

**UNIVERSITE TOULOUSE III PAUL SABATIER**  
**FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES**

ANNEE 2018

THESE 2018/TOU3/2016

**THESE**

**POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

Présentée et soutenue publiquement

par

**Julien GUILLEMAUD**

Lymphomagenèse gastrique et infection à *Helicobacter* :  
comparaison de deux fonds génétiques en modèle de souris  
exprimant la cytokine APRIL

le 6 avril 2018

Directeur de thèse : Monsieur le Professeur Philippe LEHOURS

**JURY**

Monsieur le Professeur Thierry NOEL  
Madame le Docteur Emilie BESSEDE  
Madame le Docteur Pauline FLOCH  
Monsieur le Docteur Olivier BARRAUD

Président  
Assesseur  
Assesseur  
Assesseur

**PERSONNEL ENSEIGNANT  
de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques de l'Université Paul Sabatier  
au 08 janvier 2018**

**Professeurs Emérites**

M. BENOIST H.	Immunologie
M. BERNADOU J.	Chimie Thérapeutique
M. CAMPISTRON G.	Physiologie
M. CHAVANT L.	Mycologie
M. MOULIS C.	Pharmacognosie
M. ROUGE P.	Biologie Cellulaire
M. SIE P.	Hématologie

**Professeurs des Universités**

**Hospitalo-Universitaires**

Mme AYYOUB M.	Immunologie
M. CHATELUT E.	Pharmacologie
M. FAVRE G.	Biochimie
Mme GANDIA P.	Pharmacologie
M. PARINI A.	Physiologie
M. PASQUIER C. (Doyen)	Bactériologie - Virologie
Mme ROQUES C.	Bactériologie - Virologie
Mme ROUSSIN A.	Pharmacologie
Mme SALLERIN B.	Pharmacie Clinique
M. VALENTIN A.	Parasitologie

**Universitaires**

Mme BARRE A.	Biologie
Mme BAZIARD G.	Chimie pharmaceutique
Mme BENDERBOUS S.	Mathématiques – Biostat.
Mme BERNARDES-GÉNISSON V.	Chimie thérapeutique
Mme COUDERC B.	Biochimie
M. CUSSAC D. (Vice-Doyen)	Physiologie
Mme SIXOU S.	Biochimie
M. FABRE N.	Pharmacognosie
M. GAIRIN J-E.	Pharmacologie
Mme GIROD-FULLANA S.	Pharmacie Galénique
Mme MULLER-STAUMONT C.	Toxicologie - Sémiologie
Mme NEPVEU F.	Chimie analytique
M. SALLES B.	Toxicologie
M. SEGUI B.	Biologie Cellulaire
M. SOUCHARD J-P.	Chimie analytique
Mme TABOULET F.	Droit Pharmaceutique
M. VERHAEGHE P.	Chimie Thérapeutique

## Maîtres de Conférences des Universités

### Hospitolo-Universitaires

M. CESTAC P.	Pharmacie Clinique
Mme DE MAS MANSAT V. (*)	Hématologie
Mme JUILLARD-CONDAT B.	Droit Pharmaceutique
M. PUISSET F.	Pharmacie Clinique
Mme ROUZAUD-LABORDE C.	Pharmacie Clinique
Mme SERONIE-VIVIEN S.	Biochimie
Mme THOMAS F. (*)	Pharmacologie

### Universitaires

Mme ARELLANO C. (*)	Chimie Thérapeutique
Mme AUTHIER H.	Parasitologie
M. BERGE M. (*)	Bactériologie - Virologie
Mme BON C.	Biophysique
M. BOUJILA J. (*)	Chimie analytique
Mme BOUTET E. (*)	Toxicologie - Sémiologie
M. BROUILLET F.	Pharmacie Galénique
Mme CABOU C.	Physiologie
Mme CAZALBOU S. (*)	Pharmacie Galénique
Mme CHAPUY-REGAUD S.	Bactériologie - Virologie
Mme COLACIOS-VIATGE C.	Immunologie
Mme COSTE A. (*)	Parasitologie
M. DELCOURT N.	Biochimie
Mme DERAEEVE C.	Chimie Thérapeutique
Mme ECHINARD-DOUIN V.	Physiologie
Mme EL GARAH F.	Chimie Pharmaceutique
Mme EL HAGE S.	Chimie Pharmaceutique
Mme FALLONE F.	Toxicologie
Mme FERNANDEZ-VIDAL A.	Toxicologie
Mme HALOVA-LAJOIE B.	Chimie Pharmaceutique
Mme JOUANJUS E.	Pharmacologie
Mme LAJOIE-MAZENC I.	Biochimie
Mme LEFEVRE L.	Physiologie
Mme LE LAMER A-C.	Pharmacognosie
M. LEMARIE A.	Biochimie
M. MARTI G.	Pharmacognosie
Mme MIREY G. (*)	Toxicologie
Mme MONFERRAN S.	Biochimie
M. Olichon A.	Biochimie
Mme REYBIER-VUATTOUX K. (*)	Chimie Analytique
M. Sainte-Marie Y.	Physiologie
M. Stigliani J-L.	Chimie Pharmaceutique
M. SUDOR J. (*)	Chimie Analytique
Mme TERRISSE A-D.	Hématologie
Mme TOURRETTE-DIALO A.	Pharmacie Galénique
Mme VANSTEELANDT M.	Pharmacognosie
Mme WHITE-KONING M. (*)	Mathématiques

(\*) Titulaire de l'habilitation à diriger des recherches (HDR)

## Enseignants non titulaires

### Assistants Hospitolo-Universitaires

Mme COOL C.	Physiologie
M. MOUMENI A.	Biochimie
M. METSU D.	Pharmacologie
Mme PALUDETTO M.N.	Chimie thérapeutique
M. PAGES A.	Pharmacie Clinique
M. PERES M.	Immunologie
Mme SALABERT A.S	Biophysique

**Au Professeur Thierry NOEL,**

Je vous remercie de me faire l'honneur de présider ce jury de thèse et d'avoir accepté de juger ce travail. Je vous adresse mes remerciements respectueux et ma profonde reconnaissance.

**Au Docteur Emilie BESSEDE,**

Je te suis très reconnaissant d'avoir accepté d'être membre de ce jury. Je te remercie pour ta gentillesse et ton sens du partage durant mes semestres d'internat.

**Au Docteur Pauline FLOCH,**

Je te remercie de me faire l'honneur de composer ce jury et d'avoir accepté de juger ce travail qui est aussi le tien. Je te remercie aussi pour ta gentillesse et ta disponibilité au quotidien au laboratoire et à la faculté. Ce fut un réel plaisir de travailler avec toi.

**Au Docteur Olivier BARRAUD,**

Vous me faites l'honneur de participer au jury de cette thèse et de juger ce travail. Veuillez trouver ici l'expression de mon plus grand respect.

**Au Professeur Philippe LEHOURS,**

Je te remercie pour la confiance que tu m'as accordée en me proposant ce travail. Je te remercie également pour ta disponibilité, tes conseils, ta patience, ton amitié, ta rigueur juste et pour le partage de tes connaissances et ta pédagogie tout au long de ce travail mais aussi durant mes semestres d'internat. Sois assuré de mon profond respect et de ma plus grande reconnaissance. J'espère que ce travail correspond à ce que tu en envisageais.

A mes grands-parents, pour la délicieuse purée et les fraises du jardin de Riverie, les coquillettes au comté du jeudi midi et les framboises de Craponne, et les vacances au Cap et au Sappey,

A mes parents, merci de m'avoir toujours soutenu et laissé faire mes propres choix en toute confiance, d'être toujours là quand j'en ai besoin et pour votre affection,

A mon frère et à ma sœur, pour ces bons moments passés ensemble, à la maison, à la mer ou à la montagne. A Fred, peut-être qu'un jour tu gagneras enfin aux Aventuriers du Rail ! A Lyana, voleuse d'anniversaire, heureusement que tu es trop chou, sinon je t'en voudrais encore !

« Happiness only real when shared » - Christopher McCandless

Aux « GDL » :

Au Fab Four (Anne, Kat et Matou, et qui s'est bien agrandi depuis), un grand merci pour avoir toujours été présentes pour moi. A toutes nos soirées, nos débats, nos discussions, nos rires, à la fameuse pause canapé et à Michel Chantilly surtout !

A la team Cap d'Agde, Blandin la gueuze, Eidolé la déesse et Olivier le monstre. A quand un prochain Barbu (pas de dame ?!) ou un jungle speed sur la plage avec Jujule, Mathilde et Sven, et commencer enfin ce fameux cahier ?

A Eric, maintenant que tu as basculé du côté obscur de la force, que bacamaths soit avec toi,

A Laurianne, à quand un Pizza Pino/bowling (qui sait, tu gagneras peut-être ! Mais non, je plaisante !),

Aux « JG » :

A Nono, le cœur sur la main, toujours là et toujours partant pour voyager, le roi du feu et des fonds d'écran, merci pour tout !

A Marine, Samuel, Poulpynette, Poulpy et Alfredoux, une super coloc toujours partante pour des activités,

A Camille et Paul (sans oublier Madou la ... euh non), aussi discrète que présente tout au long de cet internat, toujours là pour les autres, mais aussi fine gastronome. Tu ne manqueras pas qu'à Bordeaux !

A Chloé, alias benardy, alias Klocheu, alias la kite-surfeuse néo-calédonienne, bref une amie en or,

A Cécile, hippocup un jour, hippocup toujours pour la reine des soirées bordelaises,

A Maëva et Thibaut, une journée de ski avec toi est presque plus endurante qu'une semaine de CrossFit,

A Charlotte, l'une des meilleures guides culinaires de Bordeaux,

A Coralie et Xavier, pour la meilleure antanaclase de l'internat (et oui, moi aussi j'ai de la culture !),

A Julien, pour ta pédagogie, ta disponibilité, ton humour et tes goûts cinématographiques parfois douteux (quoi Matt ?)

A Cécile L, ne nous oublie pas,

A Camille et Louis, tous les jours la pêche, à vivre à 100 à l'heure,

A Morgane, au moins aussi râleuse que moi, mais toi au moins, tu supportes les insectes de Gwada,

A Laurent et Vincent, mon parrain d'internat bordelais, toujours là pour rire,

A Edona, le charme albanais,

A Julie B et Antoine, la reine du burger mais au calendrier ministériel !

Aux belles frites : FX, Julien, Lucas, Sylvain sans oublier Cat (la schusseuse plus rapide que le léopard des neiges !), Céline (alias Natacha), Clémence (thèse ou minerve, toujours présente), Florence G (et sa fameuse farandole), Florence T et Marine J (la globe-trotteuse de l'humanitaire).

A Cyrielle et Stéphane, Julie L et Vincent, et Lucie, à quand un prochain escape game ou une virée à vélo jusqu'à Arcachon ?!

A Emilie, la première à qui j'ai enseigné l'hémato, mais surtout ma première co-interne née dans les années 90 !

Aux « Juju » :

A Jenn et Flo, la pyramide de Khéops ne s'est pas faite en 1 jour, elle ! Tricheuse,

A Alice-Anne et Jules, pour toutes ces soirées, au Borriquito ou dans la salle de bain,

A Shéshé, la princesse des nuits agadiroises, qu'il faut quand même réussir à motiver !

A Dedel et Mocquot, des anciens voisins « libérés, délivrés » (au sens propre et à l'opposé),

A Arnaud V, maintenant que tu as acheté, tu vas devoir choisir entre la Renault Laguna et la Volvo C70 cabriolet, la classe !

A Marie, à quand une sortie à bord du Tropic Thunder jusqu'en Australie ?!

A Camille, pour ta bonne humeur,

A Louis-Tho, les gélouses se souviendront encore longtemps de ton coup de pied,

A Manu et Morgane, le chic bellillois et la discrétion biterroise, ou l'inverse mais dans les deux sens, ça vaut le coup !

Et à tous les autres : Alexandra, Alice, Alexia, Camille, Esther, Florian (et ses pathologies improbables), Jessica, Margaux B, Marie-Céline (à quand la visite guidée de Saint-Jean ?!), Mireille, les Larry, Loïc (le roi des jeux), Stéphanie et Alexis, et Tiphaine

A l'ensemble du personnel du CNR des Campylobacters et Hélicobacters, et de l'équipe INSERM U1053, et ceux qui m'ont aidé tout au long de cette thèse en particulier Elodie mais aussi Pierre Dubus, Lamia et Alban, et Alice, Astrid et Lucie,

A l'ensemble des techniciens, assistants et biologistes qui m'ont formé au cours de mon internat notamment les biologistes de Bayonne (Anne-Christine, Fanny, Marie-Laure, Aguirre, David, Rémi et Yohan), l'équipe lyonnaise (Françoise, Janine, Lorna, Marie-Alice et Jacques), ceux avec qui tout roule comme sur des rails (Cassandra, Dominique, Karine et Patrick), Anne-Laure, Julie, Stéphanie et Nicolas.

« You can't live at all, unless you can live fully, now » – Alan Watts

## Liste des figures

<b>Figure 1</b> : Morphologie de <i>Helicobacter pylori</i> en microscopie électronique (x30000). .....	16
<b>Figure 2</b> : Prévalence mondiale de l'infection à <i>Helicobacter pylori</i> . ....	17
<b>Figure 3</b> : Diverses conséquences de l'infection à <i>Helicobacter pylori</i> . ....	18
<b>Figure 4</b> : Cascade de modifications histologiques induites par <i>Helicobacter pylori</i> au niveau de la muqueuse gastrique. ....	20
<b>Figure 5</b> : Conduite à tenir en cas de suspicion d'infection à <i>Helicobacter pylori</i> . ...	23
<b>Figure 6</b> : Algorithme de traitement en cas d'infection à <i>Helicobacter pylori</i> chez l'adulte (ne s'applique pas à la femme enceinte ou allaitante). ....	32
<b>Figure 7</b> : Rôle du système de sécrétion de type IV dans la signalisation cellulaire induite par <i>Helicobacter pylori</i> . ....	36
<b>Figure 8</b> : Interaction entre BAFF et APRIL et leurs récepteurs. ....	48
<b>Figure 9</b> : Design de l'étude. ....	52
<b>Figure 10</b> : Répartition des différentes parties de l'estomac pour les analyses. ....	52
<b>Figure 11</b> : Evaluation semi-quantitative des marquages immunohistochimiques à l'aide du logiciel Mercator. ....	56
<b>Figure 12</b> : Apparence macroscopique de l'estomac des souris transgéniques APRIL à 18 mois post-infection. ....	59
<b>Figure 13</b> : Quantification par cytométrie en flux de l'infiltration leucocytaire gastrique des souris en fonds génétiques C57BL6 et BALB/c WT (fond blanc) et transgéniques APRIL (fond gris) à 18 mois post-infection. ....	62
<b>Figure 14</b> : Caractérisation par cytométrie en flux de l'infiltration leucocytaire gastrique des souris en fonds génétiques C57BL6 et BALB/c WT (fond blanc) et transgéniques APRIL (fond gris) 18 mois post-infection. ....	63
<b>Figure 15</b> : Caractérisation par cytométrie en flux de la nature de l'infiltration leucocytaire gastrique des souris en fonds génétiques C57BL6 et BALB/c WT (fond blanc) et transgéniques APRIL (fond gris) 18 mois post-infection déterminée par cytométrie en flux. ....	65
<b>Figure 16</b> : Scores histologiques de l'inflammation gastrique chez les souris en fonds génétiques C57BL6 et BALB/c non infectées (NI) et infectées ( <i>H. pylori</i> ( <i>Hp</i> ) ou <i>H.</i>	

<i>felis (Hf)</i> WT (fond blanc) et transgéniques APRIL (fond gris) 18 mois post-infection. .....	68
<b>Figure 17</b> : Scores histologiques de l'infiltration lymphoïde gastrique chez les souris en fonds génétiques C57BL6 et BALB/c non infectées (NI) et infectées ( <i>H. pylori (Hp)</i> ou <i>H. felis (Hf)</i> ) WT (fond blanc) et transgéniques APRIL (fond gris) 18 mois post-infection. ....	69
<b>Figure 18</b> : Scores des lésions histopathologiques gastriques chez les souris C57BL6 et BALB/c non infectées (NI) et infectées ( <i>H. pylori (Hp)</i> ou <i>H. felis (Hf)</i> ) WT et transgéniques APRIL 18 mois post-infection. ....	70
<b>Figure 19</b> : Quantification de la charge bactérienne dans les échantillons de biopsie gastrique provenant des souris infectées à 18 mois post-infection.....	74
<b>Figure 20</b> : Quantification de la charge bactérienne dans les échantillons de biopsie gastrique provenant des souris infectées. ....	80
<b>Figure 21</b> : Abondance relative de <i>Helicobacter</i> dans les souris C57BL6 WT (fond blanc) et transgéniques APRIL (fond gris) au sein du microbiote gastrique à 2, 12 et 18 mois post-infection.....	81

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1</b> : Recommandations de recherche et d'éradication de <i>Helicobacter pylori</i> . .....	22
<b>Tableau 2</b> : Performances des techniques invasives et non invasives. ....	25
<b>Tableau 3</b> : Avantages et inconvénients des techniques diagnostiques invasives. .	27
<b>Tableau 4</b> : Avantages et inconvénients des tests non invasifs. ....	28
<b>Tableau 5</b> : Spécificités des souches de LGM. ....	43

## Liste des abréviations

ADN : Acide Désoxyribonucléique  
Ahp : Alkylhydroperoxyde réductase  
AINS : Anti-Inflammatoire Non Stéroïdien  
APRIL : A Proliferation Inducing Ligand  
ARN : acide ribonucléique  
*babA* : *blood group antigen-binding adhesin A*  
BAFF : B-cell Activating Factor  
Bcl : B-cell lymphoma  
BCMA : B-Cell Maturation Antigen  
*cagPAI* : *cytotoxin-associated gene A Pathogenicity Island*, Ilot de Pathogénicité *cag*  
CA-SFM : Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie  
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité  
CNRCH : Centre National de Référence des Campylobacters et des Hélicobacters  
DAB : Diaminobenzidine  
DAPI : 4',6-diamidino-2-phénylindole  
EDTA : Éthylène Diamine Tétracétique  
ELISA : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay  
FITC : Fluorescein Isothiocyanate, Isothiocyanate de Fluorescéine  
FRET : Fluorescence Resonance Energy Transfer, Transfert d'Énergie par Résonance de Fluorescence  
GAPDH : Glycéraldéhyde-3-phosphate Déshydrogénase  
*H. felis* : *Helicobacter felis*  
*H. pylori* : *Helicobacter pylori*  
HAS : Haute Autorité de Santé  
HEPES : Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine Éthane Sulfonique  
HNPPC : Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer, Cancer Colorectal Héritaire Sans Polypose  
HSPG : Heparanes Sulfates Proteoglycanes  
IFN : Interféron  
IL : Interleukine  
IPP : Inhibiteur de la Pompe à Protons  
JNK : c-Jun N-terminal Kinases  
Ick : lymphocyte-specific protein tyrosine kinase  
LEL : Lésion Lympho-Épithéliale  
LGM : Lymphome gastrique du MALT  
LPS : Lipopolysaccharide  
MALT : Mucosa-Associated Lymphoid Tissue, Tissu Lymphoïde Associé aux Muqueuses  
NAD : Nicotinamide Adénine Dinucléotide  
NF-κB : Nuclear Factor kappa B, Facteur Nucléaire kappa B

NK : Natural Killer  
NLR : Nod-Like Receptors  
Nod : Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein  
QRDR : Quinolone Resistance-Determining Region  
PAMP : Pathogen-Associated Molecular Patterns, Motifs Moléculaires Associés aux Pathogènes  
PCR : Polymerase Chain Reaction  
PE : Phycoérythrine  
PNN : Polynucléaire Neutrophile  
PRR : Pattern Recognition Receptors, Récepteurs de Reconnaissance de motifs moléculaires  
ROS : Reactive Oxygen Species, Dérivés Réactifs de l'Oxygène  
*sabA* : *sialic acid-binding adhesin A*  
SOD : Superoxyde Dismutase  
TACI : Transmembrane Activator and CAML Interactor  
TBS : Tris-Buffered Saline  
TGF : Transforming Growth Factor  
Th : T helper  
TLR : Toll-Like Receptor  
Tm : Melting Temperature, température de fusion  
TNF : Tumor Necrosis Factor, Facteur de Nécrose Tumorale  
TNFSF : Tumor Necrosis Factor ligand Superfamily member  
Treg : T régulateur  
TRU : Test Respiratoire à l'Urée marquée  
UFC : Unité Formant Colonie  
WT : Wild-Type, sauvage

## Table des matières

1. <i>Helicobacter pylori</i> .....	15
1.1. Caractères morphologiques, culturels, enzymatiques et biochimiques .....	15
1.2. Epidémiologie.....	16
1.3. Pathologies.....	19
1.3.1. Gastrite .....	19
1.3.2. Ulcère gastroduodéal.....	19
1.3.3. Adénocarcinome gastrique .....	19
1.3.4. Lymphome gastrique du tissu lymphoïde associé aux muqueuses .....	20
1.4. Diagnostic et traitement.....	21
1.4.1. Diagnostic .....	21
1.4.1.1. Méthodes invasives .....	22
1.4.1.1.1. Examen anatomopathologique .....	24
1.4.1.1.2. Culture .....	25
1.4.1.1.3. Test rapide à l'urée .....	26
1.4.1.1.4. Amplification génique.....	26
1.4.1.2. Méthodes non invasives .....	27
1.4.1.2.1. Test respiratoire à l'urée marquée .....	27
1.4.1.2.2. Sérologie.....	29
1.4.1.2.3. Antigène dans les selles .....	29
1.4.2. Traitement.....	29
1.5. Facteurs de virulence .....	33
1.5.1. Facteurs de colonisation .....	33
1.5.1.1. Uréase.....	33
1.5.1.2. Mobilité et chimiotactisme .....	34
1.5.1.3. Facteurs d'adhérence.....	34
1.5.2. Facteurs de persistance.....	34
1.5.3. Facteurs de pathogénicité.....	35
1.5.3.1. Ilot de pathogénicité cag.....	35
1.5.3.2. Toxine vacuolisante VacA .....	36
1.5.3.3. Lipopolysaccharide.....	37
2. Réponse de l'hôte .....	38
2.1. Immunité innée .....	38

2.2.	Immunité adaptative .....	40
3.	Lymphome gastrique du MALT .....	40
3.1.	Physiopathologie .....	40
3.2.	Facteurs de virulence des souches de lymphome.....	42
3.3.	Modèles animaux .....	43
3.3.1.	Gerbillon de Mongolie .....	44
3.3.2.	Souris.....	45
3.3.2.1.	C57BL6 .....	45
3.3.2.2.	BALB/c .....	46
3.3.2.3.	Souris et LGM .....	46
4.	APRIL.....	47
5.	Objectifs .....	50
6.	Matériels et Méthodes.....	50
6.1.	Souches de <i>Helicobacter</i> et infection .....	50
6.2.	Cytométrie en flux.....	53
6.3.	Histologie.....	53
6.4.	Immunohistochimie.....	54
6.5.	Détermination de la charge bactérienne par qPCR .....	56
6.6.	Analyses statistiques .....	57
7.	Résultats .....	58
7.1.	Aspect macroscopique des estomacs des souris .....	58
7.2.	Caractérisation par cytométrie en flux de l'infiltration leucocytaire .....	60
7.3.	Aspects histologiques.....	66
7.4.	Immunohistochimie.....	71
7.5.	Estimation de la charge bactérienne .....	72
8.	Discussion.....	75
9.	Bibliographie .....	83
10.	Annexes.....	95

## Introduction

En France, 15 à 30 % de la population (notamment les personnes âgées et les populations immigrées de zones de forte endémie) serait contaminée par *Helicobacter pylori*, une bactérie qui peut entraîner des ulcères gastroduodénaux et, dans de rares cas, des cancers gastriques notamment le lymphome gastrique du tissu lymphoïde associé aux muqueuses (Mucosa-Associated Lymphoid Tissue, MALT) dit LGM.

Depuis la découverte de l'implication de *Helicobacter pylori* dans le développement du LGM et faute de pouvoir avoir accès à des biopsies gastriques de patients atteints de cette maladie, de nombreux modèles animaux ont été développés afin de mieux comprendre sa physiopathologie, de développer de nouvelles stratégies de prévention et *in fine* identifier des cibles thérapeutiques potentielles applicable à son traitement chez l'Homme.

Il a été démontré chez l'Homme, au sein de biopsies gastriques de patients souffrant de LGM, que la cytokine APRIL (A Proliferation Inducing Ligand) était surexprimée en comparaison à des patients souffrants de gastrites simples. Cette cytokine, membre de la famille du TNF (Tumor Necrosis Factor), partage avec BAFF (B-cell Activating Factor), un autre membre de cette famille, 30 % d'homologie au niveau protéique.

Le laboratoire où j'ai réalisé ma thèse a mis en place un modèle de LGM chez des souris sauvages et transgéniques pour la cytokine APRIL sous sa forme humaine infectées par différentes espèces du genre *Helicobacter*. Ce projet avait pour objectif de développer un modèle de lymphomagenèse gastrique facile à reproduire afin d'en étudier les mécanismes physiopathologiques.

## 1. *Helicobacter pylori*

La découverte de *Helicobacter pylori* date de 1982, avec la mise en évidence histologique par J. Robin Warren de bacilles spiralés ou incurvés « *Campylobacter-like* » au sein de biopsies prélevées dans des zones de la muqueuse antrale de patients atteints de gastrites chroniques ou d'ulcères gastroduodénaux, puis l'isolement de la bactérie en culture par Barry J. Marshall (1). Ils ont alors émis l'hypothèse que cette bactérie pouvait être responsable des ulcères gastriques et duodénaux. Cette découverte a été couronnée par le prix Nobel de médecine en 2005. En 1994, *Helicobacter pylori* a été classé carcinogène du groupe 1, « cancérigène pour l'homme » d'après le Centre International de Recherche sur le Cancer de par son implication dans l'adénocarcinome notamment.

### 1.1. Caractères morphologiques, culturels, enzymatiques et biochimiques

C'est un bacille à Gram négatif, incurvé ou spiralé, mobile grâce à 2 à 6 flagelles polaires. La bactérie mesure de 2,5 à 4,0 µm de longueur et de 0,5 à 1,0 µm de largeur (Figure 1) (2). C'est une bactérie micro-aérophile, catalase +, oxydase + et surtout importante productrice d'uréase. Une partie spécifique sera consacrée à cet enzyme dans la suite de cette introduction bibliographique (cf. paragraphe 1. 5. 1. 1.).



**Figure 1 : Morphologie de *Helicobacter pylori* en microscopie électronique (x30000).**

Figure reproduite d'après <https://www.u-bordeaux.fr/Actualites/De-la-recherche/Clouer-Helicobacter-pylori-au-pilori>

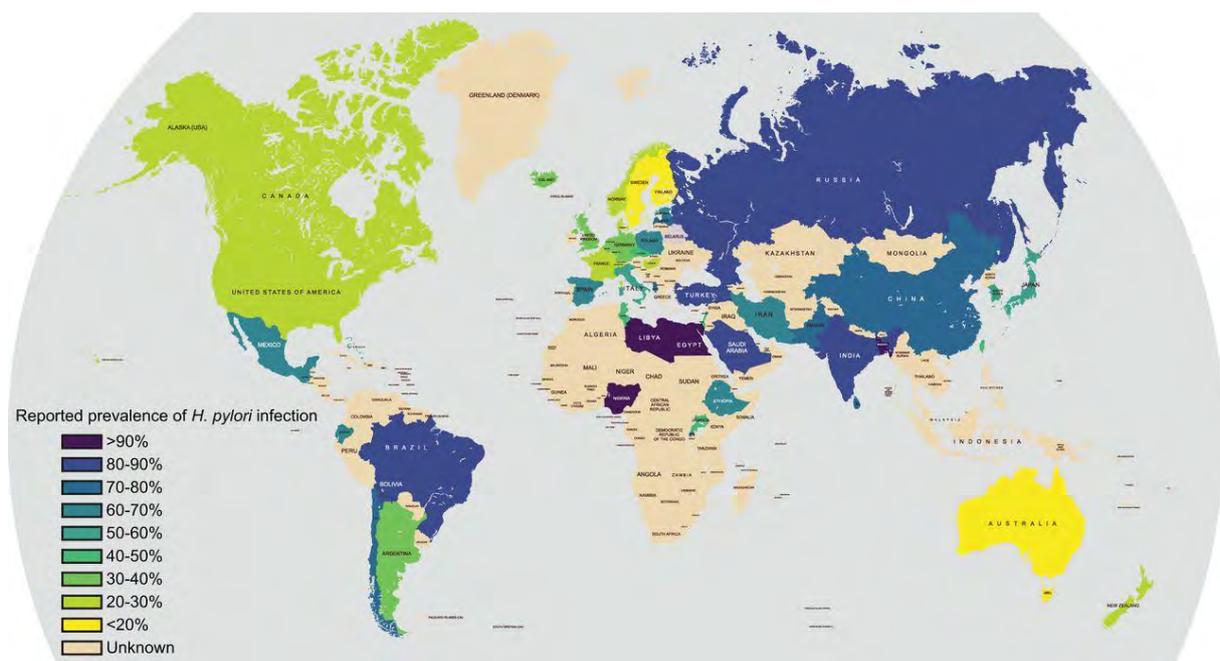
*Helicobacter pylori* a été à l'origine nommé *Campylobacter pylori*. En 1989, un nouveau genre, *Helicobacter*, a été proposé et *Campylobacter pylori* a été rebaptisé *Helicobacter pylori* (3). Il appartient à la subdivision epsilon des protéobactéries, ensemble de bactéries adaptées au mucus digestif, comprenant également les genres *Campylobacter* et *Arcobacter*.

## 1.2. Epidémiologie

*Helicobacter pylori* (*H. pylori*) colonise exclusivement la muqueuse gastrique et sa transmission est interhumaine, par voie féco-orale ou surtout oro-orale dans les pays développés (4). La contamination se fait généralement pendant l'enfance, essentiellement dans les cinq premières années de vie (elle est très rare à l'âge adulte dans les pays développés), mais l'infection persiste toute la vie tant qu'il n'y a pas d'éradication. Après éradication, le risque de réinfestation à l'âge adulte, à ne pas confondre avec la rechute habituellement dans l'année suivant un échec du traitement d'éradication (résistances des souches aux antibiotiques et faible observance), est très faible dans les pays développés (1,45 % annuel) et plus élevé

dans les pays en voie de développement (12 % annuel) (5). L'infection est favorisée par les mauvaises conditions d'hygiène et un niveau de vie faible, ce qui explique son déclin progressif dans les pays à haut niveau de vie, mais sa prévalence plus élevée chez les sujets âgés et dans les populations immigrées des pays en voie de développement de première ou deuxième génération (6) (7).

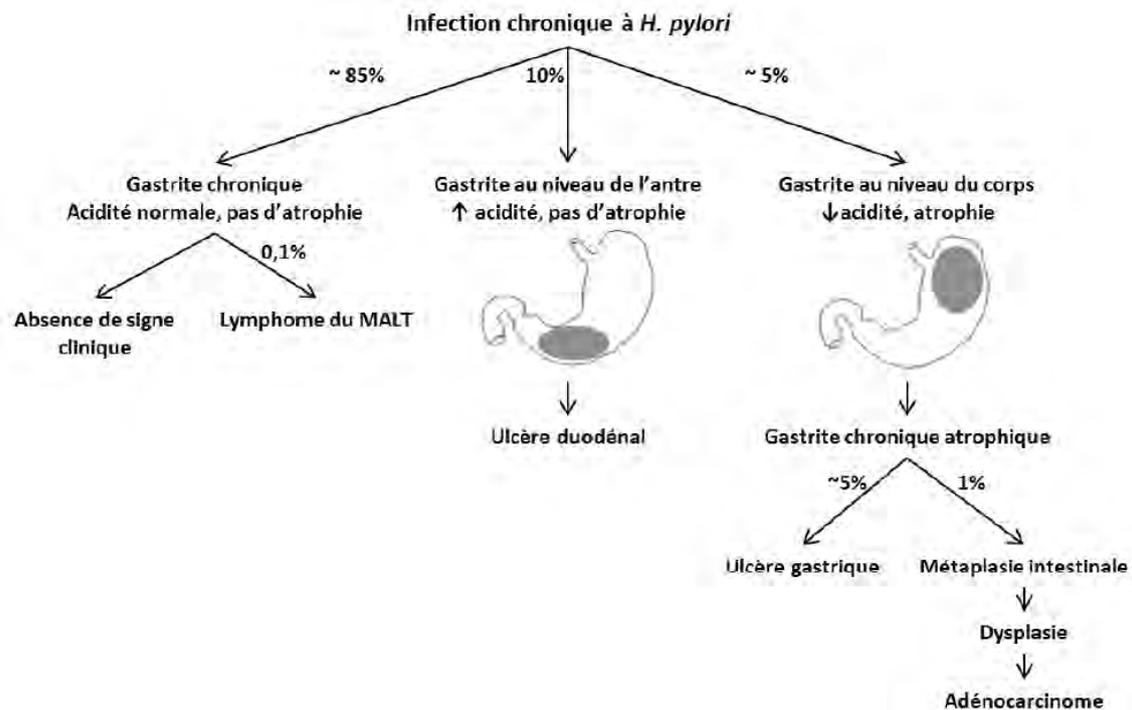
L'infection à *H. pylori* est l'infection bactérienne chronique la plus répandue et la première cause de cancer dans le monde (7). Dans les pays en voie de développement, l'incidence est stable et la prévalence à environ 70-80 % (Figure 2). En France, la prévalence de cette infection, en diminution, est de l'ordre de 15 à 30 % (moins de 20 % chez les moins de 30 ans et environ 50 % après l'âge de 50-60 ans). Elle est élevée chez les personnes provenant des régions de forte endémie (Maghreb, Afrique, Asie) (80 %) (7) (8).



**Figure 2 : Prévalence mondiale de l'infection à *Helicobacter pylori*.**

Figure reproduite d'après Burkitt *et al.* (9).

L'infection à *Helicobacter pylori* entraîne une gastrite d'abord aiguë puis chronique, le plus souvent asymptomatique (Figure 3).



**Figure 3 : Diverses conséquences de l'infection à *Helicobacter pylori*.**

Figure reproduite d'après Mégraud *et al.* (10).

Elle a un rôle majeur dans le développement de l'ulcère gastroduodéal. On estime que 5 à 10 % des malades infectés développeront un ulcère (95 % des ulcères duodénaux et 70 % des ulcères gastriques seraient associés à une infection à *H. pylori*) (11). Les ulcères gastriques évoluent rarement vers le cancer gastrique, les ulcères duodénaux jamais.

L'infection à *H. pylori* a également un rôle dans la carcinogenèse gastrique (adénocarcinome à plus de 90 % et LGM) (12). Environ 80 % des cancers de l'estomac sont en relation avec une infection à *H. pylori* (13). En 2012, le nombre de nouveaux cas en France était estimé à 6 556 (dont 66 % chez l'homme) et le nombre de décès lié au cancer de l'estomac à 4 411 (14). Depuis 30 ans, l'incidence du cancer gastrique (notamment adénocarcinome de type intestinal) a fortement diminué en France du fait de la diminution de la prévalence de l'infection à *H. pylori* (notamment du fait de l'amélioration des conditions de vie et de l'hygiène, et du recours accru aux antibiotiques) (12) (14).

On estime qu'un malade infecté sur 100 développera un adénocarcinome gastrique après plusieurs décennies (12).

Le LGM de bas grade représente environ 7 % de tous les lymphomes non hodgkiniens. Environ 2/3 des LGM sont liés à une infection à *H. pylori* (15).

### **1.3. Pathologies**

#### **1.3.1. Gastrite**

La muqueuse gastrique antrale, suite à la colonisation par *H. pylori*, est le siège d'une inflammation aiguë puis chronique superficielle, habituellement asymptomatique.

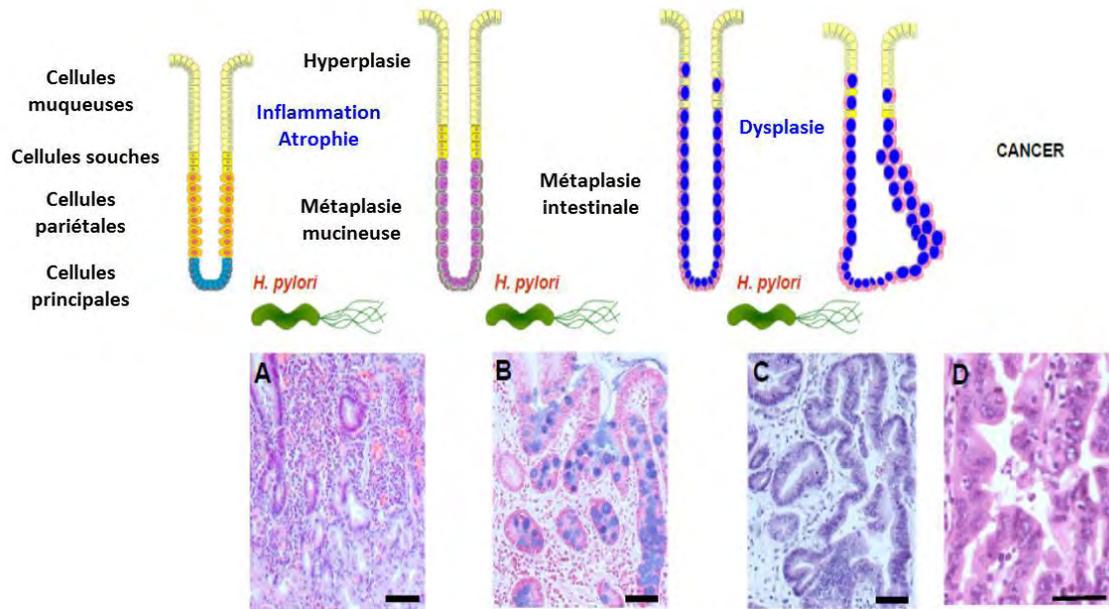
#### **1.3.2. Ulcère gastroduodéal**

La gastrite chronique antrale avec sécrétion acide élevée augmente le risque d'ulcère duodéal, la gastrite chronique antrofundique avec sécrétion acide normale ou abaissée celui de l'ulcère gastrique (16). Les signes cliniques sont des douleurs épigastriques (à type de crampes ou de brûlures) ou un syndrome dyspeptique. Les deux complications principales sont l'hémorragie et la perforation.

#### **1.3.3. Adénocarcinome gastrique**

L'adénocarcinome gastrique est un cancer hétérogène. Tout d'abord, il est nécessaire de distinguer les tumeurs provenant de l'estomac proximal (cardia), car la plupart d'entre elles ne sont pas liées à l'infection par *H. pylori*, de celles trouvées dans la partie distale de l'estomac. Parmi les tumeurs de l'estomac distal, sur la base de l'histologie, il est habituel de différencier deux types de lésions cancéreuses : le type intestinal et le type diffus selon la classification de Lauren (17).

Le cancer de type intestinal est le plus fréquent. Il résulte principalement d'une évolution lente et prolongée de la gastrite chronique vers des lésions prénéoplasiques, la gastrite chronique atrophique, la métaplasie pseudo-intestinale puis la dysplasie pour aboutir au cancer (Figure 4) (18). C'est ce qu'on appelle la cascade de Correa, qui a été décrite avant la découverte de *H. pylori* et qui apparaît tard dans la vie (19).



**Figure 4 : Cascade de modifications histologiques induites par *Helicobacter pylori* au niveau de la muqueuse gastrique.**

Figure d'après Mégraud *et al.* (10).

L'autre voie de cancérogenèse, pouvant également impliquer *H. pylori*, ne passe pas par l'atrophie et aboutit au cancer gastrique de type diffus (7). Il se produit généralement tôt dans la vie. De plus, des mutations du gène E-cadhérine (*cdh1*) notamment sont retrouvées dans environ 30 % des cas. L'expression de cette molécule est ensuite inhibée au niveau des jonctions adhérentes, conduisant à des tumeurs invasives.

#### 1.3.4. Lymphome gastrique du tissu lymphoïde associé aux muqueuses

Enfin, il existe une association entre LGM et infection à *H. pylori*. Il se produit localement, suite à l'infection, une réaction folliculaire lymphoïde avec acquisition possible par la muqueuse gastrique d'un tissu lymphoïde organisé de type MALT. Une partie spécifique à cette pathologie sera développée dans la suite de cette introduction bibliographique (cf. paragraphe 3.).

## 1.4. Diagnostic et traitement

### 1.4.1. Diagnostic

D'après les recommandations de la Haute Autorité de Santé (HAS) (20), il existe différentes situations où il convient de rechercher et de traiter cette infection :

- ulcère gastrique ou duodéal (antécédent d'ulcère ou ulcère actif, compliqué ou non) ;
- avant prise d'anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) ou d'aspirine à faible dose en cas d'antécédent d'ulcère gastrique ou duodéal ;
- dyspepsie chronique avec gastroscopie normale ;
- anémie ferriprive sans cause retrouvée ou résistante à un traitement oral par fer ;
- carence en vitamine B12 sans cause retrouvée ;
- facteurs de risque de cancer gastrique :
  - personne apparentée à un patient ayant eu un cancer de l'estomac (parents, frères/sœurs, enfants) ;
  - patient ayant un syndrome de prédisposition aux cancers digestifs (HNPCC (Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer ou Cancer Colorectal Héritaire Sans Polypose)/Lynch) ;
  - patient ayant eu une gastrectomie partielle ou un traitement endoscopique de lésions cancéreuses gastriques ;
  - patient avec lésions préneoplasiques gastriques (atrophie sévère et/ou métaplasie pseudo-intestinale, dysplasie) ;
- LGM ;
- patient devant avoir une intervention bariatrique, isolant une partie de l'estomac ;
- purpura thrombopénique immunologique de l'adulte.

Selon le Groupe d'Etudes Français des *Helicobacter*, les recommandations de recherche et d'éradication de *H. pylori* sont résumées dans le tableau 1 (Tableau 1) (21).

