

Université *Victor Segalen* Bordeaux 2

Année 2009

Thèse n°1627

THÈSE

pour le

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ BORDEAUX 2

Mention : Sciences, Technologies, Santé

Option : Biologie Cellulaire et Physiopathologie

Présentée et soutenue publiquement le 21 décembre 2009

Par Jonathan Ferrand

***Helicobacter pylori* dans un modèle de carcinogénèse gastrique impliquant les cellules souches mésenchymateuses**

Membres du Jury

M. le Docteur José Machado	Rapporteur
M. le Docteur Gwendal Lazennec	Rapporteur
Mme le Docteur Eliette Touati	Examineur
M. le Professeur Pierre Charbord.....	Examineur
M. le Professeur Francis Mégraud.....	Examineur
Mlle le Docteur Christine Varon.....	Invitée
Mme le Docteur Armelle Ménard.....	Directeur de thèse

« *Aujourd'hui c'est mon tour*

J'ai vu le bord de la Seine

Et j'ai crié : « Au secours ! »

Ainsi m'aiment les hommes que j'aime »

A tous ceux-là, toujours présents.

Remerciements

Ce travail n'aurait pu aboutir sans le soutien, l'intérêt, la confiance et la gentillesse de tous les membres, passés et présents, de l'Unité INSERM 853.

Mes remerciements et ma reconnaissance les plus sincères aux Docteurs Christine Varon et Philippe Lehours et au Professeur Francis Mégraud pour les encouragements, les conseils, les compétences, les opportunités et surtout la confiance qu'ils m'ont apportés sur les cinq années partagées.

Ma reconnaissance et mon amitié aux collègues du laboratoire INSERM U853 pour leur disponibilité, leur aide technique et personnelle, et les moments de détente partagés. Une pensée particulière pour les amis proches présents au laboratoire en 2007.

Je remercie également les différents et nombreux collaborateurs de ce projet pour leur disponibilité et leur patience; en particulier Danièle Noël, Annie Schmid-Alliana, Martina Carlotti, Patrick Legembre et Vincent Pitard.

Je suis très reconnaissant aux membres du jury d'avoir accepté de juger ces travaux.

J'adresse enfin de réels remerciements aux différents personnels des plateformes techniques de l'Université *Victor Segalen* Bordeaux 2, du laboratoire de Bactériologie de l'Hôpital Pellegrin et toutes les personnes sans lesquelles je n'aurais pu travailler dans des conditions de qualité.

Abréviations

<u>BMDC :</u>	<i>Bone Marrow-Derived Cells</i> , cellules originaires de la moelle osseuse
<u>CIRC :</u>	Centre International de Recherche sur le Cancer
<u>CSC :</u>	<i>Cancer Stem Cells</i> , cellules souches cancéreuses
<u>DsRED :</u>	<i>Discosoma Red</i> , protéine fluorescente rouge
<u>eGFP / GFP :</u>	<i>Enhanced / Green Fluorescent Protein</i> , protéine fluorescente verte
<u>ESA :</u>	<i>Epithelial Specific Antigen</i> , antigène épithélial
<u>H. pylori :</u>	<i>Helicobacter pylori</i>
<u>HSC :</u>	<i>Hematopoietic Stem Cell</i> , cellule souche hématopoïétique
<u>IL :</u>	Interleukine (voir annexe pour la nomenclature officielle)
<u>ISCT :</u>	<i>International Society for Cellular Therapy</i> , société internationale de thérapie cellulaire
<u>LMA :</u>	Leucémie Myéloïde Aiguë
<u>LPS :</u>	Lipopolysaccharide
<u>MAPC :</u>	<i>Multipotent Adult Progenitor Cells</i> , cellules progénitrices adultes multipotentes
<u>MALT :</u>	<i>Mucosa Associated Lymphoid Tissue</i> , tissu lymphoïde associé aux muqueuses
<u>MIAMI Cell :</u>	<i>Marrow-Isolated Adult Multilineage Inducible Cell</i> , cellules multipotentes inductibles issues de la moelle osseuse
<u>MMP :</u>	Métalloprotéases matricielles
<u>MOI :</u>	Multiplicité d'infection
<u>MSC :</u>	<i>Multipotent mesenchymal Stromal Cells</i> ou <i>Mesenchymal Stem Cells</i> , cellules souches mésenchymateuses
<u>NK :</u>	Cellules <i>Natural Killer</i>
<u>PAMP :</u>	<i>Pathogen-Associated Molecular Patterns</i> , profils moléculaires associés aux pathogènes
<u>qRT-PCR :</u>	<i>quantitative Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction</i> , réaction de polymérisation en chaîne après transcription inverse quantitative
<u>TGI :</u>	Tractus gastrointestinal
<u>TLR :</u>	<i>Toll Like Receptor</i> , récepteurs de type Toll
<u>TSS4 :</u>	Système de sécrétion de type IV

Pour plus de commodités, les cytokines seront dénommées selon leur appellation officielle, et leurs alias et récepteurs seront donnés en annexe (**Annexe 1**).

Index des Tables

- Table 1 Répartition de l'incidence des cancers dus à des agents infectieux dans le monde.
- Table 2 TLR et leurs ligands.
- Table 3 Souches de *H. pylori* utilisées.
- Table 4 Etude des facteurs potentiellement impliqués dans le recrutement des MSC suite à l'infection de cellules épithéliales par *H. pylori*.

Index des Figures

- Figure 1 Répartition mondiale de l'incidence des cancers gastriques.
- Figure 2 Schéma de l'estomac.
- Figure 3 Progression histologique de l'adénocarcinome gastrique de type intestinal dû à *H. pylori* dans un modèle murin.
- Figure 4 Relations phylogénétiques de quelques espèces de la famille des *Helicobacteraceae* et hôtes naturels.
- Figure 5 Pathologies gastrointestinales induites par l'infection par *H. pylori*.
- Figure 6 Composition génomique du *cagPAI* et modèle du système de sécrétion de type IV.
- Figure 7 CagA et signalisation cellulaire.
- Figure 8 Effets divers de la cytotoxine vacuolisante VacA.
- Figure 9 Résumé de la pathogénicité de *H. pylori*.
- Figure 10 Schéma de l'initiation et du développement tumoral proposé par JeanMarie Houghton.
- Figure 11 Schéma de l'organisation cellulaire au sein d'une glande de l'épithélium gastrique.
- Figure 12 Hématopoïèse simplifiée.
- Figure 13 Paramètres critiques pour l'isolement des MSC.
- Figure 14 Modèle de la plasticité cellulaire des MSC.
- Figure 15 Mécanismes de fusion cellulaire.
- Figure 16 Modèle de recrutement des MSC.
- Figure 17 Modulation du système immunitaire par les MSC.
- Figure 18 Caractéristiques des cellules cancéreuses.
- Figure 19 Principe de la chambre de migration.
- Figure 20 Purification des MSC murines.
- Figure 21 Potentiel de différenciation des mMSC.
- Figure 22 Potentiel de différenciation des hMSC.
- Figure 23 Validation des capacités migratoires des MSC.
- Figure 24 Potentiel chimiotactique des cellules épithéliales infectées par *H. pylori*.
- Figure 25 Analyse de l'apoptose des cellules épithéliales induite par l'infection par *H. pylori*.

- Figure 26 Analyse quantitative des transcrits des chimiokines produites par les cellules épithéliales murines mIC₁₂ infectées par *H. pylori*.
- Figure 27 Coculture directe entre MSC et cellules épithéliales et marquage des cytokératines.
- Figure 28 Coculture directe entre MSC et cellules épithéliales et marquage de l'*Epithelial Specific Antigen*.
- Figure 29 Coculture directe entre MSC et cellules épithéliales marquées au niveau des membranes.
- Figure 30 Analyse par microscopie confocale de la coculture directe entre MSC et cellules épithéliales et marquage de l'*Epithelial Specific Antigen*.
- Figure 31 Analyse par FICTION de la coculture directe entre MSC et cellules épithéliales et marquage des cytokératines.
- Figure 32 Coculture indirecte entre MSC et cellules épithéliales.
- Figure 33 Analyse par FISH et FICTION des tumeurs obtenues après injection de MSC et de cellules épithéliales AGS dans un modèle murin.
- Figure 34 Quantification de l'acquisition de marqueurs épithéliaux par les MSC.
- Figure 35 Effets sur la morphologie des MSC de l'infection par *H. pylori*.
- Figure 36 Mesure de l'adhérence de différentes souches de *H. pylori* aux MSC.
- Figure 37 Analyse de l'induction de l'apoptose des MSC par l'infection par *H. pylori*.
- Figure 38 Activation de la voie NF- κ B après infection par *H. pylori*.
- Figure 39 Mécanisme de l'activation des récepteurs aux chimiokines.
- Figure 40 Schéma de l'implication des MSC dans la carcinogenèse gastrique due à *H. pylori*.

INTRODUCTION	11
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	15
1. INFECTIONS ET CANCERS.....	16
1.1. Généralités	16
1.1.1. Virus et cancers.....	17
1.1.2. Parasites et cancers.....	18
1.1.3. Bactéries et cancer.....	19
1.2. Cancers de l'estomac	19
1.2.1. Adénocarcinome gastrique.....	20
1.2.2. Lymphome gastrique du MALT.....	27
1.2.3. Carcinogénèse gastrique et infection par <i>Helicobacter pylori</i>	29
1.3. <i>Helicobacter pylori</i>	32
1.3.1. Généralités	32
1.3.2. Epidémiologie	34
1.3.3. Rôle dans les pathologies gastriques	35
1.3.4. Diversité génétique.....	37
1.3.5. Facteurs de virulence.....	38
1.3.6. Reconnaissance immunitaire.....	49
2. UN NOUVEAU MODELE DE CARCINOGENESE GASTRIQUE.....	54
3. RENOUELEMENT TISSULAIRE ET CELLULES SOUCHES.....	57
3.1. Généralités	57
3.2. Renouveaulement tissulaire du tractus gastrointestinal	58
3.3. Différents types de cellules souches médullaires.....	59
3.3.1. Cellules souches hématopoïétiques	59
3.3.2. Cellules souches médullaires non hématopoïétiques.....	60
4. CELLULES SOUCHES MESENCHYMATEUSES (MSC)	63
4.1. Purification	63
4.2. Potentiel de différenciation.....	66
4.2.1. Différenciation des MSC en adipocytes, ostéoblastes et chondrocytes	66
4.2.2. Potentiel de différenciation en d'autres lignées	68
4.2.3. Mécanismes de différenciation.....	74
4.3. Recrutement	76
4.3.1. Modèle de recrutement, l'exemple des leucocytes	77
4.3.2. Différences entre migration des leucocytes et MSC.....	78
4.3.3. Existence de MSC circulantes.....	79
4.3.4. Recrutement <i>in vitro</i>	79
4.3.5. Recrutement <i>in vivo</i>	80
4.3.6. Rôle des métalloprotéases matricielles.....	81
5. CELLULES SOUCHES MESENCHYMATEUSES ET CANCERS.....	81
5.1. Cellules Souches Cancéreuses (CSC).....	81
5.2. Rôle dans l'initiation tumorale.....	82

