



HAL
open science

Etude du microenvironnement inflammatoire dans la lymphomagenèse gastrique induite par l'infection à *Helicobacter pylori*

Alice Blosse

► **To cite this version:**

Alice Blosse. Etude du microenvironnement inflammatoire dans la lymphomagenèse gastrique induite par l'infection à *Helicobacter pylori*. Médecine humaine et pathologie. Université de Bordeaux, 2021. Français. NNT : 2021BORD0160 . tel-03412668v2

HAL Id: tel-03412668

<https://theses.hal.science/tel-03412668v2>

Submitted on 3 Nov 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.

THÈSE PRÉSENTÉE
POUR OBTENIR LE GRADE DE

**DOCTEUR DE
L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX**

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

Par Alice BLOSSE

**Etude du microenvironnement inflammatoire
dans la lymphomagenèse gastrique induite par
l'infection à *Helicobacter pylori***

Sous la direction du Pr Philippe LEHOURS

Soutenue le 2 juillet 2021

Membres du jury :

Mme PEREYRE Sabine	PU-PH	Université de Bordeaux	Présidente
Mme MATYSIAK-BUDNIK Tamara	PU-PH	Université de Nantes	Rapporteur
M. BURUCOA Christophe	PU-PH	Université de Poitiers	Rapporteur
Mme VARON Christine	PU	Université de Bordeaux	Invitée
M. LEHOURS Philippe	PU-PH	Université de Bordeaux	Directeur de thèse

Titre : Etude du microenvironnement inflammatoire dans la lymphomagenèse gastrique induite par l'infection à *Helicobacter pylori*.

Résumé : *H. pylori* colonise l'estomac de près de la moitié de la population mondiale et y induit une inflammation chronique nommée gastrite, le plus souvent asymptomatique mais pouvant évoluer vers des pathologies gastroduodénales plus sévères dont le lymphome gastrique du MALT (mucosa-associated lymphoid tissue) ou LGM. Bien que n'apparaissant que chez un nombre restreint de sujets infectés, il est maintenant bien démontré que le développement du LGM est directement lié à l'infection à *H. pylori*. Dans cette pathologie, la stimulation antigénique chronique exercée par *H. pylori* sur la muqueuse gastrique entraîne un recrutement de lymphocytes et entretient une prolifération monoclonale de lymphocytes B s'organisant en follicules lymphoïdes normalement absents de la muqueuse gastrique. Le LGM s'inscrit donc dans un continuum de la réaction inflammatoire à *H. pylori*. Cependant, les mécanismes physiopathologiques conduisant à ce lymphome ne sont pas clairement élucidés. Les facteurs de virulence bactériens semblent jouer un rôle minime, l'étude des facteurs de l'hôte et notamment l'étude du microenvironnement inflammatoire paraît être une piste intéressante afin de mieux comprendre la physiopathologie de ce lymphome.

Dans une première partie, nous nous sommes intéressés aux mécanismes moléculaires pouvant être impliqués via l'étude de la dérégulation des microARNs (miARNs). Nos résultats ont montré la surexpression de 4 miARNs (miR-155, miR-150, miR-196 et miR-138) et la sous-expression de 2 miARNs (miR-7 et miR-153) au niveau gastrique chez des patients atteints par ce lymphome, résultats globalement différents de ceux préalablement obtenus par l'équipe en modèle murin d3Tx. A l'exception du miR-138, les miARNs dérégulés agiraient en synergie, via des cibles validées, dans une voie de signalisation commune anti-apoptotique induisant une prolifération lymphocytaire B nécessaire au processus de lymphomagenèse.

Certaines cytokines, dont la cytokine APRIL, joueraient également un rôle majeur dans la physiopathologie du LGM. L'équipe a ainsi développé un modèle prometteur de LGM basé sur l'utilisation de souris transgéniques pour la forme humaine de cette cytokine (Tg-hAPRIL). Dans une deuxième partie, nous nous sommes donc intéressés à l'étude de la polarisation de la réponse inflammatoire dans ce nouveau modèle et à sa comparaison avec celle observée chez l'homme. Nos résultats ont montré la présence d'une réponse inflammatoire gastrique équilibrée Th1, Th2 et T régulatrice au stade lymphome, aussi bien en modèle murin Tg-hAPRIL que chez l'homme. Après avoir confirmé la surexpression gastrique de la cytokine APRIL chez des patients atteints du LGM, nous avons mis en évidence, d'une part que les cellules cibles de la cytokine APRIL étaient majoritairement des lymphocytes B présents au sein des infiltrats lymphoïdes, appuyant ainsi l'hypothèse selon laquelle la cytokine APRIL participerait à la prolifération lymphocytaire B non contrôlée et, d'autre part que les cellules productrices de cette cytokine étaient de rares polynucléaires éosinophiles présents dans le microenvironnement tumoral, suggérant un rôle pro-tumoral de ce type cellulaire dans la lymphomagenèse gastrique.

Pour conclure, l'ensemble de nos résultats met en évidence le rôle clé du microenvironnement inflammatoire gastrique dans le développement du LGM.

Mots clés : *Helicobacter*, lymphome gastrique, inflammation, modèle animal, microARNs, APRIL.

Title: Study of the inflammatory microenvironment in gastric lymphomagenesis induced by *Helicobacter pylori* infection.

Abstract: *H. pylori* colonizes the stomach of about half of the world population and induces a chronic inflammation named gastritis, most often asymptomatic but which may evolve towards more serious gastroduodenal pathologies including gastric MALT lymphoma (mucosa-associated lymphoid tissue) or GML. Although occurring in a very small number of infected subjects, it is now well demonstrated that GML's development is directly caused by *H. pylori* infection. In this disease, *H. pylori*-antigenic chronic stimulation to the gastric mucosa leads to the recruitment of lymphocytes and maintains a monoclonal proliferation of B lymphocytes organizing into lymphoid follicles which are normally absent in the gastric mucosa. Therefore GML is part of an inflammatory continuum response to *H. pylori*. However, the mechanisms leading to this lymphoma are not clearly understood. Since bacterial virulence factors seem to play a minimal role, the study of host factors and in particular the study of the inflammatory microenvironment appears to be an interesting way to better understanding the pathogenesis of this lymphoma.

In the first part, we looked at the molecular mechanisms that may be involved by studying the deregulation of microRNAs (miRNAs). Our results showed an up regulation of 4 miRNAs (miR-155, miR-150, miR-196 and miR-138) and a down-regulation of 2 miRNAs (miR-7 and miR-153) in human stomachs at the GML stage, globally different results from those previously obtained by the team in the d3Tx mouse model of GML. Except miR-138, deregulated miRNAs could act synergistically on multiple validated targets involved in a common anti-apoptotic signaling pathway promoting cell survival and B lymphocytes proliferation leading to the lymphomagenesis process.

Some cytokines, such as the the APRIL cytokine, would play a leading role in GML pathogenesis. Thus, the team has developed a promising GML model based on transgenic mice with the human form of this cytokine (Tg-hAPRIL). In a second part, we therefore focused on the study of the polarization of the inflammatory response in this novel animal model, and validated these results in the gastric biopsies of GML patients. Our results showed the presence of a balanced gastric Th1, Th2 and T regulatory inflammatory response at the lymphoma stage, both in the Tg-hAPRIL mouse model and in humans. After confirming the gastric overexpression of the APRIL cytokine in patients with GML, we demonstrated, on the one hand, that the target cells of the APRIL cytokine were mainly B lymphocytes present within the lymphoid infiltrates, thus supporting the hypothesis according to which the APRIL cytokine would participate in uncontrolled B lymphocyte proliferation and, on the other hand that the APRIL-producing cells were rare eosinophils present in the tumor microenvironment, suggesting a pro-tumoral role of this cell type in gastric lymphomagenesis.

To conclude, all of our results demonstrate that the inflammatory microenvironment is a key contributor to the development of GML.

Keywords: *Helicobacter*, gastric lymphoma, inflammation, animal model, microRNAs, APRIL.

INSERM U1053 – UMR BaRITOn

Equipe 2 "*Helicobacter infection: inflammation and cancer*" – Université de Bordeaux
Bat. 2B RDC, 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux

REMERCIEMENTS

J'adresse toute ma reconnaissance et mes remerciements à l'ensemble des personnes qui ont contribué à la réalisation de ce travail.

Aux membres du jury, le Pr Sabine Pereyre, le Pr Tamara Matysiak-Budnik, le Pr Christine Varon et le Pr Christophe Burucoa, qui me font l'honneur de juger ce travail.

A mon directeur de thèse, le Pr Philippe Lehours. Je te remercie d'avoir inspiré et dirigé ma thèse. Tu as su m'encourager à poursuivre dans la recherche à travers ce travail. Ta disponibilité, ton dynamisme et ta rigueur scientifique ont orienté et valorisé ce travail. Sache que je ne regrette en rien de m'être lancée dans cette aventure à tes côtés.

Aux membres de l'équipe « *Helicobacter* : inflammation and cancer ». Je remercie chacun d'entre vous pour l'aide que vous avez pu m'apporter dans la réalisation de ce travail que ce soit en termes de formation, d'appui technique, de conseils et discussions scientifiques, de partage d'expérience et d'encouragements. Sans vous tous, ce travail n'aurait pas été le même et n'aurait pas été aussi agréable ! Merci également pour les moments de détente partagés ensemble.

A Sara Peru, pour sa collaboration précieuse à ce travail.

A l'ensemble des membres du CNRCH pour leur aide et leur bonne humeur.

A l'ensemble des collaborateurs de ce projet pour leur disponibilité et leur partage d'expérience :

Cathy Staedel pour son expertise pour l'étude des microARNs.

Bertrand Huart et Benoit Marteyn pour la partie APRIL et éosinophiles.

Christiane Copie-Bergman et Michael Levy de l'hôpital Henri Mondor ainsi que Agnès Ruskone-Fourmestreaux et Bettina Fabiani de l'hôpital Saint-Antoine, grâce à qui nous avons pu travailler sur du matériel humain.

Richard Bonnet pour l'obtention de souches de *E. coli* B2.

L'ensemble du personnel de l'animalerie A2 et Xavier Gauthereau de la plateforme de RT-PCR.

A la ligue contre le cancer, qui a participé au financement d'une partie de ce travail.

Aux patients dont les prélèvements ont été utilisés dans cette étude et grâce à qui la recherche est possible.

A l'ensemble du laboratoire de Bactériologie, plus particulièrement à mes collègues biologistes et à mes co-AHUs passés et actuelles, pour leur aide, leur soutien et leur bonne humeur. Vous avez aussi contribué à l'aboutissement de ce travail.

A mes amis, à ma famille qui, comme à leur habitude, ont été d'un soutien sans faille et sans qui je n'en serais pas là aujourd'hui.

TABLE DES MATIERES

Liste des figures	8
Liste des tableaux.....	9
Abréviations	10
Introduction.....	12
I. Infection à <i>Helicobacter pylori</i> et lymphomagenèse gastrique.....	13
1. Généralités.....	13
2. <i>Helicobacter pylori</i>	17
3. Lien de causalité entre l'infection à <i>H. pylori</i> et le LGM	20
4. Spécificités des souches de <i>H. pylori</i> associées au LGM.....	22
II. Lymphome gastrique du MALT (LGM).....	28
1. Classification.....	28
2. Epidémiologie	29
3. Présentation clinique	30
4. Diagnostic du LGM	30
5. Traitement.....	41
6. Suivi post-traitement	47
7. Une maladie multifactorielle ?.....	49
III. Réponse inflammatoire et lymphomagenèse gastrique du MALT.....	50
1. Immunité innée et persistance bactérienne : un prérequis nécessaire.....	50
2. Immunité adaptative : les lymphocytes T activés acteurs majeurs de la prolifération cellulaire B	53
3. Les lymphocytes T régulateurs : de précieux équipiers.....	55
4. Une signature chimiokinique et cytokinique spécifique au LGM.....	56
5. Influence des variabilités génétiques de l'hôte	58
6. Une signature microARN spécifique au LGM ?.....	61

Objectifs.....	64
Résultats expérimentaux.....	66
Article 1 :	67
Etude de la dérégulation des microARNs dans le LGM : de la souris à l'homme	67
Article 2 :	83
Lymphomagenèse gastrique et cytokine APRIL : rôle potentiel des polynucléaires éosinophiles	83
Discussion et Perspectives.....	95
Références bibliographiques	110
Annexe	137

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Représentation schématique des mécanismes de lymphomagenèse associés à une infection.....	16
Figure 2 : Morphologie de <i>H. pylori</i> en microscopie électronique.....	17
Figure 3 : Prévalence mondiale de l'infection à <i>H. pylori</i>	19
Figure 4 : Pathologies induites par l'infection à <i>H. pylori</i>	20
Figure 5: Cartographie gastrique.....	31
Figure 6 : Aspect histologique caractéristique du LGM.....	34
Figure 7: Aspect histologique d'un LGM de haut grade ou DLBCL secondaire.....	35
Figure 8 : Algorithme de traitement du LGM proposé par l'ESMO en 2013.....	42
Figure 9 : Algorithme de traitement en cas d'infection à <i>H. pylori</i> chez l'adulte.....	45
Figure 10 : Effet synergique anti-apoptotique des miARNs dérégulés dans le LGM.....	98
Figure 11 : Stratégie expérimentale de co-infection <i>H. felis</i> / <i>E. coli</i> en modèle de souris Tg-hAPRIL.....	106
Figure 12 : Résultats préliminaires des co-infections <i>H. felis</i> / <i>E. coli</i> en modèle de souris Tg-hAPRIL.....	108
Figure 13 : Analyses histologiques et immunohistochimiques des infiltrats lymphoïdes observés au sein de la muqueuse gastrique des souris mono-infectées par <i>H. felis</i> et des souris co-infectées par <i>H. felis</i> + <i>E. coli</i>	109

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Classification de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) des différents types de lymphomes associés à des infections.....	13
Tableau 2 : Spécificités des souches de <i>H. pylori</i> associées au LGM.....	27
Tableau 3 : Différents types histopathologiques de lymphomes gastro-intestinaux.....	29
Tableau 4 : Score histologique de Wotherspoon pour le diagnostic du LGM.....	33
Tableau 5 : Comparaison des classifications d'Ann Arbor modifiée et de Lugano.....	38
Tableau 6: Système de classification de Paris.....	38
Tableau 7 : Anomalies chromosomiques décrites dans les LGM.....	41
Tableau 8 : Critères d'évaluation post-traitement du LGM selon le GELA.....	48

ABRÉVIATIONS

AID: activation-induced cytidine deaminase
API2: apoptosis inhibitor 2
APRIL: a proliferative-inducing ligand
Bcl-10: B-cell chronic lymphocytic leukemia/lymphoma protein 10
BCR: B cell receptor
CagA: cytotoxin associated gene A
cagPAI: îlot de pathogénicité cag
DLBCL: diffuse large B-cell lymphoma
EBV: Epstein-Barr virus
E. coli: Escherichia coli
EGILS: European gastro intestinal lymphoma study
ESMO: European society for medical oncology
FISH: fluorescence in situ hybridization
FOXP1: Forkhead box protein P1
GELA: groupe d'étude des lymphomes de l'adulte
HAS : haute autorité de santé
H&E: hemalun-eosin
H. felis: Helicobacter felis
H. heilmannii: Helicobacter heilmannii
H. pylori: Helicobacter pylori
IGH: chaîne lourde des immunoglobulines
IGK: chaîne légère kappa des immunoglobulines
IL: interleukine
INF : interféron
IPP: inhibiteur de la pompe à protons
LGM: lymphome gastrique du MALT
LLE: lésions lympho-épithéliales
LNH: lymphome non Hodgkinien
LPGI: lymphomes primitifs gastro-intestinaux
LPS: lipopolysaccharide

MALT: mucosa-associated lymphoid tissue
MALT1: mucosa-associated lymphoid tissue translocation protein 1
miR, miARN: microARN
NF- κ B: nuclear factor kappa B
NK: natural killer
NLR: NOD (nucleotide-binding oligomerization domain) like receptors
OMS: organisation mondiale de la santé
PAMPs: pathogen-associated molecular patterns
PCR: polymerase chain reaction
PNE: polynucléaire éosinophile
PNN: polynucléaire neutrophile
PRR: pattern recognition receptors
ROS: espèces réactives de l'oxygène
RT-qPCR : reverse transcription quantitative polymerase chain reaction
TGF: tumor growth factor
Th: T helper
TLR: toll like receptors
TNF: tumor necrosis factor
Treg: T régulateur
VacA: vacuolating cytotoxin A

INTRODUCTION

I. Infection à *Helicobacter pylori* et lymphomagenèse gastrique

1. Généralités

Le lien entre infection chronique et lymphomagenèse est établi depuis plusieurs décennies. En effet, compte tenu de l'instabilité génétique inhérente aux lymphocytes, les infections chroniques peuvent contribuer à la lymphomagenèse en favorisant les conditions à risque de transformation telles qu'une prolifération cellulaire accrue ou une diminution de l'apoptose cellulaire. Ainsi, certains types de lymphomes, appartenant à diverses catégories histopathologiques, sont associés à des infections microbiennes spécifiques (Tableau 1) (1).

Tableau 1 : **Classification de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) des différents types de lymphomes associés à des infections.**
D'après Suarez *et al.* 2006 (1).

Microbial pathogen	World Health Organization (WHO) histologic subtype
Human T-lymphotropic virus 1 (HTLV-1)	Adult T-cell leukemia/lymphoma
Human immunodeficiency virus (HIV)	Hodgkin disease (with EBV)
	Burkitt lymphoma (with or without EBV)
	DLBCL (including primary effusion lymphoma and plasmablastic lymphoma)
	Extranodal MZ lymphoma, MALT-type (rare)
	T-cell lymphoma (rare)
Epstein-Barr virus (EBV)	Hodgkin disease
	Polymorphic PTLD
	Burkitt lymphoma
	Monomorphic PTLD (DLBCL)
	Primary effusion lymphoma (with HHV8)
Human herpesvirus 8/Kaposi sarcoma-associated herpesvirus (HHV8/KSHV)	Primary effusion lymphoma
	Plasmablastic lymphoma (DLBCL)
	PTLD (rare)
Hepatitis C virus (HCV)	SLVL (splenic MZ lymphoma)
	Other marginal zone lymphoma
	DLBCL
<i>Helicobacter pylori</i>	Gastric MALT lymphoma (extranodal MZ lymphoma, MALT-type)
<i>Campylobacter jejuni</i>	IPSID (extranodal MZ lymphoma, MALT-type)
<i>Borrelia burgdorferi</i>	Primary cutaneous B-cell lymphoma (various WHO subtypes including extranodal MZ lymphoma, MALT-type)
<i>Chlamydia psittaci</i>	Ocular adnexal lymphoma (extranodal MZ lymphoma, MALT-type)

DLBCL indicates diffuse large B-cell lymphoma; MZ, marginal zone; MALT, mucosa-associated lymphoid tissue; PTLD, posttransplantation lymphoproliferative disorder; SLVL, splenic lymphoma with villous lymphocytes; and IPSID, immunoproliferative small intestinal disease.

Deux processus de transformation distincts sont classiquement décrits (Figure 1) (2). Le premier, qualifié de transformation directe des lymphocytes par un agent microbien, est le scénario le plus simple et le mieux décrit. Il fait intervenir un pathogène capable d'intégrer un ou plusieurs oncogènes dans la cellule aboutissant ainsi à sa transformation. Le modèle de transformation directe a été initialement évoqué au cours des années 1960 par les travaux de Epstein mettant en évidence, par microscopie électronique, un virus

de type herpès dans des lignées cellulaires lymphoblastiques établies à partir de tissus lymphoïdes prélevés chez des patients africains atteints de la forme endémique du lymphome de Burkitt (3, 4). Ainsi, le virus Epstein-Barr (EBV) possède une puissante capacité de transformation des lymphocytes et, est étiologiquement lié à différents types de lymphomes B malins, à savoir le lymphome de Burkitt, le lymphome de Hodgkin, le lymphome B diffus à grandes cellules (DLBCL, diffuse large B cell lymphoma), les lymphomes B du sujet immunodéprimé après transplantation d'organe (PTLD, post-transplant lymphoproliferative disorder) ou suite à l'infection par le VIH (virus de l'immunodéficience humaine). L'EBV est également associé à un lymphome T appelé lymphome NK (natural killer)/T nasal (5). Les mécanismes physiopathologiques reliant l'EBV au processus lymphoprolifératif tumoral varient selon ces différents types de lymphomes (6). Différentes protéines de latence virales nucléaires et/ou membranaires (respectivement EBNA et LMPs) peuvent être exprimées au sein des lymphocytes infectés dont la protéine oncogénique LMP1 (latent membrane protein-1) exprimée dans les lymphomes B associés à une immunosuppression (7). Des réarrangements chromosomiques induits par l'EBV peuvent également avoir lieu dont le plus connu, puisque considéré comme la principale caractéristique des lymphomes de Burkitt, est le réarrangement de l'oncogène *c-myc* au locus des immunoglobulines (8, 9). Deux autres virus transformant selon un mécanisme direct, à savoir le virus HHV-8 (human herpes virus 8) et le virus HTLV-1 (human T-cell leukemia/lymphoma virus), sont également associés à des syndromes lymphoprolifératifs dont notamment le lymphome des séreuses et la leucémie/lymphome T de l'adulte, respectivement (1).

Un scénario alternatif à la transformation directe des lymphocytes a émergé plus récemment, il s'agit du processus de transformation indirecte où une stimulation antigénique chronique du lymphocyte par un pathogène donné, notamment bactérien, conduit à sa transformation cellulaire à savoir à l'émergence d'un clone lymphocytaire tumoral (1). En effet, au cours de tout processus prolifératif, des erreurs répliquatives peuvent survenir, normalement prévenues par le système de réparation cellulaire. Le développement et la maturation post-stimulation antigénique des lymphocytes B exposent ce dernier à un risque accru de transformation oncogénique, supérieur à celui du lymphocyte T, via notamment le potentiel mutationnel de la protéine AID (activation-induced cytidine deaminase) (10). Les lymphocytes B, au sein des centres germinatifs, subissent simultanément une prolifération massive et des endommagements de l'ADN du

fait des processus d'hypermutation somatique et de commutation isotypique liés à l'activité de la protéine AID (11). Bien que les voies de réparation de l'ADN maintiennent l'intégrité du génome, l'action de la protéine AID peut donner lieu à l'apparition de mutations et/ou de translocations. Ainsi, il est actuellement supposé que cette protéine AID, au-delà de son rôle physiologique dans la maturation du lymphocyte B, occupe une place centrale dans la lymphomagenèse B en introduisant des mutations ponctuelles dans certains proto-oncogènes ou gènes suppresseurs de tumeur voire en générant certaines translocations chromosomiques. Ceci expliquerait la sur incidence, observée dans la population, de lymphomes B par rapport aux lymphomes T (12). L'un des modèles les mieux établis à l'heure actuelle pour ce type de transformation indirecte est le lymphome gastrique du MALT (mucosa-associated lymphoid tissue) ou LGM associé à l'infection à *Helicobacter pylori* (*H. pylori*). Les lymphomes extra-ganglionnaires de la zone marginale, ou lymphomes de type MALT, constituent un sous type de lymphome B dans lequel il a été démontré que l'éradication de l'agent infectieux putatif peut induire une régression tumorale (1, 6). Ainsi, à côté de *H. pylori*, d'autres bactéries se sont avérées impliquées dans la pathogenèse des lymphomes de type MALT, avec un niveau de preuve plus ou moins satisfaisant, telles que *Chlamydia psittaci* et le lymphome des annexes oculaires, *Borrelia burgdorferi* et le lymphome cutané ou encore *Campylobacter jejuni* et la maladie immuno-proliférative de l'intestin grêle (13). Un risque accru de développer ce type de lymphome a également été signalé chez des patients atteints d'une infection chronique par le virus de l'hépatite C (14). Enfin, outre l'étiologie infectieuse, l'inflammation chronique causée par des maladies auto-immunes comme le syndrome de Sjögren ou la thyroïdite de Hashimoto, peuvent également constituer un facteur de risque important pour le développement d'un lymphome extra-ganglionnaire de la zone marginale selon un modèle de transformation indirecte (15).

Comme cela a précédemment été mentionné, l'infection à *H. pylori* constitue un des archétypes de la lymphomagenèse induite par une infection chronique.

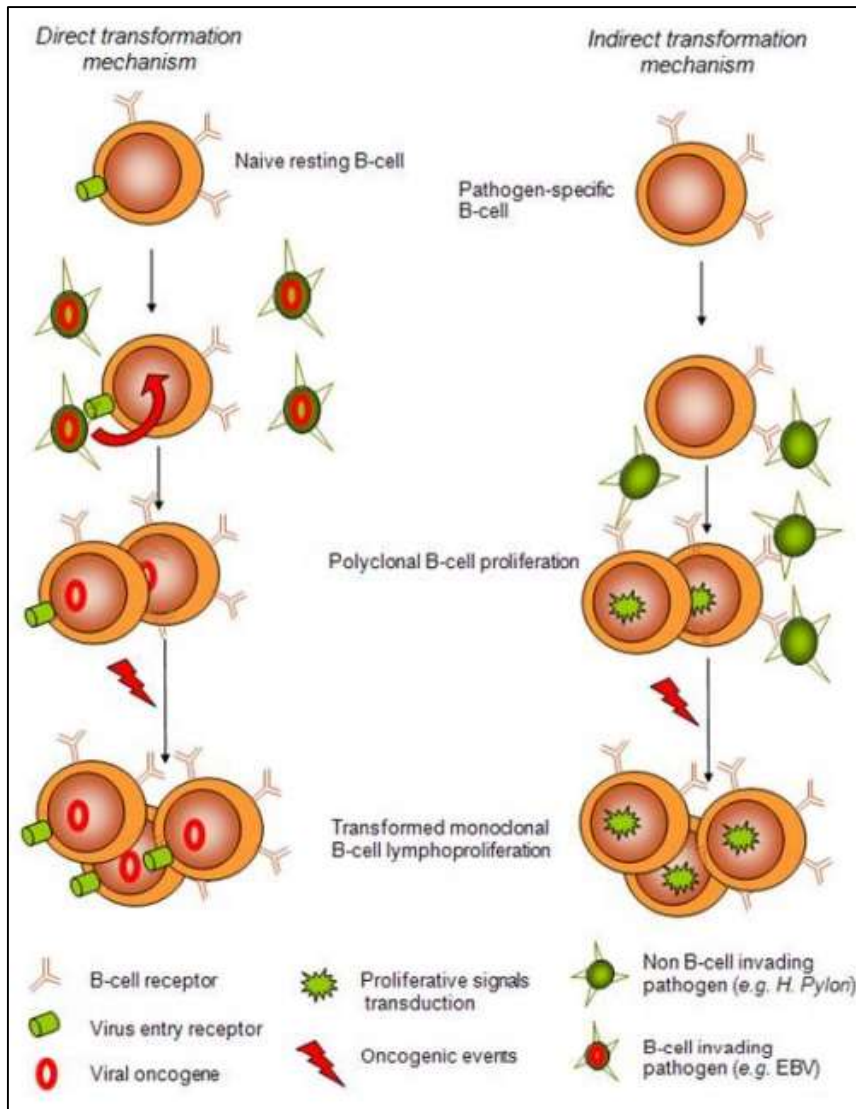


Figure 1 : Représentation schématique des mécanismes de lymphomagenèse associés à une infection.

D'après Bachy *et al.* 2010 (2).

Modèle de transformation directe. Les agents infectieux tels que l'EBV, ciblent directement les lymphocytes B au repos et y établissent une infection latente. La transcription de gènes viraux latents à potentiel oncogénique conduit à l'immortalisation des cellules B infectées et à leur prolifération incontrôlée par le système immunitaire de l'hôte. Dans certaines circonstances (comme un déficit immunitaire) ou après mutation, les cellules B infectées transformées peuvent conduire à un syndrome lymphoprolifératif malin.

Modèle de transformation indirecte. La persistance d'un agent pathogène de façon chronique au niveau de certains tissus, telle que la bactérie *H. pylori* au niveau du tissu gastrique, stimule les lymphocytes B spécifiques de l'antigène et favorise l'émergence d'un clone lymphocytaire tumoral pouvant conduire à un syndrome lymphoprolifératif malin. La prolifération chronique des lymphocytes B crée des conditions favorables à l'instabilité génétique pouvant conduire à l'apparition de mutations responsables d'une lymphoprolifération indépendante de la stimulation antigénique microbienne.

2. *Helicobacter pylori*

La découverte de *H. pylori* (Figure 2) a été un véritable bouleversement dans la communauté scientifique, il existerait une bactérie capable de coloniser la muqueuse gastrique supposée stérile. Des études phylogénétiques indiquent que l'infection de l'homme par *H. pylori* daterait de plus de 100 000 ans (16, 17), ce n'est pourtant qu'en 1875 que des scientifiques allemands observèrent la présence d'une bactérie hélicoïdale dans des estomacs de patients souffrant d'ulcères gastriques (18). Cette bactérie ne pouvant être cultivée selon les pratiques usuelles de l'époque, les recherches la concernant furent relayées au second rang. Pourtant, diverses publications décrivant la présence de bactéries spiralées dans l'estomac humain se succédèrent les années suivantes mais ce n'est finalement qu'en 1982 que deux chercheurs australiens, R. Warren et B. Marshall réussirent à cultiver un bacille à Gram négatif spiralé, à partir de biopsies gastriques de patients souffrant de gastrite ou d'ulcère gastroduodéal (19). Cette découverte et son rôle dans la gastrite et l'ulcère gastroduodéal leur valut le prix Nobel de physiologie et de médecine en 2005. Depuis cette découverte, *H. pylori* a fait l'objet de nombreuses recherches notamment en lien avec le cancer gastrique. En effet, la bactérie est considérée depuis 1994 comme carcinogène de classe I selon l'agence internationale de recherche contre le cancer (IARC) pour son implication dans les cancers de l'estomac. Il s'agit de la première bactérie carcinogène reconnue, l'infection à *H. pylori* constituant toujours à ce jour la première cause de cancers induits par un agent pathogène (20).

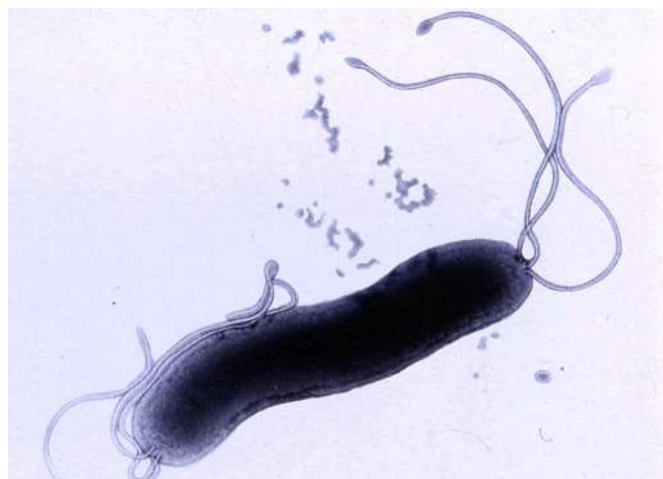


Figure 2 : **Morphologie de *H. pylori* en microscopie électronique (x 30 000).**
D'après <http://www.u-bordeaux.fr/Actualites/De-la-recherche/Clouer-Helicobacter-pylori-au-pilori>.

H. pylori est un bacille spiralé de 0,5 à 0,9 μm de large et de 2 à 4 μm de long possédant 2 à 6 flagelles lui permettant de se déplacer dans le mucus gastrique.

D'abord nommée *Campylobacter pylori* (du fait de son caractère micro-aérophile et de sa forme spiralée), certaines différences avec le genre *Campylobacter*, telles que la morphologie des flagelles, la composition en lipides ou encore la séquence du gène codant l'ARNr 16S, ont ensuite conduit à renommer cette bactérie *H. pylori*, chef de file d'un nouveau genre (21). Le genre *Helicobacter* comprend actuellement une quarantaine d'espèces validées (22). Ces espèces sont capables d'infecter de nombreuses espèces animales. Un haut degré de spécificité entre les bactéries du genre *Helicobacter* et leur hôte respectif est retrouvé, *H. pylori* étant l'espèce inféodée à l'homme (23). Ainsi, l'estomac humain est considéré comme étant le réservoir exclusif de cette bactérie. Cette colonisation est possible grâce à certaines caractéristiques bactériologiques et certains facteurs de virulence tels que la présence d'une uréase neutralisant l'acidité gastrique, de flagelles lui conférant une mobilité au sein du mucus gastrique, et l'expression d'adhésines permettant son interaction avec les cellules épithéliales gastriques (24). Sa transmission, principalement par voie orale-orale via la salive contaminée et les vomissements, est donc interhumaine et survient essentiellement pendant la petite enfance via un membre de la famille infecté (23, 24). L'infection à *H. pylori* est considérée comme étant l'infection bactérienne chronique la plus répandue dans le monde avec plus de la moitié de la population mondiale infectée (23, 25). Il convient néanmoins de préciser que la prévalence de l'infection peut être très hétérogène d'un pays à l'autre, variant de façon significative entre les pays développés (avec des taux de 30 à 50%) et les pays en développement (où elle atteint 80% de la population) (Figure 3) (26, 25, 27). Cette différence est généralement liée aux niveaux d'urbanisation (installations sanitaires, conditions d'hygiènes) et aux statuts socioéconomiques inférieurs. La prévalence de l'infection en France est estimée à 47% de la population, soit plus de 30 millions de personnes (25).

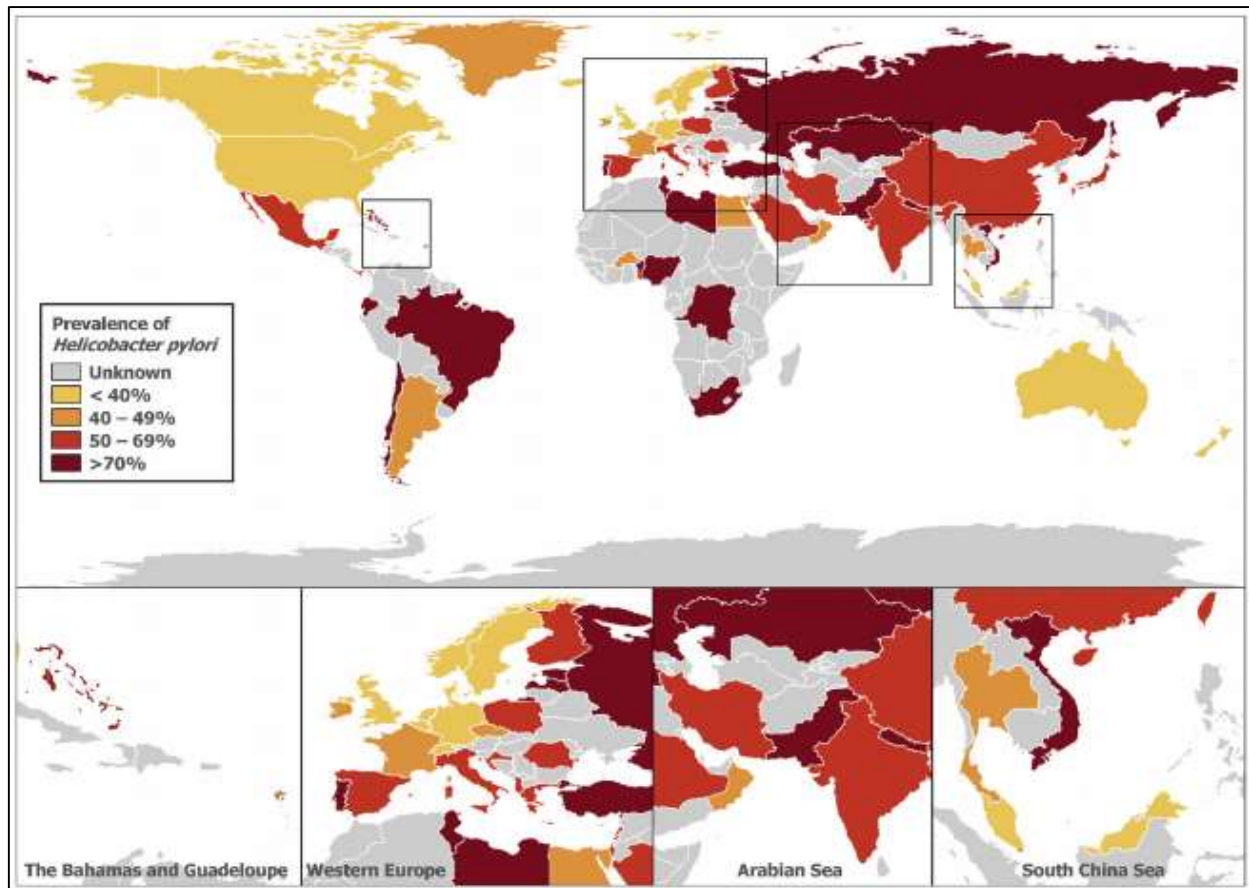


Figure 3 : **Prévalence mondiale de l'infection à *H. pylori*.**
D'après Hooi *et al.* 2017 (25).

L'infection à *H. pylori* induit toujours une réaction inflammatoire de la muqueuse gastrique appelée gastrite qui persistera toute la vie en l'absence d'un traitement antibiotique d'éradication de la bactérie. Cette gastrite chronique est le plus souvent asymptomatique, dans près de 85% des cas, mais elle peut évoluer, dans 15% des cas, vers des pathologies plus sévères. Pour 5 à 10% des patients infectés, la gastrite évolue vers un ulcère duodéal ou gastrique. 1% des sujets infectés vont développer un adénocarcinome gastrique. Enfin, dans moins de 0,1% des cas, la gastrite chronique peut évoluer, après de nombreuses années, en un LGM (Figure 4) (28). Le chapitre II est consacré à cette pathologie gastrique.

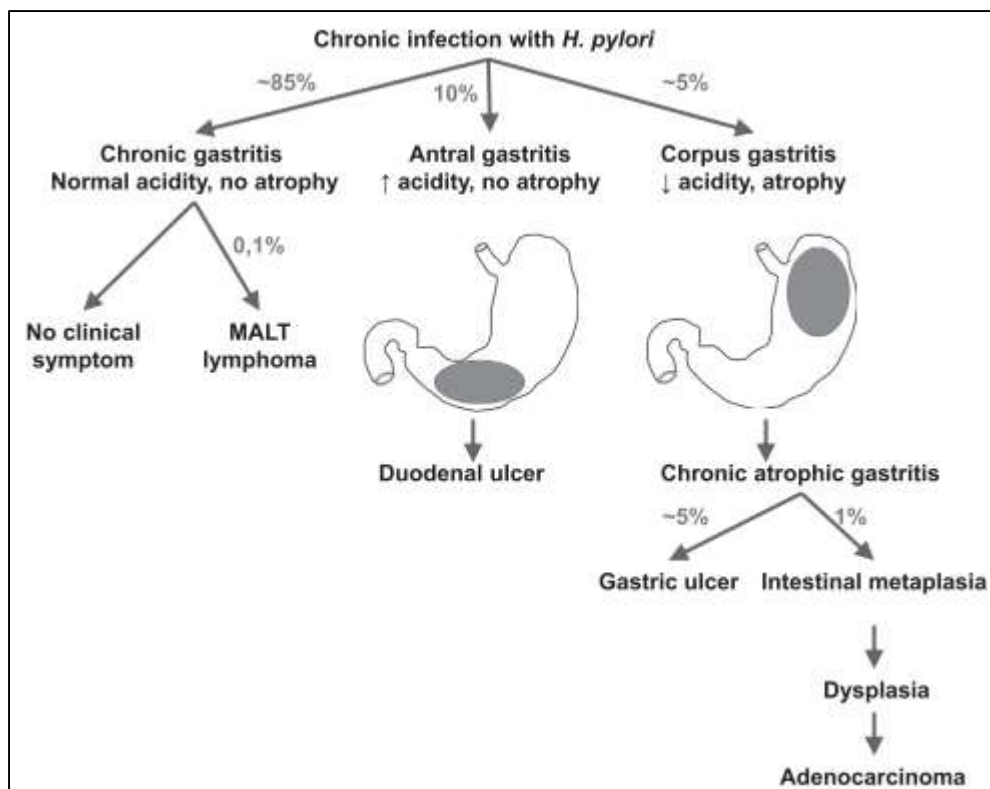


Figure 4 : **Pathologies induites par l'infection à *H. pylori*.**

D'après Mégraud *et al.* 2015 (28).

La gastrite chronique est asymptomatique dans 85% des cas mais elle peut aussi évoluer et être associée à : (i) une hypersécrétion acide, dans 10% des cas, qui confine la bactérie dans l'antra, la gastrite reste antrale et peut évoluer vers un ulcère duodénal ; (ii) une hyposécrétion acide qui permet à *H. pylori* de coloniser le corps de l'estomac entraînant une gastrite atrophique puis le développement d'un ulcère gastrique (5%) ou d'un adénocarcinome gastrique (1%) ; (iii) au LGM dans moins de 0,1% des cas.

3. Lien de causalité entre l'infection à *H. pylori* et le LGM

La démonstration précise du lien de causalité en pathologie humaine n'est jamais une étape facile. Les critères de Austin Bradford Hill, établis en 1965 pour montrer le lien de causalité entre le cancer du poumon et le tabagisme, sont encore aujourd'hui de rigueur dans la démonstration des liens de causalité entre un agent et une pathologie (29). Le LGM associé à *H. pylori* est l'archétype de la pathologie dans laquelle la quasi-totalité des critères de causalité a été démontrée.

De nombreux arguments épidémiologiques viennent appuyer ce lien. La prévalence de l'infection à *H. pylori* chez les patients atteints de LGM est, selon les études disponibles, de 92% à 98% alors que la prévalence dans la population française adulte est de 47% (25, 30-32). Une prévalence plus élevée de LGM a également été rapportée dans les zones

géographiques à forte prévalence de l'infection comme la Vénétie en Italie (33). Enfin, Parsonnet *et al.* ont apporté un argument épidémiologique majeur impliquant directement *H. pylori* dans le LGM (34). Ces auteurs ont montré dans une étude cas-témoin nichée, réalisée à partir d'une cohorte incluant plusieurs centaines de milliers de patients, que le risque relatif de développer ce type de lymphome était augmenté d'un facteur six dans la population infectée par rapport à la population non infectée. Fait important, cette augmentation n'était constatée que pour les lymphomes gastriques et non pour les lymphomes ganglionnaires, soulignant le lien spécifique entre *H. pylori* et le LGM. De plus, les auteurs ont montré que 88% des patients possédaient des anticorps anti-*H. pylori* quinze ans avant le diagnostic du LGM, cette étude introduisait donc pour la première fois le critère de temporalité nécessaire à l'établissement d'un lien de causalité.

Sur le plan physiopathologique, il existe aussi des arguments forts en faveur d'un rôle de la bactérie. En effet, l'estomac est normalement dépourvu de tissu lymphoïde. La réaction inflammatoire induite par *H. pylori* conduit successivement à l'apparition d'un infiltrat inflammatoire lymphoïde, puis dans quelques cas, à la formation de follicules lymphoïdes à partir desquels émergerait le LGM. Un chapitre de ce manuscrit sera consacré à la réaction inflammatoire associée au LGM. Il a notamment été montré que les follicules lymphoïdes apparaissaient après une stimulation antigénique chronique exercée par *H. pylori* sur la muqueuse gastrique. Cette hypothèse a été validée *in vitro* par l'équipe d'un pathologiste anglais, Peter Isaacson, montrant que des cellules tumorales, purifiées de gastrectomies de patients présentant un LGM, produisaient des cytokines stimulant la prolifération lymphocytaire B en présence de souches de *H. pylori* dans le milieu de culture. Cette prolifération tumorale était spécifique de *H. pylori* et n'a été observée qu'avec des cellules de lymphome gastrique (35). De plus, les auteurs ont montré que la prolifération du clone tumoral était dépendante de la présence de lymphocytes T, soulignant pour la première fois le caractère T-dépendant de cette lymphoprolifération tumorale de type B (36). Le LGM s'inscrit donc dans un continuum de la réaction inflammatoire à *H. pylori*. Cette continuité a été mise en évidence par Zucca *et al.* grâce à une étude comparative de prélèvements obtenus chez un patient ayant un LGM avec ceux obtenus une dizaine d'années auparavant et correspondant au stade de gastrite chronique à *H. pylori*. Le séquençage de la partie hypervariable de la chaîne lourde des immunoglobulines a mis en évidence la préexistence du clone lymphocytaire tumoral au sein de la population polyclonale observée dans les prélèvements de gastrite (37). Ainsi,

il a été possible de montrer rétrospectivement la transition du stade gastrite au stade lymphome.

La preuve formelle du rôle causal de l'infection à *H. pylori* dans le LGM a été apportée par l'effet bénéfique de l'éradication de la bactérie sur la régression des lésions lymphomateuses. Wotherspoon *et al.* ont été les premiers à montrer, dans une étude pilote incluant six patients, qu'il était possible d'obtenir pour cinq d'entre eux une régression à 22 mois du LGM de faible degré de malignité après l'éradication de *H. pylori* par un traitement antibiotique adapté (38). Cette observation a depuis été confirmée dans de nombreuses études, il est maintenant admis que dans 60 à 80% des cas, le LGM de faible degré de malignité peut être traité par l'éradication de *H. pylori* (39–42). La variabilité des résultats selon les études dépend du délai laissé entre le traitement d'éradication et le contrôle du lymphome ainsi que de l'extension locorégionale du lymphome. De plus, si une réinfection a lieu, le LGM reprend son développement de manière plus rapide, les cellules lymphoïdes résidentes étant déjà sensibilisées aux antigènes bactériens (43).

Les premières données concernant un modèle animal expérimental d'infection à *Helicobacter* datent de 1995. Ainsi, l'équipe de Enno *et al.* a décrit l'apparition, au niveau gastrique, de lésions histologiques évocatrices d'un LGM chez 25% des souris BALB/c, 22 mois après l'infection à *Helicobacter felis* (*H. felis*) (44). Preuves ultimes que le modèle expérimental mime de façon pertinente la pathologie humaine, l'éradication par un traitement antibiotique adapté s'accompagne de la régression des lésions lymphomateuses observées, alors que la réinfection des souris par la bactérie après une réponse histologique complète entraîne une réémergence rapide et agressive de la pathologie tumorale, confirmant le caractère antigène dépendant du LGM (45, 46).

4. Spécificités des souches de *H. pylori* associées au LGM

Le rôle de l'infection à *H. pylori* dans les pathologies digestives et en particulier dans la carcinogenèse gastrique tient vraisemblablement à la présence de facteurs de virulence. La question qui se pose est la suivante : existe-t-il des facteurs de virulence spécifiquement impliqués dans le devenir de l'infection à *H. pylori* vers le processus de lymphomagenèse gastrique du MALT ? Bien que de nombreux travaux aient été consacrés

à l'identification de facteurs de virulence chez les souches associées au cancer gastrique, les souches de *H. pylori* associées au LGM, certes moins fréquentes, restent à ce jour peu étudiées.

Les principaux facteurs de virulence étudiés chez *H. pylori* sont ceux impliqués dans l'inflammation et les dommages cellulaires, en particulier ceux codés par l'îlot de pathogénicité *cag* (*cagPAI*). Le gène *cagA* (cytotoxin associated gene A), codé par le *cagPAI*, est sans aucun doute le facteur de virulence le plus étudié. Contrairement à ce qui est observé dans les ulcères gastroduodénaux et l'adénocarcinome gastrique, l'oncoprotéine CagA ne semble pas jouer un rôle significatif dans la physiopathologie des stades précoces du LGM mais elle pourrait jouer un rôle dans le développement d'un LGM de haut grade, également appelé DLBCL selon la classification de l'OMS (47–49). Que ce soit au niveau protéique, génomique ou encore en terme de séroprévalence (anticorps anti-CagA), la protéine CagA ne serait présente que chez la moitié des patients ayant développés un LGM de bas grade. En effet, concernant l'expression de CagA dans le LGM, Kuo *et al.* ont détecté la protéine chez 48.4% des patients (50). Les résultats de l'étude menée par Lehours *et al.*, basée sur une large collection de souches isolées chez des patients présentant un LGM, sont cohérents avec l'absence d'association entre la présence du gène codant CagA et le développement d'un LGM (51). Quant aux analyses sérologiques, Delchier *et al.* ont montré que la séroprévalence de CagA était significativement plus élevée dans le LGM de haut grade (environ 75%) que dans le LGM de bas grade (44,8%) (52). Ces résultats confirment les observations faites quelques années plus tôt par Peng *et al.* ayant constaté que la prévalence des souches CagA positives était significativement plus élevée dans le LGM de haut grade que dans le LGM de bas grade ou la gastrite (53). L'absence de CagA dans environ la moitié des souches de LGM étudiées suggère l'existence d'autres mécanismes impliqués dans le processus de lymphomagenèse gastrique.

L'association du facteur de virulence VacA (vacuolating cytotoxin A) avec le LGM a également été étudiée. Contrairement à *cagA*, le gène *vacA*, codant la toxine vacuolisante, est présent chez toutes les souches de *H. pylori* quelle que soit la symptomatologie clinique associée, mais seulement 50% des souches possèdent la capacité de vacuolisation *in vitro* en lien avec son polymorphisme allélique (49). En effet, deux allèles de la région codant la séquence signal (*s1* et *s2*), deux allèles de la région centrale de *vacA* (*m1* et *m2*)

et 3 allèles de la région intermédiaire (*i1*, *i2* et *i3*) ont été identifiés. Chaque gène présente une combinaison entre ces différents allèles conditionnant l'activité de la toxine : les souches de *H. pylori* portant les types *s1/m1/i1* sécrètent généralement de fortes quantités de protéines VacA présentant une forte activité cytotoxique pour de multiples types cellulaires, alors que les souches contenant les allèles types *s2/m2/i2* sont dépourvues d'activité cytotoxique (54). Des études épidémiologiques ont montré une corrélation entre ces allèles et le risque de développer une maladie gastroduodénale. Le risque de développement d'un adénocarcinome gastrique ou d'un ulcère gastroduodéal est augmenté chez les personnes infectées par des souches porteuses d'allèles *s1*, *m1* ou *i1* par rapport à celles infectées par des souches *s2*, *m2* ou *i2* (54, 55). A l'inverse, concernant les souches associées au LGM, les études publiées mettent en évidence une prédominance de l'allèle *vacA m2*, correspondant aux souches les moins biologiquement actives (56, 51).

Lehours *et al.* ont étudié la présence de neuf gènes de virulence, *cagA*, *cagE*, *vacA*, *iceA*, *babA*, *hopQ*, *oipA*, *sabA* et *hopZ*, chez 43 souches de LGM en comparaison avec 39 souches isolées de gastrite (51). Aucun de ces gènes, considérés individuellement, ne semblait associé avec le LGM. Le groupe de gènes comprenant les allèles *iceA1*, *sabA* et *hopZ* a été identifié chez les souches avec lesquelles le risque de développement de LGM était dix fois plus important que pour les souches associées à une gastrite. La faible prévalence de ces souches parmi les souches associées au LGM en fait cependant un marqueur de faible sensibilité.

Le lipopolysaccharide (LPS) de *H. pylori* est considéré comme un facteur de virulence important. La chaîne glucidique externe, appelée antigène O, du LPS de *H. pylori* a une composition similaire aux antigènes de type Lewis X ou Y des groupes sanguins, retrouvés également au niveau des cellules épithéliales gastriques (57). Ce mimétisme bactérien a pour conséquence un échappement à la réponse immunitaire, *H. pylori* n'étant plus reconnu comme du non-soi ce qui favorise la colonisation et contribue à la chronicité de l'infection (58). D'autre part, ce mimétisme est impliqué dans le phénomène d'auto-immunité conduisant à une atrophie gastrique (59). Les antigènes exprimés par le LPS des 39 souches de LGM ont été étudiés (60). Les souches issues de LGM *cagPAI* négatives expriment très fortement les antigènes de type Lewis Y. Ces antigènes de type Y ont été

par le passé associés à la gastrite atrophique auto-immune, ce qui suggère une composante auto-immune dans la physiopathologie du LGM (61).

Les principaux facteurs de pathogénicité connus de *H. pylori* n'étant pas spécifiquement impliqués dans le LGM, des travaux ont été entrepris afin d'identifier de nouveaux facteurs de virulence, voire des marqueurs génétiques, associés aux souches de LGM. Ainsi, par la technique d'hybridation soustractive, utilisée à l'origine pour identifier le *cagPAI*, Lehours *et al.* ont identifié le gène *JHP950* (présent dans la zone de plasticité du génome de *H. pylori*) comme étant un marqueur génétique spécifiquement associé aux souches à haut risque de développement d'un LGM, potentiellement utilisable pour le criblage de ces souches (62, 63). Cependant, la protéine pour laquelle il code ayant une fonction non déterminée, l'intégration de son rôle potentiel dans la physiopathologie du LGM pose problème. L'association des données obtenues par Lehours *et al.* a permis de montrer une association significative de ce gène *JHP950* avec les gènes *iceA1* et *sabA* dans les souches associées au LGM (63). Une étude réalisée sur 120 souches de *H. pylori* (dont 43 souches LGM), utilisant la technique d'hybridation sur puces à ADN, a permis de visualiser que 80% des souches associées au LGM peuvent être regroupées au sein d'une même sous population homogène, par comparaison aux souches associées aux autres pathologies liées à *H. pylori*, suggérant que les souches associées au LGM partagent un fond génétique commun (64). Ce constat a motivé le même groupe à séquencer le génome de l'une de ces souches. Cette souche, nommée B38, représentait d'une part, le premier génome publié d'une souche associée au LGM et, d'autre part, le plus petit génome publié (1 576 758 paires de bases contenant 1528 gènes codant les protéines) de *H. pylori* en comparaison aux six souches précédemment séquencées (64). Le génome de la souche B38 contient l'allèle *vacA s2m2* et ne possède pas les gènes codant pour les principaux facteurs de virulence (absence de *cagA*, *babB*, *babC*, *sabB* et *homB*), confirmant les données précédemment publiées. Plus récemment, trois autres souches de *H. pylori* isolées de patients atteints de LGM ont été séquencées par Wang *et al.*. De nombreuses substitutions, délétions et insertions de gènes ont notamment été identifiées dans les génomes de ces trois souches alors que ces variabilités n'étaient pas présentes au sein des génomes des souches non LGM précédemment publiées (65). Des recherches supplémentaires sont nécessaires pour comprendre l'implication de ces variabilités génétiques dans la lymphomagenèse gastrique. Enfin, les approches protéomiques semblent également mettre en évidence des marqueurs protéiques spécifiques aux

souches associées au LGM sans néanmoins mener à l'identification de nouveaux facteurs de virulence. Ainsi, Bernarde *et al.* ont notamment identifié deux marqueurs protéiques (6 et 13.2 kDa) spécifiquement surexprimés chez les souches associées au LGM étudiées par comparaison aux souches associées à des ulcères duodénaux (66). Une de ces deux protéines a été purifiée et identifiée, il s'agit de la protéine ribosomale RpL7/L12 de 13.2 kDa dont certaines de ces propriétés pourraient, après validation expérimentale, conduire à la considérer comme un facteur de virulence bactérien. RpL7/L12 étant également surexprimée chez les souches associées au cancer gastrique, ce facteur de virulence hypothétique serait en lien avec le développement d'une pathologie maligne et non spécifiquement avec le LGM (67). Enfin, la même équipe a mis en évidence des complexes protéiques apparemment spécifiques d'une souche de LGM comparée à une souche d'ulcère duodéal, notamment le complexe constitué par RpL7/L12 et NapA (68). NapA, ou protéine activatrice des neutrophiles, est un facteur de virulence de *H. pylori* jouant un rôle important dans la réponse inflammatoire via le recrutement et l'activation des polynucléaires neutrophiles (PNN) mais aussi des monocytes, des cellules dendritiques et des lymphocytes (69, 70). Avant d'envisager un lien avec la lymphomagenèse gastrique, ces résultats doivent être confirmés sur un plus grand nombre de souches afin de vérifier la spécificité de ces complexes protéiques vis-à-vis des souches de LGM.

