gastriques (Lee, Bae *et al.* 2004, Lee, Khoi *et al.* 2013).

Sur la base de la stratification des patients, nos résultats ont clairement montré que les trois cytokines inflammatoires sont régulées positivement dans la muqueuse fundique des patients au stade de métaplasie. Selon la classification du système de Sydney mis à jour, la métaplasie est une étape d'évolution vers le cancer gastrique (Dixon, Genta et al. 1996). Les conséquences cliniques dépendent de l'interaction entre la distribution et la gravité de la gastrite ainsi que de la sécrétion d'acide. Plusieurs auteurs ont conclu que la sur-expression de l'IL-1 β induite par l'infection à *H. pylori* entraîne l'inhibition de la sécrétion d'acide gastrique, ce qui peut avoir un effet profond sur la distribution et l'histoire naturelle de cette infection (Waldum, Kleveland et al. 2016). L'infection est d'abord établie dans les parties de l'estomac ayant un pH plus élevé, comme l'antra : la production élevée d'acide par les cellules pariétales protège probablement la muqueuse fundique de la colonisation initiale. La gastrite antrale est associée à la régulation positive de la gastrine, une hormone peptidique qui stimule la sécrétion d'acide gastrique, et à la régulation négative de la somatostatine, une hormone gastro-intestinale inhibitrice universelle, avec pour effet d'augmenter la sécrétion d'acide gastrique. Les modifications de la réponse acide qui en résultent dépendent fortement de l'état et de la santé de la muqueuse fundique et de la masse des cellules pariétales. L'infection à *H. pylori* provoque initialement une gastrite antrale, mais une hypochlorhydrie se développe si l'infection est persistante, permettant à la bactérie de migrer de manière proximale, ce qui entraîne une pangastrite et un risque accru d'aggravation de la pathologie. Dans certains cas, la gastrite est principalement fundique, la sécrétion d'acide diminue et l'atrophie s'installe (Schubert and Peura 2008). Lorsque la colonisation d'*H. pylori* est à prédominance fundique ou pangastrique, la production d'acide est généralement normale ou réduite malgré la stimulation par les cellules G (Atherton 2006). Ceci est dû à l'inhibition de la sécrétion d'acide par des médiateurs pro-inflammatoires tels que l'IL-1 β et le TNF- α : *H. pylori* n'est normalement pas capable de coloniser le fundus à moins que la sécrétion d'acide soit réduite (Marshall and Warren 1984). L'hypergastrinémie chronique peut entraîner une atrophie des glandes sécrétrices d'acide, ce qui provoque une augmentation de la sécrétion de gastrine et la mise en place d'une boucle de rétroaction positive.

Par ailleurs, l'IL-1 β est régulée positivement dans les cancers du sein, du colon, du poumon et de l'estomac ainsi que dans les mélanomes. L'IL-1 β participe au processus de cancérogenèse par sa capacité à produire des facteurs angiogéniques et pro-métastatiques tels que le VEGF, l'IL-8, l'IL-6, le TNF- α et le TGF- β (Lewis, Varghese et al. 2006). Des travaux antérieurs utilisant des modèles expérimentaux ont montré que la production locale d'IL-1 β influence la croissance des tumeurs et les métastases en potentialisant la prolifération cellulaire ou en induisant une inflammation et une angiogénèse (Shigematsu, Niwa et al. 2013). Etant donné que l'IL-1 β favorise également la différenciation des cellules Th17, il est possible que certains des effets pro-cancérigènes d'IL-1 β puissent être médiés par les cellules Th17 (Acosta-Rodriguez, Napolitani et al. 2007, Acosta-Rodriguez, Rivino et al. 2007). Le

recrutement et l'activation des phagocytes et d'autres cellules pro-inflammatoires induits par la signalisation de l'IL-17A et d'autres mécanismes augmentent encore les niveaux de radicaux d'oxygène et d'azote et le stress oxydatif (Miljkovic and Trajkovic 2004, Shibata, Ueda et al. 2009). D'autre part, Kitadai *et al.* ont rapporté que l'expression de l'IL-8 est directement corrélée à la vascularisation des carcinomes gastriques humains alors que son inhibition diminue l'angiogenèse dans les cancers de l'estomac (Kitadai, Haruma et al. 1998).

La progression de ce processus inflammatoire a été décrite par Correa et al. (Correa and Piazzuelo 2012) : l'inflammation persistante du corps de l'estomac induite par *H. pylori*, entraîne une gastrite atrophique, qui est un facteur de risque de cancer gastrique (Dixon, Genta et al. 1996). La gastrite atrophique entraîne une diminution du pH et une hypochlorhydrie. Ce milieu alcalin facilite la colonisation et la prolifération de *H. pylori*. L'IL-1 β et le TNF- α suppriment également directement la production d'acide par les cellules pariétales (Atherton 2006). De plus, certains antigènes de la bactérie ont une structure similaire à l'ATPase de la pompe à protons gastrique, ce qui peut entraîner la destruction auto-immune de la pompe, réduisant encore la sécrétion d'acide (Amedei, Bergman et al. 2003, Kiriya, Watanabe et al. 2007). L'augmentation du pH gastrique peut permettre à d'autres agents pathogènes d'infecter l'estomac, ce qui aggrave encore l'inflammation. L'IL-8, l'IL-1 β et le TNF- α peuvent également stimuler la production de gastrine en favorisant la prolifération des cellules épithéliales, l'activation du NF- κ B et l'expression de la cyclooxygénase-2 (COX-2) (Robinson, Argent et al. 2007). L'expression de plusieurs cytokines et de la COX-2 dans la muqueuse gastrique peut accélérer la progression des changements atrophiques et induire une transformation de la signalisation intracellulaire. D'autre part, l'infection à *H. pylori* provoquent une réponse inflammatoire chronique, entraînant une augmentation du renouvellement cellulaire qui, sur plusieurs décennies, peut se traduire par une accumulation d'erreurs mitotiques (Graham 2015).

L'infections à *H. pylori* est modulé par l'interaction de trois facteurs étiologiques : ceux liés à l'agent infectieux, la susceptibilité génétique de l'hôte et ceux liés à l'environnement. Nos résultats suggèrent que l'IL-1 β , l'IL-8 et l'IL-17A peuvent favoriser l'inflammation chez les personnes infectées par *H. pylori*, contribuant ainsi à la persistance de l'infection. Ces cytokines sont pléiotropes et sont impliquées dans de multiples cascades de signalisation qui pourraient renforcer le processus précancéreux. Des études supplémentaires sont nécessaires pour déterminer les rôles possibles que ces cytokines jouent dans la promotion et la pathogénèse de cette infection.

Par ailleurs, des études ont montré que le polymorphisme des gènes de cytokines influence leur expression et joue donc un rôle dans la sévérité de diverses maladies chroniques (Rad, Dossumbekova et al. 2004). L'IL-1 β , comme nous l'avons présenté, est étroitement liée à l'infection par *H. pylori*. Son expression, a été rapporté dans la littérature comme étant influencée par les polymorphismes

nucléotidiques -511 C/T et -31 T/C de la région promotrice du gène de l'IL-1 β ainsi que les répétitions en tandem du gène de l'IL-1RA (Guo, Qian et al. 2013).

Les analyses de l'expression relative de l'IL-1 β selon le polymorphisme nucléotidique -511 C/T du promoteur du gène IL-1 β chez les patients marocains infectés par *H. pylori* dans l'antra et le fundus de l'estomac ont montré que : les porteurs du génotype TT présentent une surexpression de l'IL-1 β par rapport aux autres génotypes au niveau de l'antra mais pas au niveau du fundus. Selon une étude japonaise (Hwang, Kodama et al. 2002), les porteurs du génotype TT présentent une surexpression de l'IL-1 β au niveau de l'antra et du fundus par rapport aux autres génotypes chez les patients infectés par *H. pylori* ce qui concorde avec nos résultats au niveau de l'antra mais pas au niveau du fundus. En revanche, Rad *et al.* et Murphy *et al.* ont rapporté qu'il n'y a aucune différence significative d'expression de l'IL-1 β entre les différents génotypes du polymorphisme nucléotidique à la position -511 du gène IL-1 β au sein de la population allemande et irlandaise (Hwang, Kodama et al. 2002, Rad, Dossumbekova et al. 2004, Murphy, Thornton et al. 2009). Plusieurs études ont souligné que l'expression de l'IL-1 β semble être influencée par l'origine ethnique des patients infectés par *H. pylori* (Hong, Zuo et al. 2016, Rech, Mazzoleni et al. 2018).

Quant aux résultats obtenus sur l'expression relative d'IL-1 β selon le polymorphisme nucléotidique -31 C/T du promoteur du gène IL-1 β , le génotype CC semble être associé à des niveaux élevés d'expression d'IL-1 β par rapport aux autres génotypes dans l'antra des patients marocains infectés par *H. pylori*. Le génotype CT est associé à un niveau d'expression le plus élevé au niveau du fundus. Rech et al. ont démontré que le génotype TT influence de manière positive l'expression de l'IL-1 β contrairement à nos résultats où l'on n'observe que le génotype TT est associé à une faible expression d'IL-1 β (Rech, Mazzoleni et al. 2018).

L'expression relative d'IL-1 β selon les VNTR dans l'intron 2 du gène de l'IL1RA chez les patients infectés par *H. pylori* dans l'antra et le fundus de l'estomac est variable. En effet, les porteurs de l'allèle 270 présentent des niveaux d'expression élevés de l'IL-1 β par rapport aux porteurs du génotype 440. Nos résultats sont en accord avec ceux de la littérature (Rad, Dossumbekova et al. 2004, Vilaichone, Mahachai et al. 2005).

Toutefois, nos résultats sur le polymorphisme de l'IL1 β restent préliminaires. L'étude du polymorphisme du gène IL1 β et son influence sur l'expression ainsi que son association aux stades pathologiques gastriques est en cours de finalisation par notre équipe.

En conclusion, la colonisation par *H. pylori* entraîne une gastrite chez toutes les personnes infectées, mais toutes les personnes ne développeront pas de symptômes. On pense que la réponse inflammatoire chronique est nécessaire pour le développement d'une séquence de transformations épithéliales appelée cascade de Correa, qui comprend la gastrite atrophique multifocale, la métaplasie

intestinale, la dysplasie et le cancer. Notre étude a mis en évidence une signature transcriptionnelle d'une population marocaine, favorable à l'évolution de l'infection de *H. pylori* vers des stades plus graves et confirme que des niveaux élevés de plusieurs cytokines inflammatoires, y compris l'IL-1 β , peuvent servir de biomarqueurs pour le cancer gastrique.

Concernant le volet *in vitro* de ce travail (résultats préliminaires), nous avons porté notre intérêt sur la signalisation induite après la reconnaissance de la bactérie ou de ses composantes (comme le LPS) par certains récepteurs de l'immunité innée. En effet, les PAMPs de *H. pylori* sont reconnus par les PRRs du système immunitaire inné de l'hôte et initient la production de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires. *H. pylori* régule positivement l'expression du facteur de transcription nucléaire NF- κ B dans les cellules épithéliales gastriques (GEC) (Keates, Hitti et al. 1997), ainsi que lors d'une infection chronique chez l'homme (Isomoto, Miyazaki et al. 2000, van Den Brink, ten Kate et al. 2000). NF- κ B est un régulateur clé des réponses pro-inflammatoires dans les cellules de l'hôte (Hayden, West et al. 2006). Ce facteur de transcription est omniprésent dans tous les types de cellules eucaryotes, où il existe sous une forme inactive, sous forme de molécule hétéro ou homodimérique. L'activation de la voie NF- κ B par des stimuli pro-inflammatoires, tels que des microorganismes vivants ou leurs produits, se traduit par la libération des dimères inactifs des inhibiteurs de la famille NF- κ B (I κ B). Dans le cas de la voie de signalisation classique NF- κ B, ces dimères sont transloqués vers le noyau, régulant ainsi positivement l'expression de divers gènes cibles (Hayden, West et al. 2006). Beaucoup de ces gènes codent pour des facteurs ayant des fonctions inflammatoires (Ferrero, Avé et al. 2008). Nos résultats montrent que le LPS de *H. pylori* induit la phosphorylation d'I κ B- α après 30 minutes de stimulation des BMDMs. Cependant, il existe plusieurs controverses dans la littérature : certains auteurs comme Smith *et al.* (Smith, Mitchell et al. 2003), Triantafilou *et al.* (Triantafilou, Gamper et al. 2007) et Lepper *et al.* (Lepper, Triantafilou et al. 2005) ont montré que le LPS de *H. pylori* active la voie NF- κ B via TLR2. De plus, le knockdown de TLR2 dans les cellules endothéliales vasculaires inhibe l'induction de cytokines médiées par le LPS de *H. pylori* (Triantafilou, Gamper et al. 2007). En revanche, d'autres auteurs ont montré que le LPS de *H. pylori* n'active pas la voie NF- κ B, contrairement au LPS d'autres bactéries à Gram négatif. Nos résultats montrent également que suite à l'infection des BMDM par le LPS bactérien de *H. pylori*, la voie IRF3 ainsi que la voie ERK semblent être activées. Il est reporté dans la littérature que l'activation de TLR4, en coopération avec la molécule adaptatrice MyD88, signale via la voie MAPK en aval, qui active ensuite le NF- κ B (Takeuchi and Akira 2001, Cario 2005). L'induction de l'activation de TLR2 par la signalisation du TLR4 initiée par le LPS de *H. pylori* est probablement responsable de l'activation de NF- κ B via la phosphorylation de la voie ERK (Uno, Kato et al. 2007).

Dans la niche de l'épithélium gastrique, *H. pylori* régule également l'activation de l'inflammasome et la pyroptose pour sa survie. L'activation de l'inflammasome est un événement important et crucial au cours des infections microbiennes et au cours d'autres processus inflammatoires. L'inflammasome, particulièrement le NLRP3, activé induit la production de caspase-1 mature et le clivage de la pro-IL-1 β et de la pro-IL-18 en formes matures d'IL-1 β et d'IL-18. L'IL-1 β est un pyrogène connu, impliqué dans le recrutement des leucocytes et la production de médiateurs de l'inflammation et des pathologies associées au système immunitaire (Apte, Dotan et al. 2006, Dinarello 2009). L'IL-18 n'a pas d'activité pyrogène ; mais il induit la production d'IFN- δ et joue un rôle dans la différenciation des populations de lymphocytes T activés en fonction de la nature des cytokines dans le milieu (Dinarello 2009). La colonisation chronique de l'estomac par *H. pylori* ne produit généralement pas de fièvre, ce qui pourrait être liée à la production contrôlée d'IL-1 β pyrogène contrairement au cas d'autres bactéries qui activent l'inflammasome et dont l'infection est associée à de la fièvre. Des études antérieures ont rapporté l'activation de l'inflammasome et la production d'IL-1 β et d'IL-18 matures dans un modèle murin de l'infection expérimentale à *H. pylori*. De même, une activation de l'inflammasome NLRP3, indépendamment de TLR2 et TLR4 a été rapportée dans les neutrophiles humains infectés par une souche de *H. pylori* (Kim, Park et al. 2013, Semper, Mejías-Luque et al. 2014, Koch, Hartung et al. 2015, Pachathundikandi and Backert 2018).

Nos résultats préliminaires montrent que la transfection des BMDMs de souris par le LPS de *H. pylori* suite à un amorçage du pro-IL-1 β permet la libération d'IL-1 β et la mort cellulaire. Nous avons constaté que, dans les cellules HCT116, cette libération dépend en partie de deux récepteurs NOD1, NOD2 et de la caspase 4. C'est l'efflux de K⁺ en conséquence de la pyroptose induite par le clivage de la gasdermin D par la caspase-4 qui conduit indirectement à l'activation de l'inflammasome NLRP3. Cependant plusieurs études ont montré que la libération d'IL-1 β suite à l'activation de l'inflammasome au cours de l'infection par *H. pylori* dépend en grande partie de l'inflammasome NLRP3 (Pachathundikandi and Backert 2018). Les études montrant l'implication de l'inflammasome dans la physiopathologie à *H. pylori* sont rares. Jusqu'à ce jour, une interaction directe des PAMPs de la bactérie avec les molécules de l'inflammasome et l'interaction de ces partenaires en amont ou en aval de la voie de signalisation durant l'infection par *H. pylori* reste non élucidé. L'exploration de ces mécanismes en détail peut donner des pistes pour contrôler et réduire la gravité de cette infection. Des études futures sont vivement sollicitées pour explorer l'activation de l'inflammasome via les récepteurs NOD1 et NOD2. En outre, des études sont également nécessaires pour aborder le rôle précis des variantes génétiques des NLRs dans la sensibilité ou la résistance à l'infection par *H. pylori*.

PARTIE II : ETUDE DES MECANISMES D'ACTIVATION DE L'INFLAMMASOME NLRP3 PAR LES VIRUS à ARNs

A. Résultats

Afin de décrypter le mécanisme d'activation de l'inflammasome, nous avons utilisé les virus connus pour leur activation de l'inflammasome NLRP3. Dans cette partie, nous avons utilisé différents virus à ARNs. Des études récentes ont montré que l'IL-1 β est essentielle dans la défense antivirale de l'hôte. Par ailleurs, il est désormais clairement établi que l'infection par certains virus à ARNs conduit à la production d'IL-1 β essentiellement suite à l'activation de l'inflammasome NLRP3. Cependant, les mécanismes par lesquels les virus à ARN induisent la production d'IL-1 β ne sont pas bien compris et / ou controversés. Il est proposé que les virus à ARNs induisent l'activation de l'inflammasome NLRP3 via une voie de signalisation impliquant RIP1-RIP3-DRP1 (Wang et al., 2014). Il est également proposé que le RIG-I puisse activer la caspase-1 en s'associant directement à l'ASC (Poeck et al., 2010). L'objectif de cette partie est de contribuer à la compréhension des mécanismes impliqués dans l'activation de l'inflammasome NLRP3 après une infection virale par des virus à ARNs.

1) Les virus à ARNs cytopathogènes stimulent l'activation de l'inflammasome NLRP3

Bien que des études précédentes ont démontré que certains virus à ARNs déclenchent l'activation de l'inflammasome NLRP3, peu de travaux ont comparé dans la même étude l'activation de l'inflammasome par différents virus à ARNs. À cette effet, nous avons utilisé le virus de Sendai (SeV) de la famille des paramyxoviridae, la souche H4 du virus de Sendai (SeV M) composée principalement de petits génomes interférents défectueux en « copyback », surproduisant des pppARNs et sous-produisant les protéines virales V et C, le virus de la stomatite vésiculaire (VSV) de la famille rhabdoviridae, le VSV contenant une mutation dans la protéine de la matrice (M) (VSV M), le virus de l'encéphalomyocardite (EMCV) de la famille picornaviridae et le virus Sindbis (SindV) du genre alphavirus. Des macrophages dérivés de la moelle osseuse (BMDMs) amorcés par le LPS ont été infectés par les différents virus, puis la présence de la p20 de la caspase-1 active et de l'IL-1 β a été évaluée par WB dans le surnageant des cellules infectées (Figure 34A). La p20 et l'IL-1 β mature n'ont été détectées que dans le surnageant des BMDMs infectées par le VSV ou le EMCV (Figure 34A). Dans les BMDMs amorcées infectées par le SeV ou le SindV, la pro-IL-1 β était moins exprimée (Figure 34A), et cela ne semble pas être due à une inhibition de la signalisation NF- κ B ni de l'IFN- β (Figure 35). La production des cytokines pro-inflammatoires IL-1 β et IL18 (marqueurs d'activation de l'inflammasomes NLRP3), après une infection par le VSV ou le EMCV a été confirmé par ELISA (Figure 34B, C). L'activation de la caspase-1 favorise non seulement la libération de cytokines pro-inflammatoires mais déclenche

également une forme de mort cellulaire appelée pyroptose par le clivage de la gasdermine D. Ainsi, la libération de ces deux cytokines a été associée à la mort cellulaire dans les cellules infectées par le VSV ou le EMCV (Figure 34D). Il est intéressant de noter que la capacité des virus à ARN à déclencher l'activation de l'inflammasome semble être indépendante de leur détection par la machinerie de l'immunité innée. En effet, le VSV, contrairement à l'EMCV, n'a pas induit la production d'IFN- β dans les BMDM infectées (Figure 34E, F), alors que les deux virus étaient d'excellents activateurs de l'inflammasome (Figure 34A-C). Les BMDMs sans amorçage ont été infectées par les différents virus à ARNs et la mort cellulaire n'a été détectée qu'après l'infection par le VSV ou le EMCV (Figure 34G). Étant donné que les deux virus se sont très bien répliqués dans les BMDMs (Figure 34H), nos observations suggèrent donc que seuls les virus qui se répliquent avec un effet cytopathogène comme le VSV ou l'EMCV sont des bons inducteurs de l'activation de l'inflammasome (Figure 34G, H). L'infection par le VSV ou l'EMCV n'est pas capable de déclencher, *in vitro*, ni l'expression de pro-IL-1 β ni l'amorçage de l'inflammasome NLRP3 (Figure 36).

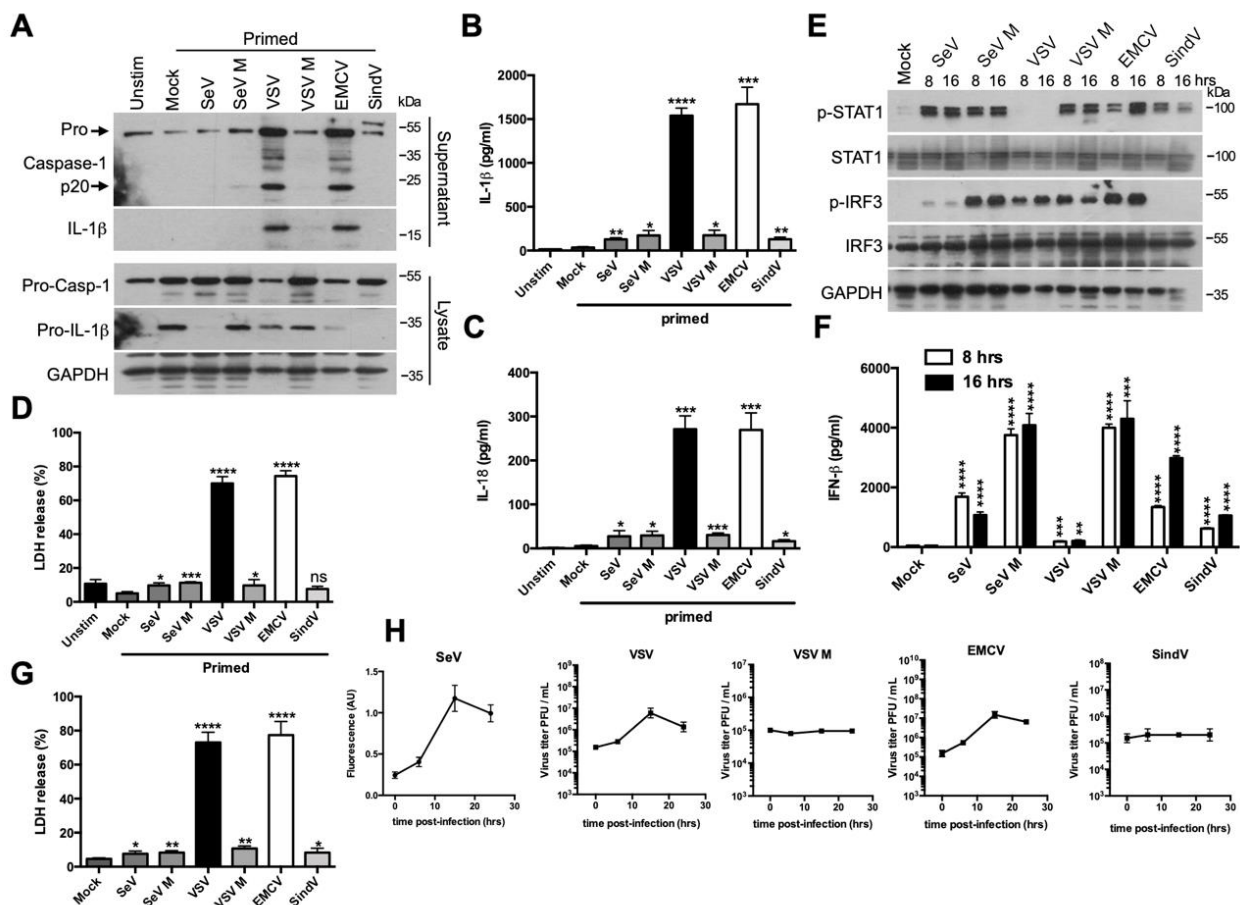


Figure 34 : Les virus à ARNs qui se répliquent et qui sont cytopathogènes déclenchent l'activation de l'inflammasome. (A). Les BMDMs amorcées par le LPS (100 ng/ml pendant 3 heures) ont été infectées par différents virus à ARNs pendant 15 heures. Ensuite, les surnageants cellulaires et les lysats cellulaires ont été analysés par WB pour les protéines indiquées. (B-C) Les BMDMs amorcés

ont été infectés par différents virus à ARNs. 15 heures plus tard, la libération d'IL-1 β (B) ou d'IL-18 (C) dans le surnageant cellulaire a été évaluée par ELISA. Les données indiquées sont des moyennes \pm SD provenant de trois expériences indépendantes (analyse de la variance et comparaison avec des BMDMs contrôles sont effectués avec le test t de Student). **** $P < 0,0001$, *** $P < 0,001$, ** $0,001 < P < 0,01$, * $0,01 < P < 0,05$. (D) Les BMDMs amorcés ont été infectés par différents virus à ARNs. 15 heures plus tard, la mort cellulaire a été évaluée à l'aide du test de libération de la LDH. Les données indiquées sont des moyennes \pm SD provenant de trois expériences indépendantes (analyse de la variance et comparaison avec des BMDMs contrôles sont effectués avec le test t de Student). **** $P < 0,0001$, *** $P < 0,001$, ** $0,001 < P < 0,01$, * $0,01 < P < 0,05$. ns, non significatif. (E) Les BMDMs ont été infectés par différents virus à ARN pendant 8 ou 16 heures. Ensuite, les lysats cellulaires ont été analysés par WB pour les protéines indiquées. (F) Les BMDMs ont été infectés par différents virus à ARNs pendant 8 ou 16 heures. Ensuite, la production d'IFN- β a été évaluée par ELISA. Les données indiquées sont des moyennes \pm SD provenant de trois expériences indépendantes (analyse de la variance et comparaison avec des BMDMs contrôles sont effectués avec le test t de Student). **** $P < 0,0001$, *** $P < 0,001$, ** $0,001 < P < 0,01$. (G) Les BMDMs ont été infectés par différents virus à ARNs. 15 heures plus tard, la mort cellulaire a été évaluée à l'aide du test de libération de LDH. Les données indiquées sont des moyennes \pm SD provenant de trois expériences indépendantes (analyse de la variance et comparaison avec des BMDMs contrôles sont effectués avec le test t de Student). **** $P < 0,0001$, ** $0,001 < P < 0,01$, * $0,01 < P < 0,05$. (H) Analyse de la réplication virale dans les BMDMs.

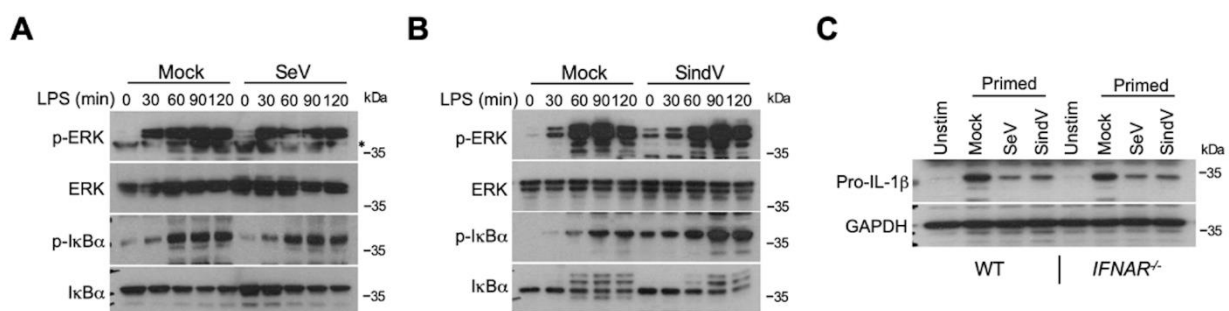


Figure 35 : les virus de Sendai et Sindbis n'induisent pas d'inhibition de la voie de signalisation TLR4. Les BMDMs ont été infectés par le SeV (A) ou le SindV (B) pendant 16 heures. Les cellules ont été stimulées par la suite avec du LPS (100 ng/ml) pendant différents temps indiqués et les lysats cellulaires ont été analysés par WB pour les protéines indiquées. (C) Les BMDMs WT ou IFNAR^{-/-}, amorcés par le LPS (100 ng/ml pendant 3 heures) sont infectés par le SeV ou le SindV pendant 16 heures. Les lysats

cellulaires ont été analysés par la suite par WB pour les protéines indiquées.