## Tableau 1 : Recommandations de recherche et d'éradication de *Helicobacter pylori*.

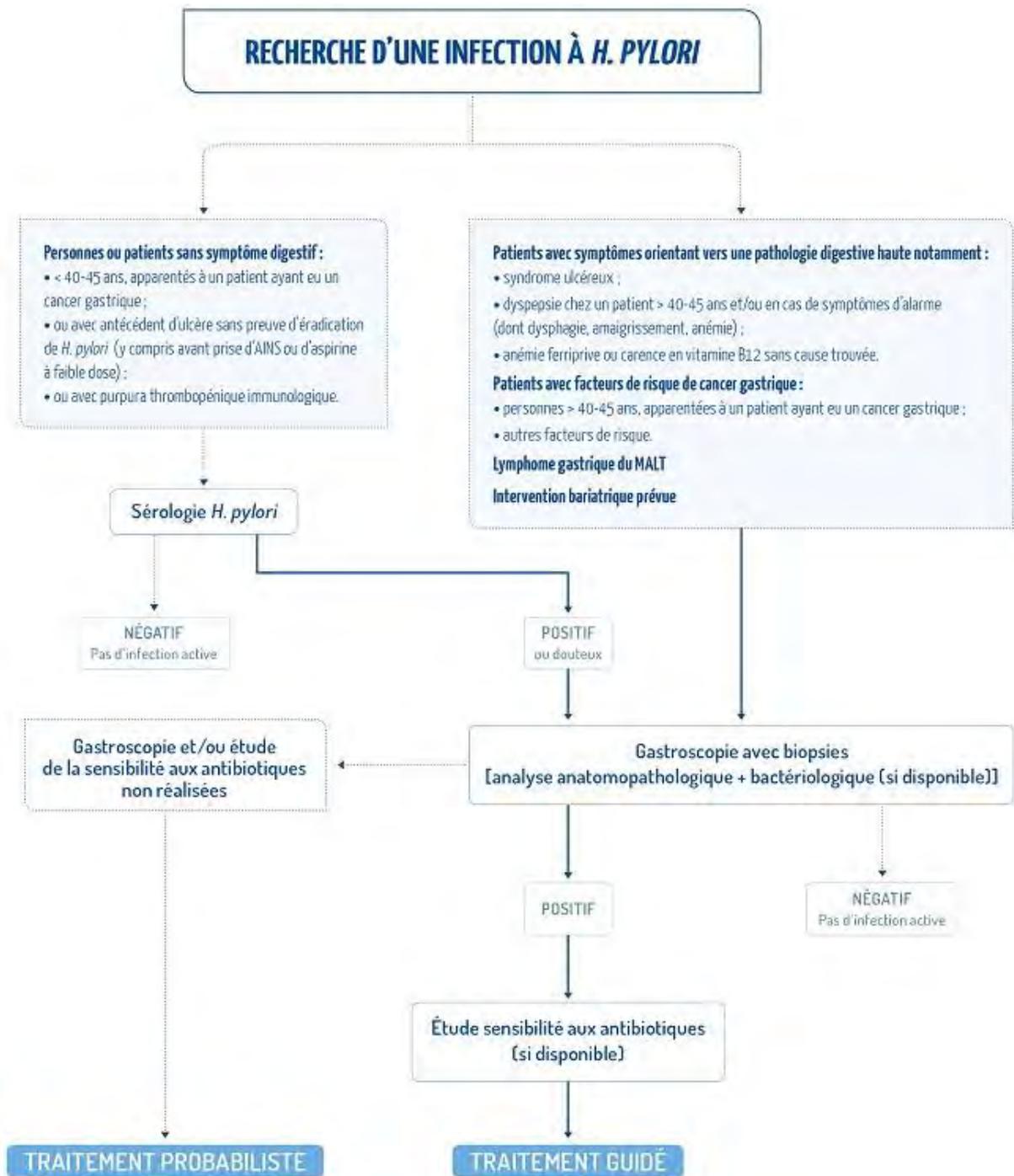
Tableau reproduit d'après Lamarque *et al.* (21).

Indication	Niveau de recommandation
Ulcère gastroduodénal, évolutif ou non, incluant les ulcères compliqués	Élevé
Lymphome du MALT	Élevé
Prise d'AINS ou d'aspirine faible dose chez des patients ayant eu un ulcère compliqué ou non.	Élevé
Traitement au long cours par aspirine chez des patients ayant eu un ulcère gastroduodénal hémorragique	Élevé
Prévention des ulcères avant de débiter un traitement par AINS, particulièrement en cas de traitement prolongé, chez des patients sans antécédent d'ulcère et non précédemment traités par AINS	Élevé
Patients ayant une endoscopie pour dyspepsie	Élevé
Traitement au long cours (au moins 6 mois) par antisécrétoires gastriques (IPP)	Élevé
Antécédents familiaux de cancer gastrique au premier degré	Moyen
Mutations des gènes de réparation de l'ADN (syndrome de Lynch)	Moyen
Lésions pré-néoplasiques de la muqueuse gastrique : atrophie avec ou sans métaplasie intestinale	Moyen
Antécédents de résection localisée d'un cancer gastrique	Moyen
Anémie par carence en fer sans cause retrouvée	Moyen
Carence en vitamine B12	Moyen
Purpura thrombopénique chronique idiopathique	Moyen
Prévention du cancer gastrique chez les patients devant avoir un by-pass gastrique pour traitement d'une obésité morbide	Faible
Enfants avec des douleurs épigastriques sans étiologie évidente	Faible

Les méthodes diagnostiques sont classées en « invasives » et « non invasives » selon qu'elles nécessitent ou non une fibroscopie gastroduodénale.

### 1.4.1.1. Méthodes invasives

La réalisation d'une gastroscopie avec biopsies gastriques permet de réaliser le diagnostic direct de l'infection à *H. pylori* (Figure 5).



**Figure 5 : Conduite à tenir en cas de suspicion d'infection à *Helicobacter pylori*.**

Figure reproduite d'après Haute Autorité de Santé (20).

#### 1.4.1.1.1. Examen anatomopathologique

L'examen anatomopathologique permet de faire le diagnostic de l'infection, d'évaluer les lésions de la muqueuse et rechercher des lésions préneoplasiques. Les biopsies doivent être réalisées sur les territoires de muqueuse au niveau de l'antra et du fundus sur la petite et la grande courbure. La pratique d'au moins deux biopsies antrales, deux biopsies fundiques et une biopsie à l'angle de la petite courbure permet à la fois la recherche de l'infection à *H. pylori* et l'évaluation de l'atrophie et de la métaplasie pseudo-intestinale (22) (23). *H. pylori* peut être visualisé sur des coupes colorées au Giemsa modifié ou à la coloration argentique (méthode de Warthin-Starry). Il se présente comme une bactérie spiralée parfois groupée en « banc de poissons ». Cet examen présente l'inconvénient d'avoir des performances variables en fonction de l'observateur (Tableau 2). D'autre part, il est possible de confondre *H. pylori* avec d'autres bactéries spiralées comme celles du groupe *Helicobacter heilmannii*. L'immunohistochimie permet d'améliorer la reproductibilité interobservateurs. Elle est plus sensible que les colorations pour la recherche de *H. pylori*. Elle est également plus spécifique que la coloration de Giemsa ou de Warthin-Starry. Elle est utile en cas de gastrite chronique faisant suspecter une gastrite à *H. pylori* sans qu'une présentation typique soit évidente aux colorations usuelles (24) (25) ou en cas de contexte ou suspicion de lymphome du MALT.

## Tableau 2 : Performances des techniques invasives et non invasives.

Tableau reproduit d'après Monteiro *et al.* (26). TRU : Test Respiratoire à l'Urée marquée.

	Sensibilité % (IC 95%)	Spécificité % (IC 95%)	Valeur prédictive positive% (IC 95%)	Valeur prédictive négative% (IC 95%)
Culture	100 (96,3-100)	100 (96,3-100)	100	100
Histologie	95,6 (91,5-99,6)	100 (96,3-100)	100	96,4
Test rapide à l'uréase	88,6 (82,4-94,9)	100 (96,3-100)	100	91,5
PCR	93,2 (88,1-98,2)	96,2 (92,3-100)	95,3	94,3
TRUM	93,3 (88,4-98,2)	98,1 (95,5-100)	97,7	94,6
Sérologie (Elisa)	95,6 (91,5-99,6)	92,6 (87,4-97,8)	91,5	96,2
Antigène fécal	88,9 (82,7-95,1)	94,4 (84,6-98,8)	90,9	90,7

### 1.4.1.1.2. Culture

Le diagnostic bactériologique repose sur la mise en évidence de la bactérie en culture. Elle présente un intérêt particulier car elle permet l'étude de la sensibilité aux antibiotiques. Deux biopsies sont nécessaires (au niveau de l'antrum et du fundus), à réaliser avec la même pince et avant les biopsies pour l'histologie. En pratique, l'emploi d'un milieu de transport gélosé spécifique Portagerm® Pylori (bioMérieux) est nécessaire (transport à +4°C, 24 h maximum) et le prélèvement doit être broyé plutôt que dilacéré. Un examen direct au Gram est réalisé en plus de la culture.

Après 3 à 12 jours en atmosphère micro-aéroophile, les cultures sur milieux sélectifs (cefsulodine, vancomycine, triméthoprim, polymyxine B (maisons ou commerciaux (gélose Pylori par bioMérieux))) présentent de petites colonies rondes et bombées. L'identification repose sur l'aspect macroscopique des colonies, la morphologie des bacilles, la mobilité polaire à l'état frais, les caractères catalase +, oxydase + et uréase + (27). L'antibiogramme, après repiquage de la souche, est réalisé à partir d'un inoculum McFarland 3 sur gélose de Mueller-Hinton additionnée de 10 % de sang de cheval incubée en micro-aérobiose à 35 ± 2°C pendant 48 à 72 h d'après le Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie

(CA-SFM). Clarithromycine et lévofloxacine sont testées en liste standard et tétracycline et rifampicine en liste complémentaire. Il n'est pas nécessaire en routine de tester la sensibilité à l'amoxicilline et au métronidazole.

#### 1.4.1.1.3. Test rapide à l'urée

Ce test est basé sur la recherche de l'activité uréasique de *H. pylori*. Il présente l'avantage de pouvoir être pratiqué par le gastro-entérologue dans la salle d'endoscopie. La spécificité est excellente, mais la sensibilité est de l'ordre de 80 à 95 % selon le test utilisé, justifiant la réalisation d'un contrôle par un examen bactériologique si le test est négatif. Ce test n'est pas remboursé (21) (22) (27).

#### 1.4.1.1.4. Amplification génique

La PCR en temps réel utilise des amorces issues du gène de l'uréase ou de l'ARN ribosomique (ARNr) 23S. Cette technique présente l'avantage de ne pas nécessiter de bactéries viables. Des trousse diagnostiques commercialisées et performantes sont disponibles et renseignent toutes sur la présence de l'infection et sont couplées à la recherche de la résistance à la clarithromycine avec un résultat dans la journée et donc plus rapide que celui de la culture (27) (28) (29). L'automatisation de l'extraction en facilite la réalisation à partir des biopsies gastriques. L'amplification génique n'est pas remboursée (Tableau 3).

**Tableau 3 : Avantages et inconvénients des techniques diagnostiques invasives.**

Tableau reproduit d'après Haute Autorité de Santé (20).

	Anatomo-pathologie	Culture	Test rapide à l'uréase	PCR
Avantages	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Sensible et spécifique.</li> <li>- Permet d'évaluer la présence d'une gastrite active (marqueur de <i>H. pylori</i>).</li> <li>- Permet d'évaluer les lésions de muqueuse gastrique et le risque de cancer gastrique.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Test de référence.</li> <li>- Sensible et spécifique.</li> <li>- Permet de réaliser un antibiogramme et d'évaluer la sensibilité à tous les antibiotiques.</li> <li>- Possibilité de conserver les souches congelées.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Spécifique pour le diagnostic préthérapeutique.</li> <li>- Simple, rapide, réalisable lors de la gastroscopie.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Sensible et spécifique pour le diagnostic préthérapeutique.</li> <li>- Conditions de transport moins contraignantes que la culture.</li> <li>- Rapide (quelques heures).</li> <li>- Permet la détection des mutations impliquées dans la résistance à la clarithromycine.</li> </ul>
Inconvénients	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Résultat dépendant de la densité bactérienne et de l'expérience du pathologiste.</li> <li>- Nécessité d'arrêt des ATB 4 semaines avant et des IPP 2 semaines avant.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Importance du délai et des conditions de transport.</li> <li>- Délai de rendu des résultats (12 j).</li> <li>- Nécessité d'arrêt des ATB 4 semaines avant et des IPP 2 semaines avant.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Moins sensible que les autres tests.</li> <li>- Non utilisable pour le contrôle d'éradication.</li> <li>- Nécessité d'arrêt des ATB 4 semaines avant et des IPP 2 semaines avant.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Nécessité d'arrêt des ATB 4 semaines avant et des IPP 2 semaines avant.</li> </ul>
Remboursement	Oui.	Oui.	Non.	Non.

Pour toutes les techniques invasives de diagnostic de l'infection à *H. pylori*, il est nécessaire d'arrêter les inhibiteurs de la pompe à protons (IPP) deux semaines avant et les antibiotiques quatre semaines avant (22).

#### 1.4.1.2. Méthodes non invasives

##### 1.4.1.2.1. Test respiratoire à l'urée marquée

Le test respiratoire à l'urée marquée (TRU) ou breath test consiste à mettre en évidence l'activité uréasique de *H. pylori* en faisant ingérer au patient de l'urée marquée au  $^{13}\text{C}$ , puis à détecter le  $^{13}\text{CO}_2$  dans l'air expiré. Dans un premier temps, le patient ingère une solution d'acide citrique ou de jus d'orange, de façon à retarder la vidange gastrique : le  $^{13}\text{C}$  est retenu plus longtemps dans l'estomac, ce qui améliore l'efficacité du test et diminue la quantité d'urée marquée ingérée. Un premier recueil

de l'air expiré est effectué à T0, un second à T30. L'analyse consiste à mesurer, à l'aide d'un spectromètre de masse, la différence entre T30 et T0 du ratio  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  dans l'air expiré. Une différence supérieure au seuil de la technique témoigne de la présence de *H. pylori*. C'est le meilleur test non invasif pour diagnostiquer une infection, ainsi que pour mettre en évidence l'éradication de *H. pylori* (en pratique, il est réalisé 4 semaines après l'arrêt du traitement chez un sujet à jeun) (22) (Tableau 4). Un test négatif est synonyme de guérison. En cas de résultat positif, une nouvelle endoscopie devra être pratiquée, avec mise en culture de la biopsie et antibiogramme, afin d'instaurer un traitement adapté.

**Tableau 4 : Avantages et inconvénients des tests non invasifs.**

Tableau reproduit d'après Haute Autorité de Santé (20).

	Sérologie	Test respiratoire à l'urée marquée	Recherche d'antigène dans les selles
Performances	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Bonnes pour le diagnostic préthérapeutique (mais variables selon les trousse, sensibilité, spécificité &gt; 90 % pour certains tests Elisa).</li> <li>- Non adapté pour le contrôle d'éradication.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Bonnes pour le diagnostic préthérapeutique et le contrôle d'éradication (sensibilité, spécificité &gt; 90 %).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Bonnes pour le diagnostic préthérapeutique et le contrôle d'éradication (sensibilité, spécificité &gt; 90 % pour les tests Elisa monoclonaux).</li> </ul>
Avantages	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Seul test à ne pas se négativer sous IPP ou d'ATB.</li> <li>- Non influencé par la charge bactérienne.</li> <li>- Faible coût, large disponibilité, facile à réaliser.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Fiabilité du transport des échantillons d'air expiré en tubes bouchés.</li> <li>- Facile à réaliser.</li> <li>- Mesure objective du résultat, reproductibilité.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Test réalisable en laboratoire non spécialisé.</li> </ul>
Inconvénients	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Variabilité de performance des trousse (parfois insuffisantes pour certains tests rapides).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Nécessité d'arrêt des ATB 4 semaines avant et des IPP 2 semaines avant.</li> <li>- Nécessité d'être à jeun.</li> <li>- Sensibilité diminuée en cas d'ulcère hémorragique, de gastrite atrophique et de tumeurs gastriques.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Nécessité d'arrêt des ATB 4 semaines avant et des IPP 2 semaines avant.</li> <li>- Nécessité d'avoir un transit normal.</li> <li>- Nécessité de recueillir et manipuler des selles puis de conserver le prélèvement au frais jusqu'à son analyse.</li> <li>- Sensibilité diminuée en cas d'ulcère hémorragique, de gastrite atrophique et de tumeurs gastriques.</li> </ul>
Remboursement	Oui.	Non pour le diagnostic initial, oui pour le contrôle d'éradication.	Non.

#### 1.4.1.2.2. Sérologie

D'après les recommandations de la HAS (20), la sérologie peut être proposée pour le diagnostic d'une infection à *H. pylori*, notamment en cas de prise récente d'antibiotique, de traitement au long cours par inhibiteur de la pompe à protons, en cas d'ulcère hémorragique, de LGM et de gastrite atrophique extensive (22). C'est un test sensible et spécifique. Les IgG apparaissent 3 semaines après le début de l'infection et diminuent de manière significative 4 à 6 mois après l'éradication. La généralisation des tests ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) utilisant un mélange d'antigènes pariétaux purifiés enrichis d'antigènes bactériens immunogènes permet d'obtenir de bonnes performances diagnostiques de la sérologie : un résultat sérologique négatif permet d'exclure avec une forte probabilité une infection à *H. pylori* (valeur prédictive négative élevée). Une sérologie positive a valeur de dépistage avant la réalisation de l'endoscopie et permet de confirmer l'infection en cas de résultats équivoques des autres méthodes (ulcère hémorragique, traitement antibiotique...).

#### 1.4.1.2.3. Antigène dans les selles

La recherche d'antigène dans les selles présente un intérêt particulier chez l'enfant pour lequel le recueil d'air expiré peut poser problème. Il peut être utilisé dans le diagnostic et le suivi de l'éradication (22). Il est nécessaire d'utiliser un antigène monoclonal et de respecter les conditions de réalisation du test (arrêt des antibiotiques depuis quatre semaines et des IPP depuis deux semaines). Différents kits commerciaux existent. Ce test n'est pas remboursé.

### 1.4.2. Traitement

Les taux de résistance aux antibiotiques sont en train d'augmenter dans le monde entier mais varient selon les régions (22). En France, une étude menée en 2014 par le Centre National de Référence des Campylobacters et des Hélicobacters (CNRCH) a confirmé (par culture avec antibiogramme) un taux de résistance primaire à la clarithromycine de 22,2 %, au métronidazole de 45,9 %, à la

lévofloxacine de 15,4 % et à l'amoxicilline de 0,7 %. Aucune résistance à la tétracycline n'a été observée (30).

La détermination de la sensibilité de la bactérie aux antibiotiques peut être réalisée par culture avec antibiogramme. Le principal avantage de cette technique est de pouvoir tester l'efficacité de tous les antibiotiques. Les inconvénients sont la durée d'obtention des résultats (7 à 12 jours) et que l'antibiogramme est réalisé sur une gélose de Mueller-Hinton additionnée de 10 % de sang de cheval qui n'est pas commercialisée. Le CA-SFM autorise maintenant la réalisation d'antibiogramme sur milieu Mueller-Hinton additionné de 5 % de sang défibriné de cheval et 20 mg/L de  $\beta$ -NAD (Nicotinamide Adénine Dinucléotide) (MH-F).

Il est possible de rechercher également la résistance à la clarithromycine ou à la lévofloxacine (sensibilité inférieure) par des techniques d'amplification génique couplées à l'hybridation sur bandelettes mais aucune n'est remboursée (22) (31).

Les techniques d'amplification génique sont particulièrement performantes pour la détection des mutations associées à la résistance à la clarithromycine, situées au niveau du gène de l'ARNr 23S, en général A2143G, A2142G et A2142C. Ces trois mutations sont les plus fréquentes en Europe même si la mutation A2142C représente moins de 7 % des mutations (32).

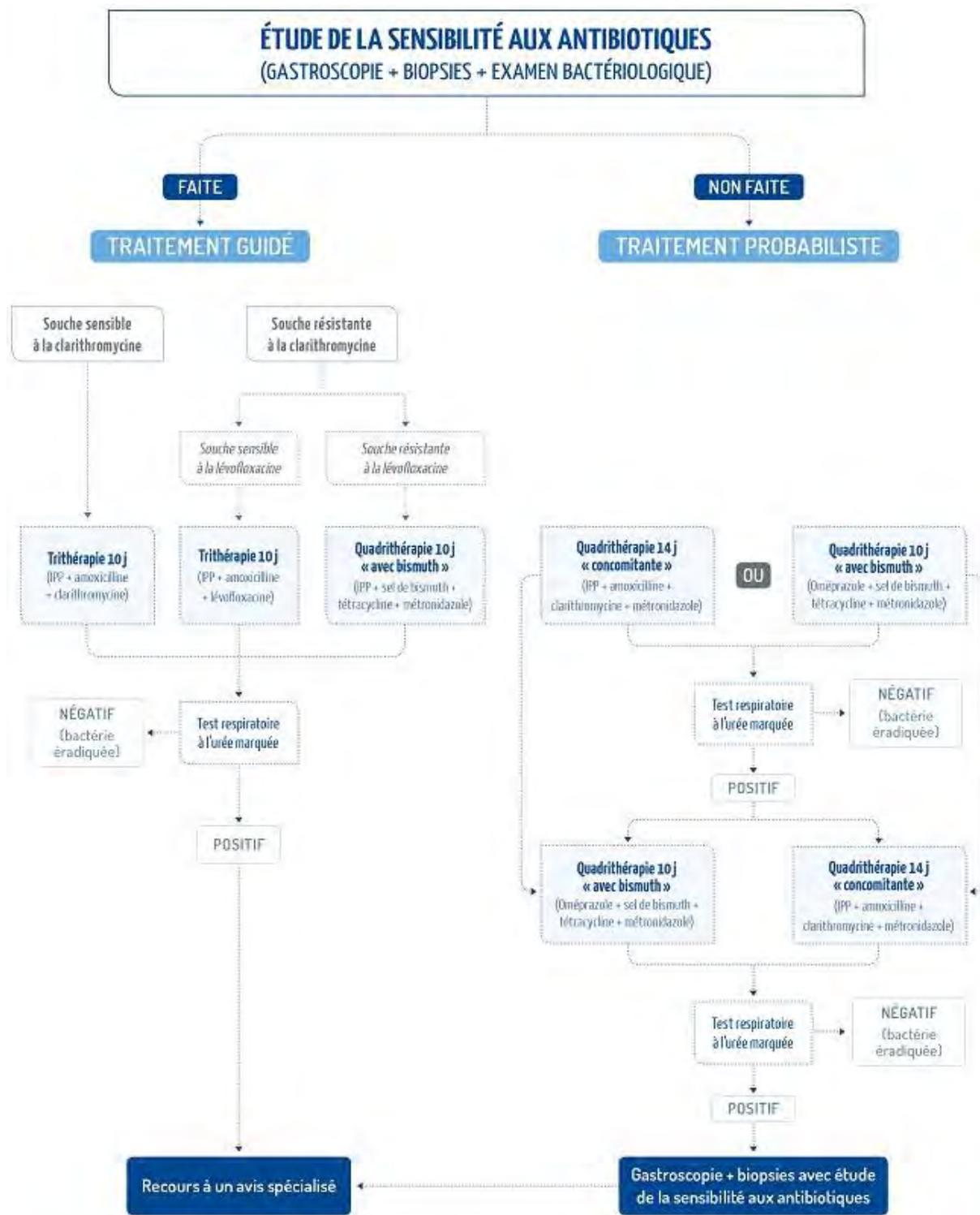
Les techniques d'amplification génique sont réalisables directement sur des biopsies gastriques. Outre les bonnes performances de ces examens, leurs principaux avantages sont la durée d'obtention des résultats en quelques heures, les conditions pré-analytiques moins contraignantes que pour la culture avec antibiogramme et l'automatisation possible (32).

Les techniques d'amplification génique sont capables de détecter des traces même minimales de souches génétiquement résistantes ainsi que des doubles populations avec coexistence au sein d'une même biopsie de clones sensibles et de clones résistants à la clarithromycine (notion d'hétérorésistance) (32). Si une population résistante est détectée, il faut proscrire l'utilisation des macrolides.

Pour la détermination de la sensibilité à la lévofloxacine, les techniques détectent diverses mutations au niveau du gène *gyrA* (codons 87 et 91 de la

Quinolone Resistance-Determining Region (QRDR)) associées à la résistance à la lévofloxacine.

Lorsque l'on dispose d'une étude de la sensibilité aux antibiotiques chez un patient, le traitement recommandé est une trithérapie guidée associant un IPP et deux antibiotiques pendant 10 jours (Figure 6). En cas de sensibilité à la clarithromycine, il est recommandé de prescrire une trithérapie associant un IPP, l'amoxicilline et la clarithromycine. En cas de résistance à la clarithromycine, il est recommandé de prescrire une trithérapie associant un IPP, l'amoxicilline et la lévofloxacine si la souche est sensible. A défaut, il est recommandé de prescrire une quadrithérapie « avec bismuth » 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 ».



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

**Figure 6 : Algorithme de traitement en cas d'infection à *Helicobacter pylori* chez l'adulte (ne s'applique pas à la femme enceinte ou allaitante).**

Figure reproduite d'après Haute Autorité de Santé (20).

En l'absence d'évaluation de la sensibilité aux antibiotiques, le traitement sera probabiliste. Dans ce cas, il est recommandé en première ligne de traitement une :

- quadrithérapie « concomitante » de 14 jours associant un IPP, de l'amoxicilline, de la clarithromycine et du métronidazole ou ;
- quadrithérapie « avec bismuth » de 10 jours associant l'oméprazole avec un sel de bismuth, la tétracycline et le métronidazole.

La quadrithérapie avec bismuth est à privilégier en cas de prise antérieure de macrolide ou d'allergie à l'amoxicilline vraie.

En cas d'échec d'éradication, il ne faut pas prescrire de nouveau la quadrithérapie utilisée en première ligne et il faut vérifier l'observance. Après échec d'un traitement par quadrithérapie « avec bismuth » chez un patient allergique à l'amoxicilline, il est recommandé de prescrire un traitement orienté par l'évaluation de la sensibilité aux antibiotiques.

En cas d'échec d'éradication après 2 lignes de traitement, il est recommandé de réaliser une gastroscopie avec biopsies pour étudier la sensibilité de la bactérie aux antibiotiques par culture avec antibiogramme.

## **1.5. Facteurs de virulence**

### **1.5.1. Facteurs de colonisation**

#### **1.5.1.1. Uréase**

*H. pylori* exprime une uréase produite en quantité abondante (6 à 10 % des protéines totales) qui hydrolyse l'urée présente dans l'environnement gastrique, permettant une production d'ammoniac et de carbonate. Cette hydrolyse entraîne une augmentation de pH et la survie de la bactérie (33). Les données de cristallographie montrent que l'uréase de *H. pylori* forme un complexe dodécamérique [(UreAUreB)<sub>3</sub>]<sub>4</sub> contenant 12 sous-unités catalytiques (*UreB*) fixant chacune 2 ions de nickel (24 ions/molécule) et formant un complexe sphérique extrêmement compact, conférant à l'enzyme une résistance à l'acidité (34).

### 1.5.1.2. *Mobilité et chimiotactisme*

La mobilité de *H. pylori* est un facteur indispensable à la colonisation de la muqueuse gastrique par la bactérie. *H. pylori* possède 2 à 6 flagelles polaires, engainés et une morphologie spiralée qui lui permettent, lors de son ingestion, d'abrèger son séjour dans le suc gastrique, de pénétrer dans la couche de mucus et de s'y mouvoir.

*H. pylori* présente une réponse chimiotactique positive vis-à-vis de l'urée, du bicarbonate de sodium et de certains acides aminés (35).

### 1.5.1.3. *Facteurs d'adhérence*

Après avoir quitté la lumière gastrique, *H. pylori* traverse le mucus où la bactérie se multiplie. Une faible proportion atteint la surface des cellules épithéliales et y adhèrent grâce à l'expression d'adhésines (36). Il a été montré que pour l'adhésine codée par le gène *babA* (*blood group antigen-binding adhesin A*), le récepteur cellulaire était l'antigène fucosylé Lewis b (37). L'adhésine codée par le gène *sabA* (*sialic acid-binding adhesin A*) reconnaît comme récepteur une forme sialylée des motifs Lewis X (38). Ces antigènes Lewis sont similaires à ceux des groupes sanguins et sont présents à la surface des cellules épithéliales gastriques. Il existe deux allèles pour le gène *babA*, *babA1* et *babA2*. Les souches *babA2* sont associées aux pathologies plus graves comme l'ulcère et l'adénocarcinome mais pas au LGM (39) (40) (41) (42).

### 1.5.2. *Facteurs de persistance*

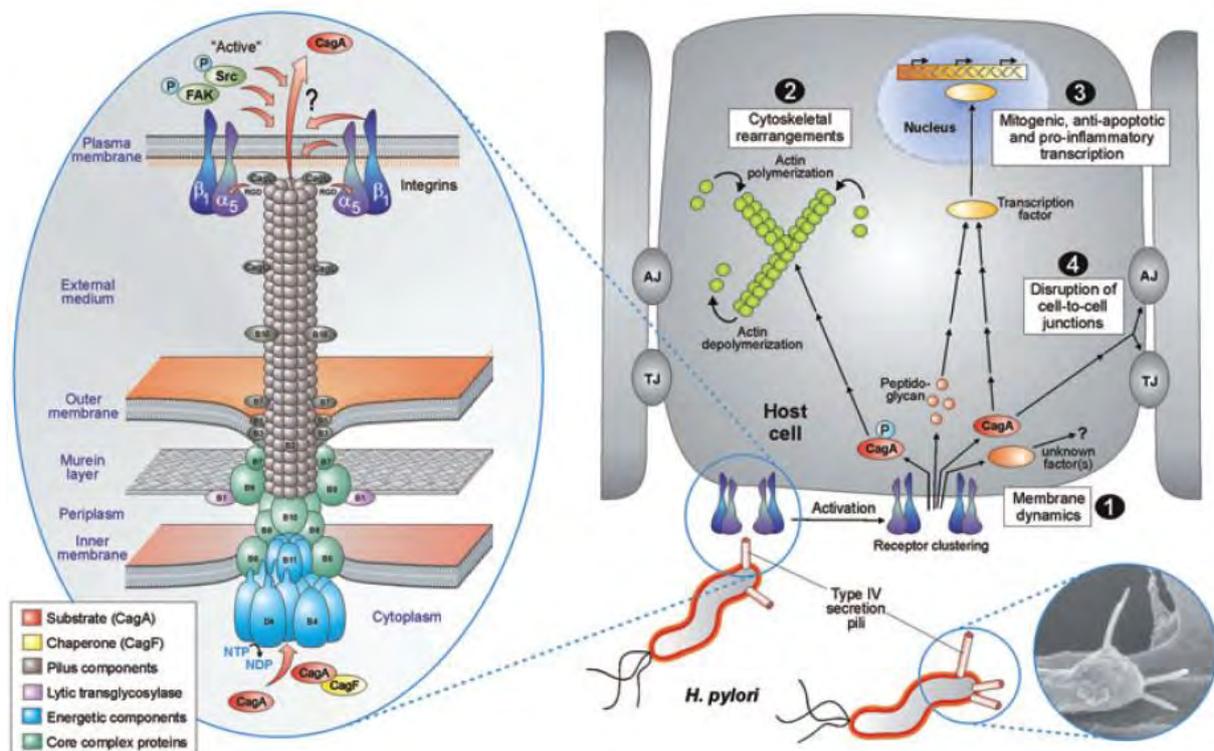
Dès les premières étapes de l'infection, l'organisme infecté met en place une réponse humorale et cellulaire spécifique dirigée contre la bactérie. En dépit de cette réponse, *H. pylori* est capable de persister et de se maintenir durant des décades, il faut donc qu'il dispose de moyens qui lui permettent de résister ou d'échapper aux mécanismes de défense innée ou acquise. Trois enzymes permettent à *H. pylori* de résister au stress oxydatif généré par les cellules phagocytaires : la superoxyde dismutase (SOD) qui décompose les ions superoxydes en peroxyde d'hydrogène et en oxygène (43), la catalase qui dégrade le peroxyde d'hydrogène en eau et en

oxygène (44) et enfin l'alkylhydroperoxyde réductase (Ahp) (45). Indépendamment de ces mécanismes enzymatiques d'échappement à la réponse immunitaire, l'abondante quantité d'antigènes relargués dans le milieu extracellulaire pourrait saturer les anticorps locaux et rendre inefficace la réponse immunitaire locale (46).

### 1.5.3. Facteurs de pathogénicité

#### 1.5.3.1. Ilot de pathogénicité *cag*

Les souches de *H. pylori* peuvent être classées en deux catégories : celles qui possèdent un îlot de pathogénicité *cag* (*cytotoxin-associated gene A PAI*) complet et fonctionnel et celles qui en sont totalement ou partiellement dépourvues (47). L'îlot code pour un appareil de sécrétion de type IV capable de transloquer la protéine CagA, de masse moléculaire variable (120-140 kDa), dans les cellules (48) (49). Une fois transloquée, la protéine CagA est phosphorylée sur des résidus tyrosines par une kinase cellulaire et forme un complexe avec une protéine homologue à Src qui induit une voie de signalisation impliquée dans le réarrangement de l'actine du cytosquelette et le phénotype de type « colibri » (forme allongée des cellules) (50). L'acquisition du phénotype « colibri » mime la transition épithéliomésenchymateuse avec une augmentation de l'expression des marqueurs des cellules mésenchymateuses (y compris ZEB1) et une diminution des marqueurs des cellules épithéliales (miR-200 et E-cadhérine) (51) (52). D'autre part, ces cellules expriment à haut niveau CD44, marqueur des cellules souches cancéreuses gastriques, et possèdent des caractéristiques identiques aux cellules souches cancéreuses telles qu'une plus grande capacité de migration, d'envahissement et de formation de tumeursphères (53). L'interaction conduit aussi à l'induction de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires - interleukine 8 (IL), IL-12 et TNF- $\alpha$  - par l'activation du facteur nucléaire kappa B (NF- $\kappa$ B) (54). En outre, l'injection - via l'îlot *cagPAI* - de résidus du peptidoglycane active le récepteur intracellulaire Nod1 (Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 1) puis en cascade NF- $\kappa$ B qui est responsable de l'activation des réponses pro-inflammatoires, telles que la sécrétion d'IL-8 (55) (Figure 7).



**Figure 7 : Rôle du système de sécrétion de type IV dans la signalisation cellulaire induite par *Helicobacter pylori*.**

Figure reproduite d'après Backert *et al.* (56).

Les fonctions cellulaires de CagA n'exigent pas toujours sa phosphorylation. Les interactions indépendantes de la phosphorylation induisent une rupture des jonctions serrées et adhérentes, une perte de polarité cellulaire, des réponses pro-inflammatoires et mitogéniques.

### 1.5.3.2. Toxine vacuolisante VacA

Toutes les souches de *H. pylori* possèdent une copie du gène codant la toxine vacuolisante VacA. Les analyses de spectrométrie de masse montrent que la taille réelle de VacA est de 124 kDa comprenant le peptide signal (3 kDa), la toxine sécrétée (88,2 kDa) et le domaine carboxyterminal (33 kDa) (57). La toxine existe sous la forme d'un complexe multimérique de haut poids moléculaire présentant une structure en « fleur » comptant six ou sept « pétales », constitués chacun par

l'association des deux polypeptides de 33,4 et 54,8 kDa (monomère de 88,2 kDa) (58). La forme oligomérique de VacA présente une faible activité sauf lorsqu'elle est exposée à pH acide ou alcalin, pH auxquels la protéine se monomérise (59). *In vitro*, VacA est associée à une vacuolisation lors de l'accumulation de VacA dans les membranes endosomales des cellules épithéliales provoquant une cytotoxicité par apoptose (60). Deux allèles de la région centrale de *vacA* (*m1* et *m2*), deux allèles de la région codant la séquence signal (*s1* et *s2*) et 3 allèles de la région intermédiaire (*i1*, *i2* et *i3*) ont été identifiés. Le génotypage de *vacA* en fonction des allèles (*s1*, *s2*, *m1*, *m2*, *i1*, *i2* et *i3*) a été utilisé et corrélé au niveau de l'activité cytotoxique de VacA qui leur est associés : 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* de *vacA* sont dépourvues d'activité cytotoxique (61). Par ailleurs, les souches exprimant la toxine à partir du génotype *s1/m2* produisent des quantités suffisantes de VacA avec une structure apparemment normale. Plusieurs études ont démontré que les infections gastriques avec des souches de *H. pylori* contenant les allèles *vacA* de type *s1*, *m1* ou *i1* sont associées à un risque plus élevé de développer un ulcère que ne le sont les souches portant l'allèle *s2*, *m2* ou *i2* (61).

#### 1.5.3.3. Lipopolysaccharide

Chimiquement, le lipopolysaccharide (LPS) est composé d'une région polysaccharidique (chaîne O) attachée à une région lipidique (le lipide A) ancrée dans la membrane externe. Il porte des résidus fucosylés associés à l'expression des antigènes Lewis similaires à ceux que l'on rencontre au niveau des cellules gastriques et plus précisément au niveau de la pompe à protons ( $H^+-K^+$  ATPase gastrique) présente dans les canalicules des cellules pariétales (62). Or, cette pompe à protons, responsable de la sécrétion acide gastrique, est connue pour être la cible d'auto-anticorps développés au cours de la gastrite auto-immune. Il a donc été suggéré que ces auto-anticorps pourraient être induits par mimétisme moléculaire en réponse à l'infection par *H. pylori* et que les anticorps produits reconnaîtraient les motifs Lewis de la muqueuse gastrique et seraient à l'origine du développement d'une gastrite auto-immune conduisant à l'atrophie fundique (63). La chaîne O du

LPS de *H. pylori* a aussi une composition similaire aux antigènes de type Lewis X ou Y des groupes sanguins. 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 (64) (65). De plus, suite à des modifications constitutives par différents enzymes, de fortes concentrations du LPS de *H. pylori* sont nécessaires pour activer le Toll-Like Receptor 4 (TLR) comparativement à ce qui est observé pour le LPS de *Escherichia coli* (66) (67). Ces modifications du lipide A du LPS permettent alors à *H. pylori* d'échapper à la reconnaissance des TLR, donc à la réponse immunitaire innée et ainsi favorisent la persistance bactérienne.

## 2. Réponse de l'hôte

*H. pylori* provoque une forte réponse immunitaire innée puis adaptative, stimulant l'expression des cytokines et des chimiokines pro-inflammatoires des cellules épithéliales gastriques. Celles-ci attirent les polynucléaires neutrophiles (PNN), les macrophages, les cellules dendritiques, les lymphocytes NK (Natural Killer), B et T, et induisent la libération de dérivés réactifs de l'oxygène (Reactive Oxygen Species, ROS) (68). Ceci conduit à une inflammation active chronique caractéristique de l'infection à *H. pylori* pouvant aboutir à une altération de l'épithélium.

### 2.1. Immunité innée

Les récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (Pattern Recognition Receptors, PRR) exprimés par les cellules épithéliales gastriques interagissent avec *H. pylori* et activent l'expression des gènes pro-inflammatoires. Ces motifs moléculaires, qui comprennent les TLR et les récepteurs de type Nod (Nod-Like Receptors, NLR), reconnaissent les motifs moléculaires associés aux pathogènes (Pathogen-Associated Molecular Patterns, PAMP) tels que le LPS, les flagellines et la paroi cellulaire (peptidoglycane) (69). Comme nous l'avons vu dans le paragraphe 1. 5. 3. 3., certains PAMP de *H. pylori* sont modifiés pour activer faiblement les PRR et échapper à la réponse immunitaire innée, et ainsi favoriser la persistance bactérienne.

Comme nous l'avons également vu précédemment, l'interaction du système de sécrétion de type IV (T4SS), encodé par *cagPAI*, avec les cellules épithéliales gastriques entraîne le transfert de peptidoglycanes dans le cytoplasme, l'activation de Nod1 et l'expression de gènes pro-inflammatoires. L'interaction conduit aussi à l'induction de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires - IL-8 et IL-12 - par l'activation du NF- $\kappa$ B. Ceci permet le recrutement et l'activation de PNN au niveau du site de l'infection, ceux-ci amplifiant la réponse pro-inflammatoire en sécrétant des cytokines pro-inflammatoires afin de recruter et d'activer les macrophages, les cellules dendritiques et les lymphocytes pour avoir une réponse plus spécifique et l'induction d'une réponse adaptative. Les PNN contribuent aussi à la gastrite en libérant des facteurs endommageant les tissus à partir de leurs granules. Ils phagocytent également les bactéries au sein des phagolysosomes, celles-ci sont alors exposées à des facteurs bactéricides, y compris la myéloperoxydase et les métalloprotéinases matricielles qui dégradent les parois cellulaires et les protéines, et aux ROS qui induisent des dommages à l'ADN (Acide Désoxyribonucléique). Comme nous l'avons vu dans le paragraphe 1. 5. 2., *H. pylori* prévient cette explosion oxydative.

Les macrophages sont aussi présents dans la muqueuse gastrique infectée et sécrètent des cytokines pro-inflammatoires et de l'oxyde nitrique, et ont donc une puissante activité bactéricide. *H. pylori* est capable de survivre à la phagocytose par les macrophages car il induit la fusion des phagosomes pour former des mégasomes sans fusion lysosomale (70). Les mégasomes fournissent alors une niche intracellulaire protégée et peuvent même contribuer à la persistance de l'infection (71).

Enfin, les lymphocytes NK sont abondants dans la muqueuse gastrique infectée. La perforine et les granzymes dérivés des lymphocytes NK peuvent endommager les cellules hôtes. Les cellules NK répondent à l'infection par *H. pylori* en sécrétant des cytokines pro-inflammatoires telles que l'interféron  $\gamma$  (IFN) et le TNF- $\alpha$  (72).

## 2.2. Immunité adaptative

L'infection par *H. pylori* induit une forte réponse des lymphocytes T, qui comprend à la fois les lymphocytes T CD4+ (T auxiliaires, T helper, Th) et T CD8+ (T cytotoxique), ces-derniers contribuant à l'inflammation (73).

Concernant les lymphocytes T CD4+, les principales sous-populations induites par l'infection par *H. pylori* sont les pro-inflammatoires Th1 et Th17 et les anti-inflammatoires T régulateurs (Treg). Les lymphocytes Th1, qui sont favorisés par l'augmentation de la production d'IL-12 par les macrophages activés, sécrètent des cytokines pro-inflammatoires (IFN- $\gamma$  et TNF- $\alpha$ ) qui stimulent les macrophages à sécréter d'autres cytokines pro-inflammatoires et ont donc une activité bactéricide (74) (68). Les lymphocytes Th17 sécrètent de l'IL-17, IL-21 et IL-22. Cela conduit à une augmentation de l'inflammation et du recrutement des PNN (75). La sévérité de la gastrite est donc en corrélation avec le nombre de lymphocytes Th1 et Th17.

## 3. Lymphome gastrique du MALT

### 3.1. Physiopathologie

La muqueuse gastrique ne contient normalement pas de tissu lymphoïde, mais une infiltration lymphoïde associée aux muqueuses apparaît presque toujours en réponse à la colonisation par *H. pylori*. Dans de rares cas, une population monoclonale de lymphocytes B peut émerger de ce tissu et proliférer lentement pour former un LGM. C'est une néoplasie lymphoïde faite de petits lymphocytes B matures. C'est un lymphome non Hodgkinien indolent, de bas grade, de la zone marginale extraganglionnaire.

Le lien entre l'infection à *H. pylori* et le LGM est clairement établi et repose sur des preuves épidémiologiques, pathologiques, cliniques et bactériologiques (76). L'infection à *H. pylori* peut être démontrée sérologiquement chez la plupart des patients et la bactérie peut être histologiquement identifiée dans la muqueuse gastrique de la majorité des patients atteints de LGM. Dans la première étude dans laquelle l'association du LGM avec l'infection à *H. pylori* a été examinée, la bactérie était présente dans plus de 90 % des cas alors que la prévalence de l'infection était

plus faible (77). En outre, la muqueuse gastrique contient normalement peu de lymphocytes mais leur nombre augmente dans le cas de l'infection à *H. pylori* menant à la gastrite chronique et ils peuvent alors s'organiser en follicules lymphoïdes, ce qui représente la première étape proposée de l'infiltration lymphoïde dans la lymphomagenèse du MALT (78). En effet, la prolifération continue des lymphocytes chez les patients infectés par *H. pylori* dépend de la présence de lymphocytes T activés de manière spécifique par les antigènes de *H. pylori* et/ou des effets oncogéniques directs des protéines de *H. pylori* sur les lymphocytes B (79). L'importance de cette stimulation *in vivo* a été clairement démontrée par les rémissions de LGM après une antibiothérapie pour éradiquer *H. pylori* (80).