Existe-t-il des facteurs de virulence spécifiquement impliqués dans le devenir de l'infection à *H. pylori* vers le processus de lymphomagenèse gastrique du MALT ?

La réponse est probablement « non ». En effet, les données disponibles à ce jour dans la littérature montrent que les souches associées au LGM ne possèdent pas les facteurs de pathogénicité connus de *H. pylori* et qu'aucun facteur de virulence spécifique au LGM ne semble exister (Tableau 2). Par conséquent, l'étude des facteurs de l'hôte, et notamment l'étude de la réponse immune de l'hôte, pourrait être une piste intéressante à explorer afin d'identifier les mécanismes impliqués dans la physiopathologie de ce lymphome. Un autre élément semble appuyer cette hypothèse. En effet, l'infection à *H. pylori* n'est pas détectée dans environ 5 à 10% des LGM, pourtant une régression du lymphome peut être obtenue, chez une proportion variable de patients selon les études, suite à un traitement d'éradication ciblant *H. pylori* (71–73). Bien que certains de ces cas de LGM négatifs pour *H. pylori* puissent être expliqués par une infection à *H. pylori* non diagnostiquée (manque de sensibilité de la méthode diagnostique utilisée), d'autres cas sont associés à une

infection à une espèce du genre *Helicobacter* différente de *H. pylori* telle qu'une espèce appartenant au groupe des *Helicobacter heilmannii* (*H. heilmannii*) (74, 75). Ainsi, ces données appuient l'hypothèse selon laquelle des facteurs autres que les facteurs bactériens de *H. pylori* pourraient être spécifiquement impliqués dans le développement de ce lymphome gastrique.

Tableau 2 : **Spécificités des souches de *H. pylori* associées au LGM**
Tableau reproduit d'après Floch *et al.* 2017 (49).

Facteurs de virulence	Association avec le LGM
CagA	Présence de cagPAI dans 50% des souches Association possible avec le LGM de haut grade
VacA	Allèle <i>vacA m2</i> prédominant (génotype associé à une faible activité biologique de VacA)
Adhésines (BabA, SabA, ...)	Aucune association
Lipopolysaccharide (LPS)	Expression des antigènes de type Lewis Y par les souches cagPAI négatives isolées de LGM
Marqueurs protéiques autres	Surexpression de deux protéines (6 et 13.2 kDa) dont l'implication biologique est non déterminée
<u>Marqueurs génétiques</u>	
Association des gènes <i>iceA1</i> , <i>sabA</i> et <i>hopZ</i>	Associée à un risque élevé de LGM (marqueur de faible sensibilité)
ORF <i>JHP950</i>	Marqueur génétique des souches isolées de LGM Code une protéine sans fonction connue Association avec les gènes <i>iceA1</i> et <i>sabA</i>
DNA array	Fond génétique commun partagé par les souches isolées de LGM
Séquençage génomique	Identification de variabilités génétiques dans les souches isolées de LGM

II. Lymphome gastrique du MALT (LGM)

1. Classification

Les lymphomes sont un groupe d'hémopathies malignes caractérisées par une prolifération excessive de lymphocytes. Historiquement, on distingue deux entités distinctes, les lymphomes hodgkiniens et les lymphomes non hodgkiniens (LNH). Le lymphome hodgkinien est caractérisé par la présence de cellules tumorales anormalement grandes appelées cellules de Reed-Sternberg qui dérivent des cellules B matures. La classification des LNH se base principalement sur l'origine cellulaire de la tumeur selon que ce sont les lymphocytes B, T ou NK qui prolifèrent. En Europe, les lymphomes B sont de loin les plus fréquents et représentent 80-90% des lymphomes (76). Certains organes, comme l'estomac, les glandes salivaires, les annexes oculaires, les poumons ou la thyroïde sont normalement dépourvus de toute structure lymphoïde. Ces sites anatomiques peuvent pourtant être le siège de lymphomes, regroupés sous le nom de lymphomes de type MALT, le MALT s'étant initialement développé dans un contexte de maladie inflammatoire chronique telle qu'une maladie auto-immune ou une infection chronique (77, 78).

Les lymphomes font référence en premier lieu à des atteintes ganglionnaires. Ceci s'explique par le fait que 75% des lymphomes surviennent au niveau d'un ou plusieurs ganglions. Néanmoins, les 25% des lymphomes restants sont localisés en dehors des ganglions avec comme localisation la plus fréquente (36% des lymphomes extra-ganglionnaires), le tractus gastro-intestinal où siège les lymphomes primitifs gastro-intestinaux (LPGI) (79-81). Ces derniers, représentant 10 à 15% des LNH, sont donc des lymphomes issus du MALT digestif et regroupent différentes entités anatomocliniques qu'il convient de bien connaître car leur origine cellulaire et leur présentation clinique conditionnent leur évolution et leur traitement (80). Les différents types de LPGI ont été initialement décrits par Isaacson, mais actuellement la dernière classification de l'OMS publiée en 2016, prenant en compte l'origine cellulaire déterminée selon des critères morphologiques et immuno-histochimiques, est considérée comme la référence (Tableau 3 (82-85, 80). Les lymphocytes B et T peuvent donner naissance aux LPGI, mais les lymphomes à cellules B sont beaucoup plus fréquents (90%) que les lymphomes à cellules T (10%) (80). Dans les pays occidentaux, les lymphomes gastriques sont les plus

fréquents (60 à 75% des LPGI) et ils sont représentés par deux types majeurs: (i) le DLBCL, composé de grandes cellules B matures, se développant généralement de novo mais pouvant aussi être secondaire à un LGM transformé ; (ii) le lymphome extraganglionnaire de la zone marginale aussi appelé LGM, correspondant à la prolifération monoclonale de petites cellules B matures au niveau de la muqueuse gastrique normalement dépourvue de tissu lymphoïde (80, 81). Ce dernier est un lymphome de faible degré de malignité, d'évolution indolente, généralement localisé et pouvant se transformer en lymphome de haut degré de malignité (DLBCL) lorsqu'apparaît un ou plusieurs contingents de grandes cellules. Comme cela a été précédemment argumenté dans la partie I-3), le développement du LGM est directement lié à l'infection à *H. pylori* bien que l'on ne sache pas pourquoi cette évolution survienne seulement chez un nombre très faible de sujets infectés.

Tableau 3 : **Différents types histopathologiques de lymphomes gastro-intestinaux** (selon la classification de l'OMS, publiée en 2016).
D'après Matysiak-Budnik *et al.* 2018 (80).

<p>B Lymphomas</p> <ul style="list-style-type: none"> • Extra-nodal marginal zone of the Mucosa Associated Lymphoid Tissue: MALT including alpha Chain Disease (IPSID) <ul style="list-style-type: none"> • Diffuse large B-cell • Mantle cell • Burkitt • Follicular <p>T Lymphomas</p> <ul style="list-style-type: none"> • Associated or not with an intestinal-type enteropathy (with or without villous atrophy) of low and especially high grade of malignancy

2. Epidémiologie

Les données épidémiologiques concernant le LGM varient quelque peu selon les pays en raison de sa rareté, de la difficulté diagnostique de cette pathologie et de la variabilité du suivi médical selon les pays. Néanmoins, l'incidence du LGM reste faible dans la majorité des pays occidentaux. D'après les études disponibles, l'incidence européenne serait estimée entre 0.2 et 0.8 personnes pour 100 000 habitants (86). De façon intéressante, une étude italienne a observé une diminution de l'incidence du LGM sur la période étudiée, passant de 1.4 cas pour 100 000 en 1997 à 0.1 en 2007 (87). Ces données confirment les observations faites par une équipe aux Pays-Bas sur une période d'étude similaire, montrant ainsi une diminution de l'incidence du LGM entre les années 1990 et

2000, dans deux régions européennes (Italie et Pays-Bas) distinctes (88). Ces variations d'incidence d'un pays à l'autre d'une part et, au sein d'un même pays au cours du temps d'autre part, pourraient s'expliquer en partie par la variabilité des techniques de détection utilisées n'ayant pas la même sensibilité, mais aussi par des facteurs de risque inégaux entre les populations étudiées tels que la prévalence de l'infection à *H. pylori* comme cela a notamment été observé entre différentes régions d'Italie (33, 87). D'après de récentes études européennes, le LGM toucherait de façon équivalente les hommes et les femmes et l'âge médian du diagnostic serait 67 ans, avec une incidence maximale entre 70 et 74 ans (88, 89).

3. Présentation clinique

La symptomatologie clinique décrite par les patients atteints de LGM est non spécifique ce qui rend difficile le diagnostic précoce de l'infection pourtant essentiel à la mise en place d'un traitement adapté (6, 90). Les symptômes observés dans la majorité des cas se résument à une dyspepsie, des douleurs abdominales et/ou des douleurs épigastriques pouvant évoquer une maladie ulcéreuse (91–93, 89). Plus rarement des symptômes plus sévères tels qu'une anémie, des saignements gastro-intestinaux (mélénas, hématomèses) ou des vomissements sont retrouvés (91–93, 89). Le LGM peut également être découvert à l'occasion d'une performance digestive (89). L'altération de l'état général est le plus souvent modérée, se limitant à un léger amaigrissement (91). La présence de signes généraux plus importants tels qu'un amaigrissement franc, une fièvre et/ou des sueurs nocturnes, est en revanche évocatrice d'un DLBCL (90). Le LGM évolue lentement de façon progressive en restant dans la majorité des cas localisé à l'estomac (90). Compte tenu du peu de spécificité de la présentation clinique, le diagnostic est réalisé par l'analyse de biopsies gastriques prélevées par endoscopie, le plus souvent dans un contexte d'exploration de troubles dyspeptiques.

4. Diagnostic du LGM

a. Aspects endoscopiques

Le corps gastrique et l'antra sont les sites prédominants d'infiltration tumorale dans le LGM (94, 92). L'aspect endoscopique au moment du diagnostic est peu spécifique et peut

prendre des aspects lésionnels très différents allant du simple érythème aux érosions ou à l'ulcération creusante entourée de gros plis, plus évocatrice (95, 89). La présence de lésions malignes claires telles que des lésions polypoïdes volumineuses est le plus souvent associée à un LGM de haut degré de malignité (96, 94). Ainsi, dans près de 15% des cas, le LGM est histologiquement établi alors que macroscopiquement à l'endoscopie la muqueuse gastrique est d'apparence saine ou présente seulement quelques lésions hémorragiques pétéchiales (97).

Compte tenu du peu de spécificité des signes endoscopiques et de l'existence possible de lésions gastriques multifocales, un nombre suffisant de biopsies, réalisées à la fois au niveau des lésions macroscopiques et de la muqueuse d'apparence normale, est nécessaire (98, 99). Cette procédure nommée « cartographie gastrique » (Figure 5) est recommandée selon les travaux publiés en 2011 par le groupe EGILS (European Gastro-Intestinal Lymphoma Study) (100). Le nombre minimal de biopsie à prélever sur les lésions visibles est de dix. Le nombre de biopsies à effectuer sur une muqueuse macroscopiquement normale n'est pas précisé. Cependant, quatre biopsies de l'antrum et du corps, respectivement, et deux biopsies supplémentaires du fundus semblent raisonnables. Ce type de protocole n'est pas réalisé en première intention, mais souvent suite à une première endoscopie faisant suspecter un LGM (100).

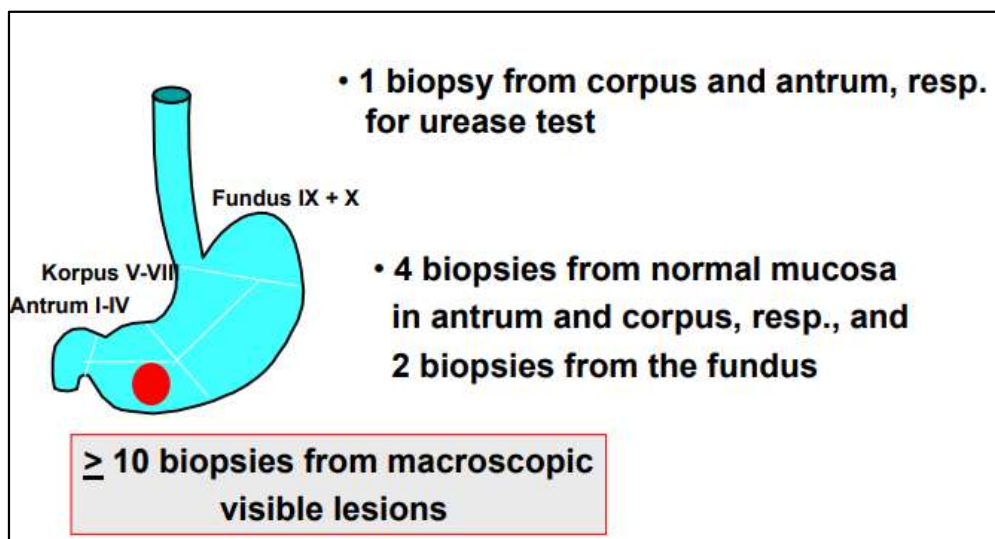


Figure 5: **Cartographie gastrique.**
D'après Fischbach *et al.* 2014 (100).

b. Aspect histologique

Le diagnostic du LGM est basé sur des critères histologiques selon la classification de l'OMS et doit toujours être confirmé par un pathologiste expert (99). En France, une seconde analyse histologique par un pathologiste dit expert appartenant au groupe national d'experts pathologistes des lymphomes (LYMPHOPATH), est obligatoire pour tous les types de lymphomes (80).

L'estomac est normalement dépourvu de tissu lymphoïde. Un petit infiltrat lymphoïde peut cependant apparaître, au sein de la muqueuse gastrique (au niveau basal) en réponse à l'infection à *H. pylori* lors d'une gastrite aiguë ou chronique. Dans certains cas, cette réaction inflammatoire gastrique s'accompagne de l'apparition de follicules lymphoïdes à partir desquels peut émerger le LGM. Les changements histologiques observés entre la muqueuse gastrique normale, la gastrite chronique active et le LGM ont été décrits par Wotherspoon *et al.* (Tableau 4) (38).

Les caractères histologiques du LGM sont stéréotypés et décrits sur des coupes de biopsies gastriques colorées à l'hémalum-éosine (H&E). Ainsi, le LGM se caractérise par une infiltration au niveau de la muqueuse gastrique de cellules lymphoïdes, faite de petites cellules B monomorphes d'allure centrocytique (6). Parfois une différenciation plasmocytoïde peut être observée parmi les petits lymphocytes (6, 101). Les cellules sont organisées en follicules lymphoïdes organisés à l'image des plaques de Peyer communément retrouvées dans l'iléon terminal (6). Le LGM est aussi caractérisé par la présence de lésions lympho-épithéliales (LLE) dues à une prolifération excessive de cellules B conduisant successivement à une infiltration de l'épithélium glandulaire puis à une destruction des cellules épithéliales gastriques (Figure 6) (101). Il est établi que l'on peut retrouver, au sein d'un LGM de faible degré de malignité, une proportion variable de grandes cellules transformées, sans pour autant porter le diagnostic de LGM de haut degré de malignité (99).

Les infiltrats lymphoïdes sont composés majoritairement de lymphocytes B ne présentant pas de profil antigénique spécifique mais ayant le même immunophénotypage que les lymphocytes B de la zone marginale présents dans la rate, les plaques de Peyer et les ganglions lymphoïdes (1). L'étude immunohistochimique met en évidence l'expression des marqueurs de surfaces bien spécifiques et typiques de la zone marginale : CD20, CD79a, Bcl2 et une immunoglobuline membranaire de type M ainsi que l'absence

d'expression de certains anticorps tels que IgD, CD5, CD10, Bcl6 et cycline D1, utiles au diagnostic différentiel avec d'autres lymphomes B à petites cellules (78, 6).

Un réarrangement monoclonal du gène des chaînes lourdes des immunoglobulines (IGH) est observé dans le LGM, avec une monotypie lambda ou kappa des chaînes légères (102). Cette monoclonalité peut être détectée par méthodes moléculaires selon un protocole standardisé recommandé (103). L'apparition de cette monoclonalité des cellules B lors d'une gastrite annonce souvent l'évolution vers un LGM (104). La recherche de la clonalité n'est pas obligatoire mais peut être utile en cas de diagnostic difficile notamment lorsque les signes histologiques et immunophénotypiques ne permettent pas un diagnostic de certitude (80).

Le LGM est un lymphome B de bas grade avec un infiltrat de petits lymphocytes, sa transformation vers un lymphome de haut grade, appelé DLBCL, n'est pas classique. Les LLE et les follicules lymphoïdes disparaissent pour laisser place à des grandes cellules à l'allure de centroblastes ou à des immunoblastes avec parfois une différenciation plasmocytaire (Figure 7) (101). Dans ce cas, l'infiltrat peut être mineur ou majeur selon le stade de transformation. La transformation en LGM de haut grade est de moins bon pronostic (96).

Tableau 4 : **Score histologique de Wotherspoon pour le diagnostic du LGM.**
D'après Wotherspoon *et al.* 1993 (38).

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

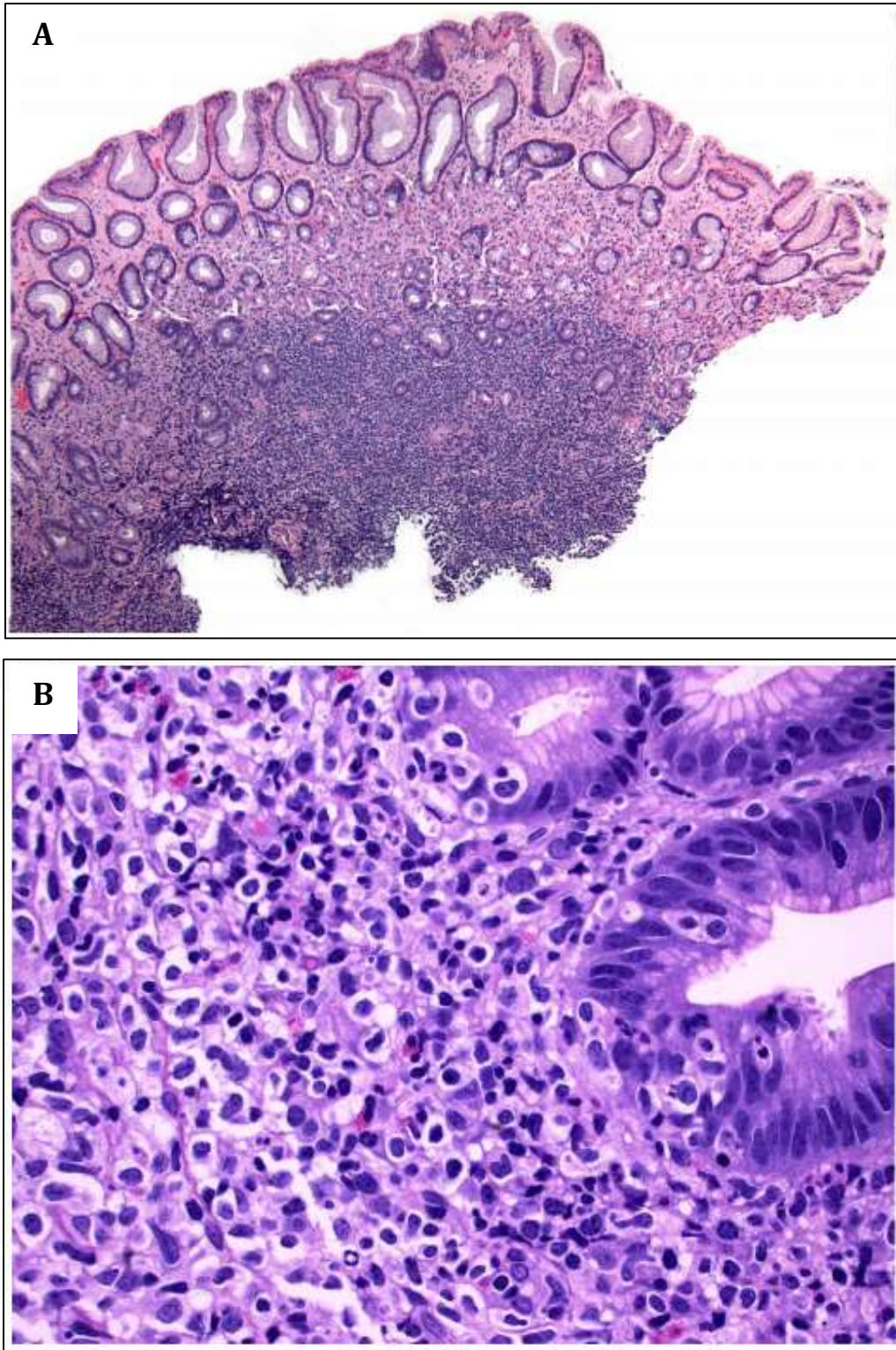


Figure 6 : **Aspect histologique caractéristique du LGM.**

D'après Bautista-Quach *et al.* 2012 (101).

(A) Coupe de biopsie gastrique humaine (coloration H&E) montrant au sein de la muqueuse gastrique un important infiltrat lymphoïde constitué de petits lymphocytes monomorphes d'allure centrocytique (grossissement x40) et (B) grossissement sur des LLE où de petits lymphocytes monomorphes d'allure centrocytique infiltrent l'épithélium glandulaire (grossissement x400).

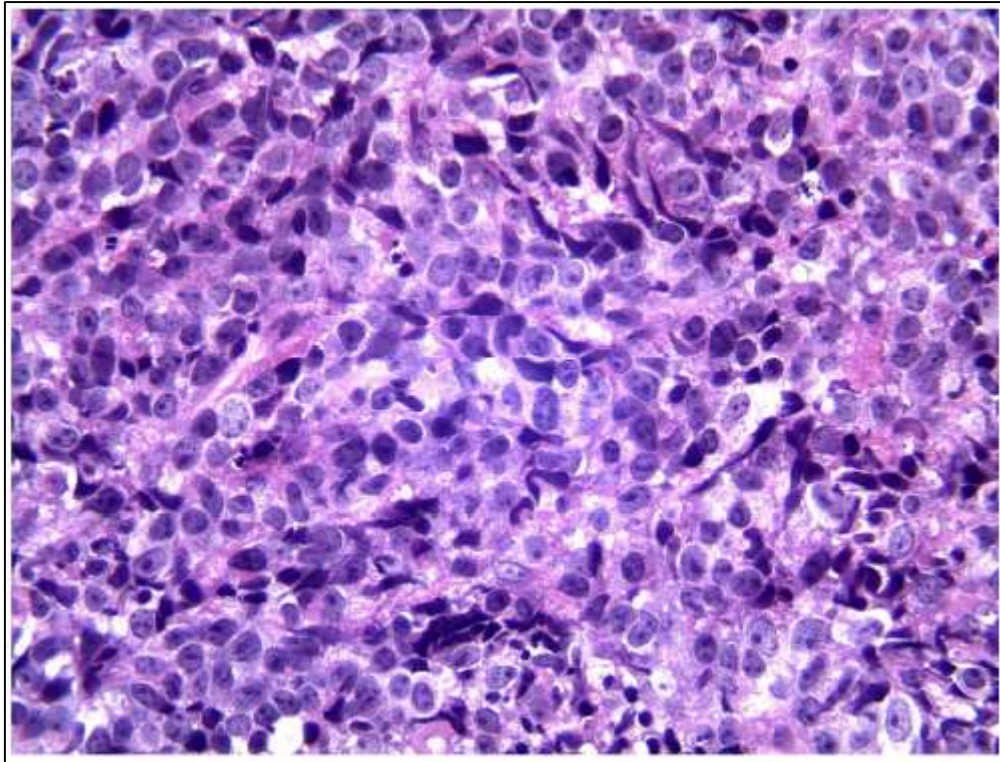


Figure 7: **Aspect histologique d'un LGM de haut grade ou DLBCL secondaire.**

D'après Bautista-Quach *et al.* 2012 (101).

Coupe de biopsie gastrique humaine (coloration H&E, grossissement x400) montrant au sein de la muqueuse gastrique un infiltrat constitué de grandes cellules lymphoïdes tumorales composées d'un cytoplasme basophile et d'un noyau volumineux présentant une chromatine vésiculaire avec des nucléoles proéminents.

*c. Etablissement du statut *H. pylori**

Compte tenu de l'association directe entre le LGM et l'infection à *H. pylori*, le dépistage de l'infection à *H. pylori* est obligatoire lors du diagnostic de LGM (80). Dans ce contexte, l'histologie est la méthode diagnostique de premier choix, bien que dans certaines situations le recours à d'autres techniques puisse s'avérer nécessaire (99).

L'histologie permet donc à la fois, l'établissement du diagnostic du LGM et la détection de *H. pylori* mais également d'autres espèces du genre *Helicobacter* telles que les espèces du groupe *H. heilmannii* pouvant être, à titre exceptionnel, associées au LGM (0.5% des LGM d'après Morgner *et al.*) (74). Cette recherche est effectuée sur des biopsies, prélevées au niveau de l'antra et du corps de la muqueuse gastrique d'apparence normale, après coloration au Giemsa, et si nécessaire, après immunohistochimie ou hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) afin d'augmenter la sensibilité de détection en particulier en cas de faible charge bactérienne (105, 99). Les performances du diagnostic direct anatomo-

pathologique de la présence de *H. pylori* sur les biopsies gastriques est excellent à condition que l'anatomo-pathologiste soit sensibilisé à cette recherche et que le nombre de lames lues soit important. Il a été montré que la sensibilité de l'histologie pour le diagnostic de *H. pylori* augmentait avec le nombre de biopsies, et atteignait 95% avec cinq biopsies lues (106). Dans le cadre du diagnostic du LGM, ces conditions optimales sont respectées étant donné qu'un grand nombre de biopsies sont examinées et, dans de nombreux cas, revues par un pathologiste expert.

En cas d'histologie positive, la culture est recommandée comme deuxième test diagnostique si une autre endoscopie est nécessaire pour le diagnostic ou la cartographie gastrique. Cet examen bactériologique peut être effectué initialement si le nombre de biopsies prélevées lors de la première gastroscopie est suffisant. En effet, la culture est réalisée sur 2 biopsies supplémentaires (au niveau de l'antrum et du corps) à envoyer au laboratoire de bactériologie en milieu de transport spécifique. Dans le LGM, la culture a une sensibilité plus faible que l'histologie même si elle est réalisée dans de bonnes conditions, mais elle permet de connaître la sensibilité de la souche incriminée aux antibiotiques et au besoin d'adapter le traitement d'éradication (107). Conjointement à la culture, sur les mêmes prélèvements de biopsie gastrique, les méthodes moléculaires, et en particulier une PCR (polymerase chain reaction) en temps réel peuvent être utilisées pour la détection simultanée de *H. pylori* et des mutations associées à la résistance aux macrolides (108, 109).

En cas d'histologie négative, la sérologie est recommandée (32, 107). Bien qu'à ce jour aucune étude de grande envergure n'existe, la PCR en temps réel peut également avoir sa place dans la stratégie diagnostique. En effet, cette méthode présente une excellente sensibilité et spécificité, elle permet également la détection de mutations associées à la résistance aux macrolides, et elle ne nécessite pas de conditions particulières pour le transport des biopsies (110).

Les méthodes diagnostiques, à l'exception de la sérologie, doivent être réalisées au moins 4 semaines après l'arrêt des antibiotiques et au moins 2 semaines après l'arrêt des anti-sécrétoires (inhibiteur de la pompe à protons (IPP) ou anti-H2) car ces traitements peuvent entraîner un résultat faussement négatif du fait de la diminution de l'inoculum bactérien (111, 112).

d. Bilan d'extension

Le LGM reste le plus souvent localisé au niveau de l'estomac, mais peut présenter comme tout lymphome d'autres localisations tumorales, d'où l'intérêt et la nécessité d'un bilan d'extension (100). L'écho-endoscopie gastrique est ainsi essentielle dans l'évaluation initiale de l'extension locorégionale du lymphome et aidera au suivi après traitement (99). Le reste du bilan d'extension (notamment tomодensitométrie, endoscopie digestive haute et basse) permettra de confirmer le caractère habituellement localisé du LGM (99, 80). Les localisations secondaires concernent en particulier les muqueuses hébergeant des lymphocytes de type MALT, soit à l'état physiologique (poumon, intestin), soit à l'état pathologique (thyroïde, cavum, parotide) (96). L'atteinte médullaire et la présence d'adénopathies périphériques sont rares (95).

Le bilan de ces examens permet de classer le lymphome en différents stades. Plusieurs classifications existent comme la classification de Lugano ou la classification d'Ann Arbor modifiée, selon Musshoff et Radaszkiewicz, en vue de son application aux lymphomes extra ganglionnaires gastro-intestinaux (Tableau 5) (113–116). L'arrivée de l'échographie endoscopique, permettant une évaluation de la profondeur d'infiltration du lymphome au sein des différentes couches de la paroi gastrique et l'implication des ganglions lymphatiques périgastriques, a conduit à la proposition d'une nouvelle classification par le groupe EGILS, cette dernière étant inspirée de la classification TNM (Tableau 6) (117). Ce système de classification de Paris (TNMB) décrit les caractéristiques les plus importantes des lymphomes gastro-intestinaux: (T) la profondeur d'infiltration du lymphome au niveau gastrique, (N) l'infiltration des ganglions lymphatiques et (M) la propagation du lymphome via des métastases. En l'absence de régression du lymphome après un traitement d'éradication de *H pylori*, une biopsie de la moelle osseuse est recommandée afin d'évaluer (B) l'atteinte médullaire dans le but d'exclure une maladie disséminée avant l'instauration d'un traitement locorégional par radiothérapie (99).

La plupart des études cliniques montre que plus de 90% des patients atteints d'un LGM ont été diagnostiqués à un stade localisé à l'estomac avec ou sans extension aux ganglions périgastriques (stade IE/IIIE) (96, 92, 99). Dans une minorité de cas, une autre localisation est trouvée, les plus fréquentes étant les localisations pulmonaires et ostéo-médullaires (91). La présence simultanée d'un LGM et d'un adénocarcinome gastrique est exceptionnelle au stade du diagnostic (118, 119).

Tableau 5 : **Comparaison des classifications d'Ann Arbor modifiée et de Lugano.**
D'après Schizas *et al.* 2017 (116).

Classification d'Ann Arbor modifiée		Classification de Lugano
Stade IE	Infiltration tumorale localisée à l'estomac sans atteinte ganglionnaire IE1 : muqueuse et sous-muqueuse IE2 : musculéuse et séreuse	Stade I
Stade IIE	Extension aux ganglions régionaux sans atteinte extra-abdominale IIE1 : atteinte des ganglions péri-gastriques contigus IIE2 : envahissement des ganglions régionaux non contigus	Stade II II1 : atteinte des ganglions locaux II2 : atteinte des ganglions distants
Stade IIIE	Extension aux ganglions extra-abdominaux situés de part et d'autre du diaphragme	Stade III
Stade IV	Extension à des organes autres que l'estomac et aux ganglions lymphatiques	Stade IV

Tableau 6: **Système de classification de Paris.**
D'après Ruskoné-Fourmestaux *et al.* 2003 (117).

TX	Lymphoma extent not specified
TO	No evidence of lymphoma
T1	Lymphoma confined to the mucosa/submucosa
T1m	Lymphoma confined to mucosa
T1sm	Lymphoma confined to submucosa
T2	Lymphoma infiltrates muscularis propria or subserosa
T3	Lymphoma penetrates serosa (visceral peritoneum) without invasion of adjacent structures
T4	Lymphoma invades adjacent structures or organs
NX	Involvement of lymph nodes not assessed
NO	No evidence of lymph node involvement
N1	Involvement of regional lymph nodes
N2	Involvement of intra-abdominal lymph nodes beyond the regional area
N3	Spread to extra-abdominal lymph nodes
MX	Dissemination of lymphoma not assessed
MO	No evidence of extranodal dissemination
M1	Non-continuous involvement of separate site in gastrointestinal tract (eg, stomach and rectum)
M2	Non-continuous involvement of other tissues (eg, peritoneum, pleura) or organs (eg, tonsils, parotid gland, ocular adnexa, lung, liver, spleen, kidney, breast etc.)
BX	Involvement of bone marrow not assessed
B0	No evidence of bone marrow involvement
B1	Lymphomatous infiltration of bone marrow

e. Anomalies moléculaires associées

L'infection à *H. pylori*, non seulement induit et entretient une prolifération des cellules B créant des conditions favorables à l'instabilité génétique, mais elle attire également et active des PNN qui ont une capacité cytotoxique du fait du relargage de métabolites réactifs de l'oxygène (120). Ainsi, de nombreuses anomalies génétiques ont été décrites au cours du LGM telles que des translocations chromosomiques induisant une lymphoprolifération alors indépendante de la stimulation antigénique exercée par *H. pylori* et donc ne régressant plus après antibiothérapie (1). Les anomalies cytogénétiques les plus souvent retrouvées dans le LGM sont des translocations entraînant l'activation du facteur de transcription nucléaire kappa B ou NF-κB. Ce facteur de transcription est impliqué dans l'inflammation mais aussi dans la survie, la différenciation et la prolifération cellulaire. Cinq translocations ont été décrites dans le LGM (Tableau 7). Aucune de ces translocations n'est cependant suffisante pour induire à elle seule un LGM, suggérant le rôle d'autres facteurs associés, dont les facteurs immuns, génétiques et environnementaux (121).

La translocation t(11;18)(q21;q21) conduisant au gène de fusion API2/MALT1 est la mieux caractérisée, elle est retrouvée dans 25% des LGM et plus fréquemment dans les LGM de stade avancé (IIE) que dans ceux localisés à l'estomac (stade IE) (122, 99). Lorsqu'elle est présente, cette translocation est, dans la plupart des cas, la seule aberration chromosomique présente. En revanche, les LGM négatifs pour la t(11;18), présentent généralement un large éventail d'anomalies chromosomiques, y compris la trisomie des chromosomes 3, 12 et 18 (78). La translocation t(11;18) n'est pas détectée dans les LGM de haut degré de malignité ni dans les autres lymphomes gastriques, mais elle peut être retrouvée dans des lymphomes de la zone marginale d'autres sites muqueux tels que le poumon et les annexes oculaires (122, 123). Cette translocation conduit à une expression constitutive de NF-κB par fusion des gènes API2 (apoptosis inhibitor 2) et MALT1 (mucosa-associated lymphoid tissue translocation protein 1) d'où la protection des cellules contre l'apoptose (124). De plus, cette translocation est significativement associée à des souches CagA positives induisant une forte réponse inflammatoire (125). La détection de cette translocation peut être envisagée au moment du diagnostic du LGM puisqu'elle apporte une valeur prédictive au traitement d'éradication de *H. pylori* (99). En effet, les patients ne possédant pas cette translocation présentent une meilleure réponse au traitement d'éradication et une médiane de survie plus importante (126). De

même, Liu *et al.* ont montré la présence de cette translocation chez près de 70% des patients non répondeurs aux traitement d'éradication dont 60% présentant un LGM pourtant localisé à l'estomac et donc habituellement bon répondeur (127). En revanche, la translocation n'est observée que dans 3% des LGM qui répondent au traitement d'éradication de *H. pylori* (128).

La recherche de cette translocation d'intérêt peut donc être effectuée directement sur des biopsies paraffinées par une technique de FISH utilisant des sondes fluorescentes commerciales ciblant la protéine de fusion ou bien par une technique de biologie moléculaire ciblant les transcrits ARNm correspondants (99).

La translocation t(1;14)(p22;q32) a également été caractérisée bien que retrouvée dans de rares cas de LGM (98, 101). Elle entraîne la surexpression de la protéine Bcl-10 (B-cell chronic lymphocytic leukemia/lymphoma protein 10) dont le gène est placé sous le contrôle du promoteur du gène IGH. Cette protéine possède un domaine de recrutement et d'activation des caspases et peut donc jouer un rôle dans la régulation de l'apoptose. La protéine Bcl-10 sauvage a un rôle pro-apoptotique et anti-tumoral, tandis que la protéine Bcl-10 tronquée, produite suite à la translocation, est capable d'activer NF- κ B et la prolifération cellulaire lui conférant une activité oncogénique (129–131). La translocation t(1;2)(p22;p12) est une variante de la translocation t(1;14)(p22;q32), le gène de Bcl-10 étant juxtaposé au gène IGK (chaîne légère kappa des immunoglobulines) conduisant également à une surexpression de Bcl-10 (132). A l'instar des cas avec translocation t(11;18), les patients atteints d'un LGM avec translocation t(1;14) ou t(1;2) présenteraient un lymphome d'un stade plus avancé et associé à un plus fort taux d'échec au traitement d'éradication de *H. pylori* (133).

La translocation t(14;18)(q32;q21) conduisant au gène de fusion IGH/MALT1 a également été décrite dans de rare cas de LGM, bien que retrouvée plus fréquemment dans les lymphomes du MALT non gastro-intestinaux (133). Elle entraîne la surexpression de la protéine MALT1 dont le gène est placé sous le contrôle du promoteur du gène IGH. De même que les translocations précédemment citées, l'activité oncogénique est liée à l'activation de la voie NF- κ B, facteur de transcription de gènes impliqués notamment dans la survie et la prolifération des cellules B (134).

La translocation t(3;14)(p14;q32) a également été mise en évidence dans le LGM mais sa signification clinique n'a pas été clairement établie. Bien que le rôle oncogénique du transcrit de fusion correspondant IGH-FOXP1 soit inconnu, Wlodarska *et al.* ont rapporté

en 2005, un cas de LGM de haut grade de type DLBCL associé à cette translocation laissant suggérer la possibilité qu'un LGM avec translocation t(3;14)(p14;q32) puisse être considéré à risque de transformation en lymphome de haut grade (134, 135).

Des anomalies génétiques surnuméraires au niveau des chromosomes 3, 12 et 18 ont également été décrites dans 5 à 65% des LGM notamment dans les LGM négatifs pour la translocation t(11;18)(q21;q21) (101). La trisomie 3 est l'anomalie génétique la plus ancienne connue bien que son importance fonctionnelle dans la progression de la pathologie soit mal établie (136). Cette trisomie n'est d'ailleurs pas spécifique du LGM et est également retrouvée dans d'autres lymphomes. La forme la plus couramment détectée est la 3q27 impliquant le gène BCL6 dont le rôle oncogénique, bien connu dans certains lymphomes B, reste à ce jour hypothétique dans le LGM (133).

Tableau 7 : **Anomalies chromosomiques décrites dans le LGM.**
D'après Bautista-Quach *et al.* 2012 (101).

Anomalie	Protéine de fusion	Fréquence %	Conséquence clinique
t(11;18)(q21;q21)	API2-MALT1	25%	Résistance aux traitements antibiotiques
t(1;14)(p22;q32)	BCL10-IGH	rare	Résistance aux traitements antibiotiques
t(1;2)(p22;p12)	BCL10-IGK	rare	Résistance aux traitements antibiotiques
t(14;18)(q32;q21)	IGH-MALT1	rare	Non connue
t(3;14)(p14;q32)	FOXP1-IGH	rare	Rapportée dans un cas de DLBCL post LGM
Trisomies 3, 12, 18	-	5-65%	Non connue

API2 : Apoptosis inhibitor 2 ; MALT1 : Mucosa-associated lymphoid tissue translocation protein 1 ; BCL10 : B-cell chronic lymphocytic leukemia/lymphoma protein 10 ; IGH : Immunoglobulin heavy chain ; IGK : Immunoglobulin kappa light chain ; FOXP1 : Forkhead box protein P1.

5. Traitement

Le traitement du LGM ne fait pas toujours l'objet d'un consensus. Néanmoins, il peut suivre les recommandations européennes provenant de l'accord d'experts de l'EGILS et de l'ESMO (European Society for Medical Oncology) (Figure 8) (99, 115).

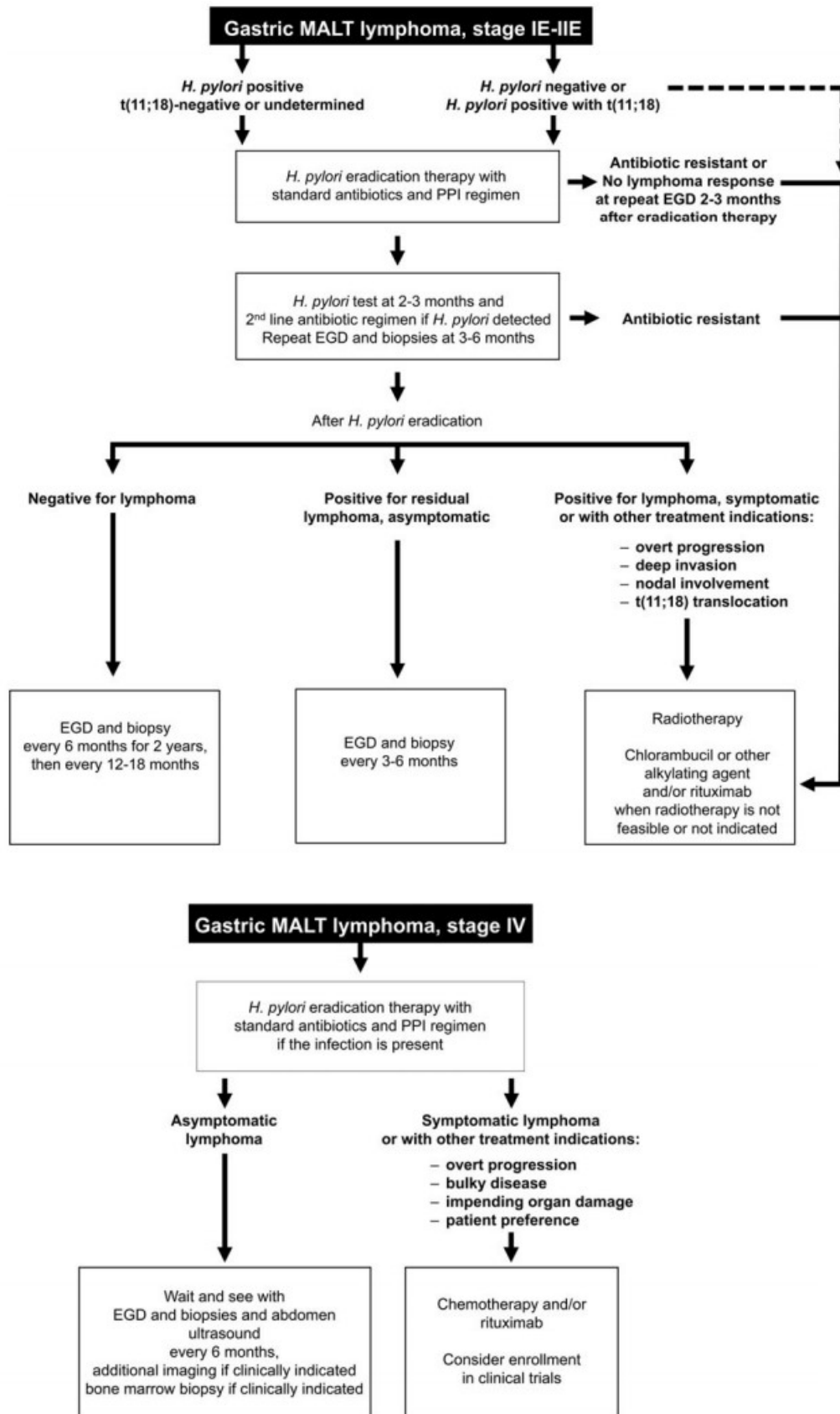


Figure 8 : **Algorithme de traitement du LGM proposé par l'ESMO en 2013.**
D'après Zucca *et al.* 2013 (115). EGD : esophagogastroduodénoscopie.

a. Traitement d'éradication de l'infection à *H. pylori*

La plupart des cas de LGM sont provoqués par l'infection à *H. pylori*. Par conséquent, le traitement d'éradication de cette bactérie constitue la première étape de la prise en charge de ce lymphome. De plus, il est maintenant bien démontré que l'éradication de l'infection à *H. pylori* est susceptible d'entraîner la régression du processus tumoral. Les auteurs s'accordent pour recommander l'éradication de *H. pylori* chez tous les patients présentant un LGM indépendamment du stade de la maladie et du statut *H. pylori* (115). En effet, une régression du LGM peut être observée après éradication de l'infection à *H. pylori* chez des patients à priori *H. pylori* négatifs (71, 137, 138). Une des hypothèses expliquant la réponse au traitement d'éradication est que les patients pourraient être infectés par une bactérie autre que *H. pylori* qui serait éliminée lors du traitement antibiotique, comme les *Helicobacter* du groupe *heilmannii* (74). La seconde hypothèse, la plus probable, est liée à la difficulté à diagnostiquer l'infection à *H. pylori* chez certains patients atteints d'un LGM (107). En effet, aucune méthode diagnostique n'est sensible à 100% que ce soit les méthodes invasives (histologie, culture et biologie moléculaire) ou non invasives (test respiratoire à l'urée marquée, sérologie). Les méthodes invasives peuvent être facilement prises en défaut notamment en cas d'inoculum très faible et donc quasiment indétectable.

Une méta-analyse de plus de 30 études portant sur des LGM de stades IE1 à IIE1 (selon la classification d'Ann Arbor modifiée) a montré que l'éradication de *H. pylori* permettait la régression du lymphome chez près de 78% des patients, avec un taux de rémission significativement plus élevé en cas de lymphome de stade I versus un lymphome de stade IIE1 (78,4% vs 55,6%) (139). De même, la régression tumorale est plus fréquente en cas de LGM localisé à la sous muqueuse, tandis que les lymphomes présentant une invasion plus profonde ainsi que ceux présentant la translocation t(11;18)(q21;q21) sont moins répondeurs (139–141).

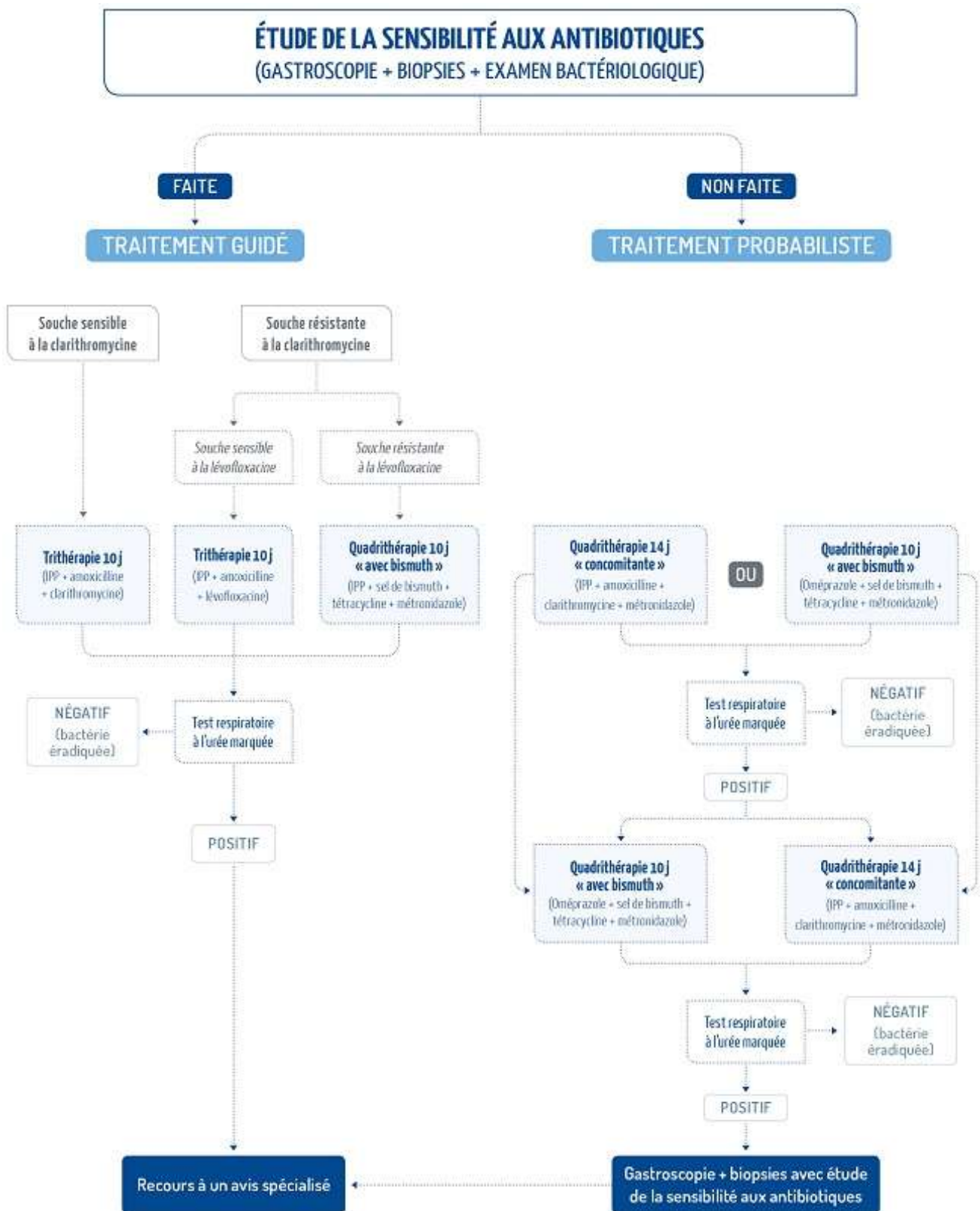
Une rémission complète peut être observée chez certains patients présentant un LGM de haut grade. Bien que la chimiothérapie soit recommandée en première ligne, le traitement antibiotique l'est également compte tenu des effets indésirables limités et du bénéfice possible en particulier dans les stades précoces de LGM de haut grade (142, 139, 141, 80). De plus, ce traitement d'éradication pourrait éviter une résurgence de la pathologie après chimiothérapie due à la présence de *H. pylori*.

Le traitement d'éradication de *H. pylori* dans le LGM est identique à celui utilisé dans les autres pathologies induites par la bactérie et doit se conformer aux recommandations nationales ou internationales (143). Ainsi, le choix du traitement d'éradication en France doit suivre les recommandations émises en 2017 par la HAS (Haute Autorité de Santé) tenant compte, lorsque cette information est disponible, des éventuelles résistances de la souche aux antibiotiques, pouvant être détectées par méthodes phénotypiques et génotypiques (Figure 9) (144). Ainsi, lorsque l'on dispose d'une étude de la sensibilité aux antibiotiques, le traitement recommandé est une trithérapie guidée associant un IPP et deux antibiotiques pendant 10 jours. En cas de sensibilité à la clarithromycine, le traitement recommandé associe un IPP, l'amoxicilline et la clarithromycine. En cas de résistance à la clarithromycine, il associe un IPP, l'amoxicilline et la lévofloxacine à condition que la souche y soit sensible. A défaut, il est recommandé de prescrire une quadrithérapie « avec bismuth », commercialisée en France sous le nom de Pylera®, associant l'oméprazole, un sel de bismuth, la tétracycline et le métronidazole. En cas d'allergie documentée à l'amoxicilline et de souche sensible à la clarithromycine, il est recommandé de prescrire une trithérapie associant un IPP, la clarithromycine et le métronidazole. En cas d'allergie documentée à l'amoxicilline et de résistance à la clarithromycine, il est recommandé de prescrire une quadrithérapie « avec bismuth ».

En l'absence d'évaluation de la sensibilité de la souche aux antibiotiques, le traitement sera probabiliste. Dans ce cas, deux options sont possibles (i) une quadrithérapie « concomitante » de 14 jours associant un IPP, l'amoxicilline, la clarithromycine et le métronidazole ou ; (ii) une quadrithérapie « avec bismuth » de 10 jours. Cette dernière est à privilégier en cas de prise antérieure de macrolide ou d'allergie avérée à l'amoxicilline.

Le contrôle de l'éradication de la bactérie doit être réalisé systématiquement après chaque ligne de traitement. Le test respiratoire à l'urée marquée est une méthode performante pour contrôler l'efficacité de l'éradication à condition d'être réalisée au moins 4 semaines après l'arrêt des antibiotiques et au moins 2 semaines après l'arrêt des IPP.

En cas d'échec de la première ligne de traitement, une seconde ligne comportant des antibiotiques non utilisés précédemment doit être mise en place.



* Cet algorithme ne s'applique pas à la femme enceinte ou allaitante.

Figure 9 : **Algorithme de traitement en cas d'infection à *H. pylori* chez l'adulte.**
D'après les recommandations émises par la HAS en 2017 (144).

b. Alternatives thérapeutiques

Un traitement locorégional par radiothérapie ou un traitement général par immunothérapie/chimiothérapie peut être proposé en cas de non régression du lymphome après l'éradication de *H. pylori* notamment en cas de LGM de stade avancé ou de LGM associé à un statut *H. pylori* négatif ou à une translocation t(11;18) puisque considérés comme moins susceptibles de répondre au traitement d'éradication (80). Bien que la gastrectomie soit curative dans le traitement du LGM, la stratégie actuelle est de favoriser des traitements permettant la conservation de l'estomac compte-tenu des conséquences de cette chirurgie notamment sur la qualité de vie du patient (145, 146). Ainsi, la gastrectomie n'est proposée qu'en cas de perforation ou d'hémorragie non contrôlée par un traitement endoscopique, ce qui est extrêmement rare (80).

Chez certains patients une maladie lymphomateuse résiduelle microscopique peut persister au niveau histologique sans lésion macroscopique, une stratégie de surveillance peut alors être pratiquée de même que chez les patients âgés ou présentant des comorbidités (80).

Il n'existe pas de consensus concernant l'utilisation de ces alternatives thérapeutiques.