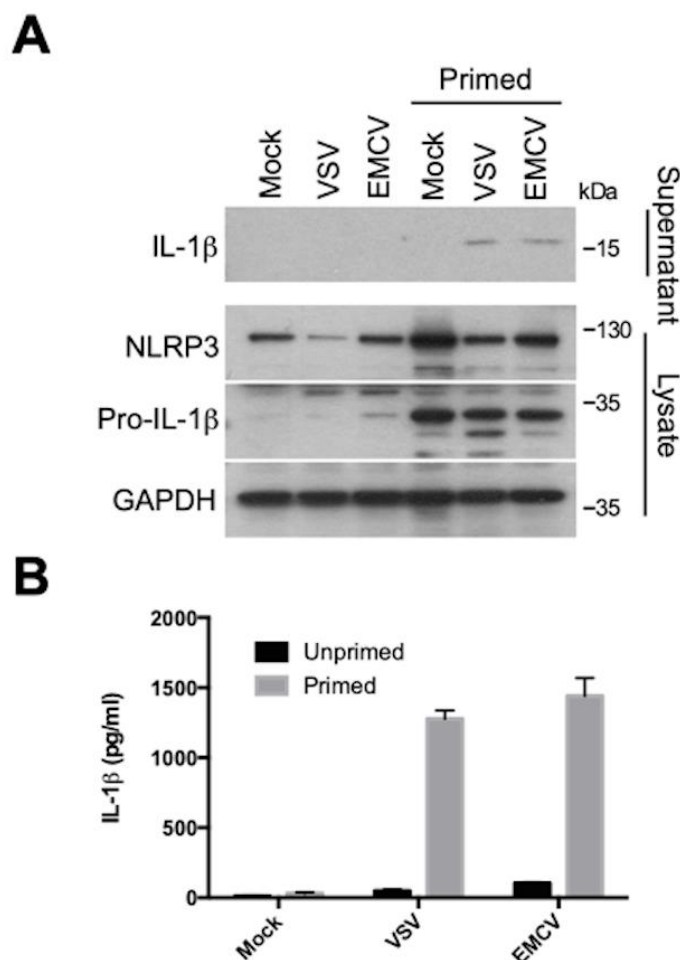


Figure 36 : L'amorçage est nécessaire pour que le VSV et l'EMCV activent l'inflammasome NLRP3. (A) Les BMDMs non amorcés ou amorcés ont été infectés par le VSV ou le EMCV pendant 15 heures. Ensuite, les surnageants et les lysats cellulaires ont été analysés par WB pour les protéines indiquées. (B) Les BMDMs non amorcés ou amorcés ont été infectés par le VSV ou le EMCV. 15 heures plus tard, la libération d'IL-1 β dans le surnageant cellulaire a été évaluée par ELISA.

L'infection des BMDMs amorcés par une MOI élevée de VSV ou de EMCV a entraîné une augmentation de la maturation de la caspase-1, la production d'IL-1 β et la mort cellulaire (Figure 37A-C). L'infection par le VSV ou le EMCV a déclenché l'activation de l'inflammasome NLRP3 : l'activation de la caspase-1 n'a pas été notifiée et la libération de l'IL-1 β a été fortement réduite lorsque les BMDMs NLRP3^{-/-} ont été infectées par les virus (Figure 37D, E). L'invalidation génétique de l'adaptateur ASC ou de la caspase-1 a induit une forte inhibition de la production d'IL-1 β (Figure 37E). Après traitement des cellules par une toxine comme la Nigéricine, un activateur classique de NLRP3, la formation de l'inflammasome NLRP3 conduit au recrutement et à l'activation de la caspase-1 par l'adaptateur ASC.

La caspase-1 active clive par la suite la pro-IL-1 β sous sa forme mature et la gasdermine D (GSDMD) (Figure 38). Le fragment N-terminal de la gasdermine D entraîne la pyroptose et permet la libération de l'IL-1 β mature par la cellule. En effet, la libération de l'IL-1 β et l'induction de la pyroptose ont été fortement réduites dans les BMDMs GSDMD^{-/-} à la suite d'un traitement à la nigéricine (Figure 37E, F). Il est intéressant de noter que la libération de l'IL-1 β n'a pas été entravée dans les BMDMs GSDMD^{-/-} infectées par le VSV ou le EMCV (Figure 37E), ce qui suggère que la libération de l'IL-1 β par le VSV ou le EMCV est indépendante de la gasdermine D. En outre, la mort cellulaire induite par le virus ne semble dépendre d'aucun composant de l'inflammasome, puisque la mort cellulaire n'a pas été affectée par l'absence de NLRP3, d'ASC, de caspase-1 ou de gasdermine D, contrairement au résultat obtenu après traitement à la nigéricine (Figure 37F). De plus, les effets observés n'étaient pas associés à l'altération de la réplication virale, car la réplication du VSV ou du EMCV dans les différentes BMDMs était normale (Figure 37G). L'infection par le VSV ou le EMCV a induit la libération de nombreuses protéines dans le milieu de culture cellulaire, et cette libération n'a pas été affectée par l'absence de GSDMD (Figure 39). Le profil de libération de ces protéines était assez similaire lorsque les BMDMs étaient incubées dans l'eau pour déclencher la nécrose (Figure 39). Ces observations suggèrent que la libération de l'IL-1 β et de l'IL-18, comme celle des autres protéines cytosoliques, est simplement due à la rupture de la membrane plasmique (une marque de nécrose) comme une conséquence de la mort

lytique des cellules induite par la réplication des virus cytopathogènes.

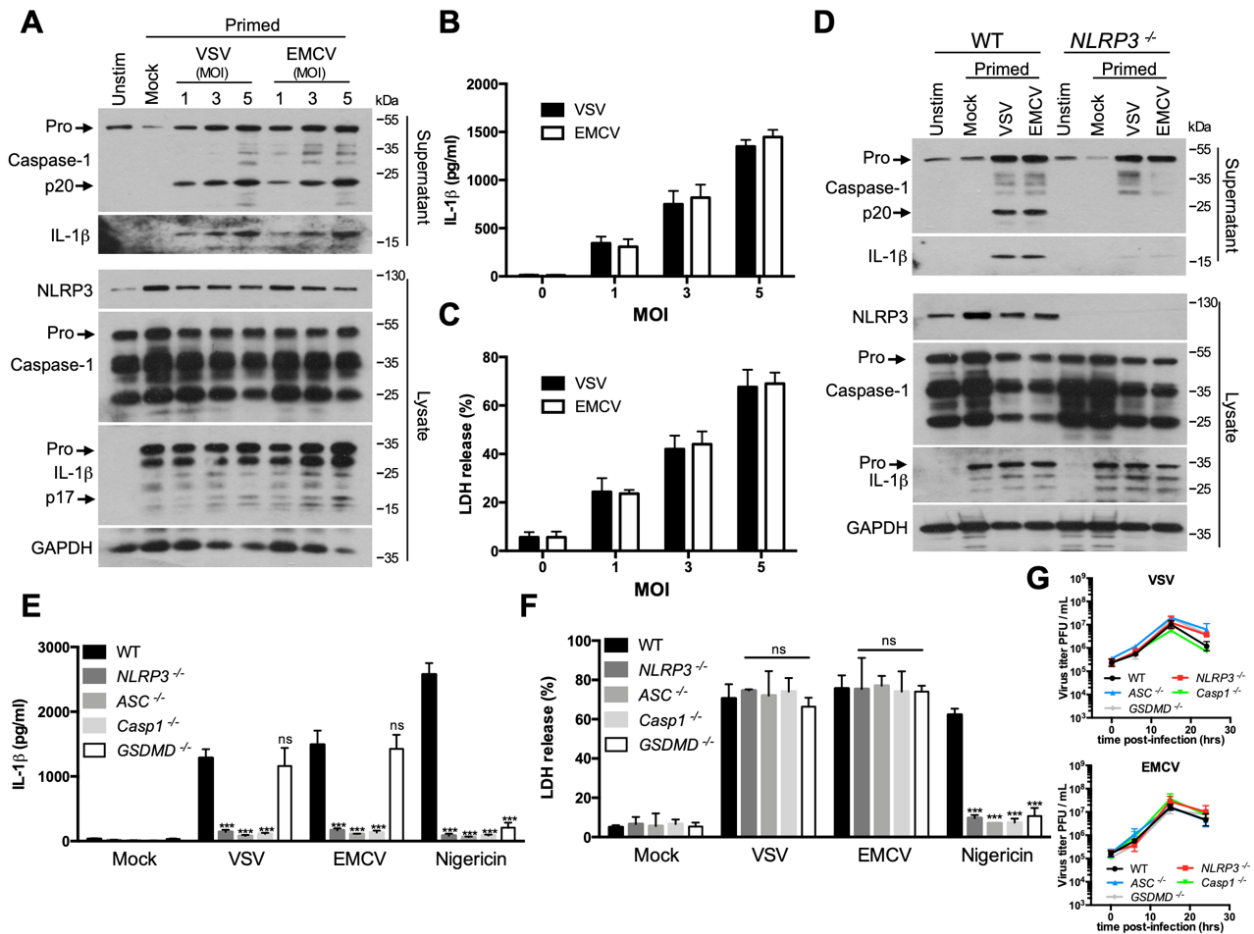


Figure 37 : Le VSV et l'EMCV favorisent l'activation de l'inflammasome NLRP3 et la mort cellulaire indépendante de l'inflammasome. (A) Des BMDMs amorcés ont été infectés avec une MOI croissante de VSV ou EMCV pendant 15 heures. Les surnageants cellulaires et les lysats cellulaires ont été par la suite analysés par WB pour les protéines indiquées. (B) Des BMDMs amorcés ont été infectés par une augmentation de la période d'incubation du VSV ou du EMCV. 15 heures plus tard, la libération d'IL-1 β dans le surnageant cellulaire a été évaluée par ELISA. (C) Les BMDMs amorcés ont été infectés par une MOI croissant de VSV ou de EMCV. 15 heures plus tard, la mort cellulaire a été évaluée par le test de libération de la LDH. (D) Des BMDMs WT ou NLRP3^{-/-}, amorcés, ont été infectés par le VSV ou le EMCV pendant 15 heures. Ensuite, le surnageant de culture et les lysats cellulaires ont été analysés par WB pour les protéines indiquées. (E) Des BMDM WT, NLRP3^{-/-}, ASC^{-/-}, Casp1^{-/-} ou GSDMD^{-/-} amorcées ont été infectées par le VSV ou l'EMCV. 15 heures plus tard, la libération d'IL-1 β dans le surnageant cellulaire a été évaluée par ELISA. Les données indiquées sont des moyennes \pm SD provenant de trois expériences indépendantes. ***P < 0,001 par rapport aux BMDMs WT (test t de Student). ns, non significatif. (F) Des BMDMs WT, NLRP3^{-/-}, ASC^{-/-}, Casp1^{-/-} ou GSDMD^{-/-} ont été infectés par le VSV ou le EMCV. 15 heures plus tard, la mort cellulaire a été évaluée à l'aide du test de libération de la LDH. Les données indiquées sont des moyennes \pm SD provenant de trois expériences

indépendantes. **** *P* contre les BMDMs WT (test *t* de Student). ns, non significatif. (G) Analyse de la réplication virale dans les différents BMDMs.

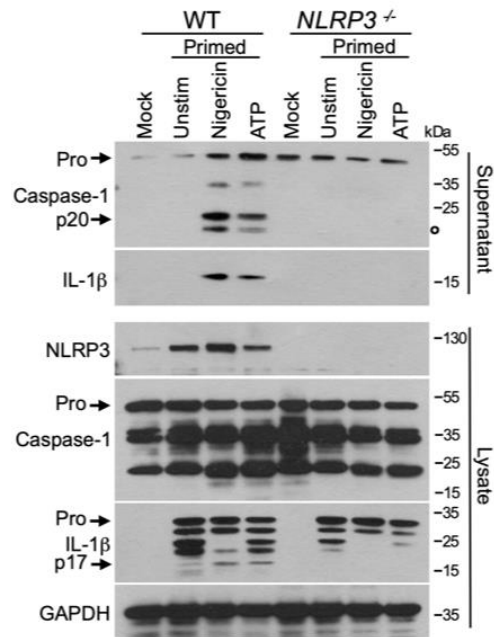


Figure 38 : La nigéricine et l'ATP déclenchent l'activation de l'inflammasome NLRP3. Des BMDMs ont été traités avec de la nigéricine (10 μ M) ou de l'ATP (5 mM) pendant 45 minutes. Ensuite, les surnageants cellulaires et les lysats cellulaires ont été analysés par WB pour les protéines indiquées.

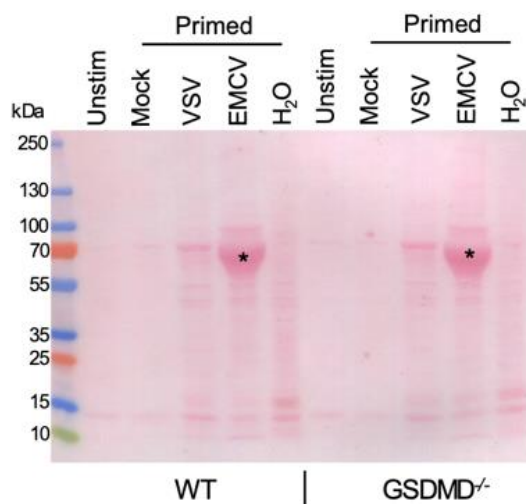


Figure 39 : L'infection par VSV ou EMCV favorise la rupture de la membrane plasmique, ce qui entraîne la libération des protéines cytosoliques. Des BMDMs WT ou GSDMD^{-/-} amorcés (LPS, 100

ng/ml pendant 3 heures) ont été infectés par le VSV ou l'EMCV pendant 15 heures. Ensuite, les surnageants cellulaires ont été analysés après coloration au rouge de ponceau. Comme témoin positif de la nécrose, des BMDMs ont été incubés pendant 1 heure dans l'eau. * indique probablement une surproduction d'une protéine du EMCV.

2) Les virus à ARNs cytopathogènes favorisent l'efflux de potassium pour activer l'inflammasome NLRP3

L'élimination des cellules infectées par apoptose est l'un des mécanismes de défense les plus ancestraux contre l'infection virale. L'infection par le VSV ou le EMCV a favorisé une activation rapide de la caspase-3, l'effecteur apoptotique (Figure 40A). Cependant, l'utilisation d'un large inhibiteur de la caspase comme le zVAD-fmk n'a pas empêché la mort cellulaire induite par le virus (Figure 40B). Enfin, l'inhibition de la caspase n'a pas affecté la formation des specks d'ASC et l'oligomérisation de l'ASC après l'infection (Figure 41), ce qui indique que la formation et l'activation du NLRP3 inflammasome sont indépendantes de toute activité de la caspase-3.

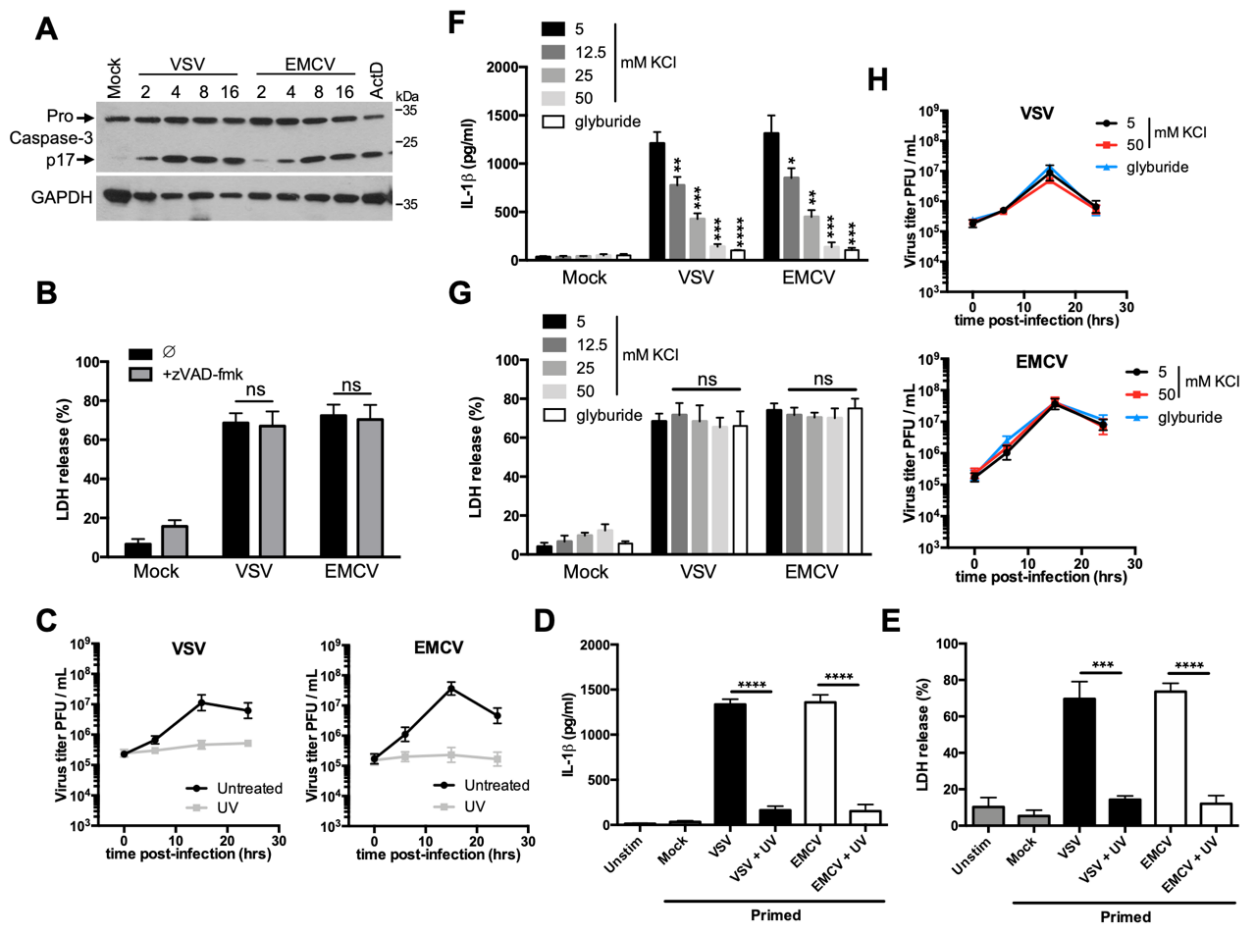


Figure 40 : La réplication du VSV et du EMCV favorise la mort cellulaire indépendante de la caspase-3 et l'activation de l'inflammasome NLRP3 par l'efflux de potassium K⁺. (A) Des BMDMs ont

été infectés par le VSV ou le EMCV. À différents moments après l'infection, les lysats cellulaires ont été analysés par WB pour les protéines indiquées. Un traitement à l'actinomycine D (ActD) (20 μ M pendant 8 heures) a été utilisé comme témoin positif. (B) Des BMDMs ont été infectés par le VSV ou l'EMCV en présence ou en l'absence de l'inhibiteur de caspases zVAD-fmk (10 μ M) pendant 15 heures. La mort cellulaire a ensuite été évaluée à l'aide du test de libération de la LDH. Les données indiquées sont des moyennes \pm SD provenant de trois expériences indépendantes. ns, non significatif (C) L'analyse de la réplication du VSV ou du EMCV soit non traité ou inactivé par les UV. (D) Des BMDMs amorcés ont été infectés par le VSV ou le EMCV non traité ou inactivé par les UV, pendant 15 heures. Ensuite, la libération d'IL-1 β dans le surnageant cellulaire a été évaluée par ELISA. Les données indiquées sont des moyennes \pm SD provenant de trois expériences indépendantes. ****P < 0,001 par rapport au virus inactivé (test t de Student). (E) Des BMDMs amorcés ont été infectés par le VSV ou le EMCV non traité ou inactivé par les UV. 15 heures plus tard, la mort cellulaire a été évaluée à l'aide du test de libération de la LDH. Les données indiquées sont des moyennes \pm SD provenant de trois expériences indépendantes. ****P < 0,0001, ***P < 0,001 par rapport au virus inactivé (test t de Student). (F) Des BMDMs amorcés ont été infectés par le VSV ou le EMCV pendant 15 heures en présence de concentrations croissantes de KCl ou de glyburide (un inhibiteur de la pompe à protons qui empêche l'efflux de K⁺, 25 μ g/ml). La libération d'IL-1 β dans le surnageant cellulaire a ensuite été évaluée par ELISA. Les données indiquées sont des moyennes \pm SD provenant de trois expériences indépendantes. ****P < 0.0001, ***P < 0.001, **0.001 < P < 0.01, *0.01 < P < 0.05 contre 5 mM de KCl (test t de Student). (G) Des BMDMs amorcés ont été infectés par le VSV ou le EMCV pendant 15 heures en présence de concentrations croissantes de KCl ou de glyburide (25 μ g/ml). Ensuite, la mort cellulaire a été évaluée à l'aide du test de libération de LDH. Les données indiquées sont des moyennes \pm SD provenant de trois expériences indépendantes. ns, non significatives par rapport à 5mM KCl (test t de Student). (H) Analyse de la réplication virale en présence de KCl ou de glyburide.

Comme le montrent les figures 34 et 37, l'infection par le VSV ou l'EMCV génère l'activation de l'inflammasome NLRP3 et la libération de l'IL-1 β . Cependant, lorsque les deux virus ont été inactivés par les rayons ultraviolets (U.V), empêchant ainsi leur réplication (Figure 40C), la sécrétion d'IL-1 β des BMDMs amorcés a été fortement réduite (Figure 40D), ce qui indique que la réplication virale est nécessaire pour que le VSV ou le EMCV soit "détecté" par l'inflammasome NLRP3. En outre, les virus inactivés par les UV ont à peine induit la mort cellulaire (Figure 40E), ce qui suggère à nouveau que la mort cellulaire consécutive à la réplication virale est nécessaire pour l'activation de l'inflammasome.

Comme nous avons observé que la réplication du VSV ou du EMCV au sein des BMDM favorise une forme de nécrose (Figure 39), nous avons ensuite émis l'hypothèse que cette rupture de la membrane

plasmique permet un efflux de K^+ intracellulaire qui est un événement de signalisation en amont nécessaire et suffisant pour l'activation du NLRP3. Nous avons confirmé cet effet, en bloquant l'efflux de K^+ par l'incubation des cellules en présence de concentrations croissantes de KCl ou avec l'inhibiteur de la pompe à protons, « glyburide ». En effet, le blocage de l'efflux de K^+ a inhibé la sécrétion d'IL-1 β après une infection par le VSV ou le EMCV (Figure 40F), sans toutefois empêcher la mort des cellules (Figure 40F) ou la réplication virale (Figure 40H). Ces observations indiquent donc que la réplication virale favorise la mort cellulaire nécrotique/lytique et l'efflux de K^+ conduisant ainsi à l'activation de l'inflammasome NLRP3 et à la maturation de l'IL-1 β .

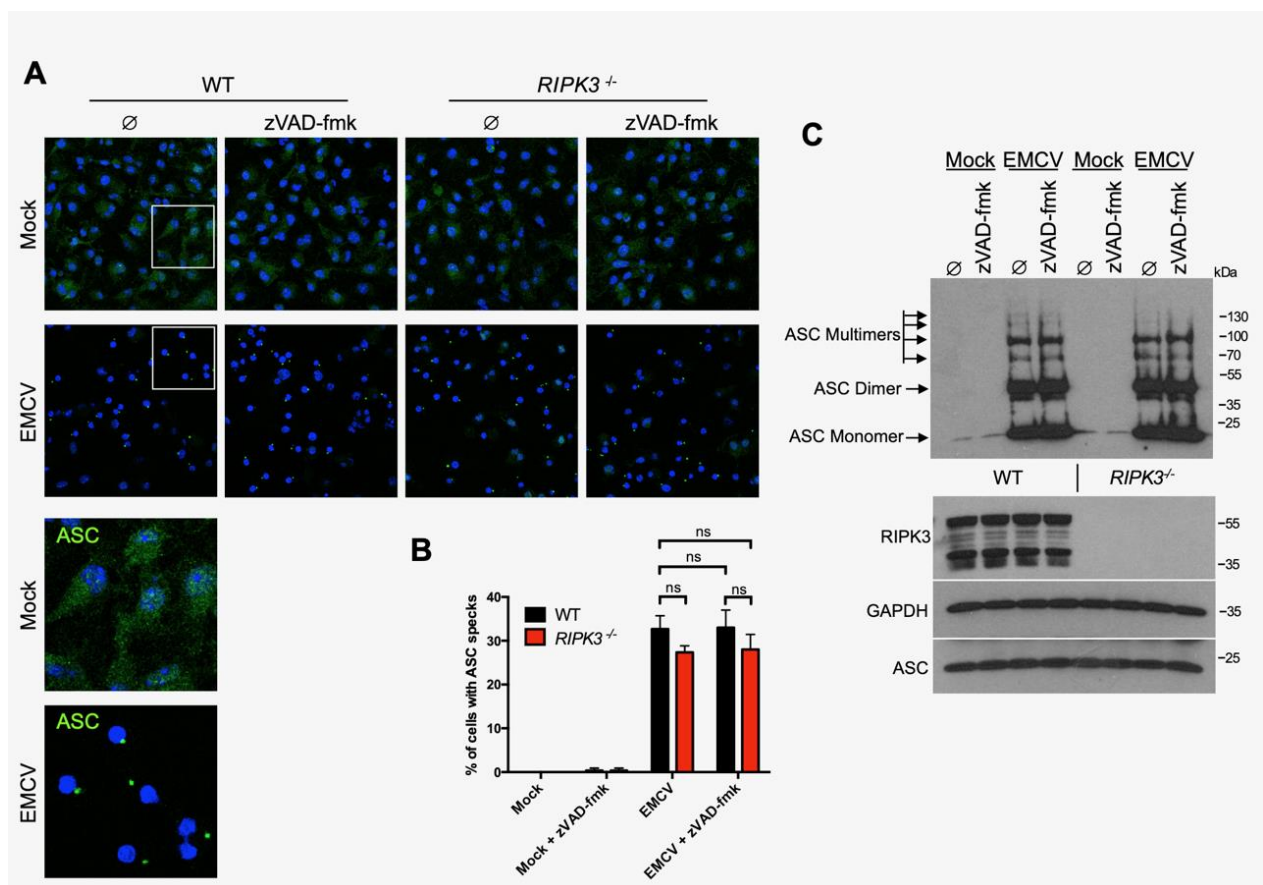


Figure 41 : L'inhibition de la nécroptose et/ou de l'apoptose n'empêche pas l'activation de l'inflammasome NLRP3 après une infection par le virus EMCV. (A) Des BMDMs WT ou RIPK3^{-/-} amorcés ont été infectés par l'EMCV pendant 8 heures en présence ou en l'absence de l'inhibiteur de caspases zVAD-fmk. La formation des specks ASC a ensuite été évaluée par immunofluorescence. Le pourcentage de cellules présentant des specks ASC est indiqué en (B). Les données indiquées sont des moyennes \pm SD provenant de trois expériences indépendantes. ns, non significatif (test t de Student). (C) Mêmes conditions qu'en (A), mais l'oligomérisation des ASC a été évaluée par WB après réticulation.

3) Les RLR, MAVS et DHX33 ne sont pas nécessaires pour l'activation de l'inflammasome NLRP3 par les virus à ARNs

Les récepteurs de type RIG-I (RLR) jouent un rôle central dans la réponse immunitaire innée vis-à-vis d'une infection par des virus à ARNs. Nous avons par la suite cherché à déterminer si la signalisation RLR aurait un rôle dans l'activation de l'inflammasome. Nos résultats montrent que ni le récepteur RIG-I ni MDA5 ne semblent indispensables pour la sécrétion de l'IL-1 β en réponse au VSV ou au EMCV. De plus, l'absence de ces RLRs n'a pas affecté la réplication virale (Figure 42A-D). Nous avons utilisé comme contrôls, la production de IFN- β en réponse à VSV M qui nécessite RIG-I (VSV étant un faible inducteur IFN- β), et MDA-5 en réponse à EMCV (Figure 42E, F). Nos résultats indiquent que les récepteurs RIG-I et MDA-5 ne semblent pas jouer de rôle dans l'activation de l'inflammasome NLRP3 en réponse au VSV ou à l'EMCV.