Les lymphocytes T jouent un rôle clé dans la réponse immunitaire adaptative dans le LGM. Comme nous l'avons vu dans le paragraphe précédent, la marque distinctive du LGM est le rôle prédominant des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> spécifiques de *H. pylori*. L'infection par *H. pylori* induit initialement une réponse immunitaire de type Th1 médiée par plusieurs cytokines pro-inflammatoires, parmi lesquelles la cytokine IL-1 $\beta$  joue un rôle majeur. Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> spécifiques à *H. pylori* fournissent une puissante aide à l'activation et à la prolifération des lymphocytes B via le CD40-CD40L et les cytokines Th2 telle que l'IL-4 dans les réponses thymodépendantes (79). Des membres de la famille du TNF assurent aussi la costimulation comme BAFF ou APRIL produits par des cellules dendritiques dans les réponses thymo-indépendantes. Ceci provoque une réponse polyclonale des lymphocytes B. En revanche, les lymphocytes T cytotoxiques des patients atteints de LGM présentent un défaut de cytotoxicité médiée par la perforine et une faible capacité à induire l'apoptose induite par FasL-Fas, permettant ainsi la croissance des lymphocytes B et facilitant l'apparition du lymphome (81). De plus, l'infection à *H. pylori* est associée à la production de ROS par les PNN endommageant l'ADN, ce qui pourrait jouer un rôle dans l'acquisition d'altérations génétiques. L'infection par *H. pylori* s'accompagne également d'une infiltration de lymphocytes producteurs de TGF- $\beta$  (Transforming Growth Factor  $\beta$ ), suggérant ainsi que les cytokines régulatrices sécrétées par les lymphocytes Treg - notamment l'IL-10 - peuvent contrecarrer les effets des lymphocytes Th1 (c'est-à-dire producteurs de IFN- $\gamma$ ). Ces lymphocytes T régulateurs peuvent donc également bénéficier au pathogène en

aidant à prolonger la chronicité de l'infection en supprimant les réponses immunitaires protectrices.

Cette stimulation antigénique conduit initialement à une hyperplasie lymphoïde mais, dans de rares cas, l'acquisition d'aberrations génétiques supplémentaires aboutit à l'activation des voies de survie intracellulaires, à la progression de la maladie due à la prolifération et à l'émergence d'un clone malin, et à la résistance à l'apoptose pour former un LGM avec des lymphocytes B monoclonaux exprimant des marqueurs moléculaires de la zone marginale (CD20+, CD79a+, Bcl2+ (B-cell lymphoma 2), IgM+, cycline D1-, CD5-, CD10-, IgD- et IRTA-1+). Ce LGM, une fois établi, devient indépendant de la présence de *H. pylori*. En effet, étant donné la prévalence élevée de l'infection dans la population mondiale par rapport à la prévalence faible du LGM, d'autres facteurs entrent en considération dans le développement de cette pathologie. De plus, la détectabilité de *H. pylori* diminue à mesure que l'histologie progresse de la gastrite chronique au LGM (77). L'indépendance de *H. pylori* est une caractéristique de la progression du lymphome, associée à l'acquisition de modifications génétiques supplémentaires. Parmi les plus caractérisées, on trouve la formation de l'oncogène de fusion *MALT1-API2* par la translocation t(11:18). Ceci conduit à l'expression de *API2* (codant pour l'inhibiteur cellulaire de l'apoptose 2) sous le contrôle du promoteur *MALT1* (82). *MALT1* code pour une protéine essentielle pour l'activation et la prolifération des lymphocytes T et B, et joue également un rôle fondamental dans l'activation de NF-κB. L'un des effets en aval de cette protéine de fusion est le clivage amélioré de la kinase inductrice de NFK (NFKK), qui est un régulateur critique de la signalisation NF-κB (83).

### **3.2. Facteurs de virulence des souches de lymphome**

Il est maintenant établi que les souches de *H. pylori* exprimant la protéine CagA ne sont pas associées au LGM de bas grade (84) (Tableau 5).

**Tableau 5 : Spécificités des souches de LGM.**

Tableau reproduit d'après Floch *et al.* (40).

Facteurs de virulence	Association avec le LGM
CagA	Implication controversée. <i>cagPAI</i> est présent dans seulement 50 % des souches isolées de LGM. Association avec un lymphome de haut grade discutable.
VacA	Allèle <i>vacAm2</i> prédominant dans les souches de LGM (génotype associé à l'activité biologique la plus faible)
BabA	Aucune association avec le LGM.
SabA	
Autres adhésines	
Antigènes lipopolysaccharidiques	Les souches <i>cagPAI</i> négative de LGM exprimaient des antigènes de Lewis Y, précédemment associés à des manifestations auto-immunes. Stratégie pour échapper à la réponse de l'hôte ?

L'association des allèles de *VacA* avec le LGM a également été étudiée. En effet, l'allèle *m2*, correspondant aux souches les moins actives biologiquement, dépourvues d'activité cytotoxique, prédomine dans les souches de LGM (85).

Les souches de LGM *cagPAI* négative expriment fortement les antigènes de Lewis Y au niveau de leur LPS (86).

### 3.3. Modèles animaux

Les modèles animaux sont essentiels pour l'analyse *in vivo* des maladies liées à *Helicobacter*. Les modèles de rongeurs sont les plus couramment utilisés en particulier la gerbille de Mongolie et la souris.

### 3.3.1. Gerbille de Mongolie

La gerbille de Mongolie a été particulièrement utile pour identifier les facteurs environnementaux et spécifiques à *Helicobacter* qui influencent le développement de l'adénocarcinome gastrique. Elle a été utilisée pour démontrer le potentiel carcinogène de *H. pylori* (87) et *Helicobacter felis* (*H. felis*) (88) (89) (90). *H. felis* a d'abord été isolé de l'estomac d'un chat (91) et a été retrouvé plus tard chez le chien. Lee *et al.* ont démontré qu'il colonisait aussi l'estomac de la souris (92). C'est une espèce fortement pro-inflammatoire (93).

Lorsqu'elles sont colonisées par *H. pylori* ou par *H. felis*, les gerbilles de Mongolie développent des lésions pré-malignes avancées (atrophie, métaplasie, dysplasie) (89). Cependant, l'utilisation de cet animal est compliquée par des problèmes de reproductibilité. Par exemple, Watanabe *et al.* (87) ont rapporté que 5 des 5 gerbilles infectées par la souche TN2GF4 *cagPAI+* de *H. pylori* développaient une métaplasie intestinale 52 semaines post-infection et 10 des 27 gerbilles infectées développaient des adénocarcinomes invasifs 62 semaines post-infection. En revanche, Elfvin *et al.* (94) ont étudié des gerbilles qui ont été colonisées avec les souches SS1 ou TN2GF4 de *H. pylori*. Aucune de ces gerbilles n'a développé d'adénocarcinome invasif et seulement 2 des 5 gerbilles à 12 mois post-infection et 3 des 10 gerbilles à 18 mois post-infection ont développé une métaplasie pseudo-intestinale. Les conditions au sein des différentes animaleries pourraient avoir contribué aux différences dans ces études, en particulier les différences dans le régime alimentaire et le microbiote résident. Ces disparités peuvent également s'expliquer par l'utilisation de souches différentes de *H. pylori*. Enfin, entre ces différentes études, il existe également une hétérogénéité dans les critères utilisés pour définir les lésions observées.

La gerbille de Mongolie a également été utilisée pour adapter les souches de *H. pylori* aux rongeurs. Cela a été le mieux démontré par le passage de la souche B128 de *H. pylori*, dérivée d'un patient souffrant d'ulcération gastrique, dans une gerbille pendant 3 semaines. *H. pylori* a ensuite été recultivé à partir de l'estomac de cet animal et décrit comme la souche 7.13 de *H. pylori*, qui est plus pathogène que la souche B128 (95).

Un inconvénient de la gerbille de Mongolie est le manque d'anticorps disponibles utilisables pour l'immunohistochimie.

### 3.3.2. Souris

La plupart des chercheurs ont choisi d'utiliser des modèles murins en raison de leur grande disponibilité (y compris de nombreux modèles transgéniques), de leurs cycles de reproduction courts et de l'accessibilité des réactifs expérimentaux. La souris de laboratoire est largement utilisée pour modéliser la préneoplasie gastrique.

#### 3.3.2.1. C57BL6

Après une infection par *H. pylori* ou *H. felis*, la réponse immunitaire est principalement polarisée Th1, avec un niveau relativement élevé de lésions des cellules épithéliales gastriques et une réponse hyperproliférative compensatoire, associée à de faibles charges bactériennes (92). *H. felis* induit une inflammation gastrique plus sévère chez les souris C57BL6 que *H. pylori* (96).

Alors que chez l'Homme la gastrite causée par l'inflammation de *H. pylori* est caractérisée par l'accumulation de PNN et de cellules mononuclées dans la muqueuse (97), le recrutement des PNN est beaucoup moins marqué chez les souris infectées par *H. pylori* ou *H. felis*. Les souris C57BL6 et BALB/c infectées par *H. pylori* présentent un afflux marqué de cellules mononuclées (98) (96).

La colonisation par *H. pylori* de souris C57BL6 entraîne une gastrite avec hyperplasie des cellules épithéliales, mais celle-ci ne progresse pas vers l'adénocarcinome (92) (99). Cependant, la colonisation de souris C57BL6 avec *H. felis* conduit systématiquement à une préneoplasie gastrique et lorsque des infections ont persisté pendant 13 à 15 mois, des adénocarcinomes ont été rapportés (100) (101) imitant ainsi la cascade de Correa observée au cours de la carcinogenèse gastrique chez l'Homme. Ce résultat est spécifique au fond génétique C57BL6.

### 3.3.2.2. BALB/c

Les souris en fond génétique BALB/c répondent différemment à l'infection par *H. felis*. Ces souris peuvent être colonisées par *H. felis* mais ne développent pas de pathologie prénéoplasique gastrique (102). Les mécanismes sous-jacents à ces différences entre les fonds génétiques des souris sont attribuables aux différences de réponse immunitaire. Comme nous venons de le voir, les souris C57BL6 présentent une réponse immunitaire polarisée Th1, tandis que les souris BALB/c ont une réponse plus polarisée Th2, ce qui permet à l'infection de persister (avec des niveaux de colonisation bactérienne plus élevés) mais ne favorise pas les lésions épithéliales chroniques (102) (103) (98). Thompson *et al.* ont montré que l'atrophie induite post-infection (caractérisée principalement par la perte de cellules pariétales) était plus importante chez les souris C57BL6 que chez les BALB/c (98).

L'infiltration lymphocytaire est également une caractéristique chez les souris BALB/c après une infection à long terme par *H. pylori* (98). Ces souris ont donc été utilisées comme modèle de LGM induit par *Helicobacter*.

### 3.3.2.3. Souris et LGM

Plusieurs facteurs rendent le LGM induit par *Helicobacter* difficile à modéliser. C'est une conséquence rare de l'infection à *Helicobacter pylori*. Il se développe après une interaction prolongée et complexe entre les bactéries, l'épithélium et le système immunitaire de l'hôte. Entre les études qui se sont intéressées à modéliser cette pathologie chez la souris, il existe également une hétérogénéité dans les critères utilisés pour définir la formation de LGM. La plupart des études décrivent les lésions lympho-épithéliales comme un événement pathognomonique, signifiant l'initiation de la lymphomagenèse. D'autres études ont utilisé des preuves de la formation d'agrégats lymphoïdes monoclonaux comme substitut au développement du LGM.

Enno *et al.* (104) ont rapporté que 25 % des souris BALB/c colonisées par *H. felis* pendant 22 à 26 mois développaient des lésions lympho-épithéliales avancées et 5 % avaient des lésions lympho-épithéliales précoces, associées à des lésions histologiques évocatrices de LGM (à savoir de multiples infiltrats lymphoïdes organisés en follicules). De telles lésions ont aussi été observées chez des souris

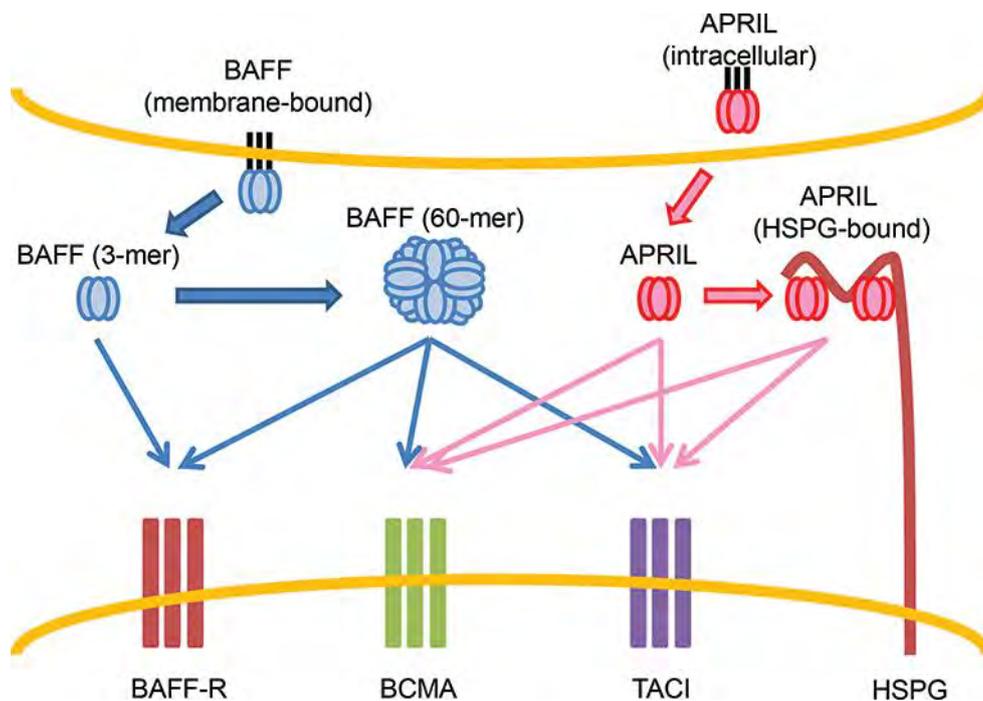
BALB/c infectées par *H. felis* par Sutton *et al.* (105) et chez des souris BALB/c et C57BL6 infectées par *H. pylori* dans l'étude de Wang *et al.* (106). Dans cette dernière, ils ont montré que les LGM pouvaient être induits par certaines souches de *H. pylori* chez des souris BALB/c, mais pas par SS1 (106). Ainsi, les souris C57BL6 semblent être un modèle de LGM de haut grade (107), alors que les souris BALB/c sont décrites comme un modèle de LGM de bas grade (98) (106). Cette dichotomie peut refléter la prédisposition de ces deux fonds génétiques à générer des réponses de type Th1 ou Th2 comme nous l'avons vu précédemment.

Enfin, des souris BALB/c qui ont subi une thymectomie à J3 après la naissance puis infectées à 6 semaines de vie par *Helicobacter* ont été décrites comme un modèle alternatif avec une apparition plus précoce de lymphomagenèse gastrique et dans des proportions plus importantes post-infection (108) (109). Les thymectomies néonatales semblent donc être un modèle intéressant pour étudier la physiopathologie du LGM, mais elles sont très difficiles à mettre en pratique car c'est une chirurgie difficile à maîtriser.

## 4. APRIL

La cytokine APRIL (aussi connu sous le nom de Tumor Necrosis Factor ligand Superfamily member 13 (TNFSF13)) a été identifiée en 1998 par Hahne *et al.* (110). Cette cytokine appartient à la famille du TNF. Elle est étroitement liée à BAFF, un autre membre de cette famille, partageant environ 30 % d'homologie protéique (111). APRIL n'existe pas sous une forme liée à la membrane, elle est sécrétée sous sa forme biologiquement active et a donc une action systémique (112).

APRIL et BAFF se lient à TACI (Transmembrane Activator and CAML Interactor) et BCMA (B-Cell Maturation Antigen) (111) (113). APRIL se lie aussi aux HSPG (Heparanes Sulfates Proteoglycanes) et peut se lier simultanément à BCMA, suggérant que les différentes régions de APRIL sont cruciales pour l'une ou l'autre interaction (114) (115) (Figure 8).



**Figure 8 : Interaction entre BAFF et APRIL et leurs récepteurs.**

Figure reproduite d'après Hirayama *et al.* (116).

APRIL est exprimée par les cellules immunitaires : monocytes, macrophages, PNN, cellules dendritiques, lymphocytes T (110). Elle est également exprimée dans les cellules à l'extérieur du système immunitaire, y compris les ostéoclastes (dans la croissance cellulaire dans le myélome multiple) et les tissus tumoraux (carcinome thyroïdien, adénocarcinome du côlon et aussi lymphome) (110) (117).

APRIL est impliquée dans l'induction et le maintien des réponses B et T. Elle augmente la présentation antigénique aux lymphocytes B (118) (113). Cet effet est médié par BCMA, dont l'expression est « up-régulée » par l'IL-4 et l'IL-6, grâce à sa capacité à activer à la fois les voies de signalisation NF-κB et JNK (c-Jun N-terminal Kinases). Ceci induira l'augmentation de l'expression de molécules de costimulation comme CD40 et CMH II (Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe II) (119). Elle stimule la prolifération des lymphocytes B et améliore leur survie (113). Elle régule la tolérance des lymphocytes B. Elle joue un rôle dans la commutation isotypique des classes d'immunoglobulines en favorisant les IgA. Ceci est médiée par TACI (120) (121). APRIL stimule les lymphocytes T via une production d'IL-2 qui

contribue à leur prolifération accrue. Cet effet est probablement également médié par TACI (122).

Enfin, APRIL favorise la prolifération et la survie des tumeurs notamment le LGM. En 2011, Munari *et al.* (123) ont suggéré que APRIL est produite par les macrophages infiltrant le LGM et que sa libération est déclenchée par stimulation à la fois directe de *H. pylori* et des lymphocytes T spécifiques de *H. pylori*. Ces résultats mettent donc en évidence que APRIL peut être impliquée dans le développement du LGM chez les patients infectés par *H. pylori*. D'autre part, il a été montré que BAFF et TACI étaient surexprimés au stade LGM, notamment par Floch *et al.* (124). Or comme nous l'avons vu précédemment, il y a une certaine homologie protéique entre les différents membres de la famille du TNF. La forme humaine de APRIL comporte environ 80 % d'homologie protéique avec la forme murine.

Des souris transgéniques APRIL exprimant la forme humaine de la cytokine APRIL au niveau des lymphocytes T (grâce à un promoteur spécifique) ont initialement été développées pour acquérir des connaissances expérimentales sur son action et ainsi de s'affranchir de l'action de son homologue BAFF. Ces dernières ont été générées en insérant la région codant l'ADN complémentaire de APRIL humaine dans un vecteur de ciblage contenant le promoteur distal Ick (lymphocyte-specific protein tyrosine kinase) fusionné aux séquences introniques et de polyadénylation de l'hormone de croissance humaine (125). La construction résultante a été injectée dans des embryons C57BL6 et BALB/c. Leur progéniture a été criblée par PCR. Le laboratoire INSERM U1053 (Equipe du Pr. Philippe Lehours) a développé ce modèle de souris transgéniques APRIL (en fonds génétiques C57BL6 et BALB/c), sous sa forme humaine, infectées par différentes espèces du genre *Helicobacter* dans l'espoir de disposer d'un modèle alternatif de LGM. Les souris de type sauvage (Wild-Type, WT) C57BL6 et BALB/c exemptes de *Helicobacter* ont été obtenues auprès de Charles River Laboratories (L'Arbresle, France). Les souris transgéniques APRIL C57BL6 et BALB/c ont été fournies par le Dr. Michael Hahne (Université de Montpellier, Institut de Génétique Moléculaire de Montpellier, UMR5535) (122). A partir de ce petits nombres de souris transgéniques, des reproductions en interne ont été lancées afin d'obtenir un nombre de souris sauvages et transgéniques suffisants dans les fonds BALB/c et C57BL6.

## 5. Objectifs

Dans le but d'étudier la physiopathologie du LGM et faute de pouvoir avoir accès à des biopsies gastriques de patients atteints de ce lymphome, le laboratoire où j'ai réalisé ma thèse a développé un modèle de souris alternatif de LGM, plus facile à mettre en place que le précédent basé sur la thymectomie néonatale (109). Ce nouveau modèle utilise des souris en fonds génétiques C57BL6 ou BALB/c, sauvage ou transgéniques APRIL, infectées par des bactéries du genre *Helicobacter* (*H. pylori* ou *H. felis*). Cette cytokine, membre de la famille du TNF, est exprimée sous sa forme humaine au niveau des lymphocytes T sous la dépendance du promoteur distal Ick. A partir du matériel d'étude de ce travail, l'objectif était de comparer les résultats obtenus en fond génétique BALB/c et ceux obtenus en fond C57BL6, déjà publiés par Floch *et al.* (126). Je me suis concentré au cours de ce travail de thèse sur l'étude des réponses histologiques, et sur l'évaluation et la caractérisation des infiltrats lymphoïdes par cytométrie en flux et par immunohistochimie, afin de confronter ces 2 fonds génétiques ayant un transgène identique. Nous avons aussi développé une PCR quantitative (qPCR) afin de quantifier les niveaux de colonisation gastriques par *H. felis*. Cela m'a donc permis de faire un état des lieux sur ce nouveau modèle animal infecté par différentes espèces du genre *Helicobacter*, jamais décrit jusqu'alors.

## 6. Matériels et Méthodes

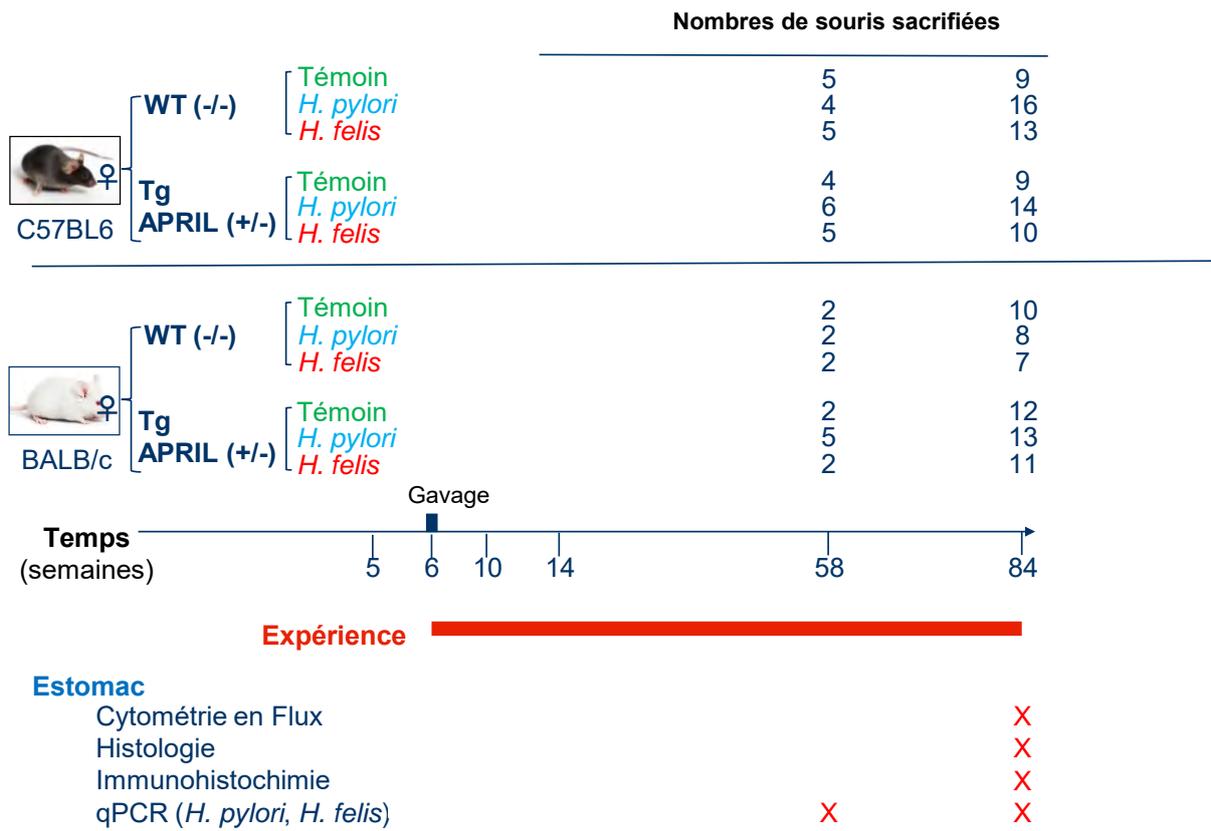
### 6.1. Souches de *Helicobacter* et infection

La souche B47 de *H. pylori*, associée au LGM humain et *cagPAI* négative, a été utilisée pour sa capacité à coloniser les estomacs de souris et à induire des lésions de LGM comme décrit précédemment notamment en modèle de souris thymectomisées (85) (127) (109). *H. felis* CS1 (ATCC 49179 ; ATCC, Manassas, VA) a été utilisée pour sa capacité à induire une inflammation sévère et des lésions de LGM dans des modèles murins comme nous l'avons vu précédemment dans le paragraphe 3.3. (104) (96).

Les souches de *H. pylori* et *H. felis* ont été cultivées sur des géloses dans une enceinte Baker Ruskin Concept (The Baker Company, Sanford, Me) dans des

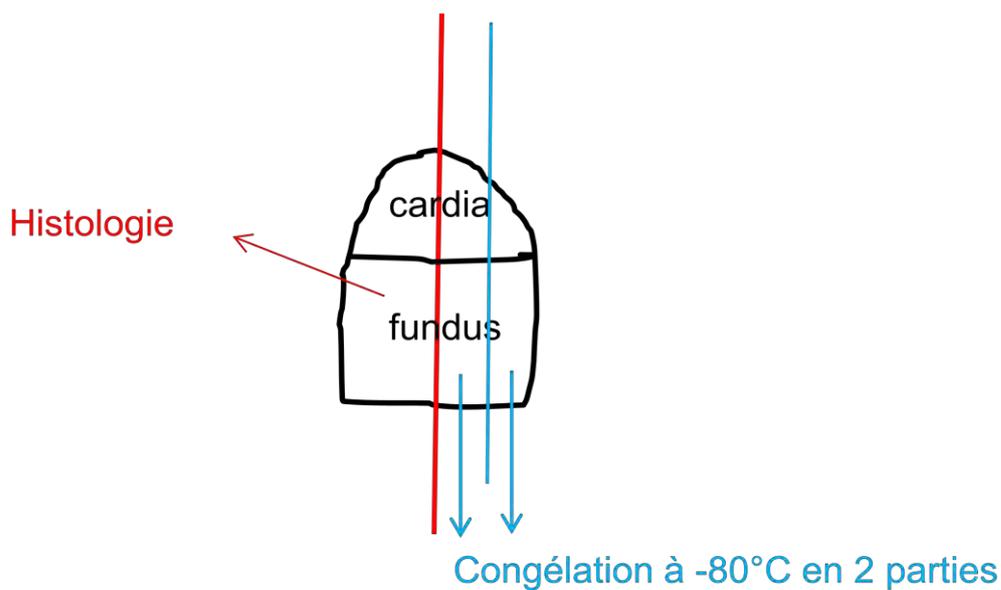
conditions micro-aérobiques (N<sub>2</sub> : 85 % ; O<sub>2</sub> : 5 % et CO<sub>2</sub> : 10 %) à 37°C, comme décrit précédemment (128).

Pour les inoculums d'infection, les souches de *H. pylori* et *H. felis* étaient cultivées en nappe sur des géloses d'agar sélectives, une gélose Pylori commercialisée par bioMérieux (413193, bioMérieux France, Craonne) et une gélose préparée au laboratoire à base de Wilkins Chalgren, de vancomycine, d'amphotéricine B, de cefsulodine, de triméthoprim et de sang humain. Pour obtenir un inoculum bactérien suffisant, les colonies étaient reprises dans un bouillon nutritif *Brucella*. Un état frais était réalisé pour la mobilité, une coloration de Gram pour le caractère morphologique et une recherche d'oxydase, de catalase et d'une activité uréasique (bouillon urée-indole) pour les caractères enzymatiques. Les souris de six semaines ont été soumises à un jeûne pour faciliter la colonisation bactérienne, puis gavées pendant 3 jours consécutifs avec une dose de 10<sup>8</sup> *H. pylori* ou *H. felis* par souris, comme décrit précédemment (20 souris pour chaque groupe) (129). A la fin de l'expérience, 18 mois post-infection, après l'observation macroscopique, la moitié de l'estomac de chaque souris était fixée dans du formaldéhyde et inclus en paraffine pour l'histologie et l'immunohistochimie, une petite partie était congelée à -80°C pour la détermination de la charge bactérienne par qPCR et le reste était utilisé pour l'analyse par cytométrie en flux (Figures 9 et 10).



**Figure 9 : Design de l'étude**

Tg : transgénique



**Figure 10 : Répartition des différentes parties de l'estomac pour les analyses.**

## 6.2. Cytométrie en flux

La partie des estomacs utilisée pour l'analyse par cytométrie en flux a été découpée en petits fragments qui ont ensuite été soumis à deux cycles d'incubation de 20 minutes avec agitation douce à 37°C dans 10 mL de solution saline équilibrée de Hank (sans Ca<sup>2+</sup> et sans Mg<sup>2+</sup>) (Gibco, Life Technologies, Saint-Aubin, France), 1 mmol/L de HEPES (acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique) (Gibco, Life Technologies), 1 mmol/L de dithioérythritol (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) et 10 % de sérum de veau fœtal (Sigma-Aldrich). Les débris ont été éliminés par passage à travers un filtre à cellules Falcon de 70 µm (BD Biosciences, San José, CA). Après filtration, les cellules ont été centrifugées à 1870 g pendant 5 minutes à 4°C, le surnageant a été jeté et les cellules ont été lavées deux fois dans 10 mL de milieu RPMI 1640 (GlutaMAX ; Gibco, Life Technologies) et 8 % de sérum de veau fœtal avant marquage. Toutes les suspensions cellulaires ont été incubées avec du DAPI (4',6-diamidino-2-phénylindole) pour évaluer la viabilité cellulaire (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) dans un volume de 10 mL de tampon phosphate salin, 0,5 % d'albumine de sérum bovin (Gibco, Life Technologies) et 2 mmol/L d'EDTA (Éthylène Diamine Tétra-Acétique) (Sigma-Aldrich) pendant 15 minutes à 4°C. Tous les anticorps marqués ont été achetés auprès de PharMingen/BD Biosciences. Les lymphocytes T ont été caractérisés en utilisant le CD45 de la cellule présentatrice d'antigène (clone 30-F11), le CD3e avec l'isothiocyanate de fluorescéine (Fluorescein Isothiocyanate, FITC) (clone 145-2C11), le CD8a avec la phycoérythrine (PE) cyanine 7 (clone 53-6.7) et le CD4 de la cellule présentatrice d'antigène (clone RM4-5). Les lymphocytes B ont été caractérisés en utilisant le CD21/CD35 de la cellule présentatrice d'antigène (clone 7G6), le CD5 avec le FITC (clone 53-7.3), l'IgM avec la PE cyanine 7 (clone R6-60.2) et le B220 avec la PE (clone RA3-6B2). Les cellules ont été lavées une fois et analysées sur un cytomètre en flux LSRFortessa (BD Biosciences) en utilisant le logiciel FACS Diva version 8.0.1 (BD Biosciences).

## 6.3. Histologie

Des coupes histologiques de 3 µm d'épaisseur provenant de la moitié de l'estomac de chaque souris inclus en paraffine ont été coupées au microtome et

déposées sur des lames. Elles ont été déparaffinées et hydratées dans du toluène, de l'éthanol 100 %, de l'éthanol 95 % et de l'eau courante et colorées à l'hématoxyline (Hemalun en solution selon Mayer, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) et à l'éosine. Elles ont été déshydratées dans de l'éthanol 95 %, de l'éthanol 100 % et du toluène et montées à l'Eukitt (O. Kindler, Orsatec GmbH, Bobingen, Allemagne). Les coupes colorées ont été examinées à l'aveugle par un pathologiste (P. D.) pour la présence d'infiltrats lymphoïdes et évaluées sur une échelle de 0 à 3 selon les critères suivants :

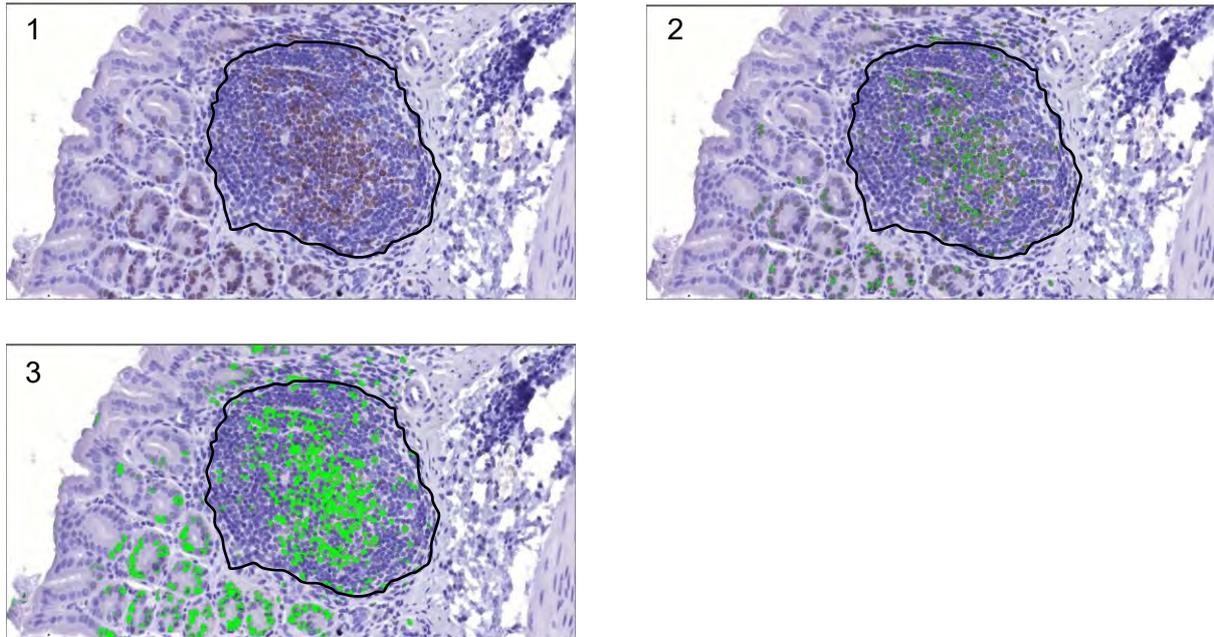
- 0 : absence d'infiltrat ;
- 1 : infiltrat lymphoïde unique ou de petite taille ;
- 2 : multiples infiltrats lymphoïdes multifocaux ;
- 3 : multiples infiltrats lymphoïdes multifocaux extensifs avec infiltration profonde de la muqueuse associée à des distorsions en surface de la muqueuse, comme décrit précédemment (93) (109).

L'inflammation, l'hyperplasie, l'atrophie des glandes oxyntiques, la métaplasie mucineuse et la métaplasie pseudo-intestinale ont été notées en utilisant une échelle de 0 à 4 comme décrit précédemment (129) (Annexe 1).

#### 6.4. Immunohistochimie

Pour l'immunohistochimie, des coupes sériées de 3 µm d'épaisseur des estomacs inclus en paraffine de souris représentatives de chaque groupe ont été coupées. Il y avait 13 souris C57BL6 (6 WT : 1 non infectée, 3 infectées par *H. pylori* et 2 par *H. felis* ; 7 transgéniques APRIL : 1 non infectée, 3 infectées par *H. pylori* et 3 par *H. felis*) et 12 souris BALB/c (6 WT : 1 non infectée, 2 infectées par *H. pylori* et 3 par *H. felis* ; 6 transgéniques APRIL : 1 non infectée, 2 infectées par *H. pylori* et 3 par *H. felis*). Les coupes ont été déparaffinées et hydratées dans des bains successifs de toluène (2 fois 5 minutes), d'éthanol 100 % (2 fois 1 minute) et d'éthanol 95 % (1 minute). Elles ont été lavées une minute dans un bain d'eau du robinet. Elles ont été chauffées à 100°C pendant 30 minutes puis ramenées à température ambiante pendant 30 minutes pour le démasquage des sites antigéniques en utilisant un tampon (Citrates pH 6 pour le marquage CD45R et CD8

et Tris EDTA pH 9 pour le marquage CD3 $\epsilon$  et CD4) et rincées avec du TBS-Twin (Tris-Buffered Saline) (2 fois 10 minutes). Les peroxydases endogènes ont été inhibées avec 3 % de peroxyde d'hydrogène (Sigma-Aldrich) dans l'eau pendant 5 minutes et les coupes ont été rincées deux fois avec du TBS. Le blocage a été réalisé avec 2,5 % de sérum normal de chèvre (pour CD45R et CD8) ou de cheval (pour CD3 $\epsilon$  et CD4) (ImmPRESS Reagent kit peroxydase, Vector Laboratories, Burlingame, CA) pendant 30 minutes. Les lymphocytes B ont été identifiés avec l'anticorps monoclonal de rat anti-CD45R (1/100, clone RA3-6B2, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), les lymphocytes T avec un anticorps polyclonal de chèvre anti-CD3 $\epsilon$  (1/800, clone M-20, Tebubio, Le Perray-en-Yvelines, France), les lymphocytes T CD4+ avec un anticorps monoclonal anti-CD4 (1/1000, clone EPR19514 ab183685 ; Abcam, Paris, France) et les lymphocytes T CD8+ avec un anticorps monoclonal anti-CD8 (1/100, clone 4SM15 ; Affymetrix eBioscience). Après 1 heure d'incubation à température ambiante, les coupes ont été rincées dans un bain de TBS (2 fois 15 minutes). Les anticorps primaires ont été détectés en utilisant la fixation d'un anticorps secondaire (ImmPRESS Reagent kit peroxidase, Vector Laboratories), rincés dans un bain de TBS (2 fois 10 minutes) et révélés par incubation avec le système diaminobenzidine (DAB) liquide-substrat chromogène (Dako, Copenhague, Danemark) à température ambiante. Toutes les lames ont été contre-colorées avec de l'hématoxyline, déshydratées et montées avec de l'Eukitt. Les lames ont été scannées à l'aide d'un scanner numérique (Panoramic SCAN, 3DHISTECH Ltd., Budapest, Hongrie) équipé d'un objectif Zeiss (Plan-Apochromat 40, ouverture numérique, 0,95, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jéna, Allemagne) et d'un appareil photo couleur haute résolution (VCCFC60FR19CL, 4MP, CIS Corporation, Tokyo, Japon) disponible sur la plateforme d'histopathologie (INSERM US 005, CNRS UMS 3427-TBM CORE). Les images ont été lues à l'aide du logiciel Panoramic Viewer version 1.15.4 (3DHISTECH Ltd.). Une évaluation semi-quantitative du pourcentage de cellules marquées a été réalisée avec la version 7.12.7 du logiciel Mercator (Explora Nova, La Rochelle, France) (Figure 11).



**Figure 11 : Evaluation semi-quantitative des marquages immunohistochimiques à l'aide du logiciel Mercator.**

1. Délimitation des contours de l'infiltrat lymphoïde à faible grossissement ; 2. Sélection au sein de l'infiltrat des cellules positives pour le marquage immunohistochimique réalisé ; 3. Seules les cellules incluses dans l'infiltrat lymphoïde sont considérées pour la semi-quantification sur la base de leurs critères colorimétriques et densitométriques.

### 6.5. Détermination de la charge bactérienne par qPCR

Une PCR quantitative utilisant la technologie FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer, Transfert d'Energie par Résonance de Fluorescence) ciblant l'ADN codant pour l'ARNr 23S de *H. pylori* a été réalisée. Les amorces décrites par Oleastro *et al.* ont été utilisées pour amplifier le gène de l'ARNr 23S (F : 5'-GGCAAGACGGAAAGACC-3' ; R : 5'-TGTAGTGGAGGTGAAAATTCCTCCTACCC-3') et celles décrites par Laur *et al.* pour celui de la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) (mGapdh1-F : CTGCAGGTTCTCCACACCTATG ; mGapdh1-R : GAATTTGCCGTGAGTGGAGTC). Chaque cible a été testée en double sur tous les échantillons. Une courbe standard a été préparée en utilisant des dilutions en série d'un extrait d'ADN d'une suspension bactérienne calibrée en unité formant colonie par millilitre (UFC/mL) de la souche SS1 de *H. pylori*. Le LightCycler® 480 SYBR® Green I Master Mix (Roche Diagnostics, Bâle, Suisse), compatible avec le thermocycleur LightCycler® 480 (Roche Diagnostics), a été

utilisé. La PCR a débuté par une étape de dénaturation de l'ADN à 95°C pendant 10 minutes suivie de 45 cycles comprenant 3 étapes : une dénaturation à 95°C pendant 10 secondes, une hybridation des amorces à 60°C pendant 10 secondes puis une élongation à 72°C pendant 15 secondes.

Une PCR quantitative utilisant la technologie de FRET ciblant l'ADN codant pour *flaA* de *H. felis* a été réalisée. Les amorces décrites par Burkitt *et al.* ont été utilisées pour amplifier le gène *flaA* (F : 5'-GTTTCTGGGGCCAATGTAAG-3' ; R : 5'-GCCTTTGGCAAACCAATAG-3'). Chaque cible a été testée en double. Une courbe standard a été préparée en utilisant la souche CS1 de *Helicobacter felis*. Le SYBR Premix Ex Taq Mix (Tli RNaseH Plus) (Takara, Saint-Germain-en-Laye, France), compatible avec le thermocycleur PCR CFX96 (Bio-Rad) et disponible sur la plateforme de PCR en temps réel TBMCORE (Université de Bordeaux) a été utilisé. La PCR a commencé avec une étape de dénaturation de l'ADN à 95°C pendant 3 minutes, suivie de 40 cycles comprenant 2 étapes : une dénaturation à 95°C pendant 5 secondes puis une hybridation des amorces à 60°C pendant 30 secondes. Après chaque cycle, la fluorescence a été mesurée pour quantifier l'ADN nouvellement synthétisé. À la fin de la procédure, une courbe de fusion a été générée par une élévation lente de la température de 65 à 95°C et la mesure continue de la fluorescence. La génération de cette courbe de fusion a permis la vérification de la spécificité de l'amplification caractérisée par un pic spécifique à la température de fusion attendue pour chaque produit. Les résultats finaux ont été exprimés en ratio bactéries/cellule épithéliale. L'ADN extrait de la lignée cellulaire épithéliale murine m-ICcl2 a été utilisé pour exprimer les résultats sous forme de rapport bactéries/cellule épithéliale. La limite de détection de la méthode était d'environ 0,001 bactérie/cellule épithéliale pour *H. pylori* et de 0,002 bactérie/cellule épithéliale pour *H. felis*.