Pour les LGM localisés (stades IE et IIE1), réfractaires aux traitements d'éradication, la radiothérapie exclusive donne de très bons résultats sans effet secondaire à long terme (139). Les doses de radiations ont été diminuées ces dernières années. Une radiothérapie à faible dose (30-40Gy) au niveau de l'estomac et des ganglions adjacents donne un taux de rémission complète de 90 à 100% avec une survie à 5 ans sans rechute de 80% (147, 148). Les excellents résultats et la bonne tolérance de la radiothérapie à faible dose (30 Gy) ont été récemment confirmés par une étude prospective française incluant 53 patients avec un suivi à long terme (médiane de 4,9 ans), montrant un taux de réponse de 98% et une survie globale de 94% (149). Ainsi, la dose recommandée en radiothérapie conformationnelle dans le LGM est de 30 Gy en fractionnement classique (1,8-2 Gy / séance et 5 séances par semaine) délivrée sur le volume gastrique et les ganglions épigastriques (80).

Bien qu'efficace à tous les stades du LGM, la chimiothérapie, compte tenu de ses effets-indésirables, doit être envisagée chez les patients réfractaires au traitement d'éradication présentant un LGM de stade avancé disséminé et chez les patients ayant un LGM de haut grade transformé (80). Plusieurs molécules ont été évaluées seules ou en association dans différentes études avec des résultats dépendants du stade de lymphome. Les associations

rituximab, chlorambucil ou fludarabine semblent donner de très bons résultats (150, 151). Il a notamment été montré dans un essai clinique de phase III, portant sur des patients atteints d'un lymphome du MALT localisé ou disséminé d'origine gastrique notamment, une supériorité de l'association rituximab et chlorambucil par rapport à une monothérapie par chlorambucil ou par rituximab, avec un taux de réponse complète de 80%, 62% et 55 % respectivement, et un taux de survie sans progression à 5 ans de 72%, 59% et 58% respectivement (152). Ces différences de survie globale ont été retrouvées chez tous les patients mais aussi dans le sous-groupe des LGM. Il n'y a pas encore un protocole de chimiothérapie recommandé de façon consensuel dans le LGM de bas grade. Une chimiothérapie est recommandée pour les LGM de haut degré de malignité, nommés DLBCL, comme traitement de première intention en association au traitement d'éradication de l'infection à *H. pylori*. Le protocole R-CHOP (Rituximab, Cyclophosphamide, Hydroxydaunorubicine (adriamycine), Oncovin (vincristine), prednisone) est recommandé pour le LGM de haut grade (138).

6. Suivi post-traitement

Un suivi post-traitement est nécessaire. Tout d'abord l'éradication de *H. pylori* doit être vérifiée 2 à 3 mois après le traitement antibiotique compte-tenu du risque d'échec thérapeutique afin de pouvoir mettre en place une deuxième ligne d'antibiotiques. De plus, le traitement d'éradication ne permet pas la rémission de la totalité des LGM, d'où l'intérêt d'un suivi endoscopique et histologique avec des biopsies répétées afin de démontrer la rémission complète. L'évaluation histologique de la réponse tumorale, en comparaison avec les biopsies précédentes, doit être faite selon les recommandations du Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte (GELA) (Tableau 8) (153). Afin d'établir correctement la rémission, au moins 2 endoscopies et analyses histologiques doivent être réalisées à distance du traitement (99, 115). Un délai minimal de 3 à 6 mois est à respecter pour avoir une évaluation fiable de la réponse tumorale (99). En effet, dans certains cas, une rémission partielle est observée à 6 mois alors qu'une rémission complète est possible dans les mois suivants d'où la nécessité de suivre les lignes directrices publiées qui recommandent une période de suivi suffisamment longue (12 à 24 mois selon les études) après l'éradication de *H. pylori* avant de conclure à une non-réponse, évitant ainsi un sur-traitement des patients (90, 115, 80).

Quand la rémission est établie, plusieurs endoscopies de contrôle avec des biopsies de tous les sites gastriques doivent être réalisées tous les 6 mois pendant les deux premières années puis tous les 12 mois pendant les 5 années suivantes (99, 115). Il n’y a pas de recommandations précises sur la fin du suivi mais un suivi clinique et endoscopique annuel pendant au moins 10 ans a été proposé avec un espacement possible de ce suivi à partir de 5 ans (80).

Malgré une rémission complète, une rechute est possible après plusieurs années chez environ 7% des patients avec un taux global de récurrence annuel de 2%, d’où l’importance du suivi (139). Cette rechute peut être due à une réinfection à *H. pylori* même si ce risque est faible étant donné que l’infection à *H. pylori* s’acquiert très majoritairement pendant l’enfance, surtout dans les pays industrialisés où la prévalence de l’infection est faible. L’importance du suivi, notamment en présence de métaplasie intestinale ou de dysplasie sur les biopsies gastriques, s’explique également par le risque accru d’adénocarcinome gastrique chez ces patients (88). Enfin, d’après la méta-analyse de Zullo *et al.*, le risque d’évolution vers un LGM de haut grade, ou DLBCL gastrique, est faible puisque 0.05% des patients initialement guéris ont développé un lymphome de haut grade dans les 6 à 25 mois suivant le traitement d’éradication (139).

Tableau 8 : Critères d’évaluation post-traitement du LGM selon le GELA.
D’après Copie-Bergman *et al.* (153).

Catégorie GELA	Infiltrats lymphoïdes	LLE	Aspect du stroma	Signification clinique
CR : Rémission histologique complète	Absents ou plasmocytes et petites cellules lymphoïdes dispersés dans la LP	Absentes	Normal ou LP vide et/ou fibrose	Rémission complète
pMRD : Maladie résiduelle probable	Agrégats de cellules lymphoïdes ou follicules lymphoïdes dans la LP/MM et/ou SM	Absentes	LP vide et/ou fibrose	Rémission complète
rRC : Maladie résiduelle	Denses, diffus ou nodulaires en expansion autour des glandes de la LP	Focales ou absentes	LP focale vide et/ou fibrose	Rémission partielle
NC : pas de modification	Denses, diffus ou nodulaires	Présentes – peuvent être absentes	Pas de changement	Maladie stable ou progressive

(LP : lamina propria ; MM : musculaire muqueuse ; SM : sous-muqueuse).

7. Une maladie multifactorielle ?

Le développement du LGM est directement lié à l'infection à *H. pylori* mais n'apparaît que chez un nombre très restreint de sujets infectés contrastant avec l'incidence mondiale élevée de cette infection. Les mécanismes physiopathologiques conduisant à ce lymphome ne sont pas clairement élucidés. Cette évolution clinique est probablement la conséquence d'une interaction complexe entre les facteurs bactériens, les facteurs environnementaux et les facteurs de l'hôte (154, 155). Comme cela a été précédemment argumenté, contrairement à ce qui est observé dans les ulcères et l'adénocarcinome gastrique, les facteurs de virulence de *H. pylori* semblent jouer un rôle minime dans le processus de lymphomagenèse gastrique (49). Néanmoins, la variabilité génétique observée chez les souches bactériennes associées au LGM reste encore à explorer pour tenter de comprendre son implication potentielle dans la lymphomagenèse gastrique (65). En ce qui concerne le rôle éventuel des facteurs environnementaux, la plupart des études disponibles concernent les LNH au sens large du terme et concluent à une présomption forte d'un lien entre l'exposition à des produits toxiques, tels que les pesticides, et le risque de développement d'un LNH (156). De plus, une étude italienne de 1994 a montré le rôle potentiel de l'exposition aux solvants organiques et aux pesticides dans le développement de lymphomes gastriques primitifs chez des patients a priori *H. pylori* négatifs (157). Ces données soulignent bien le rôle potentiel des facteurs environnementaux dans la physiopathologie des LNH et par conséquent du LGM. Il est cependant difficile d'évaluer l'impact de ces facteurs sur la survenue du LGM compte tenu notamment du faible effectif de la population concernée. Ainsi, l'étude des facteurs de l'hôte et notamment l'étude de la réponse inflammatoire de l'hôte et de sa variabilité interindividuelle, semblent être une piste intéressante et prometteuse afin d'appréhender les mécanismes physiopathologiques pouvant être impliqués dans la lymphomagenèse gastrique. En effet, le LGM émane d'une stimulation antigénique chronique exercée au sein de la muqueuse gastrique par *H. pylori*. Les facteurs de virulence n'ayant pas une fonction primordiale, la réponse inflammatoire de l'hôte va jouer un rôle important dans la chronicité de l'infection à *H. pylori* puis, très certainement dans les étapes d'initiation et de développement du LGM.

III. Réponse inflammatoire et lymphomagenèse gastrique du MALT

Bien qu'à l'heure actuelle les mécanismes physiopathologiques menant à l'initiation et au développement du LGM soient encore mal connus, les connaissances acquises concernant la réponse de l'hôte vis-à-vis de l'infection à *H. pylori* ainsi que les travaux émanant des modèles animaux de lymphomagenèse gastrique induite par l'infection à *Helicobacter* permettent de mieux appréhender la physiopathologie du LGM. Une balance entre différents facteurs de la réponse inflammatoire de l'hôte pourrait contribuer à un environnement favorable au développement d'un LGM.

1. Immunité innée et persistance bactérienne : un prérequis nécessaire

La réponse de l'hôte comprend une réponse immune innée et adaptative que la bactérie est capable de détourner rendant ainsi la persistance bactérienne possible, élément clé dans la physiopathologie du LGM.

H. pylori apparaît comme une bactérie essentiellement extracellulaire, les cellules épithéliales gastriques correspondent donc au premier point de rencontre entre le pathogène et son hôte. Ainsi, les contacts intimes entre cellules épithéliales et bactéries sont à la base de la réponse immunitaire innée, passant essentiellement par une activation des récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires ou PRR (pattern recognition receptors). Ainsi, les PRR, exprimés par les cellules épithéliales gastriques et d'autres cellules de l'immunité innée, interagissent avec des motifs moléculaires associés aux pathogènes ou PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) tels que les LPS ou les flagellines (158). Cette reconnaissance, passant notamment par certains TLR (toll-like receptors) et NLR (nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like receptors), est responsable de l'activation de l'expression de gènes pro-inflammatoires tels que la voie NF- κ B impliquée dans l'expression de cytokines pro-inflammatoires et dans le recrutement et l'activation des cellules de l'immunité innée et adaptative (159). Certains PAMPs de *H. pylori* présentent des modifications responsables d'une moindre activation des PRR et donc d'un échappement à la réponse immunitaire innée favorisant ainsi la persistance bactérienne. Ainsi, le LPS tétra-acétylé de *H. pylori* est faiblement reconnu par le TLR4 par rapport au LPS hexa-acétylé des autres bacilles à Gram négatif, considéré

comme 1000 fois plus actif (160). De même, suite à la survenue de mutation au niveau du site de liaison, la flagelline de *H. pylori* n'est pas détectée par le TLR5 (161). Également dans le but de limiter l'intensité de la réponse immune de l'hôte, l'ADN bactérien ainsi que d'autres composés bactériens, via le TLR9 et le TLR2, activent des voies de signalisation principalement anti-inflammatoires (159). Certains PRR pourraient avoir un rôle direct dans la lymphomagenèse gastrique du MALT. En effet, Chonwerawong *et al.* ont récemment observé, 3 mois post infection à *H. felis*, le développement d'une hyperplasie de la muqueuse gastrique et la formation de follicules lymphoïdes majoritairement composés de lymphocytes B, lésions précédant le développement du LGM, chez des souris C57BL6 dépourvues du récepteur cytosolique de l'immunité innée NLRC5 (NLR family CARD domain containing 5) dans les cellules myéloïdes (162). Ces données suggèrent donc que la perte de fonction de NLRC5 pourrait prédisposer les individus infectés par *H. pylori* à la lymphomagenèse gastrique du MALT. Cette découverte est cohérente avec les récentes études de séquençage de l'exome entier, reliant les modifications du locus NLRC5 à divers cancers (163, 164).

Les souches porteuses d'un îlot de pathogénécité *cagPAI* fonctionnel ont un potentiel pro-inflammatoire supérieur via l'activation, au sein des cellules épithéliales gastriques, de la voie NF- κ B conduisant à la production de chimiokines telles que les interleukines (IL) 8 et 12 (165). En effet, dans un modèle *in vitro*, Ferreira-Chagas *et al.* ont noté, comme prévu dans les souches de gastrite mais également dans les souches de LGM, une production d'IL-8 significativement plus élevée en présence d'une souche *cagPAI* positive par rapport aux souches *cagPAI* négatives (166). Une équipe a montré que la protéine CagA pouvait être transloquée dans les lymphocytes B humains et entraîner, via notamment une phosphatase cellulaire SHP-2 (Src homology-2 domain-containing phosphatase), l'activation de voies de signalisation impliquées dans la survie des lymphocytes B (167). Bien que des arguments existent quant à la possibilité que l'oncoprotéine CagA puisse jouer un rôle dans la lymphomagenèse, l'absence de l'îlot de pathogénécité *cagPAI* chez près de 50% des souches associées au LGM rend cette hypothèse fortement discutable. La réflexion est la même concernant la toxine VacA puisque cette dernière est le plus souvent présente sous sa forme biologiquement inactive dans les souches associées au LGM (51). Les souches associées au LGM semblent présenter un caractère pro-inflammatoire limité, l'interaction de *H. pylori* avec l'épithélium gastrique conduit malgré tout à l'augmentation de la production de nombreuses cytokines et chimiokines pro-inflammatoires à savoir

l'IL-1 β , l'IL-6, l'IL-8, l'IL-12, le tumor necrosis factor (TNF) α et l'interféron (IFN) γ intervenant dans le recrutement et l'activation, au niveau gastrique, des macrophages, des cellules dendritiques, des PNN, des lymphocytes NK, des lymphocytes B et T (168). Les macrophages et les PNN recrutés au niveau de la muqueuse gastrique sont susceptibles d'induire, via respectivement la sécrétion d'oxyde nitrique et d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), des dommages cellulaires pouvant conduire à une cancérogenèse (168). *H. pylori* grâce à la présence d'une catalase et d'une superoxyde dismutase détoxifie les ROS (169, 170). De plus, la présence d'une arginase permet à la bactérie d'inhiber la production d'oxyde nitrique par les macrophages activés (171). Ces mécanismes de défense vis-à-vis du stress oxydatif contribuent à la persistance bactérienne au sein de la muqueuse gastrique. L'expression des NADPH oxydases (NOXs), enzymes générant les ROS, a été étudiée au sein de biopsies gastriques de patients atteints de LGM et comparée à celle de patients témoins (120). De façon intéressante, l'expression de NOX2 était significativement plus importante chez les patients atteints du LGM par rapport à la population contrôle et une diminution de NOX2 était constatée parallèlement à la rémission du LGM. Ces données, témoignant d'un lien entre l'expression de NOX2 et le développement du LGM, montrent que la lymphomagenèse serait facilitée par les dommages à l'ADN provoqués par la libération de ROS par les PNN.

H. pylori peut également résister à la phagocytose bactérienne, à laquelle participe les PNN et les macrophages, en échappant à la fusion lysosomale (172). Ainsi, il a été montré que, lors d'une infection à *H. pylori*, les bactéries peuvent survivre de manière intracellulaire dans les macrophages en interférant avec les protéines lysosomales (173). Dans une étude, Allen *et al.* ont montré une absorption retardée des bactéries dans les macrophages suivie de la formation de mégasomes à la suite de la fusion des phagosomes. Ces mégasomes protègent les bactéries intracellulaires d'une destruction efficace et peuvent même contribuer à la persistance de l'infection (172, 174).

Enfin, plus récemment l'équipe de Zhao *et al.* a mis en évidence, à la fois chez des patients atteints de LGM et dans un modèle murin de LGM induit par l'infection à *H. felis*, la présence de cellules myéloïdes suppressives activées et de lymphocytes T $\gamma\delta$ producteurs d'IL-17 au sein du tissu tumoral gastrique suggérant un rôle de ces deux populations cellulaires dans le développement du LGM (175).

2. Immunité adaptative : les lymphocytes T activés acteurs majeurs de la prolifération cellulaire B

L'infection à *H. pylori* se caractérise donc par une inflammation active chronique associée à l'induction d'une réponse adaptative faisant suite à la réponse innée et menant au recrutement de lymphocytes T et B au niveau gastrique. Pour rappel, l'estomac dans des conditions physiologiques, contrairement au reste du tractus gastro-intestinal, est dépourvu de MALT. Des études ont montré une association significative entre l'infection à *H. pylori* et la formation de follicules lymphoïdes de type MALT au niveau gastrique, première étape de la lymphomagenèse (176). Ainsi, Genta *et al* ont mis en évidence la présence de follicules lymphoïdes dans la muqueuse gastrique de tous les patients infectés par *H. pylori*, avec une régression de ces structures post éradication bactérienne, alors qu'aucun follicule n'a été observé chez l'ensemble des sujets non infectés (177). Le développement de MALT au niveau gastrique peut donc être considéré comme caractéristique de l'infection à *H. pylori* suggérant qu'en théorie, tous les patients auraient un risque potentiel de développer un LGM.

L'infection à *H. pylori* induit une forte réponse lymphocytaire T, comprenant majoritairement des lymphocytes T auxiliaires CD4+ (T helper, Th) et minoritairement des lymphocytes T cytotoxiques CD8+, ces derniers contribuant à l'inflammation (178). Les lymphocytes T CD4+ vont ensuite se différencier en différents sous-types, dont (i) les lymphocytes Th1 sécrétant de l'IL-2 et de l'IFN- γ , favorisant la réponse inflammatoire ; (ii) les lymphocytes Th2 sécrétant de l'IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 et IL-13, avec un rôle dans la croissance et la différenciation des lymphocytes B ; (iii) les lymphocytes T régulateurs (Treg) sécrétant de l'IL-10 et du tumor growth factor (TGF) β , avec une action anti-inflammatoire via la régulation de la réponse Th1 ; (iv) les lymphocytes Th17 sécrétant de l'IL-17, IL-21 et IL-22 conduisant à une augmentation de l'inflammation et au recrutement des PNN (168, 179, 180). Ainsi, la présence de lymphocytes T activés infiltrant le tissu tumoral a été constatée peu de temps après la description des premiers cas de LGM (181). Koulis *et al* ont montré qu'il s'agissait majoritairement de lymphocytes T CD4+ activés par les antigènes bactériens (182). Le rôle joué par cette population cellulaire dans la physiopathologie du LGM a été mis en évidence par Hussell *et al.* grâce à des expérimentations *in vitro* de co-culture avec *H. pylori* (35). Cette équipe a en effet montré que la déplétion en lymphocytes T d'une suspension de cellules tumorales, isolées de biopsies de patients atteints d'un LGM, abolissait la prolifération cellulaire et que la

spécificité de la réponse à *H. pylori* était liée aux lymphocytes T infiltrant la tumeur, puisque les lymphocytes B tumoraux seuls étaient incapables de répondre aux bactéries. Les lymphocytes T, majoritairement de type CD4+, activés par les antigènes bactériens, infiltrent la tumeur et jouent donc un rôle clé dans l'activation et la prolifération des lymphocytes B. Greiner *et al.* ont ensuite mis en évidence que cette collaboration entre les lymphocytes T CD4+ et les lymphocytes B était dépendante de l'interaction directe entre des molécules membranaires exprimées par ces deux types cellulaires à savoir la co-stimulation CD40L/CD40 ainsi que de la production de cytokines de type Th2 (183). Bien que les lymphocytes T CD4+ soient nécessaires à la prolifération cellulaire B, Craig *et al* ont remis en question l'importance de l'interaction CD40L/CD40 en montrant le maintien de la prolifération lymphocytaire B en présence d'un anticorps anti-CD40L (184). Ainsi l'interaction entre les lymphocytes T CD4+ et les lymphocytes B ferait intervenir des facteurs solubles produits par les cellules T ainsi que d'autres molécules que le binôme CD40L/CD40 telles que le CD28 exprimé par les lymphocytes T et ses ligands CD80 et CD86 exprimés par les lymphocytes B néoplasiques (185, 184).

Alors que dans la gastrite chronique et la maladie ulcéreuse gastrique la réponse adaptative est majoritairement de type Th1, l'IFN- γ étant la principale cytokine impliquée, dans le LGM les modèles expérimentaux, *in vitro* et *in vivo*, disponibles soulignent l'importance de la réponse Th2 avec la sécrétion de l'IL-4 (183, 186, 187, 185). Ainsi, les signaux paracrines fournis par les lymphocytes Th2 activés infiltrant la tumeur jouent certainement un rôle majeur dans la pathogenèse du LGM.

Dans le LGM, la réponse immunitaire locale induit un recrutement et une polarisation des lymphocytes T conduisant à une population hétérogène de lymphocytes T helper sécrétant des cytokines de type Th1 et Th2 (187). Ces résultats ont été confirmés par notre équipe grâce à un modèle murin de LGM basé sur l'utilisation de souris BALB/c thymectomisées à 3 jours de vie (d3Tx) infectées par *H. pylori* (188). En effet, Floch *et al.* ont ainsi mis en évidence chez ces souris, au stade LGM, une réponse inflammatoire localement équilibrée avec une augmentation de l'expression de chimiokines permettant de polariser la réponse inflammatoire de type Th1, Th2 et Th17 et une augmentation de l'expression des cytokines produites par ces différentes sous populations de lymphocytes T helper (IFN- γ , IL2 et IL-12 pour la réponse Th1 ; IL-4, IL-13 et IL-6 pour la réponse Th2 et IL-17 et IL-21 pour la réponse Th17) (189).

En plus des effets stimulants sur la lymphomagenèse des lymphocytes T CD4+ infiltrant la tumeur, Craig *et al.* ont mis en évidence que le développement du LGM pouvait être facilité par un éventail d'antigènes du soi et du non-soi responsables d'une stimulation antigénique directe des cellules tumorales via leurs récepteurs de surface ou BCR (B-cell receptor) présentant un caractère polyréactif (190).

La prolifération cellulaire B non contrôlée peut également dépendre de l'échappement des lymphocytes B tumoraux à la cytotoxicité médiée par les lymphocytes T (191). En effet, les lymphocytes T cytotoxiques CD8+, présents en moindre quantité que les lymphocytes T helper CD4+ au sein du tissu tumoral, sont caractérisés par un défaut de cytotoxicité médiée par les perforines et une faible capacité à induire l'apoptose des cellules cibles secondaire à une perte de la fonction Fas-FasL (192). Ces altérations de la réponse T cytotoxique étaient limitées aux lymphocytes T CD8+ infiltrant le tissu tumoral, les lymphocytes T circulants présentant eux une activité cytotoxique et pro-apoptotique identiques à celles des cellules T isolées de patients atteints de gastrite chronique (192). L'ensemble de ces données soulignent donc le rôle clé joué par les lymphocytes T activés de l'hôte, infiltrant la muqueuse gastrique, dans l'activation et la prolifération anormale des lymphocytes B gastriques, étape préalable susceptible de contribuer au développement d'un LGM.

3. Les lymphocytes T régulateurs : de précieux équipiers

Parmi les lymphocytes T CD4+ infiltrant le microenvironnement tumoral, les lymphocytes Treg (CD4+ CD25+ FOXP3+) pourraient également jouer un rôle dans la lymphomagenèse gastrique induite par l'infection à *H. pylori*, cette dernière étant connue pour stimuler la réponse T régulatrice (193). Cette population cellulaire est notamment connue pour son action anti-inflammatoire via la régulation de la réponse Th1 par la production de cytokines (IL-10 et TGF- β) contribuant ainsi à la persistance bactérienne et à la protection de la muqueuse gastrique d'une inflammation excessive (179). Il a été ainsi montré en modèle animal d'infection à *H. pylori*, qu'une déplétion en lymphocytes Treg chez des souris infectées s'accompagnait d'une augmentation de l'inflammation de la muqueuse gastrique et d'une diminution de l'inoculum bactérien gastrique (194, 195). Concernant le LGM, Craig *et al.* ont montré, à la fois en modèle murin de LGM et sur du matériel humain de patient atteints de LGM, que la plupart des cellules T CD4+ infiltrant la tumeur était des

lymphocytes Treg recrutés sur le site de lymphomagenèse par la sécrétion de CCL17 et CCL22 par les cellules tumorales B (184). La déplétion en lymphocytes Treg était aussi efficace que la déplétion en lymphocytes T CD4+ dans l'inhibition de la croissance tumorale et dans la régression tumorale, soulignant le caractère indispensable de cette population cellulaire dans la lymphomagenèse (184).

Une des conséquences de la thymectomie néonatale chez les souris BALB/c aurait pu être un déficit en lymphocytes Treg. Or, un enrichissement relatif en lymphocytes Treg par rapport aux lymphocytes T totaux a été observé au niveau de la rate post-thymectomie (196). Ce modèle murin de lymphomagenèse gastrique a permis à notre équipe de mettre en évidence, au sein des infiltrats lymphoïdes des souris ayant développé un LGM, une augmentation en lymphocytes Treg.

Un enrichissement en lymphocytes Treg a également été rapporté au sein du tissu tumoral de patients atteints de LGM ce qui n'était pas le cas chez des patients présentant une gastrite (184, 197). Des études ont évalué l'implication éventuelle des lymphocytes Treg sur l'efficacité de la réponse au traitement d'éradication de la bactérie. Ainsi Garcia *et al.*, de même que Iwaya *et al.* ont mis en évidence un nombre de lymphocytes Treg FOXP3+ infiltrant la tumeur significativement plus élevé chez les patients présentant une bonne réponse au traitement antibiotique que chez les non-répondeurs, renforçant le rôle potentiel des cellules Treg dans les mécanismes de régression du LGM (198, 197).

Ainsi, l'abondance des lymphocytes Treg dans le microenvironnement tumoral et leur recrutement actif par le biais de chimiokines dérivées des cellules B tumorales plaident en faveur d'un rôle direct de cette population dans la stimulation de la croissance tumorale. Ces cellules participeraient à la préservation d'un inoculum bactérien minimal en modérant la réponse inflammatoire permettant ainsi une stimulation antigénique chronique nécessaire au maintien d'une prolifération lymphoïde antigène-dépendante.

4. Une signature chimiokinique et cytokinique spécifique au LGM

Plusieurs études ont démontré que l'implication des chimiokines et de leurs récepteurs dans la lymphomagenèse gastrique du MALT. De par leur activité chimiotactique, elles peuvent intervenir à différentes étapes du LGM dont l'initiation de la réponse immune, le développement des follicules lymphoïdes et la prolifération lymphocytaire (199). Mazzucchelli *et al.* ont rapporté que la chimiokine-1 attirant les cellules B nommée BCA-

1 (ou CXCL13) et son récepteur, CXC chemokine receptor 5 (CXCR5), sont tous deux fortement exprimés au niveau gastrique chez des patients atteints de LGM (200). Pendant l'infection, CXCL13 favoriserait le recrutement des lymphocytes B au niveau gastrique ainsi que la production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-8 (200). L'importance de l'axe de signalisation CXCL13/CXCR5 dans la formation des follicules lymphoïdes a été renforcée d'une part, via les travaux de Winter *et al.* relevant, chez des souris déficientes en CXCR5, l'absence de formation de follicule lymphoïde gastrique malgré une densité de colonisation bactérienne similaire à celle des souris de type sauvage infectées par *H. pylori* et, d'autre part grâce au modèle animal de Yamamoto *et al.* montrant que l'utilisation d'anticorps anti-CXCL13 inhibaient la formation de follicules lymphoïdes normalement induit par l'infection à *H. felis* (201, 202).

D'autres chimiokines semblent également avoir leur importance dans le développement du LGM. C'est notamment le cas de CXCR3 puisque deux études, incluant des patients atteints de LGM, ont révélé que l'expression de ce récepteur par les lymphocytes B néoplasiques était corrélée à la migration métastatique de ces cellules B tumorales vers la circulation sanguine et les organes lymphoïdes (203, 204). Ainsi, CXCR3 pourrait être lié à l'évolution du LGM vers un caractère *H. pylori*-indépendant et à sa progression vers un stade avancé. De plus, Yamamoto *et al.* ont montré que l'expression de CXCR3 était significativement associée à un risque élevé de non réponse du LGM au traitement d'éradication de *H. pylori*, résultat à mettre en parallèle avec le fait que l'expression de ce récepteur de chimiokine était retrouvée plus fréquemment chez les patients porteurs de la translocation t(11 ;18) ainsi que chez ceux présentant un LGM avancé (205). Enfin, une étude a mis en évidence une augmentation de l'expression gastrique de CCR7, CXCR3 et CXCR7, chimiokines notamment impliquées dans le recrutement et l'activation lymphocytaire B, chez des patients atteints de LGM par rapport à ceux présentant une gastrite, alors que l'expression de CXCR4 était diminuée (206).

Le modèle murin d3Tx de LGM précédemment développé par notre équipe a permis d'observer la surexpression de nombreuses chimiokines et cytokines impliquées dans la survie et la prolifération lymphocytaire B (CD40 et CD40L, CCL1, CD27, GITR, TRANCE, BAFF) au stade lymphome, expliquant le recrutement, l'entretien et le maintien d'une prolifération des cellules B au sein de la muqueuse gastrique (188, 189). De même, une surexpression de facteurs permettant l'organisation des lymphocytes en follicules lymphoïdes (lymphotoxines α et β , CXCL13, CCL(19,20), CD40, CD40L) a été observée.

D'autre part, la surexpression de nombreux membres de la famille du TNF au stade lymphome a conduit l'équipe à envisager un lien entre la dérégulation de certains membres de la famille du TNF, notamment la cytokine APRIL (A Proliferation-Inducing Ligand), et la lymphomagenèse gastrique du MALT induite par l'infection à *H. pylori*. APRIL, dont l'augmentation a déjà été constatée chez l'homme dans le LGM, est impliquée dans le développement, la maturation et la survie des lymphocytes B (207, 208). De façon intéressante, il a été montré dans des LGM humains que les macrophages infiltrant la tumeur produisaient la cytokine APRIL, suite à une stimulation par les antigènes bactériens de *H. pylori* et les lymphocytes T spécifiques activés (208). La même équipe a également observé une importante diminution des macrophages sécrétant APRIL post-éradication bactérienne. Afin d'évaluer le rôle de la cytokine APRIL dans l'émergence du LGM, l'équipe du Pr Lehours a développé un nouveau modèle murin de lymphomagenèse gastrique (Tg-hAPRIL), basé sur l'utilisation de souris transgéniques C57BL6, exprimant au niveau des lymphocytes T la forme humaine de la cytokine APRIL, infectées par *Helicobacter sp* (*H. felis* ou *H. pylori*) (209). La forte homologie protéique entre la forme humaine et la forme murine de cette cytokine ainsi qu'une affinité comparable de la cytokine APRIL humaine pour ses récepteurs humains et leurs homologues murins, ont permis d'envisager un tel modèle murin de LGM (210). L'identification de lésions caractéristiques du LGM, au sein des estomacs des souris transgéniques infectées 18 mois post-infection, a confirmé l'importance de la cytokine APRIL *in vivo* dans l'émergence du LGM induit par des espèces du genre *Helicobacter*. Ce modèle murin Tg-hAPRIL de LGM semble un modèle prometteur d'étude de la lymphomagenèse gastrique plus facile à mettre en place que le modèle reposant sur la thymectomie néonatale et plus productif que les souris C57BL6 et BALB/c sauvages (188, 211).

5. Influence des variabilités génétiques de l'hôte

La réponse inflammatoire occupe donc une place centrale dans la physiopathologie de l'infection à *H. pylori*, son déséquilibre pourrait participer à la progression vers une pathologie gastrique donnée. Ainsi, il est possible que le polymorphisme génétique de l'hôte touchant les gènes impliqués dans cette réponse inflammatoire puisse promouvoir la lymphomagenèse ou au contraire protéger l'hôte d'une évolution vers un LGM. Certaines équipes se sont ainsi intéressées à l'étude du polymorphisme de gènes sollicités

dès les premières étapes de la réponse immunitaire contre l'infection à *H. pylori*. Hellmig *et al.* ont par exemple rapporté que l'allèle G du TLR4 (Asp299Gly), récepteur impliqué dans la reconnaissance du LPS bactérien, apparaissait comme un potentiel facteur protecteur vis-à-vis du LGM dans les populations allemande et autrichienne (212). D'autres récepteurs de l'immunité innée pourraient être impliqués tels que NOD2, membres de la famille des NLR, puisque la présence de la mutation R702W dans le gène correspondant, augmenterait le risque de développement d'un LGM d'un facteur 2 dans la même population que celle étudiée par Hellmig *et al.* (213). L'hypothèse d'une composante auto-immune dans la physiopathologie du LGM a conduit Kawahara *et al.* à étudier le polymorphisme du complexe majeur d'histocompatibilité, précédemment associé à certaines maladies auto-immunes (214). Ils ont mis en évidence une prévalence significativement plus élevée des allèles HLA-DQA1*103 et HLA-DQB1*601 ainsi que de l'haplotype DQA1*0103-DQB1*601 chez les patients japonais développant un LGM par rapport aux patients contrôles (214). Des variations dans la réponse de l'hôte au stress oxydatif généré par l'infection à *H. pylori* semblent également jouer un rôle puisque deux équipes, une anglaise et une chinoise, ont toutes deux montré que le polymorphisme de la glutathion S-transférase, à savoir le génotype GST T1-nul, diminuant la capacité anti-oxydante cellulaire, était fortement associé au LGM (215, 216). D'autre part, des variations génétiques des cytokines et des chimiokines associées à l'inflammation peuvent elles aussi impacter l'évolution clinique. Rollinson *et al.* ont ainsi rapporté que le polymorphisme de l'IL-1ra (récepteur antagoniste de l'IL-1), à savoir le génotype IL-1 RN 2/2, était associé à un risque augmenté de LGM en Angleterre (216). Cette même équipe a montré que la combinaison de ce polymorphisme avec le génotype GST T1-nul conférait un risque multiplié par 32 de développer un LGM (216). D'autres travaux consacrés à la population chinoise ont montré que le polymorphisme de l'IL-22 jouait un rôle important dans le développement du LGM et était associé à la réponse du LGM au traitement d'éradication (217). Des équipes se sont également intéressées aux différents génotypes du TNF- α , cytokine pro-inflammatoire jouant un rôle clé dans la réponse immunitaire. Ainsi, l'allèle TNF- α -857T serait associé d'une part, à une diminution de risque d'un facteur 3 dans la population Taïwanaise et, d'autre part dans une population caucasienne à un risque multiplié par 1.8 d'évolution vers un LGM (218, 219). Ces résultats soulignent le principal facteur limitant quant à l'étude de ces polymorphismes génétiques, à savoir le fait qu'ils ne soient pas transposables entre deux populations de patients atteints de LGM

d'origine ethnique différente. Enfin, les polymorphismes des gènes régulateurs des lymphocytes T pourraient aussi intervenir dans la physiopathologie du LGM comme celui codant pour la protéine 4 des lymphocytes T cytotoxiques (CTLA4), considéré comme un régulateur négatif de l'activation lymphocytaire T. Ainsi, le génotype CTLA4 49 G/G, associé à une diminution de l'expression de ce récepteur cellulaire T, conférerait un risque accru de LGM dans la population chinoise étudiée (220).

Bien que l'origine ethnique doive être considérée, ces données montrent que la variation interindividuelle de la réponse inflammatoire de l'hôte à *H. pylori* peut influencer le développement de la maladie.

D'autre part, suscitant un intérêt accru depuis ces dernières années, des modifications épigénétiques au niveau de la chromatine et de l'ADN constituent un autre mécanisme pouvant influencer l'expression des gènes. La modification la plus étudiée est la méthylation des zones riches en dinucléotides cytosine-guanine, appelées îlots CpG et localisées dans les régions promotrices de nombreux gènes (221). Ces méthylations conduisent à la modification de la chromatine et à la répression transcriptionnelle du gène méthylé correspondant (222). D'abord mis en évidence dans le cancer gastrique induit par l'infection à *H. pylori*, il est clair que la méthylation de l'ADN joue un rôle important dans le LGM via l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs conférant une susceptibilité cellulaire à la transformation maligne compte tenu d'altération du cycle cellulaire et d'un excès de prolifération (222–224). Ainsi, plusieurs études ont rapporté une association entre la méthylation du gène suppresseur de tumeur $p16^{INK4}$, codant l'inhibiteur de kinase cycline-dépendante 2A (CDKN2A), et le développement du LGM (225–227). Park *et al.* ont par exemple observé sa présence chez 75% des patients atteints d'un LGM avec une corrélation entre cette méthylation et l'absence de la translocation t(11;18) (227). L'étude de Kim *et al.* a montré que la fréquence de la méthylation de $p16^{INK4A}$ dans les LGM, initialement détectée chez 58% des patients, diminuait après le traitement d'éradication de *H. pylori* et lors de la rémission de la maladie (225). Min *et al.* ont également mis en évidence que la méthylation d'un autre gène suppresseur de tumeur, à savoir $p57^{KIP2}$ codant l'inhibiteur de kinase cycline-dépendante 1C (CDKN1C), était elle aussi associée à la lymphomagenèse gastrique du MALT induite par l'infection à *H. pylori* (226). En accord avec les travaux réalisés sur le cancer colorectal, la mise en évidence d'au moins 3 marqueurs méthylés confère à l'individu le phénotype méthylateur

des îlots CpG positif ou CIMP+, constituant un facteur pronostique défavorable chez les patients atteints de cancer colorectal métastatique (228, 221). Deux études ont ainsi rapporté la relation entre le phénotype CIMP+ et le développement du LGM. Kaneko *et al.* ont constaté que 100% des LGM étudiés (vs 0% des gastrites étudiées) étaient associés à un phénotype CIMP+ définis par la présence d'au moins trois des marqueurs méthylés suivant p16, p15, hMLH1, MINT1, MINT2 et MINT31 (229). De même, Kondo *et al.* ont mis en évidence une fréquence de phénotype CIMP+ (incluant les gènes cibles spécifiques p16, MGMT et MINT31) plus élevée chez les patients atteints d'un LGM par rapport au groupe témoin (62% vs 0%) (230). Il est intéressant de noter que la fréquence des gènes méthylés semble augmenter avec la progression de la maladie selon un continuum de la gastrite au LGM et du LGM au DLBCL (230).

Ces données suggèrent donc que des méthylations aberrantes de gènes suppresseurs de tumeur, constituant des modifications épigénétiques importantes, semblent contribuer à la lymphomagenèse gastrique du MALT.

6. Une signature microARN spécifique au LGM ?

Un autre mécanisme épigénétique est la régulation de l'expression génique par les microARNs (miARNs). Les miARNs sont des petits ARN (environ 22 nucléotides) simple brin non codants qui régulent l'expression des gènes au niveau post-transcriptionnel en bloquant la traduction ou en activant la dégradation des ARN messagers (231). Découverts au début des années 1990, les miARNs se sont imposés comme des éléments majeurs du contrôle de l'expression génique et reçoivent aujourd'hui une attention particulière du fait de leur rôle pivot dans un grand nombre d'évènements biologiques nécessitant une régulation stricte, tels que le développement embryonnaire, la prolifération, la différenciation, l'hématopoïèse et les interactions hôte-pathogène (232). Des analyses fonctionnelles ont permis de dévoiler l'ampleur des mécanismes cellulaires régulés par ces petits ARNs et d'associer des profils uniques d'expression de miARNs à de nombreux cancers, en particuliers à des lymphomes (233–235). De nombreux membres de ce nouveau groupe de biomarqueurs tumoraux apparaissent en effet comme nettement associés à certains cancers, agissant comme des oncogènes ou comme des suppresseurs de tumeurs selon leur niveau de dérégulation et leur(s) cible(s) (232). Plusieurs équipes ont récemment examiné les signatures miARNs associées à l'infection à

H. pylori et leurs résultats suggèrent que la dérégulation de l'expression de certains miARNs pourrait en partie expliquer l'évolution clinique vers une pathologie gastrique donnée (236, 237). Un certain nombre d'études sont ainsi actuellement menées sur du matériel humain afin de clarifier le rôle des miARNs dans la pathogenèse du LGM. Ainsi, Thorns *et al.* ont identifié la dérégulation d'un panel de miARNs (à savoir une surexpression des miR-150, miR-550, miR-124a, miR-518b et une sous-expression du miR-539) apparaissant associée à la transformation de la gastrite en LGM (238). La surexpression gastrique du miR-150 a ensuite été confirmée sur une cohorte indépendante de patients atteints de LGM par la même équipe allemande (239). Les miR-142a et miR-155 ont également été décrits comme des biomarqueurs potentiels du LGM, inhibant la synthèse d'une protéine antiproliférative et pro-apoptotique, TP53INP1. En effet, Saito *et al.* ont d'une part, montré la surexpression de ces deux miARNs dans le tissu tumoral gastrique de patients atteints de LGM par rapport à la muqueuse non tumorale correspondante et, d'autre part validé la cible TP53INP1 pour les miARNs dérégulés (240). Puis, Fernández *et al.* ont confirmé la surexpression de ces deux miARNs au niveau gastrique chez des patients atteints de LGM par rapport à ceux présentant une gastrite chronique (241). Leurs résultats ont également montré une sous-expression du miR-203 dans le LGM, conformément aux résultats d'une étude antérieure décrivant elle aussi une forte sous-expression de ce miARN au sein du tissu tumoral (242). La sous-expression du miR-203 s'accompagne de la dérégulation de sa cible validée, à savoir la tyrosine kinase ABL1, qui peut ainsi stimuler la prolifération du clone lymphocytaire B (242). Plus récemment, Zhang *et al.* ont montré la dérégulation de trois miARNs (miR-320a, miR-622 et miR-429) au sein de biopsies gastriques de patients atteints de LGM en comparaison aux tissus amygdaliens correspondants, suggérant que ces nouveaux candidats puissent eux aussi jouer un rôle dans le développement du LGM (243). Bien que des différences en termes de méthodologie existent, les données disponibles dans la littérature semblent montrer l'existence de signatures miARNs distinctes associées au LGM. La recherche des cibles potentielles de ces miARNs ainsi que l'existence de cibles validées dans la littérature, permettent d'identifier les voies de signalisation par lesquelles ces biomarqueurs tumoraux pourraient promouvoir la transformation maligne. Des études supplémentaires sont néanmoins nécessaires afin de croiser l'ensemble des données et tenter d'identifier une signature miARN spécifiquement associée au LGM et ainsi élucider les mécanismes moléculaires impliqués dans la lymphomagenèse. Ainsi, l'équipe du Pr

Lehours s'est attardée à étudier la dérégulation des miARNs dans le modèle murin d3Tx. Ils ont identifié cinq miARNs (miR-21, miR-135b, miR-142a, miR-150, miR-155) surexprimés au stade LGM qui pourraient agir en synergie en inhibant l'apoptose et en induisant une prolifération lymphocytaire B non contrôlée via des cibles distinctes validées dans la littérature (244). Quatre de ces cinq miARNs agiraient notamment sur la synthèse de TP53INP1, cible précédemment validée dans le LGM pour les miR-142a et miR-155 par Saito *et al.* (240). Parmi ces cinq miARNs dérégulés en modèle murin d3Tx, comme nous venons de le voir, la dérégulation de trois d'entre eux a également été validée au stade LGM chez l'homme (238, 240, 241). De plus, l'évaluation de l'expression de ces cinq miARNs au niveau sérique a permis à Floch *et al.* d'identifier le miR-142a comme un potentiel marqueur non-invasif de LGM (244). De même que pour les mécanismes épigénétiques, identifier et comprendre le rôle des miARNs dans la pathogenèse du LGM pourrait conduire à un diagnostic plus précoce de la maladie et au développement de nouvelles approches thérapeutiques.

OBJECTIFS

L'objectif de ma thèse a été de perpétuer les travaux de l'équipe visant à approfondir nos connaissances concernant le rôle du microenvironnement inflammatoire gastrique de l'hôte dans l'initiation, le développement et le contrôle du LGM induit par l'infection à *H. pylori*. L'ensemble des données précédemment obtenues par l'équipe est issue de modèles animaux et a permis la mise en évidence de différents acteurs de la réponse inflammatoire et lymphoproliférative, le rôle de ces derniers devant à présent être confirmé chez l'homme.

Le premier axe de mon travail de thèse a ainsi consisté à étudier la dérégulation des miARNs au stade lymphome chez l'homme et à la comparer aux résultats obtenus par Floch *et al.* en modèle murin dT3x (Article 1). L'enjeu était donc de valider les dérégulations observées au stade lymphome en modèle murin d3Tx, chez l'homme.

Le second axe de mon travail de thèse a d'abord été consacré à la caractérisation de la réponse inflammatoire au niveau gastrique dans le nouveau modèle de LGM mis en place au laboratoire basé sur l'utilisation de souris transgéniques exprimant la forme humaine de la cytokine APRIL (Tg-hAPRIL) et infectées par des bactéries du genre *Helicobacter*. Puis, nous avons souhaité comparer cette réponse inflammatoire gastrique murine à celle observée au niveau gastrique chez des patients atteints du LGM, l'enjeu étant la validation de ce modèle prometteur de lymphomagenèse gastrique. Enfin, la cytokine APRIL semblant jouer un rôle non négligeable dans le processus lymphomateux, nous avons tenté d'identifier chez l'homme les cellules productrices et les cellules cibles de cette cytokine, acteurs potentiels de la réponse inflammatoire associée au LGM (Article 2).

RESULTATS EXPERIMENTAUX

Article 1 :

Etude de la dérégulation des microARNs dans le LGM : de la souris à l'homme

L'équipe a précédemment identifié cinq miARNs (miR-21, miR-135b, miR-142a, miR-150 et miR-155) surexprimés au stade LGM qui pourraient agir en synergie en inhibant l'apoptose et en induisant une prolifération lymphocytaire via des cibles distinctes décrites dans la littérature. Nous avons tenté de valider ces résultats obtenus en modèle murin sur du matériel humain.

Méthodes: D'une part par RT-qPCR (reverse transcription quantitative PCR) ciblant les cinq miARNs dérégulés en modèle murin d3Tx et, d'autre part par PCR array suivie d'une validation par RT-qPCR, nous avons comparé et étudié la dérégulation des miARNs au stade LGM chez l'homme en utilisant du matériel obtenu grâce à une collaboration avec des spécialistes de cette pathologie de l'hôpital Henri Mondor.

Résultats : Nous avons au total identifié quatre miARNs surexprimés (miR-155, miR-150, miR-196 et miR-138) et deux miARNs sous-exprimés (miR-7 et miR-153) au sein des estomacs des patients atteints du LGM (n=11) par rapport à la population témoin (n=17). Etonnamment, les résultats obtenus en modèle murin ne semblaient donc pas tous transposables chez l'homme puisque seuls les miR-155 et miR-150 ont été validés sur le matériel humain étudié ici. Pour chacun des miARNs dérégulés chez l'homme au stade LGM (excepté pour le miR-138) nous avons identifié, grâce à une analyse fine de la littérature, des cibles validées expérimentalement et impliquées dans l'inhibition de l'apoptose. Nos résultats suggèrent donc que la dérégulation des miARNs au stade lymphome chez l'homme participerait au processus de lymphomagenèse gastrique probablement via un effet synergique anti-apoptotique envers les lymphocytes B.

Ce travail a fait l'objet d'une publication en première auteure dans le journal *Journal of Clinical Medicine* en juin 2019.



Article

Deregulation of miRNA in *Helicobacter pylori*-Induced Gastric MALT Lymphoma: From Mice to Human

Alice Blossse ¹, Michael Levy ^{2,3}, Cyrielle Robe ⁴, Cathy Staedel ⁵, Christiane Copie-Bergman ⁶
and Philippe Lehours ^{1,7,*}

¹ INSERM, Université Bordeaux, UMR1053 Bordeaux Research in Translational Oncology, BaRITOn, 33000 Bordeaux, France; alice.blosse@u-bordeaux.fr

² EC2M3: Department of Academic Research (EA7375), Université Paris Est Créteil (UPEC), Val de Marne, 94000 Créteil, France; michalevy@me.com

³ Department of Gastroenterology, Henri Mondor Hospital, APHP, 94000 Créteil, France

⁴ INSERM U955, Equipe 9, 94000 Créteil, France; cyrielle.robe@aphp.fr

⁵ INSERM U1212, ARNA Laboratory, Université de Bordeaux, 33000 Bordeaux, France; cathy.staedel@inserm.fr

⁶ Department of Pathology, Henri Mondor Hospital, APHP, INSERM U955, Equipe 9, Université Paris-Est, 94000 Créteil, France; christiane.copie@aphp.fr

⁷ French National Reference Center for Campylobacters & Helicobacters, 33000 Bordeaux, France

* Correspondence: philippe.lehours@u-bordeaux.fr

Received: 10 May 2019; Accepted: 6 June 2019; Published: 13 June 2019



Abstract: Gastric MALT lymphoma (GML) is directly caused by *Helicobacter pylori* infection but occurs only in a small number of infected subjects. Mechanisms underlying the initiation and progression of GML remain unclear. MicroRNAs (miRNAs) are small non-coding RNAs that are now considered as major players in inflammation and carcinogenesis, acting as oncogenes or tumor suppressors. Previous laboratory studies have shown in a GML mouse model that overexpression of a distinct set of five miRNAs (miR-21a, miR-135b, miR-142a, miR-150, miR-155) could play a critical role in the pathogenesis of GML. Our goal was to compare the miRNA expression profile obtained in the GML mouse model to that in human GML (11 cases of GML compared to 17 cases of gastritis control population). RTqPCR on the five dysregulated miRNAs in the GML mouse model and PCR array followed by RTqPCR confirmation showed that four miRNAs were up-regulated (miR-150, miR-155, miR-196a, miR-138) and two miRNAs down-regulated (miR-153, miR-7) in the stomachs of GML patients vs. gastritis control population. The analysis of their validated targets allowed us to postulate that these miRNAs (except miR-138) could act synergistically in a common signaling cascade promoting lymphomagenesis and could be involved in the pathogenesis of GML.

Keywords: MALT lymphoma; miRNA; *Helicobacter*; proliferation

1. Introduction

Mucosa-associated lymphoid tissue lymphomas (MALT lymphomas) constitute 7% of adult non-Hodgkin lymphomas [1]. The majority of MALT lymphomas occurs in organs without lymphoid tissue like the stomach [2]. In the stomach, the development of gastric MALT lymphoma (GML), a rare low-grade B-cell non-Hodgkin lymphoma, is driven by infection by *Helicobacter pylori*, a Gram-negative bacterium; eradication of this bacterium induces long-term remissions [3,4]. Although *H. pylori* colonizes the human gastric mucosa of about 50% of the world population, GML occurs only in a very small number of infected subjects (less than 0.1%) [5]. *H. pylori* infection induces mucosal inflammation named gastritis, which is first superficial and asymptomatic but may evolve towards more serious pathologies, including GML. Mechanisms underlying the initiation and progression of

GML remain unclear, notably at the levels of inflammatory, immunological and cellular responses. Nevertheless, in the context of GML, *H. pylori* infection leads to the recruitment and proliferation of B cells in organized lymphoid follicles similar to intestinal Peyer's patches, which are normally absent in the stomach. The mechanisms associated with gastric lymphomagenesis are poorly understood, and in particular, compared to other cancers [6], the dysregulation of microRNAs (miRNAs) have been poorly described.

MiRNAs are small (approximately 22 nucleotides) non-coding RNAs that have been shown to be predominant actors of gene expression on a post-transcriptional level, and have been shown to be either up- or downregulated in specific cell types and disease states [7]. In fact, in human cancers including lymphoma, patterns of miRNAs are aberrantly expressed and have been described to play an important regulatory role in cellular proliferation, differentiation, and apoptosis [8]. According to previous studies, miRNAs can act as tumor suppressor genes or oncogenes depending on the human malignancies. A number of studies are currently conducted in order to clarify the role of miRNAs in gastric lymphoma pathogenesis. Thus, Thorns et al. identified the dysregulation of a distinct set of miRNAs (up-regulation of miR-150, miR-550, miR-124a, miR-518b and down-regulation of miR-539) that appeared associated with the transformation of gastritis into GML [9]. miR-142a and miR-155 have been described as potential biomarkers of GML. In fact, Saito et al. showed overexpression of these two miRNAs in GML lesions compared to the corresponding non-tumor mucosa [10]. Supporting these data, Fernández et al. described the overexpression of miR-142-3p and miR-155 in GML compared to chronic gastritis [11]. Their results also showed that miR-203 was down-regulated in GML, like another recently-published study which described altered miR-203 expression in gastric lymphomagenesis [12]. Recently, Zhang et al. showed that miR-320a, miR-622, and miR-429, which were differentially expressed between GML samples and human tonsil tissue samples, were possibly novel miRNAs playing crucial regulatory roles in the pathogenesis of GML [13]. In view of these previous findings, distinct miRNA signatures would be involved at variable degrees of contribution to MALT lymphoma pathogenesis. Therefore, further studies are needed in order to clarify the exact molecular mechanisms of lymphomagenesis.

The GML studies are hampered by the difficulty of getting primary tumors from surgical specimens of GML patients. To solve this problem, several teams have developed animal models reproducing this pathology. In this way, a mouse model of lymphomagenesis (*H. pylori*-infected BALB/c mice thymectomized at day 3 post-birth, named the d3Tx model) was used in our laboratory in order to characterize the miRNAs dysregulated at the GML stage [14,15]. Using the material obtained in d3Tx model, Chrisment et al. showed the up-regulation of a set of five miRNAs (miR-21a, miR-135b, miR-142a, miR-150, and miR-155) in gastric lymphomagenesis [15]. The analysis of their validated targets suggested that all of these miRNAs may potentially act as inhibitors of cell apoptosis, thereby allowing acceleration of MALT lymphoma cell proliferation [10,11,14]. Notably, miR-135b, miR-142a, miR-150, and miR-155 all target the TP53INP1 transcript, coding for an anti-proliferative and pro-apoptotic protein.

In the present study, human material was used to confirm and validate our previous results obtained in the GML mouse model. Surprisingly, only two of the five miRNAs (miR-155 and miR-150) were identified as being over-expressed in the stomachs of GML patients. Next, using the same human materials, we performed a PCR array followed by RTqPCR confirmation and identified a set of 4 miRNAs: miR-196a-5p, miR-138-5p which were up-regulated and miR-7-5p, miR-153-3p which were down-regulated in GML vs. gastritis control population. The final purpose was to suggest, combined with the literature and their experimentally validated miRNA-target interactions, how these miRNAs could be involved in the process of lymphomagenesis.

2. Materials and Methods

2.1. Patient Samples

Eleven cases of primary gastric marginal zone lymphomas of MALT type (GML) (7 men, 4 women, mean age 59.9 years) associated with *H. pylori* infection without t(11;18)(API2-MALT1) and responding to *H. pylori* eradication were selected for the study. All patients were stage I according to the Ann Arbor staging system and were treated with usual antibiotic treatment for *H. pylori* eradication.

Patients were recruited from the Henri Mondor Hospital Gastroenterology department's local database and/or the standardized hospital patient diagnostic dataset from 2001–2016. The study was approved by the institutional ethics committee (Comité de protection des personnes, protocol 15071-ID RCB: 2015-A00342-47). Written informed consent of non-opposition to the use of biological material for study purposes was obtained from all patients.