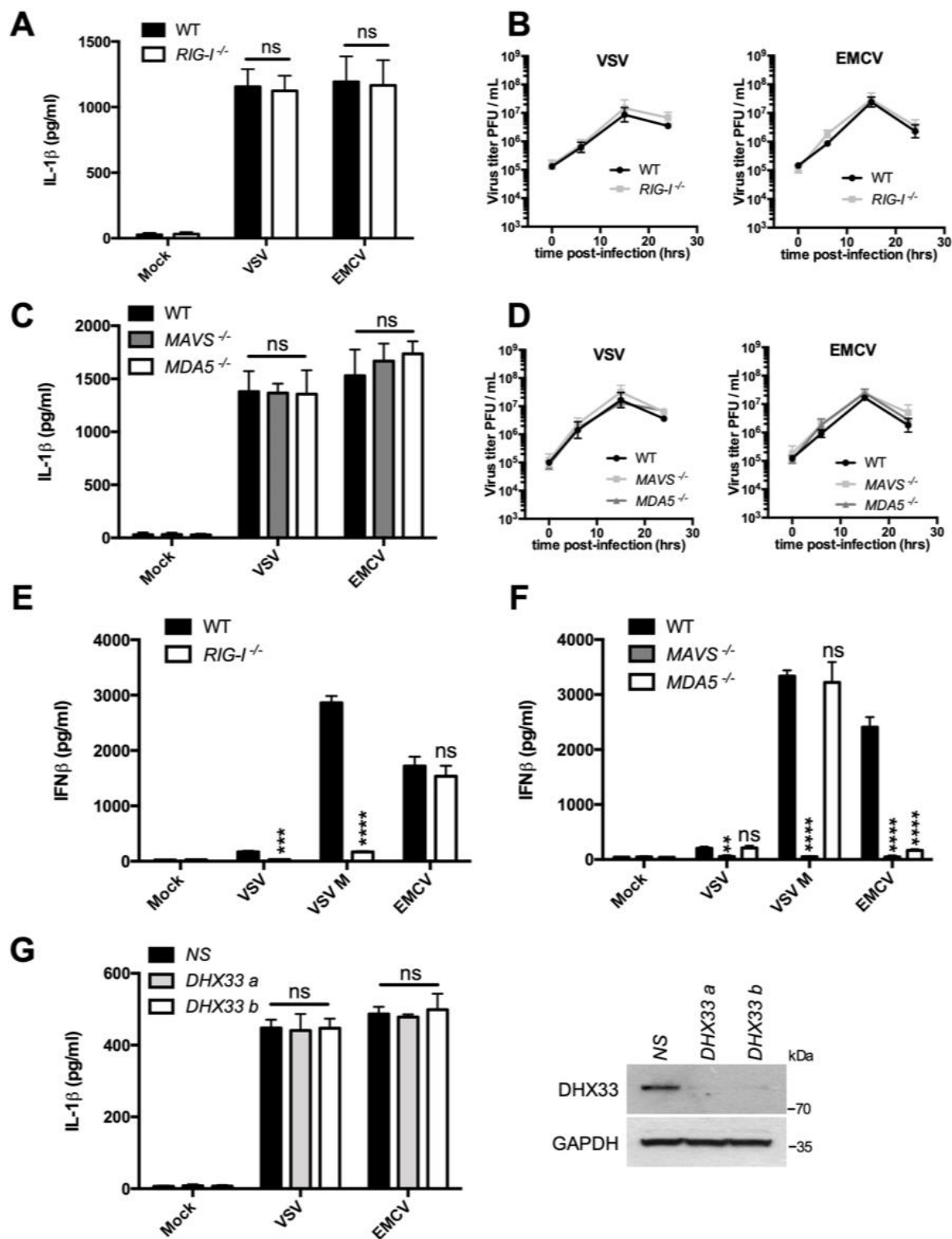


Figure 42 : L'activation de l'inflammasome induite par le virus est indépendante de la détection de l'ARN par RIG-I, MDA-5 ou DHX33. (A) Des BMDMs amorcés WT ou RIG-I $^{-/-}$ ont été infectés par le VSV ou le EMCV. 15 heures plus tard, la libération d'IL-1 β dans le surnageant cellulaire a été évaluée par ELISA. Les données indiquées sont des moyennes \pm SD provenant de trois expériences indépendantes. ns, non significatives par rapport aux BMDMs WT (test t de Student). (B) L'analyse de la réplication virale dans des BMDMs WT ou RIG-I $^{-/-}$. (C) Des BMDMs WT, MAVS $^{-/-}$ ou MDA5 $^{-/-}$

amorcés ont été infectés par le VSV ou le EMCV. 15 heures plus tard, la libération d'IL-1 β dans le surnageant cellulaire a été évaluée par ELISA. Les données indiquées sont des moyennes \pm SD provenant de trois expériences indépendantes. ns, non significatives par rapport aux BMDMs WT (test t de Student). (D) L'analyse de la réplication virale dans les BMDMs WT, MAVS^{-/-} ou MDA5^{-/-}. (E) Des BMDMs WT ou RIG-I^{-/-} ont été infectés par le VSV, VSV M ou EMCV pendant 8 heures. La libération d'IFN- β dans le surnageant cellulaire a ensuite été évaluée par ELISA. Les données indiquées sont des moyennes \pm SD provenant de trois expériences indépendantes. ****P<0,0001, ***P<0,001, ns : non significatif par rapport aux BMDMs de WT (test t de Student). (F) Des BMDMs WT, MAVS^{-/-} ou MDA5^{-/-} ont été infectées par le VSV, VSV M ou EMCV pendant 8 heures. La libération d'IFN- β dans le surnageant cellulaire a été évaluée par ELISA. Les données indiquées sont des moyennes \pm SD provenant de trois expériences indépendantes. ****P<0,0001, **0,001<P<0,01, ns : non significatif par rapport aux BMDMs WT (test t de Student). (G) Des BMDMs ont été transfectés avec des siRNAs dirigés contre DHX33 ou des siRNAs non spécifiques (NS). Trois jours plus tard, les BMDMs ont été infectés par le VSV ou le EMCV pendant 15 heures. La libération d'IL-1 β dans le surnageant cellulaire a ensuite été évaluée par ELISA. Les données indiquées sont des moyennes \pm SD provenant de trois expériences indépendantes. ns, non significatives par rapport aux BMDMs transfectés avec des siRNA NS (test t de Student). L'efficacité de l'extinction du DHX33 a été confirmée par WB.

MAVS, l'adaptateur mitochondrial en aval des RLR requis pour l'activation du signal conduisant à la production des IFN de type I (Figure 42F) a également été proposé comme étant requis dans l'activation de l'inflammasome NLRP3. En revanche, la libération des IL-1 β n'a pas été affectée dans les BMDMs MAVS^{-/-} infectées par le VSV ou le EMCV (Figure 42C). De même, la perte de MAVS n'a pas réduit l'activation de la caspase-1 et la maturation de l'IL-1 β dans les BMDMs amorcés après un traitement à la nigéricine ou à l'ATP (Figure 43).

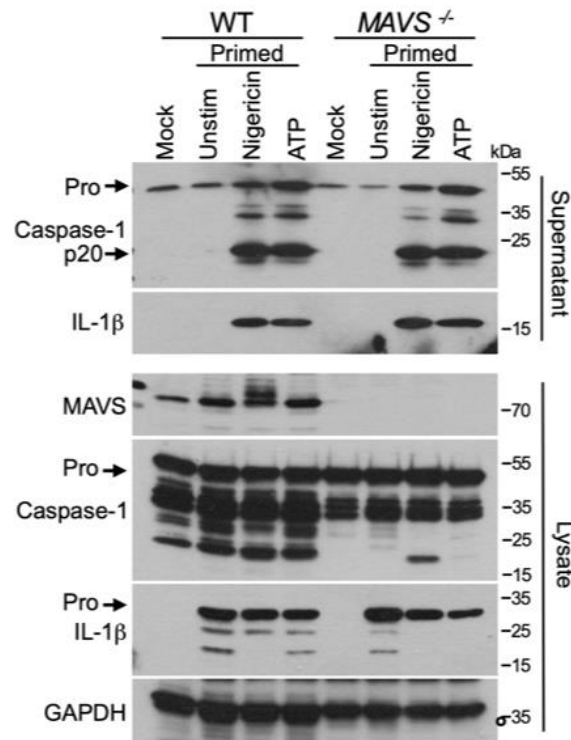


Figure 43 : MAVS n'est pas impliqué dans l'inflammasome canonique NLRP3. Des BMDMs amorcés WT ou MAVS^{-/-} ont été traités avec de la nigericine (10 μ M) ou de l'ATP (5 mM) pendant 45 minutes. Ensuite, les surnageants cellulaires et les lysats cellulaires ont été analysés par WB pour les protéines indiquées.

Enfin, il a été signalé que l'hélicase à ARN DHX33 détecte l'ARN cytosolique et active l'inflammasome NLRP3 dans les macrophages humains. Nos résultats montrent que la sécrétion d'IL-1 β par les BMDMs infectés par le VSV ou le EMCV n'a pas été affectée après l'inactivation de cette hélicase par l'utilisation des siRNA (Figure 42G). De même, l'inactivation de DHX33 n'a pas affecté la réplication virale (Figure 44). Par ailleurs, dans les cellules THP-1, l'inactivation de DHX33 n'a pas affecté la sécrétion de IL-1 β après une infection par le VSV ou le EMCV (Figure 45), cependant elle a inhibé cette production de l'IL-1 β après une transfection de Poly(I:C).

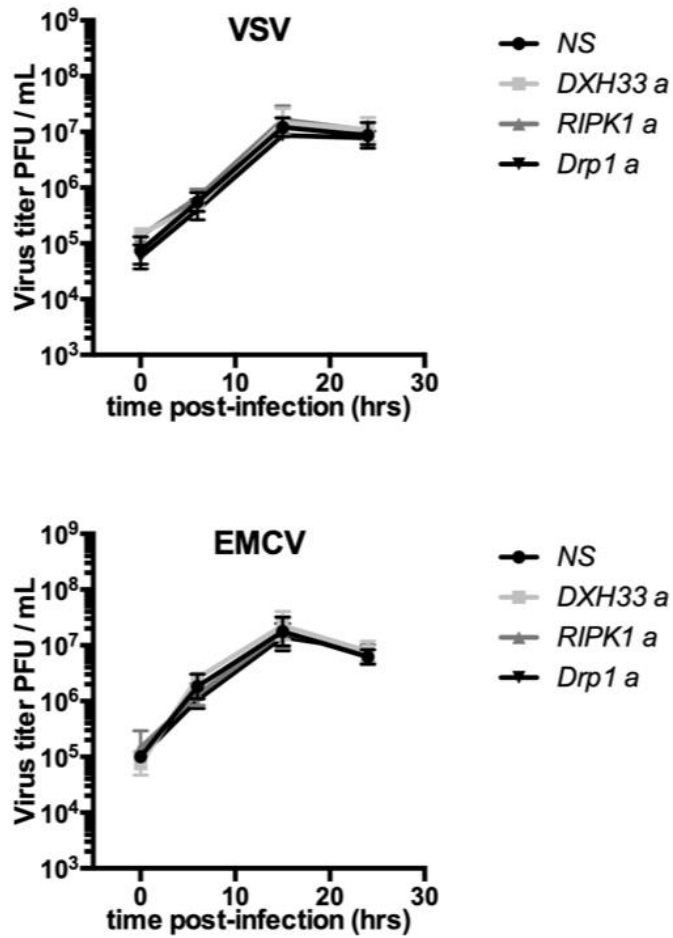


Figure 44 : L'élimination de DHX33, RIPK1 ou Drp1 n'a pas d'impact sur la réplication virale. La réplication du VSV ou du EMCV a été évaluée dans des BMDMs transfectées par des siRNA N ou dirigés contre DHX33, RIPK1 ou Drp1.

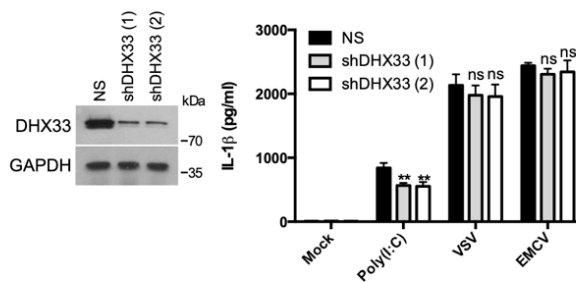


Figure 45 : L'extinction de DHX33 inhibe la libération d'IL-1 β après une transfection des cellules

THP-1 par le poly(I:C) mais pas après une infection par le VSV ou le EMCV. *Des cellules THP-1 exprimant de manière stable un shRNA non spécifique (NS) ou un shRNA contre DHX33 ont été soit transfectées par poly(I:C) (1 µg/ml), soit infectés par le VSV ou l'EMCV pendant 15 heures. La libération d'IL-1β a été évaluée par la suite par ELISA. Les données indiquées sont des moyennes ± SD provenant de trois expériences indépendantes. **0,001 < P < 0,01, ns, non significatif par rapport aux cellules THP-1 exprimant le shRNA NS (test t de Student). L'efficacité de l'extinction du DHX33 a été confirmée par WB.*

4) La machinerie de la nécroptose et Drp1 ne sont pas indispensables pour l'activation de l'inflammasome induit par les virus à ARNs

Outre l'apoptose, la nécroptose est une autre stratégie de défense de l'hôte pour prévenir l'infection virale. Ainsi, plusieurs virus ont été signalés comme des inducteurs de la nécroptose après une infection. La nécroptose est une forme de mort cellulaire régulée, impliquant des protéines contenant un domaine RHIM (RIPK1, TRIF, ou ZBP1/DAI) permettant le recrutement de RIPK3 qui active finalement l'exécution de la nécroptose par la phosphorylation de la MLKL. Étant donné que nos résultats suggèrent que la mort cellulaire induite par le VSV ou l'EMCV est indépendante des caspases, nous avons cherché à savoir si les virus qui ont favorisé l'activation de l'inflammasome pourraient également déclencher la nécroptose. Nos résultats montrent que l'infection par le VSV ou l'EMCV n'a pas provoqué la phosphorylation de MLKL ; une caractéristique de la nécroptose (Figure 46A). La nécroptose est principalement activée dans des conditions de déficience de l'apoptose, de telle sorte que seule l'incubation avec l'inhibiteur large des caspases zVAD-fmk a entraîné une faible phosphorylation des MLKL (figure 46A). Afin d'exclure la possibilité que cette nécroptose soit la forme de mort cellulaire qui induit l'efflux de K⁺ pour activer l'inflammasome NLRP3 après une infection virale. Nous avons utilisé des BMDMs MLKL^{-/-} infectés par le VSV ou le EMCV et nos résultats montrent que la libération de l'IL-1β et la réplication virale étaient similaires à celles des BMDMs WT infectés (Figure 46B, C). Par ailleurs, il a été proposé que les virus à ARNs favorisent l'activation de l'inflammasome NLRP3 par une voie de signalisation RIPK1-RIPK3-Drp1. Nos résultats montrent que la perte de RIPK3 n'a pas affecté de façon significative ni la sécrétion d'IL-1β ni la réplication virale (Figure 46B, C) ni la formation des specks d'ASC ou l'oligomérisation de l'ASC après une infection par le VSV ou le EMCV (Figure 41). En outre, l'inhibition simultanée de l'apoptose et de la nécroptose n'a pas modifié la formation des specks d'ASC ou l'oligomérisation d'ASC (Figure 41), ce qui indique que l'activation de l'inflammasome NLRP3 dans le contexte d'une infection par un virus cytopathogène est indépendante de ces formes de mort cellulaire programmée. Les souris RIPK1^{-/-} ne sont pas viables, or l'extinction de RIPK1 dans les BMDMs à l'aide de siRNA (Figure 46D) n'a pas eu d'impact sur l'inflammasome ni sur

la réplication virale après infection (Figure 46D), alors qu'elle a empêché la phosphorylation de MLKL après l'induction de la nécroptose (Figure 47). Il a été rapporté que RIPK1-RIPK3 après une infection par un virus à ARNs induisaient la phosphorylation/activation de Drp1, un effecteur de la machinerie de division mitochondriale. Alors que l'infection des BMDMs par l'EMCV a entraîné une augmentation de la phosphorylation de Drp1 (Figure 46E), la phosphorylation de la Drp1 a en revanche été atténuée dans les cellules infectées par le VSV (Figure 46E), ce qui suggère que la phosphorylation de la Drp1 n'est pas une caractéristique de l'activation de l'inflammasome induite par le virus à ARNs. En outre, l'élimination de la Drp1 dans les BMDMs (Figures 46F, 47) n'a pas affecté la production d'IL-1 β après une infection par le VSV ou le EMCV (Figure 46F). De plus, l'élimination de Drp1 n'a pas affecté la réplication virale (Figure 44). Nos observations suggèrent donc que ni RIPK1, RIPK3, MLKL, ni Drp1 ne sont nécessaires pour l'activation de l'inflammasome NLRP3 par les virus à ARNs.

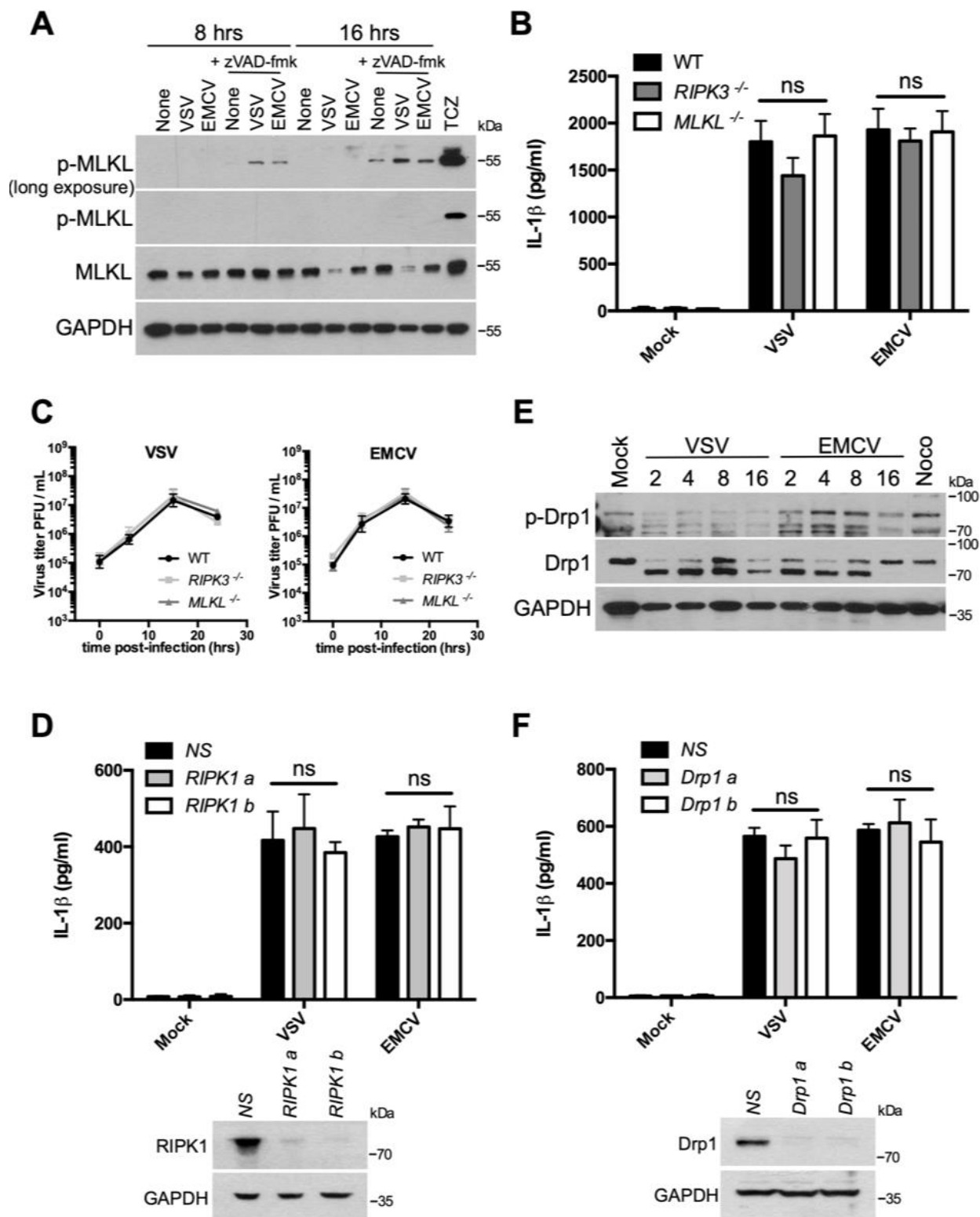


Figure 46 : L'activation de linflammasome induite par le virus est indépendante de la machinerie de nécroptose et de Drp1. (A) Des BMDMs ont été infectés par le VSV ou l'EMCV pendant 8 ou 16 heures, en présence ou en l'absence de zVAD-fmk (20 μ M). Les lysats cellulaires ont été ensuite analysés par WB pour les protéines indiquées. Comme contrôle positif, les BMDMs ont été traités avec du TNF (50 ng/ml), Cycloheximide (1 g/ml), zVAD-fmk (20 M) (TCZ) pendant 2 heures. (B) Des BMDMs WT,

RIPK3^{-/-} ou *MLKL^{-/-}* amorcés ont été infectés par le VSV ou le EMCV. 15 heures plus tard, la libération d'IL-1 β dans le surnageant cellulaire a été évaluée par ELISA. Les données indiquées sont des moyennes \pm SD provenant de trois expériences indépendantes. ns, non significatives par rapport aux BMDMs WT (test t de Student). (C) L'analyse de la réplication virale dans les BMDMs WT, *RIPK3^{-/-}* ou *MLKL^{-/-}*. (D) Des BMDMs ont été transfectés avec des siRNAs dirigés contre *RIPK1* ou des siRNAs non spécifiques (NS). Trois jours plus tard, les BMDMs ont été infectés par le VSV ou le EMCV pendant 15 heures. La libération d'IL-1 β dans le surnageant cellulaire a ensuite été évaluée par ELISA. Les données indiquées sont des moyennes \pm SD provenant de trois expériences indépendantes. ns, non significatives par rapport aux BMDMs transfectés par des siRNA NS (test t de Student). L'efficacité de l'extinction de *RIPK1* a été confirmée par WB. (E) Des BMDMs ont été infectées par le VSV ou le EMCV pendant les périodes indiquées. Les lysats cellulaires ont été analysés par WB pour les protéines indiquées. Comme contrôle positif, les BMDMs ont été traitées avec du nocodazole (100 ng/ml) pendant 16 heures. (F) Des BMDMs ont été transfectées avec des siRNAs dirigés contre *Drp1* ou des siRNAs non spécifiques (NS). Trois jours plus tard, les BMDMs ont été infectés par le VSV ou le EMCV pendant 15 heures. La libération d'IL-1 β dans le surnageant cellulaire a ensuite été évaluée par ELISA. Les données indiquées sont des moyennes \pm SD provenant de trois expériences indépendantes. ns, non significative par rapport aux BMDMs transfectées par des siRNA NS (test t de Student). L'efficacité de l'extinction du *Drp1* a été confirmée par WB.

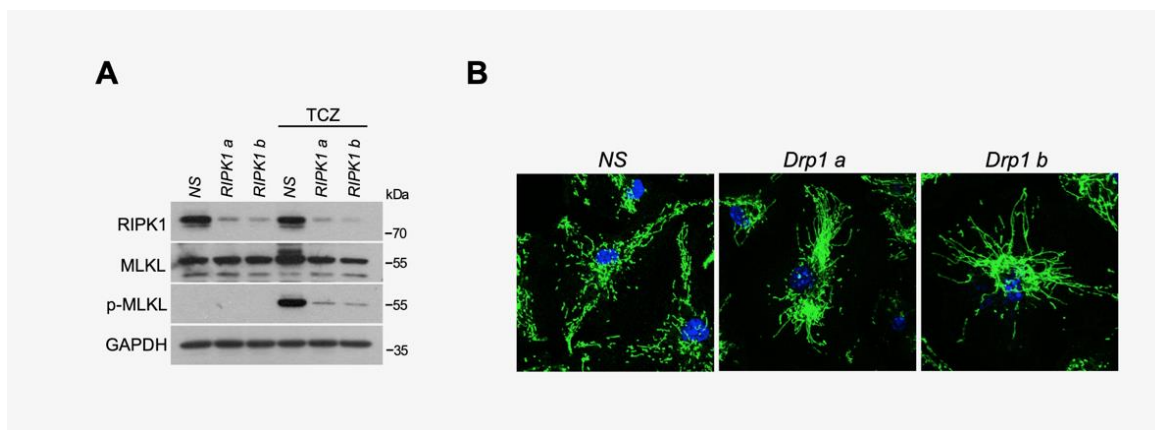


Figure 47 : Contrôle de l'extinction de *RIPK1* ou *Drp1* avec des siRNAs dans les BMDMs. (A) Des BMDMs ont été transfectés avec des siRNAs dirigés contre *RIPK1* ou des siRNAs non spécifiques (NS). Trois jours plus tard, les BMDMs ont été stimulées avec du TCZ pendant deux heures. Les lysats cellulaires ont ensuite été analysés par WB pour les protéines indiquées. (B) Des BMDMs ont été transfectées avec des siRNAs dirigés contre *Drp1* et des siRNAs non spécifiques (NS). Trois jours plus tard, la morphologie des mitochondries a été évaluée par immunofluorescence en utilisant la coloration

5) La réplication virale et la mort cellulaire qui s'ensuit sont nécessaires à l'activation de l'inflammasome NLRP3.

Les IFN de type I sont non seulement de puissantes cytokines antivirales empêchant la réplication virale, mais elles inhibent également l'activation de l'inflammasome. Contrairement au VSV, le VSV M est un puissant inducteur de l'IFN- β (Figure 34F), ne se réplique pas dans les BMDMs (Figure 34H) et n'active pas l'inflammasome (Figure 34A-C). Pour mieux confirmer que la réplication virale est nécessaire à l'activation de l'inflammasome NLRP3, des BMDMs IFNAR^{-/-} ou WT ont été infectées par le VSV M. Bien que le VSV M ne se soit pas répliqué dans les cellules BMDM WT, il s'est bien répliqué dans les cellules IFNAR^{-/-} puisque ces cellules sont insensibles aux IFN de type I (Figure 48A). Comme il peut se répliquer dans les cellules IFNAR^{-/-}, le VSV M a induit la mort cellulaire et la production d'IL-1 β (Figure 48B, C). De même, nos résultats soulignent que le SindV qui ne s'est répliqué que dans les IFNAR^{-/-} déclenche la mort cellulaire et l'activation de l'inflammasome (Figure 48A-C). Dans les BMDMs IFNAR^{-/-}, la mort cellulaire induite par le VSV M ou le SindV n'a pas été inhibée par la répression du NLRP3 ou de la GSDMD, ce qui suggère que cette mort cellulaire ne dépend pas de l'inflammasome (Figure 48D). Le VSV M et le SindV n'ont pas activé l'inflammasome dans les BMDMs car leur détection entraîne la production d'IFN de type I, empêchant ainsi leur réplication. En effet, ces deux virus sont détectés par les RLRs car l'absence de l'adaptateur MAVS a complètement inhibé la production de l'IFN- β suite à l'infection virale (Figure 48E). Par conséquent, en raison de l'absence de la production d'IFNs de type I dans les BMDMs MAVS^{-/-}, la mort cellulaire induite par le SindV et VSV M a permis la libération d'IL-1 β suite à l'activation de l'inflammasome (Figure 48F, G). Ensemble, nos observations suggèrent que la mort cellulaire induite par la réplication virale est un signal permettant l'activation de l'inflammasome après une infection par un virus à ARNs.