## 6.6. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées avec GraphPad Prism version 5.01 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA). Le test de Mann-Whitney a été utilisé comme test non paramétrique pour comparer les distributions de deux groupes non appariés. Les différences étaient considérées significatives lorsque  $P < 0,05$ .

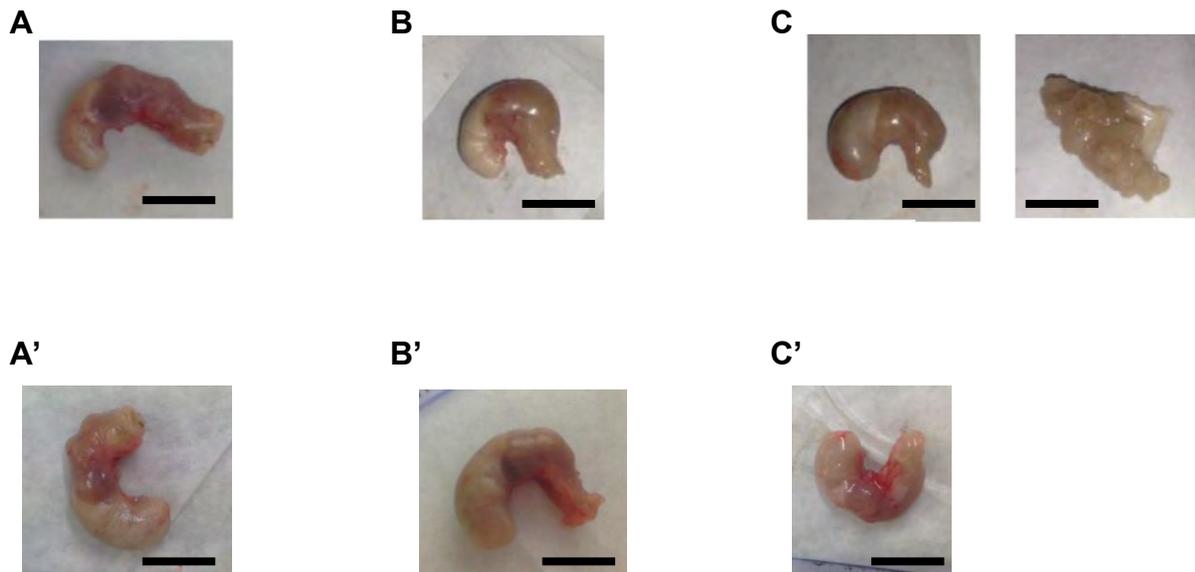
## 7. Résultats

Les résultats en fond génétique C57BL6 ont été publiés par Floch *et al.* (126) dans The American Journal of Pathology (Annexe 2) et seront repris dans les paragraphes suivants. Je suis associé à cet article.

### 7.1. Aspect macroscopique des estomacs des souris

L'apparence externe des estomacs des souris C57BL6 WT non infectées et infectées était identique et normale 18 mois post-infection. L'épaisseur de l'estomac était cependant plus importante chez les souris C57BL6 transgéniques APRIL infectées, en particulier chez celles infectées par *H. felis*, par rapport à leurs homologues non infectées (Figure 12 A). En effet, les 10 souris C57BL6 transgéniques APRIL infectées par *H. felis* (100,0 %) et 9 des 14 infectées par *H. pylori* (64,3 %) avaient un estomac plus épais et plus rigide (Figure 12 C et B). La muqueuse gastrique des souris C57BL6 WT infectées présentait des modifications moins visibles (6 des 13 souris WT infectées par *H. felis* (46,2 %) et 2 des 16 souris WT infectées par *H. pylori* (12,5 %)). Certaines souris C57BL6 transgéniques APRIL infectées présentaient des petits nodules ronds, en particulier celles infectées par *H. felis*, compatibles avec l'infiltration de la muqueuse gastrique par des infiltrats lymphoïdes.

La muqueuse gastrique des souris BALB/c WT ( $n=10$ ) et transgéniques APRIL ( $n=12$ ) non infectées ne présentait pas de modifications visibles (Figure 12 A'). L'épaisseur de l'estomac était plus importante chez les souris BALB/c transgéniques APRIL infectées par *H. felis* (6 sur 11 (55 %)) par rapport à leurs homologues WT (1 sur 7 (14,2 %)) (Figure 12 B' et C').



**Figure 12 : Apparence macroscopique de l'estomac des souris transgéniques APRIL à 18 mois post-infection.**

A : souris C57BL6 transgénique APRIL non infectée ;

B : souris C57BL6 transgénique APRIL infectée par *H. pylori* ;

C : souris C57BL6 transgénique APRIL infectée par *H. felis* ;

A' : souris BALB/c transgénique APRIL non infectée ;

B' : souris BALB/c transgénique APRIL infectée par *H. pylori* ;

C' : souris BALB/c transgénique APRIL infectée par *H. felis*.

Echelle = 1 cm.

## 7.2. Caractérisation par cytométrie en flux de l'infiltration leucocytaire

Pour obtenir des informations quantitatives sur la fréquence relative des sous-populations lymphocytaires et étudier des marqueurs qui ne peuvent pas être étudiés par immunohistochimie en raison de l'absence d'anticorps commercialisés et/ou validés pour des échantillons de biopsies incluses dans la paraffine, l'analyse cytométrique a été systématiquement réalisée sur les estomacs des souris C57BL6 ou BALB/c WT ou transgéniques APRIL, non infectées ou infectées à 18 mois post-infection.

Les leucocytes viables (CD45+/DAPI-) dans la muqueuse gastrique ont été évalués en pourcentage *versus* le nombre total de cellules qui ont été analysées par le cytomètre. Les souris C57BL6 WT et transgéniques APRIL non infectées n'ont pas développé d'infiltration leucocytaire (respectivement  $0,7 \pm 0,3$  % et  $0,6 \pm 0,4$  %) (Figure 13). Les souris C57BL6 WT et transgéniques APRIL infectées ont développé une infiltration leucocytaire significative par rapport à leurs groupes respectifs non infectés (C57BL6 WT :  $2,5 \pm 1,4$  % pour celles infectées par *H. pylori* et  $8,8 \pm 6,3$  % pour celles infectées par *H. felis* ; C57BL6 transgéniques APRIL :  $19,1 \pm 13,0$  % pour celles infectées par *H. pylori* et  $28,6 \pm 5,8$  % pour celles infectées par *H. felis*). Pour les souris C57BL6 WT et transgéniques APRIL, cette infiltration était significativement plus élevée chez celles infectées par *H. felis* par rapport à celles infectées par *H. pylori*. De même, les souris C57BL6 transgéniques APRIL infectées par *H. pylori* ou *H. felis* ont développé une infiltration leucocytaire significativement plus élevée que leurs homologues WT respectives.

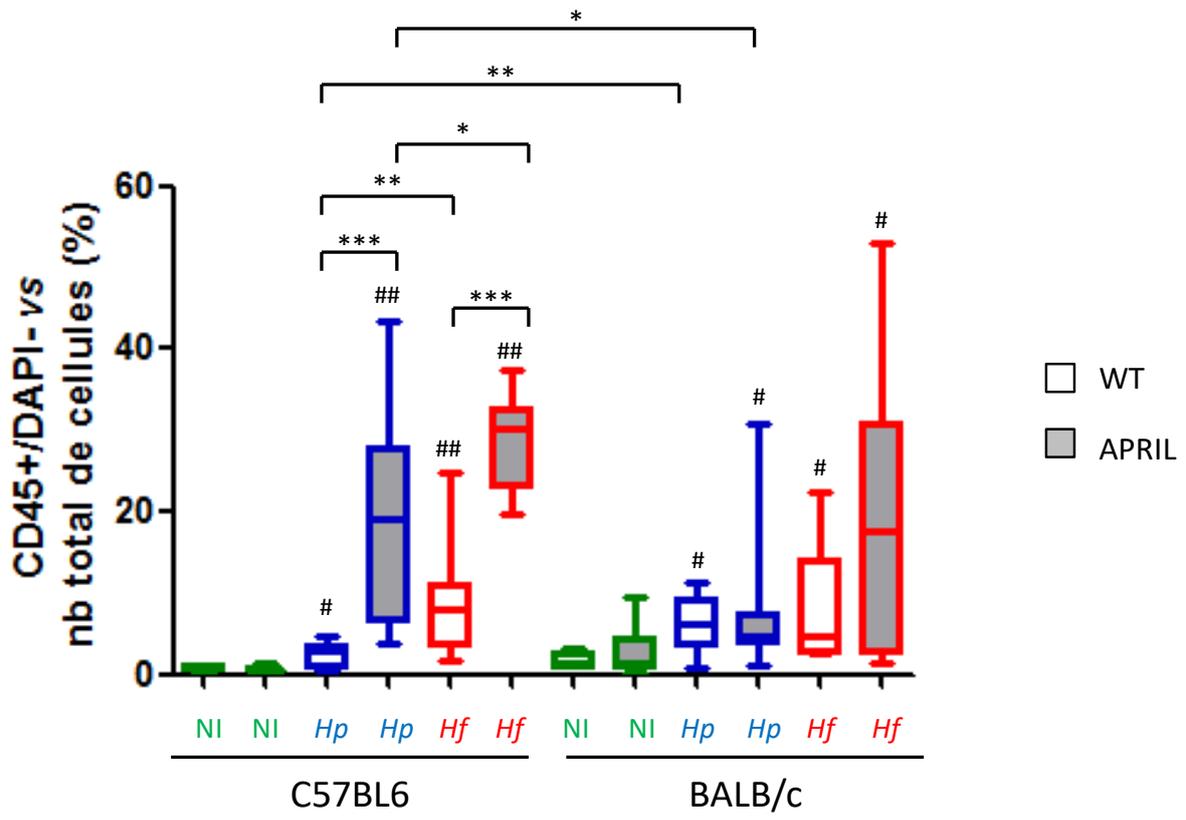
Les souris BALB/c WT et transgéniques APRIL non infectées n'ont pas développé d'infiltration leucocytaire (respectivement  $1,6 \pm 1,0$  % et  $2,7 \pm 3,4$  %). Les souris BALB/c WT et transgéniques APRIL infectées ont développé une infiltration leucocytaire significative par rapport à leurs groupes respectifs non infectés (BALB/c WT :  $6,2 \pm 3,4$  % pour celles infectées par *H. pylori* et  $8,7 \pm 7,6$  % pour celles infectées par *H. felis* ; BALB/c transgéniques APRIL :  $8,4 \pm 9,3$  % pour celles infectées par *H. pylori* et  $20,1 \pm 18,0$  % pour celles infectées par *H. felis*). Pour les souris BALB/c, il n'y avait pas de différence significative entre celles infectées par *H.*

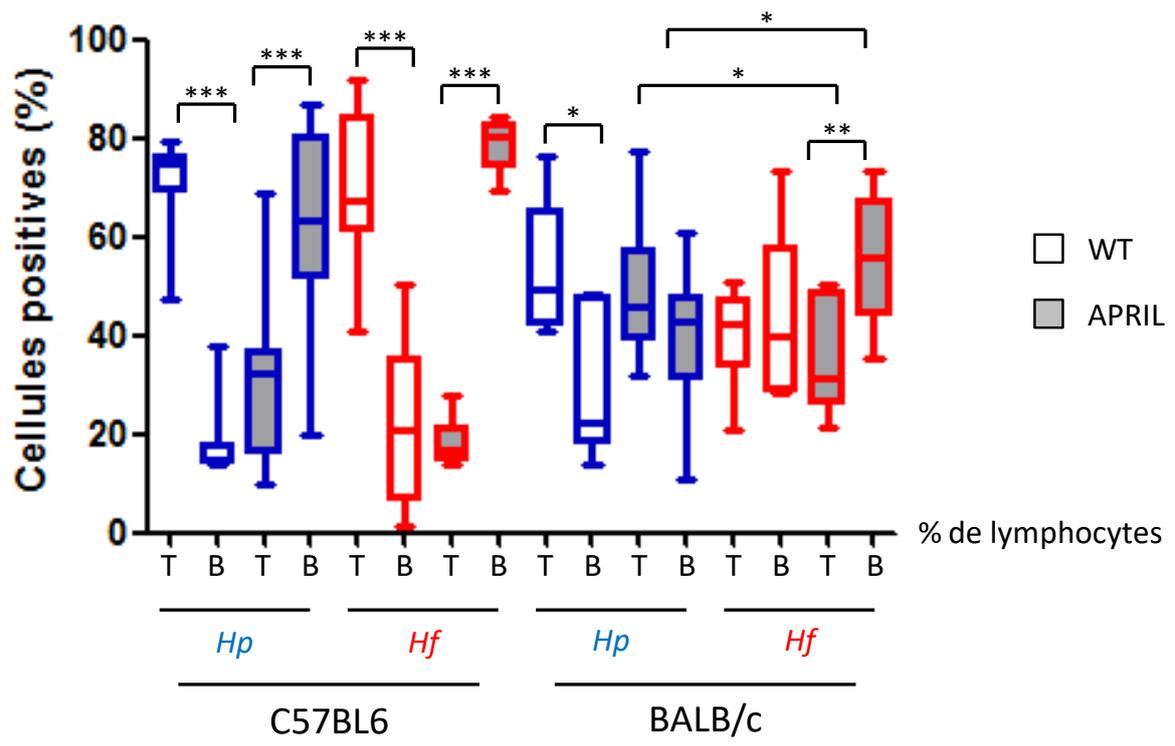
*felis* par rapport à celles infectées par *H. pylori*, ni entre celles transgéniques APRIL par rapport à leurs homologues WT respectives.

Enfin, les souris C57BL6 transgéniques APRIL infectées par *H. pylori* ont développé une infiltration leucocytaire significativement plus élevée que leurs homologues BALB/c.

Pour les souris C57BL6 WT infectées par *H. pylori* ou *H. felis*, la majorité des lymphocytes était des lymphocytes T (CD3+) ( $71,5 \pm 9,8$  % et  $68,7 \pm 16,8$  % respectivement), contrairement aux souris C57BL6 transgéniques APRIL pour lesquelles une infiltration B prédominante (B220+) a été observée ( $64,6 \pm 19,9$  % pour celles infectées par *H. pylori* et pour celles infectées par *H. felis*,  $78,7 \pm 4,8$  %) (Figure 14). Le pourcentage de lymphocytes B et T ne différait pas significativement entre les souris infectées par *H. pylori* ou *H. felis* dans chaque groupe.

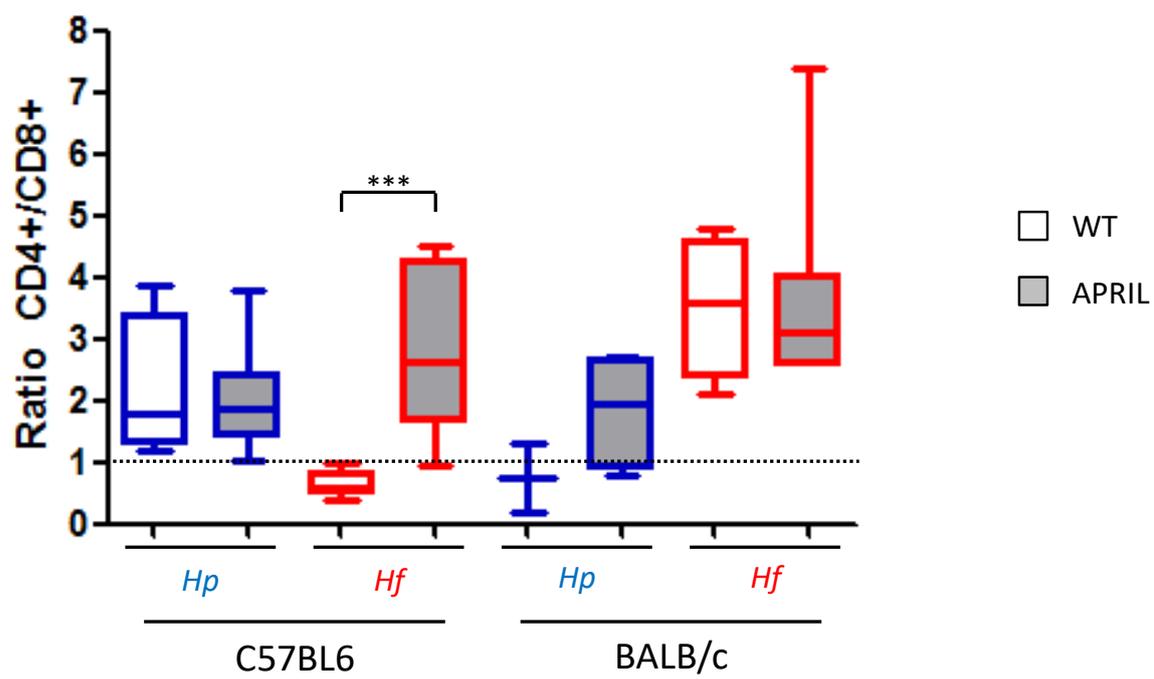
Pour les souris BALB/c WT infectées par *H. pylori*, environ la moitié des lymphocytes étaient des lymphocytes T (CD3+) ( $54,6 \pm 13,3$  %). Chez les souris BALB/c transgéniques APRIL infectées par *H. pylori* et celles WT infectées par *H. felis*, le pourcentage de lymphocytes B et T ne différait pas significativement. Contrairement aux souris BALB/c WT infectées par *H. pylori*, les transgéniques APRIL infectées par *H. felis* avaient une infiltration B prédominante (B220+) ( $54,9 \pm 12,8$  %). Chez les souris BALB/c transgéniques APRIL infectées par *H. felis*, le pourcentage de lymphocytes B était significativement plus élevé que chez leurs homologues infectées par *H. pylori*.





Chez les souris C57BL6 WT et transgéniques APRIL infectées par *H. pylori*, les lymphocytes T CD4+ prédominaient sur les lymphocytes T CD8+ (rapport CD4+/CD8+ :  $2,2 \pm 1,2$  et  $2,0 \pm 0,8$  respectivement). De façon surprenante, les souris WT infectées par *H. felis* avaient une infiltration nette de lymphocytes T CD8+ (rapport CD4+/CD8+ :  $0,6 \pm 0,2$ ) en opposition à leurs homologues transgéniques APRIL pour lesquelles un changement significatif vers les lymphocytes T CD4+ a été observé (rapport CD4+/CD8+ :  $2,8 \pm 1,3$ ) (Figure 15).

Chez les souris BALB/c transgéniques APRIL infectées par *H. pylori*, et celles WT et transgéniques APRIL infectées par *H. felis*, les lymphocytes T CD4+ prédominaient sur les lymphocytes T CD8+ (rapport CD4+/CD8+ :  $1,9 \pm 0,9$ ,  $3,5 \pm 1,2$  et  $3,6 \pm 1,6$  respectivement).



### 7.3. Aspects histologiques

Les souris C57BL6 WT et transgéniques APRIL non infectées n'ont pas développé de signes d'inflammation gastrique ou toutes autres altérations pathologiques 18 mois post-infection (Figures 16, 17 et 18).

Les estomacs de souris C57BL6 WT infectées par *H. pylori* ou *H. felis* avaient une infiltration modérée de leucocytes et quelques infiltrats lymphoïdes dispersés (Figures 16 et 17). Ces aspects histologiques étaient compatibles avec un stade de gastrite. Les souris C57BL6 transgéniques APRIL infectées par *H. pylori* ou *H. felis* avaient significativement plus d'inflammation et d'infiltrats lymphoïdes que leurs homologues WT respectives. Les souris C57BL6 transgéniques APRIL infectées par *H. felis* avaient significativement plus d'inflammation et d'infiltrats lymphoïdes que celles infectées par *H. pylori*. Des infiltrats lymphoïdes multifocaux extensifs avec infiltration profonde de la muqueuse associée à des distorsions en surface de la muqueuse ont été observées chez des souris C57BL6 transgéniques APRIL infectées par *H. pylori* ou *H. felis*.

Les souris C57BL6 WT infectées par *H. pylori* n'avaient pas de troubles épithéliaux significatifs (Figure 18). Cependant, il y avait un effet clair, pour les souris infectées par *H. pylori*, du fond transgénique APRIL sur l'apparition d'atrophie des glandes oxyntiques associée à l'hyperplasie, la métaplasie mucineuse, la métaplasie pseudo-intestinale et la dysplasie, bien que moins spectaculaire que chez les souris infectées par *H. felis*. En effet, chez des souris C57BL6 WT et transgéniques APRIL, *H. felis* induisait une atrophie significative des glandes oxyntiques associée à une hyperplasie, une métaplasie mucineuse, une métaplasie pseudo-intestinale et une dysplasie, un ensemble d'altérations compatibles avec la gastrite chronique et un stade prénéoplasique.

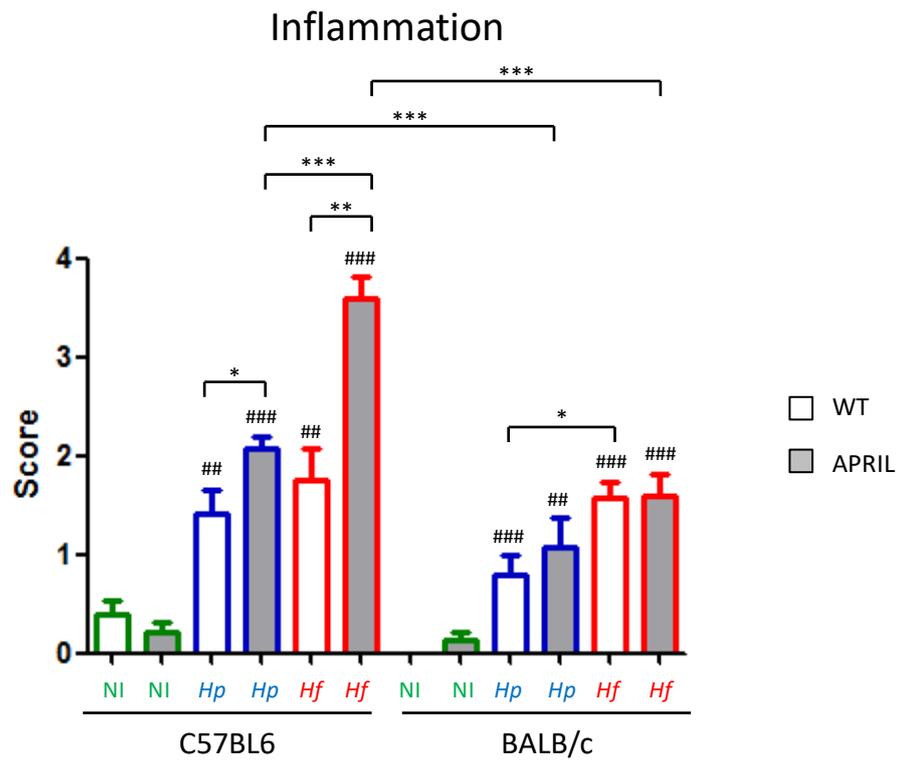
Les témoins BALB/c WT et transgéniques APRIL non infectés n'ont pas développé de signes d'inflammation gastrique ou d'autres altérations pathologiques 18 mois post-infection.

Chez des souris BALB/c WT infectées par *H. pylori* ou *H. felis*, une infiltration modérée de leucocytes a été observée, principalement composée de PNN (Figure

16). De rares petits infiltrats lymphoïdes ont parfois été trouvés, principalement chez celles infectées par *H. felis* (Figure 17). En effet, les souris BALB/c WT infectées par *H. felis* avaient significativement plus d'inflammation et d'infiltrats lymphoïdes que celles infectées par *H. pylori*. Les souris BALB/c transgéniques APRIL infectées par *H. felis* avaient significativement plus d'infiltrats lymphoïdes que leurs homologues infectées par *H. pylori*. Le fond transgénique APRIL n'a pas eu un effet significatif sur l'inflammation et l'infiltration lymphoïde chez les souris BALB/c.

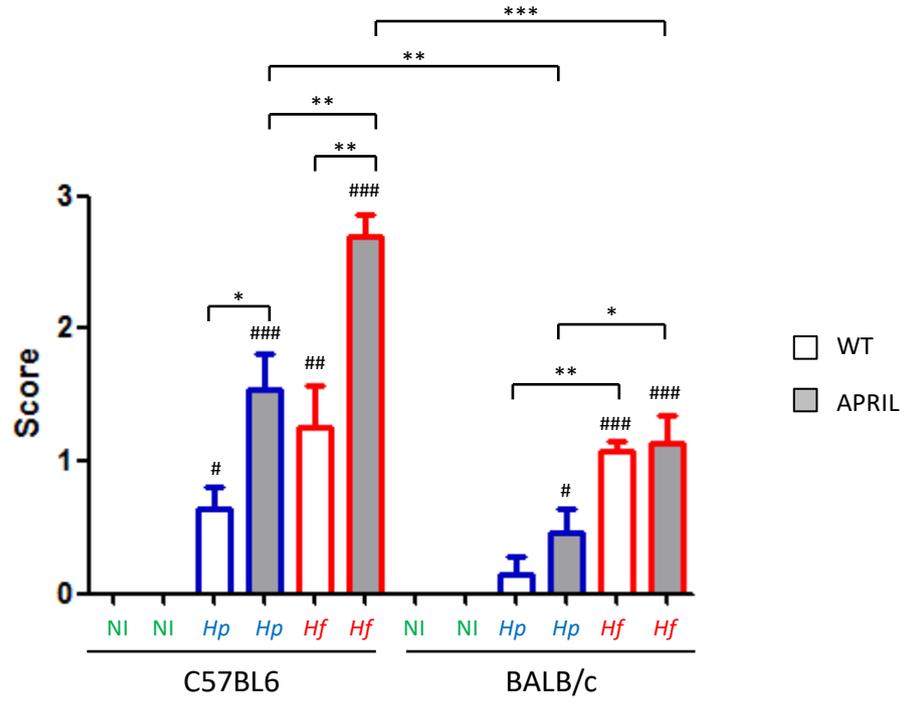
Aucune lésion épithéliale significative n'a été observée chez les souris BALB/c (Figure 18).

En conclusion, les souris C57BL6 transgéniques APRIL infectées par *H. pylori* ou *H. felis* avaient significativement plus d'inflammation et d'infiltrats lymphoïdes que leurs homologues BALB/c respectives. Les lésions épithéliales étaient significativement plus élevées chez les souris C57BL6 transgéniques APRIL infectées par *H. pylori* ou *H. felis* et chez les souris C57BL6 WT infectées par *H. felis* par rapport à leurs homologues BALB/c respectives. *H. felis* est apparu plus agressif et plus pro-inflammatoire sur la muqueuse gastrique.



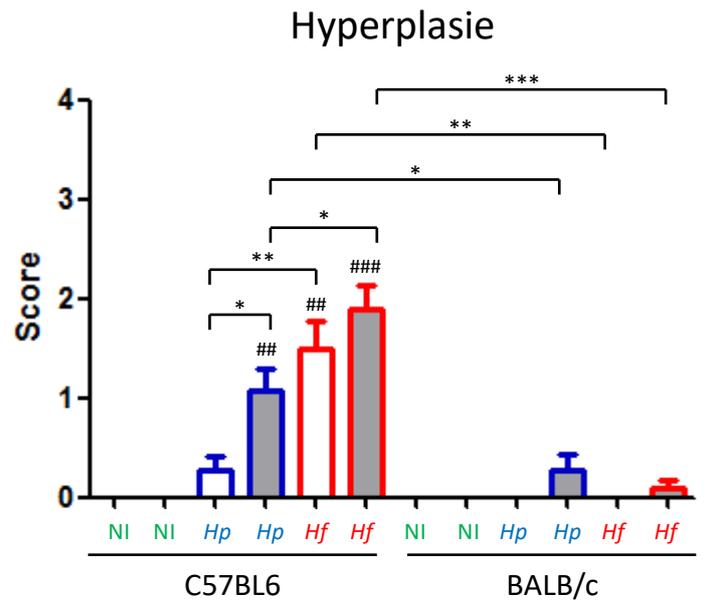
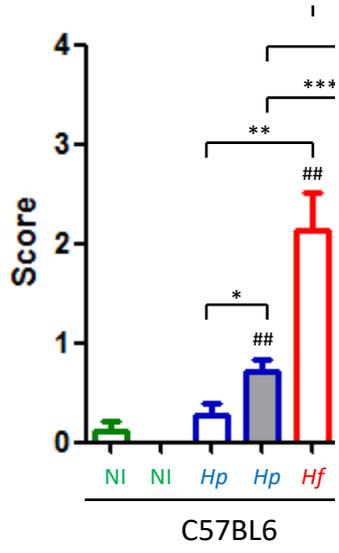
\* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$  et \*\*\* $P < 0,001$  ; # $P < 0,05$ , ## $P < 0,01$  et ### $P < 0,001$  entre les souris infectées et leurs témoins non infectés respectifs.

## Infiltrats lymphoïdes



$P < 0,05$ ,  $P < 0,01$  et  $P < 0,001$ ,  $^{*}P < 0,05$ ,  $^{**}P < 0,01$  et  $^{***}P < 0,001$  entre les souris infectées et leurs témoins non infectés respectifs.

A



## 7.4. Immunohistochimie

Nous avons sélectionné comme exemples les plus beaux marquages immunohistochimiques obtenus sur les souris des différentes catégories et ce que nous estimons être les plus représentatifs de chacun de leurs groupes respectifs.

Les coupes des estomacs des souris C57BL6 et BALB/c WT et transgéniques APRIL non infectées ne présentaient pas d'infiltrats lymphoïdes comme nous l'avons vu précédemment (Annexes 3, 4, 9 et 10).

Les coupes de biopsies gastriques des souris C57BL6 WT infectées par *H. pylori* n'avaient pas d'infiltrats lymphoïdes significatifs au niveau des coupes d'estomacs sélectionnées pour l'immunohistochimie même si nous avons choisi celles qui étaient censées avoir au minimum un infiltrat lymphoïde analysable (Annexe 5). En effet, l'une des difficultés de l'immunohistochimie est d'avoir des coupes sériées qui contiennent un infiltrat, celles-ci n'étant le reflet que d'un endroit précis du tissu étudié.

De plus, pour les autres souris, la semi-quantification des marquages des infiltrats lymphoïdes par Mercator ne permettait pas toujours une analyse statistique interprétable (données non montrées). En effet, la reproductibilité inter-souris n'était pas toujours bonne malgré l'utilisation de coupes que nous pensions sériées. L'aspect des infiltrats lymphoïdes pouvaient en effet varier de manière significative d'une coupe à l'autre (données non montrées). De plus, certains marqueurs (notamment le CD3) entraînaient un bruit de fond (marquage artéfactuel sur la muqueuse gastrique) trop important pour une analyse fine de la répartition des sous-populations lymphocytaires (Annexe 12). Enfin, malgré notre sélection des cas les plus représentatifs, le nombre d'infiltrats était parfois trop faible pour utiliser les tests statistiques. Nous avons donc décidé, afin de ne pas complexifier la présentation de nos résultats, de ne pas les exploiter statistiquement contrairement à notre objectif de départ et de se limiter à une description des populations lymphocytaires majoritaires.

Sur les coupes des estomacs des souris C57BL6 transgéniques APRIL infectées par *H. pylori*, on retrouve une infiltration majoritairement composée de lymphocytes B (CD45R) par rapport aux T (CD3) et pour ces derniers, visuellement

plus de T CD4 que de T CD8 (Annexe 6). Sur les coupes de biopsies gastriques des souris C57BL6 WT infectées par *H. felis*, on observe, sur les photos présentées en annexe 7, un infiltrat lymphoïde fait à la fois de lymphocytes B (majoritairement sur la droite de l'infiltrat) et de lymphocytes T (majoritairement sur la gauche de l'infiltrat), ces derniers étant composés de T CD4 et de T CD8 (Annexe 7). Les souris C57BL6 transgéniques APRIL infectées par *H. felis* sont, comme attendu, largement infiltrées par des lymphocytes B et par quelques lymphocytes T CD4 (Annexe 8).

En fond BALB/c, chez les souris WT infectées par *H. pylori*, on observe sur les coupes de leurs estomacs, une infiltration lymphocytaire composée de lymphocytes T et B (Annexes 11 et 12). Les T CD4 sont visuellement majoritaires par rapport aux T CD8. Sur les coupes de biopsies gastriques des souris transgéniques APRIL infectées par *H. pylori* présentées en annexe 13, on retrouve une infiltration lymphocytaire faite de lymphocytes T au centre et B en périphérie de l'infiltrat (Annexe 13). On retrouve chez les souris WT infectées par *H. felis* un infiltrat qui visuellement semble avoir autant de lymphocytes B que de T, ces derniers étant majoritairement des T CD4 (Annexe 14). Sur une coupe d'estomac d'une autre souris appartenant à la même catégorie, on retrouve le même type d'infiltrat que chez les souris transgéniques APRIL infectées par *H. pylori*, composé de lymphocytes T au centre, visiblement plus T CD4, et B tout autour (Annexe 15). Enfin, chez les souris transgéniques APRIL infectées par *H. felis*, on retrouve une infiltration faite de quelques T CD4 au centre au sein d'un infiltrat majoritairement composé de lymphocytes B (Annexes 16 et 17).

## 7.5. Estimation de la charge bactérienne

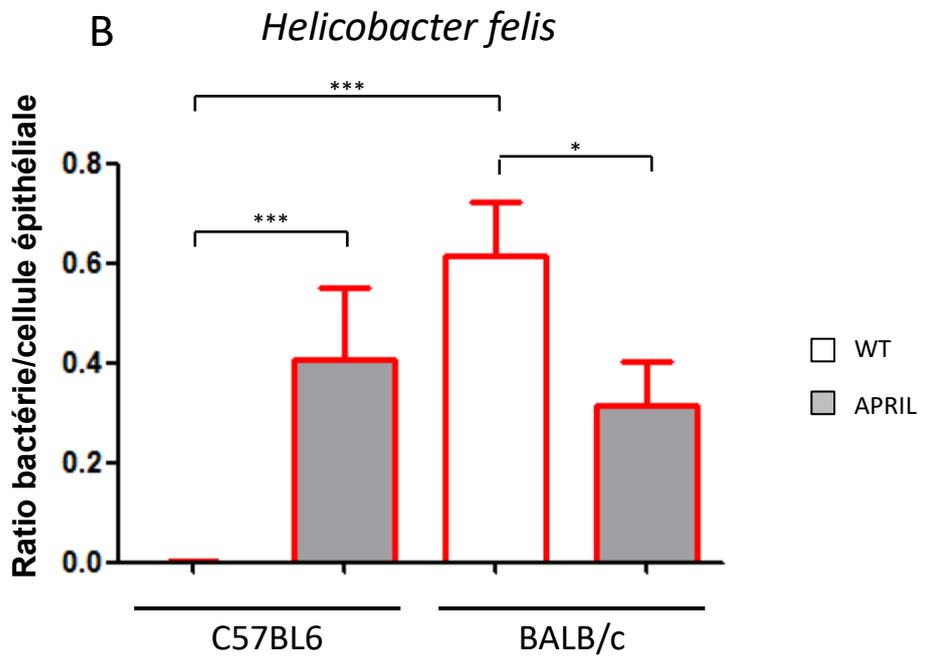
La comparaison de la charge bactérienne estimée sous la forme de ratios bactérie/cellule épithéliale entre les souris C57BL6 et BALB/c WT et transgéniques APRIL infectées par *H. pylori* ou *H. felis* à 18 mois post-infection est montrée sur la figure 19 (Figure 19). Chez les souris C57BL6 WT infectées par *H. pylori*, le rapport bactérie/cellule épithéliale était plus de 100 fois plus faible (avec 11 des 16 souris négatives) que chez les transgéniques APRIL (rapport bactérie/cellule épithéliale moyen égal à 0,08635 ( $n=14$ , avec *H. pylori* détecté dans toutes)) ( $P<0,001$ ). Chez les souris C57BL6 WT infectées avec *H. felis*, le rapport bactérie/cellule épithéliale était 1000 fois plus faible (avec 7 des 13 souris négatives) que chez les

transgéniques APRIL (rapport bactérie/cellule épithéliale moyen égal à 0,40870, avec *H. felis* détecté chez toutes les souris ( $n=10$ )) ( $P<0,001$ ).

La comparaison du ratio bactérie/cellule épithéliale entre les groupes de souris BALB/c WT et transgéniques APRIL infectées par *H. pylori* a montré que chez les souris WT, le nombre de bactéries par cellule épithéliale n'était pas significativement différent (bactérie moyenne/cellule épithéliale = 0,016375) que chez les souris transgéniques APRIL (bactérie moyenne/cellule épithéliale = 0,183307). Chez les souris transgéniques APRIL infectées par *H. felis*, le rapport bactérie/cellule épithéliale était significativement plus faible (avec 1 des 11 souris négatives) que chez les WT (rapport bactérie/cellule épithéliale moyen égal à 0,61621 ( $n=7$ , avec *H. felis* détecté dans toutes)) ( $P<0,05$ ).

18 mois post-infection, il n'y avait pas de différence significative entre la charge bactérienne chez les souris C57BL6 transgéniques APRIL infectées par *H. pylori* et *H. felis* et leurs homologues BALB/c respectives. A l'inverse, les souris C57BL6 WT étaient significativement moins infectées par *H. pylori* et *H. felis* que les BALB/c WT ( $P<0,001$ ).

Ratio bactérie/cellule épithéliale



## 8. Discussion

Le LGM est une conséquence rare de l'infection à *H. pylori* et il est maintenant difficile de pouvoir avoir accès à des biopsies gastriques. Afin de mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques de la lymphomagenèse gastrique, l'équipe du Pr. Lehours a donc mis en place un modèle de LGM chez des souris C57BL6 et BALB/c sauvages ou transgéniques pour la cytokine APRIL sous sa forme humaine et infectées par *H. pylori* ou *H. felis*. L'utilisation de souris sauvages et transgéniques dans deux fonds génétiques différents a permis de déterminer l'influence de l'hôte et de APRIL dans la lymphomagenèse gastrique.

L'étude histologique des coupes d'estomacs a montré que les souris BALB/c avaient quelques infiltrats lymphoïdes dispersés sans lésion préneoplasique significative, compatibles avec un stade de gastrite sans progression vers le LGM. Au contraire, les souris C57BL6, en particulier celles transgéniques APRIL, présentaient 18 mois post-infection une infiltration lymphoïde significative avec des infiltrats lymphoïdes multifocaux extensifs. De plus, ces dernières avaient des lésions préneoplasiques comparables à celles observées dans le LGM chez l'Homme, justifiant l'utilisation de ces souris comme modèle de LGM induit par *Helicobacter*. Cependant, il est nécessaire de préciser que les souris des deux fonds génétiques n'ont pas été gavées en même temps pouvant entraîner un biais. Néanmoins, cette différence de résultats histologiques entre les deux fonds génétiques BALB/c et C57BL6 avait déjà été observée chez des souris sauvages par Sakagami *et al.* (96) et Thompson *et al.* (98). Des lésions préneoplasiques avaient aussi été décrites en fond C57BL6 par Fox *et al.* (100) et Cai *et al.* (101) et leurs absences en fond BALB/c (102). Les différences de résultats obtenus en fonds BALB/c et C57BL6 peuvent s'expliquer par la prédisposition immunogénétique de ces deux fonds à générer des réponses de type Th1 pour les souris C57BL6 avec un niveau relativement élevé de lésions des cellules épithéliales gastriques ou Th2 pour les BALB/c qui ne favorise pas de lésions chroniques (98) (103).

A l'inverse de nos résultats, certains auteurs rapportaient le développement de LGM en fond BALB/c ce que nous ne retrouvons pas dans notre étude (104) (105)

(106). Il faut néanmoins rappeler qu'il existe une hétérogénéité dans les critères utilisés pour définir la formation de LGM. De plus, certaines études allaient au-delà de 18 mois post-infection (26 mois par exemple pour Enno *et al.*). Enfin, les souches de *Helicobacter* étaient différentes.

*H. felis* induisait dans la majorité des souris plus d'inflammation, d'infiltration lymphoïde et de lésions préneoplasiques que *H. pylori*. Cela avait déjà été décrit par Sakagami *et al.* (96) et Mueller *et al.* (93).

La cytométrie en flux nous a permis de caractériser les infiltrats phénotypiquement. Concernant les sous-populations lymphocytaires, en fond BALB/c, la réponse T majoritaire chez les souris WT infectées par *H. pylori* avait tendance à s'équilibrer vers une réponse B chez les souris transgéniques APRIL. A l'inverse, l'équilibre entre les sous-populations T et B chez les souris WT infectées par *H. felis* disparaissait au profit des lymphocytes B chez les souris transgéniques APRIL. Cette influence de APRIL sur les lymphocytes B avaient déjà été observée en fond C57BL6 par Floch *et al.* (126). Les lymphocytes T étaient significativement majoritaires par rapport aux lymphocytes B chez les souris C57BL6 WT infectées par *H. pylori* ou *H. felis* alors que les lymphocytes B étaient majoritaires chez celles transgéniques APRIL. Cela peut s'expliquer par l'action de APRIL qui est impliquée dans l'induction et le maintien des réponses B avec comme conséquence leur prolifération et leur survie comme décrit dans la littérature (113). Nos données soutiennent donc cet effet de APRIL. Ce modèle de souris transgéniques APRIL infectées par différentes espèces du genre *Helicobacter* ayant été développé par notre seul laboratoire, il n'est pas possible de comparer nos résultats avec d'autres études.

L'effet de APRIL est beaucoup plus net en fond C57BL6 que dans le fond BALB/c comme nous l'avons observé par cytométrie en flux sur la nature de la sous-population lymphocytaire majoritaire au sein des infiltrats, mais aussi, comme nous l'avons vu précédemment, sur l'inflammation et l'infiltration lymphoïde en histologie. Une de nos hypothèses est que le transgène ne s'exprime pas au même niveau en

fond C57BL6 et en fond BALB/c. Il serait intéressant de doser les niveaux de APRIL dans les sérums des souris non infectées BALB/c et C57BL6 ou d'évaluer par qRT-PCR les niveaux de dérégulation de APRIL. Ceci va être réalisé prochainement au sein du laboratoire. La différence d'effet de APRIL pourrait être liée également à la réponse de l'hôte, à la balance inflammatoire en fonction des deux fonds génétiques.

Nous avons espéré que l'immunohistochimie serait un moyen plus facile à mettre en œuvre que la cytométrie en flux sur les estomacs de souris pour évaluer l'importance des infiltrations B et T au sein des infiltrats lymphoïdes. Après une mise au point parfois délicate pour certains marqueurs, le nombre d'infiltrats étudiés était souvent insuffisant pour pouvoir interpréter les résultats. En effet, les coupes ne sont le reflet que d'un endroit précis du tissu étudié et il est donc parfois difficile de comparer les résultats obtenus entre les marqueurs puisque l'infiltrat n'est potentiellement plus présent ou d'une forme différente entre deux coupes sériées. Nous nous sommes donc concentrés à étudier les sous-populations lymphocytaires majoritaires visuellement et nos résultats confirment ceux obtenus en cytométrie en flux avec une réponse B prédominante chez les souris transgéniques APRIL en fond C57BL6. En fond BALB/c, on observait souvent au sein du même infiltrat, à la fois une partie majoritairement composée de lymphocytes T et une partie composée majoritairement de lymphocytes B sans réelle possibilité de prédire l'infiltrat majoritaire.