5.3.	Croissance tumorale.....	84
5.4.	Fibroblastes associés aux tumeurs	86
5.5.	Réponse immunitaire	86
5.5.1.	Immunoévasion	86
5.5.2.	Immunomodulation	87
5.5.3.	MSC et Toll-Like Récepteurs.....	91
5.6.	Angiogenèse	92
5.7.	Transition mésenchymo-épithéliale (MET).....	93
5.8.	Résistance thérapeutique.....	94
6.	LES MSC, DES CELLULES VULNERABLES A LA TUMORIGENESE ?	94
7.	OBJECTIFS DE CES TRAVAUX	97
MATERIEL ET METHODES		98
1.	MATERIEL BIOLOGIQUE.....	99
1.1.	Obtention et culture des MSC.....	99
1.1.1.	Purification.....	99
1.1.2.	Caractérisation	100
1.1.3.	Potentiel de différenciation <i>in vitro</i>	100
1.2.	Culture de cellules épithéliales	102
1.2.1.	Cellules épithéliales gastriques humaines	102
1.2.2.	Cellules épithéliales coliques gastriques	102
1.2.3.	Cellules épithéliales intestinales murines	103
1.3.	Transduction lentivirale	103
1.4.	Marquage chimique des membranes.....	104
1.5.	Culture bactérienne.....	104
2.	TRANSCRIPTION INVERSE ET PCR EN TEMPS REEL	105
2.1.	Extraction d'ARN et transcription inverse.....	105
2.2.	PCR quantitative	105
3.	MIGRATION	106
4.	APOPTOSE	107
5.	DIFFERENCIATION EPITHELIALE	107
5.1.	<i>In vitro</i>	107
5.1.1.	Coculture directe	107
5.1.2.	Coculture indirecte.....	108
5.2.	<i>In vivo</i>	108
6.	IMMUNOMARQUAGES.....	109
6.1.	Immunofluorescence optique.....	109
6.2.	FISH et FICTION	109
6.3.	Microscopie	110
6.4.	Cytométrie en flux	110
7.	ADHERENCE BACTERIENNE	111
7.1.	Marquage bactérien antigénique	111

7.2.	Marquage bactérien chimique.....	111
8.	ANALYSE STATISTIQUE	111
RESULTATS EXPERIMENTAUX.....		112
1.	CHAPITRE I : OBTENTION DE MSC.....	113
1.1.	MSC d'origine murine.....	113
1.2.	MSC d'origine humaine.....	116
2.	CHAPITRE II : ETUDE DU POTENTIEL CHIMIOTACTIQUE DES CELLULES EPITHELIALES INFECTEES PAR <i>H. PYLORI</i>	118
2.1.	Introduction.....	118
2.2.	Etude du recrutement des MSC en réponse à l'infection de cellules épithéliales par <i>H. pylori</i> ..	122
2.2.1.	Validation du modèle d'étude des capacités migratoires des MSC.....	122
2.2.2.	Potentiel chimiotactique des cellules épithéliales infectées par <i>H. pylori</i>	124
2.3.	Etude de l'induction de l'apoptose des cellules épithéliales par <i>H. pylori</i>	127
2.4.	Etude des facteurs chimioattractants.....	129
2.4.1.	Choix des facteurs étudiés.....	129
2.4.2.	Analyse transcriptomique.....	129
2.5.	Conclusion.....	132
3.	CHAPITRE III : ETUDE DU POTENTIEL DE DIFFERENCIATION EPITHELIAL DES MSC.....	133
3.1.	Introduction.....	133
3.2.	Coculture directe entre MSC et cellules épithéliales	135
3.2.1.	Approche phénotypique	135
3.2.2.	Approche chromosomique	139
3.3.	Coculture indirecte entre MSC et cellules épithéliales	141
3.4.	Coculture <i>in vivo</i> entre MSC et cellules épithéliales	143
3.5.	Quantification des cellules différenciées par coculture directe.....	145
3.6.	Conclusion.....	146
4.	CHAPITRE IV : ETUDE DE L'INFECTION DES MSC PAR <i>H. PYLORI</i>	148
4.1.	Introduction.....	148
4.2.	Adhérence de <i>H. pylori</i> et modifications morphologiques des MSC.....	149
4.3.	Induction de l'apoptose cellulaire par <i>H. pylori</i>	152
4.4.	Conclusion.....	155
DISCUSSION.....		156
1.	LES MSC, UNE POPULATION UNIQUE ET DEFINIE ?.....	157
1.1.	MSC et fibroblastes	157
1.2.	MSC et cultures <i>in vitro</i>	158
2.	ROLE DES MSC DANS LA CARCINOGENESE GASTRIQUE	160
2.1.	Infections de cellules épithéliales par <i>H. pylori</i> et recrutement des MSC.....	160
2.1.1.	Sécrétion de facteurs chimioattractants par les cellules épithéliales infectées par <i>H. pylori</i>	160
2.1.2.	Activation des propriétés migratoires des MSC	165
2.1.3.	Migration des MSC.....	167

2.1.4.	Infection par <i>H. pylori</i> et apoptose des cellules épithéliales gastriques.....	168
2.2.	Différenciation épithéliale des MSC.....	170
2.2.1.	Cellules médullaires et renouvellement tissulaire	170
2.2.2.	Fusion et différenciation épithéliale des MSC.....	171
2.2.3.	Différenciation épithéliale et développement tumoral.....	172
2.2.4.	Différenciation épithéliale et modèle de carcinogenèse gastrique.....	173
2.3.	Infection des MSC par <i>H. pylori</i>	173
2.3.1.	Infection par <i>H. pylori</i> et adhérence aux MSC.....	174
2.3.2.	Infection par <i>H. pylori</i> et modifications morphologiques des MSC	174
2.3.3.	Infection par <i>H. pylori</i> et apoptose des MSC	174
2.3.4.	Infection par <i>H. pylori</i> et carcinogenèse gastrique	175
3.	CONCLUSION.....	176
BIBLIOGRAPHIE		178
ANNEXE		219
1.	NOMENCLATURE DES CYTOKINES	220
2.	ARTICLE 1 : <i>HUMAN BONE MARROW-DERIVED MESENCHYMAL STEM CELLS DIFFERENTIATE INTO GASTROINTESTINAL EPITHELIAL CELLS THROUGH CELL FUSION</i>	221
3.	ARTICLE 2 : <i>MODULATION OF LYMPHOCYTE PROLIFERATION INDUCED BY GASTRIC MALT LYMPHOMA-ASSOCIATED H. PYLORI STRAINS</i>	222
4.	ARTICLE 3 : <i>EVALUATION OF THE CLINICAL SIGNIFICANCE OF HOMB, A NOVEL CANDIDATE MARKER OF HELICOBACTER PYLORI STRAINS ASSOCIATED WITH PEPTIC ULCER DISEASE</i>	223

Introduction

Vingt-cinq ans se sont écoulés depuis que deux chercheurs australiens réussirent, pour la première fois, à cultiver *Helicobacter pylori* (Marshall and Warren, 1984). Cette bactérie strictement adaptée à l'estomac humain est unique à plus d'un titre et l'importance reconnue de cette infection dans diverses pathologies gastriques a récemment valu à ces deux médecins d'être lauréats du Prix Nobel de Médecine 2005, le second pour la découverte d'une bactérie après celui de R. Koch en 1905 pour *Mycobacterium tuberculosis*.

L'infection par *H. pylori* concerne approximativement 50% de la population mondiale et environ 25% de la population française adulte. Environ vingt pour cent des sujets infectés développent des maladies gastroduodénales telles la gastrite, l'ulcère, l'adénocarcinome gastrique ou le lymphome gastrique du MALT (Tissu Lymphoïde Associé aux Muqueuses). *H. pylori* est, à ce titre, la seule bactérie ayant été reconnue comme carcinogène de type I par le Centre International de la Recherche sur le Cancer (IARC, 1994). La découverte de cette bactérie a révolutionné le domaine de la gastro-entérologie. En effet, malgré les réticences initiales, le traitement de l'ulcère passe aujourd'hui par un traitement antibiotique d'éradication de *H. pylori*. L'effet bénéfique de cette éradication est encore plus flagrant pour les patients développant un lymphome gastrique du MALT puisqu'il est possible de faire régresser durablement ce cancer particulier après un traitement antibiotique spécifique (Wotherspoon *et al.*, 1993).

Les cancers de l'estomac sont actuellement la seconde cause de mortalité par cancer dans le monde et environ 8000 personnes décèdent chaque année de ces pathologies en France (Bretagne, 2003). La détermination des mécanismes physiopathologiques responsables de l'initiation et du développement tumoral représente donc un espoir pour la politique de santé publique.

L'identification récente de la nature des cellules à l'origine de la transformation cancéreuse en réponse à l'infection chronique à *Helicobacter* apporte ainsi de nouvelles perspectives de recherche. Dans un modèle murin infecté par un pathogène animal proche de *H. pylori*, *Helicobacter felis*, il a été montré que les cellules cancéreuses de la muqueuse gastrique avaient pour origine les cellules souches mésenchymateuses (MSC) de la moelle osseuse (Houghton *et al.*, 2004). Dans ce modèle, les auteurs ont démontré qu'après la phase d'atrophie de la muqueuse gastrique consécutive à l'infection, les cellules de la moelle osseuse étaient recrutées et reconstituaient progressivement l'épithélium lésé. D'après ces résultats, la dysplasie puis l'adénocarcinome gastrique se développeraient à partir de ces glandes reconstituées par des cellules médullaires.

Des modèles *in vivo* d'initiation et de développement tumoral consécutifs à l'infection par *Helicobacter* sont disponibles. Cependant, la complexité des processus intervenant *in vivo*, impliquant la susceptibilité génétique de l'hôte et les facteurs environnementaux, est incompatible avec la mise en place de protocoles simples permettant la recherche des mécanismes moléculaires, cellulaires et bactériens impliqués. Il apparaît donc nécessaire de développer des modèles *in vitro* afin de s'affranchir de ces variables.

Le but de ce travail est de mettre au point des modèles d'étude permettant l'analyse séquentielle, par une approche *in vitro*, des différentes étapes aboutissant au développement de l'adénocarcinome gastrique dû à l'infection par *H. pylori*.

Dans un premier temps, il a été nécessaire d'obtenir le matériel biologique permettant le développement de ces modèles. Pour cela, nous avons purifié des MSC humaines ou issues de souris. Ces cellules ne possédant pas de marqueurs spécifiques, leur caractérisation a répondu aux différents critères proposés par l'*International Society for Cellular Therapy* (Dominici *et al.*, 2006). Ces cellules ont ensuite été marquées afin de pouvoir les identifier et étudier leur évolution en culture *in vitro* ou injectées *in vivo* chez la souris.