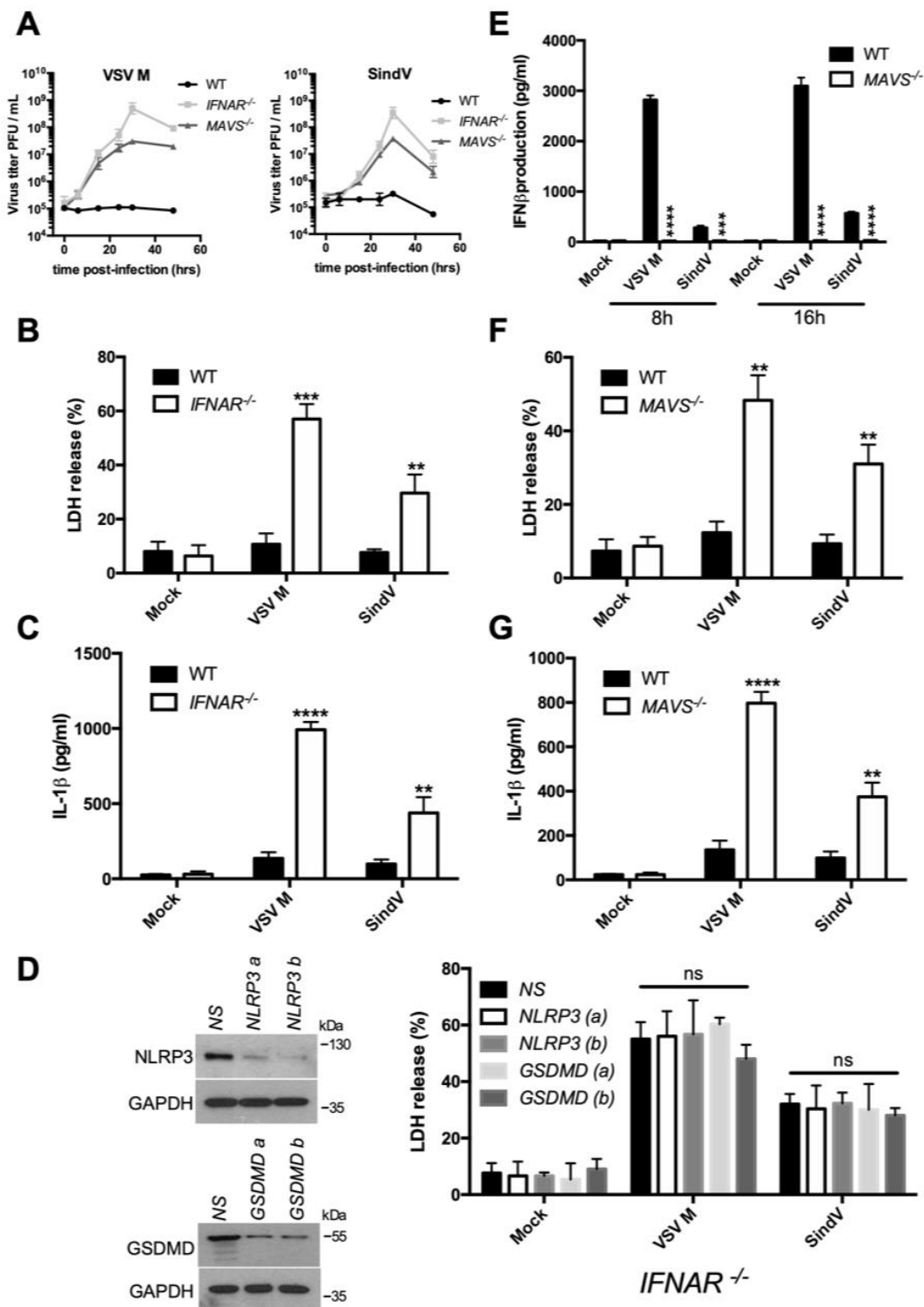


Figure 48 : La réplication virale est nécessaire pour l'activation de l'inflammasome NLRP3. (A) La réplication du VSV M ou du virus Sindbis (SindV) a été évaluée dans des BMDMs WT, IFNAR^{-/-} ou MAVS^{-/-}. (B) Des BMDMs WT ou IFNAR^{-/-} ont été infectées par le VSV M ou le SindV pendant 24 heures, puis la mort cellulaire a été évaluée à l'aide du test de libération de LDH. Les données indiquées sont des moyennes \pm SD provenant de trois expériences indépendantes. *** $P < 0,001$, ** $0,001 < P < 0,01$, par rapport aux BMDMs WT (test *t* de Student). (C) Des BMDMs WT ou IFNAR^{-/-} amorcés ont été infectés par le VSV M ou le SindV pendant 24 heures. La libération d'IL-1 β dans le surnageant cellulaire a

ensuite été évaluée par ELISA. Les données indiquées sont des moyennes \pm SD provenant de trois expériences indépendantes. **** $P < 0,0001$, ** $0,001 < P < 0,01$, par rapport aux BMDMs WT (test t de Student). (D) Les BMDMs IFNAR^{-/-} ont été transfectés avec des siRNAs dirigés contre NLRP3 ou GSDMD ou des siRNAs non spécifiques (NS). Trois jours plus tard, les BMDMs ont été infectés par le VSV M ou le SindV pendant 24 heures, puis la mort cellulaire a été évaluée à l'aide du test de libération de LDH. Les données indiquées sont des moyennes \pm SD provenant de trois expériences indépendantes. ns, non significatives par rapport aux BMDMs transfectés par des siRNA NS (test t de Student). L'efficacité de l'extinction du NLRP3 et de la GSDMD a été confirmée par WB. (E) Des BMDMs WT ou MAVS^{-/-} ont été infectées par le VSV M ou le SindV pendant 8 ou 16 heures. La libération d'IFN β dans le surnageant cellulaire a ensuite été évaluée par ELISA. Les données indiquées sont des moyennes \pm SD provenant de trois expériences indépendantes. **** $P < 0,0001$, *** $P < 0,001$, par rapport aux BMDMs WT (test t de Student). (F) Des BMDMs WT ou MAVS^{-/-} ont été infectés par le VSV M ou le SindV pendant 24 heures, puis la mort cellulaire a été évaluée à l'aide du test de libération de LDH. Les données indiquées sont des moyennes \pm SD provenant de trois expériences indépendantes. ** $0,001 < P < 0,01$, par rapport aux BMDMs WT (test t de Student). (G) Des BMDMs WT ou MAVS^{-/-} amorcées ont été infectés par le VSV M ou le SindV pendant 24 heures. La libération d'IL-1 β dans le surnageant cellulaire a ensuite été évaluée par ELISA. Les données indiquées sont des moyennes \pm SD provenant de trois expériences indépendantes. **** $P < 0,0001$, ** $0,001 < P < 0,01$, par rapport aux BMDMs WT (test t de Student).

B. DISCUSSION

Afin de décrypter le mécanisme d'activation de l'inflammasome, nous avons utilisé les virus connus pour leur activation de cette plateforme protéine. Dans cette partie de l'étude, nous avons utilisé différents virus à ARNs, et nous avons observé que seuls les virus ayant un effet cytopathogène et qui se répliquent comme le VSV ou l'EMCV sont capables d'induire une activation significative de l'inflammasome NLRP3. En accord avec les études précédentes, l'inflammasome NLRP3 est bien impliqué dans la détection des deux virus. En effet, suite à l'infection des cellules par le VSV ou l'EMCV, la libération d'IL-1 β a été fortement altérée en l'absence des composantes comme le NLRP3, ASC ou la caspase-1 (Rajan, Rodriguez et al. 2011, Poeck and Ruland 2012, Wang, Jiang et al. 2014, Lupfer, Malik et al. 2015).

Les PRRs détectent les PAMPs et déclenchent une réponse immunitaire innée (Akira, Uematsu et al. 2006). Les ARNs viraux sont les principaux PAMPs détectés par les PRRs comme les RLRs (RIG-I et MDA-5) pour induire la production d'IFNs de type I et de cytokines pro-inflammatoires. À l'exception du VSV, les différents virus ont déclenché la production de l'IFN- β par les BMDMs. Cette production a été abolie en l'absence de MAVS, l'adaptateur mitochondrial en aval de RIG-I ou MDA-5 nécessaire à la signalisation. Ceci signifie que les ARNs viraux ont été détectés par les RLRs. La détection virale par ces hélicases ne semble pas être nécessaire pour l'activation de l'inflammasome : bien que le SeV M ou le VSV M soient de puissants inducteurs d'IFNs suite à la stimulation des RLR, ces deux virus n'ont pas déclenché l'activation de l'inflammasome dans les BMDMs. Nos résultats sont en contradiction avec une étude de Poeck *et al.* (Poeck, Bscheider et al. 2010). En effet, ces auteurs ont proposé un rôle pour les RLRs dans l'activation de l'inflammasome NLRP3 après une infection par des virus à ARNs. Sur la base de leurs résultats, le MDA5 semble jouer un rôle essentiel mais indéfini dans l'activation de l'inflammasome NLRP3 par l'EMCV. En outre, ils ont proposé que le virus VSV est détecté par l'inflammasome RIG-I/ASC/caspase-1 et ne nécessite pas le NLRP3. Nos résultats ne soutiennent pas ce modèle : nous avons constamment observé qu'il y a besoin de NLRP3 en réponse au VSV et à l'EMCV d'une part, et que d'autre part, les RLRs ne semblent pas être nécessaires pour l'activation de l'inflammasome en réponse à ces virus. Nous n'avons actuellement aucune explication pour clarifier cette divergence, mais nos conclusions sont en parfaite accord avec l'étude de Rajan *et al.* (Rajan, Rodriguez et al. 2011). En outre, deux autres travaux ont également montré la nécessité du NLRP3 après une infection par le VSV (Rajan, Rodriguez et al. 2011, Wang, Jiang et al. 2014). Il a également été décrit que l'hélicase à ARNs DHX33 (également appelée DDX33) détecte l'ARN cytosolique et active l'inflammasome NLRP3 (Mitoma, Hanabuchi et al. 2013). Cependant, l'élimination de cette hélicase dans les BMDM n'a pas affecté l'activation de l'inflammasome après une infection par le VSV ou le EMCV. En accord avec une autre étude (Wang, Jiang et al. 2014), l'extinction de DHX33 dans les cellules THP-1 n'a pas altéré la sécrétion d'IL-1 β après une infection par le VSV ou le EMCV,

mais cette extinction a affecté l'activation suite à une transfection de Poly(I:C) (Mitoma, Hanabuchi et al. 2013). Une explication possible est qu'il se peut qu'un excès d'acides nucléiques comme le poly(I:C) dans le cytosol après la transfection peut être détecté par la DHX33 pour activer l'inflammasome NLRP3.

D'après nos résultats, une étape clé pour que les virus à ARNs induisent l'activation de l'inflammasome NLRP3 est leur effet cytopathogène comme conséquence de leur réplication. En effet, l'activation de l'inflammasome est négligeable lorsque l'infection par le virus ne favorise pas la mort cellulaire, ou parce que le virus n'est pas cytopathogène (cas du SeV), ou parce qu'il ne se réplique pas (VSV M ou SindV), ou après inactivation à l'aide des UV. L'infection par le VSV ou le EMCV déclenche probablement une forme de nécrose (rupture de la membrane plasmique) en conséquence de la mort lytiques des cellules, favorisant l'efflux de K^+ intracellulaire, un événement de signalisation nécessaire et suffisant en amont dans l'activation de NLRP3 (Muñoz-Planillo, Kuffa et al. 2013, Broz and Dixit 2016). Il est intéressant de noter que, comme dans le cas de l'infection par des virus à ARNs cytopathogènes, la stimulation de l'axe cGAS-STING dans les cellules myéloïdes humaines induit une mort cellulaire programmée initiant l'efflux de K^+ en amont du NLRP3 (Gaidt, Ebert et al. 2017). Les deux formes de mort cellulaire conduisent à l'activation de l'inflammasome NLRP3 permettent la libération de l'IL-1 β sans la nécessité de recourir à la gasdermine D suggérant une rupture de la membrane plasmique qui permet d'initier l'efflux de K^+ en amont de NLRP3, puis la libération de l'IL-1 β mature.

Dans le cas de l'activation canonique de l'inflammasome NLRP3, par exemple avec la nigéricine, cette activation entraîne la mort pyroptotique de la cellule à la suite du clivage de la gasdermin D par la caspase-1. Malgré l'activation de l'inflammasome NLRP3 après une infection par le VSV ou le EMCV, la mort cellulaire n'a pas été affectée dans les BMDMs déficients en NLRP3, ASC ou caspase-1 ou après un traitement avec un large inhibiteur de caspases comme le zVAD-fmk, ce qui suggère que la mort cellulaire pyroptotique ou apoptotique n'est pas impliquée. La nécroptose est une autre stratégie de défense de l'hôte pour prévenir l'infection virale (Grootjans, Vanden Berghe et al. 2017, Orzalli and Kagan 2017, Upton, Shubina et al. 2017), mais nous n'avons pas observé de phosphorylation de MLKL dans les BMDMs infectés par le VSV ou le EMCV. De plus, l'absence de MLKL n'a pas eu d'impact sur l'activation de l'inflammasome. RIPK1 et RIPK3 sont des composants du nécroptosome et il a récemment été signalé que les virus à ARNs favorisent l'activation de l'inflammasome NLRP3 par une voie de signalisation RIPK1-RIPK3-Drp1 (Wang, Jiang et al. 2014). En accord avec une étude récente (Kang, Fernandes-Alnemri et al. 2015), nos résultats suggèrent que la voie de signalisation RIPK1-RIPK3-Drp1 n'est pas nécessaire pour l'activation de l'inflammasome après une infection par des virus à ARNs. Bien que d'autres études soient nécessaires pour expliquer cette divergence, une explication possible est que dans les BMDMs déficients en RIPK1, RIPK3 ou Drp1 utilisés dans la littérature, la

réplication des virus à ARNs a été réduite, ce qui favorise moins de mort cellulaire et donc l'activation moindre de l'inflammasome NLRP3 (Wang, Jiang et al. 2014).

Après l'infection, les ARNs viraux sont détectés par les RLRs dans le cytosol et par l'intermédiaire de l'adaptateur mitochondrial MAVS : ils engagent une voie de signalisation qui induit la production d'IFN de type I ayant un effet antiviral et qui empêche donc la réplication du virus (Loo and Gale 2011). Ainsi, l'infection des BMDMs par le VSV M ou le SindV a conduit à la production de l'IFN- β qui a bloqué la réplication des deux virus et il n'y avait aucun signe d'activation de l'inflammasome NLRP3. Dans les BMDMs déficients en MAVS ou IFNAR, le VSV M ou le SindV se répliquent bien en raison d'une déficience en production IFN- β ou de l'absence du récepteur de cette cytokine. Cette réplication virale a ensuite déclenché la mort des cellules lytiques, l'efflux de K^+ et a induit l'activation de l'inflammasome NLRP3 et la production des cytokines inflammatoires notamment l'IL-1 β et l'IL-18.

Ainsi, selon la nature du virus à ARNs, le système immunitaire inné déploie deux stratégies : d'une part, la détection des ARNs viraux par les RLRs dans le cytosol et conduit à la production d'IFN de type I. D'autre part, les virus qui échappent à la réponse IFN peuvent se répliquer et déclencher la mort lytiques des cellules conduisant à la production d'IL-1 β et d'IL-18 par le biais de l'activation de l'inflammasome NLRP3.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Conclusion générale et perspectives

L'infection par *H. pylori* représente un problème de santé publique au Maroc. Comprendre les mécanismes impliqués dans la physiopathologie de cette infection pourrait être crucial pour le contrôle et la prise en charge des patients infectés.

Les cellules épithéliales gastriques répondent à *H. pylori* et produisent un certain nombre de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires, y compris l'IL-1 β , l'IL-8 et l'IL-17. Nos résultats suggèrent que l'IL-1 β , l'IL-8 et l'IL-17A peuvent favoriser l'inflammation chez les personnes infectées par *H. pylori*, contribuant ainsi à la persistance de l'infection. Les cytokines IL-1 β , IL-8 et IL-17A sont pléiotropes et sont impliquées dans de multiples cascades de signalisation qui peuvent favoriser le processus précancéreux. À notre connaissance, cette étude est la première à étudier l'expression des gènes de cytokine dans des biopsies appariées du fundus et de l'antrum de l'estomac chez des patients marocains infectés par *H. pylori*. Nous avons mis en évidence une signature cytokinique qui peut prédire la métaplasie au cours de la progression de l'infection qui implique une régulation négative spécifique de l'IL-17A dans l'antrum et une régulation positive de l'IL-1 β dans le fundus des patients ayant une métaplasie. L'exploration de l'expression de ces cytokines au stade cancer et les voies moléculaires impliquées dans la progression de la maladie peuvent réconforter les cliniciens dans l'utilisation de ces cytokines comme biomarqueurs pour la GC. De même, l'étude sur les polymorphismes nucléotidiques du gène IL-1 β a montré que ces polymorphismes génétiques influencent l'expression de l'IL-1 β . L'exploration des polymorphismes des autres cytokines, actuellement en cours, pourraient donner une idée globale sur cette association. Ces résultats peuvent contribuer à la compréhension de l'interaction complexe hôte-*H. pylori* et soutiennent le modèle multifactoriel de la pathologie gastrique. Le génotypage génétique de l'hôte pourrait permettre l'identification de patients à hauts risques de cancer gastrique avant que la transformation maligne ne se produise. Ces patients bénéficieraient d'une thérapie d'éradication préventive. Compte tenu de la prévalence élevée de l'infection à *H. pylori*, de la résistance aux antibiotiques et des coûts de traitement, cette approche peut fournir une base raisonnable pour les décisions thérapeutiques au stade de la gastrite chronique.

Par ailleurs, la compréhension des voies de signalisation cellulaire en aval des récepteurs de l'immunité innée par *H. pylori* ou par le LPS bactérien pourrait être utile dans le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques visant à inhiber l'inflammation au cours des pathologies associées à *H. pylori*. Nos résultats ont montré que le LPS de *H. pylori* induit l'activation de NF- κ B et l'activation de l'inflammasome. Bien que ces résultats fonctionnels restent préliminaires, l'implication du facteur de transcription NF- κ B et de l'inflammasome pourrait justifier de cette augmentation de l'expression de l'IL-1 β observée lors de l'infection par *H. pylori* et de son association avec l'évolution vers des stades pathologiques plus graves comme le cancer gastrique. En effet, ces cytokines convergent vers la signalisation qui conduit à une régulation positive de la transcription des protéines et de médiateurs, anti-

apoptotiques, molécules d'adhésion et expression accrue des radicaux libres. Ces changements dans le microenvironnement contribuent au développement du carcinome, car ils peuvent entraîner une augmentation des dommages à l'ADN, une dysfonction des enzymes de réparation de l'ADN et une instabilité génétique.

Par ailleurs, et pour mieux comprendre les mécanismes d'activation de l'inflammasome, nous avons traité l'activation de l'inflammasome NLRP3 par les virus à ARNs car ces derniers sont définis comme étant des activateurs de cette plateforme de l'immunité innée. En effet, Il est clairement établi que l'infection par certains virus à ARNs conduit à la production d'IL-1 β essentiellement suite à l'activation de l'inflammasome NLRP3. Cependant, les mécanismes par lesquels les virus à ARNs induisent la production d'IL-1 β ne sont pas bien compris et / ou controversés. Plusieurs modèles d'activation sont proposés notamment, que les virus à ARNs induisent l'activation de l'inflammasome NLRP3 via une voie de signalisation impliquant RIPK1-RIPK3-DRP1. Il est également proposé que RIG-I puisse activer la caspase-1 en s'associant directement à l'ASC. Dans notre travail, nous avons contribué à la compréhension des mécanismes impliqués dans l'activation de l'inflammasome NLRP3 après une infection virale par des virus à ARNs. Nous avons montré que les virus à forte capacité de réplication et qui conduisent à la nécrose des cellules infectées (effet cytopathique) sont capables d'induire l'activation de la caspase-1 conduisant à la production d'IL-1 β . A l'inverse, les virus qui induisent une très bonne réponse IFN de type I sont de très mauvais inducteurs de l'inflammasome NLRP3. Ainsi, selon la nature du virus à ARNs, le système immunitaire inné déploie deux stratégies : d'une part, la détection des ARNs viraux par les RLRs dans le cytosol conduisant à la production des IFNs de type I. D'autre part, les virus qui échappent à la réponse IFN peuvent se répliquer et déclencher une mort cellulaire lytique provoquant un efflux de K⁺ responsable de l'activation de l'inflammasome NLRP3 et à la production d'IL-1 β et d'IL-18. Ces résultats améliorent la compréhension des mécanismes par lesquels l'inflammasome NLRP3 est activé. Notre identification de l'efflux de potassium, induit par la réplication des virus à ARNs, en tant que régulateur crucial de l'inflammasome NLRP3 pourrait fournir une nouvelle cible potentielle pour le traitement des maladies inflammatoires associées aux infections virales.

Ainsi, l'importance de l'activation de l'inflammasome dans la lutte contre les infections résulte des trois activités de la caspase-1 : (1) la pyroptose, qui permet la suppression des niches de réplication des microorganismes intracellulaires ; (2) la production d'IL-1 β , qui entraîne le recrutement des cellules inflammatoires au site de l'infection ; et (3) la production d'IL-18, qui induit la cascade de l'IFN- γ et l'activation des mécanismes microbicides cellulaires.

Les recherches présentes et futures devraient permettre le décryptage complet des voies de l'inflammasome et de ses fonctions physiopathologiques et entraîner, *de facto*, la mise au point de thérapies ciblées utilisables dans nombre de situations infectieuses et permettant une meilleure prise en

charge des patients atteints.

REFERENCES ET WEBOGRAPHIES

Webographies :

<http://www.medexpert.sg/en/medical-specialities/gastroenterology/helicobacter-pylori-infection/>

References :

- (2001). "Gastric cancer and Helicobacter pylori: a combined analysis of 12 case control studies nested within prospective cohorts." *Gut* **49**(3): 347-353.
- Acosta-Rodriguez, E. V., G. Napolitani, A. Lanzavecchia and F. Sallusto (2007). "Interleukins 1beta and 6 but not transforming growth factor-beta are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells." *Nat Immunol* **8**(9): 942-949.
- Acosta-Rodriguez, E. V., L. Rivino, J. Geginat, D. Jarrossay, M. Gattorno, A. Lanzavecchia, F. Sallusto and G. Napolitani (2007). "Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells." *Nat Immunol* **8**(6): 639-646.
- Agostini, L., F. Martinon, K. Burns, M. F. McDermott, P. N. Hawkins and J. Tschopp (2004). "NALP3 forms an IL-1beta-processing inflammasome with increased activity in Muckle-Wells autoinflammatory disorder." *Immunity* **20**(3): 319-325.
- Aihara, M., D. Tsuchimoto, H. Takizawa, A. Azuma, H. Wakebe, Y. Ohmoto, K. Imagawa, M. Kikuchi, N. Mukaida and K. Matsushima (1997). "Mechanisms involved in Helicobacter pylori-induced interleukin-8 production by a gastric cancer cell line, MKN45." *Infect Immun* **65**(8): 3218-3224.
- Akhiani, A. A., J. Pappo, Z. Kabok, K. Schön, W. Gao, L. E. Franzén and N. Lycke (2002). "Protection against Helicobacter pylori infection following immunization is IL-12-dependent and mediated by Th1 cells." *J Immunol* **169**(12): 6977-6984.
- Akira, S., S. Uematsu and O. Takeuchi (2006). "Pathogen recognition and innate immunity." *Cell* **124**(4): 783-801.
- Alaoui Boukhris, S., A. Amarti, K. El Rhazi, M. El Khadir, D. A. Benajah, S. A. Ibrahim, C. Nejari, M. Mahmoud, A. Souleimani and B. Bennani (2013). "Helicobacter pylori genotypes associated with gastric histo-pathological damages in a Moroccan population." *PLoS One* **8**(12): e82646.
- Alaoui Boukhris, S., D. A. Benajah, K. El Rhazi, S. A. Ibrahim, C. Nejari, A. Amarti, M. Mahmoud, M. El Abkari, A. Souleimani and B. Bennani (2012). "Prevalence and distribution of Helicobacter pylori cagA and vacA genotypes in the Moroccan population with gastric disease." *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **31**(8): 1775-1781.
- Algood, H. M., S. S. Allen, M. K. Washington, R. M. Peek, Jr., G. G. Miller and T. L. Cover (2009). "Regulation of gastric B cell recruitment is dependent on IL-17 receptor A signaling in a model of chronic bacterial infection." *J Immunol* **183**(9): 5837-5846.

Allen, L. A., L. S. Schlesinger and B. Kang (2000). "Virulent strains of *Helicobacter pylori* demonstrate delayed phagocytosis and stimulate homotypic phagosome fusion in macrophages." J Exp Med **191**(1): 115-128.

Allison, C. C., J. Ferrand, L. McLeod, M. Hassan, M. Kaparakis-Liaskos, A. Grubman, P. S. Bhathal, A. Dev, W. Sievert, B. J. Jenkins and R. L. Ferrero (2013). "Nucleotide oligomerization domain 1 enhances IFN- γ signaling in gastric epithelial cells during *Helicobacter pylori* infection and exacerbates disease severity." J Immunol **190**(7): 3706-3715.

Allison, C. C., T. A. Kufer, E. Kremmer, M. Kaparakis and R. L. Ferrero (2009). "*Helicobacter pylori* induces MAPK phosphorylation and AP-1 activation via a NOD1-dependent mechanism." J Immunol **183**(12): 8099-8109.

Amedei, A., M. P. Bergman, B. J. Appelmelk, A. Azzurri, M. Benagiano, C. Tamburini, R. van der Zee, J. L. Telford, C. M. Vandenbroucke-Grauls, M. M. D'Elis and G. Del Prete (2003). "Molecular mimicry between *Helicobacter pylori* antigens and H⁺, K⁺ --adenosine triphosphatase in human gastric autoimmunity." J Exp Med **198**(8): 1147-1156.

Amedei, A., A. Cappon, G. Codolo, A. Cabrelle, A. Polenghi, M. Benagiano, E. Tasca, A. Azzurri, M. M. D'Elis, G. Del Prete and M. de Bernard (2006). "The neutrophil-activating protein of *Helicobacter pylori* promotes Th1 immune responses." J Clin Invest **116**(4): 1092-1101.

Amieva, M. R., N. R. Salama, L. S. Tompkins and S. Falkow (2002). "*Helicobacter pylori* enter and survive within multivesicular vacuoles of epithelial cells." Cell Microbiol **4**(10): 677-690.

Amieva, M. R., R. Vogelmann, A. Covacci, L. S. Tompkins, W. J. Nelson and S. Falkow (2003). "Disruption of the epithelial apical-junctional complex by *Helicobacter pylori* CagA." Science **300**(5624): 1430-1434.

Apte, R. N., S. Dotan, M. Elkabets, M. R. White, E. Reich, Y. Carmi, X. Song, T. Dvozkin, Y. Krelin and E. Voronov (2006). "The involvement of IL-1 in tumorigenesis, tumor invasiveness, metastasis and tumor-host interactions." Cancer Metastasis Rev **25**(3): 387-408.

Argent, R. H., J. L. Hale, E. M. El-Omar and J. C. Atherton (2008). "Differences in *Helicobacter pylori* CagA tyrosine phosphorylation motif patterns between western and East Asian strains, and influences on interleukin-8 secretion." J Med Microbiol **57**(Pt 9): 1062-1067.

Arnold, I. C., J. Y. Lee, M. R. Amieva, A. Roers, R. A. Flavell, T. Sparwasser and A. Müller (2011). "Tolerance rather than immunity protects from *Helicobacter pylori*-induced gastric preneoplasia." Gastroenterology **140**(1): 199-209.

Arnold, I. C., X. Zhang, S. Urban, M. Artola-Borán, M. G. Manz, K. M. Ottemann and A. Müller (2017). "NLRP3 Controls the Development of Gastrointestinal CD11b(+) Dendritic Cells in the Steady State and during Chronic Bacterial Infection." Cell Rep **21**(13): 3860-3872.

Asano, N., A. Imatani, T. Watanabe, J. Fushiya, Y. Kondo, X. Jin, N. Ara, K. Uno, K. Iijima, T. Koike, W. Strober and T. Shimosegawa (2016). "Cdx2 Expression and Intestinal Metaplasia Induced by H. pylori Infection of Gastric Cells Is Regulated by NOD1-Mediated Innate Immune Responses." Cancer Res **76**(5): 1135-1145.

Asfaha, S., A. N. Dubeykovskiy, H. Tomita, X. Yang, S. Stokes, W. Shibata, R. A. Friedman, H. Ariyama, Z. A. Dubeykovskaya, S. Muthupalani, R. Ericksen, H. Frucht, J. G. Fox and T. C. Wang (2013). "Mice that express human interleukin-8 have increased mobilization of immature myeloid cells, which exacerbates inflammation and accelerates colon carcinogenesis." Gastroenterology **144**(1): 155-166.

Atherton, J. C. (2006). "The pathogenesis of Helicobacter pylori-induced gastro-duodenal diseases." Annu Rev Pathol **1**: 63-96.

Bacha, D., M. Walha, S. Ben Slama, H. Ben Romdhane, S. Bouraoui, K. Bellil and A. Lahmar (2018). "Chronic gastritis classifications." Tunis Med **96**(7): 405-410.

Backert, S. and M. Selbach (2008). "Role of type IV secretion in Helicobacter pylori pathogenesis." Cell Microbiol **10**(8): 1573-1581.

Bäckhed, F., B. Rokbi, E. Torstensson, Y. Zhao, C. Nilsson, D. Seguin, S. Normark, A. M. Buchan and A. Richter-Dahlfors (2003). "Gastric mucosal recognition of Helicobacter pylori is independent of Toll-like receptor 4." J Infect Dis **187**(5): 829-836.

Bagheri, N., L. Salimzadeh and H. Shirzad (2018). "The role of T helper 1-cell response in Helicobacter pylori-infection." Microb Pathog **123**: 1-8.

Bakema, J. E. and M. van Egmond (2011). "The human immunoglobulin A Fc receptor Fc α RI: a multifaceted regulator of mucosal immunity." Mucosal Immunol **4**(6): 612-624.

Basak, C., S. K. Pathak, A. Bhattacharyya, D. Mandal, S. Pathak and M. Kundu (2005). "NF-kappaB- and C/EBPbeta-driven interleukin-1beta gene expression and PAK1-mediated caspase-1 activation play essential roles in interleukin-1beta release from Helicobacter pylori lipopolysaccharide-stimulated macrophages." J Biol Chem **280**(6): 4279-4288.

Bauernfeind, F., A. Rieger, F. A. Schildberg, P. A. Knolle, J. L. Schmid-Burgk and V. Hornung (2012). "NLRP3 inflammasome activity is negatively controlled by miR-223." J Immunol **189**(8): 4175-4181.

Bauernfeind, F. G., G. Horvath, A. Stutz, E. S. Alnemri, K. MacDonald, D. Speert, T. Fernandes-Alnemri, J. Wu, B. G. Monks, K. A. Fitzgerald, V. Hornung and E. Latz (2009). "Cutting edge: NF-kappaB activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression." J Immunol **183**(2): 787-791.

Beales, I. L. and J. Calam (1998). "Interleukin 1 beta and tumour necrosis factor alpha inhibit acid secretion in cultured rabbit parietal cells by multiple pathways." *Gut* **42**(2): 227-234.