The diagnosis of GML was based on histological analysis of gastric biopsies by an expert hematopathologist (CCB). GML was diagnosed according to the WHO classification [16] and consisted of diffuse or nodular lymphoid infiltrate of the lamina propria by small centrocyte-like cells, developed in the marginal zone of reactive lymphoid follicles and displaying lymphoepithelial lesions. Immunohistochemical studies were performed on formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissue sections using an automated immunostainer (Bond Max, Leica Microsystems, Newcastle-upon-Tyne, UK) with the appropriate diaminobenzidine (DAB) detection kit and antibodies for CD20/L26, CD5, CD10, Bcl2, CyclinD1, Mib1 (Ki67), cytokeratin (AE1/AE3) and *H. pylori*. The presence of the t(11;18) translocation was determined by using the MALT1 break apart probe that detects both t(11;18)(API2-MALT1) and t(14;18)(IGH-MALT1) translocations. If positive, FISH using the double fusion (API2-MALT1) probe is performed to confirm the presence of t(11;18)(API2-MALT1) translocation. All GML cases included in the present study were negative with MALT1 break apart probe and consequently t(11;18)(API2-MALT1) negative [17]. *H. pylori* infection was assessed by modified Giemsa-stained tissue sections and/or immunohistochemistry with an anti-*H. pylori* antibody on FFPE tissues sections of gastric biopsies. In addition, real-time quantitative polymerase chain reaction (qPCR) assay was performed from frozen gastric biopsies as previously described [18]. The tumor cells showed a CD20+ CD5- CD10- BCL2+ Cyclin D1- immunophenotype by immunohistochemistry with a low proliferative index (Ki67 < 10%).

A control group consisted of 17 gastric biopsies of patients referred for gastric endoscopy for gastric dyspepsia ($n = 15$), or routine follow-up in the context atrophic gastritis ($n = 1$) [19] or exploration of anemia ($n = 1$) (7 men, 10 women, mean age 61.9 years).

2.2. RNA Extraction

Total RNAs were extracted from frozen gastric samples of GML and control group using the TRIzol reagent (GIBCO-BRL Life Technologies, Cergy-Pontoise, France) according to the manufacturer's instructions. For this, TRIzol (TRIzol Reagent by Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) was used before adding chloroform (ratio 1/5). Centrifugation at 12,000g for 15 min allowed recovery of the aqueous phase containing the RNAs. The addition of isopropanol (ratio 1:1) followed by a 20 min centrifugation at 12,000 g was used to concentrate the RNA in a pellet. The pellet was washed with 75% ethanol and dried before being dissolved in RNase-free water. RNA quantification was performed using the spectrophotometer (BMG Labtech, Ortenberg, Germany) at 260 nm. The 260/280 nm ratio controls the quality and absence of protein contamination in the sample.

2.3. miRNA Reverse-Transcription

The miScript II RT kit with the HiSpec Buffer (Qiagen, Hilden, Germany) was used for reverse transcription of miRNA in the RNA samples prepared as described above (250 ng RNA per sample), according to the manufacturer's instructions.

2.4. PCR Array

The expression of 372 miRNAs in the gastric mucosa of gastritis patients (control population) and GML patients was evaluated by PCR array using “Human Cancer PathwayFinder 384HC miScript miRNA PCR array” panel (MIHS-102Z, Qiagen, Courtaboeuf, France). A mix of RNAs extracted from 3 gastritis patients or 3 GML patients (with similar Ct values for 3 reference genes (RNU6, RNU5A and SNORD95)) were analyzed and compared. Analysis of the expression of 372 cancer-related miRNAs and six reference miRNAs (SNORD61, SNORD68, SNORD72, SNORD95, SNORD96A and RNU6) was performed using the QuantiTech SYBR[®] Green PCR Master Mix and miScript Universal Primer (Qiagen), according to the manufacturer’s recommendations. Distribution of 0.98 ng of cDNA per well was carried out by the robot Eppendorf epMotion M5073 (Eppendorf, Hamburg, Germany). PCR arrays were performed using the CFX384[™] Real-Time PCR detection system (Bio-Rad, Marnes la Coquette, France). Cycle quantification (Cq) data for each miRNA was normalized to 5 of the most stable of the 6 reference miRNAs (variation < 0.5 Cq) and compared between gastritis and GML patients according to the $\Delta\Delta Cq$ method using the online system available for Qiagen PCR arrays users (<https://www.qiagen.com/fr/shop/genes-and-pathways/data-analysis-center-overview-page/>). Values > 3 or < -3 indicated an up- or down-regulation, respectively.

2.5. Quantitative Real-Time PCR

In order to validate the results obtained by Floch et al. [13] in the d3Tx mouse model of gastric lymphomagenesis, the expression of miR-155, miR-150, miR-21a, miR-135b, miR142a in the 17 gastritis and 11 GML patient gastric biopsies was individually performed by RT-qPCR. In order to confirm the results of the PCR array, the selected miRNAs were analyzed using the same gastric samples by RT-qPCR. The list of the specific primers used for each miRNA amplification is available in Table 1.

All RT-qPCR experiments were performed using the miScript Universal Primer and specific primers for each miRNA (Qiagen, Courtaboeuf, France) at a final concentration of 0.25 μ M and the SYBR[®] Green Premix Ex Taq[™] (Tli RNaseH Plus; Takara, Saint-Germain-en-Laye, France) for qPCR of each miRNA-RT sample. PCR reactions were carried out in duplicate in 96-well plates (Bio-Rad, Marnes-La-Coquette, France) with 2.5 ng/well of cDNA in a total of 12 μ L on the CFX96[™] Real-Time PCR detection system (Bio-Rad) at the Quantitative Platform at the University of Bordeaux (TBM-Core Real-Time PCR Platform). RNU6 (MS00033740, Qiagen, Courtaboeuf, France), RNU5A (miScript PCR control assay, 218380, Qiagen, Courtaboeuf, France) and SNOR95 (MS00033726, Qiagen, Courtaboeuf, France) were used as reference genes. PCRs started with a 95 °C DNA denaturation step for 1 min, followed by 40 cycles comprising 2 steps: A denaturation at 95 °C for 5 s and a primer hybridization at 60 °C for 30 s. After each cycle, fluorescence was measured in order to quantify newly synthesized DNA. At the end of the procedure, a melting curve was generated by a slow elevation in the temperature from 65–95 °C and the continuous measurement of fluorescence. The generation of this melting curve permitted the verification of one specific peak at the expected melting temperature for each product, which showed the PCR specificity. Relative quantification of the miRNA expression was calculated for each sample using the $2^{-\Delta Cq}$ method, with $\Delta Cq = Cq_{\text{gene of interest}} - Cq_{\text{reference genes}}$ and $Cq_{\text{reference genes}} =$ the average of Cq-values obtained for RNU6, RNU5A and SNOD95. The relative miRNA expression between GML and the control population (gastritis patients) was calculated using the $2^{-\Delta\Delta Cq}$ method.

2.6. Statistical Analysis

Statistical analyses were performed with GraphPad Prism 5.01 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). The Mann-Whitney test was used as a nonparametric test to identify miRNAs with significant differential expression between GML and gastritis patients. Differences were considered significant when p was inferior to 0.05 (* $p < 0.05$).

3. Results

3.1. Relative Expression Levels of miR-155, miR-150, miR-21a, miR-135 and miR-142a in gastric MALT Lymphomas and Gastritis Patients

In order to validate on human GML material the up-regulation of 5 miRNAs (miR-21a, miR-135b, miR-142a, miR-150, miR-155) previously identified in mice stomachs at the GML stage [14], individual miRNA expression assays were performed on 17 gastritis and 11 GML RNA extracts. Only miR-155 and miR-150 were found to be upregulated in GML patients compared to gastritis patients (Figure 1).

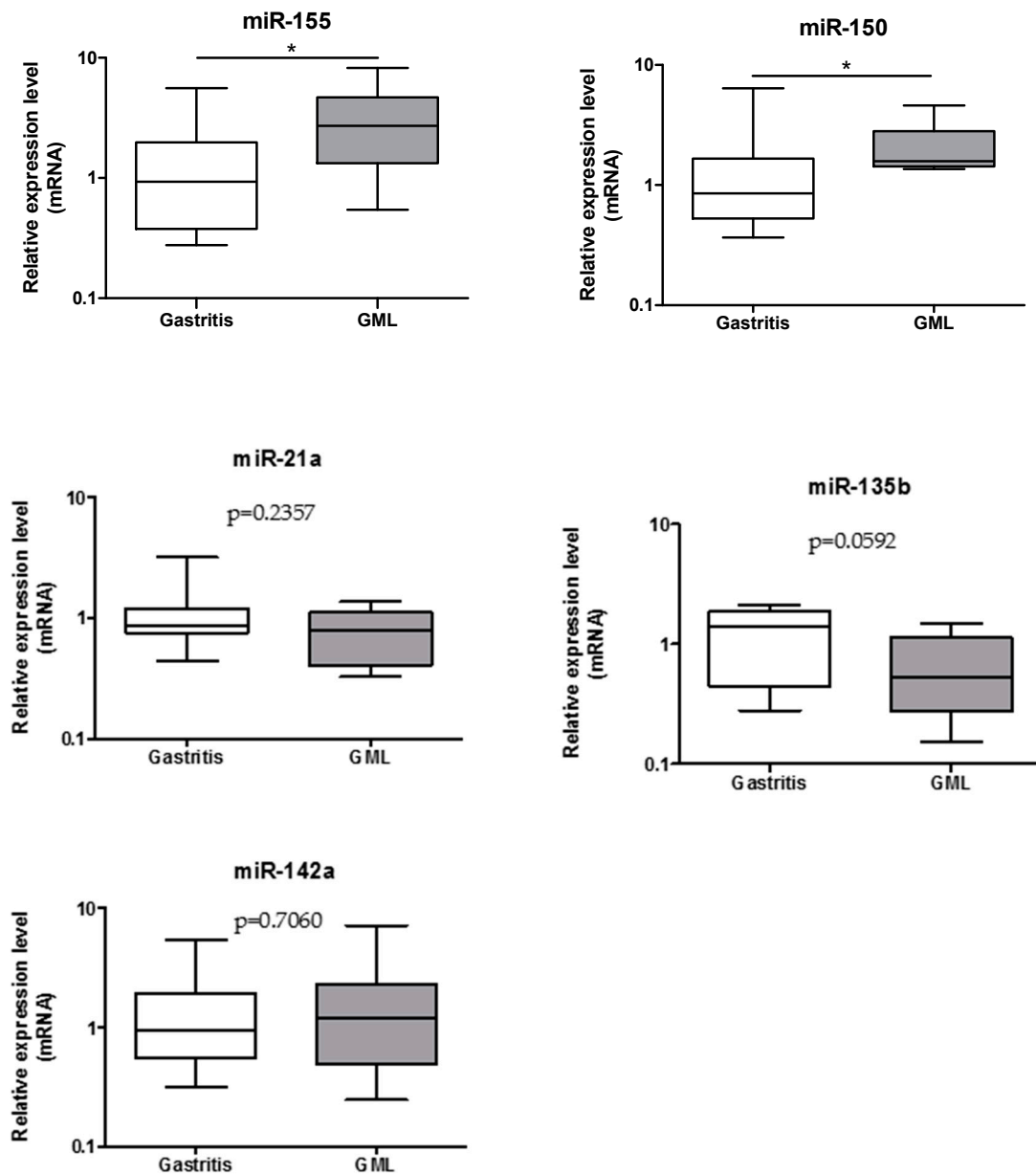


Figure 1. Relative expression levels of miR-155, miR-150, miR-21a, miR-135b, and miR-142a in gastritis and gastric mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphomas patient stomachs. Expression levels quantified by RT-qPCR for the gastric MALT lymphomas ($n = 11$) human group was normalized in comparison to expression levels for the gastritis ($n = 17$) control group. RNU6, RNU5A, and SNORD95 were used to normalize miRNA expression levels. Data are plotted as box plots, with the box representing 50% of values around the median (horizontal line) and the whiskers representing the minimum and maximum of all the data. * $p < 0.05$.

3.2. Investigation of miRNAs Expression by PCR Array

A miRNA profile was performed on a pool of 3 gastritis patients and 3 GML patients by real-time PCR arrays. Among the 372 miRNAs represented on the array, 65 were undetectable or weakly expressed (Cq-values >33), leaving 307 miRNAs for the analysis. Among these, the expression of 6 miRNAs was noticeably increased in the GML group (Fold-regulation value >3) whereas the expression of 20 miRNAs was remarkably decreased (Fold-regulation value <-3) (Table 1). We selected 9 of the 26 dysregulated miRNAs for validation by RT-qPCR. These were selected on the basis of the most significantly deregulation (highest fold-regulation values) in combination with the literature (identified miRNA targets, cancer types, predictive function): over-expressed miRNAs were miR-650 [20–22], miR196a-5p [23–26], miR-142-5p [10,11] and miR-138-5p [27] and downregulated miRNAs were miR-135a-5p [28–30], miR-7-5p [31–33], miR-210-3p [34–36], miR-153-3p [37–39] and miR-203a-3p [11,12] (Table 1, miRNAs in bold text). Two miRNAs of the final list, miR-142 and miR-135, were already analyzed based on the d3Tx mouse model [14]. Seven miRNAs, highlighted in gray on Table 1, were tested by individual RT-qPCR.

Table 1. Deregulated miRNAs in gastric MALT lymphomas compared to gastritis.

miRNA	Fold-Regulation Value
miR-650	6.8305
miR-196a-5p	6.242
miR-142-5p	3.9504
miR-138-5p	3.9231
miR-601	3.5357
miR-196b-5p	3.2761
miR-141-3p	-3.0272
miR-200a-5p	-3.0483
miR-106b-5p	-3.1558
miR-301a+3p	-3.1558
miR-30a-5p	-3.1998
miR-192-5p	-3.3357
miR-192-3p	-4.193
miR-20a-3p	-4.2222
miR-429	-4.3109
miR-22-5p	-4.5567
miR-335-5p	-4.8501
miR-95-3p	-4.952
miR-190a-5p	-6.1817
miR-203a-3p	-6.6714
miR-135b-5p	-6.859
miR-205-5p	-6.859
miR-153-3p	-7.6635
miR-210-3p	-7.6635
miR-7-5p	-7.7168
miR-135a-5p	-9.305

PCR array was performed with a pool of miRNAs from 3 gastric MALT lymphomas' patients and 3 gastritis' patients (see material and methods). miRNAs selected for validation are highlighted in gray.

3.3. Validation of the Deregulation of the miRNAs in Gastric MALT Lymphoma

Two of the three miRNAs identified as up-regulated by PCR array, miR-196a-5p ($p = 0.0060$) and miR-138-5p ($p = 0.0036$), were confirmed at the GML stage (Figure 2) compared to gastritis patients.

Down-regulation of two of the 4 miRNAs, miR-7-5p ($p = 0.0113$) and miR-153-3p ($p = 0.0004$), was confirmed at the GML stage (Figure 2) compared to gastritis patients.

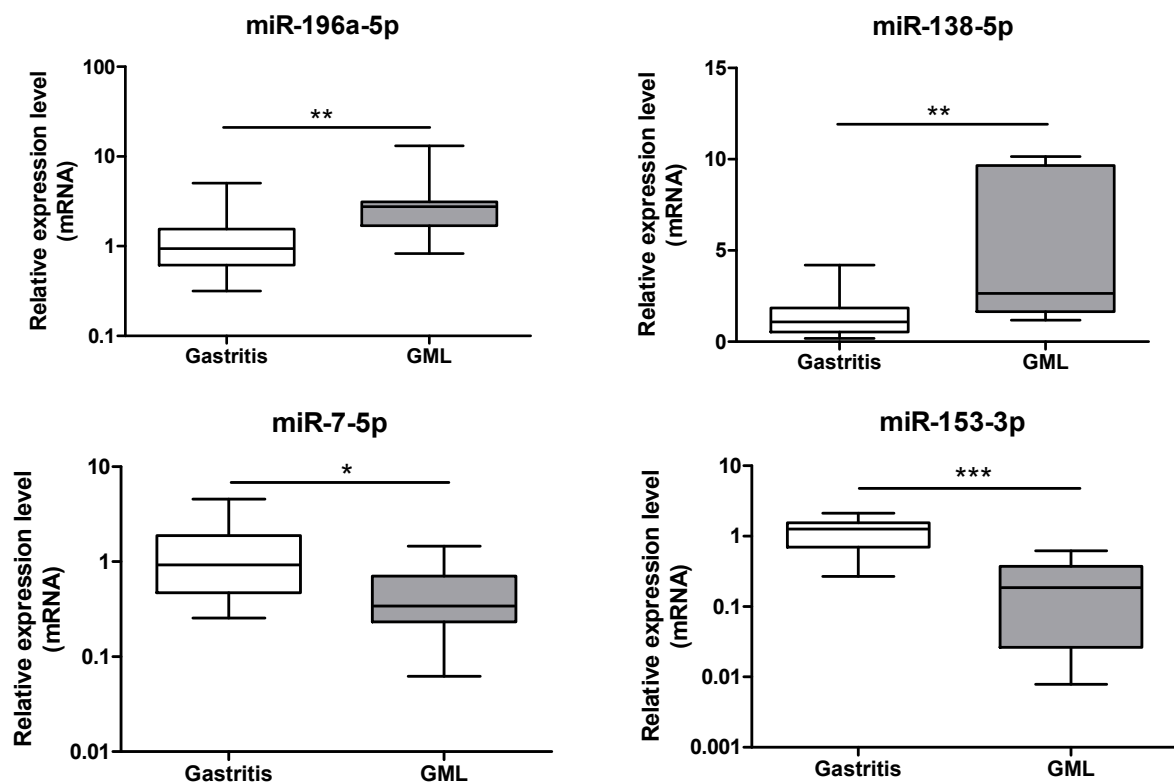


Figure 2. Relative expression levels of miR-196a-5p, miR-138-5p, miR-7-5p and miR-153-3p in gastritis and gastric MALT lymphomas. Expression levels quantified by RT-qPCR for gastric MALT lymphomas ($n = 11$) human group was normalized in comparison to expression levels for gastritis ($n = 17$) control group. RNU6, RNU5A and SNORD95 were used to normalize miRNA expression levels. Data are plotted as box plots, with the box representing 50% of values around the median (horizontal line) and the whiskers representing the minimum and maximum of all the data. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

4. Discussion

Understanding the impact of miRNA dysregulation in specific malignancies is far from straightforward. In fact, a single miRNA can target multiple mRNAs involved in overlapping biological processes and one miRNA can function as a tumor-promoting miRNA or tumor suppressor miRNA, depending on the malignancy studied. The choice of the control population compared to GML as well as the possible presence of normal residual tissue in GML samples could interfere with the identification of the change in miRNAs expression and could be an explanation of the various miRNAs expression profiles identified in previously published studies [9–11,13], including ours.

Our work focused on the deregulation of miRNA expression associated with the pathogenesis of GML. First, an up-regulation over only two (miR-155 and miR-150) of five miRNAs which were overexpressed in *H. pylori*-infected d3Tx mice, was found in GML human samples compared to gastritis samples.

Considering that miR-150 is generally known as a tumor suppressor miRNA, its up-regulation in GML is particularly remarkable. Aberrant expression of miR-150 is frequently observed in various types of hematopoietic malignancies. Thus, decreased expression of miR-150 has been described in different types of lymphomas such as mantle cell lymphoma, conjunctival MALT lymphoma, Burkitt lymphoma and NK/T cell lymphoma [40,41]. By targeting the transcription factor Myb proto-oncogene (c-Myb), miR-150 was reported to inhibit cell proliferation [42]. MiR-150 was also characterized to promote apoptosis by inhibiting the AKT pathway [41]. AKT plays a key role in cell survival pathway, including cell proliferation and survival, tissue invasion and carcinogenesis. Thus, these

two validated miR-150 targets do not seem relevant in the process of neoplastic transformation in GML disease. Nevertheless, miR-150 may act as a tumor-promoting gene in gastric lesions. In fact, an over-expression of miR-150 has already been described in samples of MALT lymphoma compared to those from gastritis [9,43]. This previous results combined with our finding emphasize the role of miR-150 as a potential tumor-promoting miRNA in GML. Furthermore, miR-150 has also been described over-expressed in gastric cancer cell lines and tissues by promoting tumorigenesis and proliferation of gastric cancer cells [44]. The pro-apoptotic gene Early Growth Response 2 (EGR2) has been identified as a direct target of miR-150 at the transcriptional level [44]. Consequently, miR-150 downregulates EGR2 expression, thereby inhibiting apoptosis. It is therefore possible that miR-150 could inhibit apoptosis in GML by this same validated signaling pathway and consequently induce B-cell proliferation (Figure 3). All of these findings may indicate that the functional significance of miR-150 in cancer development and progression seem to be cancer type-specific.

An over-expression of miR-155 has already been described in gastric biopsies of GML patients [10,11]. MiR-155 is also up-regulated in gastric epithelial cell lines and in gastric mucosal tissue specimens in response to *H. pylori* infection. According to Thorns et al. the up-regulation of miR-155 may reflect more the presence of *H. pylori* infection than the lymphoma stage [9]. These findings contrast with those of Fernández et al. [11] and ours. Indeed, we showed that miR-155 is up-regulated in the lymphoma stage compared to the gastritis stage, *H. pylori* infection being present in both populations. MiR-155 is one of the most studied miRNAs. Unlike miR-150, an over-expression of miR-155 has been associated with various cancers types including liquid tumors like lymphomas and also solid tumors such as breast, colon and lung cancers [45–48]. Moreover, miR-155 has a central role in the regulation of inflammation and immunity responses. In vivo animal experiments have shown that miR-155 is necessary to control *H. pylori* infection through Th1 and Th17 responses [49,50]. It has also been shown that the increase in miR-155 expression during *H. pylori* infection was involved in limiting the activation of NF- κ B pathway, in decreasing the release of the pro-inflammatory cytokines (like IL-8) and in the resistance to apoptosis in macrophages, thus negatively regulating the inflammatory response and contributing at the bacterial persistence [51–54]. Activation of the NF- κ B pathway has additionally been associated with the GML [55]. Considering all these potential functions, it could be expected that the up-regulation of miR-155 observed in human GML should be closely linked to the microenvironment rather than a specific signature of the GML disease. MiR-155 is an oncogenic miRNA overexpressed in numerous cancers that affect several pathways. O’Connell et al. identify Src homology-2 domain-containing inositol 5-phosphatase 1 (SHIP1) as a direct target of miR-155 [56]. By inhibiting this validated target through direct interaction with SHIP1 mRNA 3’-untranslated region (3’UTR), miR-155 increases activation of the kinase AKT, and thereby inhibits apoptosis (Figure 3). MiR-155 can also directly repress p85 α , the PI3K regulatory subunit which negatively regulates the phosphor-inositide 3 kinase (PI3K)/AKT pathway [57]. Overexpression of miR-155 in diffuse large B-cell lymphoma could down-regulate p85 α , resulting in activation of the oncogenic PI3K/AKT signaling pathway, which increases cell proliferation (Figure 3). Tumor Protein 53-Induced Nuclear Protein 1 (TP53INP1) has also been described by Saito et al. as a direct target of miR-155 [10]. The expression of TP53INP1 is suppressed notably by overexpression of miR-155 in GML lesions. In addition, we showed that the production of TP53INP1 was decreased in GML mice relative to control mice [14]. TP53INP1, induced by p53, is over-expressed in response to cellular stress such as inflammation. An over-expression of this pro-apoptotic protein promotes apoptosis and cell cycle arrest [58]. These findings suggest that the over-expression of miR-155 concomitant to the suppression of TP53INP1, as well as SHIP1 and p85 α , participates to the inhibition of cell apoptosis, thereby promoting the proliferation of MALT lymphoma cells (Figure 3).

Our initial findings regarding the over-expression of miR-21, miR-142 and miR-135 in the GML mouse model failed to reach statistical significance in the present study based on human materials. We therefore examined the expression profile of 372 selected miRNAs in GML and found a significant over-expression of miR-196a, miR-138-5p and down-regulation of miR-7-5p, miR-153-3p in GML

compared to gastritis. All these miRNAs have already been described to be deregulated in the process of gastric malignancies, but not yet in GML [37,59]. Surprisingly, we did not find any significant difference in miR-650, miR-142, miR-135, miR-210 and miR-203 expression between gastritis and GML patients, whereas they were found to be deregulated by the PCR array. The fact that the PCR array was realized with a pool of only 3 samples could explain these discordant results.

MiR-196 plays critical roles in normal development, regulating several key cellular processes including cell proliferation, apoptosis, and differentiation [60]. Consequently, its dysregulation, more frequently its up-regulation, is involved in the pathogenesis of multiple cancers such as gastric cancer [59,61,62]. Expression of miR-196 in gastric cancer tissues increased gradually with tumor size and was correlated with shorter patients' overall survival times [23]. MiR-196 may function as an oncogene by promoting cell proliferation targeting various transcription factors such as HOX, HMGA2, and Annexin A1 [26,61]. Additionally, miR-196 targets the 3'UTR region of p27^{kip1}, a tumor suppressor gene, which specifically represses cell proliferation and induces cell apoptosis. In gastric cancer (as shown in Sun et al.) [23] and in GML (as shown by our results), overexpression of miR-196 and downregulation of p27^{kip1} could promote cell proliferation and contribute to the malignancy process (Figure 3). The significant overexpression of miR-196 in GML patient stomachs confirms previous data and suggests that this miRNA could participate in the inhibition of lymphocyte apoptosis and promote B-cell survival and proliferation.

The results of the present study also revealed an up-regulation of miR-138-5p in GML patients. MiR-138, a significant tumor-related miRNA, is known to play opposite and different functions according to the types of malignancies. MiR-138 has been reported as a tumor suppressor in multiple human solid cancers such as colorectal cancer, non-small-cell lung cancer, hepatocellular carcinoma, glioma carcinoma, and ovarian cancer, in which its reduced expression was shown to promote cell proliferation of cancer cells [63–67]. While the majority of studies have mentioned that miR-138 was downregulated, possibly playing a tumor-suppressive role, opposite results have been found in gastric cancer. Whereas Pang et al. found that miR-138 expression was down-regulated in gastric cancer tissues compared with the adjacent normal tissues [68], Yao et al. identified miR-138 among the set of 22 miRNA significantly up-regulated in gastric cancer compared to normal gastric tissue [27]. To our knowledge, no validated target of miR-138 possibly involved in the lymphomagenesis process has been identified yet. In front of these conflicting results and functions, more research about miR-138 dysregulation in gastric malignancies including GML is needed.

Our study also revealed a down-regulation of miR-153-3p and miR-7-5p in GML compared to gastritis. Previous studies showed that miR-153, significantly deregulated in various tumors, could function as a tumor suppressor [39]. Zhang et al. have reported that miR-153 expression was significantly downregulated in gastric cancer tissues as compared to non-tumor tissues [38]. This study and others showed that snail family zinc finger 1 (SNAI1) could act as a direct target of miR-153 and promote cell invasiveness and tumor progression [38,69]. Interestingly, Yuan et al. demonstrated that AKT is also a direct target of miR-153 and their data indicated that miR-153 exerts its anti-tumor activity by acting on AKT expression [70]. As previously mentioned for miR-155, AKT pathway could be involved in the process of lymphomagenesis in GML disease. Additionally, we suggested that miR-153, found significantly decreased in our GML study, might increase AKT expression and thus activate cell proliferation and inhibit apoptosis (Figure 3). MiR-7 is also known to act as a tumor suppressor in various cancers including breast cancer, glioblastoma and gastric cancer [33,71,72]. Several studies have shown that the expression of miR-7 was significantly decreased in gastric cancer tissues compared to normal stomach tissues [32,33]. Reduced miR-7 expression dramatically enhances growth, invasion, and metastasis of cancer cells and contributes to gastric cancer development and progression by targeting Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) or insulin-like growth factor-1 receptor [31,32,73]. Previous works indicated that miR-7 could modulate PI3K/AKT pathway in malignancies including gastric cancer through reduced PI3K expression, which was identified as one of its validated direct

targets [72,74]. Decreased miR-7 expression found in our GML study could also participate in the activation of the PI3K/AKT signaling pathway and promote cell survival (Figure 3).

Interestingly, we suggested that three of the six deregulated miRNAs could promote the lymphomagenesis through the activation of PI3K/AKT signaling. Subsequent studies could be aimed at examining the expression of the PI3K/AKT pathway in cells of GML patients compared to gastritis patients in order to strongly support our hypothesis.

As previous studies have suggested that *H. pylori* cytotoxin-associated gene A (CagA) directly participate to the lymphomagenesis of *H. pylori*-dependent GML [75–77], it could also be of major interest to determine if CagA could participate in the deregulation of these miRNAs.

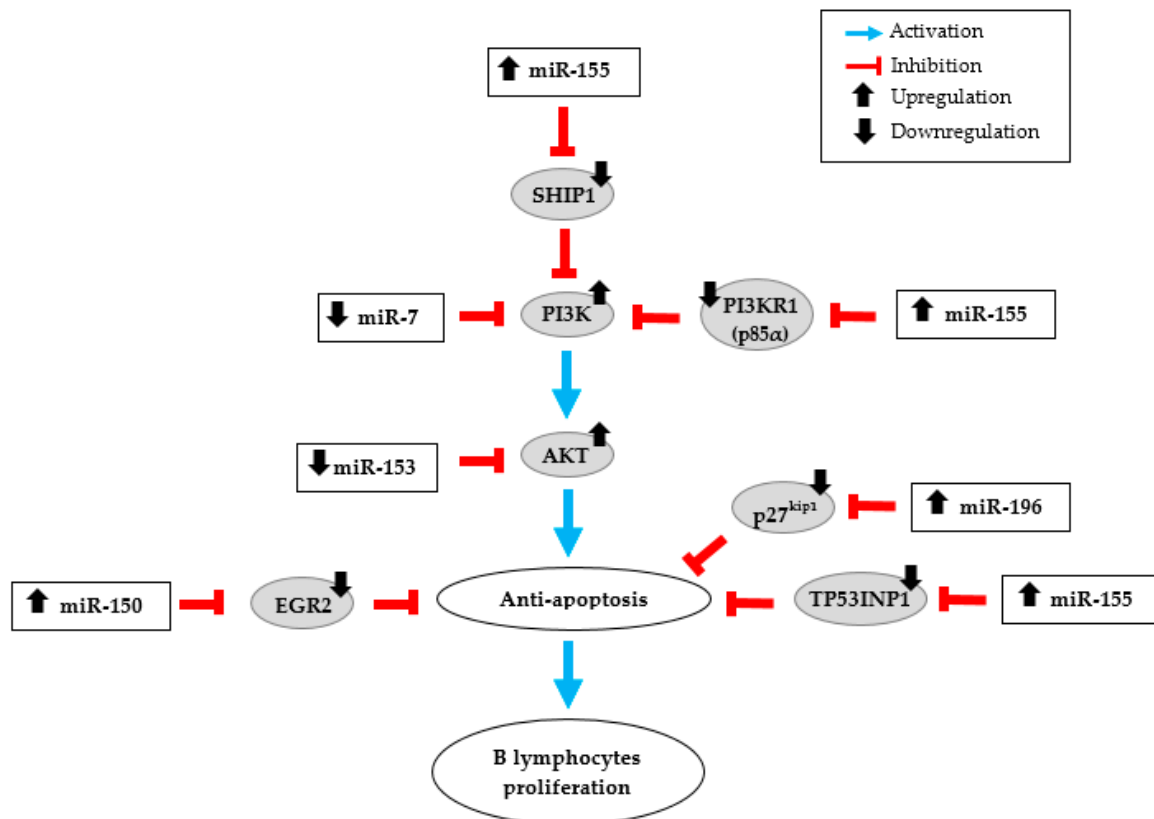


Figure 3. miRNA dysregulation in human gastric MALT lymphoma (GML). Schematic illustration of the potential action network of validated targets of miRNAs overexpressed (miR-155, miR-150 and miR-196) or down-regulated (miR-7 and miR-153) in GML patient stomachs.

5. Conclusions

In conclusion, four miRNAs up-regulated (miR-155, miR-150, miR-196a and miR-138) and two miRNAs downregulated (miR-7 and miR-153) in gastric lymphomagenesis in human samples compared to gastritis were identified in our study. Our results indicate that the miRNAs (except miR-138) described in this study could act synergistically on multiple validated targets, and some of them (notably miR-155) could act on redundant validated targets involved in a common signaling cascade promoting cell survival and lymphocyte proliferation (Figure 3). Therefore, it is possible that several pathways can promote lymphomagenesis through both the up-regulation of oncogenic miRNAs and by the downregulation of tumor-suppressor miRNAs. Our findings strengthen the idea that miRNAs deregulation may be involved in GML pathogenesis and that miRNAs can represent important molecular factors in inhibition of lymphocytes apoptosis and promote B-cell survival and proliferation.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/2077-0383/8/6/845/s1>, Table S1: List of the specific primers (Qiagen) used for each miRNA amplification by RT-qPCR.

Author Contributions: A.B. performed and analyzed the experiments. P.L. and C.S. supervised the project. M.L., C.R. and C.C.-B. included and selected the human samples. All the authors wrote the manuscript.

Funding: This research was funded by the Ligue Contre le Cancer, comité Aquitaine Charentes.

Acknowledgments: The author thank Caroline Barau and Maxime Anquetin from the Plateforme de Ressources biologiques BB-0033-00021, APHP, Hôpital Henri Mondor, 94000 Créteil, France.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Zucca, E.; Copie-Bergman, C.; Ricardi, U.; Thieblemont, C.; Raderer, M.; Ladetto, M.; on behalf of the ESMO Guidelines Working Group. Gastric marginal zone lymphoma of MALT type: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann. Oncol.* **2013**, *24*, vi144–vi148. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Zullo, A.; Hassan, C.; Ridola, L.; Repici, A.; Manta, R.; Andriani, A. Gastric MALT lymphoma: Old and new insights. *Ann. Gastroenterol.* **2014**, *27*, 27–33. [[PubMed](#)]
3. Fischbach, W.; Goebeler-Kolve, M.-E.; Dragosics, B.; Greiner, A.; Stolte, M. Long term outcome of patients with gastric marginal zone B cell lymphoma of mucosa associated lymphoid tissue (MALT) following exclusive *Helicobacter pylori* eradication therapy: Experience from a large prospective series. *Gut* **2004**, *53*, 34–37. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Ullrich, A.; Fischbach, W.; Blettner, M. Incidence of gastric B-cell lymphomas: A population-based study in Germany. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* **2002**, *13*, 1120–1127. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Kusters, J.G.; van Vliet, A.H.M.; Kuipers, E.J. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* Infection. *Clin. Microbiol. Rev.* **2006**, *19*, 449–490. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Vasilatou, D.; Sioulas, A.D.; Pappa, V.; Papanikolaou, I.S.; Triantafyllou, K.; Dimitriadis, G.D.; Papageorgiou, S.G. The role of miRNAs and epigenetic mechanisms in primary gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Future Oncol.* **2016**, *12*, 1587–1593. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Bartels, C.L.; Tsongalis, G.J. MicroRNAs: Novel Biomarkers for Human Cancer. *Clin. Chem.* **2009**, *55*, 623–631. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Lawrie, C.H. microRNA expression in lymphoid malignancies: New hope for diagnosis and therapy? *J. Cell. Mol. Med.* **2008**, *12*, 1432–1444. [[CrossRef](#)]
9. Thorns, C.; Kuba, J.; Bernard, V.; Senft, A.; Szymczak, S.; Feller, A.C.; Bernd, H.-W. Dereglulation of a distinct set of microRNAs is associated with transformation of gastritis into MALT lymphoma. *Virchows Arch.* **2012**, *460*, 371–377. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Saito, Y.; Suzuki, H.; Tsugawa, H.; Imaeda, H.; Matsuzaki, J.; Hirata, K.; Hosoe, N.; Nakamura, M.; Mukai, M.; Saito, H.; et al. Overexpression of miR-142-5p and miR-155 in Gastric Mucosa-Associated Lymphoid Tissue (MALT) Lymphoma Resistant to *Helicobacter pylori* Eradication. *PLoS ONE* **2012**, *7*. [[CrossRef](#)]
11. Fernández, C.; Bellosillo, B.; Ferraro, M.; Seoane, A.; Sánchez-González, B.; Pairet, S.; Pons, A.; Barranco, L.; Vela, M.C.; Gimeno, E.; et al. MicroRNAs 142-3p, miR-155 and miR-203 Are Dereglulated in Gastric MALT Lymphomas Compared to Chronic Gastritis. *Cancer Genomics Proteomics* **2017**, *14*, 75–82. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Craig, V.J.; Cogliatti, S.B.; Rehrauer, H.; Wündisch, T.; Müller, A. Epigenetic Silencing of MicroRNA-203 Dysregulates ABL1 Expression and Drives *Helicobacter*-Associated Gastric Lymphomagenesis. *Cancer Res.* **2011**, *71*, 3616–3624. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Zhang, Y.; Liu, A.; E, M.; Quan, L.; Qu, Y.; Gu, A. Three novel microRNAs based on microRNA signatures for gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Neoplasia* **2018**, *65*, 339–348. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Floch, P.; Capdevielle, C.; Staedel, C.; Izotte, J.; Sifré, E.; Laur, A.M.; Giese, A.; Korolik, V.; Dubus, P.; Mégraud, F.; et al. Dereglulation of MicroRNAs in Gastric Lymphomagenesis Induced in the d3Tx Mouse Model of *Helicobacter pylori* Infection. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2017**, *7*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Chrisment, D.; Dubus, P.; Chambonnier, L.; Hocès de la Guardia, A.; Sifré, E.; Giese, A.; Capone, M.; Khairallah, C.; Costet, P.; Rousseau, B.; et al. Neonatal Thymectomy Favors *Helicobacter pylori*-Promoted Gastric Mucosa-Associated Lymphoid Tissue Lymphoma Lesions in BALB/c Mice. *Am. J. Pathol.* **2014**, *184*, 2174–2184. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

16. Swerdlow, S.H.; Campo, E.; Harris, N.L.; Jaffe, E.S.; Pileri, S.A.; Stein, H.; Thiele, J. *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*, Revised 4th ed.; International Agency for Research on Cancer (IARC): Lyon, France, 2017; Volume 2, ISBN 978-92-832-4494-3.
17. Amiot, A.; Lévy, M.; Copie-Bergman, C.; Dupuis, J.; Szablewski, V.; Le Baleur, Y.; Baia, M.; Belhadj, K.; Sobhani, I.; Leroy, K.; et al. Rituximab, alkylating agents or combination therapy for gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma: A monocentric non-randomised observational study. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **2014**, *39*, 619–628. [[CrossRef](#)]
18. Tankovic, J.; Lamarque, D.; Lascols, C.; Soussy, C.J.; Delchier, J.C. Clarithromycin resistance of *Helicobacter pylori* has a major impact on the efficacy of the omeprazole-amoxicillin-clarithromycin therapy. *Pathol. Biol. (Paris)* **2001**, *49*, 528–533. [[CrossRef](#)]
19. Ferreri, A.J.M.; Ernberg, I.; Copie-Bergman, C. Infectious agents and lymphoma development: Molecular and clinical aspects. *J. Intern. Med.* **2009**, *265*, 421–438. [[CrossRef](#)]
20. Zhang, X.; Zhu, W.; Zhang, J.; Huo, S.; Zhou, L.; Gu, Z.; Zhang, M. MicroRNA-650 targets ING4 to promote gastric cancer tumorigenicity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2010**, *395*, 275–280. [[CrossRef](#)]
21. Han, L.L.; Yin, X.R.; Zhang, S.Q. miR-650 Promotes the Metastasis and Epithelial–Mesenchymal Transition of Hepatocellular Carcinoma by Directly Inhibiting LATS2 Expression. *Cell. Physiol. Biochem.* **2018**, *51*, 1179–1192. [[CrossRef](#)]
22. Zeng, Z.; Li, F.; Gao, F.; Sun, D.; Yao, L. Upregulation of miR-650 is correlated with down-regulation of ING4 and progression of hepatocellular carcinoma. *J. Surg. Oncol.* **2013**, *107*, 105–110. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Sun, M.; Liu, X.; Li, J.; Yang, J.; Zhang, E.; Yin, D.; Liu, Z.; Zhou, J.; Ding, Y.; Li, S.; et al. MiR-196a Is Upregulated in Gastric Cancer and Promotes Cell Proliferation by Downregulating p27kip1. *Mol. Cancer Ther.* **2012**, *11*, 842–852. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Xin, H.; Wang, C.; Liu, Z. miR-196a-5p promotes metastasis of colorectal cancer via targeting IκBα. *BMC Cancer* **2019**, *19*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Zhao, X.; Zhang, W.; Ji, W. miR-196b is a prognostic factor of human laryngeal squamous cell carcinoma and promotes tumor progression by targeting SOCS2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2018**, *501*, 584–592. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Shen, S.; Pan, J.; Lu, X.; Chi, P. Role of miR-196 and its target gene HoxB8 in the development and proliferation of human colorectal cancer and the impact of neoadjuvant chemotherapy with FOLFOX4 on their expression. *Oncol. Lett.* **2016**, *12*, 4041–4047. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Yao, Y.; Suo, A.-L.; Li, Z.-F.; Liu, L.-Y.; Tian, T.; Ni, L.; Zhang, W.-G.; Nan, K.-J.; Song, T.-S.; Huang, C. MicroRNA profiling of human gastric cancer. *Mol. Med. Rep.* **2009**, *2*, 963–970. [[PubMed](#)]
28. Jiang, D.; Zhou, B.; Xiong, Y.; Cai, H. miR-135 regulated breast cancer proliferation and epithelial-mesenchymal transition acts by the Wnt/β-catenin signaling pathway. *Int. J. Mol. Med.* **2019**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Navarro, A.; Diaz, T.; Martinez, A.; Gaya, A.; Pons, A.; Gel, B.; Codony, C.; Ferrer, G.; Martinez, C.; Montserrat, E.; et al. Regulation of JAK2 by miR-135a: Prognostic impact in classic Hodgkin lymphoma. *Blood* **2009**, *114*, 2945–2951. [[CrossRef](#)]
30. Wu, H.; Huang, M.; Cao, P.; Wang, T.; Shu, Y.; Liu, P. MiR-135a targets JAK2 and inhibits gastric cancer cell proliferation. *Cancer Biol. Ther.* **2012**, *13*, 281–288. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Zhao, X.; Dou, W.; He, L.; Liang, S.; Tie, J.; Liu, C.; Li, T.; Lu, Y.; Mo, P.; Shi, Y.; et al. MicroRNA-7 functions as an anti-metastatic microRNA in gastric cancer by targeting insulin-like growth factor-1 receptor. *Oncogene* **2013**, *32*, 1363–1372. [[CrossRef](#)]
32. Xie, J.; Chen, M.; Zhou, J.; Mo, M.-S.; Zhu, L.-H.; Liu, Y.-P.; Gui, Q.-J.; Zhang, L.; Li, G.-Q. miR-7 inhibits the invasion and metastasis of gastric cancer cells by suppressing epidermal growth factor receptor expression. *Oncol. Rep.* **2014**, *31*, 1715–1722. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Kong, D.; Piao, Y.-S.; Yamashita, S.; Oshima, H.; Oguma, K.; Fushida, S.; Fujimura, T.; Minamoto, T.; Seno, H.; Yamada, Y.; et al. Inflammation-induced repression of tumor suppressor miR-7 in gastric tumor cells. *Oncogene* **2012**, *31*, 3949–3960. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Tagscherer, K.E.; Fassl, A.; Sinkovic, T.; Richter, J.; Schecher, S.; Macher-Goeppinger, S.; Roth, W. MicroRNA-210 induces apoptosis in colorectal cancer via induction of reactive oxygen. *Cancer Cell Int.* **2016**, *16*. [[CrossRef](#)]

35. Cheng, Z.; Geng, H.; Cheng, Y.; Dong, N.; Ning, F.; Yu, Z.; Jian, J.; Chen, S. Effects of MiR-210 on proliferation, apoptosis and invasion abilities of esophageal cancer cells. *J. BUON* **2018**, *23*, 814–819. [[PubMed](#)]
36. Tsuchiya, S.; Fujiwara, T.; Sato, F.; Shimada, Y.; Tanaka, E.; Sakai, Y.; Shimizu, K.; Tsujimoto, G. MicroRNA-210 Regulates Cancer Cell Proliferation through Targeting Fibroblast Growth Factor Receptor-like 1 (FGFRL1). *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 420–428. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Ouyang, Y.; Yuan, W.; Qiu, S. MicroRNA-153 functions as a tumor suppressor in gastric cancer via targeting Kruppel-like factor 5. *Exp. Ther. Med.* **2018**, *16*, 473–482. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Zhang, Z.; Sun, J.; Bai, Z.; Li, H.; He, S.; Chen, R.; Che, X. MicroRNA-153 acts as a prognostic marker in gastric cancer and its role in cell migration and invasion. *OncoTargets Ther.* **2015**, *8*, 357–364.
39. Li, G.; Xue, M.; Yang, F.; Jin, Y.; Fan, Y.; Li, W. CircRBMS3 promotes gastric cancer tumorigenesis by regulating miR-153–SNAI1 axis. *J. Cell. Physiol.* **2019**, *234*, 3020–3028. [[CrossRef](#)]
40. He, Y.; Jiang, X.; Chen, J. The role of miR-150 in normal and malignant hematopoiesis. *Oncogene* **2014**, *33*, 3887–3893. [[CrossRef](#)]
41. Wu, S.J.; Chen, J.; Wu, B.; Wang, Y.J.; Guo, K.Y. MicroRNA-150 enhances radiosensitivity by inhibiting the AKT pathway in NK/T cell lymphoma. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2018**, *37*. [[CrossRef](#)]
42. Xiao, C.; Calado, D.P.; Galler, G.; Thai, T.-H.; Patterson, H.C.; Wang, J.; Rajewsky, N.; Bender, T.P.; Rajewsky, K. MiR-150 Controls B Cell Differentiation by Targeting the Transcription Factor c-Myb. *Cell* **2007**, *131*, 146–159. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Gebauer, N.; Kuba, J.; Senft, A.; Schillert, A.; Bernard, V.; Thorns, C. MicroRNA-150 Is up-regulated in Extranodal Marginal Zone Lymphoma of MALT Type. *Cancer Genomics - Proteomics* **2014**, *11*, 51–56. [[PubMed](#)]
44. Wu, Q.; Jin, H.; Yang, Z.; Luo, G.; Lu, Y.; Li, K.; Ren, G.; Su, T.; Pan, Y.; Feng, B.; et al. MiR-150 promotes gastric cancer proliferation by negatively regulating the pro-apoptotic gene EGR2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2010**, *392*, 340–345. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Lawrie, C.H. MicroRNAs and lymphomagenesis: A functional review. *Br. J. Haematol.* **2013**, *160*, 571–581. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Tagawa, H.; Ikeda, S.; Sawada, K. Role of microRNA in the pathogenesis of malignant lymphoma. *Cancer Sci.* **2013**, *104*, 801–809. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Tili, E.; Michaille, J.-J.; Croce, C.M. MicroRNAs play a central role in molecular dysfunctions linking inflammation with cancer. *Immunol. Rev.* **2013**, *253*, 167–184. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Babar, I.A.; Cheng, C.J.; Booth, C.J.; Liang, X.; Weidhaas, J.B.; Saltzman, W.M.; Slack, F.J. Nanoparticle-based therapy in an in vivo microRNA-155 (miR-155)-dependent mouse model of lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, E1695–E1704. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Oertli, M.; Engler, D.B.; Kohler, E.; Koch, M.; Meyer, T.F.; Muller, A. MicroRNA-155 Is Essential for the T Cell-Mediated Control of *Helicobacter pylori* Infection and for the Induction of Chronic Gastritis and Colitis. *J. Immunol.* **2011**, *187*, 3578–3586. [[CrossRef](#)]
50. O’Connell, R.M.; Kahn, D.; Gibson, W.S.J.; Round, J.L.; Scholz, R.L.; Chaudhuri, A.A.; Kahn, M.E.; Rao, D.S.; Baltimore, D. MicroRNA-155 promotes autoimmune inflammation by enhancing inflammatory T cell development. *Immunity* **2010**, *33*, 607–619. [[CrossRef](#)]
51. Xiao, B.; Liu, Z.; Li, B.-S.; Tang, B.; Li, W.; Guo, G.; Shi, Y.; Wang, F.; Wu, Y.; Tong, W.-D.; et al. Induction of microRNA-155 during *Helicobacter pylori* Infection and Its Negative Regulatory Role in the Inflammatory Response. *J. Infect. Dis.* **2009**, *200*, 916–925. [[CrossRef](#)]
52. Hocès de la Guardia, A.; Staedel, C.; Kaafarany, I.; Clément, A.; Roubaud Baudron, C.; Mégraud, F.; Lehours, P. Inflammatory cytokine and microRNA responses of primary human dendritic cells cultured with *Helicobacter pylori* strains. *Front. Microbiol.* **2013**, *4*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Wang, J.; Deng, Z.; Wang, Z.; Wu, J.; Gu, T.; Jiang, Y.; Li, G. MicroRNA-155 in exosomes secreted from *Helicobacter pylori* infection macrophages immunomodulates inflammatory response. *Am. J. Transl. Res.* **2016**, *8*, 3700–3709. [[PubMed](#)]
54. Koch, M.; Mollenkopf, H.-J.; Klemm, U.; Meyer, T.F. Induction of microRNA-155 is TLR- and type IV secretion system-dependent in macrophages and inhibits DNA-damage induced apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, E1153–E1162. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

55. Du, M.-Q. MALT lymphoma: Many roads lead to nuclear factor- κ B activation. *Histopathology* **2011**. Available online: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1365-2559.2010.03699.x> (accessed on 24 April 2019). [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. O'Connell, R.M.; Chaudhuri, A.A.; Rao, D.S.; Baltimore, D. Inositol phosphatase SHIP1 is a primary target of miR-155. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 7113–7118. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Huang, X.; Shen, Y.; Liu, M.; Bi, C.; Jiang, C.; Iqbal, J.; McKeithan, T.W.; Chan, W.C.; Ding, S.-J.; Fu, K. Quantitative Proteomics Reveals that miR-155 Regulates the PI3K-AKT Pathway in Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Am. J. Pathol.* **2012**, *181*, 26–33. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Tomasini, R.; Seux, M.; Nowak, J.; Bontemps, C.; Carrier, A.; Dagorn, J.-C.; Pébusque, M.-J.; Iovanna, J.L.; Dusetti, N.J. TP53INP1 is a novel p73 target gene that induces cell cycle arrest and cell death by modulating p73 transcriptional activity. *Oncogene* **2005**, *24*, 8093–8104. [[CrossRef](#)]
59. Zhang, Z.; Li, Z.; Li, Y.; Zang, A. MicroRNA and signaling pathways in gastric cancer. *Cancer Gene Ther.* **2014**, *21*, 305–316. [[CrossRef](#)]
60. Chen, C.; Zhang, Y.; Zhang, L.; Weakley, S.M.; Yao, Q. MicroRNA-196: Critical roles and clinical applications in development and cancer. *J. Cell. Mol. Med.* **2011**, *15*, 14–23. [[CrossRef](#)]
61. Lu, Y.-C.; Chang, J.T.; Chan, E.-C.; Chao, Y.-K.; Yeh, T.-S.; Chen, J.-S.; Cheng, A.-J. miR-196, an Emerging Cancer Biomarker for Digestive Tract Cancers. *J. Cancer* **2016**, *7*, 650–655. [[CrossRef](#)]
62. Lee, J.W.; Kim, N.; Park, J.H.; Kim, H.J.; Chang, H.; Kim, J.M.; Kim, J.-W.; Lee, D.H. Differential MicroRNA Expression Between Gastric Cancer Tissue and Non-cancerous Gastric Mucosa According to *Helicobacter pylori* Status. *J. Cancer Prev.* **2017**, *22*, 33–39. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Liu, Y.; Zhang, W.; Liu, K.; Liu, S.; Ji, B.; Wang, Y. miR-138 suppresses cell proliferation and invasion by inhibiting SOX9 in hepatocellular carcinoma. *Am. J. Transl. Res.* **2016**, *8*, 2159–2168. [[PubMed](#)]
64. Tang, X.; Jiang, J.; Zhu, J.; He, N.; Tan, J. HOXA4-regulated miR-138 suppresses proliferation and gefitinib resistance in non-small cell lung cancer. *Mol. Genet. Genomics MGG* **2019**, *294*, 85–93. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. You, C.; Jin, L.; Xu, Q.; Shen, B.; Jiao, X.; Huang, X. Expression of miR-21 and miR-138 in colon cancer and its effect on cell proliferation and prognosis. *Oncol. Lett.* **2019**, *17*, 2271–2277. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Qu, M.; Zhu, Y.; Jin, M. MicroRNA-138 inhibits SOX12 expression and the proliferation, invasion and migration of ovarian cancer cells. *Exp. Ther. Med.* **2018**, *16*, 1629–1638. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Xu, Y.; Pan, Z.-G.; Shu, L.; Li, Q.-J. Podocalyxin-like, targeted by miR-138, promotes colorectal cancer cell proliferation, migration, invasion and EMT. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **2018**, *22*, 8664–8674.
68. Pang, L.; Li, B.; Zheng, B.; Niu, L.; Ge, L. miR-138 inhibits gastric cancer growth by suppressing SOX4. *Oncol. Rep.* **2017**, *38*, 1295–1302. [[CrossRef](#)]
69. Wang, Z.; Liu, C. MiR-153 regulates metastases of gastric cancer through Snail. *Tumor Biol.* **2016**, *37*, 15509–15515. [[CrossRef](#)]
70. Yuan, Y.; Du, W.; Wang, Y.; Xu, C.; Wang, J.; Zhang, Y.; Wang, H.; Ju, J.; Zhao, L.; Wang, Z.; et al. Suppression of AKT expression by miR-153 produced anti-tumor activity in lung cancer. *Int. J. Cancer* **2015**, *136*, 1333–1340. [[CrossRef](#)]
71. Masuda, M.; Miki, Y.; Hata, S.; Takagi, K.; Sakurai, M.; Ono, K.; Suzuki, K.; Yang, Y.; Abe, E.; Hirakawa, H.; et al. An induction of microRNA, miR-7 through estrogen treatment in breast carcinoma. *J. Transl. Med.* **2012**, *10*, S2. [[CrossRef](#)]
72. Liu, Z.; Jiang, Z.; Huang, J.; Huang, S.; Li, Y.; Yu, S.; Yu, S.; Liu, X. miR-7 inhibits glioblastoma growth by simultaneously interfering with the PI3K/ATK and Raf/MEK/ERK pathways. *Int. J. Oncol.* **2014**, *44*, 1571–1580. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Yang, Z.; Shi, X.; Li, C.; Wang, X.; Hou, K.; Li, Z.; Zhang, X.; Fan, Y.; Qu, X.; Che, X.; et al. Long non-coding RNA UCA1 upregulation promotes the migration of hypoxia-resistant gastric cancer cells through the miR-7-5p/EGFR axis. *Exp. Cell Res.* **2018**, *368*, 194–201. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Pan, H.; Li, T.; Jiang, Y.; Pan, C.; Ding, Y.; Huang, Z.; Yu, H.; Kong, D. Overexpression of Circular RNA ciRS-7 Abrogates the Tumor Suppressive Effect of miR-7 on Gastric Cancer via PTEN/PI3K/AKT Signaling Pathway. *J. Cell. Biochem.* **2018**, *119*, 440–446. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Kuo, S.-H.; Yeh, K.-H.; Chen, L.-T.; Lin, C.-W.; Hsu, P.-N.; Wu, M.-S.; Liou, J.-M.; Tsai, H.-J.; Tzeng, Y.-S.; Cheng, A.-L. *Helicobacter pylori* CagA Translocation Is Closely Associated with the Expression of CagA-signaling Molecules in Low-grade Gastric Mucosa-associated Lymphoid Tissue Lymphoma. *Am. J. Surg. Pathol.* **2015**, *39*, 761–766. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

76. Floch, P.; Mégraud, F.; Lehours, P. *Helicobacter pylori* Strains and Gastric MALT Lymphoma. *Toxins* **2017**, *9*, 132. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Kuo, S.-H.; Wu, M.-S.; Yeh, K.-H.; Lin, C.-W.; Hsu, P.-N.; Chen, L.-T.; Cheng, A.-L. Novel Insights of Lymphomagenesis of *Helicobacter pylori*-Dependent Gastric Mucosa-Associated Lymphoid Tissue Lymphoma. *Cancers* **2019**, *11*, 547. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Article 2 :

Lymphomagenèse gastrique et cytokine APRIL : rôle potentiel des polynucléaires éosinophiles

L'étude de la réponse inflammatoire en modèle murin d3Tx a permis à l'équipe d'envisager un lien entre la dérégulation de la cytokine APRIL et la lymphomagenèse gastrique d'où le développement d'un nouveau modèle murin de LGM (Tg-hAPRIL), basé sur l'utilisation de souris transgéniques exprimant la forme humaine de cette cytokine, infectées par *Helicobacter* sp. Nous avons donc entrepris l'étude de la polarisation de la réponse inflammatoire dans le modèle Tg-hAPRIL puis, nous avons comparé les résultats obtenus à ceux issus de matériel humain afin de valider ce nouveau modèle prometteur. Enfin, nous avons tenté de caractériser les cellules productrices et les cellules cibles de la cytokine APRIL.