Nous nous sommes ensuite intéressés à la capacité des cellules épithéliales infectées par *H. pylori* à sécréter des facteurs susceptibles de recruter les MSC. Pour cela, la migration des MSC en réponse à différents stimuli a été étudiée en développant un système de chambre de migration. Les facteurs responsables du chimiotactisme ont ensuite pu être recherchés par qRT-PCR. La mise au point de ce système d'étude a permis de disposer d'un modèle permettant de mieux comprendre le mécanisme de migration des MSC et de mieux appréhender leur recrutement dans la muqueuse gastrique infectée.

Après avoir fourni des arguments permettant d'expliquer le recrutement des MSC au niveau de la muqueuse infectée, nous avons développé des modèles d'étude des capacités de différenciation épithéliale de ces cellules. Nous avons ainsi montré que les MSC étaient capables d'acquérir des marqueurs épithéliaux après fusion avec des cellules épithéliales gastriques. Notre étude a permis de mieux comprendre les mécanismes de différenciation épithéliale et d'apporter une première hypothèse sur l'instabilité génétique des cellules différenciées par fusion cellulaire.

Enfin, la dernière partie des travaux concerne l'étude, sur nos différents modèles, des effets de l'infection par *H. pylori* afin de mieux comprendre les mécanismes à la fois cellulaires et bactériens mis en jeu. Nous espérons que cette dernière partie permette la

formulation d'hypothèses expliquant le rôle de *H. pylori* dans la perturbation de la différenciation des MSC et dans l'initiation tumorale.

Ce manuscrit est composé d'une première partie bibliographique divisée en 6 chapitres apportant les éléments nécessaires à la compréhension du rôle de *H. pylori* dans le développement tumoral, de l'importance des cellules médullaires dans l'adénocarcinome gastrique et enfin des notions fondamentales sur la caractérisation des MSC et leur implication dans la cancérogenèse. Le second chapitre récapitule les différentes techniques mises en place pour le développement des modèles d'étude présentés. Les résultats de ce travail sont présentés dans le troisième chapitre. Le quatrième chapitre correspond à une vision globale du rôle des MSC dans l'adénocarcinome gastrique et permet une discussion des résultats obtenus. Une annexe a également été incluse comportant un article actuellement en revue correspondant aux travaux réalisés et deux articles sur des travaux complémentaires réalisés au cours de ma thèse. Le premier article « *modulation of lymphocyte proliferation induced by gastric MALT lymphoma-associated H. pylori strains* » a montré les capacités d'une protéine thermolabile de *H. pylori* à inhiber la prolifération de lymphocytes T humains. Le second article « *evaluation of the clinical significance of homB, a novel candidate marker of Helicobacter pylori strains associated with peptic ulcer* » a montré l'importance d'une protéine de membrane externe dans la virulence de *H. pylori*. Ces deux articles ont permis de mieux appréhender les capacités de colonisation et de persistance de *H. pylori* lors de l'infection favorisant l'apparition de pathologies gastriques.

Etude bibliographique

1. Infections et cancers

1.1. Généralités

Les croyances populaires évoquent depuis longtemps la nature contagieuse des causes des cancers en se basant sur des anecdotes de *maisons cancéreuses* supposées, de *cancers à deux* touchant les personnes mariées ou sur des transmissions des parents aux enfants. A la fin du XIX^{ième} siècle, les travaux de Pasteur et Koch, révélant l'étiologie microbienne de plusieurs pathologies, ont donné à cette hypothèse une certaine plausibilité. Les premières démonstrations scientifiques de la nature contagieuse possible des causes des cancers ont été réalisées par Ellerman et Bang (1908) puis par Rous (1910), en montrant que l'inoculation de filtres d'extraits de tumeurs permettait un développement cancéreux chez le poulet (Epstein, 2001). Du fait d'un manque de techniques permettant de démontrer le lien entre microorganismes et cancers, le rôle des agents infectieux dans l'initiation tumorale, au même titre que la susceptibilité génétique de l'hôte ou les facteurs environnementaux, n'a été accepté que plusieurs décennies plus tard.

Depuis, le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC) a reconnu six virus, quatre parasites et une bactérie comme carcinogènes ou potentiellement carcinogènes pour l'homme (Table 1) (IARC, 2008).

	Classification du CIRC	Pathologies	Incidence due à l'agent infectieux	Pourcentage de cancer dû à l'agent infectieux
<i>H. pylori</i>	1	carcinomes et lymphomes gastriques	603 500	5,5
Papillomavirus	1,2	carcinomes du col de l'utérus et autres	561 180	5,2
Virus de l'hépatite B et C	1	carcinomes hépatocellulaires	535 000	4,9
Virus Epstein-Barr	1	lymphomes	113 400	1
Herpesvirus 8	2	sarcome de Kaposi	66 200	0,9
<i>Schistosoma haematobium</i>	1	carcinomes de la vessie	10 600	0,1
HTLV-1	1	leucémies	3 300	0,03
<i>Opisthorchis viverrini</i>	1	cholangiocarcinome	2 500	0,02
<i>Clonorchis sinensis</i>	2			

Total des cancers d'origine infectieuse	1 900 000	17,7
Total des cancers	9 000 000	100

Table 1. Répartition de l'incidence des cancers dus à des agents infectieux dans le monde. Le groupe carcinogène de type 1 du CIRC correspond aux agents carcinogènes pour l'homme et le type 2 aux probablement carcinogènes pour l'homme. D'après le *World Cancer Report 2008* et Parkin *et al.*, *Int J Cancer*, 2006 (IARC, 2008; Parkin, 2006).

1.1.1. Virus et cancers

Le virus de l'hépatite B (VHB), un virus à ADN double brin de la famille des *Hepadnaviridae*, infecte environ 2 milliards de personnes au niveau mondial dont plus de 400 millions sont des porteurs chroniques (Ganem and Prince, 2004). Le virus de l'hépatite C (VHC), un virus à ARN simple brin de la famille des *Flaviviridae*, infecte quant à lui 100 millions de personnes dans le monde et induit une infection chronique chez 80% des personnes infectées (Liang *et al.*, 2000). Les infections VHB ou VHC sont responsables de l'apparition de carcinomes hépatocellulaires, menant à un million de décès par an. En 2002, les fractions des carcinomes hépatocellulaires liés à une infection par le VHB ou le VHC ont été évaluées à 23 et 20% respectivement dans les pays développés et 59% et 33% dans les pays en voie de développement (Parkin, 2006). Un vaccin contre le VHB est disponible.

Les papillomavirus, virus à ADN de la famille des *Papovaviridae*, comprennent plus de 100 membres ayant un tropisme préférentiel pour la peau ou les muqueuses (De Villiers *et al.*, 2004). La prévalence de l'infection par papillomavirus est estimée à 20% de la population mondiale avec des variations en fonction de l'âge et du nombre de partenaires sexuels (Bosch *et al.*, 2002; Huh, 2009). La persistance de l'infection est responsable du développement de cancers du col de l'utérus, mais également de cancers anaux, de la vulve, du vagin ou du pénis (Cogliano *et al.*, 2005). L'ADN du papillomavirus est retrouvé chez 90 à 100% des patientes présentant un cancer du col de l'utérus, confirmant son rôle prépondérant comme agent étiologique de cette pathologie (Bosch *et al.*, 2002). En 2005, un vaccin conférant une protection contre l'infection par 4 types de papillomavirus, dont les types 16 et 18 qui causent 70% des cancers du col de l'utérus, a été mis sur le marché (Markowitz *et al.*, 2007).

Le virus Epstein-Barr (EBV), virus à ADN de la famille des *Herpesviridae*, s'acquière généralement pendant l'enfance de manière orale et infecte la grande majorité de la population mondiale avec un tropisme préférentiel pour les lymphocytes B (Young and Rickinson, 2004). L'infection par ce virus reste dans la majorité des cas asymptomatique, en phase de latence, ou induit des maladies bénignes comme la mononucléose infectieuse. Cependant, ce virus a été le premier à avoir été directement associé à un cancer humain, le lymphome de Burkitt (Epstein *et al.*, 1964). En effet, l'EBV est responsable de la majorité des lymphomes de Burkitt endémique et de 40% des lymphomes de Hodgkin (Young and Rickinson, 2004).

Le virus T-lymphotropique humain de type 1 (HTLV-1), rétrovirus de la famille des *Deltaretrovirus*, est porté par 10 à 20 millions de la population mondiale après une infection lors de l'allaitement ou lors de rapports sexuels (Bangham, 2000; Proietti *et al.*, 2005). Le

virus est responsable pour 6,6% des patients adultes masculins et 2,1% des patients féminins de l'initiation de leucémies de type T (Arisawa *et al.*, 2000; Matsuoka and Jeang, 2007). L'infection peut également être responsable du développement de plusieurs syndromes inflammatoires chroniques, pour lesquels il n'existe pas de vaccins ou de traitements thérapeutiques satisfaisants (Bangham, 2000).

Enfin, l'herpesvirus associé au sarcome de Kaposi (KSHV ou herpesvirus 8, HHV8), virus à ADN de la famille des *Herpesviridae*, est le dernier virus à avoir été reconnu comme carcinogène de type 1. En raison de la découverte récente de ce virus, sa prévalence exacte n'est pas connue, mais semble inférieure à 5% dans la population générale française alors qu'elle pourrait dépasser 50% en Afrique subsaharienne (Schulz, 2000). Il semblerait que la voie de transmission soit orale pour la population générale et anale pour la population homosexuelle mâle (Schulz, 2000). Ce virus semble pouvoir infecter différents types de cellules incluant les lymphocytes B, T, les cellules endothéliales, les kératinocytes et les cellules médullaires (Carbone and Gloghini, 2008). Le KSHV est l'agent étiologique du sarcome de Kaposi, de certains lymphomes primitifs et de la maladie de Castelman (IARC, 2008).

1.1.2. Parasites et cancers

Des douves du foie *Opisthorchis viverrini* et *Clonorchis sinensis* sont responsables de symptômes tels que des douleurs abdominales, des constipations ou des diarrhées (Khurana *et al.*, 2005; Marcos *et al.*, 2008). La population à risque, consommant du poisson contaminé, est estimée à respectivement 600 et 80 millions de personnes en Asie (Marcos *et al.*, 2008). Ces parasites du foie ont été associés à l'apparition de cholangiocarcinomes. Il existe à l'heure actuelle peu d'informations sur les mécanismes impliqués dans l'initiation et le développement du cancer après infection (1994; IARC, 2008).

Les schistosomiasis, ou infections par des schistosomes, sont considérées comme la deuxième infection parasitaire en importance après le paludisme, avec environ 200 millions de personnes infectées dans le monde (Khurana *et al.*, 2005). Le mode de transmission prépondérant serait un contact avec de l'eau contaminée. On estime que 10% des patients infectés développent des formes pathologiques graves touchant les reins, le foie ou le système nerveux. Deux espèces de schistosome, *Schistosoma haematobium* et *Schistosoma japonicum*, ont été associées à des cancers de la vessie, du foie, de l'estomac et du colon (IARC, 1994; IARC, 2008).