Bello-Fernandez, C., G. Packham and J. L. Cleveland (1993). "The ornithine decarboxylase gene is a transcriptional target of c-Myc." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(16): 7804-7808.

Benoit, B. N., M. Kobayashi, M. Kawakubo, M. Takeoka, K. Sano, J. Zou, N. Itano, H. Tsutsui, T. Noda, M. Fukuda, J. Nakayama and S. Taniguchi (2009). "Role of ASC in the mouse model of *Helicobacter pylori* infection." *J Histochem Cytochem* **57**(4): 327-338.

Berenson, L. S., N. Ota and K. M. Murphy (2004). "Issues in T-helper 1 development--resolved and unresolved." *Immunol Rev* **202**: 157-174.

Birchenough, G. M., E. E. Nyström, M. E. Johansson and G. C. Hansson (2016). "A sentinel goblet cell guards the colonic crypt by triggering Nlrp6-dependent Muc2 secretion." *Science* **352**(6293): 1535-1542.

Blaser, N., S. Backert and S. K. Pachathundikandi (2019). "Immune Cell Signaling by *Helicobacter pylori*: Impact on Gastric Pathology." *Adv Exp Med Biol* **1149**: 77-106.

Boonyanugomol, W., C. Chomvarin, C. Hahnvajanawong, B. Sripana, M. Kaparakis-Liaskos and R. L. Ferrero (2013). "*Helicobacter pylori* cag pathogenicity island (cagPAI) involved in bacterial internalization and IL-8 induced responses via NOD1- and MyD88-dependent mechanisms in human biliary epithelial cells." *PLoS One* **8**(10): e77358.

Borén, T., P. Falk, K. A. Roth, G. Larson and S. Normark (1993). "Attachment of *Helicobacter pylori* to human gastric epithelium mediated by blood group antigens." *Science* **262**(5141): 1892-1895.

Borish, L. C. and J. W. Steinke (2003). "2. Cytokines and chemokines." *J Allergy Clin Immunol* **111**(2 Suppl): S460-475.

Boughan, P. K., R. H. Argent, M. Body-Malapel, J. H. Park, K. E. Ewings, A. G. Bowie, S. J. Ong, S. J. Cook, O. E. Sorensen, B. A. Manzo, N. Inohara, N. J. Klein, G. Nuñez, J. C. Atherton and M. Bajaj-Elliott (2006). "Nucleotide-binding oligomerization domain-1 and epidermal growth factor receptor: critical regulators of beta-defensins during *Helicobacter pylori* infection." *J Biol Chem* **281**(17): 11637-11648.

Boyden, E. D. and W. F. Dietrich (2006). "Nalp1b controls mouse macrophage susceptibility to anthrax lethal toxin." *Nat Genet* **38**(2): 240-244.

Brocker, C. N., D. Kim, T. Melia, K. Karri, T. J. Velenosi, S. Takahashi, D. Aibara, J. A. Bonzo, M. Levi, D. J. Waxman and F. J. Gonzalez (2020). "Long non-coding RNA Gm15441 attenuates hepatic inflammasome activation in response to PPARA agonism and fasting." *Nat Commun* **11**(1): 5847.

Broz, P. and V. M. Dixit (2016). "Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and signalling." *Nat Rev Immunol* **16**(7): 407-420.

- Brubaker, S. W., K. S. Bonham, I. Zanoni and J. C. Kagan (2015). "Innate immune pattern recognition: a cell biological perspective." *Annu Rev Immunol* **33**: 257-290.
- Bury-Moné, S., G. L. Mendz, G. E. Ball, M. Thibonnier, K. Stingl, C. Ecobichon, P. Avé, M. Huerre, A. Labigne, J. M. Thiberge and H. De Reuse (2008). "Roles of alpha and beta carbonic anhydrases of *Helicobacter pylori* in the urease-dependent response to acidity and in colonization of the murine gastric mucosa." *Infect Immun* **76**(2): 497-509.
- Bussière, F. I., R. Chaturvedi, Y. Cheng, A. P. Gobert, M. Asim, D. R. Blumberg, H. Xu, P. Y. Kim, A. Hacker, R. A. Casero, Jr. and K. T. Wilson (2005). "Spermine causes loss of innate immune response to *Helicobacter pylori* by inhibition of inducible nitric-oxide synthase translation." *J Biol Chem* **280**(4): 2409-2412.
- Calam, J. (1999). "Helicobacter pylori modulation of gastric acid." *Yale J Biol Med* **72**(2-3): 195-202.
- Camilo, V., R. Barros, S. Sousa, A. M. Magalhães, T. Lopes, A. Mário Santos, T. Pereira, C. Figueiredo, L. David and R. Almeida (2012). "Helicobacter pylori and the BMP pathway regulate CDX2 and SOX2 expression in gastric cells." *Carcinogenesis* **33**(10): 1985-1992.
- Camilo, V., M. Garrido, P. Valente, S. Ricardo, A. L. Amaral, R. Barros, P. Chaves, F. Carneiro, L. David and R. Almeida (2015). "Differentiation reprogramming in gastric intestinal metaplasia and dysplasia: role of SOX2 and CDX2." *Histopathology* **66**(3): 343-350.
- Campbell-Valois, F. X., M. Trost, M. Chemali, B. D. Dill, A. Laplante, S. Duclos, S. Sadeghi, C. Rondeau, I. C. Morrow, C. Bell, E. Gagnon, K. Hatsuzawa, P. Thibault and M. Desjardins (2012). "Quantitative proteomics reveals that only a subset of the endoplasmic reticulum contributes to the phagosome." *Mol Cell Proteomics* **11**(7): M111.016378.
- Canton, J., D. Neculai and S. Grinstein (2013). "Scavenger receptors in homeostasis and immunity." *Nat Rev Immunol* **13**(9): 621-634.
- Cario, E. (2005). "Bacterial interactions with cells of the intestinal mucosa: Toll-like receptors and NOD2." *Gut* **54**(8): 1182-1193.
- Carlos Rosales, E. U.-Q. (2013). "Fc receptors: cell activators of antibody functions," *Advances in Bioscience and Biotechnology*. *Advances in Bioscience and Biotechnology* **4**: 21-33.
- Carpentier, S. J., M. Ni, J. M. Duggan, R. G. James, B. T. Cookson and J. A. Hamerman (2019). "The signaling adaptor BCAP inhibits NLRP3 and NLRC4 inflammasome activation in macrophages through interactions with Flightless-1." *Sci Signal* **12**(581).
- Caruso, R., D. Fina, O. A. Paoluzi, G. Del Vecchio Blanco, C. Stolfi, A. Rizzo, F. Caprioli, M. Sarra, F. Andrei, M. C. Fantini, T. T. MacDonald, F. Pallone and G. Monteleone (2008). "IL-23-mediated

regulation of IL-17 production in *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosa." Eur J Immunol **38**(2): 470-478.

Cassel, S. L., S. C. Eisenbarth, S. S. Iyer, J. J. Sadler, O. R. Colegio, L. A. Tephly, A. B. Carter, P. B. Rothman, R. A. Flavell and F. S. Sutterwala (2008). "The Nalp3 inflammasome is essential for the development of silicosis." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(26): 9035-9040.

Castaño-Rodríguez, N., N. O. Kaakoush, K. L. Goh, K. M. Fock and H. M. Mitchell (2014). "The NOD-like receptor signalling pathway in *Helicobacter pylori* infection and related gastric cancer: a case-control study and gene expression analyses." PLoS One **9**(6): e98899.

Chakravorty, M., A. Ghosh, A. Choudhury, A. Santra, J. Hembrum and S. Roychoudhury (2006). "Interaction between IL1B gene promoter polymorphisms in determining susceptibility to *Helicobacter pylori* associated duodenal ulcer." Hum Mutat **27**(5): 411-419.

Chang, W. L., Y. C. Yeh and B. S. Sheu (2018). "The impacts of *H. pylori* virulence factors on the development of gastroduodenal diseases." J Biomed Sci **25**(1): 68.

Chaturvedi, R., M. Asim, N. D. Lewis, H. M. Algood, T. L. Cover, P. Y. Kim and K. T. Wilson (2007). "L-arginine availability regulates inducible nitric oxide synthase-dependent host defense against *Helicobacter pylori*." Infect Immun **75**(9): 4305-4315.

Chaturvedi, R., Y. Cheng, M. Asim, F. I. Bussière, H. Xu, A. P. Gobert, A. Hacker, R. A. Casero, Jr. and K. T. Wilson (2004). "Induction of polyamine oxidase 1 by *Helicobacter pylori* causes macrophage apoptosis by hydrogen peroxide release and mitochondrial membrane depolarization." J Biol Chem **279**(38): 40161-40173.

Chen, Y., Y. Wang, W. Xu and Z. Zhang (2005). "Analysis on the mechanism of *Helicobacter pylori*-induced apoptosis in gastric cancer cell line BGC-823." Int J Mol Med **16**(4): 741-745.

Chmiela, M. and J. Kupcinskis (2019). "Review: Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection." Helicobacter **24 Suppl 1**(Suppl Suppl 1): e12638.

Chu, Y. T., Y. H. Wang, J. J. Wu and H. Y. Lei (2010). "Invasion and multiplication of *Helicobacter pylori* in gastric epithelial cells and implications for antibiotic resistance." Infect Immun **78**(10): 4157-4165.

Correa, P. (1992). "Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process--First American Cancer Society Award Lecture on Cancer Epidemiology and Prevention." Cancer Res **52**(24): 6735-6740.

Correa, P., W. Haenszel, C. Cuello, S. Tannenbaum and M. Archer (1975). "A model for gastric cancer epidemiology." Lancet **2**(7924): 58-60.

Correa, P. and J. Houghton (2007). "Carcinogenesis of *Helicobacter pylori*." Gastroenterology **133**(2): 659-672.

- Correa, P. and M. B. Piazuelo (2012). "The gastric precancerous cascade." J Dig Dis **13**(1): 2-9.
- Crabtree, J. E. (1996). "Immune and inflammatory responses to Helicobacter pylori infection." Scand J Gastroenterol Suppl **215**: 3-10.
- Cruz, C. M., A. Rinna, H. J. Forman, A. L. Ventura, P. M. Persechini and D. M. Ojcius (2007). "ATP activates a reactive oxygen species-dependent oxidative stress response and secretion of proinflammatory cytokines in macrophages." J Biol Chem **282**(5): 2871-2879.
- Dambuza, I. M. and G. D. Brown (2015). "C-type lectins in immunity: recent developments." Curr Opin Immunol **32**: 21-27.
- Danesh, J. (1999). "Helicobacter pylori infection and gastric cancer: systematic review of the epidemiological studies." Aliment Pharmacol Ther **13**(7): 851-856.
- de Almeida, L., S. Khare, A. V. Misharin, R. Patel, R. A. Ratsimandresy, M. C. Wallin, H. Perlman, D. R. Greaves, H. M. Hoffman, A. Dorfleutner and C. Stehlik (2015). "The PYRIN Domain-only Protein POP1 Inhibits Inflammasome Assembly and Ameliorates Inflammatory Disease." Immunity **43**(2): 264-276.
- de Brito, B. B., F. A. F. da Silva, A. S. Soares, V. A. Pereira, M. L. C. Santos, M. M. Sampaio, P. H. M. Neves and F. F. de Melo (2019). "Pathogenesis and clinical management of Helicobacter pylori gastric infection." World J Gastroenterol **25**(37): 5578-5589.
- Delaloye, J., T. Roger, Q. G. Steiner-Tardivel, D. Le Roy, M. Knaup Reymond, S. Akira, V. Petrilli, C. E. Gomez, B. Perdiguero, J. Tschopp, G. Pantaleo, M. Esteban and T. Calandra (2009). "Innate immune sensing of modified vaccinia virus Ankara (MVA) is mediated by TLR2-TLR6, MDA-5 and the NALP3 inflammasome." PLoS Pathog **5**(6): e1000480.
- Dinarello, C. A. (2009). "Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family." Annu Rev Immunol **27**: 519-550.
- Dixon, M. F., R. M. Genta, J. H. Yardley and P. Correa (1996). "Classification and grading of gastritis. The updated Sydney System. International Workshop on the Histopathology of Gastritis, Houston 1994." Am J Surg Pathol **20**(10): 1161-1181.
- Doig, P., J. W. Austin, M. Kostrzynska and T. J. Trust (1992). "Production of a conserved adhesin by the human gastroduodenal pathogen Helicobacter pylori." J Bacteriol **174**(8): 2539-2547.
- Dostert, C., V. Pétrilli, R. Van Bruggen, C. Steele, B. T. Mossman and J. Tschopp (2008). "Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica." Science **320**(5876): 674-677.
- Duewell, P., H. Kono, K. J. Rayner, C. M. Sirois, G. Vladimer, F. G. Bauernfeind, G. S. Abela, L. Franchi, G. Nuñez, M. Schnurr, T. Espevik, E. Lien, K. A. Fitzgerald, K. L. Rock, K. J. Moore, S. D. Wright, V.

Hornung and E. Latz (2010). "NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals." Nature **464**(7293): 1357-1361.

Dunn, B. E. and S. H. Phadnis (1998). "Structure, function and localization of Helicobacter pylori urease." Yale J Biol Med **71**(2): 63-73.

Eaton, K. A., L. H. Benson, J. Haeger and B. M. Gray (2006). "Role of transcription factor T-bet expression by CD4+ cells in gastritis due to Helicobacter pylori in mice." Infect Immun **74**(8): 4673-4684.

Eaton, K. A., M. Mefford and T. Thevenot (2001). "The role of T cell subsets and cytokines in the pathogenesis of Helicobacter pylori gastritis in mice." J Immunol **166**(12): 7456-7461.

Edwards, N. J., M. A. Monteiro, G. Faller, E. J. Walsh, A. P. Moran, I. S. Roberts and N. J. High (2000). "Lewis X structures in the O antigen side-chain promote adhesion of Helicobacter pylori to the gastric epithelium." Mol Microbiol **35**(6): 1530-1539.

Eidt, S. and M. Stolte (1995). "The significance of Helicobacter pylori in relation to gastric cancer and lymphoma." Eur J Gastroenterol Hepatol **7**(4): 318-321.

Eisenbarth, S. C., O. R. Colegio, W. O'Connor, F. S. Sutterwala and R. A. Flavell (2008). "Crucial role for the Nalp3 inflammasome in the immunostimulatory properties of aluminium adjuvants." Nature **453**(7198): 1122-1126.

el-Omar, E., I. Penman, J. E. Ardill and K. E. McColl (1995). "A substantial proportion of non-ulcer dyspepsia patients have the same abnormality of acid secretion as duodenal ulcer patients." Gut **36**(4): 534-538.

El-Omar, E. M., K. Oien, A. El-Nujumi, D. Gillen, A. Wirz, S. Dahill, C. Williams, J. E. Ardill and K. E. McColl (1997). "Helicobacter pylori infection and chronic gastric acid hyposecretion." Gastroenterology **113**(1): 15-24.

el-Omar, E. M., I. D. Penman, J. E. Ardill, R. S. Chittajallu, C. Howie and K. E. McColl (1995). "Helicobacter pylori infection and abnormalities of acid secretion in patients with duodenal ulcer disease." Gastroenterology **109**(3): 681-691.

Ellis, H. (2011). "Anatomy of the stomach." BASIC SCIENCE VOLUME 29(11): P541-543.

Eren, E., M. Berber and N. Özören (2017). "NLRC3 protein inhibits inflammation by disrupting NALP3 inflammasome assembly via competition with the adaptor protein ASC for pro-caspase-1 binding." J Biol Chem **292**(30): 12691-12701.

Ermler, M. E., Z. Traylor, K. Patel, S. A. Schattgen, S. K. Vanaja, K. A. Fitzgerald and A. G. Hise (2014). "Rift Valley fever virus infection induces activation of the NLRP3 inflammasome." Virology **449**: 174-180.

- Evans, D. G., D. J. Evans, Jr., J. J. Moulds and D. Y. Graham (1988). "N-acetylneuraminylactose-binding fibrillar hemagglutinin of *Campylobacter pylori*: a putative colonization factor antigen." Infect Immun **56**(11): 2896-2906.
- Falk, P., K. A. Roth, T. Borén, T. U. Westblom, J. I. Gordon and S. Normark (1993). "An in vitro adherence assay reveals that *Helicobacter pylori* exhibits cell lineage-specific tropism in the human gastric epithelium." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(5): 2035-2039.
- Falk, P. G., L. Bry, J. Holgersson and J. I. Gordon (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**(5): 1515-1519.
- Feng, X., Q. Luo, H. Wang, H. Zhang and F. Chen (2018). "MicroRNA-22 suppresses cell proliferation, migration and invasion in oral squamous cell carcinoma by targeting NLRP3." J Cell Physiol **233**(9): 6705-6713.
- Fernandes-Alnemri, T., J. W. Yu, P. Datta, J. Wu and E. S. Alnemri (2009). "AIM2 activates the inflammasome and cell death in response to cytoplasmic DNA." Nature **458**(7237): 509-513.
- Fernandes-Alnemri, T., J. W. Yu, C. Juliana, L. Solorzano, S. Kang, J. Wu, P. Datta, M. McCormick, L. Huang, E. McDermott, L. Eisenlohr, C. P. Landel and E. S. Alnemri (2010). "The AIM2 inflammasome is critical for innate immunity to *Francisella tularensis*." Nat Immunol **11**(5): 385-393.
- Ferrero, R. L., P. Avé, D. Ndiaye, J. C. Bambou, M. R. Huerre, D. J. Philpott and S. Mémet (2008). "NF-kappaB activation during acute *Helicobacter pylori* infection in mice." Infect Immun **76**(2): 551-561.
- Figueiredo, C. A., C. R. Marques, S. Costa Rdos, H. B. da Silva and N. M. Alcantara-Neves (2014). "Cytokines, cytokine gene polymorphisms and *Helicobacter pylori* infection: friend or foe?" World J Gastroenterol **20**(18): 5235-5243.
- Figueiredo, C. u., J. C. Machado, P. Pharoah, R. Seruca, S. n. Sousa, R. Carvalho, A. F. Capelinha, W. Quint, C. Caldas, L.-J. van Doorn, F. t. Carneiro and M. Sobrinho-Simões (2002). "Helicobacter pylori and Interleukin 1 Genotyping: An Opportunity to Identify High-Risk Individuals for Gastric Carcinoma." JNCI: Journal of the National Cancer Institute **94**(22): 1680-1687.
- Fink, S. L. and B. T. Cookson (2005). "Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells." Infect Immun **73**(4): 1907-1916.
- Flannagan, R. S., V. Jaumouillé and S. Grinstein (2012). "The cell biology of phagocytosis." Annu Rev Pathol **7**: 61-98.
- Fleming, S. L. (2007). Helicobacter Pylori (Deadly Diseases and Epidemics).

Fox, J. G. and T. C. Wang (2007). "Inflammation, atrophy, and gastric cancer." *J Clin Invest* **117**(1): 60-69.

Franchi, L., T. Eigenbrod and G. Núñez (2009). "Cutting edge: TNF-alpha mediates sensitization to ATP and silica via the NLRP3 inflammasome in the absence of microbial stimulation." *J Immunol* **183**(2): 792-796.

Franchi, L. and G. Núñez (2008). "The Nlrp3 inflammasome is critical for aluminium hydroxide-mediated IL-1beta secretion but dispensable for adjuvant activity." *Eur J Immunol* **38**(8): 2085-2089.

Freeman, S. A. and S. Grinstein (2014). "Phagocytosis: receptors, signal integration, and the cytoskeleton." *Immunol Rev* **262**(1): 193-215.

Fritz, J. H., L. Le Bourhis, G. Sellge, J. G. Magalhaes, H. Fsihi, T. A. Kufer, C. Collins, J. Viala, R. L. Ferrero, S. E. Girardin and D. J. Philpott (2007). "Nod1-mediated innate immune recognition of peptidoglycan contributes to the onset of adaptive immunity." *Immunity* **26**(4): 445-459.

Fu, S., K. S. Ramanujam, A. Wong, G. T. Fantry, C. B. Drachenberg, S. P. James, S. J. Meltzer and K. T. Wilson (1999). "Increased expression and cellular localization of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase 2 in Helicobacter pylori gastritis." *Gastroenterology* **116**(6): 1319-1329.

Fukazawa, A., C. Alonso, K. Kurachi, S. Gupta, C. F. Lesser, B. A. McCormick and H. C. Reinecker (2008). "GEF-H1 mediated control of NOD1 dependent NF-kappaB activation by Shigella effectors." *PLoS Pathog* **4**(11): e1000228.

Furuta, T., E. M. El-Omar, F. Xiao, N. Shirai, M. Takashima and H. Sugimura (2002). "Interleukin 1beta polymorphisms increase risk of hypochlorhydria and atrophic gastritis and reduce risk of duodenal ulcer recurrence in Japan." *Gastroenterology* **123**(1): 92-105.

Furuta, T., N. Shirai, M. Takashima, F. Xiao and H. Sugimura (2002). "Effect of genotypic differences in interleukin-1 beta on gastric acid secretion in Japanese patients infected with Helicobacter pylori." *Am J Med* **112**(2): 141-143.

Gaidt, M. M., T. S. Ebert, D. Chauhan, K. Ramshorn, F. Pinci, S. Zuber, F. O'Duill, J. L. Schmid-Burgk, F. Hoss, R. Buhmann, G. Wittmann, E. Latz, M. Subklewe and V. Hornung (2017). "The DNA Inflammasome in Human Myeloid Cells Is Initiated by a STING-Cell Death Program Upstream of NLRP3." *Cell* **171**(5): 1110-1124.e1118.

Garhart, C. A., J. G. Nedrud, F. P. Heinzl, N. E. Sigmund and S. J. Czinn (2003). "Vaccine-induced protection against Helicobacter pylori in mice lacking both antibodies and interleukin-4." *Infect Immun* **71**(6): 3628-3633.

Gelberg, H. B. (2014). "Comparative anatomy, physiology, and mechanisms of disease production of the esophagus, stomach, and small intestine." *Toxicol Pathol* **42**(1): 54-66.

Georgel, P. and S. Bahram (2006). "[Toll-dependent and toll-independent innate antiviral immunity]." *Med Sci (Paris)* **22**(11): 961-968.

Gewirtz, A. T., Y. Yu, U. S. Krishna, D. A. Israel, S. L. Lyons and R. M. Peek, Jr. (2004). "Helicobacter pylori flagellin evades toll-like receptor 5-mediated innate immunity." *J Infect Dis* **189**(10): 1914-1920.

Giroux, V. and A. K. Rustgi (2017). "Metaplasia: tissue injury adaptation and a precursor to the dysplasia-cancer sequence." *Nat Rev Cancer* **17**(10): 594-604.

Gobert, A. P., J. C. Bambou, C. Werts, V. Balloy, M. Chignard, A. P. Moran and R. L. Ferrero (2004). "Helicobacter pylori heat shock protein 60 mediates interleukin-6 production by macrophages via a toll-like receptor (TLR)-2-, TLR-4-, and myeloid differentiation factor 88-independent mechanism." *J Biol Chem* **279**(1): 245-250.

Gobert, A. P., Y. Cheng, J. Y. Wang, J. L. Boucher, R. K. Iyer, S. D. Cederbaum, R. A. Casero, Jr., J. C. Newton and K. T. Wilson (2002). "Helicobacter pylori induces macrophage apoptosis by activation of arginase II." *J Immunol* **168**(9): 4692-4700.

Gobert, A. P., D. J. McGee, M. Akhtar, G. L. Mendz, J. C. Newton, Y. Cheng, H. L. Mobley and K. T. Wilson (2001). "Helicobacter pylori arginase inhibits nitric oxide production by eukaryotic cells: a strategy for bacterial survival." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(24): 13844-13849.

Graham, D. Y. (2015). "Helicobacter pylori update: gastric cancer, reliable therapy, and possible benefits." *Gastroenterology* **148**(4): 719-731.e713.

Gray, B. M., C. A. Fontaine, S. A. Poe and K. A. Eaton (2013). "Complex T cell interactions contribute to Helicobacter pylori gastritis in mice." *Infect Immun* **81**(3): 740-752.

Gressmann, H., B. Linz, R. Ghai, K. P. Pleissner, R. Schlapbach, Y. Yamaoka, C. Kraft, S. Suerbaum, T. F. Meyer and M. Achtman (2005). "Gain and loss of multiple genes during the evolution of Helicobacter pylori." *PLoS Genet* **1**(4): e43.

Groenen, M. J., E. J. Kuipers, B. E. Hansen and R. J. Ouwendijk (2009). "Incidence of duodenal ulcers and gastric ulcers in a Western population: back to where it started." *Can J Gastroenterol* **23**(9): 604-608.

Grootjans, S., T. Vanden Berghe and P. Vandenabeele (2017). "Initiation and execution mechanisms of necroptosis: an overview." *Cell Death Differ* **24**(7): 1184-1195.

Gross, O., H. Poeck, M. Bscheider, C. Dostert, N. Hanneschläger, S. Endres, G. Hartmann, A. Tardivel, E. Schweighoffer, V. Tybulewicz, A. Mocsai, J. Tschopp and J. Ruland (2009). "Syk kinase signalling couples to the Nlrp3 inflammasome for anti-fungal host defence." *Nature* **459**(7245): 433-436.

Grubman, A., M. Kaparakis, J. Viala, C. Allison, L. Badea, A. Karrar, I. G. Boneca, L. Le Bourhis, S. Reeve, I. A. Smith, E. L. Hartland, D. J. Philpott and R. L. Ferrero (2010). "The innate immune

molecule, NOD1, regulates direct killing of *Helicobacter pylori* by antimicrobial peptides." Cell Microbiol **12**(5): 626-639.

Gu, H. (2017). "Role of Flagella in the Pathogenesis of *Helicobacter pylori*." Curr Microbiol **74**(7): 863-869.

Guido, D., N. Demarex and P. Nunes (2015). "Junctate boosts phagocytosis by recruiting endoplasmic reticulum Ca²⁺ stores near phagosomes." J Cell Sci **128**(22): 4074-4082.

Guiney, D. G., P. Hasegawa and S. P. Cole (2003). "*Helicobacter pylori* preferentially induces interleukin 12 (IL-12) rather than IL-6 or IL-10 in human dendritic cells." Infect Immun **71**(7): 4163-4166.

Guo, C., S. Xie, Z. Chi, J. Zhang, Y. Liu, L. Zhang, M. Zheng, X. Zhang, D. Xia, Y. Ke, L. Lu and D. Wang (2016). "Bile Acids Control Inflammation and Metabolic Disorder through Inhibition of NLRP3 Inflammasome." Immunity **45**(4): 802-816.

Guo, T., J. M. Qian, Y. Q. Zhao, X. B. Li and J. Z. Zhang (2013). "Effects of IL-1 β on the proliferation and apoptosis of gastric epithelial cells and acid secretion from isolated rabbit parietal cells." Mol Med Rep **7**(1): 299-305.

Gurung, P., P. K. Anand, R. K. Malireddi, L. Vande Walle, N. Van Opdenbosch, C. P. Dillon, R. Weinlich, D. R. Green, M. Lamkanfi and T. D. Kanneganti (2014). "FADD and caspase-8 mediate priming and activation of the canonical and noncanonical Nlrp3 inflammasomes." J Immunol **192**(4): 1835-1846.

Haeberle, H. A., M. Kubin, K. B. Bamford, R. Garofalo, D. Y. Graham, F. El-Zaatari, R. Karttunen, S. E. Crowe, V. E. Reyes and P. B. Ernst (1997). "Differential stimulation of interleukin-12 (IL-12) and IL-10 by live and killed *Helicobacter pylori* in vitro and association of IL-12 production with gamma interferon-producing T cells in the human gastric mucosa." Infect Immun **65**(10): 4229-4235.

Hafsi, N., P. Volland, S. Schwendy, R. Rad, W. Reindl, M. Gerhard and C. Prinz (2004). "Human dendritic cells respond to *Helicobacter pylori*, promoting NK cell and Th1-effector responses in vitro." J Immunol **173**(2): 1249-1257.

Halle, A., V. Hornung, G. C. Petzold, C. R. Stewart, B. G. Monks, T. Reinheckel, K. A. Fitzgerald, E. Latz, K. J. Moore and D. T. Golenbock (2008). "The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid-beta." Nat Immunol **9**(8): 857-865.

Hara, H., S. S. Seregin, D. Yang, K. Fukase, M. Chamaillard, E. S. Alnemri, N. Inohara, G. Y. Chen and G. Núñez (2018). "The NLRP6 Inflammasome Recognizes Lipoteichoic Acid and Regulates Gram-Positive Pathogen Infection." Cell **175**(6): 1651-1664.e1614.

Hara, H., K. Tsuchiya, I. Kawamura, R. Fang, E. Hernandez-Cuellar, Y. Shen, J. Mizuguchi, E. Schweighoffer, V. Tybulewicz and M. Mitsuyama (2013). "Phosphorylation of the adaptor ASC acts as a molecular switch that controls the formation of speck-like aggregates and inflammasome activity." Nat Immunol **14**(12): 1247-1255.