Nous avons aussi étudié les niveaux de colonisation bactérienne dans les différents modèles à 18 mois post-infection. Il est important de noter que les souris BALB/c ou les souris C57BL6, qu'elles soient WT ou transgéniques APRIL, ont été gavées le même jour avec la même suspension bactérienne. L'inoculum était plus élevé chez les souris C57BL6 transgéniques APRIL que chez les souris WT, qu'elles soient infectées par *H. pylori* ou *H. felis*. Ces résultats nous ont beaucoup étonnés car ils étaient contraires à ceux que le laboratoire avait précédemment observés dans le modèle de souris thymectomisées où l'inoculum évoluait de manière inversement proportionnelle aux scores inflammatoires histologiques (130). Afin

d'étudier la cinétique de la maladie et la corrélation entre les niveaux de colonisation bactérienne et les scores inflammatoire histologiques, nous avons réalisé des qPCR sur des estomacs de souris euthanasiées plus précocement, à 12 mois, stade auquel les scores histologiques d'inflammation étaient plus faibles (Figure 20). De nouveau, l'inoculum bactérien était plus élevé chez les souris C57BL6 transgéniques APRIL que chez les souris WT, qu'elles soient infectées par *H. pylori* ou *H. felis*. On observe aussi une disparition quasi totale de l'inoculum bactérien chez les souris WT entre 12 et 18 mois post-infection. Chez les souris C57BL6 transgéniques APRIL, le ratio bactérie/cellule épithéliale augmente significativement entre 12 et 18 mois post-infection (ratio bactérie/cellule épithéliale chez les souris infectées par *H. pylori* : 0,00258 à 12 mois et 0,08635 à 18 mois post-infection ; ratio bactérie/cellule épithéliale chez les souris infectées par *H. felis* : 0,12111 à 12 mois et 0,40870 à 18 mois post-infection) ( $P < 0,01$ ). Nos différences de résultats en modèle transgénique APRIL peuvent s'expliquer par le potentiel rôle de APRIL. En effet, APRIL favoriserait une réponse B régulatrice, ce qui permettrait donc à l'infection de persister. Une étude de Hua *et al.* (131) a montré que APRIL favorise la production d'IL-10 par des lymphocytes B dits B régulateurs. Cette cytokine a été décrite pour inhiber l'activation de la réponse Th1, favoriser les lymphocytes T régulateurs mais aussi diminuer la sécrétion de TNF- $\alpha$  et de IFN- $\gamma$ , cytokines pro-inflammatoires, par les lymphocytes T (132) (133) (134).

D'autre part, à 18 mois post-infection, pour *H. pylori* uniquement, les souris BALB/c WT étaient plus infectées que leurs homologues C57BL6 (Figure 20). Cela avait déjà été décrit par Lee *et al.* (92) et peut s'expliquer par la réponse inflammatoire qui, comme nous l'avons vu précédemment, est moins intense chez les souris BALB/c que chez les C57BL6 (scores histologiques). La conséquence serait ainsi des niveaux de colonisation bactérienne plus élevés chez les souris BALB/c. Enfin, nous n'avons pas d'hypothèse à l'heure actuelle pour expliquer le niveau de colonisation plus faible des souris BALB/c transgéniques APRIL infectées par *H. felis* par rapport aux WT.

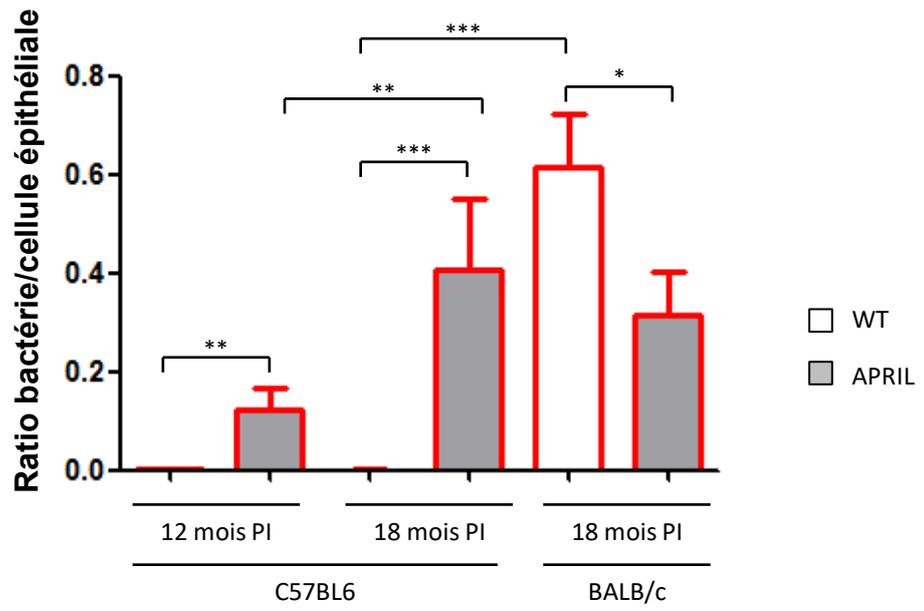
Le Pr. Lehours s'est intéressé au microbiote gastrique et intestinal de ces mêmes souris C57BL6. Sur les données qu'il a obtenues, on retrouve exactement ces mêmes tendances avec un inoculum bactérien plus faible chez les souris C57BL6 WT par rapport à celles transgéniques APRIL, ce qui conforte nos résultats

de qPCR. Ses résultats sont présentés dans la figure 21 (Figure 21). Elle représente l'abondance relative en *Helicobacter* au sein du microbiote gastrique (16S *Helicobacter*/16S totaux) de souris C57BL6 WT et transgéniques APRIL euthanasiées à 2 mois, 12 mois et 18 mois post-infection. A 2 mois post-infection, chez les souris WT et transgéniques APRIL infectées par *H. felis*, les niveaux de colonisation bactérienne sont les mêmes. A 12 mois post-infection, le niveau de colonisation bactérienne chez les souris WT infectées par *H. felis* diminue de manière drastique. On n'observe pas de différence entre 12 et 18 mois post-infection, cependant, les niveaux de colonisation bactérienne se maintiennent à des niveaux relativement bas. A 2 mois post-infection, pour les souris WT, *H. pylori* colonise l'estomac 10 fois moins que *H. felis*, et diminue à 12 mois post-infection avant d'être quasiment éliminé à 18 mois post-infection. A 2 mois post-infection, comme chez les souris WT, on retrouve chez les souris transgéniques APRIL, 10 fois moins de *H. pylori* que de *H. felis*. Chez ces dernières, on observe une augmentation significative de l'inoculum bactérien au cours du temps. Chez les souris transgéniques APRIL infectées par *H. pylori*, il n'y a pas de différence significative entre les niveaux de colonisation à 2, 12 et 18 mois post-infection.

A *Helicobacter pylori*

Ratio bactérie/cellule épithéliale

B *Helicobacter felis*



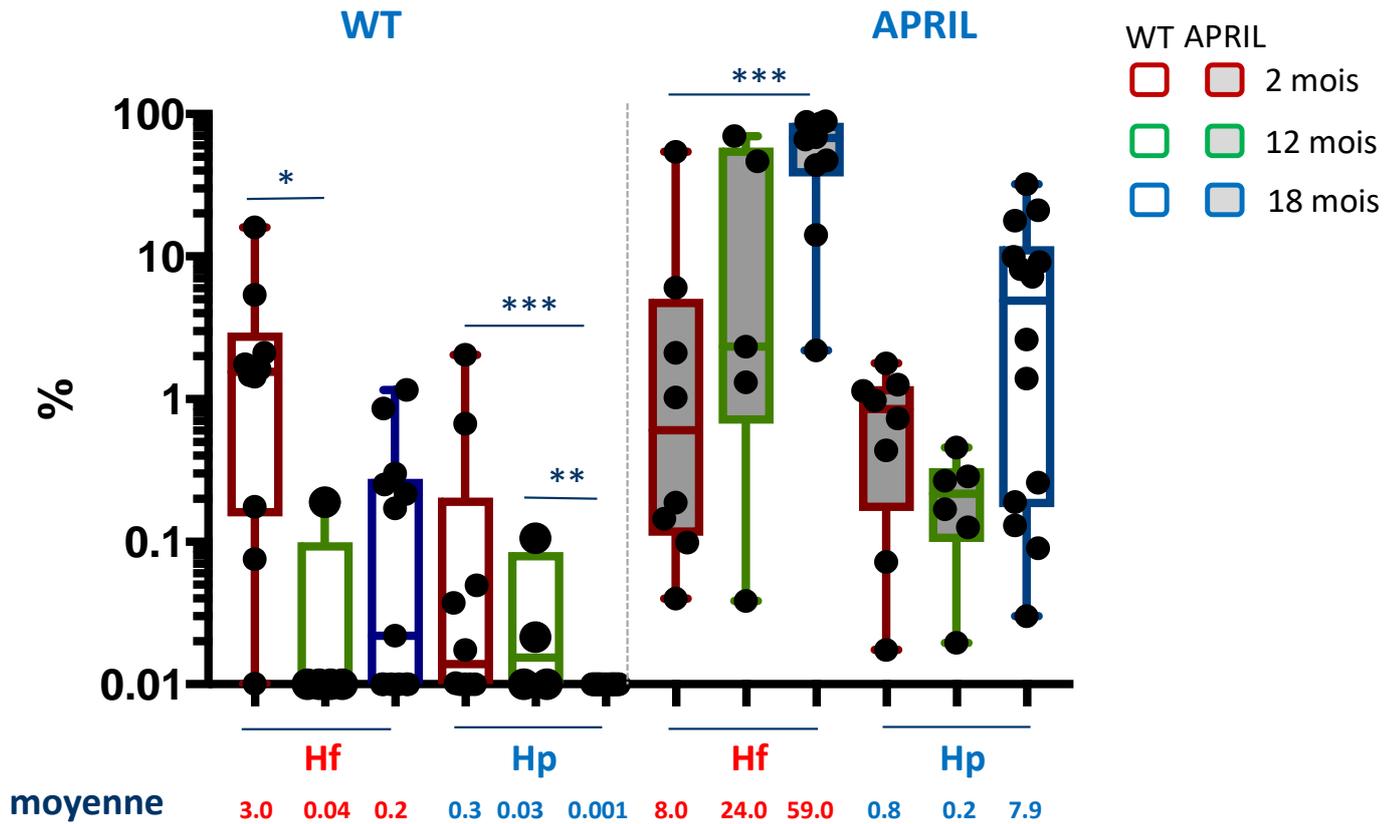


Figure 21 : Abondance relative de *Helicobacter* dans les souris C57BL6 WT (fond blanc) et transgéniques APRIL (fond gris) au sein du microbiote gastrique à 2, 12 et 18 mois post-infection.

Hf = *Helicobacter felis* ; Hp = *Helicobacter pylori* ; \* $P < 0,05$  ; \*\* $P < 0,01$  et \*\*\* $P < 0,001$

Grâce à notre étude histologique des coupes d'estomacs, nous avons observé qu'environ 50 % des souris C57BL6 transgéniques APRIL infectées par *H. pylori* avaient développé des lésions compatibles avec un LGM. La souche utilisée est la souche B47 de *H. pylori*. Or cette souche est *cagPAI* négative ce qui conforte les données sur l'absence d'association entre ce facteur de virulence et le LGM (40). D'autres facteurs de virulence pourraient être étudiés en utilisant ce nouveau modèle de souris transgéniques APRIL et différentes souches de *Helicobacter* knock-out pour d'autres facteurs de virulence bactériens.

Enfin, il sera absolument primordial d'évaluer à l'avenir les niveaux de production de APRIL dans ce modèle de souris transgéniques infectées par différentes espèces du genre *Helicobacter* et de mieux caractériser les réponses inflammatoires gastriques et systémiques en étudiant les cytokines surexprimées pour aider à la compréhension de la réponse immunitaire engendrée par cette cytokine et dans le contexte de l'infection par *Helicobacter*. Un travail est en cours au sein du laboratoire où j'ai réalisé ma thèse.

## 9. Bibliographie

1. Marshall BJ, Warren JR. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet Lond Engl.* 16 juin 1984;1(8390):1311-5.
2. Megraud F, Bonnet F, Garnier M, Lamouliatte H. Characterization of « *Campylobacter pyloridis* » by culture, enzymatic profile, and protein content. *J Clin Microbiol.* déc 1985;22(6):1007-10.
3. Goodwin CS, Armstrong JA, Chilvers T, Peters M, Collins MD, Sly L, et al. Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen. nov. as *Helicobacter pylori* comb. nov. and *Helicobacter mustelae* comb. nov., Respectively. *Int J Syst Bacteriol.* 1 oct 1989;39(4):397-405.
4. Mégraud F. [When and how does *Helicobacter pylori* infection occur?]. *Gastroenterol Clin Biol.* mars 2003;27(3 Pt 2):374-9.
5. Niv Y. H pylori recurrence after successful eradication. *World J Gastroenterol.* 14 mars 2008;14(10):1477-8.
6. Haute Autorité de Santé. Dépistage de l'infection à *Helicobacter pylori* : pertinence et populations concernées. Saint-Denis La Plaine: HAS; 2010.
7. de Korwin J-D. [Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer]. *Rev Prat.* févr 2014;64(2):189-93.
8. Calvet X, Ramírez Lázaro M-J, Lehours P, Mégraud F. Diagnosis and epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter.* sept 2013;18 Suppl 1:5-11.
9. Burkitt MD, Duckworth CA, Williams JM, Pritchard DM. *Helicobacter pylori*-induced gastric pathology: insights from in vivo and ex vivo models. *Dis Model Mech.* 1 févr 2017;10(2):89-104.
10. Mégraud F, Bessède E, Varon C. *Helicobacter pylori* infection and gastric carcinoma. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis.* nov 2015;21(11):984-90.
11. Ford AC, Gurusamy KS, Delaney B, Forman D, Moayyedi P. Eradication therapy for peptic ulcer disease in *Helicobacter pylori*-positive people. *Cochrane Database Syst Rev.* 19 avr 2016;4:CD003840.
12. Centre International de Recherche sur le Cancer. Revue des cancérogènes pour l'Homme. Monographies du CIRC 2015; 100B.

13. Société Française d'Endoscopie Digestive, Chollet R, Létard JC, Vaillant E, Delchier JC, Canard JC, et al. Prévention du cancer de l'estomac. Fiche de recommandation sur la prévention des cancers digestifs par endoscopie. Paris: SFED; 2014.
14. Institut de Veille Sanitaire, Binder-Foucard F, Belot A, Delafosse P, Remontet L, Woronoff AS, et al. Estimation nationale de l'incidence et de la mortalité par cancer en France entre 1980 et 2012. Etude à partir des registres des cancers du réseau Francim. Partie 1 - Tumeurs solides. Saint-Maurice: InVS; 2013.
15. Zucca E, Copie-Bergman C, Ricardi U, Thieblemont C, Raderer M, Ladetto M, et al. Gastric marginal zone lymphoma of MALT type: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol.* oct 2013;24 Suppl 6:vi144-148.
16. Pellicano R, Ribaldone DG, Fagoonee S, Astegiano M, Saracco GM, Mégraud F. A 2016 panorama of *Helicobacter pylori* infection: key messages for clinicians. *Panminerva Med.* déc 2016;58(4):304-17.
17. Lauren P. The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. An attempt at a histo-clinical classification. *Acta Pathol Microbiol Scand.* 1965;64:31-49.
18. Haute Autorité de Santé, Institut National du Cancer. Cancer de l'estomac. Tumeur maligne, affection maligne du tissu lymphatique ou hématopoïétique. Saint-Denis La Plaine: HAS; 2011.
19. Correa P, Haenszel W, Cuello C, Tannenbaum S, Archer M. A model for gastric cancer epidemiology. *Lancet Lond Engl.* 12 juill 1975;2(7924):58-60.
20. Haute Autorité de Santé. Pertinence des actes et prescriptions médicamenteuses chez un patient adulte infecté par *Helicobacter pylori*. Saint-Denis La Plaine: HAS; 2017.
21. Lamarque D, Burucoa C, Courillon-Mallet A, de Korwin J-D, Delchier J-C, Fauchère J-L, et al. Révision des recommandations françaises sur la prise en charge de l'infection par *Helicobacter pylori*. 2012;475-502.
22. Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain CA, Gisbert JP, Kuipers EJ, Axon AT, et al. Management of *Helicobacter pylori* infection-the Maastricht V/Florence Consensus Report. *Gut.* janv 2017;66(1):6-30.
23. Société Française d'Endoscopie Digestive, Heresbach D, Napoléon B, Delchier JC. Consensus en Endoscopie Digestive (CED). Indications des biopsies digestives au cours de la fibroscopie ou du dépistage des néoplasies oeso-gastro-duodénales. Paris: Springer; 2009.
24. Jonkers D, Stobberingh E, de Bruine A, Arends JW, Stockbrügger R. Evaluation of immunohistochemistry for the detection of *Helicobacter pylori* in gastric mucosal biopsies. *J Infect.* sept 1997;35(2):149-54.

25. Batts KP, Ketover S, Kakar S, Krasinskas AM, Mitchell KA, Wilcox R, et al. Appropriate use of special stains for identifying *Helicobacter pylori*: Recommendations from the Rodger C. Haggitt Gastrointestinal Pathology Society. *Am J Surg Pathol*. nov 2013;37(11):e12-22.
26. Monteiro L, de Mascarel A, Sarrasqueta AM, Bergey B, Barberis C, Talby P, et al. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection: noninvasive methods compared to invasive methods and evaluation of two new tests. *Am J Gastroenterol*. févr 2001;96(2):353-8.
27. Mégraud F, Bessède E, Lehours P. [Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection]. *Rev Prat*. févr 2014;64(2):201-6.
28. Mégraud F, Floch P, Labenz J, Lehours P. Diagnostic of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*. sept 2016;21 Suppl 1:8-13.
29. Atkinson NSS, Braden B. *Helicobacter Pylori* Infection: Diagnostic Strategies in Primary Diagnosis and After Therapy. *Dig Dis Sci*. janv 2016;61(1):19-24.
30. Ducournau A, Bénéjat L, Sifré E, Bessède E, Lehours P, Mégraud F. *Helicobacter pylori* resistance to antibiotics in 2014 in France detected by phenotypic and genotypic methods. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis*. août 2016;22(8):715-8.
31. Lamarque D, Burucoa C, Courillon-Mallet A, de Korwin JD, Delchier JC, Heluwaert F, Lehours P, Megraud F, Moussata D,, Amiot A, Breurec S, Raymond J. Recommandations sur le traitement de l'infection à *Helicobacter pylori* chez l'adulte. *Hepato Gastro* 2017; 24: 157-170.
32. Giorgio F, Principi M, De Francesco V, Zullo A, Losurdo G, Di Leo A, et al. Primary clarithromycin resistance to *Helicobacter pylori*: Is this the main reason for triple therapy failure? *World J Gastrointest Pathophysiol*. 15 août 2013;4(3):43-6.
33. Clyne M, Labigne A, Drumm B. *Helicobacter pylori* requires an acidic environment to survive in the presence of urea. *Infect Immun*. mai 1995;63(5):1669-73.
34. Ha NC, Oh ST, Sung JY, Cha KA, Lee MH, Oh BH. Supramolecular assembly and acid resistance of *Helicobacter pylori* urease. *Nat Struct Biol*. juin 2001;8(6):505-9.
35. Nakamura H, Yoshiyama H, Takeuchi H, Mizote T, Okita K, Nakazawa T. Urease plays an important role in the chemotactic motility of *Helicobacter pylori* in a viscous environment. *Infect Immun*. oct 1998;66(10):4832-7.
36. Falk PG, Syder AJ, Guruge JL, Kirschner D, Blaser MJ, Gordon JI. Theoretical and experimental approaches for studying factors defining the *Helicobacter pylori*-host relationship. *Trends Microbiol*. juill 2000;8(7):321-9.

37. Ilver D, Arnqvist A, Ogren J, Frick IM, Kersulyte D, Incecik ET, et al. Helicobacter pylori adhesin binding fucosylated histo-blood group antigens revealed by retagging. *Science*. 16 janv 1998;279(5349):373-7.
38. Mahdavi J, Sondén B, Hurtig M, Olfat FO, Forsberg L, Roche N, et al. Helicobacter pylori SabA adhesin in persistent infection and chronic inflammation. *Science*. 26 juill 2002;297(5581):573-8.
39. Prinz C, Schöniger M, Rad R, Becker I, Keiditsch E, Wagenpfeil S, et al. Key importance of the Helicobacter pylori adherence factor blood group antigen binding adhesin during chronic gastric inflammation. *Cancer Res*. 1 mars 2001;61(5):1903-9.
40. Floch P, Mégraud F, Lehours P. Helicobacter pylori Strains and Gastric MALT Lymphoma. *Toxins*. 8 avr 2017;9(4).
41. Gerhard M, Lehn N, Neumayer N, Borén T, Rad R, Schepp W, et al. Clinical relevance of the Helicobacter pylori gene for blood-group antigen-binding adhesin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 26 oct 1999;96(22):12778-83.
42. Oleastro M, Ménard A. The Role of Helicobacter pylori Outer Membrane Proteins in Adherence and Pathogenesis. *Biology*. 27 août 2013;2(3):1110-34.
43. Pesci EC, Pickett CL. Genetic organization and enzymatic activity of a superoxide dismutase from the microaerophilic human pathogen, Helicobacter pylori. *Gene*. 27 mai 1994;143(1):111-6.
44. Hazell SL, Evans DJ, Graham DY. Helicobacter pylori catalase. *J Gen Microbiol*. janv 1991;137(1):57-61.
45. Lundström AM, Bölin I. A 26 kDa protein of helicobacter pylori shows alkyl hydroperoxide reductase (AhpC) activity and the mono-cistronic transcription of the gene is affected by pH. *Microb Pathog*. nov 2000;29(5):257-66.
46. Blaser MJ. Hypotheses on the pathogenesis and natural history of Helicobacter pylori-induced inflammation. *Gastroenterology*. févr 1992;102(2):720-7.
47. Covacci A, Telford JL, Del Giudice G, Parsonnet J, Rappuoli R. Helicobacter pylori virulence and genetic geography. *Science*. 21 mai 1999;284(5418):1328-33.
48. Backert S, Ziska E, Brinkmann V, Zimny-Arndt U, Fauconnier A, Jungblut PR, et al. Translocation of the Helicobacter pylori CagA protein in gastric epithelial cells by a type IV secretion apparatus. *Cell Microbiol*. avr 2000;2(2):155-64.
49. Odenbreit S, Püls J, Sedlmaier B, Gerland E, Fischer W, Haas R. Translocation of Helicobacter pylori CagA into gastric epithelial cells by type IV secretion. *Science*. 25 févr 2000;287(5457):1497-500.

50. Segal ED, Cha J, Lo J, Falkow S, Tompkins LS. Altered states: involvement of phosphorylated CagA in the induction of host cellular growth changes by *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 7 déc 1999;96(25):14559-64.
51. Baud J, Varon C, Chabas S, Chambonnier L, Darfeuille F, Staedel C. *Helicobacter pylori* initiates a mesenchymal transition through ZEB1 in gastric epithelial cells. *PLoS One*. 2013;8(4):e60315.
52. Thiery JP, Acloque H, Huang RYJ, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*. 25 nov 2009;139(5):871-90.
53. Bessède E, Staedel C, Acuña Amador LA, Nguyen PH, Chambonnier L, Hatakeyama M, et al. *Helicobacter pylori* generates cells with cancer stem cell properties via epithelial-mesenchymal transition-like changes. *Oncogene*. 7 août 2014;33(32):4123-31.
54. Brandt S, Kwok T, Hartig R, König W, Backert S. NF-kappaB activation and potentiation of proinflammatory responses by the *Helicobacter pylori* CagA protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 28 juin 2005;102(26):9300-5.
55. Viala J, Chaput C, Boneca IG, Cardona A, Girardin SE, Moran AP, et al. Nod1 responds to peptidoglycan delivered by the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island. *Nat Immunol*. nov 2004;5(11):1166-74.
56. Backert S, Selbach M. Role of type IV secretion in *Helicobacter pylori* pathogenesis. *Cell Microbiol*. août 2008;10(8):1573-81.
57. Nguyen VQ, Caprioli RM, Cover TL. Carboxy-terminal proteolytic processing of *Helicobacter pylori* vacuolating toxin. *Infect Immun*. janv 2001;69(1):543-6.
58. Lupetti P, Heuser JE, Manetti R, Massari P, Lanzavecchia S, Bellon PL, et al. Oligomeric and subunit structure of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin. *J Cell Biol*. mai 1996;133(4):801-7.
59. Cover TL, Hanson PI, Heuser JE. Acid-induced dissociation of VacA, the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin, reveals its pattern of assembly. *J Cell Biol*. 25 août 1997;138(4):759-69.
60. Galmiche A, Rassow J, Doye A, Cagnol S, Chambard JC, Contamin S, et al. The N-terminal 34 kDa fragment of *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin targets mitochondria and induces cytochrome c release. *EMBO J*. 1 déc 2000;19(23):6361-70.
61. Atherton JC, Cao P, Peek RM, Tummuru MK, Blaser MJ, Cover TL. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. Association of specific vacA types with cytotoxin production and peptic ulceration. *J Biol Chem*. 28 juill 1995;270(30):17771-7.
62. Sherburne R, Taylor DE. *Helicobacter pylori* expresses a complex surface carbohydrate, Lewis X. *Infect Immun*. déc 1995;63(12):4564-8.

63. Appelmelk BJ, Faller G, Claeys D, Kirchner T, Vandenbroucke-Grauls CM. Bugs on trial: the case of *Helicobacter pylori* and autoimmunity. *Immunol Today*. juill 1998;19(7):296-9.
64. Appelmelk BJ, Monteiro MA, Martin SL, Moran AP, Vandenbroucke-Grauls CM. Why *Helicobacter pylori* has Lewis antigens. *Trends Microbiol*. déc 2000;8(12):565-70.
65. Moran AP. The role of lipopolysaccharide in *Helicobacter pylori* pathogenesis. *Aliment Pharmacol Ther*. avr 1996;10 Suppl 1:39-50.
66. Cullen TW, Giles DK, Wolf LN, Ecobichon C, Boneca IG, Trent MS. *Helicobacter pylori* versus the host: remodeling of the bacterial outer membrane is required for survival in the gastric mucosa. *PLoS Pathog*. déc 2011;7(12):e1002454.
67. Salama NR, Hartung ML, Müller A. Life in the human stomach: persistence strategies of the bacterial pathogen *Helicobacter pylori*. *Nat Rev Microbiol*. juin 2013;11(6):385-99.
68. Robinson K, Argent RH, Atherton JC. The inflammatory and immune response to *Helicobacter pylori* infection. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2007;21(2):237-59.
69. Smith SM. Role of Toll-like receptors in *Helicobacter pylori* infection and immunity. *World J Gastrointest Pathophysiol*. 15 août 2014;5(3):133-46.
70. Schwartz JT, Allen L-AH. Role of urease in megasome formation and *Helicobacter pylori* survival in macrophages. *J Leukoc Biol*. juin 2006;79(6):1214-25.
71. Allen LA. The role of the neutrophil and phagocytosis in infection caused by *Helicobacter pylori*. *Curr Opin Infect Dis*. juin 2001;14(3):273-7.
72. O'Keeffe J, Gately CM, O'Donoghue Y, Zulquernain SA, Stevens FM, Moran AP. Natural killer cell receptor T-lymphocytes in normal and *Helicobacter pylori*-infected human gastric mucosa. *Helicobacter*. déc 2008;13(6):500-5.
73. Figueiredo Soares T, Aguiar Rocha G, Camargos Rocha AM, Corrêa-Oliveira R, Martins-Filho OA, Teles Carvalho AS, et al. Differences in peripheral blood lymphocyte phenotypes between *Helicobacter pylori*-positive children and adults with duodenal ulcer. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis*. nov 2007;13(11):1083-8.
74. Popova A, Kzhyshkowska J, Nurgazieva D, Goerdts S, Gratchev A. Pro- and anti-inflammatory control of M-CSF-mediated macrophage differentiation. *Immunobiology*. févr 2011;216(1-2):164-72.
75. Wilke CM, Bishop K, Fox D, Zou W. Deciphering the role of Th17 cells in human disease. *Trends Immunol*. déc 2011;32(12):603-11.

76. Ferreri AJM, Govi S, Ponzoni M. Marginal zone lymphomas and infectious agents. *Semin Cancer Biol.* déc 2013;23(6):431-40.
77. Wotherspoon AC, Ortiz-Hidalgo C, Falzon MR, Isaacson PG. Helicobacter pylori-associated gastritis and primary B-cell gastric lymphoma. *Lancet Lond Engl.* 9 nov 1991;338(8776):1175-6.
78. Siddiqui ST, Naz E, Danish F, Mirza T, Aziz S, Ali A. Frequency of Helicobacter pylori in biopsy proven gastritis and its association with lymphoid follicle formation. *JPMA J Pak Med Assoc.* févr 2011;61(2):138-41.
79. Hussell T, Isaacson PG, Crabtree JE, Spencer J. The response of cells from low-grade B-cell gastric lymphomas of mucosa-associated lymphoid tissue to Helicobacter pylori. *Lancet Lond Engl.* 4 sept 1993;342(8871):571-4.
80. Wotherspoon AC, Doglioni C, Diss TC, Pan L, Moschini A, de Boni M, et al. Regression of primary low-grade B-cell gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue type after eradication of Helicobacter pylori. *Lancet Lond Engl.* 4 sept 1993;342(8871):575-7.
81. D'Elis MM, Amedei A, Manghetti M, Costa F, Baldari CT, Quazi AS, et al. Impaired T-cell regulation of B-cell growth in Helicobacter pylori--related gastric low-grade MALT lymphoma. *Gastroenterology.* nov 1999;117(5):1105-12.
82. Rosebeck S, Madden L, Jin X, Gu S, Apel IJ, Appert A, et al. Cleavage of NIK by the API2-MALT1 fusion oncoprotein leads to noncanonical NF-kappaB activation. *Science.* 28 janv 2011;331(6016):468-72.
83. Merga YJ, O'Hara A, Burkitt MD, Duckworth CA, Probert CS, Campbell BJ, et al. Importance of the alternative NF-kB activation pathway in inflammation-associated gastrointestinal carcinogenesis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 1 juin 2016;310(11):G1081-1090.
84. Delchier JC, Lamarque D, Levy M, Tkoub EM, Copie-Bergman C, Deforges L, et al. 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.* août 2001;96(8):2324-8.
85. Lehours P, Ménard A, Dupouy S, Bergey B, Richy F, Zerbib F, et al. Evaluation of the association of nine Helicobacter pylori virulence factors with strains involved in low-grade gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Infect Immun.* févr 2004;72(2):880-8.
86. Lehours P, Zheng Z, Skoglund A, Mégraud F, Engstrand L. Is there a link between the lipopolysaccharide of Helicobacter pylori gastric MALT lymphoma associated strains and lymphoma pathogenesis? *PLoS One.* 6 oct 2009;4(10):e7297.

87. Watanabe T, Tada M, Nagai H, Sasaki S, Nakao M. Helicobacter pylori infection induces gastric cancer in mongolian gerbils. Gastroenterology. sept 1998;115(3):642-8.
88. Court M, Robinson PA, Dixon MF, Crabtree JE. Gastric Helicobacter species infection in murine and gerbil models: comparative analysis of effects of H. pylori and H. felis on gastric epithelial cell proliferation. J Infect Dis. 1 nov 2002;186(9):1348-52.
89. De Bock M, D'Herde K, Duchateau L, Hellemans A, Decostere A, Haesebrouck F, et al. The effect of Helicobacter felis and Helicobacter bizzozeronii on the gastric mucosa in Mongolian gerbils: a sequential pathological study. J Comp Pathol. nov 2006;135(4):226-36.
90. De Bock M, Decostere A, Hellemans A, Haesebrouck F, Ducatelle R. Helicobacter felis and Helicobacter bizzozeronii induce gastric parietal cell loss in Mongolian gerbils. Microbes Infect. févr 2006;8(2):503-10.
91. Lee A, Hazell SL, O'Rourke J, Kouprach S. Isolation of a spiral-shaped bacterium from the cat stomach. Infect Immun. nov 1988;56(11):2843-50.
92. Lee A, O'Rourke J, De Ungria MC, Robertson B, Daskalopoulos G, Dixon MF. A standardized mouse model of Helicobacter pylori infection: introducing the Sydney strain. Gastroenterology. avr 1997;112(4):1386-97.
93. Mueller A, O'Rourke J, Grimm J, Guillemin K, Dixon MF, Lee A, et al. Distinct gene expression profiles characterize the histopathological stages of disease in Helicobacter-induced mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. Proc Natl Acad Sci U S A. 4 févr 2003;100(3):1292-7.
94. Elfvin A, Bölin I, Von Bothmer C, Stolte M, Watanabe H, Fändriks L, et al. Helicobacter pylori induces gastritis and intestinal metaplasia but no gastric adenocarcinoma in Mongolian gerbils. Scand J Gastroenterol. nov 2005;40(11):1313-20.
95. Franco AT, Israel DA, Washington MK, Krishna U, Fox JG, Rogers AB, et al. Activation of beta-catenin by carcinogenic Helicobacter pylori. Proc Natl Acad Sci U S A. 26 juill 2005;102(30):10646-51.
96. Sakagami T, Dixon M, O'Rourke J, Howlett R, Alderuccio F, Vella J, et al. Atrophic gastric changes in both Helicobacter felis and Helicobacter pylori infected mice are host dependent and separate from antral gastritis. Gut. nov 1996;39(5):639-48.
97. Dixon MF, Genta RM, Yardley JH, Correa P. Classification and grading of gastritis. The updated Sydney System. International Workshop on the Histopathology of Gastritis, Houston 1994. Am J Surg Pathol. oct 1996;20(10):1161-81.

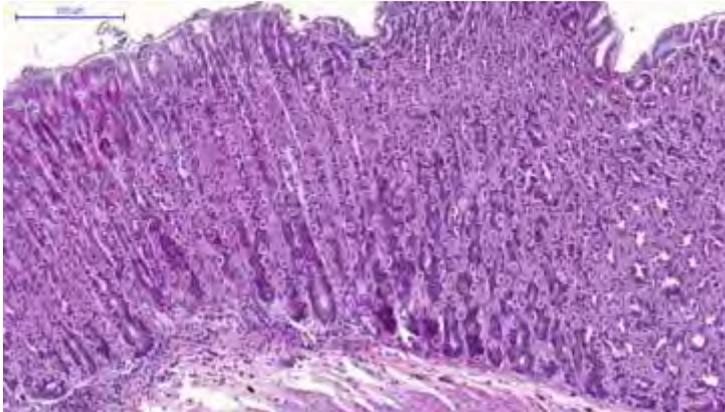
98. Thompson LJ, Danon SJ, Wilson JE, O'Rourke JL, Salama NR, Falkow S, et al. Chronic *Helicobacter pylori* infection with Sydney strain 1 and a newly identified mouse-adapted strain (Sydney strain 2000) in C57BL/6 and BALB/c mice. *Infect Immun.* août 2004;72(8):4668-79.
99. Kim DH, Kim SW, Song YJ, Oh TY, Han SU, Kim YB, et al. Long-term evaluation of mice model infected with *Helicobacter pylori*: focus on gastric pathology including gastric cancer. *Aliment Pharmacol Ther.* juill 2003;18 Suppl 1:14-23.
100. Fox JG, Sheppard BJ, Dangler CA, Whary MT, Ibragimov M, Wang TC. Germ-line p53-targeted disruption inhibits helicobacter-induced premalignant lesions and invasive gastric carcinoma through down-regulation of Th1 proinflammatory responses. *Cancer Res.* 1 févr 2002;62(3):696-702.
101. Cai X, Carlson J, Stoicov C, Li H, Wang TC, Houghton J. *Helicobacter felis* eradication restores normal architecture and inhibits gastric cancer progression in C57BL/6 mice. *Gastroenterology.* juin 2005;128(7):1937-52.
102. Wang TC, Goldenring JR, Dangler C, Ito S, Mueller A, Jeon WK, et al. Mice lacking secretory phospholipase A2 show altered apoptosis and differentiation with *Helicobacter felis* infection. *Gastroenterology.* avr 1998;114(4):675-89.
103. Mohammadi M, Redline R, Nedrud J, Czinn S. Role of the host in pathogenesis of *Helicobacter*-associated gastritis: *H. felis* infection of inbred and congenic mouse strains. *Infect Immun.* janv 1996;64(1):238-45.
104. Enno A, O'Rourke JL, Howlett CR, Jack A, Dixon MF, Lee A. 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.* juill 1995;147(1):217-22.
105. Sutton P, O'Rourke J, Wilson J, Dixon MF, Lee A. Immunisation against *Helicobacter felis* infection protects against the development of gastric MALT Lymphoma. *Vaccine.* 30 juin 2004;22(20):2541-6.
106. Wang X, Willén R, Svensson M, Ljungh A, Wadström T. Two-year follow-up of *Helicobacter pylori* infection in C57BL/6 and Balb/cA mice. *APMIS Acta Pathol Microbiol Immunol Scand.* avr 2003;111(4):514-22.
107. Wang X, Willén R, Andersson C, Wadström T. Development of high-grade lymphoma in *Helicobacter pylori*-infected C57BL/6 mice. *APMIS Acta Pathol Microbiol Immunol Scand.* août 2000;108(7-8):503-8.
108. Fukui T, Okazaki K, Tamaki H, Kawasaki K, Matsuura M, Asada M, et al. Immunogenetic analysis of gastric MALT lymphoma-like lesions induced by *Helicobacter pylori* infection in neonatally thymectomized mice. *Lab Invest J Tech Methods Pathol.* avr 2004;84(4):485-92.

109. Chrisment D, Dubus P, Chambonnier L, Hocès de la Guardia A, Sifré E, Giese A, et al. Neonatal thymectomy favors Helicobacter pylori-promoted gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma lesions in BALB/c mice. *Am J Pathol.* août 2014;184(8):2174-84.
110. Hahne M, Kataoka T, Schröter M, Hofmann K, Irmeler M, Bodmer JL, et al. APRIL, a new ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates tumor cell growth. *J Exp Med.* 21 sept 1998;188(6):1185-90.
111. Marsters SA, Yan M, Pitti RM, Haas PE, Dixit VM, Ashkenazi A. Interaction of the TNF homologues BLYS and APRIL with the TNF receptor homologues BCMA and TACI. *Curr Biol.* juin 2000;10(13):785-8.
112. López-Fraga M, Fernández R, Albar JP, Hahne M. Biologically active APRIL is secreted following intracellular processing in the Golgi apparatus by furin convertase. *EMBO Rep.* oct 2001;2(10):945-51.
113. Yu G, Boone T, Delaney J, Hawkins N, Kelley M, Ramakrishnan M, et al. APRIL and TALL-1 and receptors BCMA and TACI: system for regulating humoral immunity. *Nat Immunol.* sept 2000;1(3):252-6.
114. Ingold K, Zumsteg A, Tardivel A, Huard B, Steiner Q-G, Cachero TG, et al. Identification of proteoglycans as the APRIL-specific binding partners. *J Exp Med.* 2 mai 2005;201(9):1375-83.
115. Hendriks J, Planelles L, de Jong-Odding J, Hardenberg G, Pals ST, Hahne M, et al. Heparan sulfate proteoglycan binding promotes APRIL-induced tumor cell proliferation. *Cell Death Differ.* juin 2005;12(6):637-48.
116. Hirayama K, Nagai M. The Roles of the TNF-Family Member B-Cell Activation Factor Belonging to the TNF-Family (BAFF) in Autoimmunity. In: Aribi M, éditeur. *Immunopathogenesis and Immune-based Therapy for Selected Autoimmune Disorders* [Internet]. InTech; 2017 [cité 6 janv 2018]. Disponible sur: <http://www.intechopen.com/books/immunopathogenesis-and-immune-based-therapy-for-selected-autoimmune-disorders/the-roles-of-the-tnf-family-member-b-cell-activation-factor-belonging-to-the-tnf-family-baff-in-auto>
117. Moreaux J, Cremer FW, Reme T, Raab M, Mahtouk K, Kaukel P, et al. The level of TACI gene expression in myeloma cells is associated with a signature of microenvironment dependence versus a plasmablastic signature. *Blood.* 1 août 2005;106(3):1021-30.
118. Yang M, Hase H, Legarda-Addison D, Varughese L, Seed B, Ting AT. B cell maturation antigen, the receptor for a proliferation-inducing ligand and B cell-activating factor of the TNF family, induces antigen presentation in B cells. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1 sept 2005;175(5):2814-24.
119. Litinskiy MB, Nardelli B, Hilbert DM, He B, Schaffer A, Casali P, et al. DCs induce CD40-independent immunoglobulin class switching through BLYS and APRIL. *Nat Immunol.* sept 2002;3(9):822-9.

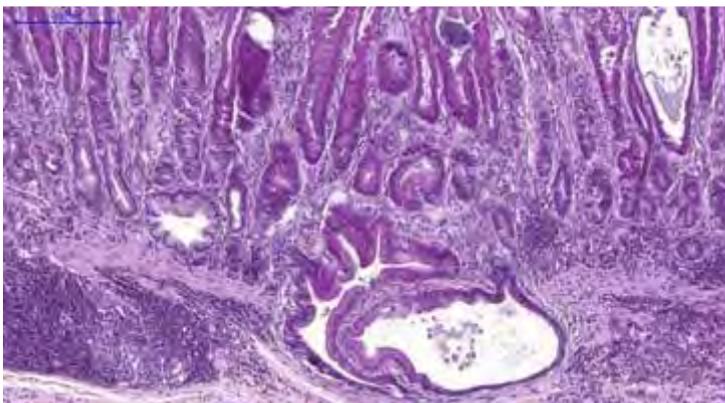
120. Castigli E, Scott S, Dedeoglu F, Bryce P, Jabara H, Bhan AK, et al. Impaired IgA class switching in APRIL-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 16 mars 2004;101(11):3903-8.
121. Castigli E, Wilson SA, Scott S, Dedeoglu F, Xu S, Lam K-P, et al. TACI and BAFF-R mediate isotype switching in B cells. *J Exp Med*. 3 janv 2005;201(1):35-9.
122. Stein JV, López-Fraga M, Elustondo FA, Carvalho-Pinto CE, Rodríguez D, Gómez-Caro R, et al. APRIL modulates B and T cell immunity. *J Clin Invest*. juin 2002;109(12):1587-98.
123. Munari F, Lonardi S, Cassatella MA, Doglioni C, Cangli MG, Amedei A, et al. Tumor-associated macrophages as major source of APRIL in gastric MALT lymphoma. *Blood*. 16 juin 2011;117(24):6612-6.
124. Floch P, Laur AM, Korolik V, Chrisment D, Cappellen D, Idrissi Y, et al. Characterisation of inflammatory processes in *Helicobacter pylori*-induced gastric lymphomagenesis in a mouse model. *Oncotarget*. 27 oct 2015;6(33):34525-36.
125. Wildin RS, Wang HU, Forbush KA, Perlmutter RM. Functional dissection of the murine Ick distal promoter. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1 août 1995;155(3):1286-95.
126. Floch P, Izotte J, Guillemaud J, Sifré E, Costet P, Rousseau B, et al. A New Animal Model of Gastric Lymphomagenesis: APRIL Transgenic Mice Infected by *Helicobacter* Species. *Am J Pathol*. juill 2017;187(7):1473-84.
127. Thiberge J-M, Boursaux-Eude C, Lehours P, Dillies M-A, Creno S, Coppée J-Y, et al. From array-based hybridization of *Helicobacter pylori* isolates to the complete genome sequence of an isolate associated with MALT lymphoma. *BMC Genomics*. 10 juin 2010;11:368.
128. Ferreira-Chagas B, Lasne G, Dupouy S, Gallois A, Morgner A, Ménard A, et al. In vitro proinflammatory properties of *Helicobacter pylori* strains causing low-grade gastric MALT lymphoma. *Helicobacter*. déc 2007;12(6):616-7.
129. Varon C, Dubus P, Mazurier F, Asencio C, Chambonnier L, Ferrand J, et al. *Helicobacter pylori* infection recruits bone marrow-derived cells that participate in gastric preneoplasia in mice. *Gastroenterology*. févr 2012;142(2):281-91.
130. Laur AM, Floch P, Chambonnier L, Benejat L, Korolik V, Giese A, et al. Regulatory T cells may participate in *Helicobacter pylori* persistence in gastric MALT lymphoma: lessons from an animal model. *Oncotarget*. 19 janv 2016;7(3):3394-402.
131. Hua C, Audo R, Yeremenko N, Baeten D, Hahne M, Combe B, et al. A proliferation inducing ligand (APRIL) promotes IL-10 production and regulatory functions of human B cells. *J Autoimmun*. sept 2016;73:64-72.