1.1.3. Bactéries et cancer

A l'heure actuelle, une seule espèce bactérienne a été classée comme carcinogène pour l'homme par le CIRC : *H. pylori* pour son implication dans les cancers de l'estomac (IARC, 1994; IARC, 2008). D'autres membres de la famille *Helicobacteraceae* sont également responsables de l'apparition de cancers chez l'animal comme *H. felis* ou *H. mustelae* (Lee, 1999; Nedrud, 1999).

D'autres espèces bactériennes semblent également jouer un rôle dans l'initiation ou le développement tumoral. Ainsi, l'infection par *Campylobacter jejuni* pourrait entraîner, au niveau de l'intestin grêle, l'apparition d'un lymphome B, la maladie des chaînes lourdes alpha (ou *Immunoproliferative Small Intestinal Disease*, IPSID) (Al-Saleem and Al-Mondhiry, 2005). Au niveau colique, l'infection par *Citrobacter rodentium* est responsable de l'apparition d'hyperplasie, précurseur de carcinomes du colon chez la souris génétiquement susceptible (Newman *et al.*, 2001). L'infection par *Salmonella enterica* serovar Typhi, l'agent pathogène de la fièvre typhoïde, favoriserait également les cholangiocarcinomes (Caygill *et al.*, 1995). D'autres espèces bactériennes, telles *Lawsonia intracellularis* ou *Pasteurella multocida* sont capables d'induire des hyperproliférations cellulaires, mais il n'existe pas à l'heure actuelle de données les impliquant dans la carcinogenèse (Lax and Grigoriadis, 2001; Smith and Lawson, 2001).

En conclusion, les infections pourraient être responsables de l'initiation et du développement tumoral selon trois étapes. Tout d'abord, l'infection doit être responsable d'une inflammation chronique. Cette inflammation entraîne des dommages cellulaires, compensés par une augmentation de la prolifération qui pourrait favoriser le développement de néoplasies. Ensuite, les pathogènes peuvent insérer des oncogènes ou modifier les oncogènes cellulaires ce qui pourrait inhiber les gènes suppresseurs de tumeurs ou favoriser la prolifération. Enfin, les pathogènes peuvent agir sur le système immunitaire et entraîner une immunosuppression ce qui augmenterait le risque de développer un cancer.

Dans ce contexte d'autres types de pathogène, comme le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), pourraient favoriser le développement tumoral ou rendre les cellules cancéreuses plus agressives (IARC, 2008).

1.2. Cancers de l'estomac

Comme montré dans la table précédente (**Table 1**), l'infection par *H. pylori* est classée comme carcinogène de type 1 pour son implication dans deux types de cancers de l'estomac :

l'adénocarcinome gastrique et le lymphome gastrique du MALT (Tissu Lymphoïde Associé aux Muqueuses) (IARC, 1994).

Les cancers de l'estomac sont parmi les cancers les plus répandus et les plus mortels au monde avec un taux de rémission à 5 ans inférieur à 25% en France. En ce qui concerne la mortalité par cancer au niveau mondial, le cancer du poumon (1,35 million de nouveaux cas et 1,18 million de morts par an) arrive en première place suivi des cancers de l'estomac (934 000 nouveaux cas et 700 000 morts par an), des cancers du colon/rectum (1 million de nouveaux cas et 530 000 morts par an) et du cancer du sein (1,15 million de nouveaux cas et 410 000 morts par an) (Parkin *et al.*, 2005).

Plus de 90% des cancers de l'estomac correspondent à des adénocarcinomes, un cancer des cellules épithéliales au niveau des glandes de l'estomac (Crew and Neugut, 2006). Le deuxième type de cancers pouvant être retrouvés au niveau de l'estomac est le lymphome gastrique du MALT, un lymphome des cellules B.

1.2.1. Adénocarcinome gastrique

- Généralités

La distribution géographique de l'adénocarcinome gastrique est très hétérogène. Plus des deux tiers des nouveaux cas sont trouvés dans les pays développés dont 42% en Chine seule. En revanche, l'incidence est faible (<10 pour 100 000) en Asie du Sud, Afrique de l'Est et du Nord, Amérique du Nord et Océanie (**Figure 1**) (IARC, 2008; Parkin *et al.*, 2005).

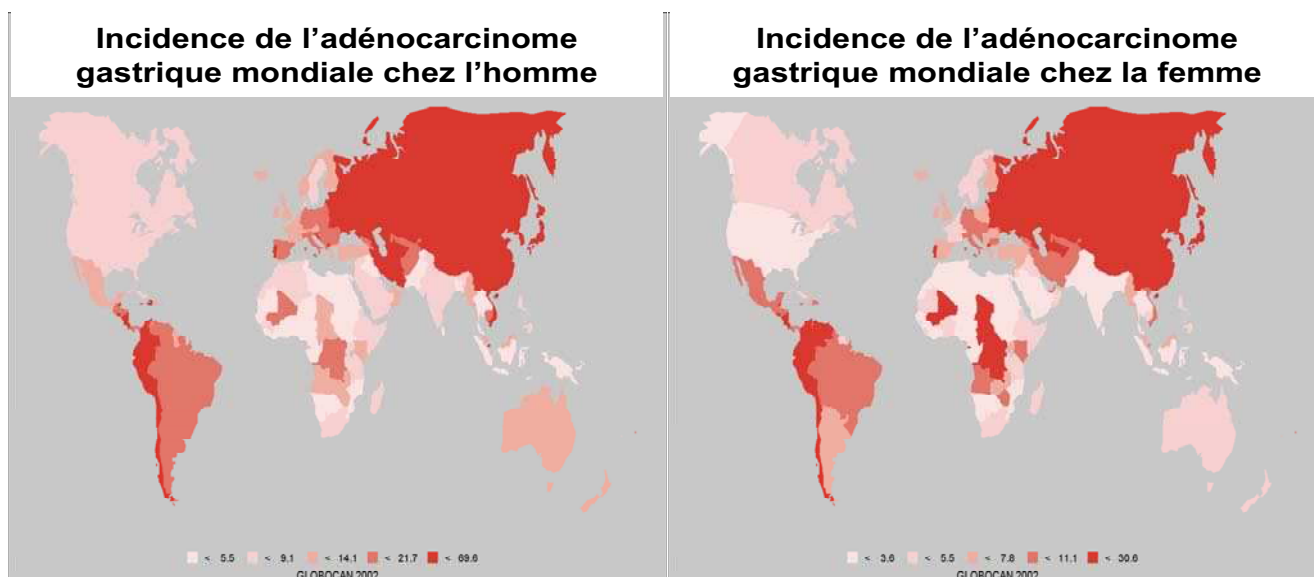


Figure 1. Répartition mondiale de l'incidence des cancers gastriques. Les incidences mondiales des cancers de l'estomac sont représentées en fonction du sexe tous âges confondus. D'après le *World Cancer Report*, 2008 (IARC, 2008).

Ainsi, l'incidence ne peut être corrélée à une zone géographique claire. Par exemple, l'Inde a une incidence faible comparée à celle des pays asiatiques comme la Chine, le Japon ou l'Indonésie (Forman and Burley, 2006; IARC, 2008). De même, à l'intérieur d'un pays, il peut exister des disparités essentiellement dépendantes de l'origine ethnique. Ainsi, nous pouvons prendre l'exemple des migrants coréens vivant aux Etats-Unis qui représentent un sous groupe à haut risque comparé à la population générale à faible risque. Après quelques générations et la mixité des différentes ethnies, le risque de développer un cancer de l'estomac pour les descendants des migrants coréens atteint le niveau de la population générale du pays d'accueil (Crew and Neugut, 2006; McMichael *et al.*, 1980).

Les cancers gastriques présentent une incidence supérieure chez l'homme par rapport à la femme avec un ratio d'environ 2:1 (**Figure 1**) (Parkin *et al.*, 2005). L'incidence augmente avec l'âge avec un pic entre 50 et 70 ans, faisant de ce cancer un cancer de la personne âgée.

L'incidence des adénocarcinomes gastriques diminue depuis quelques décennies en valeur relative, mais le nombre absolu de cas reste stable, essentiellement dû au vieillissement des populations (Munoz and Franceschi, 1997). Quoiqu'il en soit, les cancers gastriques restent encore des maladies de sombre pronostic dans la majorité des pays à l'exception du Japon. En effet, en Europe la survie à 5 ans est de l'ordre de 25%, alors qu'au Japon elle est estimée supérieure à 50%. Cette différence de pronostic serait due à l'introduction, dans les années 1960 au Japon, d'un dépistage généralisé des patients par endoscopie permettant une détection plus précoce de la pathologie (Forman and Burley, 2006; Lochhead and El-Omar, 2008; Parkin *et al.*, 2005).

- Caractérisation pathologique

Du point de vue anatomopathologique, les adénocarcinomes gastriques sont divisés en deux grands groupes en fonction de leur localisation. Ceux situés au niveau de la jonction avec l'œsophage, ou cardia, sont appelés proximaux ; par opposition aux cancers distaux, situés au niveau du corps ou de l'antrum gastrique (**Figure 2**). L'infection par *H. pylori* a été montrée associée uniquement avec les cancers distaux.

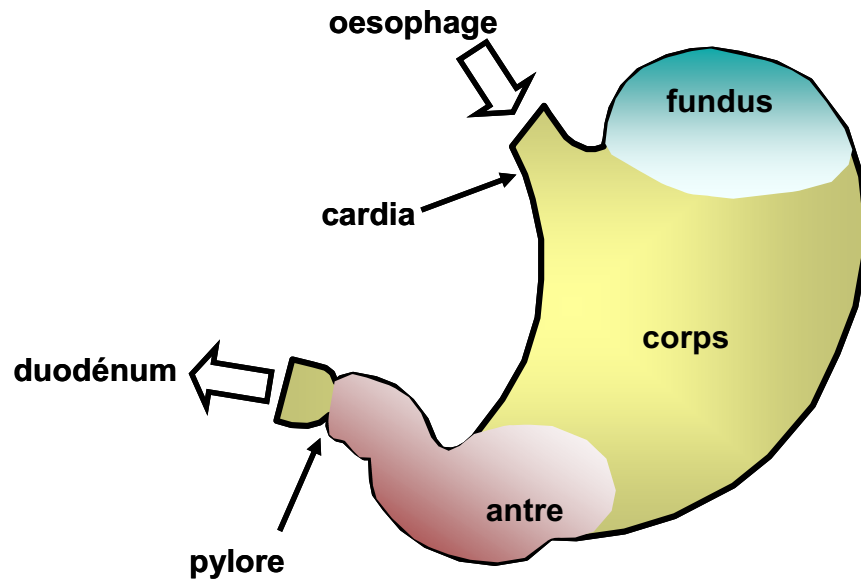


Figure 2. Schéma de l'estomac. Le cardia, situé au sommet de l'estomac permet la jonction avec l'oesophage, alors que le pylore, situé à la partie basse permet la jonction avec le duodénum. L'estomac en lui-même est composé de 3 parties : le fundus, le corps et l'antra dont les muqueuses secrètent toutes du mucus afin de protéger l'épithélium de l'acidité. Le fundus et le corps sont responsables de la sécrétion d'acide chlorhydrique et des enzymes nécessaires à la digestion. L'antra ne sécrète ni acide ni enzymes mais est le lieu de la décomposition alimentaire. En France, le corps de l'estomac est le plus souvent appelé fundus.