Harrington, L. E., R. D. Hatton, P. R. Mangan, H. Turner, T. L. Murphy, K. M. Murphy and C. T. Weaver (2005). "Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages." Nat Immunol **6**(11): 1123-1132.

Harris, P. R., P. B. Ernst, S. Kawabata, H. Kiyono, M. F. Graham and P. D. Smith (1998). "Recombinant Helicobacter pylori urease activates primary mucosal macrophages." J Infect Dis **178**(5): 1516-1520.

Hatakeyama, M. (2004). "Oncogenic mechanisms of the Helicobacter pylori CagA protein." Nat Rev Cancer **4**(9): 688-694.

Hatakeyama, M. (2009). "Helicobacter pylori and gastric carcinogenesis." J Gastroenterol **44**(4): 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**(4): 196-219.

Hayden, M. S., A. P. West and S. Ghosh (2006). "NF-kappaB and the immune response." Oncogene **25**(51): 6758-6780.

Hazell, S. L., A. Lee, L. Brady and W. Hennessy (1986). "Campylobacter pyloridis and gastritis: association with intercellular spaces and adaptation to an environment of mucus as important factors in colonization of the gastric epithelium." J Infect Dis **153**(4): 658-663.

Hellstrom, P. M. (2006). "This year's Nobel Prize to gastroenterology: Robin Warren and Barry Marshall awarded for their discovery of Helicobacter pylori as pathogen in the gastrointestinal tract." World J Gastroenterol **12**(19): 3126-3127.

Higashi, H., R. Tsutsumi, A. Fujita, S. Yamazaki, M. Asaka, T. Azuma and M. Hatakeyama (2002). "Biological activity of the Helicobacter pylori virulence factor CagA is determined by variation in the tyrosine phosphorylation sites." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(22): 14428-14433.

Hirata, Y., T. Ohmae, W. Shibata, S. Maeda, K. Ogura, H. Yoshida, T. Kawabe and M. Omata (2006). "MyD88 and TNF receptor-associated factor 6 are critical signal transducers in Helicobacter pylori-infected human epithelial cells." J Immunol **176**(6): 3796-3803.

Hitzler, I., M. Oertli, B. Becher, E. M. Agger and A. Müller (2011). "Dendritic cells prevent rather than promote immunity conferred by a helicobacter vaccine using a mycobacterial adjuvant." Gastroenterology **141**(1): 186-196, 196.e181.

Hitzler, I., A. Sayi, E. Kohler, D. B. Engler, K. N. Koch, W. D. Hardt and A. Müller (2012). "Caspase-1 has both proinflammatory and regulatory properties in Helicobacter infections, which are differentially mediated by its substrates IL-1 β and IL-18." J Immunol **188**(8): 3594-3602.

Hoffman, H. M., J. L. Mueller, D. H. Broide, A. A. Wanderer and R. D. Kolodner (2001). "Mutation of a new gene encoding a putative pyrin-like protein causes familial cold autoinflammatory syndrome and Muckle-Wells syndrome." Nat Genet **29**(3): 301-305.

Hong, J. B., W. Zuo, A. J. Wang and N. H. Lu (2016). "Helicobacter pylori Infection Synergistic with IL-1 β Gene Polymorphisms Potentially Contributes to the Carcinogenesis of Gastric Cancer." Int J Med Sci **13**(4): 298-303.

Hornung, V., A. Ablasser, M. Charrel-Dennis, F. Bauernfeind, G. Horvath, D. R. Caffrey, E. Latz and K. A. Fitzgerald (2009). "AIM2 recognizes cytosolic dsDNA and forms a caspase-1-activating inflammasome with ASC." Nature **458**(7237): 514-518.

Hsu, L. C., S. R. Ali, S. McGillivray, P. H. Tseng, S. Mariathasan, E. W. Humke, L. Eckmann, J. J. Powell, V. Nizet, V. M. Dixit and M. Karin (2008). "A NOD2-NALP1 complex mediates caspase-1-dependent IL-1 β secretion in response to Bacillus anthracis infection and muramyl dipeptide." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(22): 7803-7808.

Hu, J., H. Wu, D. Wang, Z. Yang and J. Dong (2019). "LncRNA ANRIL promotes NLRP3 inflammasome activation in uric acid nephropathy through miR-122-5p/BRCC3 axis." Biochimie **157**: 102-110.

Huang, J. Q., G. F. Zheng, K. Sumanac, E. J. Irvine and R. H. Hunt (2003). "Meta-analysis of the relationship between cagA seropositivity and gastric cancer." Gastroenterology **125**(6): 1636-1644.

Huang, W. Q., P. Wei, R. Q. Lin and F. Huang (2017). "Protective Effects of Microrna-22 Against Endothelial Cell Injury by Targeting NLRP3 Through Suppression of the Inflammasome Signaling Pathway in a Rat Model of Coronary Heart Disease." Cell Physiol Biochem **43**(4): 1346-1358.

Huber, S., N. Gagliani, L. A. Zenewicz, F. J. Huber, L. Bosurgi, B. Hu, M. Hedl, W. Zhang, W. O'Connor, Jr., A. J. Murphy, D. M. Valenzuela, G. D. Yancopoulos, C. J. Booth, J. H. Cho, W. Ouyang, C. Abraham and R. A. Flavell (2012). "IL-22BP is regulated by the inflammasome and modulates tumorigenesis in the intestine." Nature **491**(7423): 259-263.

Huesca, M., S. Borgia, P. Hoffman and C. A. Lingwood (1996). "Acidic pH changes receptor binding specificity of Helicobacter pylori: a binary adhesion model in which surface heat shock (stress) proteins mediate sulfatide recognition in gastric colonization." Infect Immun **64**(7): 2643-2648.

Humphries, F., R. Bergin, R. Jackson, N. Delagic, B. Wang, S. Yang, A. V. Dubois, R. J. Ingram and P. N. Moynagh (2018). "The E3 ubiquitin ligase Pellino2 mediates priming of the NLRP3 inflammasome." Nat Commun **9**(1): 1560.

Hurme, M., N. Lahdenpohja and S. Santtila (1998). "Gene polymorphisms of interleukins 1 and 10 in infectious and autoimmune diseases." Ann Med **30**(5): 469-473.

Hutton, M. L., M. Kaparakis-Liaskos, L. Turner, A. Cardona, T. Kwok and R. L. Ferrero (2010). "Helicobacter pylori exploits cholesterol-rich microdomains for induction of NF-kappaB-dependent responses and peptidoglycan delivery in epithelial cells." Infect Immun **78**(11): 4523-4531.

Hwang, I. R., T. Kodama, S. Kikuchi, K. Sakai, L. E. Peterson, D. Y. Graham and Y. Yamaoka (2002). "Effect of interleukin 1 polymorphisms on gastric mucosal interleukin 1beta production in Helicobacter pylori infection." Gastroenterology **123**(6): 1793-1803.

Hymowitz, S. G., E. H. Filvaroff, J. P. Yin, J. Lee, L. Cai, P. Risser, M. Maruoka, W. Mao, J. Foster, R. F. Kelley, G. Pan, A. L. Gurney, A. M. de Vos and M. A. Starovasnik (2001). "IL-17s adopt a cystine knot fold: structure and activity of a novel cytokine, IL-17F, and implications for receptor binding." Embo j **20**(19): 5332-5341.

Ian R. Daniels, W. H. A. (2005). "The Anatomy and Physiology of the Stomach." Upper Gastrointestinal Surgery.

Ichinohe, T. and A. Iwasaki (2009). "[Inflammasomes in viral infection]." Uirusu **59**(1): 13-21.

Ilver, D., A. Arnqvist, J. Ogren, I. M. Frick, D. Kersulyte, E. T. Incecik, D. E. Berg, A. Covacci, L. Engstrand and T. Borén (1998). "Helicobacter pylori adhesin binding fucosylated histo-blood group antigens revealed by retagging." Science **279**(5349): 373-377.

Introna, M., T. A. Hamilton, R. E. Kaufman, D. O. Adams and R. C. Bast, Jr. (1986). "Treatment of murine peritoneal macrophages with bacterial lipopolysaccharide alters expression of c-fos and c-myc oncogenes." J Immunol **137**(8): 2711-2715.

Ip, W. K. E., N. Hoshi, D. S. Shouval, S. Snapper and R. Medzhitov (2017). "Anti-inflammatory effect of IL-10 mediated by metabolic reprogramming of macrophages." Science **356**(6337): 513-519.

Ishihara, S., M. A. Rumi, Y. Kadowaki, C. F. Ortega-Cava, T. Yuki, N. Yoshino, Y. Miyaoka, H. Kazumori, N. Ishimura, Y. Amano and Y. Kinoshita (2004). "Essential role of MD-2 in TLR4-dependent signaling during Helicobacter pylori-associated gastritis." J Immunol **173**(2): 1406-1416.

Ishikawa, S., T. Ohta and M. Hatakeyama (2009). "Stability of Helicobacter pylori CagA oncoprotein in human gastric epithelial cells." FEBS Lett **583**(14): 2414-2418.

Isomoto, H., M. Miyazaki, Y. Mizuta, F. Takeshima, K. Murase, K. Inoue, K. Yamasaki, I. Murata, T. Koji and S. Kohno (2000). "Expression of nuclear factor-kappaB in Helicobacter pylori-infected gastric mucosa detected with southwestern histochemistry." Scand J Gastroenterol **35**(3): 247-254.

Ito, M., Y. Yanagi and T. Ichinohe (2012). "Encephalomyocarditis virus viroporin 2B activates NLRP3 inflammasome." PLoS Pathog **8**(8): e1002857.

Iwakura, Y. and H. Ishigame (2006). "The IL-23/IL-17 axis in inflammation." J Clin Invest **116**(5): 1218-1222.

Jass, J. R. and M. I. Filipe (1979). "A variant of intestinal metaplasia associated with gastric carcinoma: a histochemical study." Histopathology **3**(3): 191-199.

Jee, C. D., H. S. Lee, S. I. Bae, H. K. Yang, Y. M. Lee, M. S. Rho and W. H. Kim (2005). "Loss of caspase-1 gene expression in human gastric carcinomas and cell lines." Int J Oncol **26**(5): 1265-1271.

Jemilohun, A. C. and J. A. J. P. A. M. J. Otegbayo (2016). "Helicobacter pylori infection: past, present and future." **23**(1).

Jiang, J., S. Liu, J. Luo, X. Li, S. Tang, M. Yu, H. Cai, T. Tian and Y. Zhang (2013). "[The expressions of NLRP3 inflammasome and its downstream molecules in the mouse model of Helicobacter pylori infection]." Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi **29**(8): 785-788.

Jo, E. K., J. K. Kim, D. M. Shin and C. Sasakawa (2016). "Molecular mechanisms regulating NLRP3 inflammasome activation." Cell Mol Immunol **13**(2): 148-159.

Johnson, K. E., L. Chikoti and B. Chandran (2013). "Herpes simplex virus 1 infection induces activation and subsequent inhibition of the IFI16 and NLRP3 inflammasomes." J Virol **87**(9): 5005-5018.

Jones, J. W., N. Kayagaki, P. Broz, T. Henry, K. Newton, K. O'Rourke, S. Chan, J. Dong, Y. Qu, M. Roose-Girma, V. M. Dixit and D. M. Monack (2010). "Absent in melanoma 2 is required for innate immune recognition of Francisella tularensis." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(21): 9771-9776.

Juliana, C., T. Fernandes-Alnemri, S. Kang, A. Farias, F. Qin and E. S. Alnemri (2012). "Non-transcriptional priming and deubiquitination regulate NLRP3 inflammasome activation." J Biol Chem **287**(43): 36617-36622.

Kang, S., T. Fernandes-Alnemri, C. Rogers, L. Mayes, Y. Wang, C. Dillon, L. Roback, W. Kaiser, A. Oberst, J. Sagara, K. A. Fitzgerald, D. R. Green, J. Zhang, E. S. Mocarski and E. S. Alnemri (2015). "Caspase-8 scaffolding function and MLKL regulate NLRP3 inflammasome activation downstream of TLR3." Nat Commun **6**: 7515.

Kanneganti, T. D., N. Ozören, M. Body-Malapel, A. Amer, J. H. Park, L. Franchi, J. Whitfield, W. Barchet, M. Colonna, P. Vandenabeele, J. Bertin, A. Coyle, E. P. Grant, S. Akira and G. Núñez (2006).

"Bacterial RNA and small antiviral compounds activate caspase-1 through cryopyrin/Nalp3." Nature **440**(7081): 233-236.

Kao, J. Y., M. Zhang, M. J. Miller, J. C. Mills, B. Wang, M. Liu, K. A. Eaton, W. Zou, B. E. Berndt, T. S. Cole, T. Takeuchi, S. Y. Owyang and J. Luther (2010). "Helicobacter pylori immune escape is mediated by dendritic cell-induced Treg skewing and Th17 suppression in mice." Gastroenterology **138**(3): 1046-1054.

Kaparakis, M., L. Turnbull, L. Carneiro, S. Firth, H. A. Coleman, H. C. Parkinson, L. Le Bourhis, A. Karrar, J. Viala, J. Mak, M. L. Hutton, J. K. Davies, P. J. Crack, P. J. Hertzog, D. J. Philpott, S. E. Girardin, C. B. Whitchurch and R. L. Ferrero (2010). "Bacterial membrane vesicles deliver peptidoglycan to NOD1 in epithelial cells." Cell Microbiol **12**(3): 372-385.

Kaushik, D. K., M. Gupta, K. L. Kumawat and A. Basu (2012). "NLRP3 inflammasome: key mediator of neuroinflammation in murine Japanese encephalitis." PLoS One **7**(2): e32270.

Kawai, T. and S. Akira (2010). "The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors." Nat Immunol **11**(5): 373-384.

Kawashima, A., T. Karasawa, K. Tago, H. Kimura, R. Kamata, F. Usui-Kawanishi, S. Watanabe, S. Ohta, M. Funakoshi-Tago, K. Yanagisawa, T. Kasahara, K. Suzuki and M. Takahashi (2017). "ARIH2 Ubiquitinates NLRP3 and Negatively Regulates NLRP3 Inflammasome Activation in Macrophages." J Immunol **199**(10): 3614-3622.

Kawashima, A., K. Tanigawa, T. Akama, A. Yoshihara, N. Ishii and K. Suzuki (2011). "Innate immune activation and thyroid autoimmunity." J Clin Endocrinol Metab **96**(12): 3661-3671.

Keates, S., Y. S. Hitti, M. Upton and C. P. Kelly (1997). "Helicobacter pylori infection activates NF-kappa B in gastric epithelial cells." Gastroenterology **113**(4): 1099-1109.

Keestra-Gounder, A. M. and R. M. Tsois (2017). "NOD1 and NOD2: Beyond Peptidoglycan Sensing." Trends Immunol **38**(10): 758-767.

Kim, D. J., J. H. Park, L. Franchi, S. Backert and G. Núñez (2013). "The Cag pathogenicity island and interaction between TLR2/NOD2 and NLRP3 regulate IL-1 β production in Helicobacter pylori infected dendritic cells." Eur J Immunol **43**(10): 2650-2658.

Kim, J. G., S. J. Lee and M. F. Kagnoff (2004). "Nod1 is an essential signal transducer in intestinal epithelial cells infected with bacteria that avoid recognition by toll-like receptors." Infect Immun **72**(3): 1487-1495.

Kiriya, K., N. Watanabe, A. Nishio, K. Okazaki, M. Kido, K. Saga, J. Tanaka, T. Akamatsu, S. Ohashi, M. Asada, T. Fukui and T. Chiba (2007). "Essential role of Peyer's patches in the development of Helicobacter-induced gastritis." Int Immunol **19**(4): 435-446.

Kitadai, Y., K. Haruma, K. Sumii, S. Yamamoto, T. Ue, H. Yokozaki, W. Yasui, Y. Ohmoto, G. Kajiyama, I. J. Fidler and E. Tahara (1998). "Expression of interleukin-8 correlates with vascularity in human gastric carcinomas." Am J Pathol **152**(1): 93-100.

Knorr, J., V. Ricci, M. Hatakeyama and S. Backert (2019). "Classification of Helicobacter pylori Virulence Factors: Is CagA a Toxin or Not?" Trends Microbiol **27**(9): 731-738.

Koch, K. N., M. L. Hartung, S. Urban, A. Kyburz, A. S. Bahlmann, J. Lind, S. Backert, C. Taube and A. Müller (2015). "Helicobacter urease-induced activation of the TLR2/NLRP3/IL-18 axis protects against asthma." J Clin Invest **125**(8): 3297-3302.

Koch, K. N. and A. Müller (2015). "Helicobacter pylori activates the TLR2/NLRP3/caspase-1/IL-18 axis to induce regulatory T-cells, establish persistent infection and promote tolerance to allergens." Gut Microbes **6**(6): 382-387.

Kopic, S. and J. P. Geibel (2013). "Gastric acid, calcium absorption, and their impact on bone health." Physiol Rev **93**(1): 189-268.

Kovarova, M., P. R. Hesker, L. Jania, M. Nguyen, J. N. Snouwaert, Z. Xiang, S. E. Lommatzsch, M. T. Huang, J. P. Ting and B. H. Koller (2012). "NLRP1-dependent pyroptosis leads to acute lung injury and morbidity in mice." J Immunol **189**(4): 2006-2016.

Kranzer, K., A. Eckhardt, M. Aigner, G. Knoll, L. Deml, C. Speth, N. Lehn, M. Rehli and W. Schneider-Brachert (2004). "Induction of maturation and cytokine release of human dendritic cells by Helicobacter pylori." Infect Immun **72**(8): 4416-4423.

Kubelkova, K. and A. Macela (2019). "Innate Immune Recognition: An Issue More Complex Than Expected." **9**(241).

Kumar, M., K. Roe, B. Orillo, D. A. Muruve, V. R. Nerurkar, M. Gale, Jr. and S. Verma (2013). "Inflammasome adaptor protein Apoptosis-associated speck-like protein containing CARD (ASC) is critical for the immune response and survival in west Nile virus encephalitis." J Virol **87**(7): 3655-3667.

Kurashima, Y., N. Murata-Kamiya, K. Kikuchi, H. Higashi, T. Azuma, S. Kondo and M. Hatakeyama (2008). "Deregulation of beta-catenin signal by Helicobacter pylori CagA requires the CagA-multimerization sequence." Int J Cancer **122**(4): 823-831.

Kusters, J. G., A. H. van Vliet and E. J. Kuipers (2006). "Pathogenesis of Helicobacter pylori infection." Clin Microbiol Rev **19**(3): 449-490.

Lamb, A., X. D. Yang, Y. H. Tsang, J. D. Li, H. Higashi, M. Hatakeyama, R. M. Peek, S. R. Blanke and L. F. Chen (2009). "Helicobacter pylori CagA activates NF-kappaB by targeting TAK1 for TRAF6-mediated Lys 63 ubiquitination." EMBO Rep **10**(11): 1242-1249.

Lamkanfi, M. and V. M. Dixit (2012). "Inflammasomes and their roles in health and disease." Annu Rev Cell Dev Biol **28**: 137-161.

Larussa, T., I. Leone, E. Suraci, M. Imeneo and F. Luzzo (2015). "Helicobacter pylori and T Helper Cells: Mechanisms of Immune Escape and Tolerance." J Immunol Res **2015**: 981328.

Lawrence, T. M., A. W. Hudacek, M. R. de Zoete, R. A. Flavell and M. J. Schnell (2013). "Rabies virus is recognized by the NLRP3 inflammasome and activates interleukin-1 β release in murine dendritic cells." J Virol **87**(10): 5848-5857.

Lê, S., J. Josse and F. J. J. o. s. s. Husson (2008). "FactoMineR: an R package for multivariate analysis." **25**(1): 1-18.

Lee, A., M. F. Dixon, S. J. Danon, E. Kuipers, F. Mégraud, H. Larsson and B. Mellgård (1995). "Local acid production and Helicobacter pylori: a unifying hypothesis of gastroduodenal disease." Eur J Gastroenterol Hepatol **7**(5): 461-465.

Lee, K. E., P. N. Khoi, Y. Xia, J. S. Park, Y. E. Joo, K. K. Kim, S. Y. Choi and Y. D. Jung (2013). "Helicobacter pylori and interleukin-8 in gastric cancer." World J Gastroenterol **19**(45): 8192-8202.

Lee, K. H., S. H. Bae, J. L. Lee, M. S. Hyun, S. H. Kim, S. K. Song and H. S. Kim (2004). "Relationship between urokinase-type plasminogen receptor, interleukin-8 gene expression and clinicopathological features in gastric cancer." Oncology **66**(3): 210-217.

Lehmann, F. S., L. Terracciano, I. Carena, C. Baeriswyl, J. Drewe, L. Tornillo, G. De Libero and C. Beglinger (2002). "In situ correlation of cytokine secretion and apoptosis in Helicobacter pylori-associated gastritis." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **283**(2): G481-488.

Lepper, P. M., M. Triantafilou, C. Schumann, E. M. Schneider and K. Triantafilou (2005). "Lipopolysaccharides from Helicobacter pylori can act as antagonists for Toll-like receptor 4." Cell Microbiol **7**(4): 519-528.

Levy, M., C. A. Thaiss, D. Zeevi, L. Dohnalová, G. Zilberman-Schapira, J. A. Mahdi, E. David, A. Savidor, T. Korem, Y. Herzig, M. Pevsner-Fischer, H. Shapiro, A. Christ, A. Harmelin, Z. Halpern, E. Latz, R. A. Flavell, I. Amit, E. Segal and E. Elinav (2015). "Microbiota-Modulated Metabolites Shape the Intestinal Microenvironment by Regulating NLRP6 Inflammasome Signaling." Cell **163**(6): 1428-1443.

Lewis, A. M., S. Varghese, H. Xu and H. R. Alexander (2006). "Interleukin-1 and cancer progression: the emerging role of interleukin-1 receptor antagonist as a novel therapeutic agent in cancer treatment." J Transl Med **4**: 48.

Li, D., H. Yang, J. Ma, S. Luo, S. Chen and Q. Gu (2018). "MicroRNA-30e regulates neuroinflammation in MPTP model of Parkinson's disease by targeting Nlrp3." Hum Cell **31**(2): 106-115.

- Li, Z., D. Zou, X. Ma, J. Chen, X. Shi, Y. Gong, X. Man, L. Gao, Y. Zhao, R. Wang, X. Yan, J. Dent, J. J. Sung, B. Wernersson, S. Johansson, W. Liu and J. He (2010). "Epidemiology of peptic ulcer disease: endoscopic results of the systematic investigation of gastrointestinal disease in China." Am J Gastroenterol **105**(12): 2570-2577.
- Liu, C. C., Z. X. Huang, X. Li, K. F. Shen, M. Liu, H. D. Ouyang, S. B. Zhang, Y. T. Ruan, X. L. Zhang, S. L. Wu, W. J. Xin and C. Ma (2018). "Upregulation of NLRP3 via STAT3-dependent histone acetylation contributes to painful neuropathy induced by bortezomib." Exp Neurol **302**: 104-111.
- Liu, X., Z. Zhang, J. Ruan, Y. Pan, V. G. Magupalli, H. Wu and J. Lieberman (2016). "Inflammasome-activated gasdermin D causes pyroptosis by forming membrane pores." Nature **535**(7610): 153-158.
- Loo, Y. M. and M. Gale, Jr. (2011). "Immune signaling by RIG-I-like receptors." Immunity **34**(5): 680-692.
- Ludlow, L. E., R. W. Johnstone and C. J. Clarke (2005). "The HIN-200 family: more than interferon-inducible genes?" Exp Cell Res **308**(1): 1-17.
- Lupfer, C., A. Malik and T. D. Kanneganti (2015). "Inflammasome control of viral infection." Curr Opin Virol **12**: 38-46.
- Luzza, F., T. Parrello, G. Monteleone, L. Sebkova, M. Romano, R. Zarrilli, M. Imeneo and F. Pallone (2000). "Up-regulation of IL-17 is associated with bioactive IL-8 expression in Helicobacter pylori-infected human gastric mucosa." J Immunol **165**(9): 5332-5337.
- Lytton, S. D., W. Fischer, W. Nagel, R. Haas and F. X. Beck (2005). "Production of ammonium by Helicobacter pylori mediates occludin processing and disruption of tight junctions in Caco-2 cells." Microbiology (Reading) **151**(Pt 10): 3267-3276.
- Ma, X., E. Helgason, Q. T. Phung, C. L. Quan, R. S. Iyer, M. W. Lee, K. K. Bowman, M. A. Starovasnik and E. C. Dueber (2012). "Molecular basis of Tank-binding kinase 1 activation by transautophosphorylation." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(24): 9378-9383.
- Mahr, S., N. Neumayer, M. Gerhard, M. Classen and C. Prinz (2000). "IL-1beta-induced apoptosis in rat gastric enterochromaffin-like cells is mediated by iNOS, NF-kappaB, and Bax protein." Gastroenterology **118**(3): 515-524.
- Mannick, E. E., L. E. Bravo, G. Zarama, J. L. Realpe, X. J. Zhang, B. Ruiz, E. T. Fontham, R. Mera, M. J. Miller and P. Correa (1996). "Inducible nitric oxide synthase, nitrotyrosine, and apoptosis in Helicobacter pylori gastritis: effect of antibiotics and antioxidants." Cancer Res **56**(14): 3238-3243.

Mariathasan, S., D. S. Weiss, K. Newton, J. McBride, K. O'Rourke, M. Roose-Girma, W. P. Lee, Y. Weinrauch, D. M. Monack and V. M. Dixit (2006). "Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP." Nature **440**(7081): 228-232.

Marshall, B. J. and J. R. Warren (1984). "Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration." Lancet **1**(8390): 1311-1315.

Martine, P., A. Chevriaux, V. Derangère, L. Apetoh, C. Garrido, F. Ghiringhelli and C. Rébé (2019). "HSP70 is a negative regulator of NLRP3 inflammasome activation." Cell Death Dis **10**(4): 256.

Martinon, F., K. Burns and J. Tschopp (2002). "The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta." Mol Cell **10**(2): 417-426.

Martinon, F., A. Mayor and J. Tschopp (2009). "The inflammasomes: guardians of the body." Annu Rev Immunol **27**: 229-265.

Martinon, F., V. Pétrilli, A. Mayor, A. Tardivel and J. Tschopp (2006). "Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome." Nature **440**(7081): 237-241.

Martinsen, T. C., R. Fossmark and H. L. Waldum (2019). "The Phylogeny and Biological Function of Gastric Juice-Microbiological Consequences of Removing Gastric Acid." Int J Mol Sci **20**(23).

Masters, S. L., A. Dunne, S. L. Subramanian, R. L. Hull, G. M. Tannahill, F. A. Sharp, C. Becker, L. Franchi, E. Yoshihara, Z. Chen, N. Mullooly, L. A. Mielke, J. Harris, R. C. Coll, K. H. Mills, K. H. Mok, P. Newsholme, G. Nuñez, J. Yodoi, S. E. Kahn, E. C. Lavelle and L. A. O'Neill (2010). "Activation of the NLRP3 inflammasome by islet amyloid polypeptide provides a mechanism for enhanced IL-1 β in type 2 diabetes." Nat Immunol **11**(10): 897-904.

McClain, M. S., A. C. Beckett and T. L. Cover (2017). "Helicobacter pylori Vacuolating Toxin and Gastric Cancer." Toxins (Basel) **9**(10).

McGee, D. J., A. E. George, E. A. Trainor, K. E. Horton, E. Hildebrandt and T. L. Testerman (2011). "Cholesterol enhances Helicobacter pylori resistance to antibiotics and LL-37." Antimicrob Agents Chemother **55**(6): 2897-2904.

Mégraud, F., E. Bessède and C. Varon (2015). "Helicobacter pylori infection and gastric carcinoma." Clin Microbiol Infect **21**(11): 984-990.

Mehto, S., K. K. Jena, P. Nath, S. Chauhan, S. P. Kolapalli, S. K. Das, P. K. Sahoo, A. Jain, G. A. Taylor and S. Chauhan (2019). "The Crohn's Disease Risk Factor IRGM Limits NLRP3 Inflammasome Activation by Impeding Its Assembly and by Mediating Its Selective Autophagy." Mol Cell **73**(3): 429-445.e427.

Menu, P. and J. E. Vince (2011). "The NLRP3 inflammasome in health and disease: the good, the bad and the ugly." Clin Exp Immunol **166**(1): 1-15.

Meyer, F., K. S. Ramanujam, A. P. Gobert, S. P. James and K. T. Wilson (2003). "Cutting edge: cyclooxygenase-2 activation suppresses Th1 polarization in response to *Helicobacter pylori*." *J Immunol* **171**(8): 3913-3917.

Meyer, F., K. T. Wilson and S. P. James (2000). "Modulation of innate cytokine responses by products of *Helicobacter pylori*." *Infect Immun* **68**(11): 6265-6272.

Miao, E. A., C. M. Alpuche-Aranda, M. Dors, A. E. Clark, M. W. Bader, S. I. Miller and A. Aderem (2006). "Cytoplasmic flagellin activates caspase-1 and secretion of interleukin 1beta via Ipaf." *Nat Immunol* **7**(6): 569-575.