132. Mauri C, Menon M. Human regulatory B cells in health and disease: therapeutic potential. *J Clin Invest*. 1 mars 2017;127(3):772-9.
133. Blair PA, Noreña LY, Flores-Borja F, Rawlings DJ, Isenberg DA, Ehrenstein MR, et al. CD19(+)CD24(hi)CD38(hi) B cells exhibit regulatory capacity in healthy individuals but are functionally impaired in systemic Lupus Erythematosus patients. *Immunity*. 29 janv 2010;32(1):129-40.
134. Flores-Borja F, Bosma A, Ng D, Reddy V, Ehrenstein MR, Isenberg DA, et al. CD19+CD24hiCD38hi B cells maintain regulatory T cells while limiting TH1 and TH17 differentiation. *Sci Transl Med*. 20 févr 2013;5(173):173ra23.

## 10. Annexes



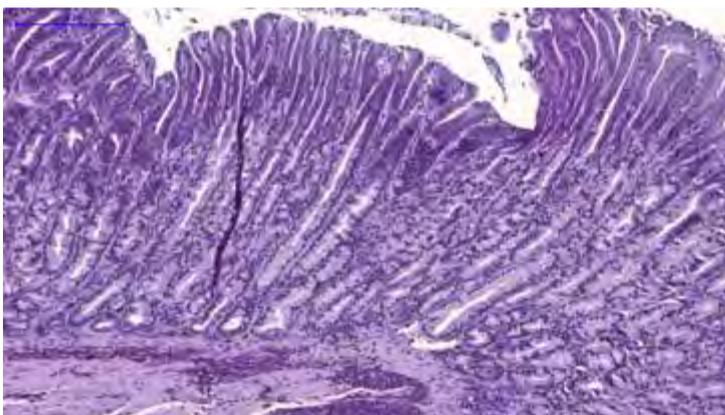
Aspect normal de la muqueuse gastrique



Dysplasie : architecture glandulaire altérée par un envahissement de la muqueuse gastrique

Atrophie : raréfaction des glandes gastriques avec perte des cellules pariétales

Hyperplasie : multiplication des cellules normales de l'estomac avec augmentation de l'épaisseur de la muqueuse gastrique



Métaplasie intestinale : remplacement des cellules de la muqueuse gastrique par des cellules ayant un phénotype de type intestinal

Annexe 1 : Aspects des différentes lésions préneoplasiques retrouvées.

Annexe 2 (pages suivantes) : Article publié dans *The American Journal of Pathology* par Floch *et al.* en Juillet 2017 sur les résultats obtenus en fond génétique C57BL6.

**ANIMAL MODELS**

# A New Animal Model of Gastric Lymphomagenesis

## *APRIL Transgenic Mice Infected by Helicobacter Species*



Pauline Floch,<sup>\*</sup> Julien Izotte,<sup>\*</sup> Julien Guillemaud,<sup>\*</sup> Elodie Sifré,<sup>\*</sup> Pierre Costet,<sup>†</sup> Benoit Rousseau,<sup>†</sup> Amandine Marine Laur,<sup>\*</sup> Alban Giese,<sup>\*</sup> Victoria Korolik,<sup>‡</sup> Francis Mégraud,<sup>\*</sup> Pierre Dubus,<sup>\*</sup> Michael Hahne,<sup>§</sup> and Philippe Lehours<sup>\*</sup>

From INSERM UMR1053,<sup>\*</sup> Bordeaux Research in Translational Oncology, Bordeaux, France; Animal Facilities,<sup>†</sup> University of Bordeaux, Bordeaux, France; the Montpellier Institute of Molecular Genetics UMR5535,<sup>§</sup> University of Montpellier, Montpellier, France; and the Institute for Glycomics,<sup>‡</sup> Griffith University, Gold Coast, Queensland, Australia

Accepted for publication  
March 9, 2017.

Address correspondence to  
Philippe Lehours, Pharm.D.,  
Ph.D., Université de Bordeaux,  
INSERM UMR1053, Bordeaux  
Research in Translational  
Oncology, Bordeaux, France.  
E-mail: philippe.lehours@u-  
bordeaux.fr.

APRIL is a member of the tumor necrosis factor cytokine family involved in the regulation of B-cell immunity. We present a study of the infection by *Helicobacter* species of transgenic (Tg) C57BL6 mice, ectopically expressing the human form of APRIL. Wild-type (WT) and APRIL Tg mice were infected with *Helicobacter felis* and *Helicobacter pylori* and compared with noninfected animals. Mice were euthanized 18 months after infection, and inflammatory responses and histologic alterations were analyzed. Flow cytometry results revealed that WT-infected mice had less leukocyte infiltration than APRIL Tg-infected mice. In WT-infected mice, infiltrates in gastric tissues were predominantly composed of T cells, mainly CD4<sup>+</sup> for *H. pylori* and CD8<sup>+</sup> for *H. felis*. In APRIL Tg-infected mice, leukocyte infiltrates were composed of B cells with few CD4<sup>+</sup> T cells for both species. B cells expressed B surface markers compatible with a marginal zone origin. These results were confirmed by immunohistochemistry. B cells in particular were involved in lymphoepithelial lesions, a hallmark of gastric MALT lymphoma. Monoclonality was observed in a few infiltrates in the presence of lymphoepithelial lesions. These results confirm the importance of APRIL in the development of gastric lymphoid infiltrates induced by *Helicobacter* species *in vivo*. We believe that APRIL Tg mice infected by *Helicobacter* species may represent a novel animal model of gastric lymphomagenesis. (*Am J Pathol* 2017, 187: 1473–1484; <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajpath.2017.03.004>)

Extranodal marginal zone—type MALT lymphomas are indolent, low-grade, mature small B-cell non-Hodgkin lymphomas that occur in a number of extranodal organs, including the gastrointestinal tract.<sup>1</sup> Among these, the stomach is the most frequent site for the development of MALT lymphoma. Gastric MALT lymphoma (GML) in humans can be directly related to infection by *Helicobacter pylori*, but it only appears in a small subset of infected individuals.<sup>2</sup> *H. pylori* eradication leads to complete remission in 60% to 80% of such cases.<sup>3</sup> Long-term antigenic stimulation exerted by *H. pylori* on the gastric mucosa leads to the formation of dense lymphoid infiltrates that contain small centrocytic B-cell—expressing surface markers typical of the marginal zone B cells of normal MALT. B cells are organized in lymphoid follicles and are involved in lymphoepithelial lesions (LELs), characterized by the invasion of the

epithelium of the gastric glands by proliferating B cells and epithelial cell destruction.<sup>4</sup> Nonneoplastic T lymphocytes are associated with lymphoma cells with a predominance of CD4<sup>+</sup> helper T cells.<sup>5</sup>

To better understand mechanisms that promote gastric lymphomagenesis and because of the difficulty in obtaining primary xenografts from surgical specimens of patients with GML, animal models need to be developed. Three *Helicobacter* species—*Helicobacter felis*,<sup>6–9</sup> *Helicobacter heilmannii*,<sup>8,10–12</sup> and *Helicobacter pylori*,<sup>8,13–16</sup>—and three rodents—C57BL6<sup>12,13</sup> and BALB/c mice<sup>6–10,13–15</sup> and Mongolian gerbils<sup>11</sup>—are generally used.

Supported by Sites de Recherche Intégrée sur le Cancer, Bordeaux Recherche Intégrée en Oncologie (SIRIC-BRIO; A.G.).

Disclosures: None declared.

At 18 to 24 months post infection (PI), *H. felis*-infected BALB/c mice develop histologic lesions evocative of GML, composed of B cells with some infiltrating T cells (mainly CD4<sup>+</sup>) associated with LELs.<sup>6,8</sup> *H. heilmannii* induced the development of GML to various degrees (25% to 66% of infected animals) and at a later time after infection (18 to 24 months PI) in BALB/c,<sup>8,10</sup> C57BL6,<sup>6,12</sup> or Mongolian gerbils.<sup>11</sup> For *H. pylori*, the *Helicobacter* species mostly found in human GML, the situation is more complex. C57BL/6 mice were first described as a model of high-grade GML,<sup>13</sup> whereas BALB/c mice were described as a model of low-grade GML.<sup>8,14,15</sup> Only a small percentage (<20%) of infected BALB/c mice developed lymphomas 24 months PI, rendering this model difficult to use. More recently, BALB/c mice that underwent thymectomy at day 3 after birth have been described as an alternative model with a much earlier onset of gastric lymphomagenesis.<sup>16</sup> BALB/c mice infected with *H. pylori* strains that underwent thymectomy at day 3 after birth developed histologic characteristics of GML at 12 months PI in 60% of cases, whereas noninfected mice and infected nonthymectomized mice did not.<sup>16</sup> Neonatal thymectomy seems to be an interesting model to study the pathophysiology of GML but is very difficult to implement in practice.

A previous study implicated APRIL (a proliferation-inducing ligand) in the induction and maintenance of B-cell immunity and in the survival and proliferation of B cells *in vivo*.<sup>17</sup> APRIL promotes antigen presentation to B cells via increasing expression of co-stimulatory molecules, such as CD40.<sup>18</sup> In Hodgkin lymphoma, APRIL activates the NF- $\kappa$ B pathway and promotes the expression of anti-apoptotic proteins (BCL-2, BCL-xL, and MYC) via transmembrane activator and calcium modulator and cyclophilin ligand interactor (TACI) and B-cell maturation antigen (BCMA) receptors, resulting in increased cell survival and proliferation.<sup>19</sup> The implication of APRIL was also found in chronic lymphocytic leukemia, follicular, and Burkitt lymphomas.<sup>20–23</sup> Recently, Munari et al<sup>24</sup> reported that high levels of APRIL were produced by tumor-infiltrating macrophages in a case of *H. pylori*-dependent GML and that macrophages produced APRIL after direct stimulation with both *H. pylori* and *H. pylori*-specific T cells. The number of APRIL-producing macrophages was reduced after lymphoma regression induced by *H. pylori* eradication. APRIL is a tumor necrosis factor superfamily member known to be important for B-cell development, maturation, and survival. Interestingly, several members of the tumor necrosis factor superfamily, such as APRIL, B-cell-activating factor of the tumor necrosis factor family, or TACI, a receptor for APRIL, were found to be overexpressed in *H. pylori*-infected mice that underwent thymectomy at day 3 after birth at the GML stage.<sup>25</sup>

To study the role of APRIL during *Helicobacter* infection we used previously described APRIL transgenic (Tg) mice.<sup>26</sup> APRIL is a T-cell secreted factor, and therefore effects are systemic in this mouse strain. We hypothesized that infection with *Helicobacter* (*H. felis* versus *H. pylori*) in

mice ectopically expressing APRIL would override the natural brake observed in wild-type (WT) animals and therefore allow lymphoid infiltration. The results presented in this study indicate that APRIL Tg mice, infected by *Helicobacter* species, could serve as a novel animal model of gastric lymphomagenesis.

## Materials and Methods

### Mice

*Helicobacter*-free C57BL6 mice were obtained from Charles River Laboratories (L'Arbresle, France). APRIL Tg C57BL6 mice were provided by Dr. Michael Hahne (Université de Montpellier, Institut de Génétique Moléculaire de Montpellier, UMR5535).<sup>26</sup> All experiments were performed in specific pathogen-free animal facilities at the University of Bordeaux. The animal experiments were performed according to European Union recommendations (European Directive 2010/63/EU) on animal experimentation. The project was evaluated by a local ethical committee of the University of Bordeaux and conforms 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 (replacement, reduction and refinement; approval number 50120143-A). Only female neonates were used for experiments.

### *Helicobacter* Species Strains and Infection Experiments

*H. pylori* strain B47, a *H. pylori* *cag* pathogenicity island-negative human GML-associated strain, was used for its ability to colonize mouse stomachs<sup>27,28</sup> and to induce GML-lesions as previously described.<sup>16</sup> *H. felis* CS1 (ATCC 49179; ATCC, Manassas, VA) was used for its capacity to induce severe inflammation and GML lesions in mouse models.

*H. pylori* and *H. felis* strains were cultured under microaerobic conditions (N<sub>2</sub>, 85%; O<sub>2</sub>, 5%; CO<sub>2</sub>, 10%) at 37°C, as previously described.<sup>29</sup>

For infection inocula, *H. pylori* and *H. felis* strains were grown on selective agar plates and transferred to *Brucella* broth medium. Six-week-old mice were fasted to facilitate bacterial colonization and then force-fed for 3 consecutive days with a dose of 10<sup>8</sup> *H. pylori* or 10<sup>8</sup> *H. felis* per mouse, as previously described (20 mice for each group).<sup>30</sup>

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

### Flow Cytometry Analysis of Stomach Samples

Stomachs were cut into small fragments that were then subjected to two 20-minute incubation cycles with gentle

shaking at 37°C in 10 mL of Hanks' balanced salt solution (Ca<sup>2+</sup>Mg<sup>2+</sup> free) (Gibco, Life Technologies, Saint Aubin, France), 1 mmol/L HEPES (Gibco, Life Technologies), 1 mmol/L dithioerythritol (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France), and 10% fetal bovine serum (Sigma-Aldrich). Debris was removed by passage through a 70- $\mu$ m Falcon Cell Strainer (BD Biosciences, San Jose, CA). After filtration, the cells were centrifuged at 1870  $\times$  *g* for 5 minutes at 4°C, the supernatant was discarded, and the cells were washed twice in 10 mL of RPMI 1640 medium (GlutaMAX; Gibco, Life Technologies) and 8% fetal bovine serum before staining. All cell suspensions were incubated with DAPI to assess cell viability (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) in a volume of 10 mL of phosphate-buffered saline, 0.5% bovine serum albumin (Gibco, Life Technologies), and 2 mmol/L EDTA (Sigma-Aldrich) for 15 minutes at 4°C. All labeled antibodies were purchased from PharMingen/BD Biosciences. T lymphocytes were characterized using CD45 antigen-presenting cell (clone 30-F11), CD3 $\epsilon$  fluorescein isothiocyanate (clone 145-2C11), CD8 $\alpha$  phycoerythrin cyanine 7 (clone 53-6.7), and CD4 antigen-presenting cell (clone RM4-5). B lymphocytes were characterized using CD21/CD35 antigen-presenting cell (clone 7G6), CD5 fluorescein isothiocyanate (clone 53-7.3), IgM phycoerythrin cyanine 7 (clone R6-60.2), and B220 phycoerythrin (clone RA3-6B2). Cells were washed once and analyzed on a LSRFortessa flow cytometer (BD Biosciences) using FACS Diva software version 8.0.1 (BD Biosciences).

### Histologic and Immunohistochemistry Experiments

Tg and WT mice were euthanized at 18 months PI. Half of the stomach was fixed in formaldehyde. Sections (3- $\mu$ m thick) from paraffin-embedded tissues were processed for hematoxylin and eosin (H&E) staining. H&E-stained sections were coded and examined blindly by a pathologist (P.D.) for the presence of lymphoid infiltrates and LELs. These features were graded on a 0- to 3-point scale, according to the following criteria<sup>8</sup> for lymphocytic infiltration: 0, no change; 1, single or few small aggregates of lymphocytes; 2, multiple multifocal large lymphoid aggregates or follicles; and 3, extensive multifocal lymphocytic infiltration often extending through the depth of mucosa, resulting in distortion of the epithelial surface, as previously described.<sup>16</sup> Inflammation, hyperplasia, oxyntic gland atrophy, mucinous, and pseudo-intestinal metaplasia were scored using a scale of 1 to 4, as previously described.<sup>30</sup>

For immunohistochemistry (IHC), sections (3- $\mu$ m thick) from paraffin-embedded tissue were rehydrated, washed, and heated to 100°C for 30 minutes and then brought to room temperature for 30 minutes for antigen retrieval using a buffer (pH 6 for CD45R and Ki-67 staining; pH 9 for CD3 $\epsilon$  and E-cadherin staining). Endogenous peroxidases were inhibited with 3% hydrogen peroxide (Sigma-Aldrich) in water for 5 minutes, and blocking with 2.5% normal goat

(for CD45R and Ki-67) or horse (for CD3 $\epsilon$  and E-cadherin) serum (ImmPRESS Reagent kit peroxidase; Vector Laboratories, Burlingame, CA) was performed for 30 minutes. B lymphocytes were identified with the anti-CD45R rat monoclonal antibody (1:100, clone RA3-6B2; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), and T cells with a polyclonal goat anti-CD3 $\epsilon$  antibody (1:1000, clone M-20; Tebubio, Le Perray-en-Yvelines, France). A gastric cell-cell adhesion protein, E-cadherin, was detected by a polyclonal mouse antibody anti-E-cadherin (1:200, clone 36/E-cadherin; BD Biosciences). Rat anti-murine Ki-67 antibody (1:150, 16A8 clone; BioLegend, San Diego, CA) was used for detection of proliferating cells. After 1-hour incubation at room temperature (30 minutes for Ki-67), primary antibodies were detected using ImmPRESS reagent peroxidase (ImmPRESS Reagent kit peroxidase; Vector Laboratories) and revealed by an additional 10 minutes of incubation with liquid diaminobenzidine Substrate-Chromogen System (Dako, Copenhagen, Denmark) at room temperature. All slides were counterstained with hematoxylin, dehydrated, and mounted with Eukitt mounting medium (Labonord; VWR International, Fontenay-sous-Bois, France).

Slides were scanned using a digital slide scanner (Panoramic SCAN; 3DHISTECH Ltd., Budapest, Hungary) equipped with a Zeiss objective (Plan-Apochromat 40; numerical aperture, 0.95; Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Germany) and a high-resolution color camera (VCC-FC60FR19CL, 4MP; CIS Corporation, Tokyo, Japan) available at the Experimental Histopathology Platform, US 005 UMS 3427-TBM CORE. The images were read using the Panoramic Viewer software version 1.15.4 (3DHISTECH Ltd.). A semiquantitative evaluation of the percentage of proliferating cells was performed with Mercator (Explora Nova, La Rochelle, France) software version 7.12.7 as previously described.<sup>31</sup>

### DNA Extraction and PCR Amplification of the Immunoglobulin Heavy Chain

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

To detect immunoglobulin D-JH rearrangement, PCR was performed in a reaction volume of 25  $\mu$ L containing 5  $\mu$ L of DNA extract (5 ng/ $\mu$ L), with a mixture of 1 $\times$  PCR buffer (GoTaq; Promega, Charbonnières, France), 1  $\mu$ mol/L of each primer [DSF, 5'-AGGGATCCTTGTGAAGG-GATCTACTACTGTG-3', JH4, 5'-AAAGACCTGCA-GAGGCCATTCTTACC-3' (Eurofins, Nantes, France), described by Kawamoto et al<sup>32</sup>], 125  $\mu$ mol/L of dNTPs (Promega), and 0.625 U of Go Taq G2 Hot Start polymerase (Promega). DNAs extracted from clonal B lymphomas from myc/CDK4R24C and myc/P53 mice were used as a positive control (a kind gift of Dr. Yves Denizot, University of

Limoges, Limoges, France).<sup>33</sup> PCRs were started with a 95°C DNA denaturation step for 2 minutes, followed by 40 cycles comprising three steps: a denaturation at 94°C for 30 seconds, a primer hybridization at 58°C for 30 seconds, and an elongation at 72°C for 1.5 minutes. Amplified DNA products were loaded onto a 1% agarose gel containing Midori Green Advance DNA Stain (Nippon Genetics, Düren, Germany) and were also analyzed by Agilent D5000 ScreenTape System (Agilent Technologies, Santa-Clara, CA) with a 2200 TapeStation instrument (Agilent Technologies) using TapeStation Controller Software version A.02.01 (Agilent Technologies).

A polyclonal profile was defined by the presence of several rearrangements on the CDR3 region of the *IgH* gene and represented by amplicons of different sizes of comparable intensity. A monoclonal profile was defined by 1 single PCR amplicon with a fluorescence intensity three times higher than the background peak and an oligoclonal profile by the reduction of the number of PCR amplicons.

### Quantitative PCR to Determine the Bacterial Load in Gastric Biopsies

A quantitative PCR using Fluorescence Resonance Energy Transfer technology targeting DNA coding for *H. pylori* 23S rRNA, previously developed in the laboratory,<sup>34</sup> was performed. Primers described by Oleastro et al<sup>34</sup> were used to amplify the 23S rRNA gene, and primers described by Laur et al<sup>31</sup> were used to amplify the *GAPDH* gene. Each target was tested in duplicate on all samples. A standard curve was prepared using serial dilutions of a DNA extract from a colony-forming unit per milliliter calibrated bacterial suspension of the *H. pylori* SS1 strain. The LightCycler 480 SYBR Green I Master Mix (Roche Diagnostics), compatible with the LightCycler 480 thermocycler (Roche Diagnostics), was used according to the manufacturer's instructions and as previously described.<sup>16</sup>

A quantitative PCR using Fluorescence Resonance Energy Transfer technology targeting DNA coding for *H. felis* *flaA* was developed. Primers described by Burkitt et al<sup>35</sup> were used to amplify the *flaA* gene (60 bp). Each target was tested in duplicate on all samples. A standard curve was prepared using serial dilutions of a DNA extract from a colony-forming unit per milliliter calibrated bacterial suspension of the *H. felis* CS1 strain. The SYBR Premix Ex Taq Mix (Tli RNaseH Plus) (Takara, Saint-Germain-en-Laye, France) compatible with the PCR thermocycler CFX96 (Bio-Rad) available at the TBMCORE real-time PCR platform (University of Bordeaux) was used according to the manufacturer's instructions. The PCR started with a 95°C DNA denaturation step for 3 minutes, followed by 40 cycles comprising 2 steps: a 95°C denaturation step for 5 seconds and a 60°C primers' hybridization step for 30 seconds. After each cycle, fluorescence was measured 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°C to 95°C and the continuous measurement of fluorescence. The generation of this melting curve permitted the verification of one specific peak at the expected melting temperature for each product, which revealed the PCR specificity. The final results were expressed as a ratio of bacteria/murine cells.

DNA extracted from the m-ICc12 murine epithelial cell line available in the laboratory was used to express results as a bacteria/murine cells ratio. The method's detection limit was approximately 0.001 bacteria/murine cells for *H. pylori* and 0.002 bacteria/murine cells for *H. felis*.

### Statistical Analysis

Statistical analyses were performed with GraphPad Prism version 5.01 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA). The Mann-Whitney test was used as nonparametric test to compare the distributions of two unmatched groups. Differences were considered significant when  $P < 0.05$ .

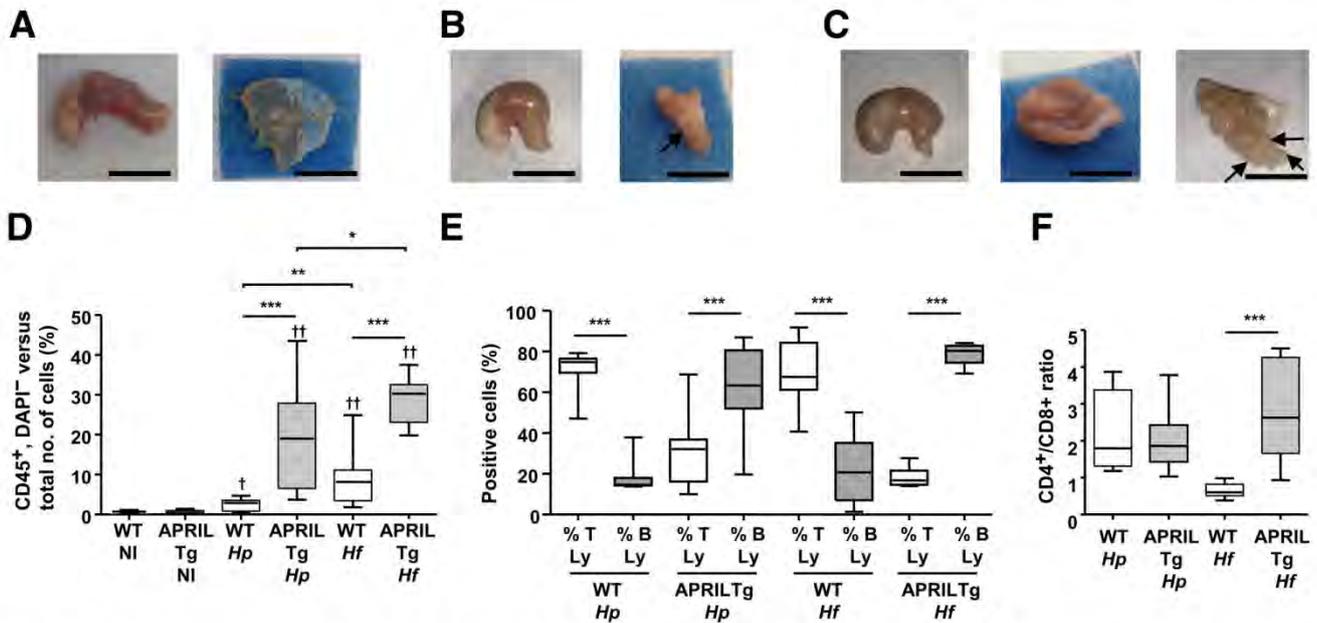
## Results

### Macroscopic Appearance of Mouse Stomachs

The external appearance of the whole stomachs of noninfected and infected WT mice did not differ 18 months PI (Figure 1, A–C). The thickness of the stomach was, however, greater in infected APRIL Tg mice, particularly in those infected by *H. felis*, compared with noninfected APRIL Tg mice (Figure 1, A and C). All 10 *H. felis*-infected APRIL Tg mice and nine of the 14 *H. pylori*-infected APRIL Tg mice (64.3%) had a thicker and more rigid stomach. The gastric mucosa of noninfected mice (WT and APRIL Tg) had less visible changes [6 of 13 *H. felis*-infected APRIL Tg mice (46.2%) and 2 of 16 *H. pylori*-infected APRIL Tg mice (12.5%)]. However, some infected APRIL Tg mice presented small (in *H. pylori*-infected APRIL Tg mice) to numerous (in *H. felis*-infected APRIL Tg mice) round nodules in the corpus (Figure 1, B and C). These nodular aspects were compatible with the infiltration of the gastric mucosa by lymphoid follicles as described by others.<sup>9</sup>

### Flow Cytometry Characterization of Leukocyte Infiltration Located in the Gastric Mucosa of WT and APRIL Tg Mice 18 Months PI

To provide quantitative information on the relative frequency of leukocyte subsets and to investigate surface markers that cannot be studied by IHC because of the lack of commercialized and/or validated antibodies for paraffin-embedded biopsy specimens from mice, flow cytometric analysis was systematically performed on noninfected and infected WT and APRIL Tg mice stomachs 18 months PI. Noninfected WT and APRIL Tg mice did not develop leukocyte infiltration ( $0.7\% \pm 0.3\%$  and  $0.6\% \pm 0.4\%$ ,



**Figure 1** Macroscopic appearance of APRIL transgenic (Tg) mice and characterization of leukocyte infiltration in the gastric mucosa of wild-type (WT) and APRIL Tg mice 18 months after infection (PI) determined by flow cytometry. Macroscopic findings in the mice stomachs 18 months PI (external appearance and gastric mucosa aspect). **A:** Noninfected (NI) APRIL Tg mice that did not have abnormalities such as NI WT mice. **B:** *Helicobacter pylori* (Hp)–infected APRIL Tg mice. **C:** *Helicobacter Felis* (Hf)–infected APRIL Tg mice. Several small round protrusive lesions form in the fundic area (arrows) of infected mice, especially in mice infected by *H. felis*. Characterization of the leukocyte infiltration. **D:** Viable leukocytes (CD45<sup>+</sup>/DAPI<sup>-</sup>) in the gastric mucosa of the NI ( $n = 5$  in each group), *H. pylori* ( $n = 15$  and  $n = 13$  in the WT and Tg groups, respectively), and *H. felis* ( $n = 12$  and  $n = 10$  in the WT and Tg groups, respectively) WT and APRIL Tg mice were evaluated as percentages of the total number of cells that were analyzed by the cytometer. **E:** Percentage of infiltrating T lymphocytes (CD3<sup>+</sup>) and B lymphocytes (B220<sup>+</sup> cells) in the *H. pylori*– ( $n = 9$  and  $n = 13$  in the WT and Tg groups, respectively) and *H. felis*– ( $n = 12$  and  $n = 10$  in the WT and Tg groups, respectively) infected WT and APRIL Tg mice among CD45<sup>+</sup> cells. **F:** Percentages of infiltrating helper T lymphocytes (CD4<sup>+</sup>) and T cytotoxic lymphocytes (CD8<sup>+</sup>) in the *H. pylori*– ( $n = 4$  and  $n = 13$  in the WT and Tg groups, respectively) and *H. felis*– ( $n = 12$  and  $n = 10$  in the WT and Tg groups, respectively) infected WT and APRIL Tg mice among CD3<sup>+</sup> cells. Data were obtained with a LSRFortessa flow cytometer using FACS Diva software. Graphic representations are box plots, with the box representing 50% of values around the median and the whiskers representing the minimum and maximum of all the data. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , and \*\*\* $P < 0.001$ ; † $P < 0.05$ , †† $P < 0.01$  between infected mice and respective NI controls. Scale bars = 1 cm (A–C). B Ly, B lymphocytes; T Ly, T lymphocytes.

respectively) (Figure 1D). Infected WT ( $2.5\% \pm 1.4\%$  for *H. pylori*–infected mice and  $8.8\% \pm 6.3\%$  for *H. felis*–infected mice) and APRIL Tg mice ( $19.1\% \pm 13.0\%$  for *H. pylori*–infected mice and  $28.6\% \pm 5.8\%$  for *H. felis*–infected mice) developed significant leukocyte infiltration compared with their respective noninfected group. This infiltration was significantly higher in *H. felis*–infected mice compared with *H. pylori*–infected mice for WT and APRIL Tg mice (Figure 1D).

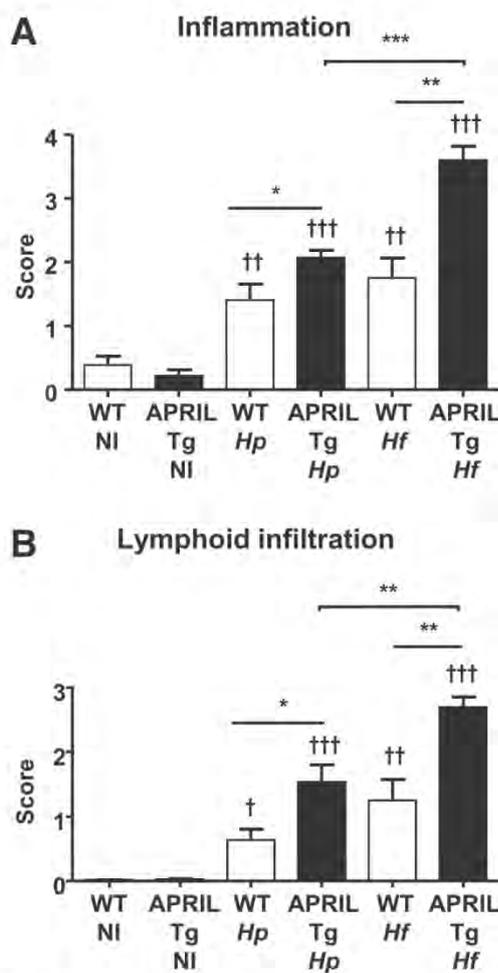
For *H. pylori*– and *H. felis*–infected WT mice, most lymphocytes were T cells (CD3<sup>+</sup>) ( $71.5\% \pm 9.8\%$  and  $68.7\% \pm 16.8$ , respectively), unlike APRIL Tg mice for which a predominant B infiltration (B220<sup>+</sup>) was observed ( $64.6\% \pm 19.9\%$  for *H. pylori*–infected mice and  $78.7\% \pm 4.8$  for *H. felis*–infected mice) (Figure 1E). Percentage of B and T lymphocytes did not differ significantly between *H. pylori*– and *H. felis*–infected mice in each group. In infected APRIL Tg mice, B lymphocytes were mostly CD5<sup>-</sup>, CD21<sup>+</sup>, and IgM<sup>+</sup>, a typical phenotype of marginal zone B cells ( $69.8\% \pm 16.0\%$  for *H. pylori*–infected mice and  $71.0\% \pm 3.6$  for *H. felis*–infected mice). In *H. pylori*–infected WT and APRIL Tg mice, CD4<sup>+</sup> T cells predominated over CD8<sup>+</sup> T cells (CD4/CD8 ratio:

$2.2 \pm 1.2$  and  $2.0 \pm 0.8$ , respectively). Surprisingly, *H. felis*–infected WT mice had a clear CD8<sup>+</sup> T-cell infiltration (CD4/CD8 ratio:  $0.6 \pm 0.2$ ) in opposition to their APRIL Tg-*H. felis*–infected mice counterparts for which a significant switch toward CD4<sup>+</sup> T cells was found (CD4/CD8 ratio:  $2.8 \pm 1.3$ ) (Figure 1F).

In conclusion, APRIL promoted B-cell infiltration in *H. pylori*– and *H. felis*–infected mice and the recruitment of helper T lymphocytes (CD4<sup>+</sup>) in *H. felis*–infected mice.

### Histologic and Inflammatory Aspects during *H. pylori* and *H. felis* Infection in WT and APRIL Tg C57BL6 Mice 18 Months PI

Noninfected WT and APRIL Tg mice did not develop signs of gastric inflammation or any other pathological indications 18 months PI (Figure 2, Supplemental Figures S1, and S2, A and B). At 18 months PI, a moderate leukocyte infiltration and a few scattered small lymphoid infiltrates were observed in stomachs of *H. pylori*– and *H. felis*–infected WT mice. No significant epithelial lesions and LELs were observed in this group. These histologic aspects were compatible with a gastritis stage. Leukocyte infiltration present at the base of



**Figure 2** Scores of inflammation and lymphoid infiltration in noninfected (NI) and infected wild-type (WT) and APRIL transgenic (Tg) mice 18 months post infection. **A:** For inflammation, scores range from 0 to 4. **B:** For the lymphoid infiltration, scores range from 0 to 3 (*Materials and Methods*). Data are expressed as medians ± SD for each group.  $n = 9$  NI WT and APRIL Tg mice;  $n = 11$  *Helicobacter pylori* (Hp)-infected WT mice;  $n = 14$  *Helicobacter pylori*-infected APRIL Tg mice;  $n = 8$  *Helicobacter felis* (Hf)-infected WT mice;  $n = 10$  *Helicobacter felis*-infected APRIL Tg mice. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , and \*\*\* $P < 0.001$ ; † $P < 0.05$ , †† $P < 0.01$ , and ††† $P < 0.001$  between infected mice and respective NI controls.

the mucosa was composed of polymorphonuclear cells with some B and T lymphocytes. T lymphocytes were observed within the gastric mucosa, alongside glands (*Supplemental Figures S2, C and D, and S3*), an aspect compatible with a lymphocytic gastritis.

At 18 months PI, *H. pylori*- and *H. felis*-infected APRIL Tg mice had more inflammation and lymphoid infiltrates than their respective infected WT mice counterparts (*Figure 3*). *H. felis*-infected APRIL Tg mice had more inflammation and lymphoid infiltrates than *H. pylori*-infected APRIL Tg mice. Extensive multifocal lymphocytic infiltrations deforming the gastric mucosa were observed in *H. pylori*- and *H. felis*-infected mice (*Figure 3*). They were composed of mostly B lymphocytes

surrounded or including areas with T cells (*Figure 4, A and B*). The presence of LELs was investigated by using H&E and E-cadherin IHC staining (*Figure 4, A and B*). Overall, LELs were found in 5 of 12 *H. pylori*-infected APRIL Tg mice (41.7%) and 7 of 10 *H. felis*-infected APRIL Tg mice (70%), whereas no LELs were detected in WT mice.

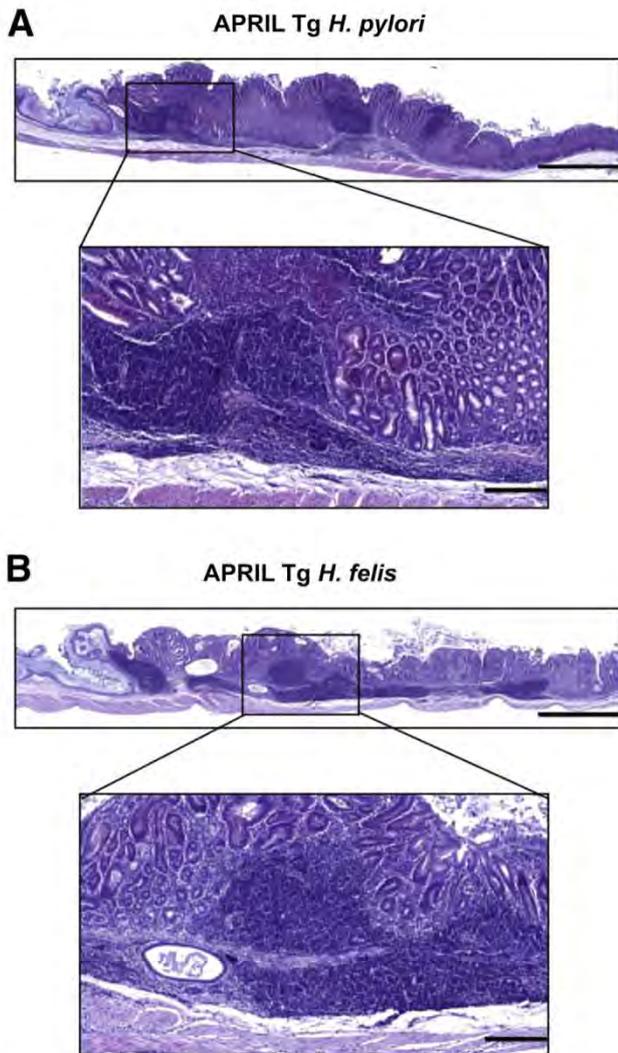
Semiquantification of the Ki-67 IHC staining in *Helicobacter*-infected WT and APRIL Tg mice revealed that the percentage of proliferating cells among the infiltrates was significantly higher in infected APRIL mice ( $11.8\% \pm 11.7\%$  for *H. pylori* and  $7.6\% \pm 2.6\%$  for *H. felis*) compared with infected WT mice ( $2.2 \pm 1.6$  and  $1.0 \pm 0.7$ , respectively) (three mice in each group, two to nine areas with lymphoid infiltrates were considered for each mouse) (*Figure 4C*). The percentage of proliferating cells among the infiltrates did not differ significantly between *H. pylori*- and *H. felis*-infected APRIL Tg mice.

Observation of epithelial lesions indicated that *H. felis* induced significant oxyntic gland atrophy associated with hyperplasia, mucinous metaplasia, pseudo-intestinal metaplasia, and dysplasia in both the WT and APRIL Tg mice (*Supplemental Figure S1*), a set of alterations compatible with established gastritis and the preneoplastic stage. *H. pylori*-infected WT mice had no significant epithelial disturbances; however, there was a clear effect of the APRIL Tg background on oxyntic gland atrophy associated with hyperplasia, mucinous metaplasia, pseudo-intestinal metaplasia, and dysplasia scores, although less spectacular than for the *H. felis*-infected APRIL Tg mice (*Supplemental Figure S1*).

In conclusion, we confirmed by histologic and IHC experiments that *Helicobacter* infection promoted B-cell proliferation and lymphoid infiltrate formation in APRIL Tg mice only. *H. felis* appeared more aggressive on the gastric mucosa because we found these lymphoid infiltrates were often associated with preneoplastic lesions. The presence of LELs in most of the infected Tg mice supports the hypothesis that APRIL may promote B-lymphoma development.

### Evaluation of B-Lymphocyte Clonality

Amplification of the CDR3 region of the *IgH* gene was used to study the level of clonality of infiltrating B cells in the stomachs of all APRIL Tg mice at 18 months PI (*Table 1*). No amplification or polyclonal profile was observed in noninfected APRIL Tg mice ( $n = 9$ ). A polyclonal profile was found in 14 of the 14 *H. pylori*-infected APRIL Tg mice (100%) and 7 of the 10 *H. felis*-infected APRIL Tg mice (70%). One of the 10 *H. felis*-infected APRIL Tg mice (10%) had an oligoclonal profile, and 2 of the 10 (20%) had a monoclonal profile with a single band observed. LELs were present in the three mice with monoclonal or oligoclonal profiles. Thus, *H. felis* appeared to induce GML-like lesions in APRIL Tg mice more efficiently compared with *H. pylori*.



**Figure 3** Histologic and inflammatory aspects during *Helicobacter pylori* and *Helicobacter felis* infection in APRIL transgenic (Tg) C57BL6 mice 18 months post infection. Sections (3- $\mu$ m thick) from paraffin-embedded tissues were processed for hematoxylin and eosin staining. The large curvature of the stomach (fundus and corpus) is presented on these images. **A:** Representative histopathologic features of *H. pylori*-infected APRIL Tg mice. Lymphoid infiltrates are observed. **B:** Representative histopathologic features of *H. felis*-infected APRIL Tg mice. Extensive multifocal lymphocytic infiltrations are observed. Scale bars: 1000  $\mu$ m (main images); 200  $\mu$ m (higher magnification).

#### Estimation of the Bacterial Load in Gastric Biopsy Specimens from Infected Mice

The comparison of bacteria to cell ratios between *H. pylori*- and *H. felis*-infected WT and APRIL Tg mice is shown in Figure 5. WT and APRIL Tg mice were infected at 6 weeks of age with the same bacterial inoculum of *H. pylori* or *H. felis* per mouse for 3 consecutive days. At 18 months PI, bacteria/epithelial cell ratios were >100 times lower in *H. pylori*-infected WT mice (with 11 of the 16 mice being negative) than in APRIL Tg mice [mean bacteria/cell ratio = 0.08635 ( $n = 14$ , with *H. pylori* detected in all)] ( $P < 0.001$ ) (Figure 5A).