Méthodes : Le matériel humain a été obtenu grâce à une collaboration avec l'hôpital Henri Mondor et avec l'hôpital Saint-Antoine. Les techniques de RT-qPCR, d'immunohistochimie et d'immunofluorescence nous ont notamment permis d'étudier et de comparer la polarisation des réponses inflammatoires gastriques murine et humaine ainsi que d'identifier, au sein du microenvironnement tumoral, les cellules productrices et les cellules cibles de la cytokine APRIL au stade LGM chez l'homme.

Résultats : Nos résultats ont montré la présence d'une réponse inflammatoire gastrique équilibrée avec une réponse Th1, Th2 et T régulatrice significativement plus intense au stade lymphome par rapport à la population témoin, aussi bien en modèle murin Tg-hAPRIL que chez l'homme. Ainsi, le modèle de souris Tg-hAPRIL semble reproduire la réponse inflammatoire propre au LGM humain. Après avoir confirmé, par RT-qPCR, la surexpression de la cytokine APRIL au niveau gastrique chez des patients atteints du LGM par rapport à une population témoin, nous avons mis en évidence que les cellules cibles de la cytokine APRIL étaient majoritairement des lymphocytes B présents au sein des infiltrats lymphoïdes, appuyant ainsi l'hypothèse selon laquelle la cytokine APRIL participerait à la prolifération lymphocytaire B non contrôlée caractéristique de cette pathologie. Enfin, concernant l'identification des cellules productrices de la cytokine APRIL, nos résultats ont démontré qu'il s'agissait de rares polynucléaires éosinophiles

(PNE) présents dans le microenvironnement tumoral gastrique de patients atteints de LGM, suggérant un rôle pro-tumoral de ce sous-type de cellules polynuclées dans la lymphomagenèse gastrique.

Ce travail a été réalisé en association avec une étudiante en master 2 recherche, Sara Peru et a été publié dans le journal *Scientific Reports* en septembre 2020.



OPEN

APRIL-producing eosinophils are involved in gastric MALT lymphomagenesis induced by *Helicobacter sp* infection

Alice Blossse^{1,13,14}, Sara Peru^{1,14}, Michael Levy^{2,3}, Benoit Marteyn^{4,5}, Pauline Floch¹, Elodie Sifré¹, Alban Giese¹, Martine Prochazkova-Carlotti¹, Lamia Azzi Martin¹, Pierre Dubus^{1,13}, Francis Mégraud^{1,6,13}, Agnès Ruskone Fournestraux⁷, Bettina Fabiani⁸, Christiane Copie Bergman⁹, Cyrielle Robe¹⁰, Michael Hahne¹¹, Bertrand Huard¹² & Philippe Le hours^{1,6,13}✉

The roles of the inflammatory response and production of a proliferation-inducing ligand (APRIL) cytokine in gastric mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphomagenesis induced by *Helicobacter* species infection are not clearly understood. We characterized the gastric mucosal inflammatory response associated with gastric MALT lymphoma (GML) and identified APRIL-producing cells in two model systems: an APRIL transgenic mouse model of GML induced by *Helicobacter* infection (Tg-hAPRIL) and human gastric biopsy samples from *Helicobacter pylori*-infected GML patients. In the mouse model, polarization of T helper 1 (*tbet*), T helper 2 (*gata3*), and regulatory T cell (*foxp3*) responses was evaluated by quantitative PCR. In humans, a significant increase in *april* gene expression was observed in GML compared to gastritis. APRIL-producing cells were eosinophilic polynuclear cells located within lymphoid infiltrates, and tumoral B lymphocytes were targeted by APRIL. Together, the results of this study demonstrate that the Treg-balanced inflammatory environment is important for gastric lymphomagenesis induced by *Helicobacter* species, and suggest the pro-tumorigenic potential of APRIL-producing eosinophils.

The bacterium *Helicobacter pylori* induces chronic inflammation called gastritis within the gastric mucosa in humans. Gastritis is often asymptomatic but can progress to more serious pathologies such as gastric and duodenal ulcer, adenocarcinoma and, in approximately 0.1% of infected patients, gastric mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma (GML)^{1,2}.

In GML, chronic antigenic stimulation by *H. pylori* on the gastric mucosa induces the formation of B-cell monoclonal infiltrates with a marginal zone immunophenotype^{1,3}. Reactive T lymphocytes (predominantly CD4⁺) are found within the infiltrates. These CD4⁺ cells allow the activation and proliferation of neoplastic B cells via CD40L-CD40 co-stimulation and the secretion of T helper type 2 cytokines such as interleukin 4^{3,4}. Some of

¹Univ. Bordeaux, INSERM, BaRITOn, U1053, 33000 Bordeaux, France. ²EC2M3: Department of Academic Research (EA7375), Université Paris Est Créteil (UPEC) – Val de Marne, 94000 Créteil, France. ³Department of Gastroenterology, Henri Mondor Hospital, APHP, 94000 Créteil, France. ⁴Institut Pasteur, Unité de Pathogénie Microbienne Moléculaire, 28 rue du Dr Roux, 75724 Paris Cedex 15, France. ⁵INSERM Unité 1202, 28 rue du Dr Roux, 75724 Paris Cedex 15, France. ⁶French National Reference Center for Campylobacters and Helicobacters, Hôpital Pellegrin, 33076 Bordeaux, France. ⁷Department of Gastroenterology, Groupe d'Etude des Lymphomes Digestifs (GELD), Hôpital Saint Antoine, AP-HP, 75012 Paris, France. ⁸Department of Pathology, Hôpital Saint Antoine, APHP, 75012 Paris, France. ⁹Department of Pathology, Henri Mondor Hospital, APHP, INSERM U955, Equipe 9, Université Paris-Est, 94000 Créteil, France. ¹⁰INSERM U955, Equipe 9, Mondor Institute of Biomedical Research, 94000 Créteil, France. ¹¹IGMM, Univ Montpellier, CNRS, Montpellier, France. ¹²Institute for Advanced Biosciences, INSERM U1209, CNRS UMR 5309, University Grenoble-Alpes, 38700 La Tronche, France. ¹³CHU de Bordeaux, 33000 Bordeaux, France. ¹⁴These authors contributed equally: Alice Blossse and Sara Peru. ✉email: philippe.lehours@u-bordeaux.fr

these T cells are regulatory cells (LTregs) that regulate local T-cell responses induced in the lymphoid follicles^{5,6}. The presence of LTregs as promoters of B-cell proliferation, either by directly stimulating B cells or suppressing T cells, was suggested by Craig et al.⁷ LTregs may also participate in the persistent chronic inflammation of the gastric mucosa due to *H. pylori*, as suggested by Laur et al.⁵ rendering the antigenic stimulation process mandatory for B-cell proliferation. Compared to non-responders, GML patients with high tumor LTreg infiltration show a better response to antibiotics, suggesting that LTregs play a role in the regression mechanisms of GML^{8,9}.

A proliferation-inducing ligand (APRIL) cytokine is a member of the tumor necrosis factor (TNF) family. APRIL shares protein homology with other members such as the B-cell activating factor (BAFF). APRIL and BAFF are synthesized as transmembrane type II proteins with a C-terminal domain, characteristic of members of the TNF family. APRIL is produced by cleavage into a soluble protein by a furin-like protease intracellularly before secretion. It is expressed by many cells of the immune system cells such as neutrophils, eosinophils, and macrophages^{10–12}.

The association of APRIL with carcinogenesis has long been suspected¹³. Accordingly, its role in cancer and lymphoma has been analyzed in several studies^{12,14–16}, but there have been few studies on the role of APRIL in GML^{17,18}. Tumor-infiltrating macrophages are a major source of APRIL in GML¹⁷; the production of APRIL is induced by *H. pylori* antigens and *H. pylori*-specific T cells¹⁷.

Since it was determined that *H. pylori* plays a role in the development of GML, many animal models have been developed to understand more fully the pathophysiology of GML. An alternative model of lymphomagenesis was used in our laboratory, based on *Helicobacter sp* infection of transgenic C57BL6 mice with the human form of the APRIL cytokine (Tg-hAPRIL)¹⁹.

We characterized the inflammatory response in the stomach of Tg-hAPRIL mice, a novel animal model of gastric lymphomagenesis, and validated these results in the gastric biopsies of GML patients. We evaluated the inflammatory response in gastric mucosa, verified the deregulation of APRIL in human GML, and identified cytokine-producing and target cells. Our results demonstrate that a Treg-balanced inflammatory environment is important for gastric lymphomagenesis induced by *Helicobacter* species, and suggest the pro-tumorigenic potential of APRIL-producing eosinophils.

Materials and methods

Murine material. Murine material from a previous mouse Tg-hAPRIL experiment was obtained as follows. The stomachs of WT or Tg-hAPRIL mice, uninfected (n=9 each) or infected with *H. pylori* (n=16 for WT and n=14 for Tg-hAPRIL) or *H. felis* (n=13 and n=10, respectively), had been recovered 18 months post-infection as described by Floch et al.¹⁹ One part of the stomach was formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE), and another part was ground to recover leukocyte cells. A fraction of these cells had been cultured in RPMI medium overnight. Leukocytes and leukocyte supernatants (frozen at –80 °C after centrifugation) were available for our study¹⁹.

Patient selection. Eleven cases of primary GML (seven men, four women, mean age: 59.9 years) associated with *H. pylori* infection without t(11;18) (API2-MALT1) translocation were included in the present study. All GML patients were *H. pylori*-positive: nine were positive by histology, one by PCR detection on gastric biopsy only, and one by serology only. All patients had stage I gastritis according to the Ann Arbor staging system, and were treated with the typical antibiotic regimen for *H. pylori* eradication²⁰, which was followed by lymphoma regression.

The diagnosis of GML was based on histological analysis of gastric biopsies by an expert hematopathologist. GML was diagnosed according to the World Health Organization classification. The presence of the t(11;18) translocation was determined by amplification and sequencing of the API2-MALT1 fusion transcript according to a previously described method until 2012, and thereafter by interphase fluorescent in situ hybridization (FISH) using the MALT1 break apart probe as previously described²¹. *H. pylori* infection was assessed by modified Giemsa-stained tissue sections and/or immunohistochemistry (IHC) with an anti-*H. pylori* antibody on FFPE tissue sections of gastric biopsies. In addition, a quantitative polymerase chain reaction (qPCR) assay was performed on frozen gastric biopsies as previously described²². The control group consisted of 16 gastric biopsies from patients referred for gastric endoscopy for gastric dyspepsia (n=14), routine follow-up in the context of atrophic gastritis (n=1), or exploration of anemia (n=1) (six men, 10 women, mean age: 62.7 years +/– 12.1). We also used gastric biopsy blocks (sent from Saint Antoine Hospital, Paris, France) from these GML patients. The results are shown for two patients (40-year-old male, 62-year-old female), and are representative of the results obtained for the entire GML study population.

RNA extraction. The leukocyte RNAs of WT or Tg-hAPRIL mice, uninfected (n=5 each) or infected with *H. pylori* (n=10 for WT and n=8 for Tg-hAPRIL) or *H. felis* (n=11 and n=10, respectively), were extracted according to a standard phenol–chloroform protocol. TRIzol Reagent (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) was used before adding chloroform (ratio 1:5). Centrifugation at 12,000 g for 15 min allowed recovery of the aqueous phase containing the RNAs. The addition of isopropanol (ratio 1:1) followed by an additional 20 min 12,000 g centrifugation was used to concentrate the RNA in a pellet. The pellet was washed with 75% ethanol before resuspending in water. RNA quantification was performed using a spectrophotometer (BMG Labtech, Ortenberg, Germany) at 260 nm. The 260/280 nm ratio is a reflection of the quality and protein contamination in a sample. Total RNAs were also extracted from frozen gastric samples from GML individuals and the control group using TRIzol reagent according to the manufacturer's instructions, and were quantified using the NanoDrop. The QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) was used to reverse transcribe all murine RNAs extracted from leukocyte pellets and RNAs extracted from humans. A total of 250 ng

human RNA and 500 ng murine RNA were used to generate cDNA. The first step of genomic DNA removal was performed according to the supplier's recommendations (2 min at 42 °C), followed by reverse transcription to cDNA for 30 min at 42 °C and then for 3 min at 95 °C. The generated cDNAs were stored at –20 °C.

qPCR. qPCR was performed with the CFX96 thermocycler (Bio-Rad, Marnes la Coquette, France) using a qPCR platform (from SFR TransBioMed, Bordeaux, France), and 96-well plates (Bio-Rad). SYBR Premix Ex Taq™ (Tli RNaseH Plus) reaction mixture (Takara Bio Inc., Shiga, Japan) was used (as recommended by the supplier) with 0.2 μM specific primers and 10 ng murine or 5 ng human cDNA. Each target was tested in duplicate for all samples. Commercial primer pairs (RT² qPCR Primer Assay, Qiagen) or synthesized primer pairs (Eurofins Mwg Biotech, Courtaboeuf, France) were used to evaluate the relative expression level of human *april* (PPH01047C), human and murine *tbet* genes (PPH00396A, PPM03727A, respectively), human and murine *gata3* (PPH02143A, PPM05199A, respectively), and human and murine *foxp3* (PPH00029C, PPM05497F, respectively) compared to murine *hprt1* (Eurofins) and murine *gapdh* (Eurofins) or human *hprt1* (Eurofins) and human *gusb* (PPH01096H). Gene expression was compared by obtaining delta threshold cycle values (ΔC_t) and normalizing to the expression of the two housekeeping genes. Relative gene expression values were calculated as $2^{-\Delta\Delta C_t}$ according to the method described by Livak and Schmittgen²³. Cycle threshold (C_t) values above 35 were considered non-specific and not used for the analysis.

IHC. Serial sections (3 μm thick) were prepared, deposited on glass slides, and deparaffinized at 60 °C. After rehydration of the slides by successive toluene and alcohol baths (100 °C and 95 °C, respectively), the antigenic sites were unmasked. This unmasking was performed with primary antibody, using homemade buffers citrate (pH 6) or Tris EDTA (pH 9), for 15 or 30 min at 100 °C, and then 30 min at room temperature. Hydrogen peroxide (3%) (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) was used for 5 min to inactivate the endogenous peroxidases. Specific sites were blocked with horse serum solution. An adjustment was made to determine the optimal dilutions of each primary antibody (Table S1). The primary antibodies were labeled with secondary antibodies (Table S1) and the labels were revealed using Liquid DAB+ Substrate Chromogen (Dako) peroxidase substrate followed by hematoxylin counterstaining (VWR International, Fontenay-Sous-Bois, France). The slides were subsequently dehydrated by successive alcohol and toluene baths (95 °C and 100 °C, respectively) to mount them between the slide and cover with the Eukitt mounting medium (VWR). The slides were scanned using the MIRAX SCAN scanner (3DHISTECH Ltd, Budapest, Hungary) and the images were read using Panoramic Viewer software (3DHISTECH Ltd).

Immunofluorescence. Serial sections (3 or 10 μm thick) were prepared, deposited on glass slides, deparaffinized, and rehydrated. To reveal primary antibody binding, fluorochrome-coupled secondary antibodies were used (Table S1). Slides were mounted between the slide and coverslip with ProLong™ Gold Antifade reagent or ProLong™ Diamond Antifade Mountant with DAPI (Invitrogen), and stored at 4 °C. The images were captured with the Nikon TE50i epi-fluorescence microscope equipped with a 40× immersion objective and DS-Qi1Mc camera (Nikon, Champigny sur Marne, France), and then processed with NIS-BR software version 3.2 (Nikon) or with the Leica Microsystems SP5 confocal microscope equipped with a 63× immersion objective and camera (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). Then the images were processed with Leica Application Suite Advanced Fluorescence software and ImageJ image analysis software version 1.48 (Java).

Purification of human neutrophils and eosinophils. Human peripheral blood was collected by venipuncture in tubes containing sodium citrate (3.8% final) as the anticoagulant. The neutrophils and eosinophilic polynuclear cells were purified with the MACSxpress Whole Blood Neutrophil Isolation Kit and the MACSxpress Whole Blood Eosinophil Isolation Kit (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) according to the supplier's recommendations, respectively. Son et al.²⁴ reported that the MACSxpress method consistently allowed high-purity isolation of eosinophils ($95.0 \pm 1.7\%$) and neutrophils ($94.2 \pm 10.1\%$). Then the cells were deposited on slides by cytocentrifugation (150×g, 4 min) and fixed in paraformaldehyde (4%). The fixed slides were stored at 4 °C until use. The purity of the purified cells was verified by May-Grunwald staining after cytocentrifugation.

Statistical analysis. To evaluate the significance of the results, statistical tests were performed using GraphPad Prism 6.0 software (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA). The Mann–Whitney test was used as a non-parametric test to compare the distributions of two unmatched groups. $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Ethical issues. All methods were carried out in accordance with relevant guidelines and regulations. All experimental protocols were approved by a named institutional and/or licensing committee. Patients were recruited from the Gastroenterology Department's local database at Henri Mondor Hospital and/or the standardized hospital inpatient diagnostic database from 2001 to 2016. The study was approved by the Institutional Ethics Committee (Comité de protection des personnes, Protocol No. 15071-ID RCB:2015-A00342-47). Written informed consent of non-opposition to the use of biological material for study purposes was obtained from all patients. Human peripheral blood was also collected by venous puncture from healthy patients at the Bordeaux Blood Bank (Authorization No. 14PLER006). All participants gave their consent in accordance with the Helsinki Declaration of Principles.

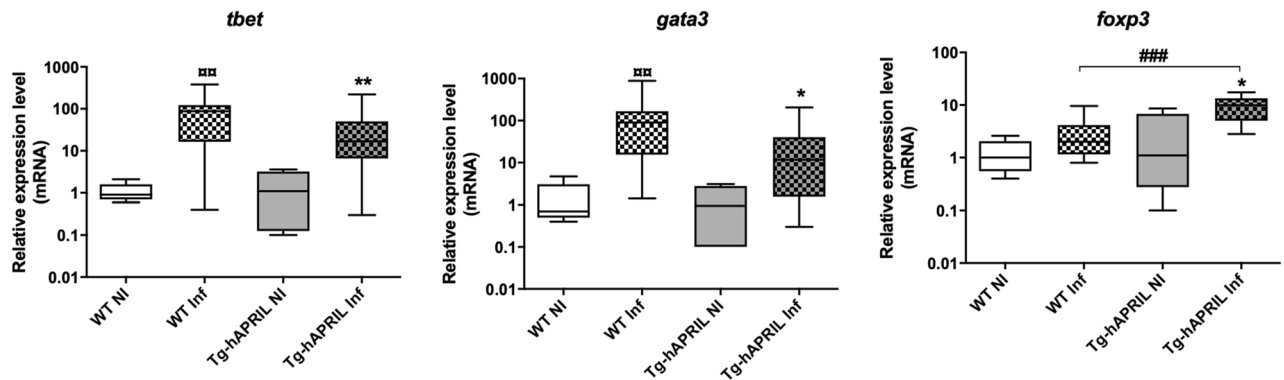


Figure 1. Polarization of gastric inflammatory response in WT and Tg-hAPRIL mice infected with *Helicobacter sp.* Relative expression of *tbet*, *gata3*, and *foxp3* genes in relation to NI control condition. Quantification by qPCR in leukocyte pellets according to genotype (WT or Tg-hAPRIL) and infectious status [non-infected (NI) (n = 5), infected (Inf) mice (n = 21 and n = 18, respectively)]. Boxed graphical representations, with the box representing 50% of values around the median (horizontal bar) and extremity segments representing extreme values, * (vs. Tg-hAPRIL NI): $p < 0.05$, ### (vs. WT NI) or ** (vs. Tg-hAPRIL NI): $p < 0.01$ and ###: $p < 0.0001$; Mann–Whitney test.

Helicobacter-free C57BL6 mice were obtained from Charles River Laboratories (L'Arbresle, France). APRIL transgenic (Tg) C57BL6 mice were originally provided by Dr. Michael Hahne (Université de Montpellier, Institut de Génétique Moléculaire de Montpellier (IGMM)-UMR5535). All experiments were performed in specific pathogen-free animal facilities at the University of Bordeaux. Animal experiments were performed according to EU recommendations (European Directive 2010/63/EU) for animal experimentation. This study was evaluated by the local ethics committee of the University of Bordeaux and conformed to the French Ministry of Agriculture Guidelines on Animal Care and the French Committee of Genetic Engineering, with respect to the principle of the 3Rs (Replace, Reduce, Refined) (Approval No. 50120143-A). Only female neonates were used for experiments.

Results

Characterization of the gastric mucosal inflammatory response in a mouse model of gastric lymphomagenesis. The relative expression levels of *tbet* (Th1), *gata3* (Th2), and *foxp3* (LTreg) genes in the leukocyte pellets were evaluated to characterize the polarization state of the infiltrating leukocytes at the GML stage in the mouse model Tg-hAPRIL. By qPCR, a significant increase in *tbet* and *gata3* gene expression was observed in infected WT and Tg-hAPRIL mice (*H. pylori* or *H. felis*). By comparing the relative expression levels of *tbet* with *gata3*, no significant difference was found in infected WT mice or Tg-hAPRIL mice, indicating the presence of a balanced Th1 and Th2 response within the gastric microenvironment (Fig. 1). In infected Tg-hAPRIL mice (*H. pylori* or *H. felis*), a significant increase in the relative expression of *foxp3* transcripts was also found, unlike in infected WT mice (Fig. 1), indicating the existence of a regulatory response in *Helicobacter*-infected Tg-hAPRIL at the GML stage. By comparing the relative expression levels of one gene with the others in this mouse model of GML, no significant difference was found, suggesting the presence of balanced Th1, Th2 and Treg responses within the gastric microenvironment at the GML stage.

Characterization of gastric mucosal inflammatory response in *H. pylori*-infected GML patients. The evaluation of the relative expression levels of the *tbet*, *gata3*, and *foxp3* gene transcripts in RNA extracts from gastric biopsies of *H. pylori*-infected GML patients allowed characterization at the gastric level of the polarization of the inflammatory response of these patients, as compared to the gastritis control population. By qPCR, a significant increase in *tbet*, *gata3*, and *foxp3* gene expression was observed, confirming the presence of Th1, Th2, and regulatory responses in the human gastric microenvironment of GML patients (Fig. 2A) with no significant difference found between the relative gene expression levels. In addition, IHC detection of the CD20 surface marker of B lymphocytes as well as the CD3 and Foxp3 markers for T lymphocytes and LTregs confirmed the expected presence of lymphoid infiltrates composed mainly of B lymphocytes with some infiltrating T cells, among which LTregs were found (Fig. 2B).

Gastric characterization of APRIL expression in *H. pylori*-infected GML patients. To verify the dysregulation of APRIL in human GML, the relative expression levels of the *april* gene transcripts within RNA extracts from gastric biopsies from *H. pylori*-infected GML patients were evaluated. A significant increase in expression of the *april* gene, compared to gastritis, confirmed the presence of deregulation of this cytokine at the GML stage within the human gastric microenvironment (Fig. 3).

Identification of producer cells and target cells of the APRIL cytokine. To identify the human producer cells of APRIL and its target cells, two antibodies were used for IHC experiments: Stalk-1 antibody and Aprily-2 antibody. The Stalk-1 antibody recognizes the non-secreted and membrane-bound form of the cytokine and thus the producing cells, whereas Aprily-2 recognizes the secreted and internalized form and thus

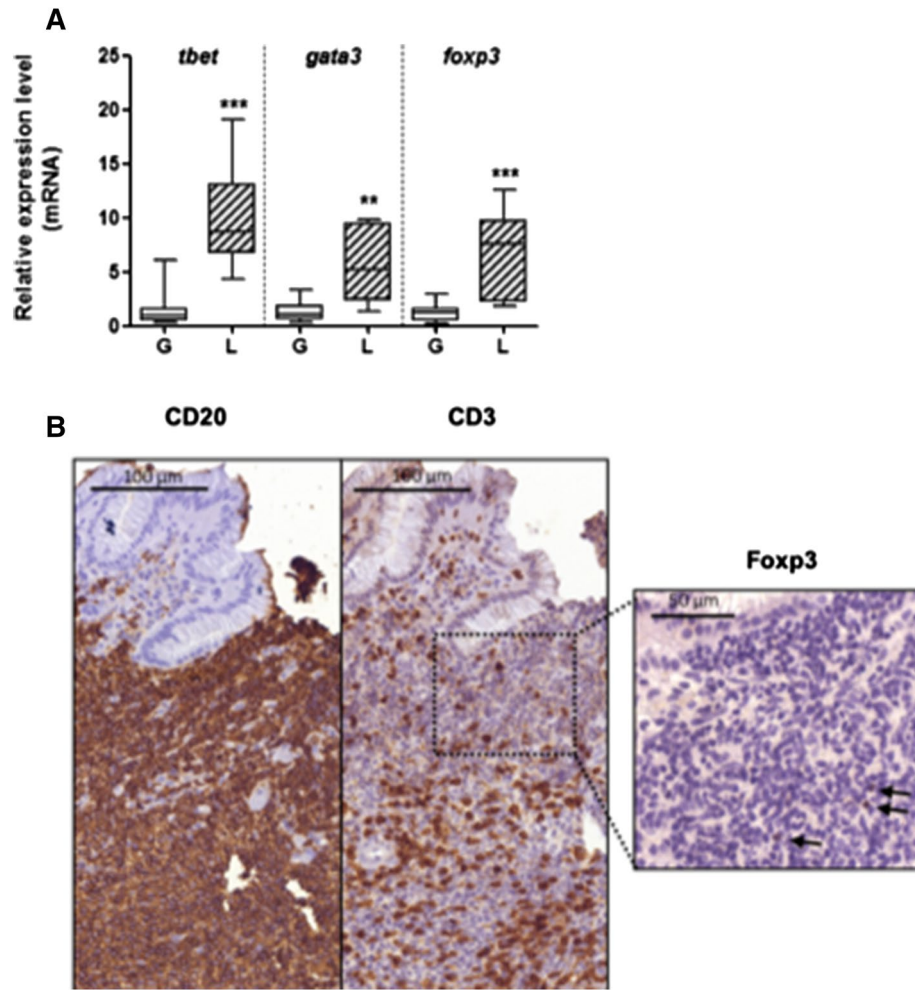


Figure 2. Polarization of gastric inflammatory response in patients with gastric MALT lymphoma. **(A)** Relative expression of *tbet*, *gata3* and *foxp3* genes relative to the gastritis control condition. Quantification by qPCR within RNA extracted from gastric biopsies of GML (L) patients (n = 11) or gastritis (G) control population (n = 16), all infected with *H. pylori*. Boxed graphical representations, with the box representing 50% of values around the median (horizontal bar) and extremity segments representing extreme values, ** (vs. Gastritis): $p < 0.01$, *** (vs. Gastritis): $p < 0.001$; Mann–Whitney test. **(B)** Example of B lymphocyte (CD20+), T lymphocyte (CD3+) and T regulatory cells (Foxp3+, black arrows) staining within lymphoid infiltrate by IHC on sections of human gastric biopsies from GML patients.

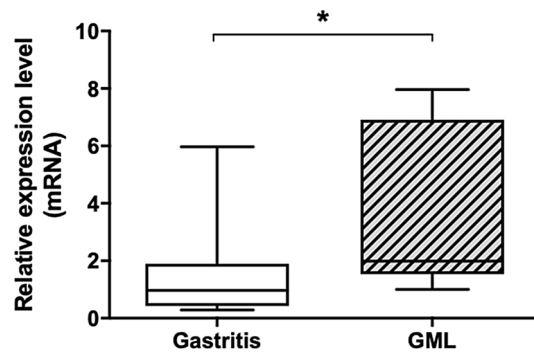


Figure 3. Quantification of the relative expression of the cytokine APRIL in patients with gastric MALT lymphoma. Relative expression of the *april* gene with respect to the gastritis control condition. Quantification by qPCR within RNA extracted from gastric biopsies of GML (L) (n = 11) or gastritis (G) patients (n = 16), all infected with *H. pylori*. Graphic representations are box plots, with the box representing 50% of values around the median (horizontal line) and the whiskers representing the minimum and maximum of all the data * (vs. Gastritis): $p < 0.05$.

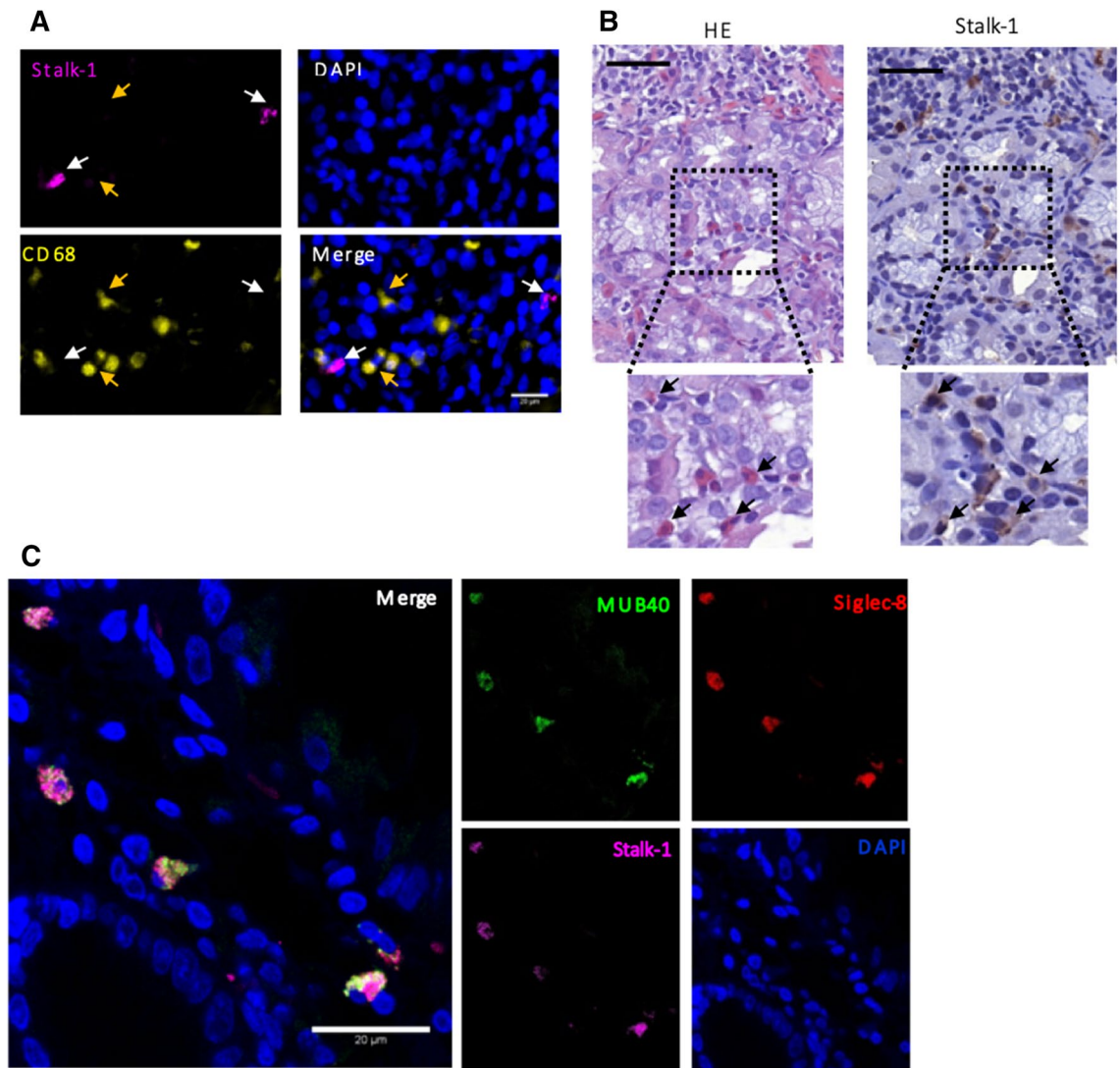


Figure 4. Identification of APRIL cytokine producing cells in gastric lymphoid infiltrates from patients with gastric MALT lymphoma. **(A)** Immunofluorescence co-labeling of the membrane form of APRIL with Stalk-1+ (magenta), CD68+ macrophages (yellow) and DAPI-labeled nuclei (blue) on sections of human gastric biopsies from GML patients. The white arrows indicate the APRIL-producing cells (Stalk-1+) and the yellow arrows the macrophages (CD68+). **(B)** Example of HE staining and APRIL staining (Stalk-1+) in serial sections of human gastric biopsies of GML patients. **(C)** Immunofluorescence co-labeling of the membrane form of the APRIL Stalk-1 (magenta), MUB40+/Siglec-8+ eosinophilic polynuclear cells (green and red) and DAPI-labeled nuclei (blue) on sections of human gastric biopsies of GML patients.

the target cells²⁵. The data obtained showed the presence of Stalk-1-positive cells within the infiltrates from GML patients (Fig. 4A, B). As suggested by Munari et al.¹⁷ we determined whether the cells producing APRIL were macrophages (CD68+) infiltrating the tumor. As immunofluorescence data did not show Stalk-1/CD68 co-labeling (Fig. 4A), we concluded that APRIL-producing cells within lymphoid infiltrates of GML patients were not macrophages, as previously described¹⁷. Hematoxylin and eosin staining (H&E) and IHC using Stalk-1 were performed on serial sections of FFPE tissue sections of the two gastric biopsies from GML patients. The APRIL-producer cells resembled polymorphonuclear leukocytes macroscopically and, in particular, eosinophils (Fig. 4B).

To validate this hypothesis, double immunofluorescence staining on purified human polymorphonuclear leukocytes was performed. The myelotracker (also known as MUB40—a neutrophil lactoferrin marker)^{26,27}, coupled with cyanine-5 was used. Given the presence of granulation in the eosinophilic polynuclear cells, this compound could also mark this other type of polymorphonuclear leukocytes. Eosinophil-specific anti-Siglec-8 (sialic acid-binding immunoglobulin superfamily lectins) antibodies were used to stain human eosinophils²⁸. This double MUB40-Siglec-8 staining was first validated on purified human eosinophilic polynuclear cells using normal human purified neutrophils as a control, after verifying the effectiveness of the purification by performing May-Grünwald Giemsa staining on the purified cells (Fig. S1A, B). As expected, the immunofluorescence results showed simple MUB40 + Siglec-8—labeling (Fig. S1C) for human neutrophils, whereas the human eosinophils

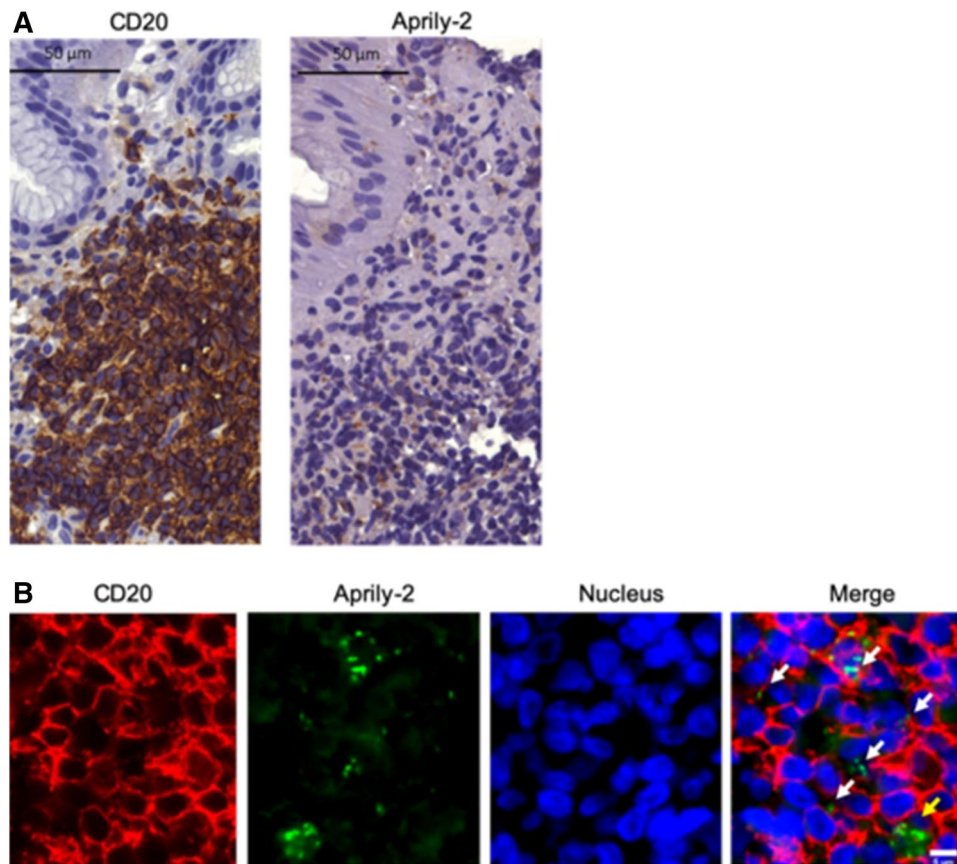


Figure 5. Identification of APRIL cytokine target cells in gastric biopsies from patients with gastric MALT lymphoma. **(A)** Example of B lymphocyte (CD20+) and APRIL (Aprily-2+) labeling in lymphoid infiltrates by IHC on sections of human gastric biopsies from GML patients. **(B)** Immunofluorescence co-labeling of B lymphocyte (CD20+ in red), APRIL cytokine (Aprily-2+ in green) and DAPI-labeled nuclei (blue) on sections of human gastric biopsies from GML patients. The white arrows indicate the B lymphocytes that internalized APRIL and the yellow arrows the CD20-cells that internalized the cytokine.

were double labeled with MUB40 + Siglec-8 + (Fig. S1D). We analyzed human gastric biopsies of GML patients and found that Stalk1+ cells were double-positive for MUB40 and Siglec-8. In conclusion, within the lymphoid infiltrates, the cells producing APRIL appeared to be eosinophilic polynuclear cells (Fig. 4C).

Target cells of the APRIL cytokine. The presence of APRIL cytokine targeted cells with lymphoid infiltrates of human GML was estimated by IHC. Detection of the secreted and internalized form of the cytokine was performed on tissue sections of gastric biopsies from patients with GML, using the Aprily-2 antibody. Numerous cells present in the infiltrates were Aprily-2-positive (Fig. 5A). Co-labeling with Aprily-2 and CD20 was performed and analyzed by immunofluorescence (IF), revealing the co-localization of these two markers (white arrows, Fig. 5B). Therefore, the target cells of the APRIL cytokine were predominantly B lymphocytes. However, some cells did not exhibit Aprily-2/CD20 co-labeling (yellow arrows, Fig. 5B). As Munari et al.¹⁷ suggested that macrophages could be Aprily-2-positive, IF was performed on serial tissue sections of gastric biopsies from patients with GML using anti-CD68 and Aprily-2 antibodies (Fig. S2). Only rare CD68+/Aprily-2+ cells were found (orange arrow, Fig. S2), possibly corresponding to macrophages that phagocytized their environment and thus internalized APRIL.

In conclusion, the use of two distinct antibodies that differentiate APRIL producer cells from target cells, combined with appropriate cell markers, allowed us to demonstrate that tumor B cells in GML are targeted by this cytokine, which is produced by tumor-infiltrating eosinophilic polynuclear cells.

Discussion

To understand more fully the pathophysiology of GML induced by *H. pylori* infection, an alternative model was implemented in our laboratory that relies on the use of transgenic C57BL/6 mice for the human form of the APRIL cytokine (Tg-hAPRIL), and infected with *Helicobacter sp* (*H. pylori* or *H. felis*)¹⁹. We showed that the Tg-hAPRIL mouse model infected with *Helicobacter sp* closely reproduces the pathology of human GML with the same balanced gastric Th1, Th2, and Treg inflammatory response. The dysregulation of APRIL at the gastric

level has been confirmed in patients with GML. B lymphocytes were identified as the target of the APRIL cytokine that appeared to be produced by tumor-infiltrating eosinophils.

We first investigated the local inflammatory response at the gastric level in murine models to identify the inflammatory environment favorable to the appearance of GML in infected Tg-hAPRIL mice. At the GML stage, the inflammatory response at the gastric level was balanced. Indeed, an increase in the expression of transcription factors for Th1 (*tbet*) and Th2 (*gata3*) responses was observed in both infected murine models (WT and Tg-hAPRIL mice). We also confirmed these findings in patients with GML. This balanced inflammatory response within the gastric microenvironment at GML stage was already described by D'Elios et al.²⁹ who showed that gastric *H. pylori*-reactive T-cell clones from MALT lymphoma comprised a larger proportion of Th clones secreting both Th1- and Th2-type cytokines, suggesting that mechanisms other than cytokines could be involved in the *H. pylori*-dependent enhanced T-cell help for B-cell proliferation. The role of a regulatory response must also be considered. In infected Tg-hAPRIL mice, a more intense regulatory response was found in contrast to infected WT mice. The intensity of this response may explain the higher level of bacterial colonization in infected Tg-hAPRIL mice²⁷ compared to infected WT mice. As suggested⁵, Treg cells could participate in the persistence of the pathogen in the gastric mucosa by delaying the inflammatory response to allow chronic antigen stimulation necessary for lymphoid proliferation.

The role of APRIL in cancers and lymphomas has been analyzed in several studies^{12,14–16}.

Chonwerawong et al.³⁰ have recently suggested that BAFF, another member of the TNF family, may be involved in the development of gastric mucosal hyperplasia and B-cell lymphoid follicles formation in mice lacking Nlr5 (NLR family CARD domain-containing 5) infected by *H. felis*. Here, we highlight the deregulation of APRIL in patients with GML, compared to a control population of patients with gastritis, suggesting a potential role of this cytokine in the development of GML in humans. Indeed, we showed that tumor B cells internalize this cytokine. Since APRIL is involved in lymphocyte regulation and B lymphocyte development, overexpression of this cytokine could contribute to the significant proliferation of neoplastic B cells present in lymphoid infiltrates.

We also identified APRIL-producing cells in the lymphoid infiltrates of GML patients. To differentiate between the target cells and the cytokine producer cells, two antibodies were used: Stalk-1 and Aprily-2. The Stalk-1 antibody recognizes a peptide located at the level of the extracellular domain that remains associated with the membrane after proteolytic cleavage (aa 67–79, which correspond to the peptide GTGGPSQNGEGYP); it is therefore directed against the cells producing the cytokine. The Aprily-2 antibody is directed against the extracellular portion of the protein (aa 93–233) and the secreted form after proteolytic cleavage, thus allowing APRIL cytokine target cells to be recognized²⁵. Our data show that APRIL was not produced by macrophages, unlike the report of Munari et al.¹⁷ which, in a different cohort of GML patients and using Aprily-2 antibody against the secreted form of APRIL, found APRIL production by macrophages (CD68⁺) infiltrating the tumor. The cells producing the APRIL cytokine within the tumor were identified in the present work as eosinophilic polynuclear cells. This identification was made possible by study of their cellular morphology (nuclear and cytoplasmic granulations) and the results of previously validated IF staining. The use of the myelotracker (MUB40) known as a neutrophil-specific marker allowed us to characterize Stalk-1 positive cells as polymorphonuclear leukocytes. The association with the anti-Siglec-8 antibody enabled us to distinguish between neutrophil (anti-Siglec-8 negative) and eosinophilic polynuclear cells (anti-Siglec-8 positive).

This distinction was important since neutrophil polynuclear cells were previously identified by Schwaller et al.²⁵ as the major cellular source of the APRIL cytokine within tumor tissue infiltrates in patients with diffuse large B-cell lymphoma, which is part of non-Hodgkin B-cell lymphomas like GML. However, eosinophilic polynuclear cells were also identified as cells producing the APRIL cytokine in other studies^{31–33}. Among the factors that allow the recruitment of these cells, exposure to pathogens such as *H. pylori* has already been reported³⁴.

Eosinophils comprise part of the inflammatory reaction in *H. pylori* gastritis. Indeed, in 1991 McGovern et al.³⁵ suggested that the severity of chronic gastritis was significantly correlated with eosinophil infiltration. A few years later, Aydemir et al.³⁶ showed that eosinophil infiltration in gastric mucosa was greater in *H. pylori*-positive patients than in *H. pylori*-negative patients. Bold et al.³⁷ also described the presence of eosinophils in the gastric lamina propria in 65% of *H. pylori*-positive chronic gastritis patients and the eosinophils were even more numerous in atrophic gastritis patients with intestinal metaplasia. It was therefore suggested that eosinophils may participate in the immune response against *H. pylori*. However, Arnold et al.³⁴ recently showed that *H. pylori* escapes their bactericidal activity. As a result, we investigated the APRIL expression by eosinophils in gastritis and atrophic gastritis cases to see whether *H. pylori* infection could induce expression in vitro using eosinophils purified from peripheral blood of normal donors (coculture experiments). Unfortunately, neither *april* gene upregulation nor APRIL production were detected (data not shown), indicating that circulating eosinophils cells are probably different from tumor-infiltrating ones. This latter category could indeed be influenced by the tumor microenvironment and especially the local inflammatory response, which could not be reproduced in vitro.

Several studies have shown tumor-associated tissue eosinophilia in various types of tumors, such as in Hodgkin lymphoma where it is associated with poor prognosis³³; however, to date, the presence of tumor-infiltrating eosinophils in the context of GML has been poorly described. Herrera-Goepfert et al.³⁸ showed in a set of 35 low-grade and 16 high-grade GML patients that 73.8% exhibited an increased number of eosinophils accompanied by precancerous lesions such as intestinal metaplasia and atrophy. Piazuelo et al.³⁹ proposed that eosinophils play a dual role in chronic gastritis by either downregulating or favoring the effects of Th1 proinflammatory cytokines. In the context of *H. pylori* infection, Arnold et al.³⁴ showed in vivo that eosinophils suppress Th1 responses locally; this, in turn, could be an explanation for the bacterial gastric persistence, itself known to be involved in the initiation of the lymphomagenesis process. The identification of tumor-infiltrating eosinophils as the source of APRIL production in GML, as shown in the present study, is therefore of major interest. They no doubt play an important role in lymphocyte proliferation of targeted B-cells by their regulatory contribution⁴⁰ to the inflammatory response and preservation of the bacterial load in vivo.

In conclusion, our results demonstrate that the cellular and inflammatory microenvironment is a key contributor to gastric lymphomagenesis. We now have an easy-to-implement model to evaluate the effect of different cytokine receptor inhibitors of the TNF family or activated signaling pathways on the establishment of GML. This is the first description of the implication of APRIL in low grade B cell lymphoma. In our opinion, the identification of APRIL production by eosinophils involved in GML paves the way for more extensive research on the pro-tumoral role of these cells. The targetability of the APRIL producing eosinophils in gastric MALT lymphomagenesis induced by *H. pylori* infection could represent an interesting strategy.

Received: 23 March 2020; Accepted: 3 August 2020

Published online: 09 September 2020

References

- Ferreri, A. J., Ernberg, I. & Copie-Bergman, C. Infectious agents and lymphoma development: molecular and clinical aspects. *J. Intern. Med.* **265**, 421–438 (2009).
- Peek, R. M. & Crabtree, J. E. *Helicobacter* infection and gastric neoplasia. *J. Pathol.* **208**, 233–248 (2006).
- Suarez, F., Lortholary, O., Hermine, O. & Lecuit, M. Infection-associated lymphomas derived from marginal zone B cells: a model of antigen-driven lymphoproliferation. *Blood* **107**, 3034–3044 (2006).
- Craig, V. J. *et al.* Gastric MALT lymphoma B cells express polyreactive, somatically mutated immunoglobulins. *Blood* **115**, 581–591 (2010).
- Laur, A. M. *et al.* Regulatory T cells may participate in *Helicobacter pylori* persistence in gastric MALT lymphoma: lessons from an animal model. *Oncotarget* **7**, 3394–3402 (2016).
- Kuo, S.-H. *et al.* Novel Insights of lymphomagenesis of *Helicobacter pylori*-dependent gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Cancers* **11**, 1–20 (2019).
- Craig, V. J. *et al.* B-cell receptor signaling and CD40 ligand-independent T cell help cooperate in *Helicobacter*-induced MALT lymphomagenesis. *Leukemia* **24**, 1186–1196 (2010).
- Garcia, M. *et al.* Study of regulatory T-cells in patients with gastric malt lymphoma: influence on treatment response and outcome. *PLoS ONE* **7**, 1–7 (2012).
- Iwaya, Y. *et al.* High levels of FOXP3(+) regulatory T cells in gastric MALT lymphoma predict responsiveness to *Helicobacter pylori* eradication. *Helicobacter* **18**, 356–362 (2013).
- Huard, B. *et al.* APRIL secreted by neutrophils binds to heparan sulfate proteoglycans to create plasma cell niches in human mucosa. *J. Clin. Invest.* **118**, 2887–2895 (2008).
- Stein, J. V. *et al.* APRIL modulates B and T cell immunity. *J. Clin. Invest.* **109**, 1587–1598 (2002).
- Mhawech-Fauceglia, P. *et al.* The source of APRIL up-regulation in human solid tumor lesions. *J. Leukoc. Biol.* **80**, 697–704 (2006).
- Hahne, M. *et al.* APRIL, a new ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates tumor cell growth. *J. Exp. Med.* **188**, 1185–1190 (1998).
- Chiu, A. *et al.* Hodgkin lymphoma cells express TACI and BCMA receptors and generate survival and proliferation signals in response to BAFF and APRIL. *Blood* **109**, 729–739 (2007).
- Rennert, P. *et al.* A soluble form of B cell maturation antigen, a receptor for the tumor necrosis factor family member APRIL, inhibits tumor cell growth. *J. Exp. Med.* **192**, 1677–1684 (2000).
- Lascano, V. *et al.* The TNF family member APRIL promotes colorectal tumorigenesis. *Cell Death Differ.* **19**, 1826–1835 (2012).
- Munari, F. *et al.* Tumor-associated macrophages as major source of APRIL in gastric MALT lymphoma. *Blood* **117**, 6612–6616 (2011).
- Planelles, L., Medema, J. P., Hahne, M. & Hardenberg, G. The expanding role of APRIL in cancer and immunity. *Curr. Mol. Med.* **8**, 829–844 (2008).
- Floch, P. *et al.* A new animal model of gastric lymphomagenesis: APRIL transgenic mice infected by *Helicobacter* species. *Am. J. Pathol.* **187**, 1473–1484 (2017).
- Malfertheiner, P. *et al.* Management of *Helicobacter pylori* infection—the Maastricht IV/florence consensus report. *Gut* **61**, 646–664 (2012).
- Amiot, A. *et al.* Rituximab, alkylating agents or combination therapy for gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma: a monocentric non-randomised observational study. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **39**, 619–628 (2014).
- Tankovic, J., Lamarque, D., Lascols, C., Soussy, C. J. & Delchier, J. C. Clarithromycin resistance of *Helicobacter pylori* has a major impact on the efficacy of the omeprazole-amoxicillin-clarithromycin therapy. *Pathol. Biol. (Paris)* **49**, 528–533 (2001).
- Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods San Diego Calif.* **25**, 402–408 (2001).
- Son, K. *et al.* Improved recovery of functionally active eosinophils and neutrophils using novel immunomagnetic technology. *J. Immunol. Methods* **449**, 44–55 (2017).
- Schwaller, J. *et al.* Neutrophil-derived APRIL concentrated in tumor lesions by proteoglycans correlates with human B-cell lymphoma aggressiveness. *Blood* **109**, 331–338 (2007).
- Anderson, M. C. *et al.* MUB40 binds to Lactoferrin and stands as a specific neutrophil marker. *Cell Chem. Biol.* **25**, 483–493 (2018).
- Anderson, M. C., Injarabian, L., Andre, A., Tournebize, R. & Marteyn, B. S. The MUB40 peptide for use in detecting neutrophil-mediated inflammation events. *J. Vis. Exp. JoVE* **143**, e58367 (2019).
- Floyd, H. *et al.* Siglec-8. A novel eosinophil-specific member of the immunoglobulin superfamily. *J. Biol. Chem.* **275**, 861–866 (2000).
- D'Elios, M. M. *et al.* Impaired T-cell regulation of B-cell growth in *Helicobacter pylori*-related gastric low-grade MALT lymphoma. *Gastroenterology* **117**, 1105–1112 (1999).
- Chonwerawong, M. *et al.* Innate immune molecule NLR5 protects mice from *Helicobacter*-induced formation of gastric lymphoid tissue. *Gastroenterology*, **159**, 169–182 (2020).
- Chu, V. T. *et al.* Eosinophils are required for the maintenance of plasma cells in the bone marrow. *Nat. Immunol.* **12**, 151–159 (2011).
- Kawakami, T. *et al.* Abundant a proliferation-inducing ligand (APRIL)-producing macrophages contribute to plasma cell accumulation in immunoglobulin G4-related disease. *Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc. Eur. Ren. Assoc.* **34**, 960–969 (2018).
- Davis, B. P. & Rothenberg, M. E. Eosinophils and cancer. *Cancer Immunol. Res.* **2**, 1–8 (2014).
- Arnold, I. C. *et al.* Eosinophils suppress Th1 responses and restrict bacterially induced gastrointestinal inflammation. *J. Exp. Med.* **215**, 2055–2072 (2018).
- McGovern, T. W., Talley, N. J., Kephart, G. M., Carpenter, H. A. & Gleich, G. J. Eosinophil infiltration and degranulation in *Helicobacter pylori*-associated chronic gastritis. *Dig. Dis. Sci.* **36**, 435–440 (1991).