Miao, E. A., D. P. Mao, N. Yudkovsky, R. Bonneau, C. G. Lorang, S. E. Warren, I. A. Leaf and A. Aderem (2010). "Innate immune detection of the type III secretion apparatus through the NLRC4 inflammasome." *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(7): 3076-3080.

Michetti, P. and A. M. Svennerholm (2003). "*Helicobacter pylori*- inflammation, immunity and vaccines." *Helicobacter* **8 Suppl 1**: 31-35.

Miljkovic, D. and V. Trajkovic (2004). "Inducible nitric oxide synthase activation by interleukin-17." *Cytokine Growth Factor Rev* **15**(1): 21-32.

Mishra, B. B., V. A. Rathinam, G. W. Martens, A. J. Martinot, H. Kornfeld, K. A. Fitzgerald and C. M. Sasseti (2013). "Nitric oxide controls the immunopathology of tuberculosis by inhibiting NLRP3 inflammasome-dependent processing of IL-1 β ." *Nat Immunol* **14**(1): 52-60.

Mitchell, P. J., B. Afzali, H. Fazekasova, D. Chen, N. Ali, N. Powell, G. M. Lord, R. I. Lechler and G. Lombardi (2012). "*Helicobacter pylori* induces in-vivo expansion of human regulatory T cells through stimulating interleukin-1 β production by dendritic cells." *Clin Exp Immunol* **170**(3): 300-309.

Mitoma, H., S. Hanabuchi, T. Kim, M. Bao, Z. Zhang, N. Sugimoto and Y. J. Liu (2013). "The DHX33 RNA helicase senses cytosolic RNA and activates the NLRP3 inflammasome." *Immunity* **39**(1): 123-135.

Miura, M., N. Ohnishi, S. Tanaka, K. Yanagiya and M. Hatakeyama (2009). "Differential oncogenic potential of geographically distinct *Helicobacter pylori* CagA isoforms in mice." *Int J Cancer* **125**(11): 2497-2504.

Moese, S., M. Selbach, T. Kwok, V. Brinkmann, W. König, T. F. Meyer and S. Backert (2004). "*Helicobacter pylori* induces AGS cell motility and elongation via independent signaling pathways." *Infect Immun* **72**(6): 3646-3649.

Mohammadi, M., J. Nedrud, R. Redline, N. Lycke and S. J. Czinn (1997). "Murine CD4 T-cell response to *Helicobacter* infection: TH1 cells enhance gastritis and TH2 cells reduce bacterial load." *Gastroenterology* **113**(6): 1848-1857.

Moseley, T. A., D. R. Haudenschild, L. Rose and A. H. Reddi (2003). "Interleukin-17 family and IL-17 receptors." *Cytokine Growth Factor Rev* **14**(2): 155-174.

Muñoz-Planillo, R., P. Kuffa, G. Martínez-Colón, B. L. Smith, T. M. Rajendiran and G. Núñez (2013). "K⁺ efflux is the common trigger of NLRP3 inflammasome activation by bacterial toxins and particulate matter." *Immunity* **38**(6): 1142-1153.

Murata-Kamiya, N., Y. Kurashima, Y. Teishikata, Y. Yamahashi, Y. Saito, H. Higashi, H. Aburatani, T. Akiyama, R. M. Peek, Jr., T. Azuma and M. Hatakeyama (2007). "Helicobacter pylori CagA interacts with E-cadherin and deregulates the beta-catenin signal that promotes intestinal transdifferentiation in gastric epithelial cells." *Oncogene* **26**(32): 4617-4626.

Murphy, G., J. Thornton, R. McManus, N. Swan, B. Ryan, D. J. Hughes, C. A. O'Morain and M. O'Sullivan (2009). "Association of gastric disease with polymorphisms in the inflammatory-related genes IL-1B, IL-1RN, IL-10, TNF and TLR4." *Eur J Gastroenterol Hepatol* **21**(6): 630-635.

Muruve, D. A., V. Pétrilli, A. K. Zaiss, L. R. White, S. A. Clark, P. J. Ross, R. J. Parks and J. Tschopp (2008). "The inflammasome recognizes cytosolic microbial and host DNA and triggers an innate immune response." *Nature* **452**(7183): 103-107.

Mutoh, H., S. Sakurai, K. Satoh, H. Osawa, Y. Hakamata, T. Takeuchi and K. Sugano (2004). "Cdx1 induced intestinal metaplasia in the transgenic mouse stomach: comparative study with Cdx2 transgenic mice." *Gut* **53**(10): 1416-1423.

Mutoh, H., S. Sakurai, K. Satoh, K. Tamada, H. Kita, H. Osawa, T. Tomiyama, Y. Sato, H. Yamamoto, N. Isoda, T. Yoshida, K. Ido and K. Sugano (2004). "Development of gastric carcinoma from intestinal metaplasia in Cdx2-transgenic mice." *Cancer Res* **64**(21): 7740-7747.

Nagashima, H., S. Iwatani, M. Cruz, J. A. Jiménez Abreu, L. Tronilo, E. Rodríguez, M. Disla, H. Terao, T. Uchida, V. Mahachai, R. K. Vilaichone, L. Tshering, T. Mitsui, S. Shiota, D. Y. Graham and Y. Yamaoka (2015). "Differences in interleukin 8 expression in Helicobacter pylori-infected gastric mucosa tissues from patients in Bhutan and the Dominican Republic." *Hum Pathol* **46**(1): 129-136.

Nair-Gupta, P., A. Baccarini, N. Tung, F. Seyffer, O. Florey, Y. Huang, M. Banerjee, M. Overholtzer, P. A. Roche, R. Tampé, B. D. Brown, D. Amsen, S. W. Whiteheart and J. M. Blander (2014). "TLR signals induce phagosomal MHC-I delivery from the endosomal recycling compartment to allow cross-presentation." *Cell* **158**(3): 506-521.

Nakayama, T., K. Hirahara, A. Onodera, Y. Endo, H. Hosokawa, K. Shinoda, D. J. Tumes and Y. Okamoto (2017). "Th2 Cells in Health and Disease." *Annu Rev Immunol* **35**: 53-84.

Namavar, F., M. Sparrius, E. C. Veerman, B. J. Appelmelk and C. M. Vandenbroucke-Grauls (1998). "Neutrophil-activating protein mediates adhesion of *Helicobacter pylori* to sulfated carbohydrates on high-molecular-weight salivary mucin." *Infect Immun* **66**(2): 444-447.

Ndjamen, B., B. H. Kang, K. Hatsuzawa and P. E. Kima (2010). "Leishmania parasitophorous vacuoles interact continuously with the host cell's endoplasmic reticulum; parasitophorous vacuoles are hybrid compartments." *Cell Microbiol* **12**(10): 1480-1494.

Necchi, V., P. Sommi, V. Ricci and E. Solcia (2010). "In vivo accumulation of *Helicobacter pylori* products, NOD1, ubiquitinated proteins and proteasome in a novel cytoplasmic structure." *PLoS One* **5**(3): e9716.

Nejati, S., A. Karkhah, H. Darvish, M. Validi, S. Ebrahimpour and H. R. Nouri (2018). "Influence of *Helicobacter pylori* virulence factors CagA and VacA on pathogenesis of gastrointestinal disorders." *Microb Pathog* **117**: 43-48.

Neudecker, V., M. Haneklaus, O. Jensen, L. Khailova, J. C. Masterson, H. Tye, K. Biette, P. Jedlicka, K. S. Brodsky, M. E. Gerich, M. Mack, A. A. B. Robertson, M. A. Cooper, G. T. Furuta, C. A. Dinarello, L. A. O'Neill, H. K. Eltzschig, S. L. Masters and E. N. McNamee (2017). "Myeloid-derived miR-223 regulates intestinal inflammation via repression of the NLRP3 inflammasome." *J Exp Med* **214**(6): 1737-1752.

Nicholson, L. B. (2016). "The immune system." *Essays Biochem* **60**(3): 275-301.

Nunes, P., D. Cornut, V. Bochet, U. Hasler, M. Oh-Hora, J. M. Waldburger and N. Demaurex (2012). "STIM1 juxtaposes ER to phagosomes, generating Ca²⁺ hotspots that boost phagocytosis." *Curr Biol* **22**(21): 1990-1997.

Odenbreit, S., M. Till, D. Hofreuter, G. Faller and R. Haas (1999). "Genetic and functional characterization of the alpAB gene locus essential for the adhesion of *Helicobacter pylori* to human gastric tissue." *Mol Microbiol* **31**(5): 1537-1548.

Oertli, M., M. Sundquist, I. Hitzler, D. B. Engler, I. C. Arnold, S. Reuter, J. Maxeiner, M. Hansson, C. Taube, M. Quiding-Järbrink and A. Müller (2012). "DC-derived IL-18 drives Treg differentiation, murine *Helicobacter pylori*-specific immune tolerance, and asthma protection." *J Clin Invest* **122**(3): 1082-1096.

Oh, J. D., S. M. Karam and J. I. Gordon (2005). "Intracellular *Helicobacter pylori* in gastric epithelial progenitors." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(14): 5186-5191.

Olbermann, P., C. Josenhans, Y. Moodley, M. Uhr, C. Stamer, M. Vauterin, S. Suerbaum, M. Achtman and B. Linz (2010). "A global overview of the genetic and functional diversity in the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island." *PLoS Genet* **6**(8): e1001069.

Orzalli, M. H. and J. C. Kagan (2017). "Apoptosis and Necroptosis as Host Defense Strategies to Prevent Viral Infection." Trends Cell Biol **27**(11): 800-809.

Ostrowski, P. P., S. Grinstein and S. A. Freeman (2016). "Diffusion Barriers, Mechanical Forces, and the Biophysics of Phagocytosis." Dev Cell **38**(2): 135-146.

Otani, K., T. Watanabe, T. Tanigawa, H. Okazaki, H. Yamagami, K. Watanabe, K. Tominaga, Y. Fujiwara, N. Oshitani and T. Arakawa (2009). "Anti-inflammatory effects of IL-17A on Helicobacter pylori-induced gastritis." Biochem Biophys Res Commun **382**(2): 252-258.

Ouyang, W., J. K. Kolls and Y. Zheng (2008). "The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation." Immunity **28**(4): 454-467.

Pachathundikandi, S. K. and S. Backert (2018). "Helicobacter pylori controls NLRP3 expression by regulating hsa-miR-223-3p and IL-10 in cultured and primary human immune cells." Innate Immun **24**(1): 11-23.

Packham, G. and J. L. Cleveland (1997). "Induction of ornithine decarboxylase by IL-3 is mediated by sequential c-Myc-independent and c-Myc-dependent pathways." Oncogene **15**(10): 1219-1232.

Park, H., Z. Li, X. O. Yang, S. H. Chang, R. Nurieva, Y. H. Wang, Y. Wang, L. Hood, Z. Zhu, Q. Tian and C. Dong (2005). "A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17." Nat Immunol **6**(11): 1133-1141.

Parkin, D. M., F. Bray, J. Ferlay and P. Pisani (2005). "Global cancer statistics, 2002." CA Cancer J Clin **55**(2): 74-108.

Parsons, B. N., U. Z. Ijaz, R. D'Amore, M. D. Burkitt, R. Eccles, L. Lenzi, C. A. Duckworth, A. R. Moore, L. Tiszlavicz, A. Varro, N. Hall and D. M. Pritchard (2017). "Comparison of the human gastric microbiota in hypochlorhydric states arising as a result of Helicobacter pylori-induced atrophic gastritis, autoimmune atrophic gastritis and proton pump inhibitor use." PLoS Pathog **13**(11): e1006653.

Peck, B., M. Ortkamp, K. D. Diehl, E. Hundt and B. Knapp (1999). "Conservation, localization and expression of HopZ, a protein involved in adhesion of Helicobacter pylori." Nucleic Acids Res **27**(16): 3325-3333.

Peek, R. M., Jr., C. Fiske and K. T. Wilson (2010). "Role of innate immunity in Helicobacter pylori-induced gastric malignancy." Physiol Rev **90**(3): 831-858.

Pelegrin, P. and A. Surprenant (2007). "Pannexin-1 couples to maitotoxin- and nigericin-induced interleukin-1beta release through a dye uptake-independent pathway." J Biol Chem **282**(4): 2386-2394.

Persson, C., L. Engstrand, O. Nyrén, L. E. Hansson, H. Enroth, A. M. Ekström and W. Ye (2009). "Interleukin 1-beta gene polymorphisms and risk of gastric cancer in Sweden." Scand J Gastroenterol **44**(3): 339-345.

Pétrilli, V., S. Papin, C. Dostert, A. Mayor, F. Martinon and J. Tschopp (2007). "Activation of the NALP3 inflammasome is triggered by low intracellular potassium concentration." Cell Death Differ **14**(9): 1583-1589.

Philpott, D. J. and S. E. Girardin (2010). "Nod-like receptors: sentinels at host membranes." Curr Opin Immunol **22**(4): 428-434.

Piotrowski, J., J. Majka, V. L. Murty, A. Czajkowski, A. Slomiany and B. L. Slomiany (1994). "Inhibition of gastric mucosal mucin receptor by Helicobacter pylori lipopolysaccharide: effect of sulglycotide." Gen Pharmacol **25**(5): 969-976.

Poeck, H., M. Bscheider, O. Gross, K. Finger, S. Roth, M. Rebsamen, N. Hanneschläger, M. Schlee, S. Rothenfusser, W. Barchet, H. Kato, S. Akira, S. Inoue, S. Endres, C. Peschel, G. Hartmann, V. Hornung and J. Ruland (2010). "Recognition of RNA virus by RIG-I results in activation of CARD9 and inflammasome signaling for interleukin 1 beta production." Nat Immunol **11**(1): 63-69.

Poeck, H. and J. Ruland (2012). "From virus to inflammation: mechanisms of RIG-I-induced IL-1 β production." Eur J Cell Biol **91**(1): 59-64.

Prinz, C., N. Neumayer, S. Mahr, M. Classen and W. Schepp (1997). "Functional impairment of rat enterochromaffin-like cells by interleukin 1 beta." Gastroenterology **112**(2): 364-375.

Py, B. F., M. S. Kim, H. Vakifahmetoglu-Norberg and J. Yuan (2013). "Deubiquitination of NLRP3 by BRCC3 critically regulates inflammasome activity." Mol Cell **49**(2): 331-338.

Qu, Y., S. Misaghi, A. Izrael-Tomasevic, K. Newton, L. L. Gilmour, M. Lamkanfi, S. Louie, N. Kayagaki, J. Liu, L. Kömüves, J. E. Cupp, D. Arnott, D. Monack and V. M. Dixit (2012). "Phosphorylation of NLRC4 is critical for inflammasome activation." Nature **490**(7421): 539-542.

Rad, R., A. Dossumbekova, B. Neu, R. Lang, S. Bauer, D. Saur, M. Gerhard and C. Prinz (2004). "Cytokine gene polymorphisms influence mucosal cytokine expression, gastric inflammation, and host specific colonisation during Helicobacter pylori infection." Gut **53**(8): 1082-1089.

Rahimkhani M, M. A. (2019). "An overview of helicobacter pylori and diagnostic methods." International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology **10**(3): 022-034.

Rajan, J. V., D. Rodriguez, E. A. Miao and A. Aderem (2011). "The NLRP3 inflammasome detects encephalomyocarditis virus and vesicular stomatitis virus infection." J Virol **85**(9): 4167-4172.

Ramos, H. J., M. C. Lanteri, G. Blahnik, A. Negash, M. S. Suthar, M. M. Brassil, K. Sodhi, P. M. Treuting, M. P. Busch, P. J. Norris and M. Gale, Jr. (2012). "IL-1 β signaling promotes CNS-intrinsic immune control of West Nile virus infection." PLoS Pathog **8**(11): e1003039.

Rathinam, V. A., Z. Jiang, S. N. Waggoner, S. Sharma, L. E. Cole, L. Waggoner, S. K. Vanaja, B. G. Monks, S. Ganesan, E. Latz, V. Hornung, S. N. Vogel, E. Szomolanyi-Tsuda and K. A. Fitzgerald (2010). "The AIM2 inflammasome is essential for host defense against cytosolic bacteria and DNA viruses." Nat Immunol **11**(5): 395-402.

Rathinam, V. A., S. K. Vanaja, L. Waggoner, A. Sokolovska, C. Becker, L. M. Stuart, J. M. Leong and K. A. Fitzgerald (2012). "TRIF licenses caspase-11-dependent NLRP3 inflammasome activation by gram-negative bacteria." Cell **150**(3): 606-619.

Ratsimandresy, R. A., L. H. Chu, S. Khare, L. de Almeida, A. Gangopadhyay, M. Indramohan, A. V. Misharin, D. R. Greaves, H. Perlman, A. Dorfleutner and C. Stehlik (2017). "The PYRIN domain-only protein POP2 inhibits inflammasome priming and activation." Nat Commun **8**: 15556.

Rech, T. F., L. E. Mazzoleni, F. Mazzoleni, C. F. M. Francesconi, G. B. Sander, R. T. Michita, D. D. Nabinger, T. C. Milbradt, R. J. S. Torresini and D. Simon (2018). "Helicobacter pylori eradication: influence of interleukin-1beta -31 C/T polymorphism." Braz J Infect Dis **22**(4): 311-316.

Reis, C. A., L. David, P. Correa, F. Carneiro, C. de Bolós, E. Garcia, U. Mandel, H. Clausen and M. Sobrinho-Simões (1999). "Intestinal metaplasia of human stomach displays distinct patterns of mucin (MUC1, MUC2, MUC5AC, and MUC6) expression." Cancer Res **59**(5): 1003-1007.

Ren, G., X. Zhang, Y. Xiao, W. Zhang, Y. Wang, W. Ma, X. Wang, P. Song, L. Lai, H. Chen, Y. Zhan, J. Zhang, M. Yu, C. Ge, C. Li, R. Yin and X. Yang (2019). "ABRO1 promotes NLRP3 inflammasome activation through regulation of NLRP3 deubiquitination." Embo j **38**(6).

Ritter, M., O. Gross, S. Kays, J. Ruland, F. Nimmerjahn, S. Saijo, J. Tschopp, L. E. Layland and C. Prazeres da Costa (2010). "Schistosoma mansoni triggers Dectin-2, which activates the Nlrp3 inflammasome and alters adaptive immune responses." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(47): 20459-20464.

Roberts, T. L., A. Idris, J. A. Dunn, G. M. Kelly, C. M. Burnton, S. Hodgson, L. L. Hardy, V. Garceau, M. J. Sweet, I. L. Ross, D. A. Hume and K. J. Stacey (2009). "HIN-200 proteins regulate caspase activation in response to foreign cytoplasmic DNA." Science **323**(5917): 1057-1060.

Robinson, K., R. H. Argent and J. C. Atherton (2007). "The inflammatory and immune response to Helicobacter pylori infection." Best Pract Res Clin Gastroenterol **21**(2): 237-259.

Rosenstiel, P., S. Hellmig, J. Hampe, S. Ott, A. Till, W. Fischbach, H. Sahly, R. Lucius, U. R. Fölsch, D. Philpott and S. Schreiber (2006). "Influence of polymorphisms in the NOD1/CARD4 and NOD2/CARD15 genes on the clinical outcome of Helicobacter pylori infection." Cell Microbiol **8**(7): 1188-1198.

Rossi, A. F., A. C. Cadamuro, J. M. Biselli-Périco, K. R. Leite, F. E. Severino, P. P. Reis, J. A. Cordeiro and A. E. Silva (2016). "Interaction between inflammatory mediators and miRNAs in *Helicobacter pylori* infection." Cell Microbiol **18**(10): 1444-1458.

Rugge, M. and R. M. Genta (2005). "Staging and grading of chronic gastritis." Hum Pathol **36**(3): 228-233.

Saadat, I., H. Higashi, C. Obuse, M. Umeda, N. Murata-Kamiya, Y. Saito, H. Lu, N. Ohnishi, T. Azuma, A. Suzuki, S. Ohno and M. Hatakeyama (2007). "Helicobacter pylori CagA targets PAR1/MARK kinase to disrupt epithelial cell polarity." Nature **447**(7142): 330-333.

Sagaert, X., E. Van Cutsem, G. De Hertogh, K. Geboes and T. Tousseyn (2010). "Gastric MALT lymphoma: a model of chronic inflammation-induced tumor development." Nat Rev Gastroenterol Hepatol **7**(6): 336-346.

Sakaguchi, S., M. Miyara, C. M. Costantino and D. A. Hafler (2010). "FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system." Nat Rev Immunol **10**(7): 490-500.

Salar, A. (2019). "Gastric MALT lymphoma and *Helicobacter pylori*." Med Clin (Barc) **152**(2): 65-71.

Saldinger, P. F., N. Porta, P. Launois, J. A. Louis, G. A. Waanders, H. Bouzouréne, P. Michetti, A. L. Blum and I. E. Corthésy-Theulaz (1998). "Immunization of BALB/c mice with *Helicobacter urease B* induces a T helper 2 response absent in *Helicobacter* infection." Gastroenterology **115**(4): 891-897.

Salimuddin, A. Nagasaki, T. Gotoh, H. Isobe and M. Mori (1999). "Regulation of the genes for arginase isoforms and related enzymes in mouse macrophages by lipopolysaccharide." Am J Physiol **277**(1): E110-117.

Samir, P., S. Kesavardhana, D. M. Patmore, S. Gingras, R. K. S. Malireddi, R. Karki, C. S. Guy, B. Briard, D. E. Place, A. Bhattacharya, B. R. Sharma, A. Nourse, S. V. King, A. Pitre, A. R. Burton, S. Pelletier, R. J. Gilbertson and T. D. Kanneganti (2019). "DDX3X acts as a live-or-die checkpoint in stressed cells by regulating NLRP3 inflammasome." Nature **573**(7775): 590-594.

Schattgen, S. A. and K. A. Fitzgerald (2011). "The PYHIN protein family as mediators of host defenses." Immunol Rev **243**(1): 109-118.

Schepp, W., K. Dehne, H. Herrmuth, K. Pfeffer and C. Prinz (1998). "Identification and functional importance of IL-1 receptors on rat parietal cells." Am J Physiol **275**(5): G1094-1105.

Schroder, K. and J. Tschopp (2010). "The inflammasomes." Cell **140**(6): 821-832.

Schubert, M. L. and D. A. Peura (2008). "Control of gastric acid secretion in health and disease." Gastroenterology **134**(7): 1842-1860.

Segovia, M., S. Russo, M. Jeldres, Y. D. Mahmoud, V. Perez, M. Duhalde, P. Charnet, M. Rousset, S. Victoria, F. Veigas, C. Louvet, B. Vanhove, R. A. Floto, I. Anegón, M. C. Cuturi, M. R. Girotti, G. A. Rabinovich and M. Hill (2019). "Targeting TMEM176B Enhances Antitumor Immunity and Augments the Efficacy of Immune Checkpoint Blockers by Unleashing Inflammasome Activation." Cancer Cell **35**(5): 767-781.e766.

Semino-Mora, C., S. Q. Doi, A. Marty, V. Simko, I. Carlstedt and A. Dubois (2003). "Intracellular and interstitial expression of *Helicobacter pylori* virulence genes in gastric precancerous intestinal metaplasia and adenocarcinoma." J Infect Dis **187**(8): 1165-1177.

Semper, R. P., R. Mejías-Luque, C. Groß, F. Anderl, A. Müller, M. Vieth, D. H. Busch, C. Prazeres da Costa, J. Ruland, O. Groß and M. Gerhard (2014). "Helicobacter pylori-induced IL-1 β secretion in innate immune cells is regulated by the NLRP3 inflammasome and requires the cag pathogenicity island." J Immunol **193**(7): 3566-3576.

Seregin, S. S., N. Golovchenko, B. Schaf, J. Chen, K. A. Eaton and G. Y. Chen (2017). "NLRP6 function in inflammatory monocytes reduces susceptibility to chemically induced intestinal injury." Mucosal Immunol **10**(2): 434-445.

Serelli-Lee, V., K. L. Ling, C. Ho, L. H. Yeong, G. K. Lim, B. Ho and S. B. Wong (2012). "Persistent *Helicobacter pylori* specific Th17 responses in patients with past H. pylori infection are associated with elevated gastric mucosal IL-1 β ." PLoS One **7**(6): e39199.

Serrano, C., S. W. Wright, D. Bimczok, C. L. Shaffer, T. L. Cover, A. Venegas, M. G. Salazar, L. E. Smythies, P. R. Harris and P. D. Smith (2013). "Downregulated Th17 responses are associated with reduced gastritis in *Helicobacter pylori*-infected children." Mucosal Immunol **6**(5): 950-959.

Sharma, S. A., M. K. Tummuru, M. J. Blaser and L. D. Kerr (1998). "Activation of IL-8 gene expression by *Helicobacter pylori* is regulated by transcription factor nuclear factor-kappa B in gastric epithelial cells." J Immunol **160**(5): 2401-2407.

Shi, Y., X. F. Liu, Y. Zhuang, J. Y. Zhang, T. Liu, Z. Yin, C. Wu, X. H. Mao, K. R. Jia, F. J. Wang, H. Guo, R. A. Flavell, Z. Zhao, K. Y. Liu, B. Xiao, Y. Guo, W. J. Zhang, W. Y. Zhou, G. Guo and Q. M. Zou (2010). "Helicobacter pylori-induced Th17 responses modulate Th1 cell responses, benefit bacterial growth, and contribute to pathology in mice." J Immunol **184**(9): 5121-5129.

Shibata, R., S. Ueda, S. Yamagishi, Y. Kaida, Y. Matsumoto, K. Fukami, A. Hayashida, H. Matsuoka, S. Kato, M. Kimoto and S. Okuda (2009). "Involvement of asymmetric dimethylarginine (ADMA) in tubulointerstitial ischaemia in the early phase of diabetic nephropathy." Nephrol Dial Transplant **24**(4): 1162-1169.

Shigematsu, Y., T. Niwa, E. Rehnberg, T. Toyoda, S. Yoshida, A. Mori, M. Wakabayashi, Y. Iwakura, M. Ichinose, Y. J. Kim and T. Ushijima (2013). "Interleukin-1 β induced by Helicobacter pylori infection enhances mouse gastric carcinogenesis." Cancer Lett **340**(1): 141-147.

Shimada, M., T. Ando, R. M. Peek, O. Watanabe, K. Ishiguro, O. Maeda, D. Ishikawa, M. Hasegawa, K. Ina, N. Ohmiya, Y. Niwa and H. Goto (2008). "Helicobacter pylori infection upregulates interleukin-18 production from gastric epithelial cells." Eur J Gastroenterol Hepatol **20**(12): 1144-1150.

Shimada, T. and A. Terano (1998). "Chemokine expression in Helicobacter pylori-infected gastric mucosa." J Gastroenterol **33**(5): 613-617.

Shiomi, S., A. Toriie, S. Imamura, H. Konishi, S. Mitsufuji, Y. Iwakura, Y. Yamaoka, H. Ota, T. Yamamoto, J. Imanishi and M. Kita (2008). "IL-17 is involved in Helicobacter pylori-induced gastric inflammatory responses in a mouse model." Helicobacter **13**(6): 518-524.

Siavoshi, F., R. Malekzadeh, M. Daneshmand and H. Ashktorab (2005). "Helicobacter pylori endemic and gastric disease." Dig Dis Sci **50**(11): 2075-2080.

Smith, M. F., Jr., A. Mitchell, G. Li, S. Ding, A. M. Fitzmaurice, K. Ryan, S. Crowe and J. B. Goldberg (2003). "Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR5, but not TLR4, are required for Helicobacter pylori-induced NF-kappa B activation and chemokine expression by epithelial cells." J Biol Chem **278**(35): 32552-32560.

Song, H., B. Liu, W. Huai, Z. Yu, W. Wang, J. Zhao, L. Han, G. Jiang, L. Zhang, C. Gao and W. Zhao (2016). "The E3 ubiquitin ligase TRIM31 attenuates NLRP3 inflammasome activation by promoting proteasomal degradation of NLRP3." Nat Commun **7**: 13727.

Song, N., Z. S. Liu, W. Xue, Z. F. Bai, Q. Y. Wang, J. Dai, X. Liu, Y. J. Huang, H. Cai, X. Y. Zhan, Q. Y. Han, H. Wang, Y. Chen, H. Y. Li, A. L. Li, X. M. Zhang, T. Zhou and T. Li (2017). "NLRP3 Phosphorylation Is an Essential Priming Event for Inflammasome Activation." Mol Cell **68**(1): 185-197.e186.

Spalinger, M. R., S. Kasper, C. Gottier, S. Lang, K. Atrott, S. R. Vavricka, S. Scharl, T. Raselli, I. Frey-Wagner, P. M. Gutte, M. G. Grütter, H. D. Beer, E. Contassot, A. C. Chan, X. Dai, D. J. Rawlings, F. Mair, B. Becher, W. Falk, M. Fried, G. Rogler and M. Scharl (2016). "NLRP3 tyrosine phosphorylation is controlled by protein tyrosine phosphatase PTPN22." J Clin Invest **126**(5): 1783-1800.

Strober, W., P. J. Murray, A. Kitani and T. Watanabe (2006). "Signalling pathways and molecular interactions of NOD1 and NOD2." Nat Rev Immunol **6**(1): 9-20.