To verify these results, DNA was extracted from five gastric biopsy specimens from infected mice with both *Helicobacter* species euthanized at 12 months PI to check the kinetics of the disease in this new animal model. Again bacteria/epithelial cell ratios were 10 times lower in *H. pylori*-infected WT mice (with two of the five mice being negative) than in APRIL Tg mice (mean bacteria/cell ratio = 0.00258, with *H. pylori* detected in four of the five mice) ( $P < 0.01$ ) (Figure 5A). *H. pylori* colonization was also higher at 18 months PI versus 12 months PI in APRIL Tg mice ( $P < 0.01$ ).

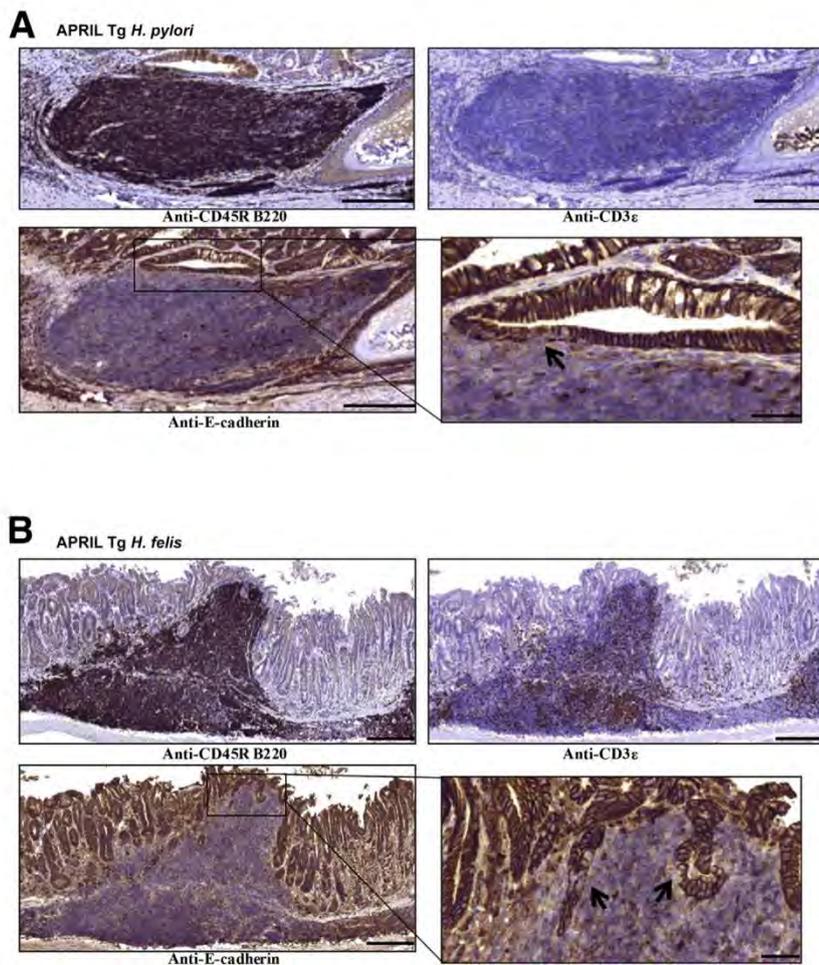
This phenomenon was also observed in *H. felis*-infected mice (Figure 5B): at 12 months PI, bacteria/epithelial cell ratios were 100 times lower in infected WT mice (with four of the five mice being negative) than in APRIL Tg mice (mean bacteria/cell ratio = 0.13644, with *H. felis* detected in four of the five mice) ( $P < 0.01$ ). At 18 months PI, bacteria/cell ratios were 1000 times lower in infected WT mice (with seven of the 13 mice being negative) than in APRIL Tg mice [mean bacteria/cell ratio = 0.40870, with *H. felis* detected in all mice ( $n = 10$ )] ( $P < 0.001$ ).

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

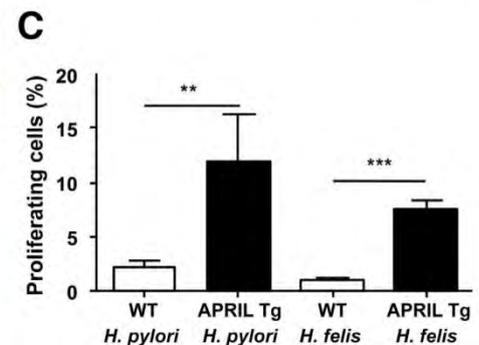
#### Discussion

The association of APRIL with carcinogenesis had been alluded to previously.<sup>36</sup> High levels of APRIL were observed in *H. pylori*-dependent GML,<sup>24</sup> suggesting a role of APRIL in gastric lymphomagenesis.<sup>24</sup> To study the role of APRIL in GML, we infected APRIL Tg C57BL6 mice<sup>26</sup> with *H. pylori* or *H. felis*. Typical lesions (namely, massive B lymphoid infiltrates associated with LELs), considered a characteristic of a lymphoma stage, were observed in gastric mucosa of 60% of *H. pylori*- and all *H. felis* infected-APRIL Tg mice 18 months PI, whereas the infected WT C57BL6 mice did not develop such lesions. Flow cytometry results confirm the predominance of B cells in infected APRIL Tg mice compared with infected WT or noninfected mice. A monoclonal population was detected in a few *H. felis*-infected APRIL Tg mice. These results confirm our hypothesis on the importance of the deregulation of APRIL in the development of gastric lymphoid infiltrates induced by *Helicobacter* species.

Our first observation was the resistance of WT C57BL6 mice in developing GML-like lesions even 18 months PI by *H. pylori* or *H. felis*. In contrast, previous studies have described that these mice developed high-grade GML after *H. pylori* infection.<sup>13,14</sup> Others found that *H. felis* induced GML-like lesions in BALB/c mice at 22 months PI<sup>6,8</sup> or even gastric adenocarcinoma in C57BL6 mice.<sup>37</sup> All these



**Figure 4** Analysis by immunohistochemistry of the lymphoid infiltrates found in infected APRIL transgenic (Tg) mice 18 months post infection. **A** and **B**: Consecutive cuts of the same gastric biopsy specimen are shown. **A**: In a *Helicobacter pylori*-infected APRIL Tg mouse, a representative infiltrate composed of B lymphocytes with some infiltrating T cells. The B cells are involved in lymphoepithelial lesions (LELs). A higher magnification of the E-cadherin staining is shown. **B**: In a *Helicobacter felis*-infected APRIL Tg mouse, representative infiltrate composed of B lymphocytes with some infiltrating T cells. This infiltrate extends through the entire mucosa level, resulting in distortion of the epithelial surface. The B cells are involved in LELs. A higher magnification of the E-cadherin staining is shown. LELs are indicated by **arrows**. **C**: Percentage of proliferating cells evaluated by semi-quantification of the Ki-67 staining in *H. pylori*- and *H. felis*-infected APRIL Tg and WT mice. Data are expressed as medians  $\pm$  SD for each group.  $n = 3$  for each group, and two to nine areas with lymphoid infiltrates were considered for each mouse.  $**P < 0.01$ ,  $***P < 0.001$ . Scale bars: 250  $\mu$ m (main images); 50  $\mu$ m (higher magnification).



findings should be considered with caution because the criteria used to define GML or even gastric adenocarcinoma are sometimes unclear (eg, histologic analyses only were performed, without precise characterization of infiltrating lymphoid cells, in the study by Wang et al<sup>13</sup>). To circumvent these issues, we took care to demonstrate not only large lymphoid infiltrates consisting of B cells but also LELs and immunological surface markers for B cells of marginal zone origin, such as those found in human GML.

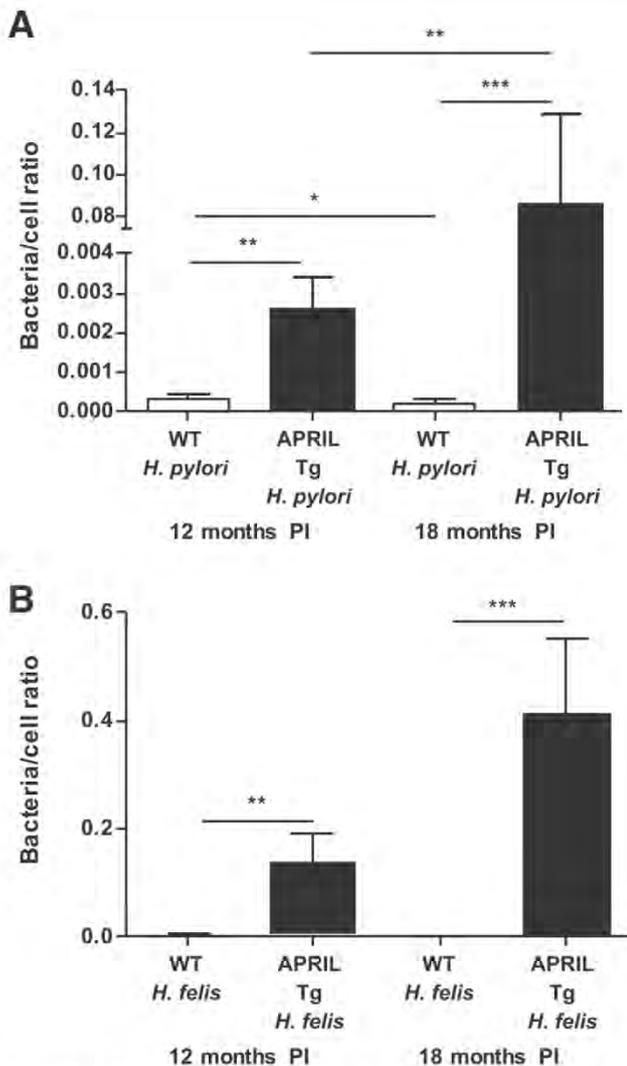
The *H. pylori* strain used in our study differs from those used by other groups, namely, *H. pylori* strains 119/95, G50, or SS1,<sup>13,14</sup> used to infect C57BL6 mice. It is noteworthy that in these studies the appearance of GML-like

lesions was dependent on the strain: only *H. pylori* strains 119p and G50 induced lymphoma-like lesions, whereas *H. pylori* strain SS1 did not.

In this study, we report the first use of mice with C57BL6 genetic background with *H. pylori* strain B47. It was originally isolated from a patient with GML and is known for its ability to efficiently colonize BALB/c mice stomachs and to induce GML-like lesions in neonatal thymectomized mice.<sup>16</sup> The fact that *H. pylori* strain B47 is *cag* pathogenicity island negative suggests that this important virulence marker is not required for MALT pathogenesis, as previously suggested<sup>16,27,38</sup>; hence, GML appearance could be related to a stimuli by unknown bacterial antigens in a host with an

**Table 1** Results of PCR Amplification of the CDR3 Region of the *IgH* Gene for APRIL Transgenic Mice at 18 Months after Infection

Variable	CDR3 <i>IgH</i> PCR profiles			
	No amplification	Polyclonal	Oligoclonal	Monoclonal
Noninfected ( $n = 9$ )	2	7	0	0
<i>Helicobacter pylori</i> ( $n = 14$ )	0	14	0	0
<i>Helicobacter felis</i> ( $n = 10$ )	0	7	1	2
All infected mice ( $n = 24$ )	0	21	1	2



**Figure 5** Quantification of the bacterial load in gastric biopsy specimens from infected mice. Results were obtained by quantitative PCR as described in *Materials and Methods*. **A:** *Helicobacter pylori*/murine cell ratio in wild-type (WT) and APRIL transgenic (Tg) mice infected by *H. pylori* at 12 months post infection (PI) ( $n = 5$ ) versus 18 months PI ( $n = 16$  and  $n = 14$ , respectively). **B:** *Helicobacter felis*/murine cell ratio in WT and APRIL Tg mice infected by *H. felis* 12 months PI ( $n = 5$ ) versus 18 months PI ( $n = 13$  and  $n = 10$ , respectively). Data are expressed as medians  $\pm$  SD for each group.  $n = 5$  *H. pylori*-infected WT and APRIL mice at 12 months PI (**A**);  $n = 16$  *H. pylori*-infected WT mice at 18 months PI (**A**);  $n = 14$  *H. pylori*-infected APRIL mice at 18 months PI (**A**);  $n = 5$  *H. felis*-infected WT and APRIL mice at 12 months PI (**B**);  $n = 13$  *H. felis*-infected WT mice at 18 months PI (**B**);  $n = 10$  *H. felis*-infected APRIL mice at 18 months PI (**B**). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , and \*\*\* $P < 0.001$ .

altered inflammatory response, such as that found in APRIL Tg C57BL6 mice.

More inflammation and gastric lesions were observed with *H. felis* compared with *H. pylori* in WT C57BL6 mice.<sup>39</sup> Indeed, *H. felis* is described as being able to induce a potent proinflammatory response in mice, greater than that induced by *H. pylori*.<sup>8</sup> This is, no doubt, reflected in the incidence and severity of GML-like lesions, which varied between *H. pylori*- and *H. felis*-infected APRIL Tg mice.

Indeed, more extensive and severe lesions were found to be induced by *H. felis* compared with *H. pylori*. In particular, *H. felis* induced preneoplastic lesions, such as dysplasia, even in WT-infected animals, whereas *H. pylori* induced lesions in infected APRIL Tg mice only.

Surprisingly, we found that for both *Helicobacter* species, the level of colonization was lower in WT than in APRIL Tg animals. Because both groups of mice were infected the same day and with the same bacterial suspension, we can exclude a problem of oral gavage for the WT group. These results were unprecedented because we found in our previous study<sup>31</sup> a decrease in the level of colonization with these scores in infected animals that underwent thymectomy at day 3 after birth in line with the conventional wisdom of increased gastritis and decreased colony-forming units. The differences in inflammatory responses could explain these data. Our hypothesis is that the strong Th1 response that is expected in WT C57BL6 infected mice may participate in bacterial clearance or reduction of colonization levels as already shown by others.<sup>40–42</sup> An inflammatory balance (Th2 or T-regulatory cells) may be present in infected APRIL Tg animals, which allows bacterial colonization. It would be interesting to compare the inflammatory responses induced by both species in WT and Tg animals to understand the differences in inflammatory responses in this new animal model.

The second main point of our study is the confirmation of the importance of APRIL in the development of gastric lymphoid infiltrates and GML-like lesions after *H. pylori* or *H. felis* infection. Flow cytometry and histologic analyses revealed the presence of lymphoid infiltrates with a predominance of B cells with the phenotype expected for marginal zone B-cell lymphoma (CD5<sup>-</sup>, CD21<sup>+</sup>, IgM<sup>+</sup>).<sup>5</sup> There was an emergence of lymphoid infiltrates associated with LELs, which constitutes a characteristic criterion of GML. Our in-depth histologic analysis also revealed that *H. pylori*- and *H. felis*-infected APRIL Tg mice developed mucosal atrophy, metaplasia, dysplasia, and lesions that are frequently observed at the time of GML diagnosis in humans.<sup>43,44</sup> These lesions were not present in *H. pylori*-infected WT mice.

Despite oligoclonality not being a prerequisite for the diagnosis of GML,<sup>45</sup> monoclonal B-cell populations are detected in approximately 80% to 90% of human GML cases.<sup>46,47</sup> Interestingly, oligoclonality or monoclonality of the lymphoid infiltrates has been observed in only 30% of *H. felis*-infected APRIL Tg mice and in none of the *H. pylori*-infected mice. Reduced clonality could be explained by a lack of sensitivity of the detection method used (DNA extraction of the entire stomachs and not just the lymphoid infiltrates) or a low abundance of the clonal population among the entire population of lymphocyte infiltrates. Tissue collection may also have been performed too early after infection. Nevertheless, the gastric lesions were severe and the lymphoid infiltrates were extensive in APRIL Tg infected mice. Alternatively, a rapid B-cell

proliferation could have been induced by APRIL without clonal selection.

We also identified indicators related to infiltrating T cells that are similar to those described in human GML, especially the predominance of CD4<sup>+</sup> over CD8<sup>+</sup> T lymphocytes.<sup>48,49</sup> The predominance of the former subset is compatible with helper T-cell–dependent B-cell proliferation occurring early in low-grade GML, whereas the low number of CD8<sup>+</sup> T cells is consistent with the impaired cytotoxicity of tumor-infiltrating T cells described in humans,<sup>49</sup> both features contributing to lymphoma development. The T-cell response switched between *H. felis*–infected WT and APRIL Tg mice, confirming the importance of CD4<sup>+</sup> T cells to promote marginal zone B-cell proliferation. The effect of APRIL on T-cell subsets during infection is novel and represents a new direction in this research, requiring further development. Interestingly, these T cells were mainly found among the lymphoid infiltrates in GML-developing mice, whereas they were scattered into the gastric mucosa in infected WT animals. This may be explained by the proinflammatory response that recruits T cells, which in turn helps B cells to proliferate in GML APRIL Tg mice or contributes to epithelial lesions in WT animals.

Another major objective of our study was to compare the ability of *H. pylori* versus *H. felis* to induce GML-like lesions. *H. pylori* and *H. felis* were both able to induce lymphoid infiltrates, with a predominance of B cells having the phenotype expected for marginal zone B-cell lymphoma in APRIL Tg mice, but more LELs were observed after *H. felis* infection compared with *H. pylori* infection. Moreover, monoclonality or oligoclonality of B infiltrates was detected only in *H. felis*–infected APRIL Tg mice. *H. felis* appeared *prima facie* more efficient in induction of GML-like lesions in a shorter time frame.

In conclusion, our model is new and original and confirms the implication of APRIL in GML development. Consequently, it will be easier to use and be more productive than the previous models.

## Acknowledgments

We thank Vincent Pitard from the TBM-Core Cytometry Platform (University of Bordeaux), Xavier Gauthereau from the TBM-Core Real-Time PCR Platform (University of Bordeaux), and Dr. Yves Denizot (University of Limoges, Limoges, France) for providing DNA extracts from mice with B-cell lymphoma for positive control and Lindsay Mégraud for proofreading the manuscript.

## Supplemental Data

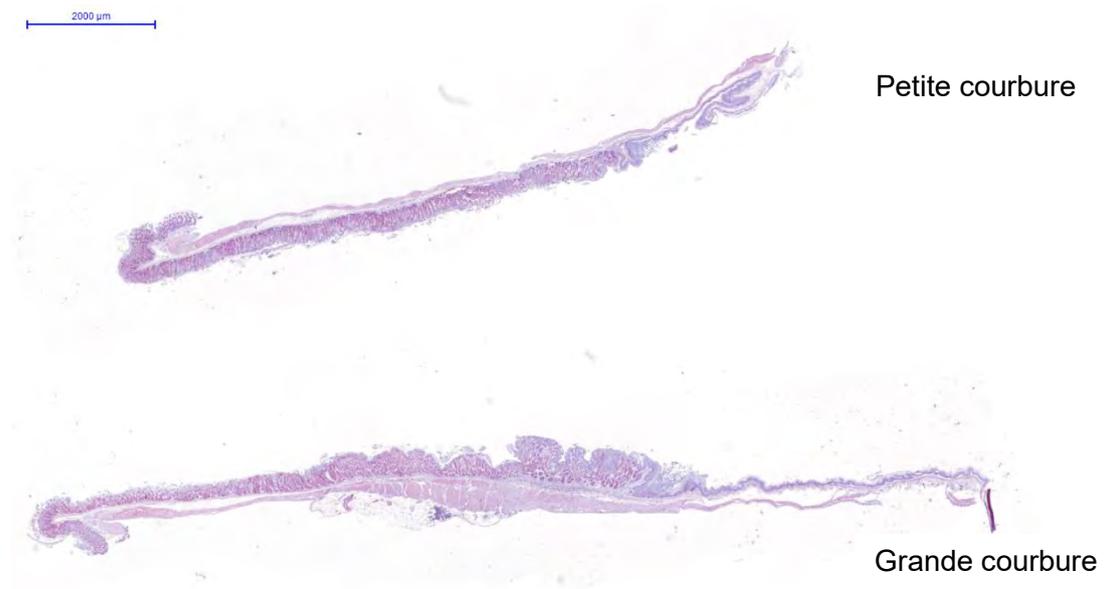
Supplemental material for this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajpath.2017.03.004>.

## References

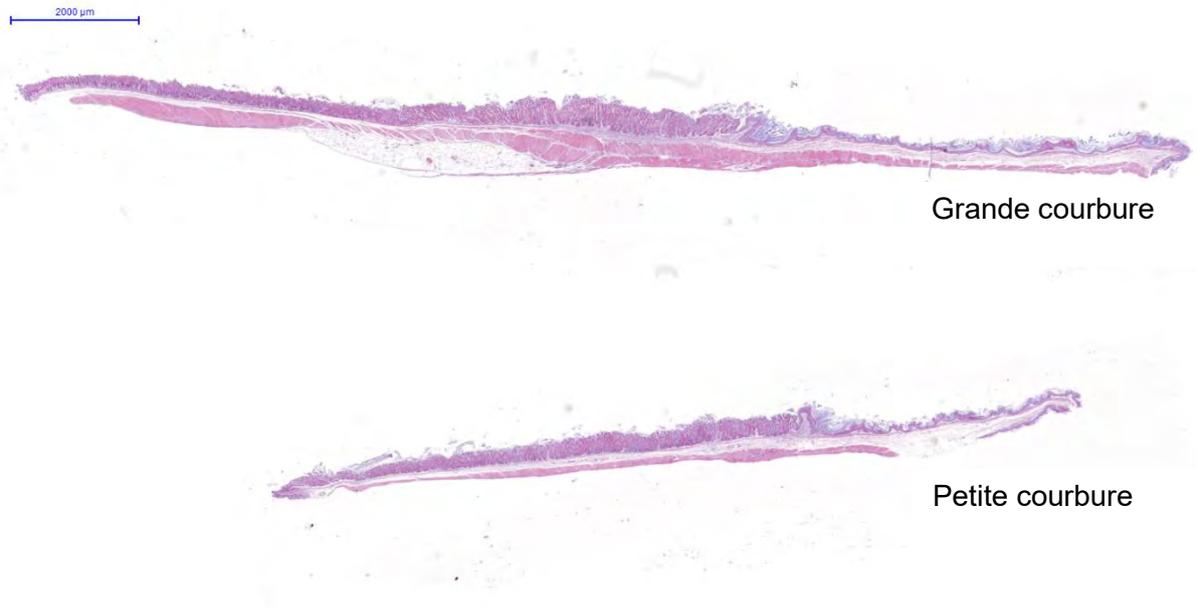
1. Isaacson P, Wright DH: Malignant lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue: a distinctive type of B-cell lymphoma. *Cancer* 1983, 52:1410–1416
2. Ullrich A, Fischbach W, Blettner M: Incidence of gastric B-cell lymphomas: a population-based study in Germany. *Ann Oncol* 2002, 13: 1120–1127
3. Wotherspoon AC, Doglioni C, Diss TC, Pan L, Moschini A, de Boni M, Isaacson PG: Regression of primary low-grade B-cell gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue type after eradication of *Helicobacter pylori*. *Lancet* 1993, 342:575–577
4. Wotherspoon AC, Ortiz-Hidalgo C, Falzon MR, Isaacson PG: *Helicobacter pylori*-associated gastritis and primary B-cell gastric lymphoma. *Lancet* 1991, 338:1175–1176
5. Ferreri AJ, Ernberg I, Copie-Bergman C: Infectious agents and lymphoma development: molecular and clinical aspects. *J Intern Med* 2009, 265:421–438
6. Enno A, O'Rourke JL, Howlett CR, Jack A, Dixon MF, Lee A: 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* 1995, 147: 217–222
7. Enno A, O'Rourke J, Braye S, Howlett R, Lee A: 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* 1998, 152:1625–1632
8. Mueller A, O'Rourke J, Grimm J, Guillemin K, Dixon MF, Lee A, Falkow S: Distinct gene expression profiles characterize the histopathological stages of disease in *Helicobacter*-induced mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, 100:1292–1297
9. Mueller A, O'Rourke J, Chu P, Chu A, Dixon MF, Bouley DM, Lee A, Falkow S: The role of antigenic drive and tumor-infiltrating accessory cells in the pathogenesis of *Helicobacter*-induced mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Am J Pathol* 2005, 167: 797–812
10. O'Rourke JL, Dixon MF, Jack A, Enno A, Lee A: Gastric B-cell mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma in an animal model of '*Helicobacter heilmannii*' infection. *J Pathol* 2004, 203: 896–903
11. Flahou B, Haesebrouck F, Pasmans F, D'Herde K, Driessen A, Van Deun K, Smet A, Duchateau L, Chiers K, Ducatelle R: *Helicobacter suis* causes severe gastric pathology in mouse and mongolian gerbil models of human gastric disease. *PLoS One* 2010, 5:e14083
12. Saito Y, Suzuki H, Tsugawa H, Imaeda H, Matsuzaki J, Hirata K, Hosoe N, Nakamura M, Mukai M, Saito H, Hibi T: 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:e47396
13. Wang X, Willen R, Andersson C, Wadstrom T: Development of high-grade lymphoma in *Helicobacter pylori*-infected C57BL/6 mice. *APMIS* 2000, 108:503–508
14. Wang X, Willen R, Svensson M, Ljungh A, Wadstrom T: Two-year follow-up of *Helicobacter pylori* infection in C57BL/6 and Balb/cA mice. *APMIS* 2003, 111:514–522
15. Thompson LJ, Danon SJ, Wilson JE, O'Rourke JL, Salama NR, Falkow S, Mitchell H, Lee A: Chronic *Helicobacter pylori* infection with Sydney strain 1 and a newly identified mouse-adapted strain (Sydney strain 2000) in C57BL/6 and BALB/c mice. *Infect Immun* 2004, 72:4668–4679
16. Chrisment D, Dubus P, Chambonnier L, Hoces de la Guardia A, Sifre E, Giese A, Capone M, Khairallah C, Costet P, Rousseau B, Hubert C, Burlen-Defranoux O, Varon C, Bandeira A, Megraud F, Lehours P: Neonatal thymectomy favors *Helicobacter pylori*-promoted

- gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma lesions in BALB/c mice. *Am J Pathol* 2014, 184:2174–2184
17. Dillon SR, Gross JA, Ansell SM, Novak AJ: An APRIL to remember: novel TNF ligands as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov* 2006, 5:235–246
  18. Yu G, Boone T, Delaney J, Hawkins N, Kelley M, Ramakrishnan M, McCabe S, Qiu WR, Kornuc M, Xia XZ, Guo J, Stolina M, Boyle WJ, Sarosi I, Hsu H, Senaldi G, Theill LE: APRIL and TALL-1 and receptors BCMA and TACI: system for regulating humoral immunity. *Nat Immunol* 2000, 1:252–256
  19. Chiu A, Xu W, He B, Dillon SR, Gross JA, Sievers E, Qiao X, Santini P, Hyjek E, Lee JW, Cesarman E, Chadburn A, Knowles DM, Cerutti A: Hodgkin lymphoma cells express TACI and BCMA receptors and generate survival and proliferation signals in response to BAFF and APRIL. *Blood* 2007, 109:729–739
  20. Novak AJ, Bram RJ, Kay NE, Jelinek DF: Aberrant expression of B-lymphocyte stimulator by B chronic lymphocytic leukemia cells: a mechanism for survival. *Blood* 2002, 100:2973–2979
  21. He B, Chadburn A, Jou E, Schattner EJ, Knowles DM, Cerutti A: Lymphoma B cells evade apoptosis through the TNF family members BAFF/BLyS and APRIL. *J Immunol* 2004, 172:3268–3279
  22. Kern C, Cornuel JF, Billard C, Tang R, Rouillard D, Stenou V, Defrance T, Ajchenbaum-Cymbalista F, Simonin PY, Feldblum S, Kolb JP: Involvement of BAFF and APRIL in the resistance to apoptosis of B-CLL through an autocrine pathway. *Blood* 2004, 103:679–688
  23. Schwaller J, Schneider P, Mhawech-Fauceglia P, McKee T, Myit S, Matthes T, Tschopp J, Donze O, Le Gal FA, Huard B: Neutrophil-derived APRIL concentrated in tumor lesions by proteoglycans correlates with human B-cell lymphoma aggressiveness. *Blood* 2007, 109:331–338
  24. Munari F, Lonardi S, Cassatella MA, Doglioni C, Cangi MG, Amedei A, Facchetti F, Eishi Y, Ruge M, Fassan M, de Bernard M, D'Elios MM, Vermi W: Tumor-associated macrophages as major source of APRIL in gastric MALT lymphoma. *Blood* 2011, 117:6612–6616
  25. Floch P, Laur AM, Korolik V, Chrisment D, Cappellen D, Idrissi Y, Dubus P, Megraud F, Lehours P: Characterisation of inflammatory processes in *Helicobacter pylori*-induced gastric lymphomagenesis in a mouse model. *Oncotarget* 2015, 6:34525–34536
  26. Stein JV, Lopez-Fraga M, Elustondo FA, Carvalho-Pinto CE, Rodriguez D, Gomez-Caro R, De Jong J, Martinez AC, Medema JP, Hahne M: APRIL modulates B and T cell immunity. *J Clin Invest* 2002, 109:1587–1598
  27. Lehours P, Menard A, Dupouy S, Bergey B, Richey F, Zerbib F, Ruskone-Fourmestreaux A, Delchier JC, Megraud F: Evaluation of the association of nine *Helicobacter pylori* virulence factors with strains involved in low-grade gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Infect Immun* 2004, 72:880–888
  28. Thiberge JM, Boursaux-Eude C, Lehours P, Dillies MA, Creno S, Coppee JY, Rouy Z, Lajus A, Ma L, Burucoa C, Ruskone-Fourmestreaux A, Courillon-Mallet A, De Reuse H, Boneca IG, Lamarque D, Megraud F, Delchier JC, Medigue C, Bouchier C, Labigne A, Raymond J: From array-based hybridization of *Helicobacter pylori* isolates to the complete genome sequence of an isolate associated with MALT lymphoma. *BMC Genomics* 2010, 11:368
  29. Ferreira-Chagas B, Lasne G, Dupouy S, Gallois A, Morgner A, Menard A, Megraud F, Lehours P: In vitro proinflammatory properties of *Helicobacter pylori* strains causing low-grade gastric MALT lymphoma. *Helicobacter* 2007, 12:616–617
  30. Varon C, Dubus P, Mazurier F, Asencio C, Chambonnier L, Ferrand J, Giese A, Senant-Dugot N, Carlotti M, Megraud F: *Helicobacter pylori* infection recruits bone marrow-derived cells that participate in gastric preneoplasia in mice. *Gastroenterology* 2012, 142:281–291
  31. Laur AM, Floch P, Chambonnier L, Benejat L, Korolik V, Giese A, Dubus P, Megraud F, Bandeira A, Lehours P: Regulatory T cells may participate in *Helicobacter pylori* persistence in gastric MALT lymphoma: lessons from an animal model. *Oncotarget* 2016, 7:3394–3402
  32. Kawamoto H, Ikawa T, Ohmura K, Fujimoto S, Katsura Y: T cell progenitors emerge earlier than B cell progenitors in the murine fetal liver. *Immunity* 2000, 12:441–450
  33. Vincent-Fabert C, Fiancette R, Rouaud P, Baudet C, Truffinet V, Magnone V, Guillaudeau A, Cogne M, Dubus P, Denizot Y: A defect of the INK4-Cdk4 checkpoint and Myc collaborate in blastoid mantle cell lymphoma-like lymphoma formation in mice. *Am J Pathol* 2012, 180:1688–1701
  34. Oleastro M, Menard A, Santos A, Lamouliatte H, Monteiro L, Barthelemy P, Megraud F: Real-time PCR assay for rapid and accurate detection of point mutations conferring resistance to clarithromycin in *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol* 2003, 41:397–402
  35. Burkitt MD, Williams JM, Duckworth CA, O'Hara A, Hanedi A, Varro A, Caamano JH, Pritchard DM: Signaling mediated by the NF-kappaB sub-units NF-kappaB1, NF-kappaB2 and c-Rel differentially regulate *Helicobacter felis*-induced gastric carcinogenesis in C57BL/6 mice. *Oncogene* 2013, 32:5563–5573
  36. Hahne M, Kataoka T, Schroter M, Hofmann K, Irmeler M, Bodmer JL, Schneider P, Bornand T, Holler N, French LE, Sordat B, Rimoldi D, Tschopp J: APRIL, a new ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates tumor cell growth. *J Exp Med* 1998, 188:1185–1190
  37. Cai X, Carlson J, Stoicov C, Li H, Wang TC, Houghton J: *Helicobacter felis* eradication restores normal architecture and inhibits gastric cancer progression in C57BL/6 mice. *Gastroenterology* 2005, 128:1937–1952
  38. Taupin A, Occhialini A, Ruskone-Fourmestreaux A, Delchier JC, Rambaud JC, Megraud F: Serum antibody responses to *Helicobacter pylori* and the *cagA* marker in patients with mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Clin Diagn Lab Immunol* 1999, 6:633–638
  39. Sakagami T, Dixon M, O'Rourke J, Howlett R, Alderuccio F, Vella J, Shimoyama T, Lee A: Atrophic gastric changes in both *Helicobacter felis* and *Helicobacter pylori* infected mice are host dependent and separate from antral gastritis. *Gut* 1996, 39:639–648
  40. Lee A, O'Rourke J, De Ungria MC, Robertson B, Daskalopoulos G, Dixon MF: A standardized mouse model of *Helicobacter pylori* infection: introducing the Sydney strain. *Gastroenterology* 1997, 112:1386–1397
  41. Wang TC, Goldenring JR, Dangler C, Ito S, Mueller A, Jeon WK, Koh TJ, Fox JG: Mice lacking secretory phospholipase A2 show altered apoptosis and differentiation with *Helicobacter felis* infection. *Gastroenterology* 1998, 114:675–689
  42. Sayi A, Kohler E, Hitzler I, Arnold I, Schwendener R, Rehrauer H, Muller A: The CD4+ T cell-mediated IFN-gamma response to *Helicobacter* infection is essential for clearance and determines gastric cancer risk. *J Immunol* 2009, 182:7085–7101
  43. Herrera-Goepfert R, Arista-Nasr J, Alba-Campomanes A: Pathologic features of the gastric mucosa adjacent to primary MALT-lymphomas. *J Clin Gastroenterol* 1999, 29:266–269
  44. Lamarque D, Levy M, Chaumette MT, Roudot-Thoraval F, Cavicchi M, Auroux J, Courillon-Mallet A, Haioun C, Delchier JC: Frequent and rapid progression of atrophy and intestinal metaplasia in gastric mucosa of patients with MALT lymphoma. *Am J Gastroenterol* 2006, 101:1886–1893
  45. Bacon CM, Du MQ, Dogan A: Mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma: a practical guide for pathologists. *J Clin Pathol* 2007, 60:361–372
  46. Bertoni F, Conconi A, Capella C, Motta T, Giardini R, Ponzoni M, Pedrinis E, Novero D, Rinaldi P, Cazzaniga G, Biondi A,

- Wotherspoon A, Hancock BW, Smith P, Souhami R, Cotter FE, Cavalli F, Zucca E: Molecular follow-up in gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphomas: early analysis of the LY03 cooperative trial. *Blood* 2002, 99:2541–2544
47. Hummel M, Oeschger S, Barth TF, Loddenkemper C, Cogliatti SB, Marx A, Wacker HH, Feller AC, Bernd HW, Hansmann ML, Stein H, Moller P: Wotherspoon criteria combined with B cell clonality analysis by advanced polymerase chain reaction technology discriminates covert gastric marginal zone lymphoma from chronic gastritis. *Gut* 2006, 55:782–787
48. Greiner A, Knorr C, Qin Y, Sebald W, Schimpl A, Banchereau J, Muller-Hermelink HK: 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* 1997, 150:1583–1593
49. D’Elios MM, Amedei A, Manghetti M, Costa F, Baldari CT, Quazi AS, Telford JL, Romagnani S, Del Prete G: Impaired T-cell regulation of B-cell growth in *Helicobacter pylori*-related gastric low-grade MALT lymphoma. *Gastroenterology* 1999, 117:1105–1112



Annexe 3 : Coupes histologiques colorées à l'hématoxyline et à l'éosine de l'estomac d'une souris C57BL6 WT non infectée.



Annexe 4 : Coupes histologiques colorées à l'hématoxyline et à l'éosine de l'estomac d'une souris C57BL6 transgénique APRIL non infectée.

2000 µm

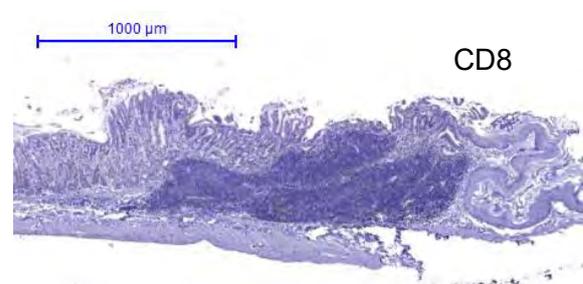
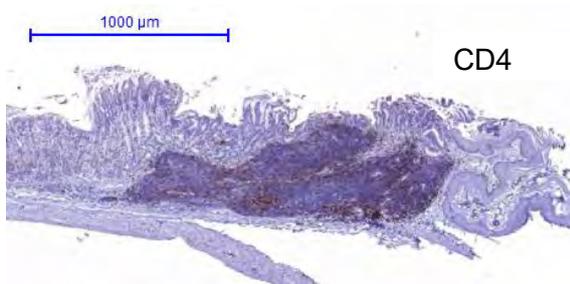
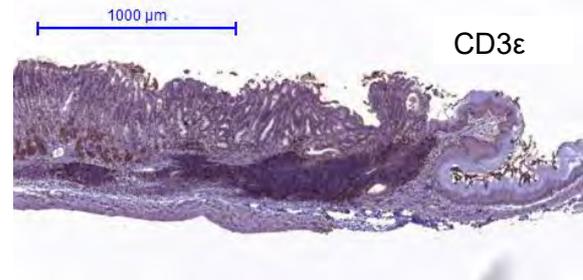
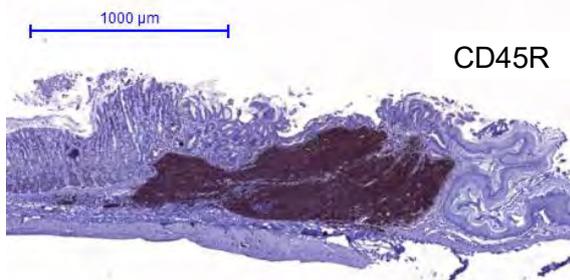
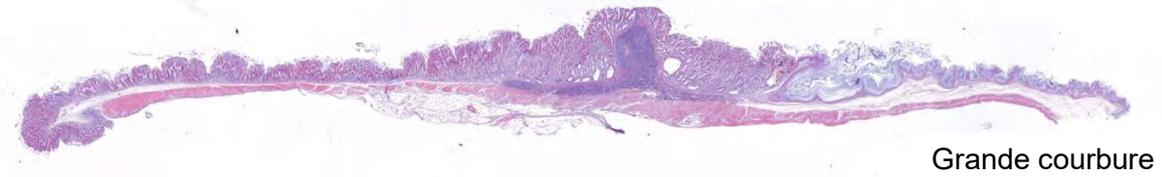
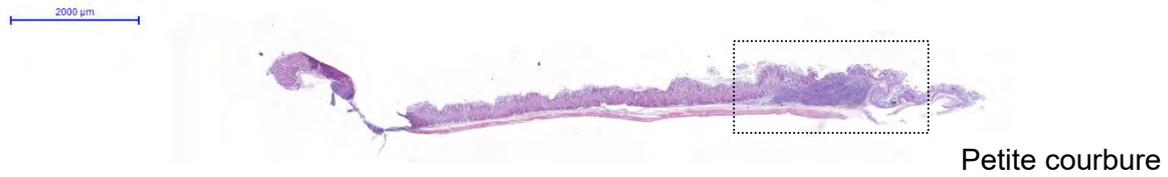


Petite courbure

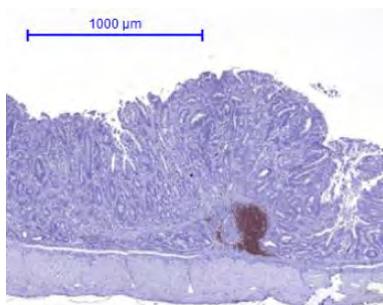
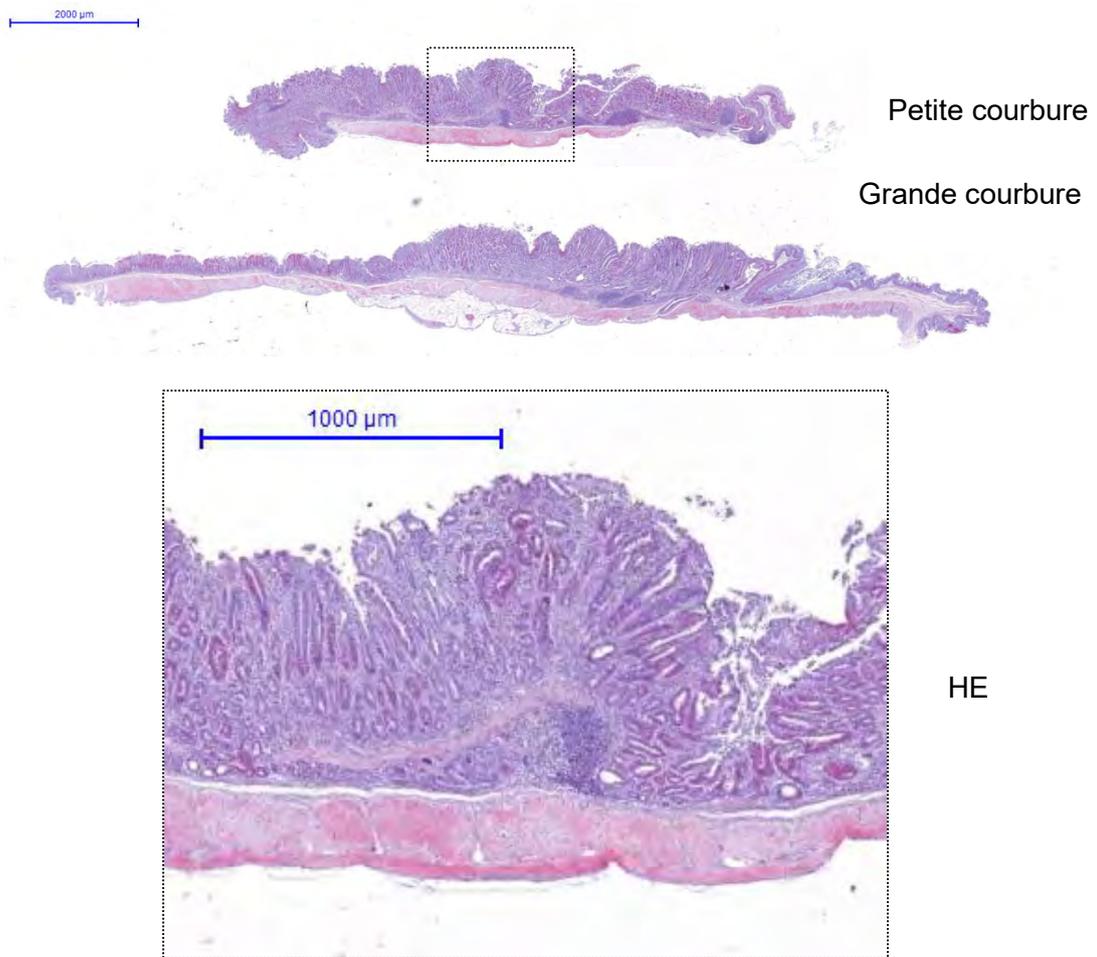


Grande courbure

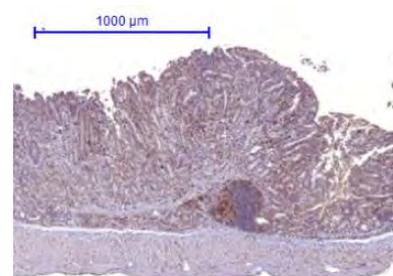
Annexe 5 : Coupes histologiques colorées à l'hématoxyline et à l'éosine de l'estomac d'une souris C57BL6 WT infectées par *Helicobacter pylori*.