36. Aydemir, S. A., Tekin, I. O., Numanoglu, G., Borazan, A. & Ustundag, Y. Eosinophil infiltration, gastric juice and serum eosinophil cationic protein levels in *Helicobacter pylori*-associated chronic gastritis and gastric ulcer. *Med. Inflamm.* **13**, 369–372 (2004).
37. Bold, A. *et al.* Gastric eosinophilia—clinical and morphological correlations. *Rom. J. Morphol. Embryol. Rev. Roum. Morphol. Embryol.* **54**, 805–809 (2013).
38. Herrera-Goepfert, R., Arista-Nasr, J. & Alba-Campomanes, A. Pathologic features of the gastric mucosa adjacent to primary MALT-lymphomas. *J. Clin. Gastroenterol.* **29**, 266–269 (1999).
39. Piazzuelo, M. B. *et al.* Eosinophils and mast cells in chronic gastritis: possible implications in carcinogenesis. *Hum. Pathol.* **39**, 1360–1369 (2008).
40. Long, H., Liao, W., Wang, L. & Lu, Q. A player and coordinator: the versatile roles of eosinophils in the immune system. *Transfus. Med. Hemother. Off. Organ Dtsch. Ges. Transfusionsmedizin Immunhamatologie* **43**, 96–108 (2016).

Acknowledgements

The authors thank Dr. Caroline Barau and Maxime Anquetin from the Plateforme de Ressources Biologiques BB-0033-00021, APHP, Hôpital Henri Mondor, Créteil, France. The English in this document has been checked by at least two professional editors, both native speakers of English.

Author contributions

Conceptualization, L.P.; Data curation, L.P.; Formal analysis, B.A., P.S., M.B., S.E., A.M.L. and H.B.; Funding acquisition, L.P.; Investigation, L.M., R.F.A. and C.B.C.; Methodology, B.A., P.S., L.M., M.B., S.E., F.P., G.A., C.M., A.M.L., C.B.C., H.M. and H.B.; Resources, L.M., R.F.A., F.B., C.B.C., R.C., H.M. and H.B.; Software, A.M.L.; Supervision, H.B. and L.P.; Validation, B.A., P.S. and L.P.; Visualization, S.E., G.A., A.M.L. and D.P.; Writing—original draft, B.A., P.S., L.M., M.B., A.M.L., R.F.A., F.B. and R.C.; Writing—review and editing, M.F., C.B.C., H.B. and L.P.

Funding

This study was funded by the “Ligue Contre le Cancer—Comité Lot et Garonne”.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary information is available for this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71792-3>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to P.L.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher’s note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article’s Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article’s Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2020

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

La réponse inflammatoire et la prolifération lymphocytaire peuvent notamment être contrôlées au niveau moléculaire par les miARNs, petits ARN simple brin non codants, considérés comme des acteurs majeurs de la régulation post-transcriptionnelle de l'expression des gènes. Comprendre l'impact de la dérégulation spécifique d'un panel de miARNs dans une pathologie maligne donnée est loin d'être simple puisqu'un même miARN peut avoir plusieurs cibles impliquant des voies de signalisation distinctes et peut agir à la fois en tant qu'oncogène ou que gène suppresseur de tumeur selon le cancer étudié. Face à la difficulté d'accès à des prélèvements gastriques humains associés à cette pathologie rare, l'équipe du Pr Lehours a précédemment mis en évidence, en modèle murin d3Tx (188), la surexpression d'un panel de cinq miARNs (miR-21 ; miR-135, miR-142, miR-150 et miR-155) au stade LGM pouvant agir en synergie en inhibant l'apoptose et en induisant une prolifération lymphocytaire via des cibles distinctes décrites dans la littérature (244). Nous n'avons néanmoins que partiellement validé ces résultats sur le matériel humain étudié ici, obtenu grâce à une collaboration avec des spécialistes de cette pathologie de l'hôpital Henri Mondor, puisque que nous avons confirmé la surexpression gastrique de seulement deux de ces cinq miARNs, à savoir le miR-150 et le miR-155, au stade LGM chez l'homme en comparaison à une population contrôle.

La surexpression du miR-155 a déjà été décrite dans des biopsies gastriques de patients atteints de LGM (240, 241). Néanmoins, cette surexpression gastrique a également été constatée en réponse à l'infection à *H. pylori* d'où un biais potentiel dans les résultats en fonction du statut *H. pylori* de la population contrôle (245–247). Concernant notre matériel d'étude et celui de Fernandez *et al.*, la population contrôle était mixte c'est-à-dire composée à la fois de patients *H. pylori* négatifs et positifs, confirmant l'existence d'un potentiel biais. Néanmoins, la méthodologie utilisée par Saito *et al.* consistant à comparer les profils d'expression des miARNs chez un même patient entre le tissu tumoral et le tissu non tumoral adjacent, permet d'envisager que la surexpression du miR-155 puisse participer au processus de lymphomagenèse, d'autant plus qu'une forte augmentation de ce miARN a déjà été constatée dans plusieurs pathologies malignes à cellules B, à savoir le DLBCL, le lymphome folliculaire, la leucémie lymphoïde chronique et le lymphome du manteau (248–250). De plus, il a été montré que l'augmentation de l'expression du miR-155 lors d'une infection à *H. pylori* limitait la réponse inflammatoire contribuant ainsi à la persistance bactérienne indispensable au développement du LGM (245, 251–253). Le miR-155 régulerait l'expression de près de 140 gènes codant des protéines

immunorégulatrices, suppresseurs de tumeur et des acteurs de la réponse inflammatoire (254). Ainsi, en inhibant les cibles validées SHIP1 (Src homoly-2 domain-containing inositol 5-phosphatase 1) et p85 α (sous-unité inhibitrice de PI3K), miR-155 stimule la voie de signalisation oncogénique anti-apoptotique PI3K/AKT (255, 256). Enfin, le miR-155 inhibe également la protéine pro-apoptotique TP53INP1, cible validée par Saito *et al.*, dont la diminution de l'expression a précédemment été objectivée par notre équipe en modèle murin d3Tx au sein du tissu tumoral lymphomateux (240, 244). Une surexpression de cette protéine pro-apoptotique favorise l'apoptose et l'arrêt du cycle cellulaire (257). Ces données suggèrent donc que la surexpression du miR-155, via l'inhibition de trois cibles directes validées SHIP1, p85 α et TP53INP1, participerait à l'inhibition de l'apoptose cellulaire, favorisant ainsi la prolifération lymphocytaire B non contrôlée, caractéristique du LGM (Figure 10).

A la différence du miR-155, l'augmentation du miR-150, miARN habituellement considéré comme suppresseur de tumeur, n'a que rarement été rapportée dans le cadre de pathologies tumorales. En effet, une diminution de l'expression du miR-150 a été décrite dans différents types de lymphomes tels que le lymphome du manteau, le lymphome du MALT conjonctival, le lymphome de Burkitt et le lymphome à cellules NK/T (258, 259). Néanmoins, une augmentation de son expression a déjà été associée au cancer gastrique ainsi qu'au LGM, soulignant le rôle potentiel oncogénique du miR-150 dans les tumeurs gastriques (238, 260, 239). Le gène codant la protéine pro-apoptotique EGR2 (early growth response 2) a été identifié comme une cible directe du miR-150, ce dernier inhibant son expression (260). Via cette voie de signalisation validée, le miR-150 est donc susceptible de contribuer à la prolifération lymphocytaire B (Figure 10).

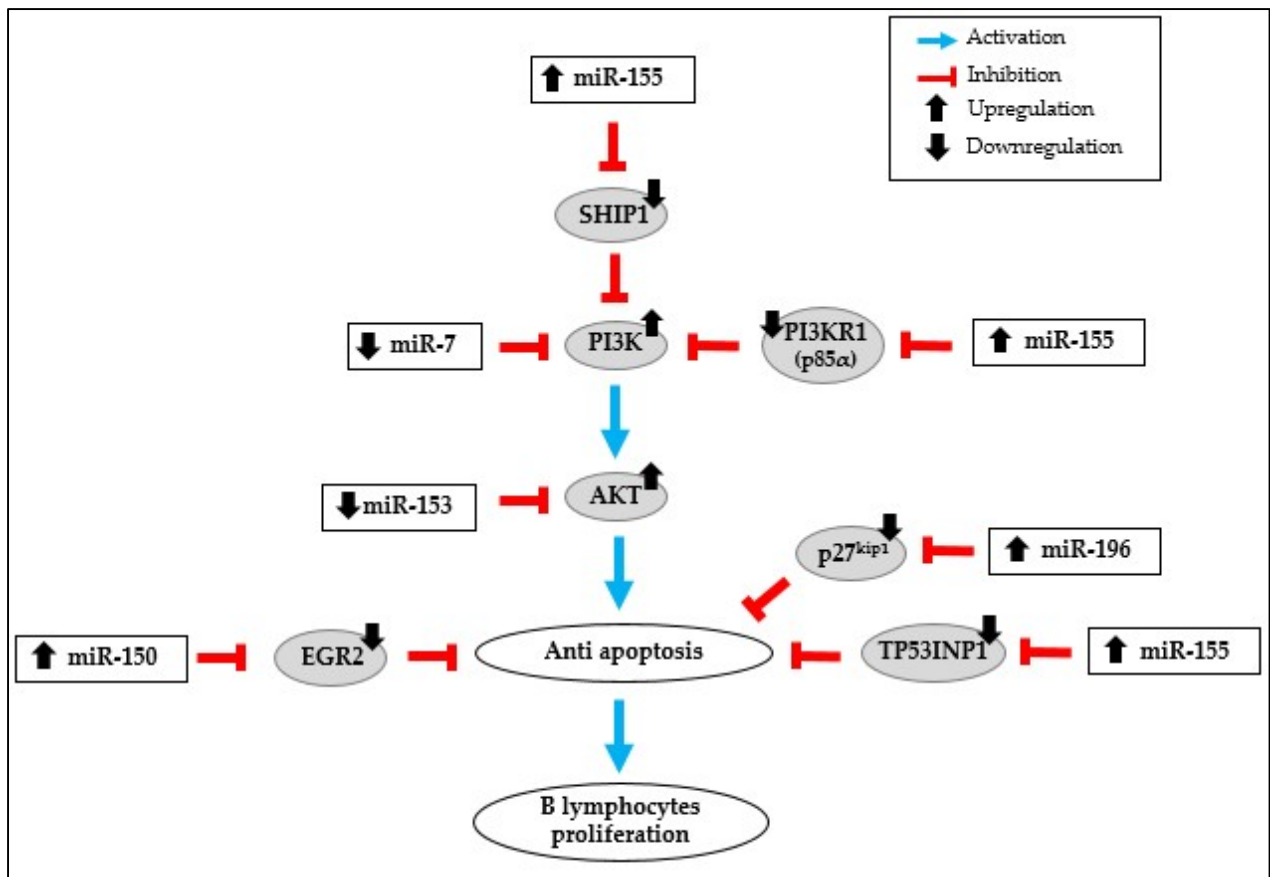


Figure 10 : **Effet synergique anti-apoptotique des miARNs dérégulés dans le LGM.**
D'après Blossse *et al.* 2019 (261).

L'absence de validation du miR-142 en tant que miARN significativement surexprimé au stade LGM dans le matériel humain étudié ici nous a fortement étonnée. En effet, en plus d'être surexprimé au niveau gastrique, le miR-142 l'était également au niveau sérique chez les souris d3Tx infectées ayant développées un LGM, faisant de ce miARN un potentiel marqueur non invasif de LGM. De plus, une association entre la surexpression gastrique du miR-142 et le LGM chez l'homme a précédemment été mise en évidence par les travaux de trois équipes distinctes (240, 241, 239). Les variations de méthodologies utilisées pourraient en partie expliquer cette discordance de même que les différences observées en termes de profils d'expression des miARNs selon les études publiées. Concernant la méthodologie utilisée dans ce travail, le matériel disponible nous permettait d'étudier la dérégulation des miARNs au sein d'une biopsie gastrique et non pas spécifiquement au sein de l'infiltrat lymphoïde tumoral. Le problème de cette approche étant que le tissu sain résiduel peut conduire à la sous-estimation voir à la non identification de certains miARNs par un effet de dilution. Pour pallier ce problème,

l'extraction des miARNs pourrait être réalisée après microdissection laser d'une zone tumorale (biopsies incluses en paraffine) ou bien après un tri cellulaire par cytométrie en flux (biopsies fraîches). De même, comme cela a été précédemment discuté pour le miR-155, les caractéristiques de la population témoin peuvent interférer sur les résultats et expliquer certaines différences, de même que celles de la population LGM. Fernandez *et al.* ont notamment constaté des profils miARNs spécifiquement associés aux patients LGM porteurs de la translocation t(11;18) d'une part et, d'autre part associés aux patients atteints d'un LGM disséminé, suggérant donc l'existence d'un biais possible selon si la population LGM étudiée comprend ou non des patients positifs pour cette translocation et/ou atteints d'un lymphome disséminé (241).

Nos résultats ne nous ont donc pas permis la validation sur le matériel humain disponible pour cette étude des trois miARNs suivants : miR-21, miR-142 et miR-135. Cependant, nous avons mis en évidence, au niveau gastrique, une surexpression des miR-196 et miR-138 ainsi qu'une sous-expression des miR-7 et miR-153 chez les patients atteints de LGM par rapport à la population témoin, faisant de ces quatre miARNs des nouveaux candidats pouvant être associés au LGM.

La surexpression du miR-196 a déjà été observée dans de nombreux cancers dont le cancer gastrique où elle est associée à un mauvais pronostic en termes de survie globale (237, 262). Ainsi, en inhibant le gène suppresseur de tumeur p27^{kip1}, cible validée du miR-196, ce dernier favoriserait la prolifération cellulaire contribuant ainsi au processus tumoral que ce soit dans le cancer gastrique mais aussi dans le LGM (Figure 10) (262).

La surexpression du miR-138 est quant à elle plus difficilement rattachable au LGM puisque la majorité des études confère à ce miARN un rôle suppresseur de tumeur (263–266). Néanmoins, en ce qui concerne le cancer gastrique, des résultats contradictoires ont été publiés comme en témoigne les travaux de Pang *et al.* et de Yao *et al.* observant respectivement une sous-expression et, une surexpression du miR-138 associée au cancer gastrique (267, 268). Des recherches supplémentaires sur la dérégulation du miR-138 dans les tumeurs malignes gastriques, y compris le LGM, paraissent donc nécessaires. A notre connaissance, aucune cible validée pour le miR-138 pouvant être impliquée dans le processus de lymphomagenèse n'a encore été identifiée.

La principale limite de notre travail est l'absence de donnée fonctionnelle, raison pour laquelle nous ne nous sommes intéressés qu'aux cibles déjà validées expérimentalement

dans la littérature. Afin de relier la dérégulation du miR-138 au LGM il aurait fallu par exemple, valider une des cibles de la voie de signalisation PI3K/AKT via des expérimentations utilisant un vecteur codant la luciférase (240). Cette voie de signalisation anti-apoptotique semble en effet une cible majeure des miARNs identifiés ici comme dérégulés au stade LGM, puisqu'en plus du miR-155 elle est la cible des miR-153 et miR-7, ces derniers agiraient comme suppresseurs de tumeur via l'inhibition de l'expression de leur cible validée, l'AKT et la PI3K, respectivement (269–271). Ainsi, nos résultats combinés aux données bibliographiques disponibles, suggèrent que la sous-expression des miR-153 et miR-7, au stade LGM, active la voie oncogénique PI3K/AKT et stimule ainsi la prolifération cellulaire comme cela a d'ailleurs été précédemment rapporté dans le cancer gastrique (Figure 10) (237, 272). Des études ultérieures visant à examiner l'expression de la voie de signalisation PI3K/AKT dans les cellules de patients atteints de LGM permettraient d'appuyer notre hypothèse. Néanmoins, faute de matériel disponible, nous n'avons pas pu vérifier la dérégulation de ces cibles protéiques.

Nos résultats indiquent donc que les miARNs identifiés comme dérégulés dans cette étude pourraient agir en synergie sur plusieurs cibles validées impliquées dans une cascade de signalisation commune favorisant la survie cellulaire et la prolifération lymphocytaire B (Figure 10). Ces données renforcent le rôle joué par ces acteurs moléculaires, présents au sein du microenvironnement inflammatoire gastrique, dans la lymphomagenèse. De plus, certains de ces miARNs pourraient, comme dans d'autres pathologies tumorales, jouer le rôle de biomarqueurs tumoraux et être utilisés comme outils diagnostiques, pronostiques et/ou thérapeutiques dans le LGM (273). Bien qu'il existe peu d'études axées sur le LGM, les travaux de Saito *et al.* ont montré que les niveaux d'expression des miR-142 et miR-155 étaient associés à la réponse au traitement d'éradication de *H. pylori* suggérant que ces deux miARNs puissent être utilisés comme marqueurs prédictifs de la résistance au traitement antibiotique indépendamment de la translocation t(11;18) (240). Fernandez *et al.* proposent quant à eux l'utilisation des profils d'expression de miARNs comme outils d'aide à la différenciation de la gastrite chronique versus LGM lorsque le diagnostic histopathologique est délicat du fait d'une transformation maligne progressive (241). Certaines publications semblent mettre en évidence des profils d'expression de miARNs associés à un risque de diffusion du LGM comme la surexpression du miR-223 qui serait associée à l'atteinte des ganglions lymphatiques périgastriques (274).

Le lien entre l'expression aberrante de miARNs et la progression vers le LGM suggère également que les miARNs pourraient être des cibles thérapeutiques potentielles. Des études ont ainsi montré que des oligonucléotides modifiés chimiquement, appelés « antagomirs », peuvent fonctionner comme des inhibiteurs spécifiques des miARNs chez la souris, et pourraient être potentiellement utilisables pour éteindre l'expression de miARNs oncogènes surexprimés au stade LGM (275–277).

A côtés des miARNs, certaines cytokines joueraient un rôle majeur dans la lymphomagenèse dont la cytokine APRIL impliquée dans la physiologie des lymphocytes B et dont l'augmentation a déjà été observée au stade LGM chez l'homme par les travaux de Munari *et al.* identifiant les macrophages intra tumoraux comme principale source de cette cytokine (207, 208). Grâce à un modèle alternatif de LGM, basé sur l'utilisation de souris transgéniques pour la forme humaine de la cytokine APRIL (Tg-hAPRIL) et infectées par *Helicobacter* sp., l'équipe a confirmé l'importance de cette cytokine *in vivo* dans le développement du LGM. La deuxième partie de mes travaux a permis de valider ce nouveau modèle prometteur de LGM mimant la réponse inflammatoire gastrique observée chez l'homme au stade LGM avec une réponse équilibrée de type Th1, Th2 et T régulatrice. Chez les souris Tg-hAPRIL infectées, une réponse T régulatrice significativement plus intense a été mise en évidence, ce qui n'était pas le cas chez les souris WT infectées, soulignant l'importance de cette réponse au stade LGM en modèle murin Tg-hAPRIL. L'intensité de cette réponse pourrait expliquer les niveaux de colonisation bactérienne plus élevés observés au sein des estomacs des souris Tg-hAPRIL infectées par rapport aux souris WT infectées (209). Conformément aux travaux de Craig *et al.* un enrichissement en lymphocytes T régulateurs a également été observé lors de nos expériences sur le matériel humain chez les patients LGM en comparaison aux patients contrôles (184). Ainsi, ces données appuient le rôle joué par les lymphocytes Treg dans la persistance bactérienne au sein de la muqueuse gastrique en temporisant la réponse inflammatoire permettant ainsi le maintien d'une stimulation antigénique chronique nécessaire à la lymphomagenèse.

Conformément aux données de Munari *et al.*, nous avons également confirmé la surexpression gastrique de la cytokine APRIL chez les patients atteints de LGM par rapport à la population contrôle. APRIL jouant un rôle crucial dans le développement du

LGM, nous avons identifié, chez l'homme, les cellules productrices et les cellules cibles de cette cytokine afin de mettre en évidence d'éventuels nouveaux acteurs cellulaires présents au sein du microenvironnement inflammatoire gastrique et impliqués dans la physiopathologie du LGM. Afin de différencier ces deux types cellulaires, nous avons utilisé deux anticorps : Aprily-2 et Stalk-1. L'anticorps Stalk-1, dirigé contre un peptide du domaine extracellulaire restant associé à la membrane après clivage protéolytique de la cytokine, permet d'identifier les cellules productrices de la cytokine APRIL (278). L'anticorps Aprily-2, dirigé contre la forme sécrétée de la cytokine après clivage protéolytique, permet d'identifier les cellules cibles de la cytokine APRIL (279). Contrairement aux données de Munari *et al.*, nos résultats n'ont pas permis d'identifier les macrophages comme étant les cellules productrices de la cytokine APRIL. L'analyse détaillée de leurs travaux nous a permis de comprendre cette discordance puisqu'afin d'identifier les cellules productrices de la cytokine APRIL, Munari *et al.* ont utilisé l'anticorps Aprily-2 permettant d'identifier les cellules cibles de cette cytokine et non pas, comme ils le souhaitaient, les cellules productrices de la cytokine APRIL. Nos résultats ont montré que les cellules productrices de la cytokine APRIL étaient des PNE présents au sein du tissu lymphomateux. Cette identification a été possible grâce à l'utilisation de co-marquages préalablement validés utilisant l'anticorps Stalk-1, le peptide MUB40 connu comme marqueur des PNN et l'anticorps anti-Siglec-8 marquant spécifiquement les PNE. La distinction entre les PNN et les PNE était importante puisque Schwaller *et al.* ont précédemment identifiés les PNN intra tumoraux comme source principale de la cytokine APRIL chez les patients atteints de DLBCL, sous type de LNH à cellules B comme le LGM (279). Bien que les PNE n'aient, avant ce travail, pas encore été identifiés comme cellules productrices de la cytokine APRIL dans une maladie lymphomateuse, cette capacité leur a néanmoins déjà été attribuée grâce aux travaux de plusieurs équipes dont ceux de Kawakami *et al.* consacrés à une maladie inflammatoire systémique (280, 281, 278). Cette capacité n'a malheureusement pas pu être confirmée par les tests de co-culture *in vitro* réalisés dans ce travail à partir de PNE purifiés du sang périphérique, indiquant que les PNE circulants présenteraient des capacités sécrétrices différentes de ceux présents au sein du microenvironnement tumoral. Les travaux de Straumann *et al.* montrant des différences significatives en termes d'activation cellulaire entre les PNE circulants et ceux situés dans le tractus gastro-intestinal, confortent cette hypothèse (282). De plus, d'autres acteurs cellulaires ou moléculaires, présents au sein du microenvironnement gastrique

sont surement nécessaires à la sécrétion de la cytokine APRIL par les PNE. La mise en évidence, par l'équipe du Pr JP Merlio de l'UMR BaRITOn 1053 travaillant sur le lymphome cutané, du rôle des lymphocytes Th2 dans le recrutement des PNE via la sécrétion de l'IL-5 (données non publiées) est une piste intéressante d'optimisation de nos essais de co-culture où nous pourrions ajouter dans un modèle *in vitro* des lymphocytes Th2.

De plus, certains travaux relatant le rôle potentiel des lymphocytes Th17 dans le recrutement et l'activation des PNE, il pourrait être intéressant d'évaluer la part de la réponse gastrique Th17, au stade LGM, en modèle murin mais également chez l'homme, via la détermination du niveau d'expression relatif du transcrite du facteur de transcription ROR- γ T des lymphocytes Th17 (283, 284).

Les PNE sont des cellules résidentes du tractus gastro-intestinal, constituant un de leur plus grand réservoir (285). Ce sont des cellules aux propriétés multiples bien connues pour leur rôle dans les réactions allergiques et les infections parasitaires mais également dans l'immunité innée et adaptative via notamment la sécrétion de nombreux médiateurs impliqués dans la réponse inflammatoire (281). Ainsi, envisager un rôle des PNE dans la physiopathologie du LGM n'est pas dénué de sens, d'autant plus que parmi les facteurs permettant leur recrutement, l'exposition à *H. pylori* a déjà été rapportée (286). Il a en effet été décrit dans des publications plus ou moins anciennes, la présence de PNE infiltrant la muqueuse gastrique chez des patients infectés par *H. pylori* et présentant une gastrite chronique (287–289). De plus, dans une publication datant de 1999 consacrée au LGM, une augmentation significative du nombre de PNE infiltrant le tissu tumoral a été observée dans plus de 70% des cas de LGM étudiés (290). De même, nous avons pu repérer sur des coupes de biopsies gastriques, colorées à l'hémalum-éosine, prélevées chez des patients atteints de LGM, la présence de PNE identifiés sur la base de leurs caractéristiques morphologiques cellulaires (données publiées dans la littérature comme la photo présentée en Figure 6-B ou données obtenues au laboratoire) (101).

Enfin, l'équipe du Pr Müller a récemment mis en évidence d'une part, dans un modèle murin d'infection à *H. pylori* le rôle des PNE dans la diminution de la réponse immunitaire Th1 et, d'autre part l'activité antibactérienne *in vitro* des PNE limitée envers *H. pylori* paradoxalement à celle observée envers d'autres pathogènes (286). Ces données récentes suggèrent que les PNE favoriseraient la persistance bactérienne permettant ainsi le maintien d'une stimulation antigénique chronique, condition nécessaire à l'émergence du LGM.

Par ailleurs, nos résultats ont montré que la population cellulaire cible de la cytokine APRIL était majoritairement constituée de lymphocytes B tumoraux, appuyant le rôle majeur joué par cette cytokine dans la lymphomagenèse via sa participation à la prolifération des lymphocytes B néoplasiques présents au sein des infiltrats lymphoïdes. Une population cellulaire minoritaire ciblée par cette cytokine a également été repérée via nos marquages utilisant Aprily-2, conformément aux travaux de Munari *et al.* il s'agit de macrophages intra tumoraux ayant probablement phagocytés la cytokine APRIL.

Ce travail, pour la première fois, suggère que les polynucléaires éosinophiles de par (i) leurs propriétés immunorégulatrices connues ; (ii) leur action suppressive envers la réponse Th1 récemment décrite dans la littérature et ; (iii) leur capacité à produire la cytokine APRIL reconnue par les lymphocytes B ; pourraient avoir un rôle pro-tumoral dans le LGM.

Afin de valider le rôle joué par les PNE dans le développement du LGM, une perspective de ce travail serait l'application de la thymectomie néonatale chez des souris dépourvues de PNE (KO PNE) puis infectées par *H. pylori* (188). Plusieurs modèles de souris KO PNE ont été décrits dans la littérature tels que les souris déficientes en IL-5, en GATA-1 ou encore transgéniques Tg-PHIL dans lesquelles une toxine bactérienne provoque la mort des cellules différenciées vers la lignée éosinophile (291–293). L'absence d'émergence de lésions lymphomateuses, 12 mois post infection, chez l'ensemble des souris KO PNE thymectomisées confirmerait l'implication des PNE dans la lymphomagenèse gastrique induite par l'infection à *H. pylori*. Le modèle de souris d3Tx est cependant très difficile à maîtriser et à mettre en place. En revanche, un modèle murin potentiellement productif en termes d'émergence de LGM serait le croisement entre les souris Tg-hAPRIL, facile à générer, et les souris déficientes pour NLRC5 de l'équipe du Pr Ferrero (162).

En conclusion, ce travail nous ont permis de participer à la compréhension de la physiopathologie du LGM mettant en évidence l'importance des différents acteurs moléculaires et cellulaires du microenvironnement inflammatoire de l'hôte dans le développement de ce lymphome.

Le modèle de souris Tg-hAPRIL, mimant la réponse inflammatoire gastrique observée chez l'homme, a été validé comme modèle de LGM et semble être un modèle promoteur pour étudier l'influence d'autres facteurs de l'hôte dans la lymphomagenèse gastrique tels

que l'impact du microbiote digestif, encore peu étudié dans le développement de cette pathologie tumorale. Il est en effet maintenant bien établi que le microbiote digestif joue un rôle essentiel dans l'histoire naturelle des cancers gastro-intestinaux dont le cancer gastrique où il a été récemment identifié des modifications du microbiote gastrique spécifiquement associées à la carcinogénèse (294–297). Outre le rôle direct d'un agent du microbiote dans l'initiation d'un lymphome, le microbiote digestif peut, en modifiant les réponses inflammatoire et immunitaire de l'hôte, affecter le processus de lymphomagenèse (298, 297, 299). Dans un modèle murin utilisant des souris déficientes pour le gène *Atm* (ataxie télangiectasie) (*Atm*^{-/-}) développant spontanément des lymphomes B, Yamamoto *et al.* ont mis en évidence l'impact du microbiote intestinal sur la lymphomagenèse (300). Les souris *Atm*^{-/-} avec un microbiote restreint mais enrichi en *Lactobacillus johnsonii* présentaient moins de lymphome et une survie plus longue que celles ayant un microbiote conventionnel. L'inoculation de *Lactobacillus johnsonii*, isolé du microbiote intestinal restreint, aux souris *Atm*^{-/-} présentant un microbiote conventionnel, s'est accompagnée d'une réduction de l'inflammation, du stress oxydatif et de la génotoxicité. Les modèles animaux de lymphome paraissent donc utiles pour la mise en évidence d'un lien entre microbiote et lymphomagenèse. Ainsi, l'équipe du Pr Lehours a étudié, en collaboration avec le laboratoire du Pr MJ Blaser (NYU, School of Medicine, Langone Medical Center), la composition du microbiote digestif dans le modèle Tg-hAPRIL. L'infection à *H. felis* est spécifiquement associée à une augmentation de l'abondance relative en *Escherichia coli* (*E. coli*) au niveau gastrique et au niveau intestinal à la fois dans les souris WT et Tg-hAPRIL. De plus, l'équipe a montré que le niveau de colonisation gastrique à *E. coli* était significativement relié aux scores histologiques d'atrophie. Ces résultats nous ont permis d'envisager une éventuelle synergie entre *H. felis* et *E. coli* en termes de capacité à induire la lymphomagenèse gastrique d'autant plus que certaines souches de *E. coli* ont été identifiées comme facteur de risque de cancer colorectal (301, 302). Pour vérifier cette hypothèse, nous avons réalisé en modèle murin des co-infections gastriques *H. felis*/*E. coli*. Ainsi, des souris C57BL6 Tg-hAPRIL ont été infectées par *H. felis* (gavage oral à 6 semaines de vie) puis, à partir de 3 mois post-infection, ces souris ont été gavées pendant 4 mois (1 série de gavage par mois) par différentes souches de *E. coli* : (i) une souche appartenant au groupe phylogénétique B1, isolée des estomacs de souris lymphomateuses Tg-hAPRIL du précédent projet ; (ii) une souche CCR20 appartenant au groupe B2 et disposant de l'ilôt génomique *pks* complet

(codant la colibactine), isolée d'un patient atteint d'un cancer colorectal et (iii) son mutant isogénique Δ CCR20 pour la colibactine afin d'explorer spécifiquement l'impact de ce facteur de virulence connu pour stimuler l'émergence du cancer colorectal (souches obtenues en collaboration avec le Pr R Bonnet) (303–305). Les souris ont été sacrifiées 1 mois après le dernier gavage, soit 7 mois post-infection à *H. felis* (Figure 11). Les sacrifices ont eu lieu mi-mars 2020 et les premières analyses (histologiques, immunohistochimiques et qPCR) sont actuellement en cours au laboratoire, du retard ayant été pris compte tenu de la crise sanitaire. L'objectif était donc d'évaluer une coopération potentielle entre les bactéries du genre *Helicobacter* et *E. coli* dans la lymphomagenèse gastrique, en modèle murin Tg-hAPRIL.

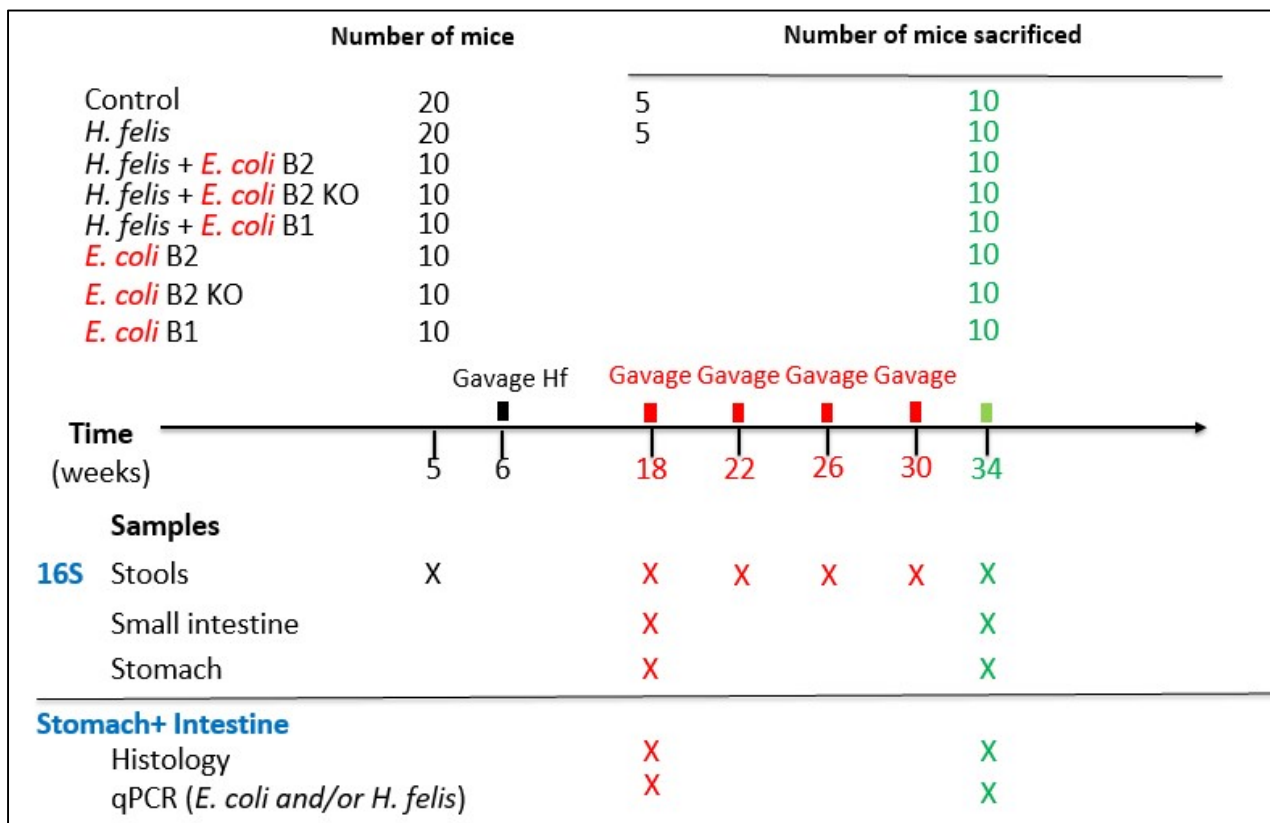


Figure 11 : **Stratégie expérimentale de co-infection *H. felis* / *E. coli* en modèle de souris Tg-hAPRIL.**

Les résultats préliminaires indiquent que la réponse inflammatoire n'est pas plus élevée dans les souris co-infectées (*E. coli* + *H. felis*) que mono-infectée par *H. felis* (Figure 12-A). En revanche les infiltrats lymphoïdes sont plus nombreux et de plus grandes tailles notamment dans le groupe des souris *H. felis* + *E. coli* B2 (Figure 12-B). Ces infiltrats sont

comme attendus majoritairement composés de lymphocytes B avec quelques lymphocytes T infiltrants (Figure 13). Ces lymphocytes B présentent dans le groupe *H. felis* + *E. coli* B2-KO un indice de prolifération (marquage Ki67) plus important par rapport aux autres groupes de souris (Figure 12-C). Les études de clonalité sont en cours. Des analyses par qPCR après extraction des ADN des biopsies gastriques montrent que la quantité de *H. felis* est significativement plus importante dans les estomacs des souris co-infectées (tous groupes confondus) que mono-infectée (Figure 12-D). En revanche *E. coli* n'est pas détectable par qPCR à cause probablement d'un manque de sensibilité de notre PCR (données non montrées). Les ARN des biopsies gastriques ont également été extraits et permettront d'évaluer la réponse inflammatoire gastrique (PCR array et RT-qPCR ciblées). Nous pourrions ainsi déterminer si les co-infections *H. felis* + *E. coli* modulent la réponse inflammatoire en faveur de l'émergence d'un LGM.

Toutes ces données sont prometteuses bien qu'elles indiquent que les sacrifices sont intervenus un peu trop précocement par rapport à l'émergence de LGM dans ce modèle.

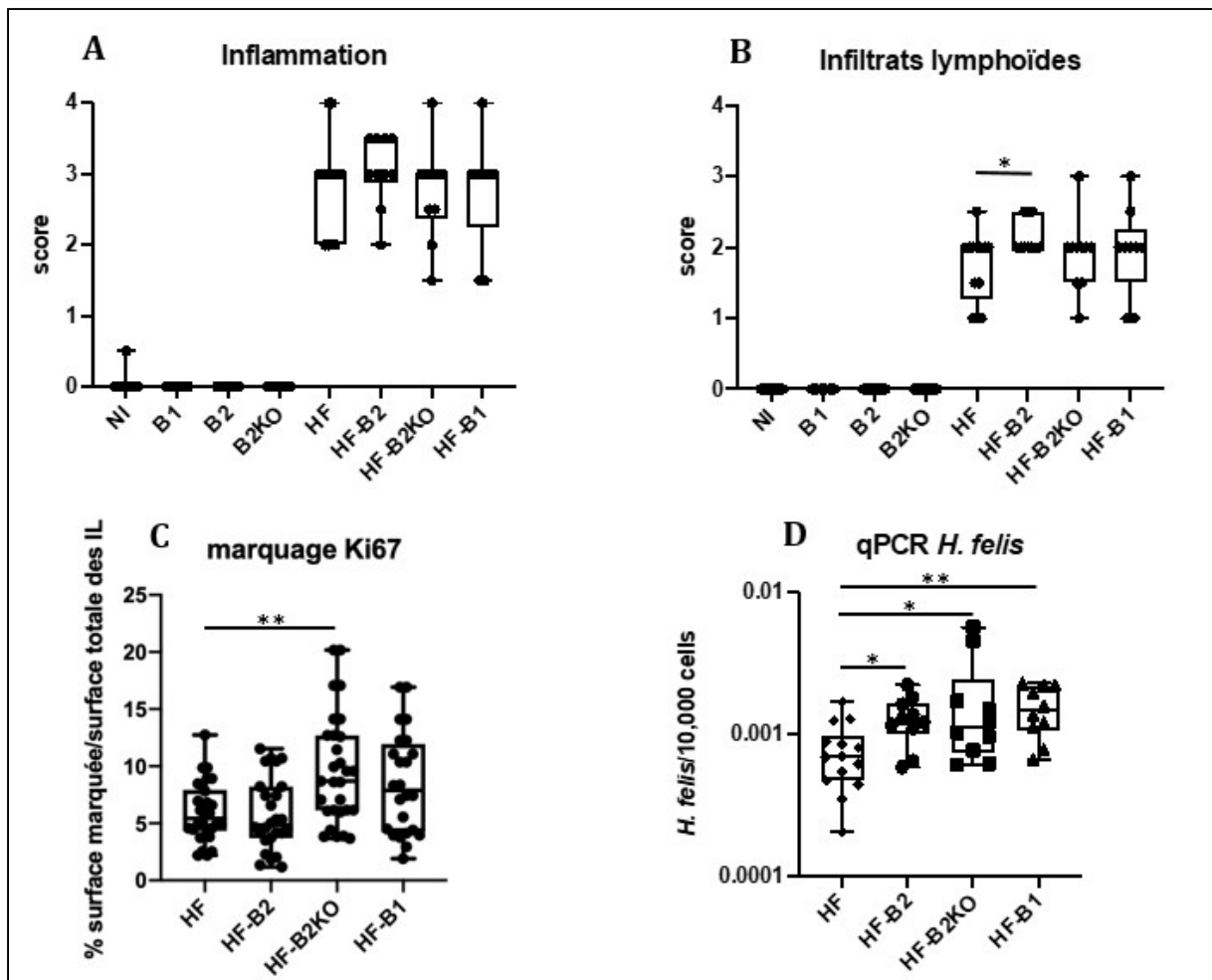


Figure 12 : Résultats préliminaires des co-infections *H. felis*/*E. coli* en modèle de souris Tg-hAPRIL.

(A) Scores histologiques d'inflammation gastrique (de 0 à 4) chez les souris des différents groupes : non infectées (NI) (n=15), mono-infectées par *E. coli* B1 (n=10), B2 (n=10), B2KO (n=10) et par *H. felis* (HF) (n=15) et co-infectées HF-B2 (n=10), HF-B2KO (n=10), et HF-B1 (n=10). (B) Scores histologiques d'infiltration lymphoïde (de 0 à 4) pour ces mêmes groupes. (C) Estimation de la prolifération lymphocytaire B au sein des infiltrats lymphoïdes, par le calcul du pourcentage des ratios entre la surface occupée par les cellules Ki67+ et la surface totale de l'infiltrat lymphoïde : 5 souris par groupe, 3 à 6 infiltrats évalués par coupe. (D) Quantification de l'inoculum bactérien gastrique par PCR quantitative rapportée aux nombres de cellules gastriques, chez les souris mono-infectées HF (n=15) et co-infectées HF-B2 (n=10), HF-B2KO (n=10) et HF-B1 (n=10). Plus de détails techniques dans l'article de Floch *et al.* 2017 (209).

Représentations graphiques en diagramme en boîte avec visualisation de toutes les valeurs, avec la boîte représentant 50% des valeurs autour de la médiane (barre horizontale) et les segments aux extrémités représentant les valeurs extrêmes, * : $p < 0.05$ et ** $p < 0.01$; Test de Mann-Whitney.

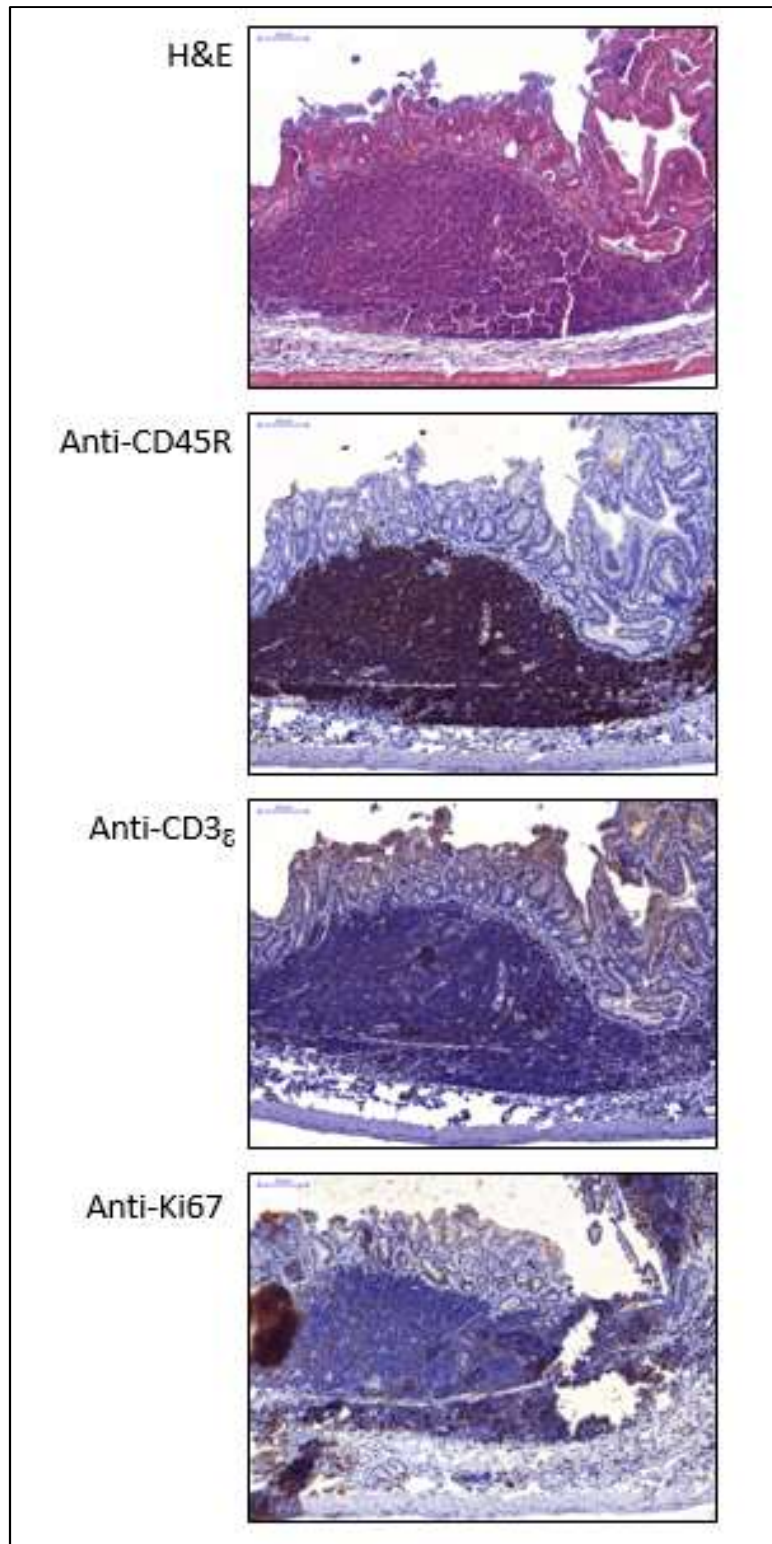


Figure 13: **Analyses histologiques** (coloration H&E) et **immunohistochimiques** (marquages anti-CD45R, anti-CD3 ϵ et anti-Ki67) des infiltrats lymphoïdes observés au sein de la muqueuse gastrique des souris mono-infectées par *H. felis* et co-infectées par *H. felis* + *E. coli*. Représentations d'un infiltrat lymphoïde d'une souris co-infectée *H. felis* + *E. coli* B2KO. Résultats conformes à ceux obtenus pour les souris mono-infectées par *H. felis* et co-infectées par *H. felis* + *E. coli* analysées à ce jour. Analyses réalisées sur des coupes (3 μ m d'épaisseur) sériées de biopsies incluses en paraffine.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Suarez F, Lortholary O, Hermine O, Lecuit M. 2006. Infection-associated lymphomas derived from marginal zone B cells: a model of antigen-driven lymphoproliferation. *Blood* 107:3034–3044.
2. Bachy E, Besson C, Suarez F, Hermine O. 2010. Hepatitis C Virus Infection and Lymphoma. *Mediterr J Hematol Infect Dis* 2.
3. Epstein MA, Henle G, Achong BG, Barr YM. 1965. MORPHOLOGICAL AND BIOLOGICAL STUDIES ON A VIRUS IN CULTURED LYMPHOBLASTS FROM BURKITT'S LYMPHOMA. *J Exp Med* 121:761–770.
4. Epstein M., Achong B., Barr Y. 1964. VIRUS PARTICLES IN CULTURED LYMPHOBLASTS FROM BURKITT'S LYMPHOMA. *The Lancet* 283:702–703.
5. Okano M. 2000. Haematological associations of Epstein-Barr virus infection. *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol* 13:199–214.
6. Ferreri AJM, Ernberg I, Copie-Bergman C. 2009. Infectious agents and lymphoma development: molecular and clinical aspects. *J Intern Med* 265:421–438.
7. Young LS, Yap LF, Murray PG. 2016. Epstein–Barr virus: more than 50 years old and still providing surprises. *Nature Reviews Cancer* 16:789–802.
8. Ott G, Rosenwald A, Campo E. 2013. Understanding MYC-driven aggressive B-cell lymphomas: pathogenesis and classification 9.
9. Graham BS, Lynch DT. 2020. Burkitt Lymphoma StatPearls. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).
10. Pasqualucci L, Bhagat G, Jankovic M, Compagno M, Smith P, Muramatsu M, Honjo T, Morse HC, Nussenzweig MC, Dalla-Favera R. 2008. AID is required for germinal center–derived lymphomagenesis. *Nature Genetics* 40:108–112.
11. Martin A, Scharff MD. 2002. AID and mismatch repair in antibody diversification. *Nat Rev Immunol* 2:605–614.
12. Okazaki I, Kotani A, Honjo T. 2007. Role of AID in Tumorigenesis, p. 245–273. *In* *Advances in Immunology*. Academic Press.
13. Ponzoni M, Ferreri AJM. 2017. Bacteria associated with marginal zone lymphomas. *Best Practice & Research Clinical Haematology* 30:32–40.
14. Emerging Role of Infectious Etiologies in the Pathogenesis of Marginal Zone B-cell Lymphomas | *Clinical Cancer Research*.
15. Schreuder MI, van den Brand M, Hebeda KM, Groenen PJTA, van Krieken JH, Scheijen B. 2017. Novel developments in the pathogenesis and diagnosis of extranodal marginal zone lymphoma. *J Hematol* 10:91–107.

16. Moodley Y, Linz B, Bond RP, Nieuwoudt M, Soodyall H, Schlebusch CM, Bernhöft S, Hale J, Suerbaum S, Mugisha L, van der Merwe SW, Achtman M. 2012. Age of the Association between *Helicobacter pylori* and Man. PLoS Pathog 8.
17. Mégraud F, Lehours P, Vale FF. 2016. The history of *Helicobacter pylori*: from phylogeography to paleomicrobiology. Clinical Microbiology and Infection 22:922–927.
18. Kidd M, Modlin IM. 1998. A Century of *Helicobacter pylori*. DIG 59:1–15.
19. Marshall BJ, Warren JR. 1984. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. Lancet 16;1(8390):1311-5.
20. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. 2005. Global cancer statistics, 2002. CA Cancer J Clin 55:74–108.
21. Goodwin CS, Armstrong JA, Chilvers T, Peters M, Collins MD, Sly L, McCONNELL W, Harper WES. 1989. Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen. nov. as *Helicobacter pylori* comb. nov. and *Helicobacter mustelae* comb. nov., Respectively. International Journal of Systematic Bacteriology 39:397–405.
22. Berthenet E, Bénéjat L, Ménard A, Varon C, Lacomme S, Gontier E, Raymond J, Boussaba O, Toulza O, Ducournau A, Buissonnière A, Giese A, Megraud F, Bessède E, Jehanne Q, Lehours P. 2019. Whole-Genome Sequencing and Bioinformatics as Pertinent Tools to Support *Helicobacteraceae* Taxonomy, Based on Three Strains Suspected to Belong to Novel *Helicobacter* Species. Front Microbiol 10.
23. Mégraud F. 2003. [When and how does *Helicobacter pylori* infection occur?]. Gastroenterol Clin Biol 27:374–379.
24. Brown LM. 2000. *Helicobacter pylori*: Epidemiology and Routes of Transmission. Epidemiologic Reviews 22:283–297.
25. Hooi JKY, Lai WY, Ng WK, Suen MMY, Underwood FE, Tanyingoh D, Malfertheiner P, Graham DY, Wong VWS, Wu JCY, Chan FKL, Sung JY, Kaplan GG, Ng SC. 2017. Global Prevalence of *Helicobacter pylori* Infection: Systematic Review and Meta-Analysis. Gastroenterology 153:420–429.
26. Sebastian S, Pierre M. 2002. *Helicobacter pylori* Infection. The New England Journal of Medicine 12.
27. Malaty HM. 2007. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. Best Practice & Research Clinical Gastroenterology 21:205–214.
28. Mégraud F, Bessède E, Varon C. 2015. *Helicobacter pylori* infection and gastric carcinoma. Clinical Microbiology and Infection 21:984–990.
29. Hill AB. 2015. The environment and disease: association or causation? J R Soc Med 108:32–37.

30. Wotherspoon A. 1991. *Helicobacter pylori*-associated gastritis and primary B-cell gastric lymphoma. *The Lancet* 338:1175–1176.
31. Isaacson PG. 1996. Recent developments in our understanding of gastric lymphomas. *Am J Surg Pathol* 20 Suppl 1:S1-7.
32. Eck M, Greiner A, Schmausser B, Eck H, Kolve M, Fischbach W, Strecker P, Müller-Hermelink HK. 1999. Evaluation of *Helicobacter pylori* in gastric MALT-type lymphoma: differences between histologic and serologic diagnosis. *Mod Pathol* 12:1148–1151.
33. Doglioni C, Moschini A, de Boni M, Wotherspoon AC, Isaacson PG. 1992. High incidence of primary gastric lymphoma in northeastern Italy. *The Lancet* 339:834–835.
34. *Helicobacter pylori* Infection and Gastric Lymphoma | NEJM.
35. Hussell T, Isaacson PG, Spencer J, Crabtree JE. 1993. The response of cells from low-grade B-cell gastric lymphomas of mucosa-associated lymphoid tissue to *Helicobacter pylori*. *The Lancet* 342:571–574.
36. Hussell T, Isaacson PG, Crabtree JE, Spencer J. 1996. *Helicobacter pylori*-Specific Tumour-Infiltrating T Cells Provide Contact Dependent Help for the Growth of Malignant B Cells in Low-Grade Gastric Lymphoma of Mucosa-Associated Lymphoid Tissue. *The Journal of Pathology* 178:122–127.
37. Zucca E, Bertoni F, Roggero E, Bosshard G, Cazzaniga G, Pedrinis E, Biondi A, Cavalli F. 1998. Molecular Analysis of the Progression from *Helicobacter pylori* -Associated Chronic Gastritis to Mucosa-Associated Lymphoid-Tissue Lymphoma of the Stomach. *N Engl J Med* 338:804–810.
38. Wotherspoon AC, Diss TC, Pan L, Isaacson PG, Doglioni C, Moschini A, de Boni M. 1993. Regression of primary low-grade B-cell gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue type after eradication of *Helicobacter pylori*. *The Lancet* 342:575–577.
39. Weber DM, Dimopoulos MA, Anandu DP, Pugh WC, Steinbach G. 1994. Regression of gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue with antibiotic therapy for *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 107:1835–1838.
40. Bayerdörffer E, Rudolph B, Neubauer A, Thiede C, Lehn N, Eidt S, Stolte M, MALT Lymphoma Study Group. 1995. Regression of primary gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue type after cure of *Helicobacter pylori* infection. *The Lancet* 345:1591–1594.
41. Pinotti G, Zucca E, Roggero E, Pascarella A, Bertoni F, Savio A, Savio E, Capella C, Pedrinis E, Saletti P, Morandi E, Santandrea G, Cavalli F. 1997. Clinical Features, Treatment and Outcome in a Series of 93 Patients with Low-Grade Gastric MALT Lymphoma. *Leukemia & Lymphoma* 26:527–537.

42. Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain CA, Atherton J, Axon ATR, Bazzoli F, Gensini GF, Gisbert JP, Graham DY, Rokkas T, El-Omar EM, Kuipers EJ, The European Helicobacter Study Group (EHSg). 2012. Management of *Helicobacter pylori* infection—the Maastricht IV/ Florence Consensus Report. *Gut* 61:646–664.
43. Cammarota G, Montalto M, Tursi A, Vecchio FM, Fedeli G, Gasbarrini G. 1995. *Helicobacter pylori* reinfection and rapid relapse of low-grade B-cell gastric lymphoma. *Lancet* 345:192.
44. Enno A, O'Rourke JL, Howlett CR, Jack A, Dixon MF, Lee A. 1995. MALToma-like lesions in the murine gastric mucosa after long-term infection with *Helicobacter felis*. A mouse model of *Helicobacter pylori*-induced gastric lymphoma. *Am J Pathol* 147:217–222.
45. Enno A, O'Rourke J, Braye S, Howlett R, Lee A. 1998. Antigen-dependent progression of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT)-type lymphoma in the stomach. Effects of antimicrobial therapy on gastric MALT lymphoma in mice. *Am J Pathol* 152:1625–1632.
46. Mueller A, O'Rourke J, Chu P, Chu A, Dixon MF, Bouley DM, Lee A, Falkow S. 2005. The Role of Antigenic Drive and Tumor-Infiltrating Accessory Cells in the Pathogenesis of *Helicobacter*-Induced Mucosa-Associated Lymphoid Tissue Lymphoma. *Am J Pathol* 167:797–812.
47. Blaser MJ, Perez-Perez GI, Kleanthous H, Cover TL, Peek RM, Chyou PH, Stemmermann GN, Nomura A. 1995. Infection with *Helicobacter pylori* Strains Possessing *cagA* Is Associated with an Increased Risk of Developing Adenocarcinoma of the Stomach. *Cancer Res* 55:2111–2115.
48. Parsonnet J, Friedman GD, Orentreich N, Vogelmann H. 1997. Risk for gastric cancer in people with CagA positive or CagA negative *Helicobacter pylori* infection. *Gut* 40:297–301.
49. Floch P, Mégraud F, Lehours P. 2017. *Helicobacter pylori* Strains and Gastric MALT Lymphoma. *Toxins (Basel)* 9.
50. Kuo S-H, Chen L-T, Lin C-W, Wu M-S, Hsu P-N, Tsai H-J, Chu C-Y, Tzeng Y-S, Wang H-P, Yeh K-H, Cheng A-L. 2013. Detection of the *Helicobacter pylori* CagA protein in gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma cells: clinical and biological significance. *Blood Cancer J* 3:e125.
51. Lehours P, Ménard A, Dupouy S, Bergey B, Richy F, Zerbib F, Ruskoné-Fourmestraux A, Delchier JC, Mégraud F. 2004. Evaluation of the Association of Nine *Helicobacter pylori* Virulence Factors with Strains Involved in Low-Grade Gastric Mucosa-Associated Lymphoid Tissue Lymphoma. *Infect Immun* 72:880–888.
52. Delchier JC, Lamarque D, Levy M, Tkoub EM, Copie-Bergman C, Deforges L, Chaumette MT, Haioun C. 2001. *Helicobacter pylori* and gastric lymphoma: high seroprevalence of CagA in diffuse large B-cell lymphoma but not in low-grade lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue type. *Am J Gastroenterol* 96:2324–2328.

53. Peng H, Ranaldi R, Diss TC, Isaacson PG, Bearzi I, Pan L. 1998. High frequency of CagA+ *Helicobacter pylori* infection in high-grade gastric MALT B-cell lymphomas. *The Journal of Pathology* 185:409–412.
54. Atherton JC, Cao P, Peek RM, Tummuru MKR, Blaser MJ, Cover TL. 1995. Mosaicism in Vacuolating Cytotoxin Alleles of *Helicobacter pylori*: Association of specific vacA types with cytotoxin production and peptic ulceration. *Journal of Biological Chemistry* 270:17771–17777.
55. Cover TL. 2016. *Helicobacter pylori* Diversity and Gastric Cancer Risk. *mBio* 7.
56. Koehler CI, Mues MB, Dienes HP, Kriegsmann J, Schirmacher P, Odenthal M. 2003. *Helicobacter pylori* genotyping in gastric adenocarcinoma and MALT lymphoma by multiplex PCR analyses of paraffin wax embedded tissues. *Mol Pathol* 56:36–42.
57. Vandenbroucke-Grauls CM, Appelmek BJ. 1998. *Helicobacter pylori* LPS: molecular mimicry with the host and role in autoimmunity. *Ital J Gastroenterol Hepatol* 30 Suppl 3:S259-260.
58. Moran AP. 1996. The role of lipopolysaccharide in *Helicobacter pylori* pathogenesis. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 10:39–50.
59. Appelmek BJ, Simoons-Smit I, Negrini R, Moran AP, Aspinall GO, Forte JG, De Vries T, Quan H, Verboom T, Maaskant JJ, Ghiara P, Kuipers EJ, Bloemena E, Tadema TM, Townsend RR, Tyagarajan K, Crothers JM, Monteiro MA, Savio A, De Graaff J. 1996. Potential role of molecular mimicry between *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide and host Lewis blood group antigens in autoimmunity. *Infect Immun* 64:2031–2040.
60. Lehours P, Zheng Z, Skoglund A, Mégraud F, Engstrand L. 2009. Is There a Link between the Lipopolysaccharide of *Helicobacter pylori* Gastric MALT Lymphoma Associated Strains and Lymphoma Pathogenesis? *PLoS One* 4.
61. Moran AP. 2008. Relevance of fucosylation and Lewis antigen expression in the bacterial gastroduodenal pathogen *Helicobacter pylori*. *Carbohydrate Research* 343:1952–1965.
62. Censini S, Lange C, Xiang Z, Crabtree JE, Ghiara P, Borodovsky M, Rappuoli R, Covacci A. 1996. cag, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:14648–14653.
63. Lehours P, Dupouy S, Bergey B, Ruskoné-Foumestroux A, Delchier JC, Rad R, Richy F, Tankovic J, Zerbib F, Mégraud F, Ménard A. 2004. Identification of a genetic marker of *Helicobacter pylori* strains involved in gastric extranodal marginal zone B cell lymphoma of the MALT-type. *Gut* 53:931–937.
64. Thiberge J-M, Boursaux-Eude C, Lehours P, Dillies M-A, Creno S, Coppée J-Y, Rouy Z, Lajus A, Ma L, Burucoa C, Ruskoné-Foumestroux A, Courillon-Mallet A, De Reuse H, Boneca IG, Lamarque D, Mégraud F, Delchier J-C, Médigue C, Bouchier C, Labigne A, Raymond J. 2010. From array-based hybridization of *Helicobacter pylori* isolates to

- the complete genome sequence of an isolate associated with MALT lymphoma. *BMC Genomics* 11:368.
65. Wang H-C, Cheng F-C, Wu M-S, Shu H-Y, Sun HS, Wang Y-C, Su I-J, Wu C-J. 2015. Genome Sequences of Three *Helicobacter pylori* Strains from Patients with Gastric Mucosa-Associated Lymphoid Tissue Lymphoma. *Genome Announc* 3.
 66. Bernarde C, Khoder G, Lehours P, Burucoa C, Fauchère J-L, Delchier J-C, Mégraud F, Atanassov C. 2009. Proteomic *Helicobacter pylori* biomarkers discriminative of low-grade gastric MALT lymphoma and duodenal ulcer. *PROTEOMICS – Clinical Applications* 3:672–681.
 67. Zhang J, Ding S, Zhong L, Lin S, Yang B, Peng J, Lou Y. 2006. [Difference analysis on proteome of *Helicobacter pylori* in patients with peptic ulcer, gastritis, and gastric cancer]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 86:2690–2694.
 68. Bernarde C, Lehours P, Lasserre J-P, Castroviejo M, Bonneu M, Mégraud F, Ménard A. 2010. Complexomics Study of Two *Helicobacter pylori* Strains of Two Pathological Origins. *Mol Cell Proteomics* 9:2796–2826.
 69. D’Elios MM, Montecucco C, de Bernard M. 2007. VacA and HP-NAP, Ying and Yang of *Helicobacter pylori*-associated gastric inflammation. *Clinica Chimica Acta* 381:32–38.
 70. Polenghi A, Bossi F, Fischetti F, Durigutto P, Cabrelle A, Tamassia N, Cassatella MA, Montecucco C, Tedesco F, Bernard M de. 2007. The Neutrophil-Activating Protein of *Helicobacter pylori* Crosses Endothelia to Promote Neutrophil Adhesion In Vivo. *The Journal of Immunology* 178:1312–1320.
 71. Nakamura S, Matsumoto T, Ye H, Nakamura S, Suekane H, Matsumoto H, Yao T, Tsuneyoshi M, Du M-Q, Iida M. 2006. *Helicobacter pylori*-negative gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Cancer* 107:2770–2778.
 72. Du M-Q. 2007. MALT Lymphoma : Recent Advances in Aetiology and Molecular Genetics. *JCEH* 47:31–42.
 73. Raderer M, Wöhrer S, Kiesewetter B, Dolak W, Lagler H, Wotherspoon A, Muellauer L, Chott A. 2015. Antibiotic treatment as sole management of *Helicobacter pylori*-negative gastric MALT lymphoma: a single center experience with prolonged follow-up. *Ann Hematol* 94:969–973.
 74. Morgner A, Lehn N, Andersen LP, Thiede C, Bennedsen M, Trebesius K, Neubauer B, Neubauer A, Stolte M, Bayerdörffer E. 2000. *Helicobacter heilmannii*-associated primary gastric low-grade MALT lymphoma: Complete remission after curing the infection. *Gastroenterology* 118:821–828.
 75. Nakamura M, Øverby A, Michimae H, Matsui H, Takahashi S, Mabe K, Shimoyama T, Sasaki M, Terao S, Kamada T, Yanaka A, Iwamoto J, Tanabe S, Tari A, Nasu S, Suzuki H, Murayama SY. 2020. PCR analysis and specific immunohistochemistry revealing a high prevalence of non-*Helicobacter pylori* *Helicobacters* in *Helicobacter pylori*-

- negative gastric disease patients in Japan: High susceptibility to an Hp eradication regimen. *Helicobacter* 25:e12700.
76. Delsol G. 2010. Les anomalies moléculaires dans les lymphomes. *Bulletin du Cancer* 97:1347–1364.
 77. Isaacson P, Wright DH. 1983. Malignant lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue. A distinctive type of B-cell lymphoma. *Cancer* 52:1410–1416.
 78. Isaacson PG, Du M-Q. 2004. MALT lymphoma: from morphology to molecules. *Nature Reviews Cancer* 4:644–653.
 79. Freeman C, Berg JW, Cutler SJ. 1972. Occurrence and prognosis of extranodal lymphomas. *Cancer* 29:252–260.
 80. Matysiak-Budnik T, Fabiani B, Hennequin C, Thieblemont C, Malamut G, Cadiot G, Bouché O, Ruskoné-Fourmestreaux A. 2018. Gastrointestinal lymphomas: French Intergroup clinical practice recommendations for diagnosis, treatment and follow-up (SNFGE, FFCD, GERCOR, UNICANCER, SFCD, SFED, SFRO, SFH). *Digestive and Liver Disease* 50:124–131.
 81. Olszewska-Szopa M, Wróbel T. 2019. Gastrointestinal non-Hodgkin lymphomas. *Adv Clin Exp Med* 28:1119–1124.
 82. Isaacson PG, Spencer J, Wright DH. 1988. Classifying primary gut lymphomas. *Lancet* 2:1148–1149.
 83. Update on MALT lymphomas - ScienceDirect.
 84. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, Harris NL, Stein H, Siebert R, Advani R, Ghielmini M, Salles GA, Zelenetz AD, Jaffe ES. 2016. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood* 127:2375–2390.
 85. Bruneau J, Canioni D, Jo Molina T. 2017. Révision 2016/2017 de la classification OMS des hémopathies lymphoïdes matures : ce qui va changer dans la pratique quotidienne. *Revue Francophone des Laboratoires* 2017:39–48.
 86. Ullrich A, Fischbach W, Blettner M. 2002. Incidence of gastric B-cell lymphomas: a population-based study in Germany. *Ann Oncol* 13:1120–1127.
 87. Luminari S, Cesaretti M, Marcheselli L, Rashid I, Madrigali S, Maiorana A, Federico M. 2010. Decreasing incidence of gastric MALT lymphomas in the era of anti-*Helicobacter pylori* interventions: results from a population-based study on extranodal marginal zone lymphomas. *Annals of Oncology* 21:855–859.
 88. Capelle LG, de Vries AC, Looman CWN, Casparie MK, Boot H, Meijer GA, Kuipers EJ. 2008. Gastric MALT lymphoma: Epidemiology and high adenocarcinoma risk in a nation-wide study. *European Journal of Cancer* 44:2470–2476.
 89. Matysiak-Budnik T, Jamet P, Ruskoné-Fourmestreaux A, de Mascarel A, Velten M, Maynadié M, Woronoff A-S, Trétarre B, Marrer E, Delafosse P, Ligier K, Lapôtre

- Ledoux B, Daubisse L, Bouzid L, Orazio S, Cowppli-Bony A, Monnereau A. 2019. Gastric MALT lymphoma in a population-based study in France: clinical features, treatments and survival. *Aliment Pharmacol Ther* 50:654–663.
90. Delchier J-C. 2003. [Gastric MALT lymphoma, a malignancy potentially curable by eradication of *Helicobacter pylori*]. *Gastroenterol Clin Biol* 27:453–458.
 91. Blazquez M, Haioun C, Chaumette MT, Gaulard P, Reyes F, Soulé JC, Delchier JC. 1992. Low grade B cell mucosa associated lymphoid tissue lymphoma of the stomach: clinical and endoscopic features, treatment, and outcome. *Gut* 33:1621–1625.
 92. Fischbach W, Dragosics B, Kolve-Goebeler M, Ohmann C, Greiner A, Yang Q, Böhm S, Verreet P, Horstmann O, Busch M, Dühmke E, Müller-Hermelink H, Wilms K. 2000. Primary gastric B-Cell lymphoma: Results of a prospective multicenter study. *Gastroenterology* 119:1191–1202.
 93. Shirwaikar Thomas A, Schwartz M, Quigley E. 2019. Gastrointestinal lymphoma: the new mimic. *BMJ Open Gastroenterol* 6:e000320.
 94. Kolve M, Fischbach W, Greiner A, Wilms K. 1999. Differences in endoscopic and clinicopathological features of primary and secondary gastric non-Hodgkin's lymphoma. *Gastrointestinal Endoscopy* 49:307–315.
 95. Zullo A, Hassan C, Ridola L, Repici A, Manta R, Andriani A. 2014. Gastric MALT lymphoma: old and new insights. *Ann Gastroenterol* 27:27–33.
 96. Montalbàn C, Castrillo MJ, Abraira V, Serrano M, Bellas C, Piris MA, Carrion R, Cruz MA, Laraña JG, Menarguez J, Gomez-Marcos F, Rivas C. 1995. Gastric B-cell mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma. Clinicopathological study and evaluation of the prognostic factors in 143 patients. *Annals of Oncology* 6:355–362.
 97. Zullo A, Hassan C, Cristofari F, Perri F, Morini S. 2010. Gastric low-grade mucosal-associated lymphoid tissue-lymphoma: *Helicobacter pylori* and beyond. *World J Gastrointest Oncol* 2:181–186.
 98. Wotherspoon AC, Doglioni C, Isaacson PG. 1992. Low-grade gastric B-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT): a multifocal disease. *Histopathology* 20:29–34.
 99. Ruskone-Fourmestraux A, Fischbach W, Aleman BMP, Boot H, Du MQ, Megraud F, Montalbàn C, Raderer M, Savio A, Wotherspoon A, on behalf of the EGILS group. 2011. EGILS consensus report. Gastric extranodal marginal zone B-cell lymphoma of MALT. *Gut* 60:747–758.
 100. Fischbach W. 2014. Gastric MALT lymphoma - update on diagnosis and treatment. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 28:1069–1077.
 101. Bautista-Quach MA, Ake CD, Chen M, Wang J. 2012. Gastrointestinal lymphomas: Morphology, immunophenotype and molecular features. *J Gastrointest Oncol* 3:209–225.

102. Kuid B, Gaparov S, Katiid M, Antica M. Monoclonality in *Helicobacter pylori*-Positive Gastric Biopsies: An Early Detection of Mucosa-Associated Lymphoid Tissue Lymphoma 7.
103. Liu H, Bench AJ, Bacon CM, Payne K, Huang Y, Scott MA, Erber WN, Grant JW, Du M-Q. 2007. A practical strategy for the routine use of BIOMED-2 PCR assays for detection of B- and T-cell clonality in diagnostic haematopathology. *British Journal of Haematology* 138:31–43.
104. Nakamura S, Aoyagi K, Furuse M, Suekane H, Matsumoto T, Yao T, Sakai Y, Fuchigami T, Yamamoto I, Tsuneyoshi M, Fujishima M. 1998. B-cell monoclonality precedes the development of gastric MALT lymphoma in *Helicobacter pylori*-associated chronic gastritis. *Am J Pathol* 152:1271–1279.
105. Trebesius K, Panthel K, Strobel S, Vogt K, Faller G, Kirchner T, Kist M, Heesemann J, Haas R. 2000. Rapid and specific detection of *Helicobacter pylori* macrolide resistance in gastric tissue by fluorescent in situ hybridisation. *Gut* 46:608–614.
106. Bayerdörffer E, Oertel H, Lehn N, Kasper G, Mannes GA, Sauerbruch T, Stolte M. 1989. Topographic association between active gastritis and *Campylobacter pylori* colonisation. *J Clin Pathol* 42:834–839.
107. Lehours P, Ruskone-Fourmestraux A, Lavergne A, Cantet F, Mégraud F, Groupe d'Etude des Lymphomes Digestifs (GELD) for the Fédération Française de Cancérologie Digestive (FFCD). 2003. Which test to use to detect *Helicobacter pylori* infection in patients with low-grade gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma? *Am J Gastroenterol* 98:291–295.
108. Oleastro M, Ménard A, Santos A, Lamouliatte H, Monteiro L, Barthélémy P, Mégraud F. 2003. Real-time PCR assay for rapid and accurate detection of point mutations conferring resistance to clarithromycin in *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol* 41:397–402.
109. Bénéjat L, Ducournau A, Lehours P, Mégraud F. 2018. Real-time PCR for *Helicobacter pylori* diagnosis. The best tools available. *Helicobacter* 23:e12512.
110. Godbole G, Mégraud F, Bessède E. 2020. Review: Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 25:e12735.
111. Dickey W, Kenny BD, McConnell JB. 1996. Effect of proton pump inhibitors on the detection of *Helicobacter pylori* in gastric biopsies. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 10:289–293.
112. Malfertheiner P. 2015. Diagnostic methods for *H. pylori* infection: Choices, opportunities and pitfalls. *United European Gastroenterol J* 3:429–431.
113. Musshoff K. 1977. [Clinical staging classification of non-Hodgkin's lymphomas (author's transl)]. *Strahlentherapie* 153:218–221.

114. Radaszkiewicz T, Dragosics B, Bauer P. 1992. Gastrointestinal malignant lymphomas of the mucosa-associated lymphoid tissue: Factors relevant to prognosis. *Gastroenterology* 102:1628–1638.
115. Zucca E, Copie-Bergman C, Ricardi U, Thieblemont C, Raderer M, Ladetto M, on behalf of the ESMO Guidelines Working Group. 2013. Gastric marginal zone lymphoma of MALT type: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology* 24:vi144–vi148.
116. Schizas D, Ntanasis-Stathopoulos I, Tsilimigras DI, Sioulas AD, Moris D, Spartalis E, Scotinotis I, Papanikolaou IS. 2017. The Role of Endoscopic Ultrasound in the Diagnosis and Management of Primary Gastric Lymphoma. *Gastroenterol Res Pract* 2017.
117. Ruskoné-Fourmestreaux A, Dragosics B, Morgner A, Wotherspoon A, de Jong D. 2003. Paris staging system for primary gastrointestinal lymphomas. *Gut* 52:912–913.
118. Wotherspoon AC, Isaacson PG. 1995. Synchronous adenocarcinoma and low grade B-cell lymphoma of mucosa associated lymphoid tissue (MALT) of the stomach. *Histopathology* 27:325–331.
119. Kaffes A, Hughes L, Hollinshead J, Katelaris P. 2002. Synchronous primary adenocarcinoma, mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma and a stromal tumor in a *Helicobacter pylori*-infected stomach. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 17:1033–1036.
120. Bessède E, Copie-Bergman C, Lehours P, Levy M, Leroy K, Baia M, Riou A, Mégraud F, Delchier J-C, Salles N. 2012. Is Elevated Gastric Tissue NOX2 Associated with Lymphoma of Mucosa-Associated Lymphoid Tissue? *Antioxid Redox Signal* 16:1205–1211.
121. Du M-Q. 2011. MALT lymphoma: many roads lead to nuclear factor- κ b activation. *Histopathology* 58:26–38.
122. Isaacson PG. 2005. Update on MALT lymphomas. *Best Practice & Research Clinical Haematology* 18:57–68.
123. Baens M, Maes B, Steyls A, Geboes K, Marynen P, De Wolf-Peeters C. 2000. The Product of the t(11;18), an API2-MLT Fusion, Marks Nearly Half of Gastric MALT Type Lymphomas without Large Cell Proliferation. *Am J Pathol* 156:1433–1439.
124. Pereira M-I, Medeiros JA. 2014. Role of *Helicobacter pylori* in gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphomas. *World J Gastroenterol* 20:684–698.
125. Ye H. 2003. Variable frequencies of t(11;18)(q21;q21) in MALT lymphomas of different sites: significant association with CagA strains of *H pylori* in gastric MALT lymphoma. *Blood* 102:1012–1018.
126. Chen T, Cen L, Xiao R, Yang J, Jiang N, Lu X, Zhang Y, Lu J. 2012. [Prognostic value of t(11; 18) (q21; q21) for gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma]. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi* 29:181–183.

127. Liu H, Ye H, Ruskone–Fourmesttraux A, De Jong D, Pileri S, Thiede C, Lavergne A, Boot H, Caletti G, Wündisch T, Molina T, Taal BG, Elena S, Thomas T, Zinzani PL, Neubauer A, Stolte M, Hamoudi RA, Dogan A, Isaacson PG, Du M. 2002. T(11;18) is a marker for all stage gastric MALT lymphomas that will not respond to *H. pylori* eradication. *Gastroenterology* 122:1286–1294.
128. Yeh K-H, Kuo S-H, Chen L-T, Mao T-L, Doong S-L, Wu M-S, Hsu H-C, Tzeng Y-S, Chen C-L, Lin J-T, Cheng A-L. 2005. Nuclear expression of BCL10 or nuclear factor kappa B helps predict *Helicobacter pylori*-independent status of low-grade gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphomas with or without t(11;18)(q21;q21). *Blood* 106:1037–1041.
129. Willis TG, Jadayel DM, Du M-Q, Peng H, Perry AR, Abdul-Rauf M, Price H, Karran L, Majekodunmi O, Wlodarska I, Pan L, Crook T, Hamoudi R, Isaacson PG, Dyer MJS. 1999. Bcl10 Is Involved in t(1;14)(p22;q32) of MALT B Cell Lymphoma and Mutated in Multiple Tumor Types. *Cell* 96:35–45.
130. Zhang Q, Siebert R, Yan M, Hinzmann B, Cui X, Xue L, Rakestraw KM, Naeve CW, Beckmann G, Weisenburger DD, Sanger WG, Nowotny H, Vesely M, Callet-Bauchu E, Salles G, Dixit VM, Rosenthal A, Schlegelberger B, Morris SW. 1999. Inactivating mutations and overexpression of BCL10, a caspase recruitment domain-containing gene, in MALT lymphoma with t(1;14)(p22;q32). *Nat Genet* 22:63–68.
131. Ruland J, Duncan GS, Elia A, del Barco Barrantes I, Nguyen L, Plyte S, Millar DG, Bouchard D, Wakeham A, Ohashi PS, Mak TW. 2001. Bcl10 Is a Positive Regulator of Antigen Receptor-Induced Activation of NF- κ B and Neural Tube Closure. *Cell* 104:33–42.
132. Achuthan R, Bell SM, Leek JP, Roberts P, Horgan K, Markham AF, Selby PJ, MacLennan KA. 2000. Novel translocation of the BCL10 gene in a case of mucosa associated lymphoid tissue lymphoma. *Genes, Chromosomes and Cancer* 29:347–349.
133. Farinha P, Gascoyne RD. 2016. Molecular Pathogenesis of Mucosa-Associated Lymphoid Tissue Lymphoma. *Journal of Clinical Oncology* <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.05.011>.
134. Sagaert X, De Wolf-Peeters C, Noels H, Baens M. 2007. The pathogenesis of MALT lymphomas: where do we stand? *Leukemia* 21:389–396.
135. Wlodarska I, Veyt E, De Paepe P, Vandenberghe P, Nooijen P, Theate I, Michaux L, Sagaert X, Marynen P, Hagemeyer A, De Wolf-Peeters C. 2005. FOXP1, a gene highly expressed in a subset of diffuse large B-cell lymphoma, is recurrently targeted by genomic aberrations. *Leukemia* 19:1299–1305.
136. Wotherspoon AC, Finn TM, Isaacson PG. 1995. Trisomy 3 in Low-Grade B-Cell Lymphomas of Mucosa-Associated Lymphoid Tissue. *Blood* 85:2000–2004.
137. Raderer M, Streubel B, Wöhrer S, Häfner M, Chott A. 2006. Successful antibiotic treatment of *Helicobacter pylori* negative gastric mucosa associated lymphoid tissue lymphomas. *Gut* 55:616–618.

138. Raderer M, Chott A, Drach J, Montalban C, Dragosics B, Jäger U, Püspök A, Österreicher C, Zielinski CC. 2002. Chemotherapy for management of localised high-grade gastric B-cell lymphoma: how much is necessary? *Annals of Oncology* 13:1094–1098.
139. Zullo A, Hassan C, Cristofari F, Andriani A, De Francesco V, Ierardi E, Tomao S, Stolte M, Morini S, Vaira D. 2010. Effects of *Helicobacter pylori* Eradication on Early Stage Gastric Mucosa-Associated Lymphoid Tissue Lymphoma. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 8:105–110.
140. Fischbach W. 2010. Long-term follow-up of gastric lymphoma after stomach conserving treatment. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 24:71–77.
141. Kuo S-H, Yeh K-H, Wu M-S, Lin C-W, Hsu P-N, Wang H-P, Chen L-T, Cheng A-L. 2012. *Helicobacter pylori* eradication therapy is effective in the treatment of early-stage H pylori-positive gastric diffuse large B-cell lymphomas. *Blood* 119:4838–4844.
142. Cavanna L, Pagani R, Seghini P, Zangrandi A, Paties C. 2008. High grade B-cell gastric lymphoma with complete pathologic remission after eradication of *Helicobacter pylori* infection: report of a case and review of the literature. *World J Surg Oncol* 6:35.
143. Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain CA, Gisbert JP, Kuipers EJ, Axon AT, Bazzoli F, Gasbarrini A, Atherton J, Graham DY, Hunt R, Moayyedi P, Rokkas T, Rugge M, Selgrad M, Suerbaum S, Sugano K, El-Omar EM. 2017. Management of *Helicobacter pylori* infection—the Maastricht V/Florence Consensus Report. *Gut* 66:6–30.
144. [Helicobacter_fiche_pertinence_traitement.pdf](#).
145. Kuo S-H, Chen L-T, Wu M-S, Lin C-W, Yeh K-H, Kuo K-T, Yeh P-Y, Tzeng Y-S, Wang H-P, Hsu P-N, Lin J-T, Cheng A-L. 2008. Long-term follow-up of gastrectomized patients with mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma: need for a revisit of surgical treatment. *Ann Surg* 247:265–269.
146. Yoon SS, Coit DG, Portlock CS, Karpeh MS. 2004. The Diminishing Role of Surgery in the Treatment of Gastric Lymphoma. *Ann Surg* 240:28–37.
147. Tsang RW, Gospodarowicz MK, Pintilie M, Wells W, Hodgson DC, Sun A, Crump M, Patterson BJ. 2016. Localized Mucosa-Associated Lymphoid Tissue Lymphoma Treated With Radiation Therapy Has Excellent Clinical Outcome. *Journal of Clinical Oncology* <https://doi.org/10.1200/JCO.2003.06.085>.
148. Tomita N, Kodama F, Motomura S, Itoh S, Ohshima R, Hyo R, Kawano T, Hashimoto C, Takemura S, Yamazaki E, Fujita H, Fujisawa S, Ogawa K, Kanamori H, Ishigatsubo Y. 2008. Adjuvant radiotherapy to an initial bulky mass in diffuse large B-cell lymphoma: lack of survival benefit. *International Journal of Laboratory Hematology* 30:53–57.
149. Ruskoné-Fourmestraux A, Matysiak-Budnik T, Fabiani B, Cervera P, Brixi H, Le Malicot K, Nion-Larmurier I, Fléjou J-F, Hennequin C, Quéro L. 2015. Exclusive

- moderate-dose radiotherapy in gastric marginal zone B-cell MALT lymphoma: Results of a prospective study with a long term follow-up. *Radiotherapy and Oncology* 117:178–182.
150. Salar A, Domingo-Domenech E, Estany C, Canales MA, Gallardo F, Servitje O, Fraile G, Montalbán C. 2009. Combination therapy with rituximab and intravenous or oral fludarabine in the first-line, systemic treatment of patients with extranodal marginal zone B-cell lymphoma of the mucosa-associated lymphoid tissue type. *Cancer* 115:5210–5217.
 151. Lévy M, Copie-Bergman C, Molinier-Frenkel V, Riou A, Haioun C, Gaulard P, Delfau-Larue M-H, Sobhani I, Leroy K, Delchier J-C. 2010. Treatment of t(11;18)-positive gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma with rituximab and chlorambucil: clinical, histological, and molecular follow-up. *Leuk Lymphoma* 51:284–290.
 152. Zucca E, Conconi A, Laszlo D, López-Guillermo A, Bouabdallah R, Coiffier B, Sebban C, Jardin F, Vitolo U, Morschhauser F, Pileri SA, Copie-Bergman C, Campo E, Jack A, Floriani I, Johnson P, Martelli M, Cavalli F, Martinelli G, Thieblemont C. 2013. Addition of rituximab to chlorambucil produces superior event-free survival in the treatment of patients with extranodal marginal-zone B-cell lymphoma: 5-year analysis of the IELSG-19 Randomized Study. *J Clin Oncol* 31:565–572.
 153. Copie-Bergman C, Wotherspoon AC, Capella C, Motta T, Pedrinis E, Pileri SA, Bertoni F, Conconi A, Zucca E, Ponzoni M, Ferreri AJM. 2013. Gela histological scoring system for post-treatment biopsies of patients with gastric MALT lymphoma is feasible and reliable in routine practice. *British Journal of Haematology* 160:47–52.
 154. Asaka M, Dragosics BA. 2004. *Helicobacter pylori* and Gastric Malignancies. *Helicobacter* 9:35–41.
 155. Wu M-S, Chen C-J, Lin J-T. 2005. Host-Environment Interactions: Their Impact on Progression from Gastric Inflammation to Carcinogenesis and on Development of New Approaches to Prevent and Treat Gastric Cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14:1878–1882.
 156. Zhang L, Rana I, Shaffer RM, Taioli E, Sheppard L. 2019. Exposure to Glyphosate-Based Herbicides and Risk for Non-Hodgkin Lymphoma: A Meta-Analysis and Supporting Evidence. *Mutat Res* 781:186–206.
 157. Fagioli F, Rigolin GM, Cuneo A, Scapoli G, Spanedda R, Cavazzini P, Castoldi G. 1994. Primary gastric lymphoma: distribution and clinical relevance of different epidemiological factors. *Haematologica* 79:213–217.
 158. Smith SM. 2014. Role of Toll-like receptors in *Helicobacter pylori* infection and immunity. *World J Gastrointest Pathophysiol* 5:133–146.
 159. Salama NR, Hartung ML, Müller A. 2013. Life in the human stomach: persistence strategies of the bacterial pathogen *Helicobacter pylori*. *Nat Rev Microbiol* 11:385–399.

160. Pérez-Pérez GI, Shepherd VL, Morrow JD, Blaser MJ. 1995. Activation of human THP-1 cells and rat bone marrow-derived macrophages by *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide. *Infect Immun* 63:1183–1187.
161. Andersen-Nissen E, Smith KD, Strobe KL, Barrett SLR, Cookson BT, Logan SM, Aderem A. 2005. Evasion of Toll-like receptor 5 by flagellated bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:9247–9252.
162. Chonwerawong M, Ferrand J, Chaudhry HM, Higgins C, Tran LS, Lim SS, Walker MM, Bhathal PS, Dev A, Moore GT, Sievert W, Jenkins BJ, D’Elios MM, Philpott DJ, Kufer TA, Ferrero RL. 2020. Innate Immune Molecule NLRC5 Protects Mice From *Helicobacter*-induced Formation of Gastric Lymphoid Tissue. *Gastroenterology* 159:169-182.e8.
163. Yoshihama S, Roszik J, Downs I, Meissner TB, Vijayan S, Chapuy B, Sidiq T, Shipp MA, Lizee GA, Kobayashi KS. 2016. NLRC5/MHC class I transactivator is a target for immune evasion in cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113:5999–6004.
164. Li YY, Chung GTY, Lui VWY, To K-F, Ma BBY, Chow C, Woo JK S, Yip KY, Seo J, Hui EP, Mak MKF, Rusan M, Chau NG, Or YYY, Law MHN, Law PPY, Liu ZWY, Ngan H-L, Hau P-M, Verhoeft KR, Poon PHY, Yoo S-K, Shin J-Y, Lee S-D, Lun SWM, Jia L, Chan AWH, Chan JYK, Lai PBS, Fung C-Y, Hung S-T, Wang L, Chang AMV, Chiosea SI, Hedberg ML, Tsao S-W, van Hasselt AC, Chan ATC, Grandis JR, Hammerman PS, Lo K-W. 2017. Exome and genome sequencing of nasopharynx cancer identifies NF- κ B pathway activating mutations. *Nat Commun* 8.
165. Fischer W, Püls J, Buhrdorf R, Gebert B, Odenbreit S, Haas R. 2001. Systematic mutagenesis of the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island: essential genes for CagA translocation in host cells and induction of interleukin-8. *Molecular Microbiology* 42:1337–1348.
166. Ferreira-Chagas B, Lasne G, Dupouy S, Gallois A, Morgner A, Ménard A, Mégraud F, Lehours P. 2007. In Vitro Proinflammatory Properties of *Helicobacter pylori* Strains Causing Low-Grade Gastric MALT Lymphoma. *Helicobacter* 12:616–617.
167. Lin W-C, Tsai H-F, Kuo S-H, Wu M-S, Lin C-W, Hsu P-I, Cheng A-L, Hsu P-N. Translocation of *Helicobacter pylori* CagA into Human B Lymphocytes, the Origin of Mucosa-Associated Lymphoid Tissue Lymphoma. *Cancer Research* 10.
168. Robinson K, Argent RH, Atherton JC. 2007. The inflammatory and immune response to *Helicobacter pylori* infection. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 21:237–259.
169. Hazell SL, Evans DJ, Graham DY. 1991. *Helicobacter pylori* catalase. *J Gen Microbiol* 137:57–61.
170. 1994. Genetic organization and enzymatic activity of a superoxide dismutase from the microaerophilic human pathogen, *Helicobacter pylori*. *Gene* 143:111–116.

171. Gobert AP, McGee DJ, Akhtar M, Mendz GL, Newton JC, Cheng Y, Mobley HLT, Wilson KT. 2001. *Helicobacter pylori* arginase inhibits nitric oxide production by eukaryotic cells: A strategy for bacterial survival. Proc Natl Acad Sci U S A 98:13844–13849.
172. Allen L-AH, Beecher BR, Lynch JT, Rohner OV, Wittine LM. 2005. *Helicobacter pylori* Disrupts NADPH Oxidase Targeting in Human Neutrophils to Induce Extracellular Superoxide Release. The Journal of Immunology 174:3658–3667.
173. Ramarao N, Meyer TF. 2001. *Helicobacter pylori* Resists Phagocytosis by Macrophages: Quantitative Assessment by Confocal Microscopy and Fluorescence-Activated Cell Sorting. Infect Immun 69:2604–2611.
174. Schwartz JT, Allen L-AH. 2006. Role of urease in megasome formation and *Helicobacter pylori* survival in macrophages. J Leukoc Biol 79:1214–1225.
175. Zhao Y, Lu F, Ye J, Ji M, Pang Y, Wang Y, Wang L, Li G, Sun T, Li J, Ma D, Ji C. 2020. Myeloid-Derived Suppressor Cells and $\gamma\delta$ T17 Cells Contribute to the Development of Gastric MALT Lymphoma in *H. felis*-Infected Mice. Front Immunol 10.
176. Siddiqui ST, Naz E, Danish F, Mirza T, Aziz S, Ali A. 2011. Frequency of *Helicobacter pylori* in biopsy proven gastritis and its association with lymphoid follicle formation. J Pak Med Assoc 61:4.
177. Genta RM, Wentzell H, Graham DY. 1993. Gastric Lymphoid Follicles in *Helicobacter pylori* Infection: HUMAN PATHOLOGY 24:7.
178. Portal-Celhay C, Perez-Perez GI. 2006. Immune responses to *Helicobacter pylori* colonization: mechanisms and clinical outcomes. Clinical Science 110:305–314.
179. O’Keeffe J, Moran AP. 2008. Conventional, Regulatory, and Unconventional T Cells in the Immunologic Response to *Helicobacter pylori*. Helicobacter 13:1–19.
180. Wilke CM, Bishop K, Fox D, Zou W. 2011. Deciphering the role of Th17 cells in human disease. Trends Immunol 32:603–611.
181. Guindi M. 2000. Role of activated host T cells in the promotion of MALT lymphoma growth. Seminars in Cancer Biology 10:341–344.
182. Koulis A, Diss T, Isaacson PG, Dogan A. 1997. Characterization of tumor-infiltrating T lymphocytes in B-cell lymphomas of mucosa-associated lymphoid tissue. Am J Pathol 151:1353–1360.
183. Greiner A, Knörr C, Qin Y, Sebald W, Schimpl A, Banchereau J, Müller-Hermelink HK. 1997. Low-grade B cell lymphomas of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT-type) require CD40-mediated signaling and Th2-type cytokines for in vitro growth and differentiation. Am J Pathol 150:1583–1593.
184. Craig VJ, Cogliatti SB, Arnold I, Gerke C, Balandat J-E, Wündisch T, Müller A. 2010. B-cell receptor signaling and CD40 ligand-independent T cell help cooperate in *Helicobacter*-induced MALT lymphomagenesis. Leukemia 24:1186–1196.

185. Mueller A, O'rourke J, Chu P, Chu A, Dixon MF, Bouley DM, Lee A, Falkow S. 2005. The role of antigenic drive and tumor-infiltrating accessory cells in the pathogenesis of *helicobacter*-induced mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Am J Pathol* 167:797–812.
186. Lohoff M, Röllinghoff M, Sommer F. 2000. *Helicobacter pylori* gastritis: a Th1 mediated disease? *Journal of Biotechnology* 83:33–36.
187. D'Elis MM, Amedei A, Del Prete G. 2003. *Helicobacter pylori* antigen-specific T-cell responses at gastric level in chronic gastritis, peptic ulcer, gastric cancer and low-grade mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma. *Microbes and Infection* 5:723–730.
188. Chrisment D, Dubus P, Chambonnier L, Hocès de la Guardia A, Sifré E, Giese A, Capone M, Khairallah C, Costet P, Rousseau B, Hubert C, Burlen-Defranoux O, Varon C, Bandeira A, Mégraud F, Lehours P. 2014. Neonatal Thymectomy Favors *Helicobacter pylori*-Promoted Gastric Mucosa-Associated Lymphoid Tissue Lymphoma Lesions in BALB/c Mice. *The American Journal of Pathology* 184:2174–2184.
189. Floch P, Laur AM, Korolik V, Chrisment D, Cappellen D, Idrissi Y, Dubus P, Mégraud F, Lehours P. 2015. Characterisation of inflammatory processes in *Helicobacter pylori*-induced gastric lymphomagenesis in a mouse model. *Oncotarget* 6:34525–34536.
190. Craig VJ, Arnold I, Gerke C, Huynh MQ, Wündisch T, Neubauer A, Renner C, Falkow S, Müller A. 2010. Gastric MALT lymphoma B cells express polyreactive, somatically mutated immunoglobulins. *Blood* 115:581–591.
191. Bergman MP, D'Elis MM. 2010. Cytotoxic T Cells in *H. pylori*-Related Gastric Autoimmunity and Gastric Lymphoma. *J Biomed Biotechnol* 2010.
192. D'Elis MM, Amedei A, Manghetti M, Costa F, Baldari CT, Quazi AS, Telford JL, Romagnani S, del Prete G. 1999. Impaired T-cell regulation of B-cell growth in *Helicobacter pylori*-related gastric low-grade MALT lymphoma. *Gastroenterology* 117:1105–1112.
193. Raghavan S, Suri-Payer E, Holmgren J. 2004. Antigen-Specific In Vitro Suppression of Murine *Helicobacter pylori*-Reactive Immunopathological T Cells by CD4+CD25+ Regulatory T Cells. *Scandinavian Journal of Immunology* 60:82–88.
194. Raghavan S, Fredriksson M, Svennerholm A-M, Holmgren J, Suri-Payer E. 2003. Absence of CD4+CD25+ regulatory T cells is associated with a loss of regulation leading to increased pathology in *Helicobacter pylori*-infected mice. *Clin Exp Immunol* 132:393–400.
195. Rad R, Brenner L, Bauer S, Schwendy S, Layland L, da Costa CP, Reindl W, Dossumbekova A, Friedrich M, Saur D, Wagner H, Schmid RM, Prinz C. 2006. CD25+/Foxp3+ T Cells Regulate Gastric Inflammation and *Helicobacter pylori* Colonization In Vivo. *Gastroenterology* 131:525–537.

196. Laur AM, Floch P, Chambonnier L, Benejat L, Korolik V, Giese A, Dubus P, Mégraud F, Bandeira A, Lehours P. 2015. Regulatory T cells may participate in *Helicobacter pylori* persistence in gastric MALT lymphoma: lessons from an animal model. *Oncotarget* 7:3394–3402.
197. Iwaya Y, Kobayashi M, Momose M, Hiraoka N, Sakai Y, Akamatsu T, Tanaka E, Ohtani H, Fukuda M, Nakayama J. 2013. High Levels of FOXP3+ Regulatory T Cells in Gastric MALT Lymphoma Predict Responsiveness to *Helicobacter pylori* Eradication. *Helicobacter* 18:356–362.
198. García M, Bellosillo B, Sánchez-González B, García-Payarols F, Seoane A, Ferrer AM, Gimeno E, Barranco LE, Torner A, Solé F, Besses C, Serrano S, Salar A. 2012. Study of Regulatory T-Cells in Patients with Gastric Malt Lymphoma: Influence on Treatment Response and Outcome. *PLoS One* 7.
199. Höpken UE, Rehm A. 2012. Homeostatic chemokines guide lymphoma cells to tumor growth-promoting niches within secondary lymphoid organs. *J Mol Med (Berl)* 90:1237–1245.
200. Mazzucchelli L, Blaser A, Kappeler A, Schärli P, Laissue JA, Baggiolini M, Ugucioni M. 1999. BCA-1 is highly expressed in *Helicobacter pylori*-induced mucosa-associated lymphoid tissue and gastric lymphoma. *J Clin Invest* 104:R49–R54.
201. Winter S, Loddenkemper C, Aebischer A, Räbel K, Hoffmann K, Meyer TF, Lipp M, Höpken UE. 2010. The chemokine receptor CXCR5 is pivotal for ectopic mucosa-associated lymphoid tissue neogenesis in chronic *Helicobacter pylori*-induced inflammation. *J Mol Med (Berl)* 88:1169–1180.
202. Yamamoto K, Nishiumi S, Yang L, Klimatcheva E, Pandina T, Takahashi S, Matsui H, Nakamura M, Zauderer M, Yoshida M, Azuma T. 2014. Anti-CXCL13 antibody can inhibit the formation of gastric lymphoid follicles induced by *Helicobacter* infection. *Mucosal Immunol* 7:1244–1254.
203. Ohshima K, Suefuji H, Karube K, Hamasaki M, Hatano B, Tutiya T, Yamaguchi T, Suzuki K, Suzumiya J, Kikuchi M. 2003. Expression of Chemokine Receptor CXCR3 and its Ligand, Mig, in Gastric and Thyroid Marginal Zone Lymphomas. Possible Migration and Autocrine Mechanism. *Leukemia & Lymphoma* 44:329–336.
204. Suefuji H, Ohshima K, Karube K, Kawano R, Nabeshima K, Suzumiya J, Hayabuchi N, Kikuchi M. 2005. CXCR3-positive B cells found at elevated frequency in the peripheral blood of patients with MALT lymphoma are attracted by MIG and belong to the lymphoma clone. *International Journal of Cancer* 114:896–901.
205. Yamamoto H, Nakamura T, Matsuo K, Tajika M, Kawai H, Ohmiya N, Niwa Y, Goto H, Nakamura S. 2008. Significance of CXCR3 expression in gastric low-grade B-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue type for predicting responsiveness to *Helicobacter pylori* eradication. *Cancer Science* 99:1769–1773.
206. Deutsch AJA, Steinbauer E, Hofmann NA, Strunk D, Gerlza T, Beham-Schmid C, Schaidler H, Neumeister P. 2013. Chemokine receptors in gastric MALT lymphoma:

- loss of CXCR4 and upregulation of CXCR7 is associated with progression to diffuse large B-cell lymphoma. *Mod Pathol* 26:182–194.
207. Planelles L, Medema JP, Hahne M, Hardenberg G. 2008. The expanding role of APRIL in cancer and immunity. *Curr Mol Med* 8:829–844.
 208. Munari F, Lonardi S, Cassatella MA, Doglioni C, Cangì MG, Amedei A, Facchetti F, Eishi Y, Ruge M, Fassan M, de Bernard M, D'Elis MM, Vermi W. 2011. Tumor-associated macrophages as major source of APRIL in gastric MALT lymphoma. *Blood* 117:6612–6616.
 209. Floch P, Izotte J, Guillemaud J, Sifré E, Costet P, Rousseau B, Laur AM, Giese A, Korolik V, Mégraud F, Dubus P, Hahne M, Lehours P. 2017. A New Animal Model of Gastric Lymphomagenesis: APRIL Transgenic Mice Infected by *Helicobacter* Species. *The American Journal of Pathology* 187:1473–1484.
 210. Stein JV, López-Fraga M, Elustondo FA, Carvalho-Pinto CE, Rodríguez D, Gómez-Caro R, de Jong J, Martínez-A C, Medema JP, Hahne M. 2002. APRIL modulates B and T cell immunity. *J Clin Invest* 109:1587–1598.
 211. WADSTROM T. Two-year follow-up of *Helicobacter pylori* infection in C57BL/6 and Balb/cA mice.
 212. Hellmig S, Fischbach W, Goebeler-Kolve M-E, Fölsch UR, Hampe J, Schreiber S. 2005. Association study of a functional Toll-like receptor 4 polymorphism with susceptibility to gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Leukemia & Lymphoma* 46:869–872.
 213. Rosenstiel P, Hellmig S, Hampe J, Ott S, Till A, Fischbach W, Sahly H, Lucius R, Fölsch UR, Philpott D, Schreiber S. 2006. Influence of polymorphisms in the NOD1/CARD4 and NOD2/CARD15 genes on the clinical outcome of *Helicobacter pylori* infection. *Cellular Microbiology* 8:1188–1198.
 214. Kawahara Y, Mizuno M, Yoshino T, Yokota K, Oguma K, Okada H, Fujiki S, Shiratori Y. 2005. HLA-DQA1*0103-DQB1*0601 Haplotype and *Helicobacter pylori*-Positive Gastric Mucosa-Associated Lymphoid Tissue Lymphoma. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 3:865–868.
 215. Rollinson S, Levene AP, Mensah FK, Roddam PL, Allan JM, Diss TC, Roman E, Jack A, MacLennan K, Dixon MF, Morgan GJ. 2003. Gastric marginal zone lymphoma is associated with polymorphisms in genes involved in inflammatory response and antioxidative capacity. *Blood* 102:1007–1011.
 216. Wu M-S, Shun C-T, Huang S-P, Cheng A-L, Chen L-T, Lin J-T. 2004. Effect of interleukin-1beta and glutathione S-transferase genotypes on the development of gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Haematologica* 89:1015–1017.
 217. Liao F, Hsu Y-C, Kuo S-H, Yang Y-C, Chen J-P, Hsu P-N, Lin C-W, Chen L-T, Cheng A-L, Fann CSJ, Lin J-T, Wu M-S. 2014. Genetic polymorphisms and tissue expression of

- interleukin-22 associated with risk and therapeutic response of gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Blood Cancer J* 4:eXX.
218. Wu M-S, Chen L-T, Shun C-T, Huang S-P, Chiu H-M, Wang H-P, Lin M-T, Cheng A-L, Lin J-T. 2004. Promoter polymorphisms of tumor necrosis factor- α are associated with risk of gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *International Journal of Cancer* 110:695–700.
 219. Hellmig S, Fischbach W, Goebeler-Kolve M-E, Fölsch U, Hampe J, Schreiber S. 2005. A Functional Promotor Polymorphism of TNF- α Is Associated with Primary Gastric B-Cell Lymphoma. *American Journal of Gastroenterology* 100:2644–2649.
 220. Cheng T-Y, Lin J-T, Chen L-T, Shun C-T, Wang H-P, Lin M-T, Wang T-E, Cheng A-L, Wu M-S. 2016. Association of T-Cell Regulatory Gene Polymorphisms With Susceptibility to Gastric Mucosa-Associated Lymphoid Tissue Lymphoma. *Journal of Clinical Oncology* <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.05.5434>.
 221. Kuo S-H, Wu M-S, Yeh K-H, Lin C-W, Hsu P-N, Chen L-T, Cheng A-L. 2019. Novel Insights of Lymphomagenesis of *Helicobacter pylori*-Dependent Gastric Mucosa-Associated Lymphoid Tissue Lymphoma. *Cancers (Basel)* 11.
 222. Jones PL, Veenstra GJ, Wade PA, Vermaak D, Kass SU, Landsberger N, Strouboulis J, Wolffe AP. 1998. Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat Genet* 19:187–191.
 223. Ando T, Yoshida T, Enomoto S, Asada K, Tatematsu M, Ichinose M, Sugiyama T, Ushijima T. 2009. DNA methylation of microRNA genes in gastric mucosae of gastric cancer patients: its possible involvement in the formation of epigenetic field defect. *Int J Cancer* 124:2367–2374.
 224. Arribas AJ, Bertoni F. 2017. Methylation patterns in marginal zone lymphoma. *Best Practice & Research Clinical Haematology* 30:24–31.
 225. Kim YS, Kim JS, Jung HC, Lee CH, Kim CW, Song IS, Kim CY. 2002. Regression of low-grade gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma after eradication of *Helicobacter pylori*: possible association with p16 hypermethylation. *J Gastroenterol* 37:17–22.
 226. Min KO, Seo EJ, Kwon HJ, Lee EJ, Kim WI, Kang CS, Kim K-M. 2006. Methylation of p16INK4A and p57KIP2 are involved in the development and progression of gastric MALT lymphomas. *Mod Pathol* 19:141–148.
 227. Park S, Kim K-M, Kim JJ, Lee J-H, Rhee J-C, Ko Y-H. 2008. Methylation of p16INK4A and Mitotic Arrest Defective Protein 2 (MAD2) Genes in Gastric Marginal-Zone B-Cell Lymphomas. *AHA* 120:217–224.
 228. Toyota M, Ahuja N, Ohe-Toyota M, Herman JG, Baylin SB, Issa J-PJ. 1999. CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:8681–8686.

229. Kaneko Y, Sakurai S, Hironaka M, Sato S, Oguni S, Sakuma Y, Sato K, Sugano K, Saito K. 2003. Distinct methylated profiles in *Helicobacter pylori* dependent and independent gastric MALT lymphomas. *Gut* 52:641–646.
230. Kondo T, Oka T, Sato H, Shinnou Y, Washio K, Takano M, Morito T, Takata K, Ohara N, Ouchida M, Shimizu K, Yoshino T. 2009. Accumulation of aberrant CpG hypermethylation by *Helicobacter pylori* infection promotes development and progression of gastric MALT lymphoma. *International Journal of Oncology* 35:547–557.
231. MacFarlane L-A, Murphy PR. 2010. MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer. *Curr Genomics* 11:537–561.
232. Bartels CL, Tsongalis GJ. 2010. MicroRNA : nouveaux biomarqueurs des pathologies tumorales. *Annales de Biologie Clinique* 68:263–272.
233. Huang Y, Shen XJ, Zou Q, Wang SP, Tang SM, Zhang GZ. 2011. Biological functions of microRNAs: a review. *J Physiol Biochem* 67:129–139.
234. Sandhu SK, Croce CM, Garzon R. 2011. Micro-RNA Expression and Function in Lymphomas. *Adv Hematol* 2011.
235. Lawrie CH. 2013. MicroRNAs and lymphomagenesis: a functional review. *British Journal of Haematology* 160:571–581.
236. Belair C, Darfeuille F, Staedel C. 2009. *Helicobacter pylori* and gastric cancer: possible role of microRNAs in this intimate relationship. *Clinical Microbiology and Infection* 15:806–812.
237. Zhang Z, Li Z, Li Y, Zang A. 2014. MicroRNA and signaling pathways in gastric cancer. *Cancer Gene Therapy* 21:305–316.
238. Thorns C, Kuba J, Bernard V, Senft A, Szymczak S, Feller AC, Bernd H-W. 2012. Deregulation of a distinct set of microRNAs is associated with transformation of gastritis into MALT lymphoma. *Virchows Archiv* 460:371–377.
239. Gebauer N, Kuba J, Senft A, Schillert A, Bernard V, Thorns C. 2014. MicroRNA-150 Is up-regulated in Extranodal Marginal Zone Lymphoma of MALT Type. *Cancer Genomics Proteomics* 11:51–56.
240. Saito Y, Suzuki H, Tsugawa H, Imaeda H, Matsuzaki J, Hirata K, Hosoe N, Nakamura M, Mukai M, Saito H, Hibi T. 2012. Overexpression of miR-142-5p and miR-155 in Gastric Mucosa-Associated Lymphoid Tissue (MALT) Lymphoma Resistant to *Helicobacter pylori* Eradication. *PLoS One* 7.
241. Fernández C, Bellosillo B, Ferraro M, Seoane A, Sánchez-González B, Pairet S, Pons A, Barranco L, Vela MC, Gimeno E, Colomo L, Besses C, Navarro A, Salar A. 2017. MicroRNAs 142-3p, miR-155 and miR-203 Are Deregulated in Gastric MALT Lymphomas Compared to Chronic Gastritis. *Cancer Genomics Proteomics* 14:75–82.