Stutz, A., C. C. Kolbe, R. Stahl, G. L. Horvath, B. S. Franklin, O. van Ray, R. Brinkschulte, M. Geyer, F. Meissner and E. Latz (2017). "NLRP3 inflammasome assembly is regulated by phosphorylation of the pyrin domain." J Exp Med **214**(6): 1725-1736.

Su, B., P. J. Ceponis, S. Lebel, H. Huynh and P. M. Sherman (2003). "Helicobacter pylori activates Toll-like receptor 4 expression in gastrointestinal epithelial cells." Infect Immun **71**(6): 3496-3502.

Suerbaum, S. and P. Michetti (2002). "Helicobacter pylori infection." N Engl J Med **347**(15): 1175-1186.

Sugimoto, M., T. Furuta, N. Shirai, A. Nakamura, F. Xiao, M. Kajimura, H. Sugimura and A. Hishida (2007). "Different effects of polymorphisms of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta on development of peptic ulcer and gastric cancer." J Gastroenterol Hepatol **22**(1): 51-59.

Sugiyama, T. and M. Asaka (2004). "Helicobacter pylori infection and gastric cancer." Med Electron Microsc **37**(3): 149-157.

Suzuki, H., T. Nishizawa, K. Tsuchimoto and T. Hibi (2005). "[Helicobacter pylori infected gastric mucosa--inflammation, atrophy and carcinogenesis]." Nihon Saikingaku Zasshi **60**(3): 453-457.

Swanson, K. V., M. Deng and J. P. Ting (2019). "The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics." Nat Rev Immunol **19**(8): 477-489.

Takeuchi, O. and S. Akira (2001). "Toll-like receptors; their physiological role and signal transduction system." Int Immunopharmacol **1**(4): 625-635.

Takeuchi, O. and S. Akira (2010). "Pattern recognition receptors and inflammation." Cell **140**(6): 805-820.

Tang, T., T. Gong, W. Jiang and R. Zhou (2018). "GPCRs in NLRP3 Inflammasome Activation, Regulation, and Therapeutics." Trends Pharmacol Sci **39**(9): 798-811.

Toyoda, T., T. Tsukamoto, S. Takasu, L. Shi, N. Hirano, H. Ban, T. Kumagai and M. Tatematsu (2009). "Anti-inflammatory effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE), a nuclear factor-kappaB inhibitor, on Helicobacter pylori-induced gastritis in Mongolian gerbils." Int J Cancer **125**(8): 1786-1795.

Triantafilou, M., F. G. Gamper, P. M. Lepper, M. A. Mouratis, C. Schumann, E. Harokopakis, R. E. Schifferle, G. Hajishengallis and K. Triantafilou (2007). "Lipopolysaccharides from atherosclerosis-associated bacteria antagonize TLR4, induce formation of TLR2/1/CD36 complexes in lipid rafts and trigger TLR2-induced inflammatory responses in human vascular endothelial cells." Cell Microbiol **9**(8): 2030-2039.

Tricottet, V., P. Bruneval, O. Vire, J. P. Camilleri, F. Bloch, N. Bonte and J. Roge (1986). "Campylobacter-like organisms and surface epithelium abnormalities in active, chronic gastritis in humans: an ultrastructural study." Ultrastruct Pathol **10**(2): 113-122.

Tsutsumi, R., H. Higashi, M. Higuchi, M. Okada and M. Hatakeyama (2003). "Attenuation of *Helicobacter pylori* CagA x SHP-2 signaling by interaction between CagA and C-terminal Src kinase." J Biol Chem **278**(6): 3664-3670.

Ulland, T. K., A. M. Janowski, B. W. Buchan, M. Faron, S. L. Cassel, B. D. Jones and F. S. Sutterwala (2013). "Francisella tularensis live vaccine strain folate metabolism and pseudouridine synthase gene mutants modulate macrophage caspase-1 activation." Infect Immun **81**(1): 201-208.

Umeda, M., N. Murata-Kamiya, Y. Saito, Y. Ohba, M. Takahashi and M. Hatakeyama (2009). "Helicobacter pylori CagA causes mitotic impairment and induces chromosomal instability." J Biol Chem **284**(33): 22166-22172.

Uno, K., K. Kato, T. Atsumi, T. Suzuki, J. Yoshitake, H. Morita, S. Ohara, Y. Kotake, T. Shimosegawa and T. Yoshimura (2007). "Toll-like receptor (TLR) 2 induced through TLR4 signaling initiated by *Helicobacter pylori* cooperatively amplifies iNOS induction in gastric epithelial cells." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **293**(5): G1004-1012.

Upton, J. W., M. Shubina and S. Balachandran (2017). "RIPK3-driven cell death during virus infections." Immunol Rev **277**(1): 90-101.

van Den Brink, G. R., F. J. ten Kate, C. Y. Ponsioen, M. M. Rive, G. N. Tytgat, S. J. van Deventer and M. P. Peppelenbosch (2000). "Expression and activation of NF-kappa B in the antrum of the human stomach." J Immunol **164**(6): 3353-3359.

van Lookeren Campagne, M., C. Wiesmann and E. J. Brown (2007). "Macrophage complement receptors and pathogen clearance." Cell Microbiol **9**(9): 2095-2102.

Vashi, N., S. B. Andrabi, S. Ghanwat, M. Suar and D. Kumar (2017). "Ca(2+)-dependent Focal Exocytosis of Golgi-derived Vesicles Helps Phagocytic Uptake in Macrophages." J Biol Chem **292**(13): 5144-5165.

Viala, J., C. Chaput, I. G. Boneca, A. Cardona, S. E. Girardin, A. P. Moran, R. Athman, S. Mémet, M. R. Huerre, A. J. Coyle, P. S. DiStefano, P. J. Sansonetti, A. Labigne, J. Bertin, D. J. Philpott and R. L. Ferrero (2004). "Nod1 responds to peptidoglycan delivered by the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island." Nat Immunol **5**(11): 1166-1174.

Vilaichone, R. K., V. Mahachai, S. Tumwasorn, J. Y. Wu, D. Y. Graham and Y. Yamaoka (2005). "Gastric mucosal cytokine levels in relation to host interleukin-1 polymorphisms and *Helicobacter pylori* cagA genotype." Scand J Gastroenterol **40**(5): 530-539.

Wähe, A., B. Kasmajpour, C. Schmaderer, D. Liebl, K. Sandhoff, A. Nykjaer, G. Griffiths and M. G. Gutierrez (2010). "Golgi-to-phagosome transport of acid sphingomyelinase and prosaposin is mediated by sortilin." J Cell Sci **123**(Pt 14): 2502-2511.

Waldum, H. L., P. M. Kleveland and F. Sørdal Ø (2016). "Helicobacter pylori and gastric acid: an intimate and reciprocal relationship." Therap Adv Gastroenterol **9**(6): 836-844.

Wang, H. J., W. C. Cheng, H. H. Cheng, C. H. Lai and W. C. Wang (2012). "Helicobacter pylori cholesteryl glucosides interfere with host membrane phase and affect type IV secretion system function during infection in AGS cells." Mol Microbiol **83**(1): 67-84.

Wang, X., W. Jiang, Y. Yan, T. Gong, J. Han, Z. Tian and R. Zhou (2014). "RNA viruses promote activation of the NLRP3 inflammasome through a RIP1-RIP3-DRP1 signaling pathway." Nat Immunol **15**(12): 1126-1133.

Waskito, L. A., N. R. Salama and Y. Yamaoka (2018). "Pathogenesis of Helicobacter pylori infection." Helicobacter **23 Suppl 1**: e12516.

Watanabe, T., N. Asano, S. Fichtner-Feigl, P. L. Gorelick, Y. Tsuji, Y. Matsumoto, T. Chiba, I. J. Fuss, A. Kitani and W. Strober (2010). "NOD1 contributes to mouse host defense against Helicobacter pylori via induction of type I IFN and activation of the ISGF3 signaling pathway." J Clin Invest **120**(5): 1645-1662.

Watanabe, T., N. Asano, M. Kudo and W. Strober (2017). "Nucleotide-binding oligomerization domain 1 and gastrointestinal disorders." Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci **93**(8): 578-599.

Wei, M., L. Wang, T. Wu, J. Xi, Y. Han, X. Yang, D. Zhang, Q. Fang and B. Tang (2016). "NLRP3 Activation Was Regulated by DNA Methylation Modification during Mycobacterium tuberculosis Infection." Biomed Res Int **2016**: 4323281.

Wickham, H. (2016). ggplot2: elegant graphics for data analysis, springer.

Wiedemann, T., E. Loell, S. Mueller, M. Stoeckelhuber, M. Stolte, R. Haas and G. Rieder (2009). "Helicobacter pylori cag-Pathogenicity island-dependent early immunological response triggers later precancerous gastric changes in Mongolian gerbils." PLoS One **4**(3): e4754.

Wilson, K. T. and J. E. Crabtree (2007). "Immunology of Helicobacter pylori: insights into the failure of the immune response and perspectives on vaccine studies." Gastroenterology **133**(1): 288-308.

Wilson, K. T., K. S. Ramanujam, H. L. Mobley, R. F. Musselman, S. P. James and S. J. Meltzer (1996). "Helicobacter pylori stimulates inducible nitric oxide synthase expression and activity in a murine macrophage cell line." Gastroenterology **111**(6): 1524-1533.

Wlodarska, M., C. A. Thaiss, R. Nowarski, J. Henao-Mejia, J. P. Zhang, E. M. Brown, G. Frankel, M. Levy, M. N. Katz, W. M. Philbrick, E. Elinav, B. B. Finlay and R. A. Flavell (2014). "NLRP6 inflammasome orchestrates the colonic host-microbial interface by regulating goblet cell mucus secretion." Cell **156**(5): 1045-1059.

Wroblewski, L. E., R. M. Peek, Jr. and K. T. Wilson (2010). "Helicobacter pylori and gastric cancer: factors that modulate disease risk." Clin Microbiol Rev **23**(4): 713-739.

Wu, M. F., S. T. Chen, A. H. Yang, W. W. Lin, Y. L. Lin, N. J. Chen, I. S. Tsai, L. Li and S. L. Hsieh (2013). "CLEC5A is critical for dengue virus-induced inflammasome activation in human macrophages." Blood **121**(1): 95-106.

Wynn, T. A., A. Chawla and J. W. Pollard (2013). "Macrophage biology in development, homeostasis and disease." Nature **496**(7446): 445-455.

Yamada, S., S. Kato, T. Matsuhisa, L. Makonkawkeyoon, M. Yoshida, T. Chakrabandhu, N. Lertprasertsuk, P. Suttharat, B. Chakrabandhu, S. Nishiumi, W. Chongraksut and T. Azuma (2013). "Predominant mucosal IL-8 mRNA expression in non-cagA Thais is risk for gastric cancer." World J Gastroenterol **19**(19): 2941-2949.

Yan, Y., W. Jiang, L. Liu, X. Wang, C. Ding, Z. Tian and R. Zhou (2015). "Dopamine controls systemic inflammation through inhibition of NLRP3 inflammasome." Cell **160**(1-2): 62-73.

Yang, C. S., J. J. Kim, T. S. Kim, P. Y. Lee, S. Y. Kim, H. M. Lee, D. M. Shin, L. T. Nguyen, M. S. Lee, H. S. Jin, K. K. Kim, C. H. Lee, M. H. Kim, S. G. Park, J. M. Kim, H. S. Choi and E. K. Jo (2015). "Small heterodimer partner interacts with NLRP3 and negatively regulates activation of the NLRP3 inflammasome." Nat Commun **6**: 6115.

Yang, J. C., H. C. Yang, C. T. Shun, T. H. Wang, C. T. Chien and J. Y. Kao (2013). "Catechins and Sialic Acid Attenuate Helicobacter pylori-Triggered Epithelial Caspase-1 Activity and Eradicate Helicobacter pylori Infection." Evid Based Complement Alternat Med **2013**: 248585.

Yasumoto, K., S. Okamoto, N. Mukaida, S. Murakami, M. Mai and K. Matsushima (1992). "Tumor necrosis factor alpha and interferon gamma synergistically induce interleukin 8 production in a human gastric cancer cell line through acting concurrently on AP-1 and NF-kB-like binding sites of the interleukin 8 gene." J Biol Chem **267**(31): 22506-22511.

Ye, G., C. Barrera, X. Fan, W. K. Gourley, S. E. Crowe, P. B. Ernst and V. E. Reyes (1997). "Expression of B7-1 and B7-2 costimulatory molecules by human gastric epithelial cells: potential role in CD4+ T cell activation during Helicobacter pylori infection." J Clin Invest **99**(7): 1628-1636.

Youm, Y. H., K. Y. Nguyen, R. W. Grant, E. L. Goldberg, M. Bodogai, D. Kim, D. D'Agostino, N. Planavsky, C. Lupfer, T. D. Kanneganti, S. Kang, T. L. Horvath, T. M. Fahmy, P. A. Crawford, A. Biragyn, E. Alnemri and V. D. Dixit (2015). "The ketone metabolite β -hydroxybutyrate blocks NLRP3 inflammasome-mediated inflammatory disease." Nat Med **21**(3): 263-269.

Zamboni, D. S., K. S. Kobayashi, T. Kohlsdorf, Y. Ogura, E. M. Long, R. E. Vance, K. Kuida, S. Mariathasan, V. M. Dixit, R. A. Flavell, W. F. Dietrich and C. R. Roy (2006). "The Birc1e cytosolic pattern-recognition receptor contributes to the detection and control of Legionella pneumophila infection." Nat Immunol **7**(3): 318-325.

- Zhang, C., N. Yamada, Y. L. Wu, M. Wen, T. Matsuhisa and N. Matsukura (2005). "Comparison of *Helicobacter pylori* infection and gastric mucosal histological features of gastric ulcer patients with chronic gastritis patients." World J Gastroenterol **11**(7): 976-981.
- Zhang, M., M. Liu, J. Luther and J. Y. Kao (2010). "Helicobacter pylori directs tolerogenic programming of dendritic cells." Gut Microbes **1**(5): 325-329.
- Zhang, P., L. Cao, R. Zhou, X. Yang and M. Wu (2019). "The lncRNA Neat1 promotes activation of inflammasomes in macrophages." Nat Commun **10**(1): 1495.
- Zhang, Z., G. Meszaros, W. T. He, Y. Xu, H. de Fatima Magliarelli, L. Mailly, M. Mihlan, Y. Liu, M. Puig Gámez, A. Goginashvili, A. Pasquier, O. Bielska, B. Neven, P. Quartier, R. Aebersold, T. F. Baumert, P. Georgel, J. Han and R. Ricci (2017). "Protein kinase D at the Golgi controls NLRP3 inflammasome activation." J Exp Med **214**(9): 2671-2693.
- Zhao, Y., J. Yang, J. Shi, Y. N. Gong, Q. Lu, H. Xu, L. Liu and F. Shao (2011). "The NLRC4 inflammasome receptors for bacterial flagellin and type III secretion apparatus." Nature **477**(7366): 596-600.
- Zheng, D., T. Liwinski and E. Elinav (2020). "Inflammasome activation and regulation: toward a better understanding of complex mechanisms." Cell Discov **6**: 36.
- Zheng, P. Y. and N. L. Jones (2003). "Helicobacter pylori strains expressing the vacuolating cytotoxin interrupt phagosome maturation in macrophages by recruiting and retaining TACO (coronin 1) protein." Cell Microbiol **5**(1): 25-40.
- Zhou, Y., M. Lu, R. H. Du, C. Qiao, C. Y. Jiang, K. Z. Zhang, J. H. Ding and G. Hu (2016). "MicroRNA-7 targets Nod-like receptor protein 3 inflammasome to modulate neuroinflammation in the pathogenesis of Parkinson's disease." Mol Neurodegener **11**: 28.
- Zhu, J., H. Yamane and W. E. Paul (2010). "Differentiation of effector CD4 T cell populations (*)." Annu Rev Immunol **28**: 445-489.

ANNEXES

Annexe 1

Corrélation entre polymorphisme et expression des cytokines et les lésions histologiques au cours de l'infection chronique à *Helicobacter pylori*

- ✓ Facteur d'exclusion : TTT d'éradication d'Hp oui non
- ✓ Identité : _____ N° télé : _____
- ✓ Age : _____ sexe : _____ IMC= _____ NA= _____
- ✓ Origine : urbaine rurale
- ✓ Profession : _____ Ramed : oui non
- ✓ Accès à l'eau potable : oui non
- ✓ Nombre de personne vivant sous le même toit : _____
-
- ✓ Niveau d'étude : illettré primaire secondaire universitaire
- ✓ Tabac : non tabagique ex tabagique tabagique chronique
- ✓ Prise médicamenteuse : AINS Aspirine IPP
- ATB (à préciser) : _____ non
- ✓ Délai de prise par rapport à la FOGD : _____
- ✓ ATCD de néoplasie familiale : gastrique : oui non
Autres (à préciser) : _____

✓ Consommation excessive de sel (salaison, charcuterie, saucisse, olives, khlii...):

oui non

✓ Consommation de fruits et légumes (quantité en g/j ou nombre de fruit et légume /jour) :

✓ Indication de la FOGD :

- Epigastralgies : RGO : hémorragie digestive
- Bilan d'anémie dyspepsie vomissements
- Autres :

✓ Résultats de la FOGD :

- Gastrite : érythémateus. micronodulaire érosive atrophique
- Tumeur gastrique : corps antre cardia
- Ulcère : duodénale gastrique
- Autres :

✓ Histologie :

- Statut Hp : positif nombre de x négatif
- Gastrite : minime modérée sévère
Active : minime modérée sévère
Non active
Atrophique : minime modérée sévère
Non atrophique
- Métaplasie intestinale : oui non
- Dysplasie : oui non
- Infiltrat inflammatoire :

Sérologie Hp : positive négative non faite

Annexe 2

Information pour le malade et recueil du consentement

Je, soussigné,

Nom et prénom du patient :

Ai été reçu en consultation au service de gastro-entérologie du CHU Ibn Rochd de Casablanca pour l'examen clinique de pathologies gastriques.

J'ai bénéficié d'un examen clinique et fait l'objet d'un prélèvement de biopsies gastriques qui permettra de confirmer ou d'infirmer le diagnostic d'*Helicobacter pylori*.

En outre, l'équipe médicale a demandé mon accord pour procéder à un prélèvement sanguin (6 ml) pour des tests spécialisés complémentaires, dans le cadre de leur projet de recherche.

Suite à quoi, j'accepte de participer librement à cette étude, sans aucune contrainte, et mes droits ne seront en aucun cas affectés en signant le présent formulaire de consentement. Je sais que je peux interrompre cette participation à tout moment. Les informations médicales recueillies par les chercheurs seront traitées confidentiellement.

Fait à Casablanca le :/...../.....

Signature :

En cas d'impossibilité d'obtention de la signature du patient lui-même, nous, soussignés, confirmons avoir expliqué la nature et le but de cette étude au susnommé, et avoir obtenu son consentement verbal.

Le chercheur :.....

Signature :.....

Le témoin :.....

Signature :.....

استمارة خاصة بالمريض لأخذ موافقته

أنا الموقع أسفله

اسم ونسب المريض

أعلن موافقتي على الانخراط بكل حرية في هذا البحث وبدون أي قيد أو شرط، وأعلم أن حقوقي في المتابعة والعلاج ليست مرتبطة بتوقيعي على هذه الموافقة. كما أعلم أنه يمكنني الانسحاب من هذا البحث بكل حرية وفي أي وقت دون الحاجة لتبرير قراري.

حرر في البيضاء

إمضاء:

بتاريخ:/...../.....

في حالة عجز المريض عن التوقيع شخصياً، نشهد نحن الموقعون أسفله، أننا قمنا بتوضيح طبيعة وهدف هذا البحث للمعني بالأمر، وأعطانا موافقته الشفهية.

الإمضاء:

الباحث:

الإمضاء:

الشاهد:

معلومات خاصة بالمريض قبل أخذ موافقته

عند استقبالي لفحص مرضي، بمصلحة الأمراض الجهاز الهضمي التابع للمركز الاستشفائي ابن رشد بالدار البيضاء، سوف أستفيد من تشخيص طبي معمق واخذ عينات نسيجية للتأكد من صحة اصابتي ببكتيريا الملوية البوابية.

إضافة الى هذا، يود الفريق الطبي أخذ عينات من الدم (6 مل) لإجراء تحليلات متخصصة والتي تدخل في نطاق مشروع البحث العلمي.

بنأ على هذا أعلن موافقتي على الانخراط بكل حرية في هذا البحث، وبدون قيد أو شرط، وأعلم أن حقوقي في المتابعة والعلاج ليست مرتبطة بتوقيعي على هذه الموافقة. كما أعلم أنه يمكنني الانسحاب من هذا البحث بكل حرية وفي أي وقت دون الحاجة لتبرير قراري.

المعطيات الطبية الخاصة بي والمستخلصة من طرف الباحثين سيتم تحليلها وتشخيصها بكل سرية وبشكل يضمن عدم كشف هويتي.

Annexe 3 :

Les anticorps primaires utilisés pour l'immunoempreinte sont dans le tableau suivant :

Anticorps	Espèces / Isotype	Dilution	Compagnie	Application
Anti-caspase-1	IgG1 de souris	1/2000	Adipogen	WB
Anti-NLRP3	IgG2b de souris	1/1000	Adipogen	WB
Anti-IL-1 β	Chèvre	1/1000	R&D systems,	WB
Anti-GAPDH	Lapin	1/20000	Sigma-Aldrich	WB
Anti-IRF3	Lapin	1/2000	Cell Signaling	WB
Anti-phospho-IRF3	Lapin	1/2000	Cell Signaling	WB
Anti-MAVS	Lapin	1/1000	Cell Signaling	WB
Anti-phospho-STAT1	Lapin	1/1000	Cell Signaling	WB
Anti-STAT1	Lapin	1/3000	Cell Signaling	WB
Anti-caspase-3	Lapin	1/1000	Cell Signaling	WB
Anti-DDX33	IgG1 de souris	1/1000	Santa Cruz	WB
Anti-MLKL	Lapin	1/1000	Abcam	WB
Anti-MLKL	Lapin	1/2000	Cell Signaling	WB
Anti-phospho-DRP1	Lapin	1/1000	Cell Signaling	WB
Anti-DRP1	IgG1 de souris	1/2000	BD Biosciences	WB
Anti-RIPK1	Lapin	1/2000	Cell Signaling	WB
Anti-Gasdermin D	Cobaye	1/1000	Adipogen	WB

Annexe 4 :

Anticorps	Compagnie
Anti-Rb	Jackson IR
Anti-Ms IgG1	Jackson IR
Anti-Goat	Cell Signaling
Anti-Cobaye	Invitrogen
Anti-Ms IgG2b	Invitrogen
Anti-Ms total	SouthernBiotech

Annexe 5 : siRNA :

Nom	siRNA
DRP1	A : GGAAUAAUUGGAGUAGUUAdTdT B : CUGUCAAUUUGCUAGAUGUdTdT
DDX33	A : GCAAGAAUAUGCUGCUAGUdTdT B : CCCAAAUGUGCUCACCUUdTdT
RIPK1	A : CACAAUCCUUUCUUACACAdTdT B : GGAAGAUUUGUGAGCGGAdTdT
NLRP3	A : GAUCAACCUCUCUACCAGAdTdT B : GUGUUGUCAGGAUCUCGCAdTdT
GSDMD	A : GAUUGAUGAGGAGGAAUAdTdT B : CUGCUUAUUGGCUCUAAAUdTdT

Titre : Exploration des cytokines pro-inflammatoires et de l'inflammasome NLRP3 dans les infections intracellulaires : cas de *H. pylori* et des virus à ARN.

Mots clés : *Helicobacter pylori*, inflammation, inflammasome NLRP3, IL-1 β , virus à ARN.

Résumé : *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) est une bactérie qui infecte l'estomac et induit une gastrite inflammatoire, qui peut être chronique et évoluer vers un cancer gastrique. La sévérité de l'infection et son évolution clinique sont associées aux différents facteurs notamment le statut immunitaire de l'hôte. La réponse inflammatoire à l'infection entraîne la sécrétion d'une panoplie de cytokines (l'interleukine-1 β (IL-1 β), l'IL-8 et l'IL-17A) qui jouent un rôle clé dans l'initiation et la progression du cancer gastrique. L'IL-1 β est une cytokine clé au cours de l'infection à *H. pylori* dont l'expression est étroitement associée à l'inflammation gastrique et à la carcinogenèse. La production de cette cytokine dépend de l'activation de l'inflammasome, en particulier l'inflammasome NLRP3. Ce dernier, responsable de l'activation des processus inflammatoires, est essentiel pour le maintien de l'homéostasie contre diverses infections pathogènes telles les infections bactérienne et virale. L'objectif général de ce travail est i) d'étudier l'expression et le polymorphisme des gènes de cytokines comme IL-1 β , IL-17 et IL-8 chez des patients marocains infectés par *H. pylori*. ii) explorer l'activation de l'inflammasome NLRP3 par *H. pylori* et déterminer les mécanismes impliqués dans l'activation de ce complexe par des virus à ARN ; connus comme des activateurs définis de NLRP3. Nos résultats ont mis en évidence une signature cytokinique qui peut prédire la métaplasie au cours de la

progression de l'infection à *H. Pylori*. Les polymorphismes génétiques de l'IL-1 β (IL-1 β -31 et -511) ne semblent pas influencer l'expression de l'IL-1 β de manière significative. La transfection des cellules in vitro par le LPS bactérien induit la production de l'IL-1 β qui semble être modulée par la caspase 4, NOD1 et NOD2. Par ailleurs, bien qu'il soit clairement établi que les virus à ARN induisent l'activation de l'inflammasome NLRP3, les mécanismes par lesquels ces virus induisent la production d'IL-1 β ne sont pas bien compris et restent à confirmer. Les résultats de cette partie du travail ont montré que la réplication des virus à ARN cytopathogènes tels que le virus de la stomatite vésiculaire (VSV) ou le virus de l'encéphalomyocardite (EMCV) induit une mort cellulaire lytique conduisant à un efflux de potassium qui déclenche l'activation de l'inflammasome NLRP3. Ainsi, les virus à forte capacité de réplication et qui ont un effet cytopathique sont capables d'induire l'activation de la caspase-1 conduisant à la production d'IL-1 β . A l'inverse, les virus qui induisent une très bonne réponse IFN de type I sont de très mauvais inducteurs de l'inflammasome NLRP3. Une meilleure compréhension de l'activation de l'inflammasome pourrait aider dans la mise au point de stratégies thérapeutiques ciblées utilisables dans la lutte contre les infections bactérienne et virale.

Title : Exploration of pro-inflammatory cytokines and NLRP3 inflammasome in intracellular infections: cases of *H. pylori* and RNA viruses

Keywords : *Helicobacter pylori*, inflammation, NLRP3 inflammasome, IL-1 β , RNA virus.

Abstract : *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) is a bacteria that infects the stomach and induces inflammatory gastritis, which can be chronic and progress to gastric cancer. The severity of the infection and its clinical course are associated with various factors including the immune status of the host. The initial inflammatory response to infection results in the secretion of a wide range of cytokines (interleukin-1 β (IL-1 β), IL-8 and IL-17A) which appear to play a key role in the initiation and progression of gastric cancer. Among these cytokines, IL-1 β is a key cytokine during *H. pylori* infection whose expression is associated with gastric inflammation and carcinogenesis. The production of this cytokine depends on the activation of the inflammasome, in particular NLRP3 inflammasome. The latter, responsible of the activation of inflammatory processes, is essential for the maintenance of homeostasis against various pathogenic infections such as bacterial and viral infections. The general objective of this work is i) to study the expression and polymorphism of genes for cytokines such as IL-1 β , IL-17 and IL-8 in Moroccan patients infected with *H. pylori*. ii) explore the activation of the NLRP3 inflammasome by *H. pylori* and determine the mechanisms involved in the activation of this complex by RNA viruses; known as defined activators of NLRP3. Our results demonstrated a cytokine signature: it can predict metaplasia during the progression of *H. pylori* infection.

In particular, the genetic polymorphisms of IL-1 β (IL-1 β -31 and -511) do not appear to influence IL-1 β expression significantly. In view of the difficulties encountered in isolating and culturing *H. pylori*, we used LPS from *H. pylori* to stimulate the inflammasome. Our results show that the transfection of cells in vitro with bacterial LPS induces the production of IL-1 β which appears to be modulated by caspase 4, NOD1 and NOD2. Furthermore, while it is clearly established that RNA viruses induce activation of the NLRP3 inflammasome, the mechanisms by which these viruses induce IL-1 β production are not well understood and remain to be confirmed. The results of this part of the work showed that the replication of cytopathogenic RNA viruses such as vesicular stomatitis virus (VSV) or encephalomyocarditis virus (EMCV) induces lytic cell death leading to an efflux of potassium which triggers activation of the NLRP3 inflammasome. Thus, viruses with a high replication capacity and which have a cytopathic effect are capable of inducing the activation of caspase-1 leading to the production of IL-1 β . Conversely, viruses which induce type I IFN response are very poor inducers of the NLRP3 inflammasome. A better understanding of the activation of the inflammasome could help in the development of targeted therapeutic strategies for use in the fight against bacterial and viral infections.