D'un point de vue histologique, la classification de Laurén propose de séparer les adénocarcinomes gastriques distaux en deux sous groupes majeurs : le type intestinal et le type diffus (Lauren, 1965).

Le type intestinal apparaît après une gastrite chronique atrophique évoluant lentement sur de nombreuses décennies, ce qui explique l'âge élevé d'apparition de ce cancer, en moyenne entre 70 et 80 ans (Gore, 1997). L'évolution histopathologique est bien connue et suit des étapes bien définies. Correa a proposé une voie expliquant cette évolution dénommée la « Cascade de Correa » (Correa *et al.*, 1975; Peek and Blaser, 2002). Les différentes étapes sont représentées dans la figure suivante issue d'un modèle murin de carcinome gastrique de type intestinal après infection par *H. pylori* (Figure 3). Brièvement, la pathologie commence par une gastrite chronique, inflammation de la muqueuse gastrique, passant d'un stade superficiel à un stade atrophique caractérisé par une perte variable des glandes gastriques et un recrutement de cellules inflammatoires dans les zones glandulaires. Ce stade est associé à la perte des cellules pariétales gastriques, responsables de la production d'acide chlorhydrique, et donc d'une perte des fonctions sécrétoires gastriques (Dixon *et al.*, 1996). Cette phase est donc liée à une hypochlorhydrie, favorable au développement tumoral. Cette gastrite mène à un état de métaplasie dite intestinale où les cellules épithéliales de la muqueuse gastrique acquièrent un phénotype de cellules épithéliales intestinales. Cette

métaplasie peut évoluer vers une dysplasie, étape correspondant à l'apparition d'une néoplasie. Cette dysplasie précède l'apparition de l'adénocarcinome correspondant à une tumeur maligne invasive (Correa *et al.*, 1975; Peek and Blaser, 2002; Takaishi *et al.*, 2008). Les personnes présentant une gastrite atrophique du corps de l'estomac ont un risque de développer un cancer 90 fois supérieur aux patients présentant une muqueuse normale (Sipponen and Marshall, 2000).

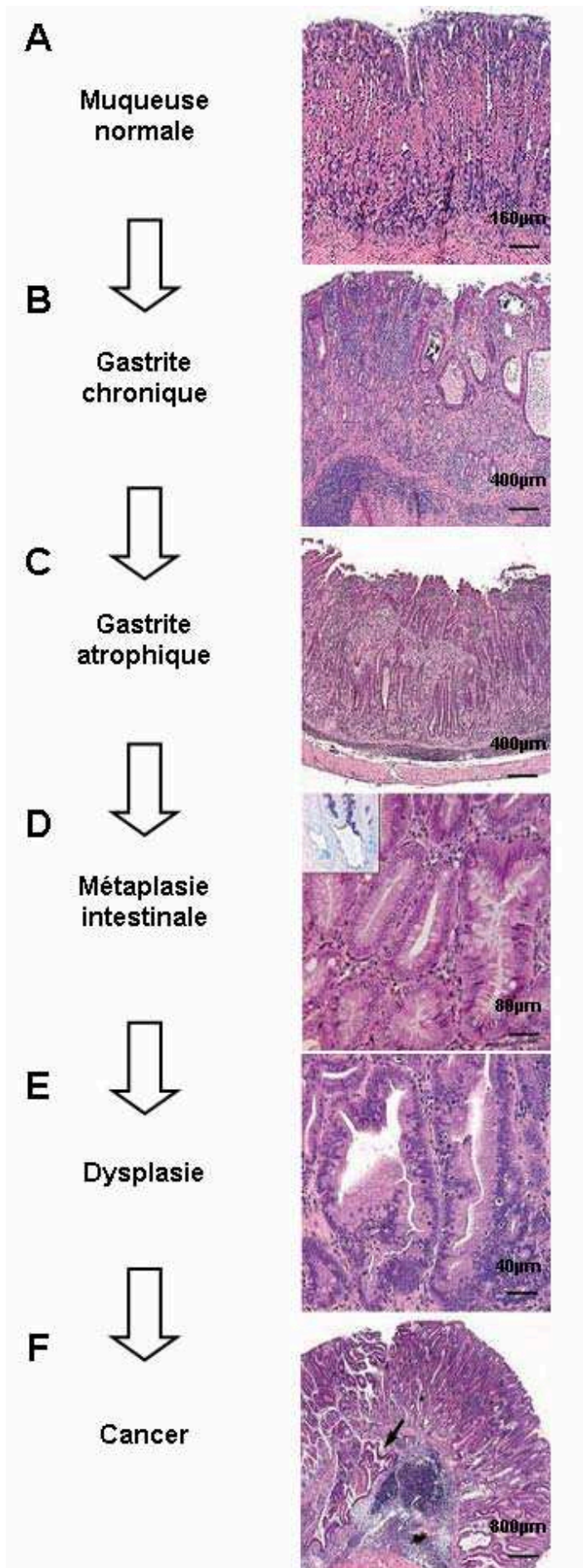


Figure 3. Progression histologique de l'adénocarcinome gastrique de type intestinal dû à *Helicobacter pylori* dans un modèle murin. **A/** Chez un sujet non infecté, la muqueuse gastrique comporte des glandes normales. **B/** L'infection par *H. pylori* est responsable d'une gastrite chronique caractérisée par des dilatations glandulaires. **C/** Cette gastrite peut évoluer vers un stade atrophique avec perte des cellules pariétales et perte variable des glandes gastriques. **D/** La métaplasie intestinale correspond à l'acquisition d'un phénotype intestinal avec apparition de cellules caliciformes et d'un mucus de nature différente (l'encart représente une coloration du mucus de type gastrique en rouge et du mucus de type intestinal en bleu). **E/** La métaplasie peut évoluer vers un stade dysplasique caractérisé par des glandes de formes et de tailles irrégulières qui peuvent communiquer. La morphologie cellulaire est également modifiée. **F/** Enfin, le stade cancéreux correspond à des néoplasies intraépithéliales et des invasions tumorales à l'intérieur du mucus (flèche). Détails dans le texte. D'après Fox et Wang, J Clin Invest , 2007 (Fox and Wang, 2007).

Le type diffus affecte quant à lui des personnes plus jeunes. Cet adénocarcinome est caractérisé par des cellules néoplasiques individuelles dites « en bague à chatons » qui ne forment pas de glandes et qui ne sont pas associées à une métaplasie intestinale (Sipponen and Marshall, 2000). Les différentes étapes caractérisant l'apparition de ce cancer sont donc nettement moins bien définies.

- Anomalies génétiques associées

Certains types de cancers gastriques diffus sont retrouvés au sein d'une même famille sur plusieurs générations suggérant une transmission héréditaire de cette pathologie (Blair *et al.*, 2006). Ainsi, des études sur des familles Maori ont permis de mettre en évidence la présence d'une mutation germinale au niveau du gène *cdh1* associée à ce cancer (Guilford *et al.*, 1998). Ce gène code pour l'expression de la protéine E-cadhérine, impliquée dans les jonctions intercellulaires en étant reliée aux microfilaments d'actine via le complexe des caténines (Wang *et al.*, 2004). Typiquement, les cadhérines possèdent une région extracellulaire permettant la liaison avec les cadhérines des cellules avoisinantes et une région cytoplasmique qui interagit avec de nombreuses molécules régissant divers processus intracellulaires. Les cadhérines peuvent interagir avec différentes caténines (α/β -caténines ou p120) mais également avec des tyrosines kinases ou phosphatases et des régulateurs du cytosquelette (Jeanes *et al.*, 2008). Les mécanismes responsables de modifications d'expression de la E-cadhérine, cadhérine spécifique des cellules épithéliales, et impliqués dans le développement tumoral sont cependant mal connus. Le rôle de la β -caténine semble primordial. Les taux de β -caténine sont normalement régulés par deux mécanismes l'un impliquant la liaison avec la E-cadhérine et l'autre impliquant un complexe de séquestration (GSK-3 β , APC, axine) sous la dépendance de la voie Wnt. Une activation de la voie Wnt permet une libération de la β -caténine qui peut alors jouer son rôle de facteur de transcription. Une hypothèse de la mécanistique tumorale serait que la diminution du taux de E-cadhérine permette une augmentation du taux de β -caténine cytoplasmique et donc une potentialisation de la voie de signalisation Wnt. A l'inverse, un taux d'expression élevé de E-cadhérine pourrait inhiber la voie Wnt en séquestrant son effecteur la β -caténine (Christofori and Semb, 1999; Jeanes *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2004). La voie de signalisation Wnt fait partie des mécanismes fondamentaux de régulation de la prolifération et de la polarité cellulaire lors du développement embryonnaire ou de l'homéostasie tissulaire en activant la transcription de nombreux gènes impliqués dans le cycle cellulaire (Logan and Nusse, 2004). De manière très

intéressante, la voie de signalisation Wnt semble également contrôler l'évolution et le potentiel de différenciation des cellules souches mésenchymateuses (Ling *et al.*, 2009).

D'autre part, la E-cadhérine pourrait inhiber ou moduler la voie de signalisation du récepteur à l'EGF impliqué dans la prolifération, l'invasion et les métastases (Bublil and Yarden, 2007; Jeanes *et al.*, 2008). Ainsi, dans des conditions physiologiques, les cellules répondent à l'effet mitogénique de l'EGF jusqu'à ce qu'elles atteignent la confluence. En revanche, l'inhibition des fonctions de la E-cadhérine fait perdre ce contrôle et les cellules peuvent continuer de se multiplier (Qian *et al.*, 2004).

Enfin, la E-cadhérine peut également interagir avec les petites GTPases de la famille Rho (RhoA, Cdc42 et Rac) qui régulent la morphologie, la croissance et la polarité cellulaire (Tapon and Hall, 1997). En conclusion, des mutations de la E-cadhérine pourraient être responsables d'une perte de la polarité et des jonctions cellulaires favorisant une croissance et une migration non contrôlées. Les mutations de la E-cadhérine sont également retrouvées dans d'autres types de cancers comme les carcinomes colorectaux, les adénocarcinomes de l'œsophage ou les cancers pancréatiques (Natalwala *et al.*, 2008).

Ces cancers familiaux, induits par la mutation de *cdh1*, représenteraient de 10 à 15% des cancers gastriques diffus (Barber *et al.*, 2006). A l'heure actuelle, des mutations spécifiques de l'adénocarcinome de type intestinal n'ont pas été identifiées. Cependant, plusieurs mutations peuvent être régulièrement retrouvées. Ces mutations peuvent toucher les voies d'adhérence cellulaire, avec une perte d'hétérozygotie du gène *dcc* (Deleted in Colon Carcinoma), les voies du cycle cellulaire, avec des altérations de p16, p53, APC (adenomatous polyposis coli) et de la cycline E ou les voies d'induction de l'apoptose, avec des altérations de BCL2 et de SC-1 (Moss, 1998; Nardone, 2003; Tahara, 1995).