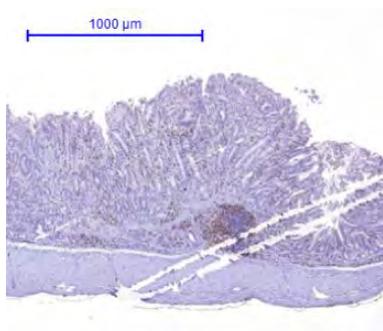
Annexe 6 : Coupes histologiques colorées à l'hématoxyline et à l'éosine (HE) et marquages immunohistochimiques de l'estomac d'une souris C57BL6 transgénique APRIL infectée par *Helicobacter pylori*. CD45R : marquage des lymphocytes B (B220+); CD3 : marquage des lymphocytes T; CD4 : marquage des lymphocytes T CD4+; CD8 : marquage des lymphocytes T CD8+.



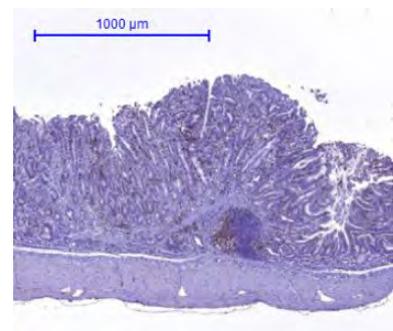
CD45R



CD3ε

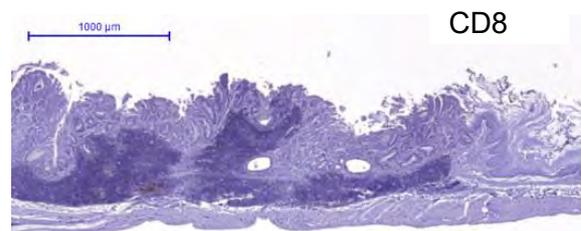
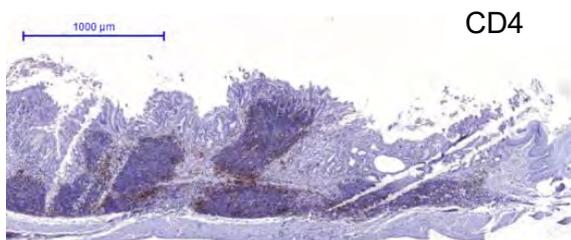
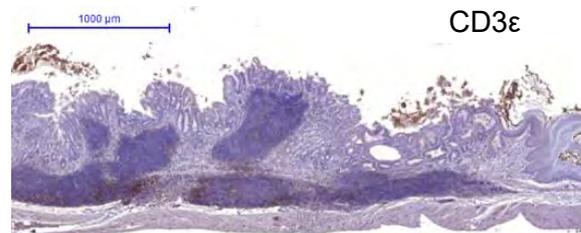
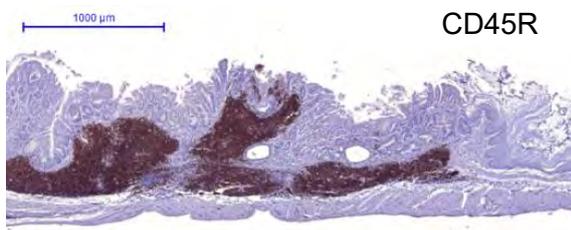
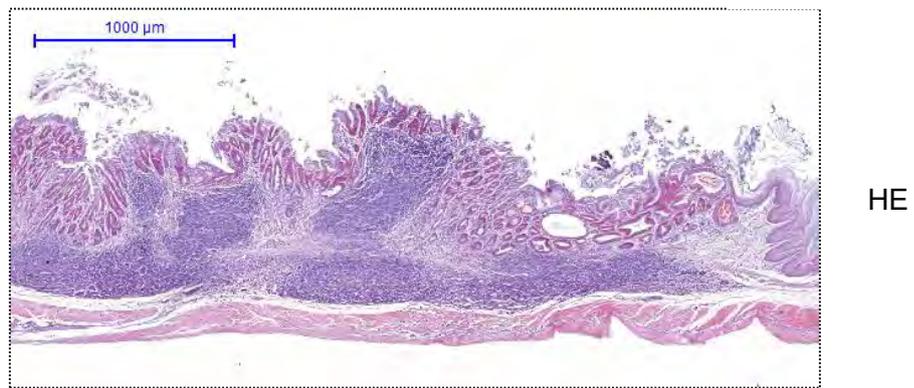
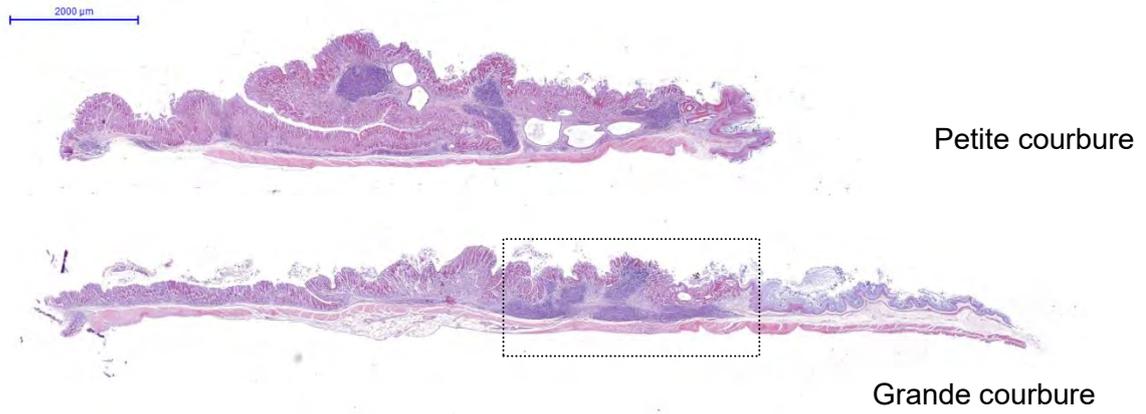


CD4



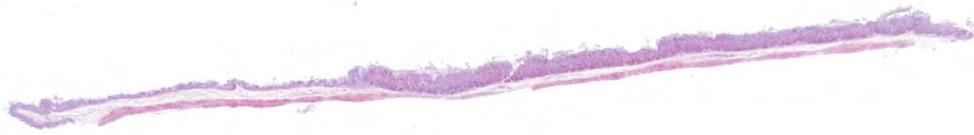
CD8

Annexe 7 : Coupes histologiques colorées à l'hématoxyline et à l'éosine (HE) et marquages immunohistochimiques de l'estomac d'une souris C57BL6 WT infectée par *Helicobacter felis*. Marquages décrits en annexe 6.

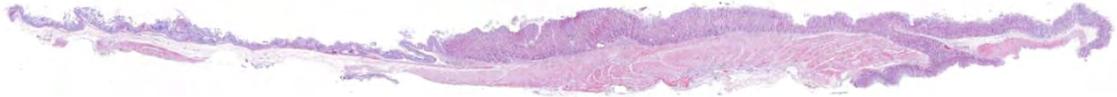


Annexe 8 : Coupes histologiques colorées à l'hématoxyline et à l'éosine (HE) et marquages immunohistochimiques de l'estomac d'une souris C57BL6 transgénique APRIL par *Helicobacter felis*. Marquages décrits en annexe 6.

2000 µm

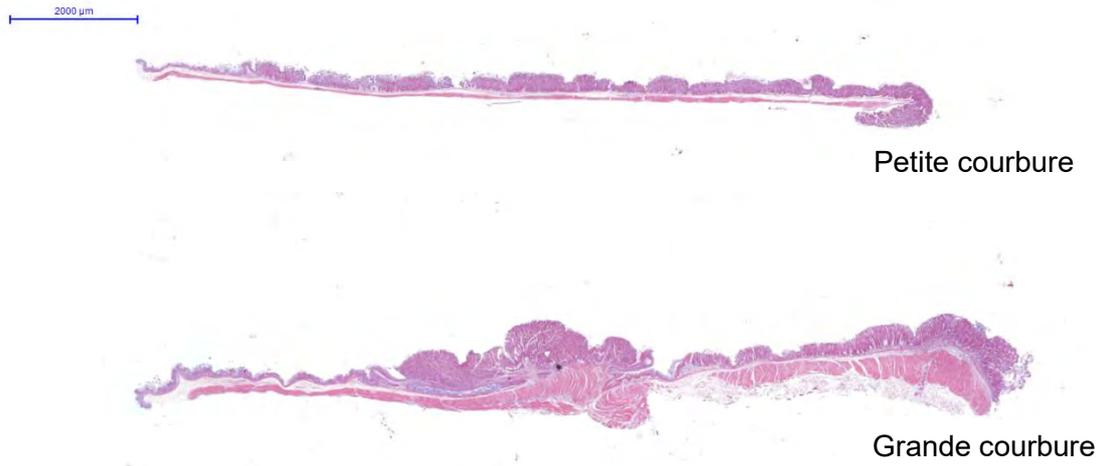


Petite courbure

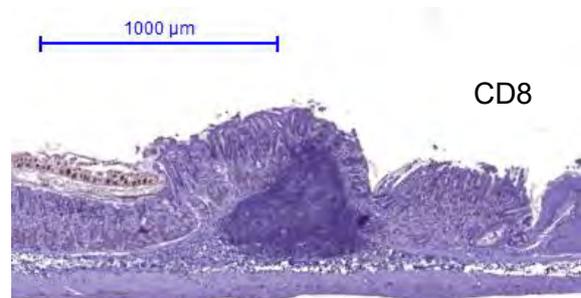
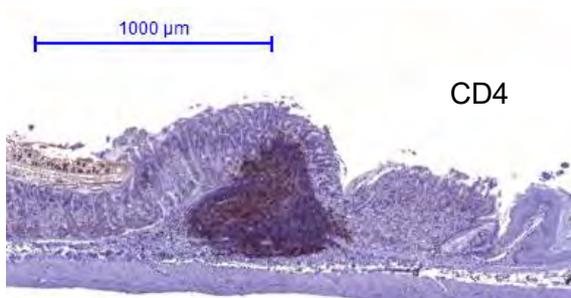
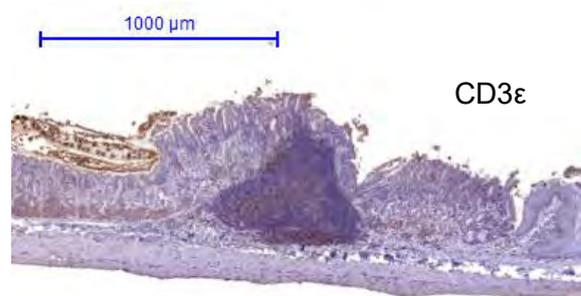
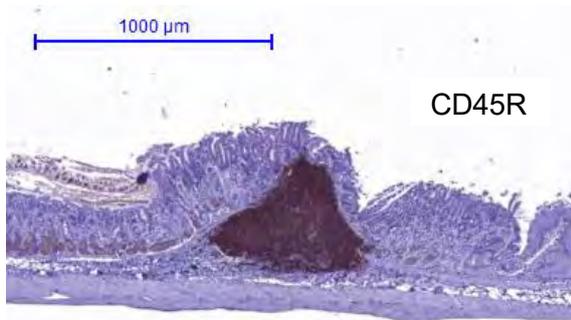
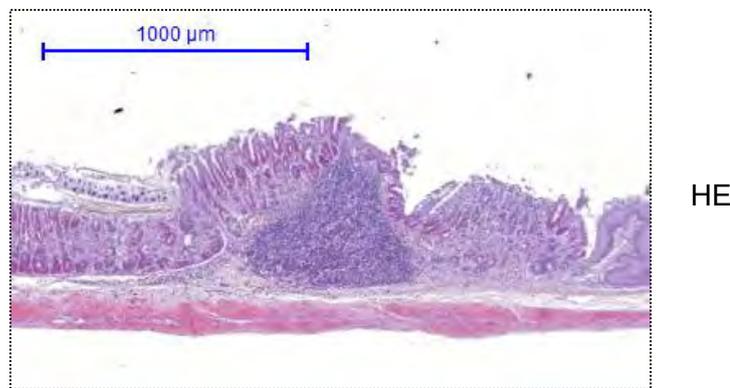


Grande courbure

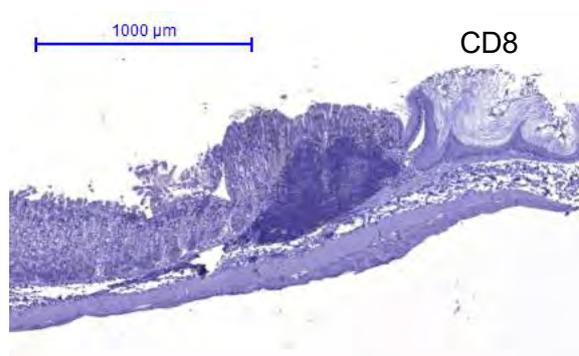
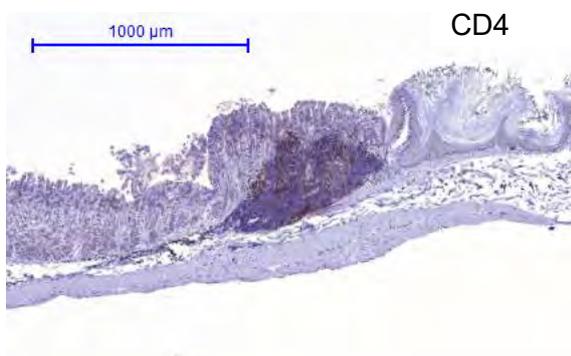
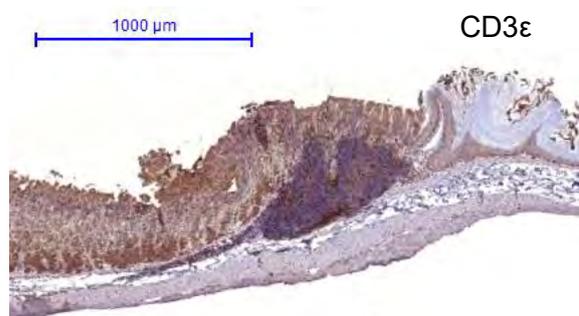
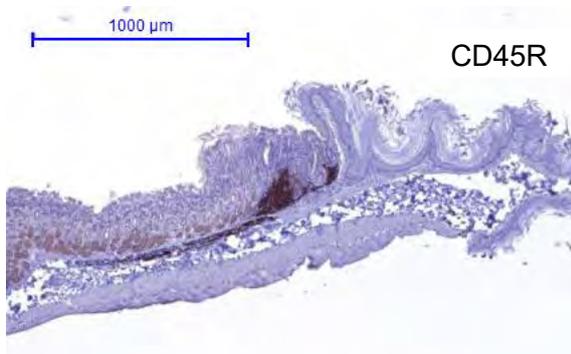
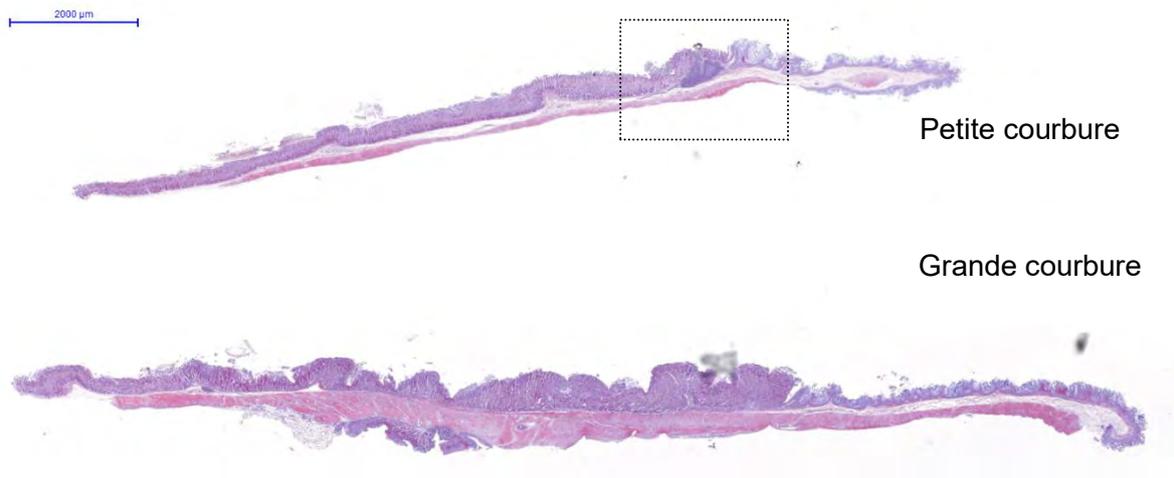
Annexe 9 : Coupes histologiques colorées à l'hématoxyline et à l'éosine de l'estomac d'une souris BALB/c WT non infectée.



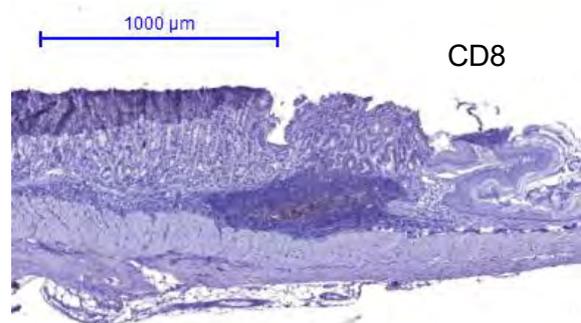
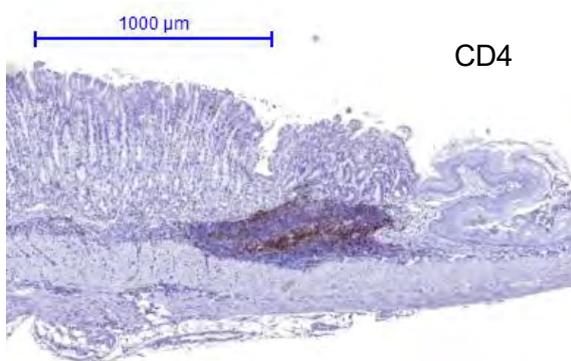
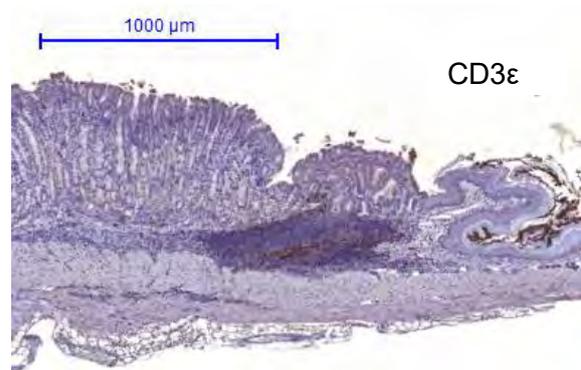
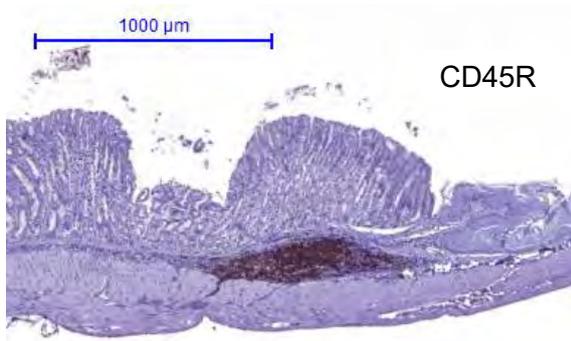
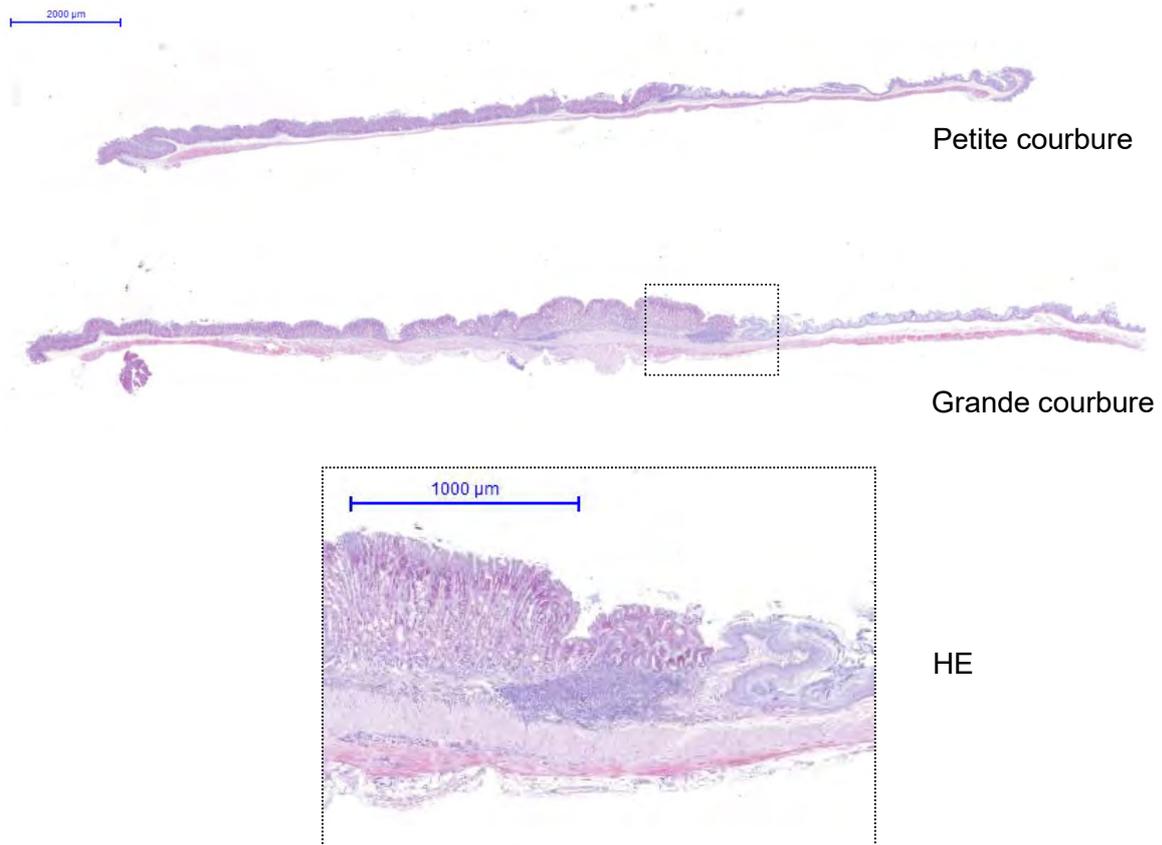
Annexe 10 : Coupes histologiques colorées à l'hématoxyline et à l'éosine de l'estomac d'une souris BALB/c transgénique APRIL non infectée.



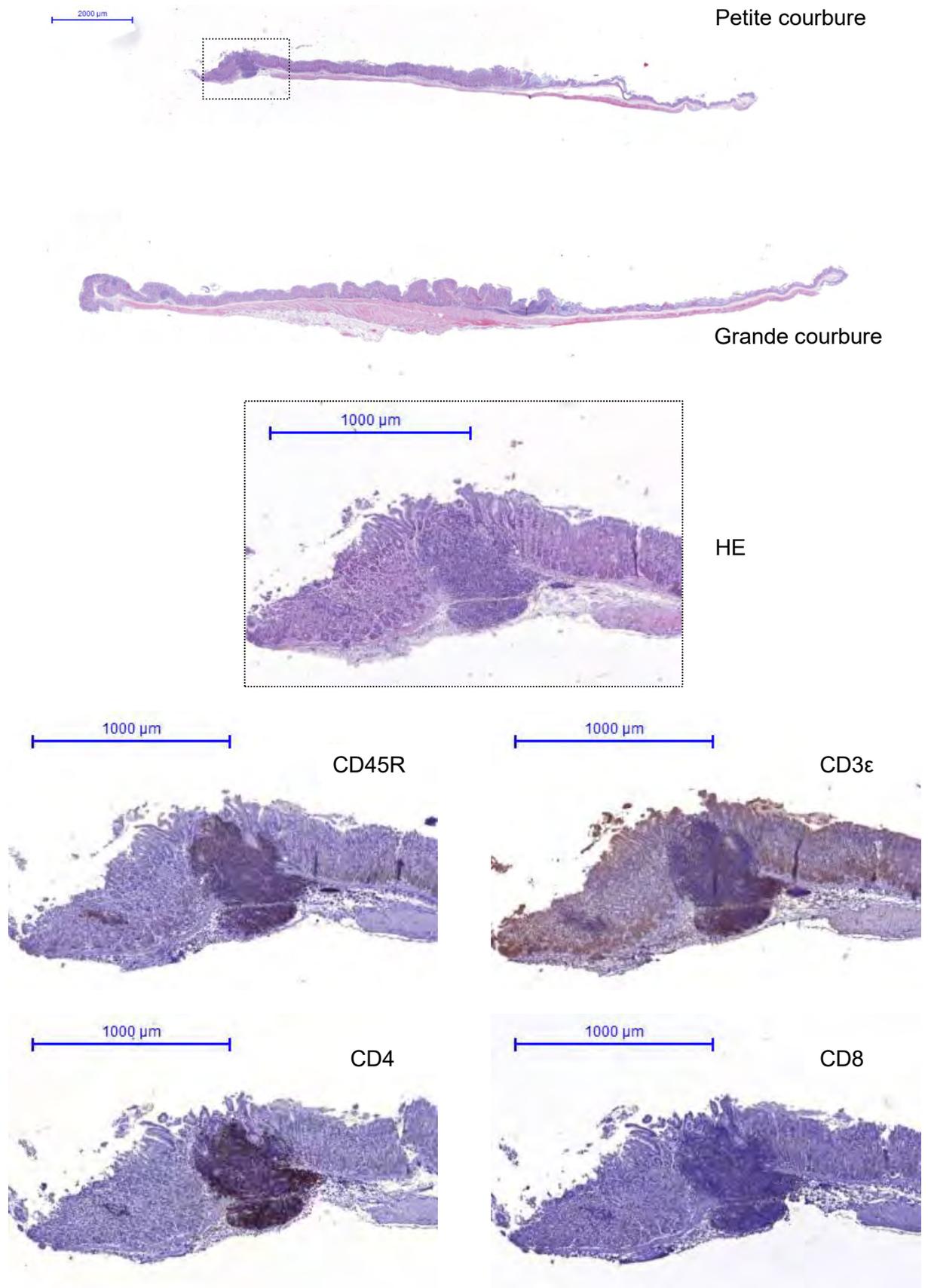
Annexe 11 : Coupes histologiques colorées à l'hématoxyline et à l'éosine (HE) et marquages immunohistochimiques de l'estomac d'une souris BALB/c WT infectée par *Helicobacter pylori*. Marquages décrits en annexe 6.



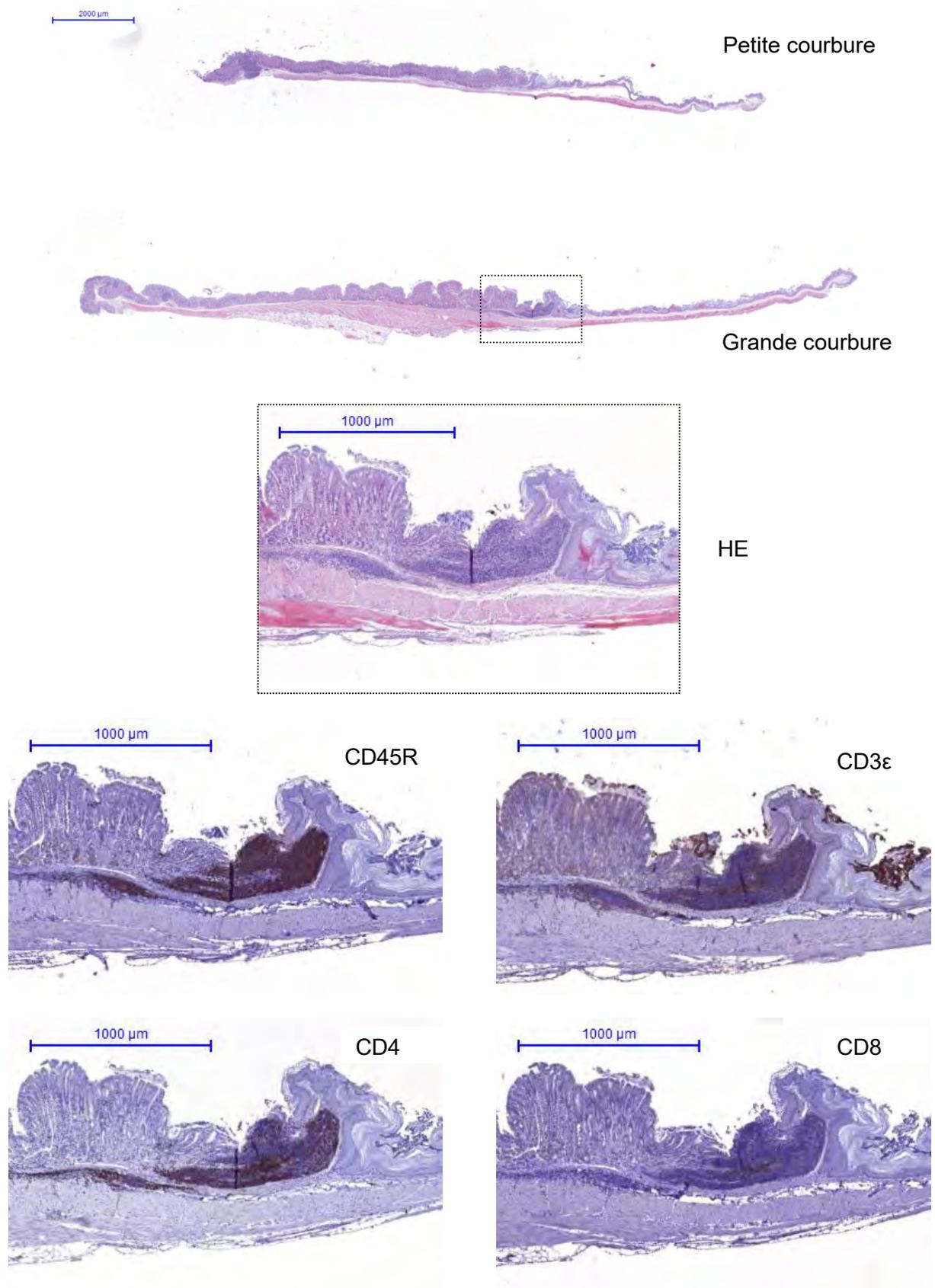
Annexe 12 : Coupes histologiques colorées à l'hématoxyline et à l'éosine (HE) et marquages immunohistochimiques de l'estomac d'une souris BALB/c WT infectée par *Helicobacter pylori*. Marquages décrits en annexe 6.



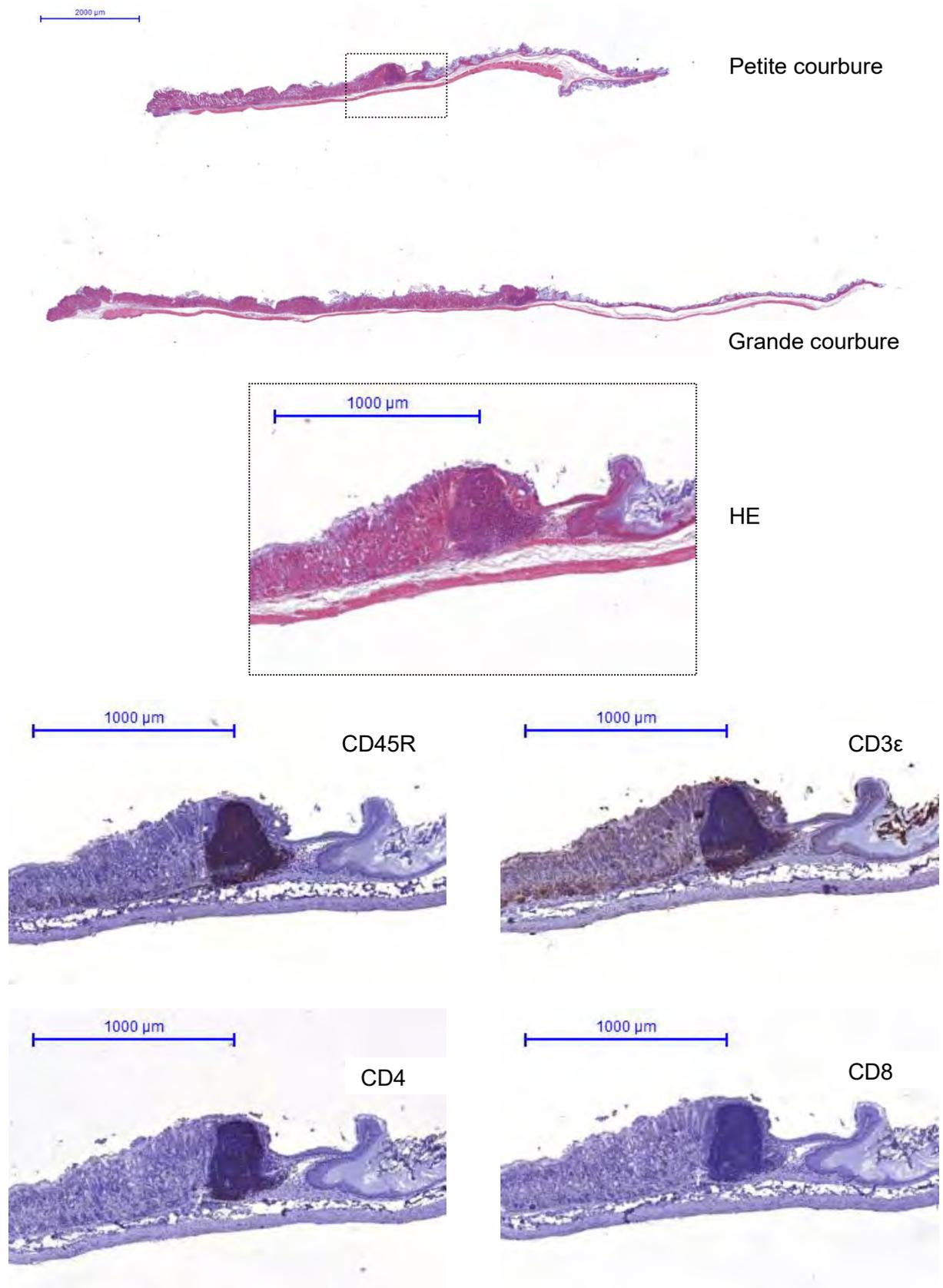
Annexe 13 : Coupes histologiques colorées à l'hématoxyline et à l'éosine (HE) et marquages immunohistochimiques de l'estomac d'une souris BALB/c transgénique APRIL infectée par *Helicobacter pylori*. Marquages décrits en annexe 6.



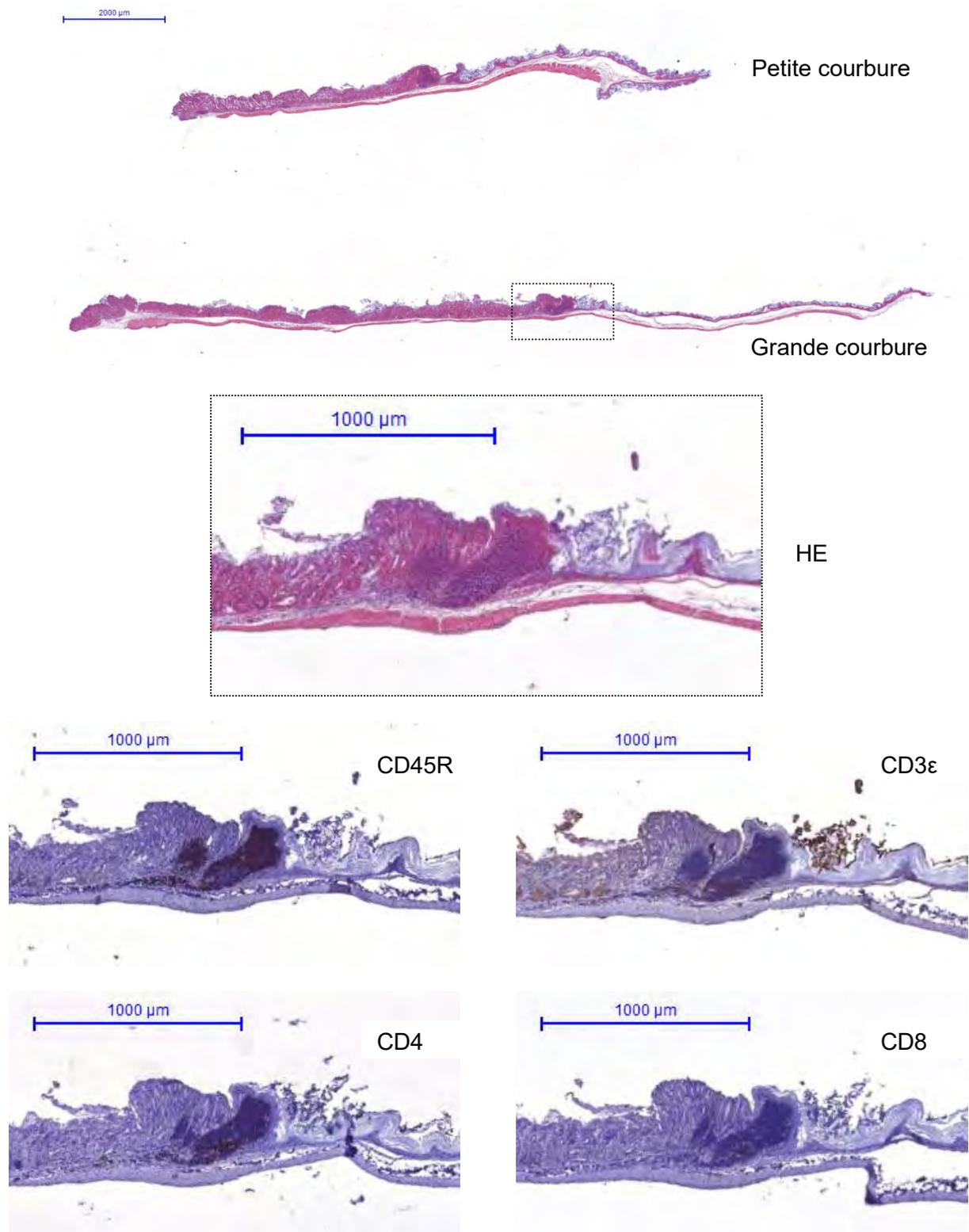
Annexe 14 : Coupes histologiques colorées à l'hématoxyline et à l'éosine (HE) et marquages immunohistochimiques de l'estomac d'une souris BALB/c WT infectée par *Helicobacter felis*. Marquages décrits en annexe 6.



Annexe 15 : Coupes histologiques colorées à l'hématoxyline et à l'éosine (HE) et marquages immunohistochimiques de l'estomac d'une souris BALB/c WT infectée par *Helicobacter felis*. Marquages décrits en annexe 6.



Annexe 16 : Coupes histologiques colorées à l'hématoxyline et à l'éosine (HE) et marquages immunohistochimiques de l'estomac d'une souris BALB/c transgénique APRIL infectée par *Helicobacter felis*. Marquages décrits en annexe 6.



Annexe 17 : Coupes histologiques colorées à l'hématoxyline et à l'éosine (HE) et marquages immunohistochimiques de l'estomac d'une souris BALB/c transgénique APRIL infectée par *Helicobacter felis*. Marquages décrits en annexe 6.

---

## ABSTRACT

### **Gastric lymphomagenesis and *Helicobacter* infection: comparison of two genetic backgrounds of a mice model expressing the cytokine APRIL**

*H. pylori* infection rarely causes gastric MALT lymphomas (LGM). The INSERM U1053 team has developed a transgenic mice model in C57BL6 and BALB/c genetic backgrounds expressing the human form of the cytokine APRIL infected by different species of the genus *Helicobacter* in order to study the pathophysiology of gastric lymphomagenesis. This cytokine of the TNF family is involved in the induction and maintenance of B-cells responses. C57BL6 APRIL mice exhibited histologically, 18 months post-infection with *Helicobacter*, multifocal lymphoid infiltrates associated with preneoplastic lesions. On histological and cytometric arguments, only infected C57BL6 APRIL mice appeared to develop GML. The results obtained in the BALB/c background were less convincing. The study of bacterial load by qPCR at 12 and 18 months post-infection showed that APRIL would promote the persistence of the infection *in vivo*. The results obtained allowed us to compare the C57BL6 and BALB/c genetic backgrounds, to demonstrate the influence of APRIL *in vivo* and finally to make an assessment of this new model.

---

**KEY WORDS :** *Helicobacter* ; GML ; APRIL ; MALT lymphoma ; animal model

---

## RESUME

### **Lymphomagenèse gastrique et infection à *Helicobacter* : comparaison de deux fonds génétiques en modèle de souris exprimant la cytokine APRIL**

L'infection à *H. pylori* entraîne dans de rares cas des lymphomes gastriques de type MALT (LGM). L'équipe INSERM U1053 a développé un modèle de souris transgéniques en fonds génétiques C57BL6 et BALB/c exprimant la forme humaine de la cytokine APRIL, infectées par différentes espèces du genre *Helicobacter* afin d'étudier la physiopathologie de la lymphomagenèse gastrique. Cette cytokine de la famille du TNF est impliquée dans l'induction et le maintien des réponses lymphocytaires B. Les souris C57BL6 APRIL présentaient histologiquement, 18 mois post-infection par *Helicobacter*, des infiltrats lymphoïdes multifocaux associés à des lésions préneoplasiques. Sur des arguments histologiques et cytométriques, seules les souris C57BL6 APRIL infectées semblaient développer des LGM. Les résultats obtenus dans le fond BALB/c étaient beaucoup moins convaincants. L'étude des niveaux de colonisation bactérienne par qPCR à 12 et 18 mois post-infection a montré que APRIL favoriserait la persistance *in vivo* de l'infection. Les résultats obtenus nous ont permis de confronter les fonds génétiques C57BL6 et BALB/c, de démontrer l'influence de APRIL *in vivo* et *in fine* de faire un état des lieux sur ce nouveau modèle.

---

**Titre et résumé en Anglais** : voir au recto de la dernière page de la thèse

---

**Discipline administrative** : Biologie Médicale

---

**MOTS-CLES** : *Helicobacter* ; LGM ; APRIL ; lymphome du MALT ; modèle animal

---

**Intitulé et adresse du laboratoire** : INSERM U1053-UMR BaRITOn – Team 2  
« *Helicobacter* infection: inflammation and cancer » - Bat 2B RDC Zone Nord – 146  
Rue Léo Saignat – 33076 BORDEAUX CEDEX

**Directeur de thèse** : Monsieur le Professeur Philippe LEHOURS