242. Craig VJ, Cogliatti SB, Rehrauer H, Wündisch T, Müller A. 2011. Epigenetic Silencing of MicroRNA-203 Dysregulates ABL1 Expression and Drives *Helicobacter*-Associated Gastric Lymphomagenesis. *Cancer Res* 71:3616–3624.
243. Zhang Y, Liu A, E M, Quan L, Qu Y, Gu A. 2018. Three novel microRNAs based on microRNA signatures for gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Neoplasma* 65:339–348.
244. Floch P, Capdevielle C, Staedel C, Izotte J, Sifré E, Laur AM, Giese A, Korolik V, Dubus P, Mégraud F, Lehours P. 2017. Deregulation of MicroRNAs in Gastric Lymphomagenesis Induced in the d3Tx Mouse Model of *Helicobacter pylori* Infection. *Front Cell Infect Microbiol* 7.
245. Xiao B, Liu Z, Li B-S, Tang B, Li W, Guo G, Shi Y, Wang F, Wu Y, Tong W-D, Guo H, Mao X-H, Zou Q-M. 2009. Induction of microRNA-155 during *Helicobacter pylori* Infection and Its Negative Regulatory Role in the Inflammatory Response. *J Infect Dis* 200:916–925.
246. Fassi Fehri L, Koch M, Belogolova E, Khalil H, Bolz C, Kalali B, Mollenkopf HJ, Beigier-Bompadre M, Karlas A, Schneider T, Churin Y, Gerhard M, Meyer TF. 2010. *Helicobacter pylori* Induces miR-155 in T Cells in a cAMP-Foxp3-Dependent Manner. *PLoS One* 5.
247. Matsushima K, Isomoto H, Inoue N, Nakayama T, Hayashi T, Nakayama M, Nakao K, Hirayama T, Kohno S. 2011. MicroRNA signatures in *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosa. *International Journal of Cancer* 128:361–370.
248. Eis PS, Tam W, Sun L, Chadburn A, Li Z, Gomez MF, Lund E, Dahlberg JE. 2005. Accumulation of miR-155 and BIC RNA in human B cell lymphomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:3627–3632.
249. Rai D, Karanti S, Jung I, Dahia PLM, Aguiar RCT. 2008. Coordinated Expression of MicroRNA-155 and Predicted Target Genes in Diffuse Large B-cell Lymphoma. *Cancer Genet Cytogenet* 181:8–15.
250. Musilova K, Mraz M. 2015. MicroRNAs in B-cell lymphomas: how a complex biology gets more complex. *Leukemia* 29:1004–1017.
251. Hocès de la Guardia A, Staedel C, Kaafarany I, Clément A, Roubaud Baudron C, Mégraud F, Lehours P. 2013. Inflammatory cytokine and microRNA responses of primary human dendritic cells cultured with *Helicobacter pylori* strains. *Front Microbiol* 4:236.
252. Wang J, Deng Z, Wang Z, Wu J, Gu T, Jiang Y, Li G. 2016. MicroRNA-155 in exosomes secreted from *helicobacter pylori* infection macrophages immunomodulates inflammatory response. *Am J Transl Res* 8:3700–3709.
253. Koch M, Mollenkopf H-J, Klemm U, Meyer TF. 2012. Induction of microRNA-155 is TLR- and type IV secretion system-dependent in macrophages and inhibits DNA-damage induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:E1153–E1162.

254. Wan J, Xia L, Xu W, Lu N. 2016. Expression and Function of miR-155 in Diseases of the Gastrointestinal Tract. *Int J Mol Sci* 17.
255. O'Connell RM, Chaudhuri AA, Rao DS, Baltimore D. 2009. Inositol phosphatase SHIP1 is a primary target of miR-155. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:7113–7118.
256. Huang X, Shen Y, Liu M, Bi C, Jiang C, Iqbal J, McKeithan TW, Chan WC, Ding S-J, Fu K. 2012. Quantitative Proteomics Reveals that miR-155 Regulates the PI3K-AKT Pathway in Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Am J Pathol* 181:26–33.
257. Tomasini R, Seux M, Nowak J, Bontemps C, Carrier A, Dagorn J-C, Pébusque M-J, Iovanna JL, Dusetti NJ. 2005. TP53INP1 is a novel p73 target gene that induces cell cycle arrest and cell death by modulating p73 transcriptional activity. *Oncogene* 24:8093–8104.
258. Wu SJ, Chen J, Wu B, Wang YJ, Guo KY. 2018. MicroRNA-150 enhances radiosensitivity by inhibiting the AKT pathway in NK/T cell lymphoma. *J Exp Clin Cancer Res* 37.
259. He Y, Jiang X, Chen J. 2014. The role of miR-150 in normal and malignant hematopoiesis. *Oncogene* 33:3887–3893.
260. Wu Q, Jin H, Yang Z, Luo G, Lu Y, Li K, Ren G, Su T, Pan Y, Feng B, Xue Z, Wang X, Fan D. 2010. MiR-150 promotes gastric cancer proliferation by negatively regulating the pro-apoptotic gene EGR2. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 392:340–345.
261. Blosse A, Levy M, Robe C, Staedel C, Copie-Bergman C, Lehours P. 2019. Dereglulation of miRNA in *Helicobacter pylori*-Induced Gastric MALT Lymphoma: From Mice to Human. *J Clin Med* 8.
262. Sun M, Liu X, Li J, Yang J, Zhang E, Yin D, Liu Z, Zhou J, Ding Y, Li S, Wang Z, Cao X, De W. 2012. MiR-196a Is Upregulated in Gastric Cancer and Promotes Cell Proliferation by Downregulating p27kip1. *Mol Cancer Ther* 11:842–852.
263. Liu Y, Zhang W, Liu K, Liu S, Ji B, Wang Y. 2016. miR-138 suppresses cell proliferation and invasion by inhibiting SOX9 in hepatocellular carcinoma. *Am J Transl Res* 8:2159–2168.
264. Qu M, Zhu Y, Jin M. 2018. MicroRNA-138 inhibits SOX12 expression and the proliferation, invasion and migration of ovarian cancer cells. *Exp Ther Med* 16:1629–1638.
265. Tang X, Jiang J, Zhu J, He N, Tan J. 2019. HOXA4-regulated miR-138 suppresses proliferation and gefitinib resistance in non-small cell lung cancer. *Mol Genet Genomics* 294:85–93.
266. You C, Jin L, Xu Q, Shen B, Jiao X, Huang X. 2019. Expression of miR-21 and miR-138 in colon cancer and its effect on cell proliferation and prognosis. *Oncol Lett* 17:2271–2277.

267. Yao Y, Suo A-L, Li Z-F, Liu L-Y, Tian T, Ni L, Zhang W-G, Nan K-J, Song T-S, Huang C. 2009. MicroRNA profiling of human gastric cancer. *Molecular Medicine Reports* 2:963–970.
268. Pang L, Li B, Zheng B, Niu L, Ge L. 2017. miR-138 inhibits gastric cancer growth by suppressing SOX4. *Oncology Reports* 38:1295–1302.
269. Yuan Y, Du W, Wang Y, Xu C, Wang J, Zhang Y, Wang H, Ju J, Zhao L, Wang Z, Lu Y, Cai B, Pan Z. 2015. Suppression of AKT expression by miR-153 produced anti-tumor activity in lung cancer. *International Journal of Cancer* 136:1333–1340.
270. Liu Z, Jiang Z, Huang J, Huang S, Li Y, Yu S, Yu S, Liu X. 2014. miR-7 inhibits glioblastoma growth by simultaneously interfering with the PI3K/ATK and Raf/MEK/ERK pathways. *International Journal of Oncology* 44:1571–1580.
271. Pan H, Li T, Jiang Y, Pan C, Ding Y, Huang Z, Yu H, Kong D. 2018. Overexpression of Circular RNA ciRS-7 Abrogates the Tumor Suppressive Effect of miR-7 on Gastric Cancer via PTEN/PI3K/AKT Signaling Pathway. *Journal of Cellular Biochemistry* 119:440–446.
272. Kong D, Piao Y-S, Yamashita S, Oshima H, Oguma K, Fushida S, Fujimura T, Minamoto T, Seno H, Yamada Y, Satou K, Ushijima T, Ishikawa T-O, Oshima M. 2012. Inflammation-induced repression of tumor suppressor miR-7 in gastric tumor cells. *Oncogene* 31:3949–3960.
273. Due H, Svendsen P, Bødker JS, Schmitz A, Bøgsted M, Johnsen HE, El-Galaly TC, Roug AS, Dybkær K. 2016. miR-155 as a Biomarker in B-Cell Malignancies. *Biomed Res Int* 2016.
274. Liu T-Y, Chen S-U, Kuo S-H, Cheng A-L, Lin C-W. 2010. E2A-positive gastric MALT lymphoma has weaker plasmacytoid infiltrates and stronger expression of the memory B-cell-associated miR-223: possible correlation with stage and treatment response. *Mod Pathol* 23:1507–1517.
275. Krützfeldt J, Rajewsky N, Braich R, Rajeev KG, Tuschl T, Manoharan M, Stoffel M. 2005. Silencing of microRNAs in vivo with “antagomirs.” *Nature* 438:685–689.
276. Zhang Y, Roccaro AM, Rombaoa C, Flores L, Obad S, Fernandes SM, Sacco A, Liu Y, Ngo H, Quang P, Azab AK, Azab F, Maiso P, Reagan M, Brown JR, Thai T-H, Kauppinen S, Ghobrial IM. 2012. LNA-mediated anti-miR-155 silencing in low-grade B-cell lymphomas. *Blood* 120:1678–1686.
277. Babar IA, Cheng CJ, Booth CJ, Liang X, Weidhaas JB, Saltzman WM, Slack FJ. 2012. Nanoparticle-based therapy in an in vivo microRNA-155 (miR-155)-dependent mouse model of lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:E1695–E1704.
278. Kawakami T, Mizushima I, Yamada K, Fujii H, Ito K, Yasuno T, Izui S, Yamagishi M, Huard B, Kawano M. 2019. Abundant a proliferation-inducing ligand (APRIL)-producing macrophages contribute to plasma cell accumulation in immunoglobulin G4-related disease. *Nephrol Dial Transplant* 34:960–969.

279. Schwaller J, Schneider P, Mhawech-Fauceglia P, McKee T, Myit S, Matthes T, Tschopp J, Donze O, Le Gal F-A, Huard B. 2007. Neutrophil-derived APRIL concentrated in tumor lesions by proteoglycans correlates with human B-cell lymphoma aggressiveness. *Blood* 109:331–338.
280. Chu VT, Fröhlich A, Steinhauser G, Scheel T, Roch T, Fillatreau S, Lee JJ, Löhning M, Berek C. 2011. Eosinophils are required for the maintenance of plasma cells in the bone marrow. *Nat Immunol* 12:151–159.
281. Davis BP, Rothenberg ME. 2014. Eosinophils and cancer. *Cancer Immunol Res* 2:1–8.
282. Straumann A, Kristl J, Conus S, Vassina E, Spichtin H-P, Beglinger C, Simon H-U. 2005. Cytokine expression in healthy and inflamed mucosa: probing the role of eosinophils in the digestive tract. *Inflamm Bowel Dis* 11:720–726.
283. Samson M, Lakomy D, Audia S, Bonnotte B. 2011. Les lymphocytes TH17 : différenciation, phénotype, fonctions, et implications en pathologie et thérapeutique humaine. *La Revue de Médecine Interne* 32:292–301.
284. Dias PM, Banerjee G. 2013. The Role of Th17/IL-17 on Eosinophilic Inflammation. *Journal of Autoimmunity* 40:9–20.
285. Jung Y, Rothenberg ME. 2014. Roles and Regulation of Gastrointestinal Eosinophils in Immunity and Disease. *J Immunol* 193:999–1005.
286. Arnold IC, Artola-Borán M, Tallón de Lara P, Kyburz A, Taube C, Ottemann K, van den Broek M, Yousefi S, Simon H-U, Müller A. 2018. Eosinophils suppress Th1 responses and restrict bacterially induced gastrointestinal inflammation. *J Exp Med* 215:2055–2072.
287. McGovern TW, Talley NJ, Kephart GM, Carpenter HA, Gleich GJ. 1991. Eosinophil infiltration and degranulation in *Helicobacter pylori*-associated chronic gastritis. *Dig Dis Sci* 36:435–440.
288. Aydemir SA, Tekin IO, Numanoglu G, Borazan A, Ustundag Y. 2004. Eosinophil infiltration, gastric juice and serum eosinophil cationic protein levels in *Helicobacter pylori*-associated chronic gastritis and gastric ulcer. *Mediators Inflamm* 13:369–372.
289. Bold A, Tra DM, Olar L, Mitru P, Mateescu AO, Streba IAM. Gastric eosinophilia – clinical and morphological correlations 5.
290. Herrera-Goepfert R, Arista-Nasr J, Alba-Campomanes A. 1999. Pathologic features of the gastric mucosa adjacent to primary MALT-lymphomas. *J Clin Gastroenterol* 29:266–269.
291. Kopf M, Brombacher F, Hodgkin PD, Ramsay AJ, Milbourne EA, Dai WJ, Ovington KS, Behm CA, Köhler G, Young IG, Matthaei KI. 1996. IL-5-Deficient Mice Have a Developmental Defect in CD5+ B-1 Cells and Lack Eosinophilia but Have Normal Antibody and Cytotoxic T Cell Responses. *Immunity* 4:15–24.

292. Yu C, Cantor AB, Yang H, Browne C, Wells RA, Fujiwara Y, Orkin SH. 2002. Targeted Deletion of a High-Affinity GATA-binding Site in the GATA-1 Promoter Leads to Selective Loss of the Eosinophil Lineage In Vivo. *J Exp Med* 195:1387–1395.
293. Lee JJ, Dimina D, Macias MP, Ochkur SI, McGarry MP, O’Neill KR, Protheroe C, Pero R, Nguyen T, Cormier SA, Lenkiewicz E, Colbert D, Rinaldi L, Ackerman SJ, Irvin CG, Lee NA. 2004. Defining a link with asthma in mice congenitally deficient in eosinophils. *Science* 305:1773–1776.
294. Noto JM, Peek RM. 2017. The gastric microbiome, its interaction with *Helicobacter pylori*, and its potential role in the progression to stomach cancer. *PLoS Pathog* 13.
295. Coker OO, Dai Z, Nie Y, Zhao G, Cao L, Nakatsu G, Wu WK, Wong SH, Chen Z, Sung JY, Yu J. 2018. Mucosal microbiome dysbiosis in gastric carcinogenesis. *Gut* 67:1024–1032.
296. Ferreira RM, Pereira-Marques J, Pinto-Ribeiro I, Costa JL, Carneiro F, Machado JC, Figueiredo C. 2018. Gastric microbial community profiling reveals a dysbiotic cancer-associated microbiota. *Gut* 67:226–236.
297. Richard ML, Sokol H. 2019. The gut mycobiota: insights into analysis, environmental interactions and role in gastrointestinal diseases. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 16:331–345.
298. Kim M, Kim CH. 2017. Regulation of humoral immunity by gut microbial products. *Gut Microbes* 8:392–399.
299. Yamamoto ML, Schiestl RH. 2014. Intestinal Microbiome and Lymphoma Development. *Cancer J* 20:190–194.
300. Yamamoto ML, Maier I, Dang AT, Berry D, Liu J, Ruegger PM, Yang J, Soto PA, Presley LL, Reliene R, Westbrook AM, Wei B, Loy A, Chang C, Braun J, Borneman J, Schiestl RH. 2013. Intestinal bacteria modify lymphoma incidence and latency by affecting systemic inflammatory state, oxidative stress, and leucocyte genotoxicity. *Cancer Res* 73:4222–4232.
301. Swidsinski A, Khilkin M, Kerjaschki D, Schreiber S, Ortner M, Weber J, Lochs H. 1998. Association between intraepithelial *Escherichia coli* and colorectal cancer. *Gastroenterology* 115:281–286.
302. Bonnet M, Buc E, Sauvanet P, Darcha C, Dubois D, Pereira B, Déchelotte P, Bonnet R, Pezet D, Darfeuille-Michaud A. 2014. Colonization of the Human Gut by *E. coli* and Colorectal Cancer Risk. *Clin Cancer Res* 20:859–867.
303. Arthur JC, Perez-Chanona E, Mühlbauer M, Tomkovich S, Uronis JM, Fan T-J, Campbell BJ, Abujamel T, Dogan B, Rogers AB, Rhodes JM, Stintzi A, Simpson KW, Hansen JJ, Keku TO, Fodor AA, Jobin C. 2012. Intestinal inflammation targets cancer-inducing activity of the microbiota. *Science* 338:120–123.
304. Cougnoux A, Dalmaso G, Martinez R, Buc E, Delmas J, Gibold L, Sauvanet P, Darcha C, Déchelotte P, Bonnet M, Pezet D, Wodrich H, Darfeuille-Michaud A, Bonnet R.

2014. Bacterial genotoxin colibactin promotes colon tumour growth by inducing a senescence-associated secretory phenotype. *Gut* 63:1932–1942.
305. Cougnoux A, Delmas J, Gibold L, Faïs T, Romagnoli C, Robin F, Cuevas-Ramos G, Oswald E, Darfeuille-Michaud A, Prati F, Dalmaso G, Bonnet R. 2016. Small-molecule inhibitors prevent the genotoxic and protumoural effects induced by colibactin-producing bacteria. *Gut* 65:278–285.

ANNEXE



Published in final edited form as:

Helicobacter. 2018 September ; 23(Suppl 1): e12517. doi:10.1111/hel.12517.

Helicobacter: Inflammation, immunology, and vaccines

Alice Blossse^{1,2}, Philippe Lehours^{1,2}, Keith T. Wilson^{3,4,5,6}, and Alain P. Gobert^{3,4}

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

²French National Reference Centre for Campylobacters and Helicobacters, Bordeaux Hospital, Bordeaux, France

³Division of Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition, Department of Medicine, Vanderbilt University Medical Center, Nashville, TN, USA

⁴Center for Mucosal Inflammation and Cancer, Nashville, TN, USA

⁵Department of Pathology, Microbiology, and Immunology, Vanderbilt University Medical Center, Nashville, TN, USA

⁶Veterans Affairs Tennessee Valley Healthcare System, Nashville, TN, USA

Abstract

Helicobacter pylori infection induces a chronic gastric inflammation which can lead to gastric ulcers and cancer. The mucosal immune response to *H. pylori* is first initiated by the activation of gastric epithelial cells that respond to numerous bacterial factors, such as the cytotoxin-associated gene A or the lipopolysaccharide intermediate heptose-1,7-bisphosphate. The response of these cells is orchestrated by different receptors including the intracellular nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 1 or the extracellular epidermal growth factor receptor. This nonspecific response leads to recruitment and activation of various myeloid (macrophages and dendritic cells) and T cells (T helper-17 and mucosal-associated invariant T cells), which magnify and maintain inflammation. In this review, we summarize the major advances made in the past year regarding the induction, the regulation, and the role of the innate and adaptive immune responses to *H. pylori* infection. We also recapitulate efforts that have been made to develop efficient vaccine strategies.

Keywords

host-pathogen interaction; mucosal immunity; stomach; virulence factors

Correspondence: Alain P. Gobert, Division of Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition, Department of Medicine, Nashville, TN, USA. alain.p.gobert@vanderbilt.edu.

DISCLOSURES OF INTERESTS

The authors declare no conflict of interest.

1 | INFLAMMATION

1.1 | *Helicobacter pylori* factors that regulate the activation of epithelial cells

Helicobacter pylori is essentially an extracellular bacterium that generally does not invade the gastric mucosa of the host. Gastric epithelial cells (GECs) are a primary target for *H. pylori* infection and actively contribute to the development of an acute and chronic inflammation. Natural immune response strongly depends on host recognition of invariant structures, namely pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), via signaling through pattern recognition receptors such as toll-like receptors (TLRs). But *H. pylori* also regulates the host innate responses by injecting one of its main virulence factors, the cytotoxin-associated gene A (CagA), directly into epithelial cells using a type 4 secretion system (T4SS).

Thus, Li et al investigated the effect of *H. pylori* on GEC auto-phagy. Using immunohistochemistry, they demonstrated that the SQSTM1/p62 (sequestosome1) protein, which accumulates when autophagy is dysfunctional, accumulates in the gastric epithelium of patients infected with *cagA*⁺/*vacA*s1m2 *H. pylori* strains compared to uninfected individuals or to patients infected with *cagA*⁻/*vacA*s1m2 isolates.¹ Then, in vitro investigations demonstrated that the CagA dampens the formation of autophagy by stimulating the c-Met/Akt signaling pathway.¹ Furthermore, because the inhibition of autophagy by CagA was associated with an increase of proinflammatory cytokine release,¹ Li et al concluded that this mechanism is an unrecognized cellular event that may sustain gastric inflammation and consequently lead to gastric carcinogenesis.

Members of the Pellino proteins (PELI1, PELI2, PELI3) have been shown to sustain TLR signaling by functioning as scaffold proteins² and by inducing polyubiquitination of interleukin (IL)-1 receptor-associated kinase 1 (IRAK1).³ TLR2 is involved in the recognition of *H. pylori* lipopolysaccharide (LPS) in GECs⁴ and leads to the activation of numerous signaling events, to nuclear factor-kappa B (NF- κ B) activation, and to the transcription of the genes encoding chemokines such as C-X-C motif chemokine ligand 8 (CXCL8, also known as IL-8), which plays a major function in the development of gastritis and gastric cancer.⁵ Using TLR2-expressing HEK293T cells and *H. pylori* LPS stimulation, Smith et al demonstrated that PELI1 and PELI3 overexpression enhances NF- κ B activation and *CXCL8* gene expression;⁶ in contrast, the innate response was dampened by PELI3.⁶ Moreover, *PELI1* mRNA expression was stimulated in the human GEC line MKN45 in response to *H. pylori* LPS and live bacteria.⁶ This emphasizes that the balance between PELI1/PELI2 and PELI3 in *H. pylori*-infected patients might have effects on the development of gastritis. In the same way, in the last year, three groups reported the critical effect of an LPS intermediate metabolite, namely heptose-1,7-bisphosphate (HBP), on the innate response of GECs.⁷⁻⁹ Using direct delivery of HBP in host cells and mutants defective in the genes required for synthesis of HBP or for the T4SS, they all found that HBP (a) is delivered intracellularly by a functional T4SS, (b) is sensed by tumor necrosis factor (TNF) receptor-associated factor-interacting protein with a forkhead-associated domain (TIFA), and (c) signals in GECs to stimulate an NF- κ B-dependent innate immune response,⁷⁻⁹ independently of nucleotide-binding oligomerization domain-containing

protein 1 (NOD1).⁸ Further, Zimmermann et al proposed that TIFA, TNF receptor-associated factor 2 (TRAF2), and tumor growth factor-beta-activated kinase 1 binding protein 2 (TAB 2) form large protein complexes called TIFAsomes.⁹ These discoveries have revived the lost interest in the role of *H. pylori* LPS on the induction of the immune response and the increased complexity of the interaction between the T4SS and GECs. Now, it is important to understand whether the *H. pylori* HBP/TIFA signaling pathway also has a biological significance in myeloid cells.

In an intriguing manner, in this last year, it has been reported that *H. pylori* also induces a rapid noncanonical NF- κ B signaling in human HeLa cells and in the GEC line NCI-N87, characterized by an increase in the expression of the mitogen-activated protein kinase kinase 14 (MAP3K14, also named NIK) and by phosphorylation/activation of p100.¹⁰ The authors then questioned the cellular mechanism leading to the activation of this pathway. The phosphorylation of p100 was not observed when a *virB7* mutant strain, which lacks a functional T4SS, was used to stimulate GECs; in contrast, a *cagA*-deficient strain had the same effect as the parental strain,¹⁰ demonstrating that the T4SS, but not CagA, is required for this signaling event. The authors also demonstrated that MAP3K14 induction and p100 activation are dependent on the lymphotoxin beta receptor that signals via TRAF2.¹⁰ At last, they found that MAP3K14 protein expression is also increased in gastric biopsies from *H. pylori*-infected patients compared to uninfected individuals,¹⁰ providing a further rationale that NIK could represent a marker of *H. pylori* infection and may have a potential effect in *H. pylori*-mediated diseases. In the light of the finding that HBP,⁷⁻⁹ peptidoglycan,¹¹ and DNA¹² can be transferred into GECs by a T4SS, it would be of interest to understand how *H. pylori* signals in cells activate the noncanonical NF- κ B pathway.

Helicobacter pylori, which is an auxotroph for cholesterol, extracts the lipid from host membranes to incorporate it into its own outer membrane using the enzyme cholesterol- α -glucosyltransferase (Cgt).¹³ Cholesterol glucosylation and extraction from host cells result in lipid raft destruction and/or alteration of the membrane architecture, which has been linked to immune evasion and bacterial persistence.¹³ Phosphorylation/activation of signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1) is stimulated in the GEC lines MKN45 and AGS, as well as in primary human GEC, treated with interferon-gamma (IFN- γ), but not in these cells preinfected for 24 h with *H. pylori*.¹⁴ This phenomenon was not observed with an *H. pylori* mutant strain lacking *cgt*. Furthermore, *H. pylori* coated with water-soluble cholesterol before infection did not block the cellular response to IFN- γ .¹⁴ At last, the reduction of cholesterol levels by *H. pylori* in GEC blocks IFN- γ signaling by preventing assembly of IFN- γ receptor subunits via lipid raft destruction.¹⁴ In an important way, IL-6 and IL-22 signaling in GEC was also perturbed by *H. pylori* via a mechanism involving a Cgt-dependent cholesterol depletion. In mice infected for 3 days, the *H. pylori* PMSS1 *cgt* was not able to colonize mice as the wild-type strain did but the expression of the host IFN- γ downstream response gene *Irf1* was significantly higher in PMSS1 *cgt*-infected mice compared to animals infected with the parental strain.¹⁴ Therefore, *H. pylori* Cgt reduces cholesterol levels in infected GEC, thereby blocking T-cell signaling, allowing the bacteria to escape the host inflammatory response.

1.2 | Regulation of inflammation by cellular receptors

Intracellular and extracellular receptors of PAMPS or immune effectors display different effects on *H. pylori* pathogenesis. NOD1 is expressed in GECs, senses peptidoglycan, and modulates innate immune response.¹² Tran et al investigated whether NOD1 can also dampen the inflammatory response by inducing the cytokine IL-33. Indeed, the mouse GEC line GSM06 infected with *H. pylori* releases the anti-inflammatory cytokine IL-33 by a NOD1-dependent pathway; this was confirmed in primary GECs from wild type (WT) and *Nod1*-deficient mice.¹⁵ Similar to that, the human AGS cells transfected with shRNA specific for *NOD1* or with a *NOD1* knockout using CRISPR/Cas9 technology failed to produce IL-33 in response to *H. pylori*.¹⁵ As expected, the NOD1-dependent production of IL-33 was orchestrated by a functional T4SS.¹⁵ At 8 weeks postinfection, WT mice, but not *Nod1*^{-/-} mice, exhibited a significant increase in *Il33* mRNA expression and IL-33 concentration in the gastric mucosa;¹⁵ this suggests that NOD1-driven IL-33 may protect against *H. pylori*-mediated inflammatory responses thus favoring the persistence of the bacterium in the stomach.

Of all the hormones produced in the stomach, gastrin plays a major function in cellular processes involved in carcinogenesis such as proliferation, apoptosis, angiogenesis, motility, and tumor cell invasion. Hence, transgenic mice overexpressing gastrin under the transcriptional control of the insulin promoter (INS-GAS mice) rapidly develop gastric malignancies after *H. pylori* infection.¹⁶ Gunawardhana et al found that the induction of the gene encoding gastrin by *H. pylori* is abolished in the presence of AG1478, an inhibitor of epidermal growth factor receptor (EGFR) in AGS cells.¹⁷ Using siRNAs to specifically knockdown various signaling molecules, these authors demonstrated that *H. pylori* first induces the release of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor (HB-EGF), which in turn signals via Raf-1 proto-oncogene, serine/threonine kinase (RAF1), mitogen-activated protein kinase kinase 1 (MAP2K1, previously known as MEK1), and mitogen-activated protein kinase 1 (MAPK1, also called ERK2) to stimulate the transcription of the gene encoding gastrin.¹⁷ In the same way, it has been already reported that there is increased EGFR phosphorylation in the *H. pylori*-induced human gastric inflammation and cancer development.¹⁸ This year, the Wilson group also showed that treatment of *H. pylori*-infected INS-GAS mice or Mongolian gerbils with the EGFR inhibitor gefitinib resulted in (a) reduced activation of MAPK1/3 and activator protein 1 in GECs, (b) inhibition of chemokine synthesis by the gastric mucosa, (c) a decrease in myeloperoxidase-positive inflammatory cells, and (d) a marked reduction of gastric dysplasia and carcinoma.¹⁹ Of particular interest, similar data were obtained in mice with epithelial cell-specific deletion of *Egfr* (*Egfr*^{epi}) and key findings were recapitulated using culture of primary GEC monolayers of WT and *Egfr*^{epi} mice. Altogether, these data prove that the recruitment of myeloperoxidase-positive inflammatory cells to the infected gastric mucosa is orchestrated by epithelial EGFR. The same group had already demonstrated that EGFR signaling in myeloid cells is also involved in *H. pylori*-mediated mucosal immune response.²⁰ In this context, the inhibition of EGFR may represent an interesting chemopreventive strategy to alter the development of a persistent mucosal immune response, which may lead to carcinogenesis.

1.3 | Beyond epithelial cells

Although the gastric epithelium is the primary site of *H. pylori* colonization, *H. pylori* can access deeper tissues and the bacterium has been found in the vicinity of endothelial cells in the gastric submucosa.²¹ By examining a previously unappreciated role of endothelial cells in eliciting a strong CXCL8 response against *H. pylori* infection, recent studies provide important new insights into the pathogenesis of *H. pylori*-associated gastric diseases. This last year, Tafreshi et al showed that, apart from gastric epithelial cells, endothelial cells may also contribute to *H. pylori*-induced inflammation.²² They demonstrated that primary human umbilical vein cells (HUVEC) from an immortalized HUVEC cell line (EA.Hy926) produce more CXCL8 than the human GEC line AGS when stimulated with *H. pylori*.²² This induction was completely inhibited when mutant strains lacking the complete *cagPAI* or the *cagL* gene, but not the *cagA* gene, were used to stimulate the cells; moreover, a recombinant CagL protein, but not a recombinant protein with a mutation in the arginine-glycine-aspartate (RGD) motif that is involved in the binding to the human transmembrane receptor integrin $\alpha 5\beta 1$ and can activate EGFR,²³ also stimulates CXCL8 secretion by HUVECs.²² At last, CXCL8 and IL-6 production by *H. pylori*-infected HUVECs has been significantly reduced with the EGFR inhibitor AG1478.²² Thus, this work demonstrates that endothelial cells may play a critical role in the initiation and chronicity of the proinflammatory response in *H. pylori*-infected patients.

Urease displays an important function in *H. pylori* colonization and survival in the acidic environment of the stomach. Previous data have shown that, in a nonenzymatic way, *H. pylori* urease activates neutrophils to produce reactive oxygen species and also induces platelet aggregation, requiring ADP secretion modulated by the 12-lipoxygenase pathway, a signaling cascade also triggered by the physiological agonist collagen. Thus, Scopel-Guerra et al aimed to elucidate the mechanism underlying the activation of platelets exposed to an enzymatically active *H. pylori* urease holoenzyme and to its subunits UreA and UreB. For this purpose, they used recombinant versions of *H. pylori* urease and its two subunits, and they conducted platelet aggregation assays, flow cytometry and quantitative PCR to analyze how these proteins affect the platelets' physiology. They demonstrated that the *H. pylori* urease, and notably its B subunit, activates platelet aggregation and that the activation of platelets by *H. pylori* urease appears to lead these cells to exhibit a proinflammatory phenotype.²⁴ Therefore, platelets might possibly contribute to the development and/or the persistence of *H. pylori*-induced inflammation.

2 | IMMUNOLOGY

2.1 | Activation and role of myeloid cells

Neutrophils, monocytes and macrophages, and dendritic cells are the first cells recruited in the gastric lamina propria during *H. pylori* infection. A remaining topic is the identification of the cellular mechanism by which myeloid cells are recruited to the gastric mucosa and are activated by *H. pylori*. In their recent work, Arnold et al observed that the recruitment of macrophages and CD11b⁺ dendritic cells (DCs), but not neutrophils and CD4⁺ T cells, is inhibited in mice lacking C-C Motif Chemokine Receptor 2 (CCR2), a receptor for monocyte chemoattractant protein-1.²⁵ In addition, the recruited gastric macrophages and

DCs were found to express the receptor for fractalkine C-X3-C motif chemokine receptor 1 (CX3CR1), which may also play a role in myeloid cell recruitment.²⁵ Then, in an elegant study using an *H. pylori* strain that expresses the red fluorescent protein (RFP) and mice with a reconstituted human immune system, they showed that CX3CR1⁺ macrophages and DCs phagocytose *H. pylori* in the gastric mucosa;²⁵ this result is particularly important because it demonstrates that myeloid cells are in contact not only with *H. pylori* soluble factors, but also with live bacteria during the infection, thus providing yet another strong rationale for the study of *H. pylori*/myeloid cell interactions. These CX3CR1⁺/*H. pylori*⁺ myeloid cells expressed high levels of the inflammasome nucleotide-binding domain, leucine-rich-containing family, pyrin domain-containing-3 (NLRP3), and deletion of the gene encoding this protein led to a reduction of FOXP3⁺ Treg response, to a concomitant increased gastric T helper (Th) 1 response, and to a decreased colonization of the gastric tissue by *H. pylori*.²⁵ The differentiation and the recruitment of DCs were not dependent on other inflammasome-related factors such as apoptosis-associated speck-like protein containing a carboxy-terminal CARD or caspase-1. Hence, the authors concluded that *H. pylori*-induced NLRP3 is required to generate Treg response independently of the role of the inflammasome.²⁵ This cellular event could be considered as a novel pathway of immune escape by *H. pylori*. In parallel, it was reported that NLRP3 mRNA expression and IL-1 β secretion is increased in the human monocytic cell line THP-1 and blood-derived monocytes/macrophages infected with *H. pylori* or with mutants lacking functional T4SS, CagA, the vacuolating cytotoxin A (VacA), Cgt, or flagellin,²⁶ suggesting that other factors than the typical *H. pylori* virulence factors are involved in the stimulation of the inflammasome in humans.

MicroRNAs (miRNAs) are short noncoding RNAs (20–22 nt) that inhibit mRNA transduction and induce their degradation. Pagliari et al were able to identify the miRNAs induced by *H. pylori* in human macrophages differentiated from blood-derived monocytes using colony stimulating factor 1 (CSF1 or MCSF). Using miRNA microarray, the authors observed 55 downregulated and 46 upregulated miRNAs after 24 h of infection.²⁷ Using a sophisticated comparative mapping of the miRNAs inhibited by *H. pylori* and of the mRNAs induced during the infection, they found that the downregulation of miR-4270 was correlated with a marked overexpression of the activating receptor CD300E, which is involved in the inducible expression of IL-1 β and IL-6, and in the inhibition of MHC-II-dependent pathway of antigen presentation in human macrophages.²⁷ Thus, these findings highlight a novel mechanism by which *H. pylori* elicits persistent inflammation and escapes T-cell-dependent specific immune response.

2.2 | The adaptive immune responses

CD4⁺ Th cells are central to many aspects of immune response. The proinflammatory response characterized by the Th1 and Th17 subtypes contributes to protection against *H. pylori* via cytokine secretion and activation of effector cells, but also supports chronic inflammation and injury that can ultimately lead to development of gastric cancer.²⁸ In the last year, clinical investigations emphasized that Th1 and Th17 responses are elicited during *H. pylori* infection. Adamsson et al reported that the level of expression of the genes encoding the prototype Th17 cytokine IL-17A and the Th1 lymphokine IFN- γ is enhanced

in the corpus and antrum of Swedish patients with *H. pylori* infection compared to uninfected individuals;²⁹ more importantly they confirmed by immunofluorescence that the number of IL-17A⁺ and IFN- γ ⁺ cells is also increased in *H. pylori*-infected patients.²⁹ Similar to that, a significant increase in *IL17A* mRNA transcripts was observed in the gastric tissue of *H. pylori*-infected patients from Iran³⁰ and France³¹ compared to uninfected ones. Arachchi et al also reported that *H. pylori* infection is associated with elevated IL-17 serum concentrations in a human cohort from Sri-Lanka.³² As expected, the severity of the gastritis was positively correlated with the production of IL-17.³² However, two studies showed that the number of infiltrating Th17 cells is higher in *H. pylori*-infected patients with peptic ulcers compared to individuals with *H. pylori* gastritis.^{29,30} To converse, Cremniter et al described that the same level of *IL17A* mRNA is found in patients with gastritis, ulcer, or precancerous and cancerous lesions.³¹

An alternative picture to the Th1/Th17 synergy and antagonism emerged from a study by D'Souza et al. These authors assessed the induction and the role of mucosal-associated invariant T (MAIT) cells during *H. pylori* infection; these cells expressed the MHC class I-related gene protein (MR1), were activated by riboflavin-producing bacteria, secreted IFN- γ and IL-17, and displayed a protective role in bacterial infections.^{33,34} They found that MAIT cells were enhanced in the gastric mucosa of patients or mice infected with *H. pylori*.³⁵ Transgenic *V α 19iCa^{-/-}MrI^{+/+}* mice, which express only the TCR α chain (V α 19i) harbored by MAIT cells,³⁶ exhibited high levels of MAIT cells in the stomach and showed increased gastritis compared to *V α 19iCa^{-/-}MrI^{-/-}* mice upon *H. pylori* infection.³⁵ Similar results were obtained in animals with a boosted MAIT cell levels using preinfection with *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* or pretreatment with Pam2Cys plus 5-(2-oxopropylideneamino)-6-d-riboylaminouracil. In an important way, these last animals infected with *H. pylori* exhibited not only more gastric T cells, but also an increase in neutrophils, macrophages, eosinophils, and dendritic cells. These data emphasize that MAIT cells should be taken into consideration to elucidate of the immunopathology of *H. pylori* infection; however, the level of bacterial colonization in mice with increased MAIT cells was not provided in this article, so we are not able to estimate the effect of MAIT cells on the *H. pylori* burden.³⁶

3 | VACCINES

During the past year, studies sought to identify *H. pylori* antigens and epitopes that may lead to the development of efficient vaccine protocols were performed. By identifying the immunodominant antigens of 30 different groups of *H. pylori* proteins, based on their molecular weight, Sun et al determined that inosine 5'-monophosphate dehydrogenase, type II citrate synthase, and urease subunit beta are three protective antigens inducing dominant Th1 and Th17 responses.³⁷ Moreover, immunization of mice with recombinant *H. pylori* FliD protein was shown to elicit strong Th1 and Th17 immune responses and a significant reduction in *H. pylori* bacterial load by more than a 2-log order compared to mice treated with the adjuvant only.³⁸ At last, Li et al identified that only the epitopes UreB₃₇₃₋₃₈₅ and UreB₃₁₇₋₃₂₉ are effective in stimulating a strong T-cell response and are protective against *H. pylori* challenge in mice.³⁹

More particularly, Guo et al developed multivalent epitope-based vaccines, called CWAE vaccines. They cloned in *Escherichia coli* two plasmids containing CD4⁺ Th cell and B cell epitopes in antigenic *H. pylori* proteins predicted by T Cell Epitope Prediction Tools and B Cell Epitope Prediction Tools. The first harbored (a) two molecular adjuvants (mucosal adjuvant cholera toxin B subunit and Th1-type adjuvant), (b) tandem copies of the selected B and Th cell epitopes (UreA₂₇₋₅₃, UreA₁₈₃₋₂₀₃, HpaA₁₃₂₋₁₄₁, and heat shock protein 60₁₈₉₋₂₀₃), and (c) epitope-rich regions UreB₁₅₈₋₂₅₁ containing four known Th or B cell epitopes and UreB₃₂₁₋₃₈₅ containing three Th or B cell epitopes.⁴⁰ The second was composed of (a) the mucosal adjuvant cholera toxin B subunit, (b) Th and B-cell epitopes (UreA₂₇₋₉₀, UreA₁₈₃₋₂₂₅, UreB₃₂₇₋₃₈₅, membrane-associated lipoprotein Lpp20₅₈₋₉₇, HpaA₅₂₋₁₉₄, and CagL₂₁₋₁₃₉), and (c) an Lpp20 mimotope.⁴¹ These proteins were administered *per os* together with aluminum hydroxide adjuvant or polysaccharide adjuvant in gerbils infected with *H. pylori* SS1, 6 weeks after infection; *H. pylori* burden was assessed 5 weeks after vaccination. Stomach colonization was reduced by 3–4-log orders in animals treated with both CWAE vaccines compared to infected gerbils and by 1-log versus gerbils vaccinated with either a univalent epitope-based vaccine against *H. pylori* urease⁴⁰ or a urease vaccine.⁴¹ Antibody response and gastritis were also improved with the CWAE vaccine.⁴⁰ Thus, this multivalent epitope-based vaccine may be a promising candidate to control *H. pylori* infection.

As an alternative to classical vaccines, two groups engineered recombinant *Lactococcus lactis* strains to overexpress *H. pylori* antigens: (a) the complete *H. pylori* adhesin A (HpaA),⁴² a lipoprotein located in the cellular outer membrane and flagellum sheath, and (b) the neutrophil-activating protein A subunit (NapA),⁴³ a virulence factor that recruits and stimulates neutrophils and protects *H. pylori* against oxidative damage.⁴⁴ Animals inoculated once a week for four weeks with the recombinant *L. lactis* strain developed anti-HpaA and anti-NapA IgG, and fecal IgA.^{42,43} The immunization with the NapA-expressing *L. lactis* strain also initiated a Th1 and Th17 response by splenic cells under an antigenic recall assay using *H. pylori* lysates, a partial reduction in *H. pylori* colonization,⁴³ but no significant change in the level of gastritis. It would now be of interest to assess the role of the HpaA-expressing strain on *H. pylori* colonization and clinical outcomes.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was funded by National Institutes of Health (NIH) grants R01AT004821, R01CA190612, P01CA116087, and P01CA028842 (K.T.W.), Veterans Affairs Merit Review Grant I01BX001453 (K.T.W.), the Thomas F. Frist Sr. Endowment (K.T.W.), and the Vanderbilt Center for Mucosal Inflammation and Cancer (K.T.W., A.P.G.).

Funding information

National Institutes of Health (NIH), Grant/Award Number: R01AT004821, R01CA190612, P01CA116087 and P01CA028842; Veterans Affairs Merit Review Grant, Grant/Award Number: I01BX001453; Thomas F. Frist Sr. Endowment; Vanderbilt Center for Mucosal Inflammation and Cancer

REFERENCES

1. Li N, Tang B, Jia YP, et al. *Helicobacter pylori* CagA protein negatively regulates autophagy and promotes inflammatory response via c-Met-PI3K/Akt-mTOR signaling pathway. *Front Cell Infect Microbiol* 2017;7:417. [PubMed: 28983474]

2. Moynagh PN. The Pellino family: IRAK E3 ligases with emerging roles in innate immune signalling. *Trends Immunol* 2009;30:33–42. [PubMed: 19022706]
3. Schauvliege R, Janssens S, Beyaert R. Pellino proteins are more than scaffold proteins in TLR/IL-1R signalling: a role as novel RING E3-ubiquitin-ligases. *FEBS Lett* 2006;580:4697–4702. [PubMed: 16884718]
4. Yokota S, Ohnishi T, Muroi M, Tanamoto K, Fujii N, Amano K. Highly-purified *Helicobacter pylori* LPS preparations induce weak inflammatory reactions and utilize Toll-like receptor 2 complex but not Toll-like receptor 4 complex. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2007;51:140–148. [PubMed: 17645528]
5. Gobert AP, Wilson KT. Human and *Helicobacter pylori* interactions determine the outcome of gastric diseases. *Curr Top Microbiol Immunol* 2017;400:27–52. [PubMed: 28124148]
6. Smith SM, Freeley M, Moynagh PN, Kelleher DP. Differential modulation of *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide-mediated TLR2 signaling by individual Pellino proteins. *Helicobacter*. 2017;22:e12325.
7. Stein SC, Faber E, Bats SH, et al. *Helicobacter pylori* modulates host cell responses by CagT4SS-dependent translocation of an intermediate metabolite of LPS inner core heptose biosynthesis. *PLoS Pathog* 2017;13:e1006514. [PubMed: 28715499]
8. Gall A, Gaudet RG, Gray-Owen SD, Salama NR. TIFA signaling in gastric epithelial cells initiates the Cag type 4 secretion system-dependent innate immune response to *Helicobacter pylori* Infection. *MBio* 2017;8:e01168–17. [PubMed: 28811347]
9. Zimmermann S, Pfannkuch L, Al-Zeer MA, et al. ALPK1-and TIFA-dependent innate immune response triggered by the *Helicobacter pylori* type IV secretion system. *Cell Rep* 2017;20:2384–2395. [PubMed: 28877472]
10. Feige MH, Vieth M, Sokolova O, Tager C, Naumann M. *Helicobacter pylori* induces direct activation of the lymphotoxin beta receptor and non-canonical nuclear factor-kappa B signaling. *Biochim Biophys Acta* 2018;1865:545–550.
11. Viala J, Chaput C, Boneca IG, et al. Nod1 responds to peptidoglycan delivered by the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island. *Nat Immunol* 2004;5:1166–1174. [PubMed: 15489856]
12. Varga MG, Shaffer CL, Sierra JC, et al. Pathogenic *Helicobacter pylori* strains translocate DNA and activate TLR9 via the cancer-associated cag type IV secretion system. *Oncogene*. 2016;35:6262–6269. [PubMed: 27157617]
13. Wunder C, Churin Y, Winau F, et al. Cholesterol glucosylation promotes immune evasion by *Helicobacter pylori*. *Nat Med* 2006;12:1030–1038. [PubMed: 16951684]
14. Morey P, Pfannkuch L, Pang E, et al. *Helicobacter pylori* depletes cholesterol in gastric glands to prevent interferon gamma signaling and escape the inflammatory response. *Gastroenterology*. 2018;154:1391–1404. [PubMed: 29273450]
15. Tran LS, Tran D, De Paoli A, et al. NOD1 is required for *Helicobacter pylori* induction of IL-33 responses in gastric epithelial cells. *Cell Microbiol* 2018;20:e12826. [PubMed: 29392836]
16. Fox JG, Rogers AB, Ihrig M, et al. *Helicobacter pylori*-associated gastric cancer in INS-GAS mice is gender specific. *Cancer Res* 2003;63:942–950. [PubMed: 12615707]
17. Gunawardhana N, Jang S, Choi YH, et al. *Helicobacter pylori*-induced HB-EGF upregulates gastrin expression via the EGF receptor, C-Raf, Mek1, and Erk2 in the MAPK pathway. *Front Cell Infect Microbiol* 2017;7:541. [PubMed: 29379775]
18. Chaturvedi R, Asim M, Piazzuelo MB, et al. Activation of EGFR and ERBB2 by *Helicobacter pylori* results in survival of gastric epithelial cells with DNA damage. *Gastroenterology*. 2014;146:1739–1751. [PubMed: 24530706]
19. Sierra JC, Asim M, Verriere TG, et al. Epidermal growth factor receptor inhibition downregulates *Helicobacter pylori*-induced epithelial inflammatory responses, DNA damage and gastric carcinogenesis. *Gut* 2017;7:1247–1260.
20. Hardbower DM, Singh K, Asim M, et al. EGFR regulates macrophage activation and function in bacterial infection. *J Clin Invest* 2016;126:3296–3312. [PubMed: 27482886]
21. Necchi V, Candusso ME, Tava F, et al. Intracellular, intercellular, and stromal invasion of gastric mucosa, preneoplastic lesions, and cancer by *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology*. 2007;132:1009–1023. [PubMed: 17383424]

22. Tafreshi M, Guan J, Gorrell RJ, et al. *Helicobacter pylori* type IV secretion system and its adhesin subunit, CagL, mediate potent inflammatory responses in primary human endothelial cells. *Front Cell Infect Microbiol* 2018;8:22. [PubMed: 29468142]
23. Kwok T, Zabler D, Urman S, et al. *Helicobacter* exploits integrin for type IV secretion and kinase activation. *Nature*. 2007;449:862–866. [PubMed: 17943123]
24. Scopel-Guerra A, Olivera-Severo D, Staniscuaski F, et al. The impact of *Helicobacter pylori* urease upon platelets and consequent contributions to inflammation. *Front Microbiol* 2017;8:2447. [PubMed: 29312166]
25. Arnold IC, Zhang X, Urban S, et al. NLRP3 controls the development of gastrointestinal CD11b(+) dendritic cells in the steady state and during chronic bacterial infection. *Cell Rep* 2017;21:3860–3872. [PubMed: 29281833]
26. Pachathundikandi SK, Backert S. *Helicobacter pylori* controls NLRP3 expression by regulating hsa-miR-223-3p and IL-10 in cultured and primary human immune cells. *Innate Immun* 2018;24:11–23. [PubMed: 29145789]
27. Pagliari M, Munari F, Toffoletto M, et al. *Helicobacter pylori* affects the antigen presentation activity of macrophages modulating the expression of the immune receptor CD300E through miR-4270. *Front Immunol* 2017;8:1288. [PubMed: 29085364]
28. Jafarzadeh A, Larussa T, Nemati M, Jalapour S. T cell subsets play an important role in the determination of the clinical outcome of *Helicobacter pylori* infection. *Microb Pathog* 2018;116: 227–236. [PubMed: 29407232]
29. Adamsson J, Ottsojo LS, Lundin SB, Svennerholm AM, Raghavan S. Gastric expression of IL-17A and IFN γ in *Helicobacter pylori* infected individuals is related to symptoms. *Cytokine*. 2017;99:30–34. [PubMed: 28683359]
30. Bagheri N, Razavi A, Pourgheysari B, et al. Up-regulated Th17 cell function is associated with increased peptic ulcer disease in *Helicobacter pylori*-infection. *Infect Genet Evol* 2018;60: 117–125. [PubMed: 29481961]
31. Cremniter J, Bodet C, Tougeron D, et al. Th-17 response and antimicrobial peptide expression are uniformly expressed in gastric mucosa of *Helicobacter pylori*-infected patients independently of their clinical outcomes. *Helicobacter*. 2018;23:e12479. [PubMed: 29582503]
32. Arachchi PS, Fernando N, Weerasekera MM, Senevirathna B, Weerasekera DD, Gunasekara CP. Proinflammatory cytokine IL-17 shows a significant association with *Helicobacter pylori* infection and disease severity. *Gastroenterol Res Pract* 2017;2017:6265150. [PubMed: 29391865]
33. Meierovics A, Yankelevich WJ, Cowley SC. MAIT cells are critical for optimal mucosal immune responses during in vivo pulmonary bacterial infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013;110:E3119–E3128. [PubMed: 23898209]
34. Le Bourhis L, Martin E, Peguillet I, et al. Antimicrobial activity of mucosal-associated invariant T cells. *Nat Immunol* 2010;11:701–708. [PubMed: 20581831]
35. D'Souza C, Pediongco T, Wang H, et al. Mucosal-associated invariant t cells augment immunopathology and gastritis in chronic *Helicobacter pylori* infection. *J Immunol* 2018;200:1901–1916. [PubMed: 29378910]
36. Kawachi I, Maldonado J, Strader C, Gilfillan S. MR1-restricted V α 19i mucosal-associated invariant T cells are innate T cells in the gut lamina propria that provide a rapid and diverse cytokine response. *J Immunol* 2006;176:1618–1627. [PubMed: 16424191]
37. Sun H, Yuan H, Tan R, et al. Immunodominant antigens that induce Th1 and Th17 responses protect mice against *Helicobacter pylori* infection. *Oncotarget*. 2018;9:12050–12063. [PubMed: 29552292]
38. Ghasemi A, Mohammad N, Mautner J, Karsabet MT, Ardjmand A, Moniri R. Immunization with recombinant FliD confers protection against *Helicobacter pylori* infection in mice. *Mol Immunol* 2018;94:176–182. [PubMed: 29324238]
39. Li B, Yuan H, Chen L, et al. The influence of adjuvant on UreB protection against *Helicobacter pylori* through the diversity of CD4 + T-cell epitope repertoire. *Oncotarget*. 2017;8:68138–68152. [PubMed: 28978104]

40. Guo L, Yang H, Tang F, et al. Oral Immunization with a multivalent epitope-based vaccine, based on NAP, Urease, HSP60, and HpaA, provides therapeutic effect on *H. pylori* Infection in Mongolian gerbils. *Front Cell Infect Microbiol* 2017;7:349. [PubMed: 28824883]
41. Guo L, Yin R, Xu G, et al. Immunologic properties and therapeutic efficacy of a multivalent epitope-based vaccine against four *Helicobacter pylori* adhesins (urease, Lpp20, HpaA, and CagL) in Mongolian gerbils. *Helicobacter*. 2017;22:e12428.
42. Zhang R, Wang C, Cheng W, et al. Delivery of *Helicobacter pylori* HpaA to gastrointestinal mucosal immune sites using *Lactococcus lactis* and its immune efficacy in mice. *Biotechnol Lett* 2018;40:585–590. [PubMed: 29299716]
43. Peng X, Zhang R, Duan G, et al. Production and delivery of *Helicobacter pylori* NapA in *Lactococcus lactis* and its protective efficacy and immune modulatory activity. *Sci Rep* 2018;8:6435. [PubMed: 29691472]
44. Gobert AP, Wilson KT. Polyamine-and NADPH-dependent generation of ROS during *Helicobacter pylori* infection: a blessing in disguise. *Free Radic Biol Med* 2017;105:16–27. [PubMed: 27682363]