- Facteurs de risque

Le facteur étiologique principal des adénocarcinomes gastriques distaux reste l'infection par *H. pylori* et les facteurs bactériens seront discutés dans les paragraphes suivants. Cependant, il a été montré que l'environnement ainsi que la susceptibilité de l'hôte peuvent rentrer en jeu.

Ainsi, un régime alimentaire trop salé ou avec un apport trop pauvre en fruits et légumes frais peut augmenter le risque de développer un adénocarcinome gastrique (Liu and Russell, 2008; Plummer *et al.*, 2007). Dans les modèles animaux, l'ingestion de sel est connue pour entraîner des atrophies gastriques et augmenter la carcinogène (Takahashi and Hasegawa, 1985; Tatematsu *et al.*, 1975). Une relation dose dépendante entre la consommation de

cigarettes et d'alcool et l'adénocarcinome a aussi été démontrée (Franceschi and La Vecchia, 1994; Gonzalez *et al.*, 2003; Koizumi *et al.*, 2004). Enfin, l'obésité peut jouer un rôle important dans l'apparition des cancers proximaux (Calle *et al.*, 2003; Chow *et al.*, 1998; Vaughan *et al.*, 1995).

Au niveau génétique, certains polymorphismes ont été montrés associés avec un risque plus élevé de développer un adénocarcinome gastrique distal. Ces polymorphismes concernent essentiellement des gènes impliqués dans la réponse inflammatoire et immunitaire. Ainsi, certains allèles de l'interleukine 1 β ou de son récepteur, du Tumor Necrosis Factor α (TNF α) ou de l'interleukine 10 peuvent influencer le développement de ce type de cancers (El-Omar, 2001; El-Omar *et al.*, 2000; El-Omar *et al.*, 2001; El-Omar *et al.*, 2003).

1.2.2. Lymphome gastrique du MALT

- Généralités

Les lymphomes du MALT correspondent à la majorité des lymphomes extra ganglionnaires retrouvés dans des organes normalement dépourvus de tissus lymphoïdes comme l'estomac, les glandes salivaires, les poumons ou la thyroïde (Isaacson and Wright, 1983).

Le lymphome gastrique du MALT est un lymphome de pathogénie et d'évolution singulières. Il évolue très progressivement et reste longtemps localisé dans l'estomac.

Les données épidémiologiques concernant ce cancer sont disparates en raison de sa rareté, de la difficulté diagnostique de cette pathologie et de la variabilité du suivi médical selon les pays. En Allemagne, une étude réalisée sur 3,5 millions d'habitants sur une période de 3 ans a permis d'estimer l'incidence à 0,75 pour 100 000 avec une moyenne d'âge de 62,1 ans et un sexe ratio légèrement en défaveur des hommes (Ullrich *et al.*, 2002). L'incidence semble être plus élevée dans certains pays, atteignant 6,3 pour 100 000 chez les hommes en Tunisie (Ben-Khelifa, 2002).

- Caractérisation pathologique

L'estomac est normalement dépourvu de tissu lymphoïde. Un infiltrat lymphoïde peut cependant apparaître lors d'une gastrite aïgue ou chronique. Dans certains cas, cette inflammation s'accompagne de l'apparition de follicules lymphoïdes (tissus lymphoïdes organisés) à partir desquels émerge le lymphome du MALT. D'un point de vue histologique, la prolifération lymphomateuse a été classée initialement en fonction de la taille des cellules.

Ainsi l'on distingue les lymphomes à petites cellules qui correspondent à des lymphome dits de bas degré de malignité et des lymphomes à grandes cellules qui correspondent aux lymphomes dits de haut degré de malignité, beaucoup plus agressifs (Ruskone-Fourmestreaux and Rambaud, 2001). Un diagnostic précoce de lymphome gastrique est difficile car il ne présente pas de signes d'appel caractéristiques. En effet, les symptômes se résument le plus souvent à des douleurs épigastriques pouvant évoquer une maladie ulcéreuse, ces douleurs pouvant se manifester trois ans avant l'apparition du lymphome. Il peut aussi être découvert à l'occasion d'une perforation gastrique ou d'hémorragies (Ruskone-Fourmestreaux *et al.*, 1993).

- Anomalies chromosomiques associées

La prolifération crée des conditions favorables à l'apparition d'une instabilité génétique dans les cellules B conduisant à l'apparition de mutations. Les anomalies cytogénétiques les plus souvent retrouvées dans le lymphome gastrique du MALT de faible degré de malignité sont la trisomie 3 (50 à 60%) et des translocations entraînant des modifications dans l'activation du facteur de transcription nucléaire κ B (NF- κ B).

La translocation t(11;18)(q21;q21) est retrouvée dans la moitié des lymphomes du MALT et est spécialement associée à cette pathologie (Dierlamm *et al.*, 1999). Cette translocation fait intervenir deux gènes, *mlt1* (MALT lymphoma associated translocation-1) une para-caspase humaine et un inhibiteur d'apoptose (*ap12*) dont l'une des fonctions serait d'inhiber les caspases. Cette translocation produirait une fusion *API2-MLT1* qui aurait la capacité d'activer NF- κ B d'où la protection des cellules de l'apoptose (Uren *et al.*, 2000).

La translocation t(1;14)(p22;q32) est retrouvée dans environ 5% des lymphomes gastriques. Elle place le gène de la protéine BCL10 (B Cell Lymphoma 10) sous le contrôle du promoteur d'un gène des chaînes lourdes des immunoglobulines. Cette protéine possède un domaine de recrutement des caspases CARD et peut donc jouer un rôle dans la régulation de l'apoptose. Dans les cellules lymphomateuses, le gène *BCL10* est donc surexprimé, mais il est aussi muté ce qui conduit à la synthèse d'une protéine tronquée capable d'activer NF- κ B (Zhang *et al.*, 1999).

Les gènes induits par NF- κ B et favorisant la survie cellulaire ne sont pas encore clairement identifiés. Ils incluent un membre de la famille BCL2 (B Cell Lymphoma 2) aux propriétés anti-apoptotiques, des inhibiteurs de caspases et les facteurs TRAF1 et TRAF2, (membres de la famille des Facteurs Associés au Récepteur du TNF) impliqués dans

l'inflammation, la réponse aux pathogènes et l'apoptose (Chu *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1998; Zong *et al.*, 1999).

- Facteurs de risque

Le facteur de risque le plus important dans le développement d'un lymphome correspond à l'infection bactérienne par *H. pylori* comme cela sera détaillé dans le paragraphe suivant.

Cependant, des études ont montré un rôle potentiel de facteurs environnementaux comme l'exposition aux solvants et pesticides (Fagioli *et al.*, 1994).

Quelques travaux ont également montré que certains polymorphismes pouvaient représenter un facteur de risque de développer un lymphome gastrique du MALT. Ainsi, certaines mutations des gènes codant CD14, l'antigène 4 des lymphocytes T cytotoxiques (CTLA4), l'Interleukine 10 et le TNF pourraient favoriser l'émergence de lymphome (Cheng *et al.*, 2006; Hellmig *et al.*, 2008; Ture-Ozdemir *et al.*, 2008).

1.2.3. Carcinogénèse gastrique et infection par *Helicobacter pylori*

De nombreuses études de cohortes et cas-témoins ont été publiées montrant le lien entre l'infection par *H. pylori* et l'adénocarcinome gastrique (Eslick, 2006; Lochhead and El-Omar, 2007).

Cependant, pour montrer le lien de causalité entre l'infection par *H. pylori* et les cancers gastriques, il est intéressant d'utiliser les critères de Bradford Hill, initialement utilisés en 1965 pour montrer le lien de causalité entre le tabagisme et le cancer du poumon (Hill, 1965). Il s'agit en particulier 1/ de montrer une association et la relation temporelle, 2/ de mettre en évidence une plausibilité biologique, c'est-à-dire les mécanismes physiopathologiques et 3/ de juger des effets d'une intervention.

- Association et relation temporelle

Les premières études d'association entre l'infection par *H. pylori* et l'adénocarcinome gastrique correspondaient à des études dites écologiques déterminant les corrélations géographiques entre la prévalence de l'infection et la mortalité par cancer gastrique (Forman *et al.*, 1990; *The EUROGAST Study Group*, 1993).

Des études cas-témoins ont permis de montrer que l'infection par *H. pylori* était significativement associée à la présence d'un cancer gastrique (Hansson *et al.*, 1993; Sipponen *et al.*, 1992).

L'argument épidémiologique le plus important provient d'une analyse sur 12 études prospectives dans lesquelles le sérum des patients avait été congelé permettant de

diagnostiquer une infection par *H. pylori* des années avant le diagnostic de cancers (*Helicobacter and Cancer Collaborative Group*, 2001). L'ensemble de ces données, correspondant à 1228 patients présentant un cancer gastrique a abouti à la conclusion que l'infection par *H. pylori* entraîne une augmentation du risque de développer un adénocarcinome distal de 5,9 fois supérieur par rapport aux patients non infectés. Ces résultats montrent que la part attribuable à l'infection est de 63% des cancers gastriques distaux (Parkin, 2006). En revanche, aucune association n'a été montrée entre l'infection et le développement d'adénocarcinomes proximaux. Des résultats similaires ont été obtenus en étudiant l'implication de la bactérie dans l'apparition du lymphome gastrique du MALT (Parsonnet *et al.*, 1994). Ces études montrent clairement que l'infection par *H. pylori*, le plus souvent acquise pendant la petite enfance, précède l'apparition de cancers.

Enfin, il est intéressant de noter qu'il existe des modèles animaux permettant d'étudier l'apparition de cancers après infection par *Helicobacter*. Ainsi, l'infection de souris C57BL/6 par *Helicobacter felis* ou de gerbilles de Mongolie par *H. pylori* induit l'apparition d'adénocarcinomes gastriques (Fox *et al.*, 2002; Watanabe *et al.*, 1998). De même, les infections de souris BALB/c par *H. felis* ou de furets par *H. mustelae* sont des modèles d'étude de l'apparition d'un lymphome gastrique du MALT (Enno *et al.*, 1998; Erdman *et al.*, 1997).

- Mécanismes physiopathologiques

A l'heure actuelle, les mécanismes physiopathologiques conduisant à l'initiation et au développement de l'adénocarcinome gastrique ou du lymphome gastrique du MALT sont encore mal connus. Cependant, plusieurs hypothèses concernant le rôle de l'infection par *H. pylori* ont été proposées.

En premier lieu, l'infection par *H. pylori* est responsable d'une inflammation chronique générant des radicaux oxygénés et azotés qui pourraient conduire à des dommages de l'ADN (Baik *et al.*, 1996; Mannick *et al.*, 1996).

D'autre part, certaines souches de *H. pylori* possèdent un îlot de pathogénicité codant un système de sécrétion de type IV (TSS4) capable d'injecter des molécules dans les cellules de l'hôte et perturber les voies de signalisation cellulaire (Backert and Selbach, 2008; Viala *et al.*, 2004).

Concernant le lymphome gastrique du MALT, il a été montré que l'infection par certaines souches de *H. pylori* entraîne une prolifération lymphoïde B par l'intermédiaire de cytokines

libérées par des lymphocytes T (D'Elis *et al.*, 1999; Hussell *et al.*, 1993; Hussell *et al.*, 1996).

Nous avons également montré que toutes les souches de *H. pylori* sont capables d'inhiber la prolifération des lymphocytes T, ce qui pourrait favoriser l'apparition de cellules cancéreuses en inhibant la réponse immunitaire (Ferrand *et al.*, 2008). Cet effet passerait par la γ -glutamyl transpeptidase bactérienne (Schmees *et al.*, 2007).

Les différents effecteurs de la bactérie impliqués dans le développement tumoral seront détaillés dans le paragraphe facteurs de virulence.

En conclusion, l'apparition du cancer gastrique semble être une conséquence de lésions cellulaires liées à l'infection. L'infection par *H. pylori* et l'inflammation chronique en résultant seraient responsables d'une apoptose des cellules épithéliales suivie d'une prolifération compensatrice et d'une diminution des défenses immunitaires locales. Cette hyperprolifération favoriserait l'apparition d'anomalies génétiques conduisant à la transformation cellulaire et au développement de cancer.

- Effet d'une éradication thérapeutique

Evaluer l'effet de l'éradication de *H. pylori* sur l'incidence des cancers gastriques demande le suivi de cohortes de grande ampleur sur de nombreuses années, ce qui explique que peu de données soient disponibles. Une étude japonaise a montré qu'aucun des 253 patients pour lequel *H. pylori* avait été éradiqué n'avait développé de cancer gastrique alors que 36 cas étaient apparus chez 993 patients non traités (Uemura *et al.*, 2001). D'autres études de cohortes ont par la suite confirmé ces résultats (Ogura *et al.*, 2008; Wong *et al.*, 2004). Cependant, il existerait un point de non retour, correspondant à un stade de lésions précancéreuses avancées, où l'éradication de *H. pylori* n'aurait plus d'effet sur le développement tumoral (Wong *et al.*, 2004).

Les effets de l'éradication de *H. pylori* sont beaucoup plus impressionnants dans le contexte du lymphome gastrique du MALT. En effet, une étude pilote incluant 6 patients a montré qu'il était possible pour 5 de ces 6 patients d'obtenir une régression à 22 mois du lymphome de faible degré de malignité après éradication de *H. pylori* (Wotherspoon *et al.*, 1993). Plusieurs études ont confirmé ces résultats et il est aujourd'hui estimé que 70 à 80% des lymphomes de faible degré de malignité régressent après éradication (Bayerdorffer *et al.*, 1995). Au stade de haut degré de malignité les chances de guérison par éradication semblent beaucoup plus aléatoires, sans doute du fait de l'accumulation d'anomalies génétiques cellulaires irréversibles (Ng *et al.*, 2000).

Pour la première fois, une éradication bactérienne pouvait guérir d'un cancer !

1.3. *Helicobacter pylori*

1.3.1. Généralités

En 1906, un médecin allemand, Walter Krienitz, a observé pour la première fois des bactéries spiralées dans l'estomac d'un patient atteint d'un cancer (Ricketts *et al.*, 2006). Durant le XXI^{ème} siècle, de rares publications ont mentionné ces travaux jusqu'à ce que Robin Warren, un pathologiste australien, suspecte une association entre des bactéries spiralées de l'estomac et des lésions gastriques à partir de la moitié des biopsies qu'il prélevait. En effet, les inflammations de la muqueuse gastrique (gastrites) apparaissaient toujours à proximité des zones infectées par la bactérie. Intéressé par ces résultats, Barry Marshall, un étudiant de Robin Warren, a été le premier à réussir à cultiver cette bactérie en 1982 (Marshall and Warren, 1984; Megraud, 2005). De par ses similarités avec *Campylobacter jejuni*, cet organisme a tout d'abord été dénommé *Campylobacter pylori*. Cependant, différentes études portant sur les caractères génétiques (séquences des ARNr 16S, pourcentage de G+C) et phénotypiques (morphologie, structure, composition en acides gras, activités enzymatiques) ont permis d'individualiser cette bactérie dans un nouveau genre, et de la renommer *Helicobacter pylori* (Goodwin *et al.*, 1989).

La classification actuelle de l'espèce *H. pylori* montre une appartenance au règne des Eubactéries, à l'embranchement des *Proteobacteria*, à la classe des *Epsilonproteobacteria*, à l'ordre des *Campylobacterales*, à la famille des *Helicobacteraceae* et enfin au genre *Helicobacter* (Garrity *et al.*, 2005). La méthode de référence pour la détection et l'identification des espèces du genre *Helicobacter* est apporté par des techniques de biologie moléculaire en particulier par l'étude de la séquence de l'ARN 16S (Okoli *et al.*, 2009).

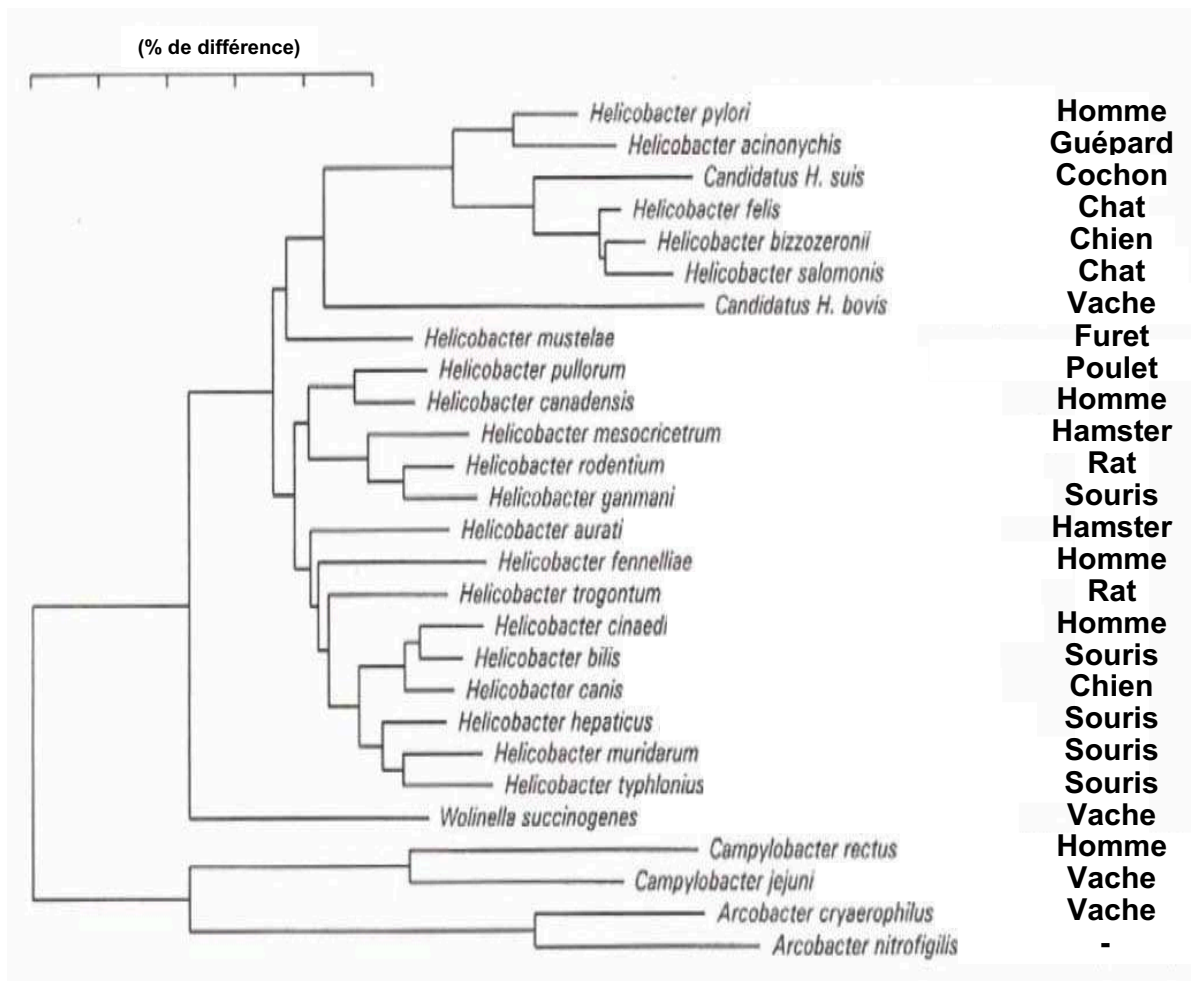


Figure 4. Relations phylogénétiques de quelques espèces de la famille des *Helicobacteraceae* et hôtes naturels. Le dendrogramme a été réalisé en fonction des pourcentages de différence du gène de l'ARN 16S. Les espèces animales infectées par ces différentes bactéries sont indiquées dans la partie droite de la figure. D'après Garrity *et al.*, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2005 (Garrity *et al.*, 2005).

Aujourd'hui, au moins 31 membres de ce genre autres que *H. pylori* ont été décrits (Haesebrouck *et al.*, 2009). En fonction du tropisme de ces bactéries, les espèces du genre *Helicobacter* peuvent être classées en deux groupes : les espèces gastriques et les espèces entérohépatiques (enterohepatic *Helicobacter* species, EHS). Toutes les espèces gastriques possèdent une uréase à l'inverse de la plupart des EHS (Pot *et al.*, 2007). Les espèces gastriques, comme *H. heilmannii*, semblent posséder un pouvoir pathogène et être responsables de gastrites, d'ulcérations gastriques, de carcinomes ou de lymphomes (Boyanova *et al.*, 2007; Nishikawa *et al.*, 2007; Qualia *et al.*, 2007). Plusieurs espèces d'EHS ont été associées à un spectre pathologique large allant de l'inflammation au cancer du tractus digestif et du système hépatobiliaire et à un risque augmenté de calculs biliaires (Abu Al-Soud *et al.*, 2008; Bohr *et al.*, 2007; Pandey, 2007; Vivekanandan and Torbenson, 2008).

Les différentes espèces du genre *Helicobacter* peuvent être retrouvées chez l'homme ou chez différentes espèces animales comme le cochon, le chat, le chien, le lapin, le furet, le hamster, les ruminants, le cheval ou les primates (Haesebrouck *et al.*, 2009) (**Figure 4**).

Ex vivo, la croissance de *H. pylori* est difficile et nécessite des milieux riches additionnés de sang, de sérum ou de suppléments d'enrichissement (Owen, 1995). La bactérie est sensible à la composition gazeuse de l'environnement et ne pousse que dans une atmosphère microaérobie, typiquement composée de 5% d'oxygène, 5% de dioxyde de carbone, 2% d'hydrogène et 88% d'azote, à une température comprise entre 33 et 40°C (Megraud *et al.*, 1985; Owen, 1995).

Morphologiquement, *H. pylori* est un bacille de forme hélicoïdale de 0,5 à 0,9 µm de large et de 2 à 4 µm de long, possédant de 4 à 6 flagelles unipolaires. La bactérie ne forme pas de spores mais peut adopter une forme coccoïde lorsqu'elle atteint la phase du plateau de croissance.

Biochimiquement, *H. pylori* peut être caractérisé par la présence de différentes enzymes telles que l'uréase, la catalase, la cytochrome oxydase, les phosphatases alcalines et acides et la γ -glutamyl transpeptidase ainsi que l'absence de capacité à fermenter les sucres et à hydrolyser l'hippurate (Megraud *et al.*, 1985; Owen, 1995).

Le traitement d'éradication de l'infection par *H. pylori* de première intention passe par une trithérapie incluant deux antibiotiques, l'amoxicilline et la clarithromycine ou le métronidazole, et un inhibiteur de la pompe à proton permettant de contrôler le pH gastrique (Bazzoli *et al.*, 1993; Lamouliatte *et al.*, 1993). Cependant, la résistance à la clarithromycine peut excéder 20%, suggérant un besoin de remplacer cet antibiotique par du métronidazole (Malfertheiner *et al.*, 2007).

1.3.2. Epidémiologie

Le seul réservoir significatif de *H. pylori* est l'estomac humain, même si la bactérie peut être retrouvée chez le chat domestique et quelques primates (Cave, 1997). Cependant, il apparaît peu probable que ces réservoirs secondaires jouent un rôle dans l'infection humaine (Bode *et al.*, 1998; Dubois *et al.*, 1996; Webb *et al.*, 1996). En revanche, la bactérie peut survivre plusieurs jours voire semaines dans un milieu aquatique (Klein *et al.*, 1991; Shahamat *et al.*, 1993). Ainsi, il apparaît que le mode de contamination privilégié de la bactérie dans les pays en voie de développement soit une contamination fécale-orale. En revanche, dans les pays développés et grâce à des niveaux d'hygiène supérieurs, le mode de transmission prépondérant serait une contamination oro-orale ou gastro-orale. Ainsi, il

apparaît que le niveau socio-économique constitue le déterminant principal de la prévalence de l'infection, allant de 10% dans certains pays industrialisés à plus de 80% dans les pays en voie de développement (Kivi and Tindberg, 2006; Megraud *et al.*, 1989). Ces différents modes de transmission mènent tous à une contamination intrafamiliale (Lehours and Yilmaz, 2007). L'une des conséquences les plus inattendues de cette transmission intrafamiliale est la possibilité de retracer les grandes migrations humaines à partir de l'Afrique de l'Est en étudiant la diversité génétique des souches bactériennes (Falush *et al.*, 2003). Ainsi, ces résultats montrent la co-évolution de la bactérie avec l'Homme depuis plus de 58 000 ans (Linz *et al.*, 2007). L'infection se produirait essentiellement lors de la petite enfance, l'incidence actuelle de l'acquisition chez l'adulte étant inférieure à 0,5% par an (Banatvala *et al.*, 1993; Megraud and Broutet, 2000).

1.3.3. Rôle dans les pathologies gastriques

En dehors de son rôle carcinogène, *H. pylori* est également responsable de l'apparition de pathologies gastriques non malignes.

L'infection par *H. pylori* est responsable chez tous les sujets infectés du développement d'une gastrite chronique persistante aboutissant à une diminution du nombre de glandes gastriques (De Vries and Kuipers, 2007). Cependant la gastrite peut également évoluer vers des formes pathologiques non malignes comme l'ulcère gastrique ou duodéal, bien que ce dernier porte à controverse (Hobsley *et al.*, 2008). Il est aujourd'hui estimé que 10 à 15% des patients infectés par *H. pylori* développent un ulcère gastrique ou duodéal au cours de leur vie. Le mécanisme pathologique supposé passerait par une augmentation de l'inflammation gastrique, avec une augmentation de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires comme l'interleukine 8, l'interleukine 1 β et le Tumor Necrosis Factor α (TNF α) (Konturek *et al.*, 2006). Concernant l'ulcère duodéal, l'infection serait responsable d'une augmentation de l'acidité gastrique, due à une modification de la synthèse hormonale de somatostatine. L'hyperchlorhydrie gastrique conduirait à une augmentation de l'acidité au niveau du duodénum qui produirait alors une métaplasie antrale protectrice. Alors qu'en conditions physiologiques *H. pylori* ne peut infecter le duodénum, cette métaplasie permet la colonisation par *H. pylori*, résultant en une inflammation locale qui fragilise la muqueuse et prédispose à l'apparition d'un ulcère duodéal (Atherton, 2006). L'infection pourrait également jouer un rôle dans l'apparition de polypes gastriques (Furuta and Delchier, 2009).

D'autre part, il semblerait que l'infection par *H. pylori* joue un rôle protecteur contre le reflux gastro-oesophagien, la prévalence de la maladie étant plus faible chez les patients

infectés. Cependant les résultats restent contradictoires, et l'hypothèse que l'éradication de la bactérie favorise ce type de reflux est controversée (Furuta and Delchier, 2009).

Il est très important de rappeler que seule une partie de la population infectée développe des pathologies, ce qui suggère l'importance de facteurs de l'hôte, de l'environnement et surtout de facteurs de virulence bactériens. Les différentes pathologies induites par l'infection chronique à *H. pylori* sont résumées dans la figure suivante (Figure 5).

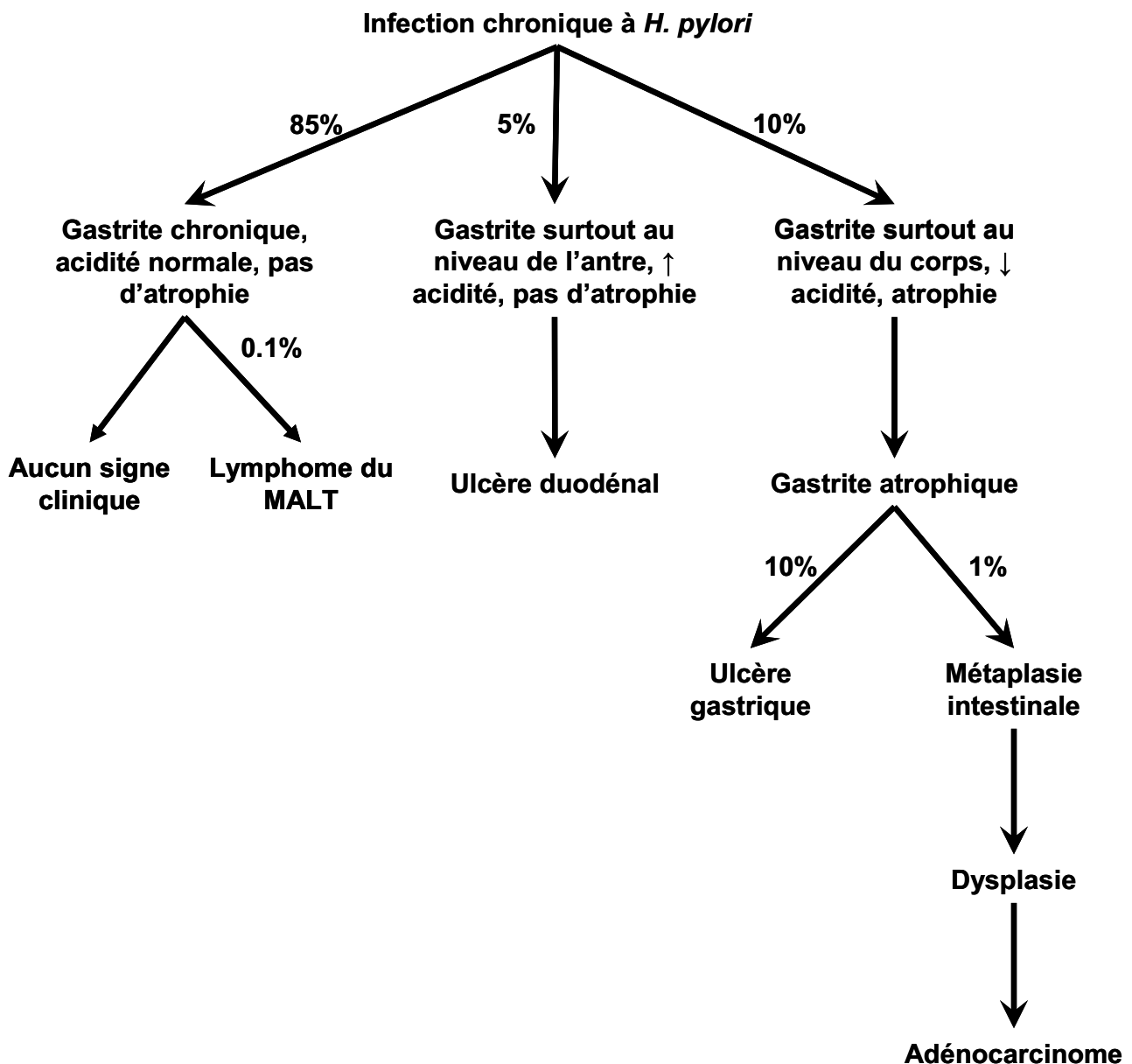


Figure 5. Pathologies gastrointestinales induites par l'infection par *H. pylori*. L'infection par *H. pylori* n'entraîne des signes cliniques que pour une partie minoritaire de la population infectée. Pour 0.1% des patients, la gastrite chronique évolue vers le lymphome du MALT. Pour 10 à 15% des patients, l'infection chronique est responsable d'une gastrite au niveau de l'antré de l'estomac qui évolue vers un ulcère gastrique ou duodénal. Pour 10% des patients, l'infection chronique est responsable d'une gastrite au niveau du corps qui évolue vers un ulcère gastrique ou des formes cancéreuses. D'après Konturek *et al.*, J Physiol Phramacol, 2006 (Konturek *et al.*, 2006).

1.3.4. Diversité génétique

Trente pour cent des gènes de *H. pylori* seraient spécifiques à l'espèce car non retrouvés chez les autres organismes (Boneca *et al.*, 2003; Marais *et al.*, 1999). A l'intérieur même de l'espèce, une grande variabilité génétique peut être retrouvée entre les différentes souches, certains auteurs allant même jusqu'à parler de quasi-espèce (Covacci and Rappuoli, 1998). Cette variabilité peut être retrouvée par une variabilité de l'organisation des gènes ou par des taux de mutations et recombinaisons importants.

Concernant l'organisation des gènes, cette variabilité inter-espèce est estimée à 22% du génome total, correspondant à un noyau d'environ 1200 gènes communs à toutes les souches et 200 à 400 gènes présents de manière variable chez les différentes souches (Gressmann *et al.*, 2005; Josenhans *et al.*, 2007; Salama *et al.*, 2000). La majorité des gènes variablement présents est retrouvée dans la zone de plasticité et dans l'îlot de pathogénicité *cag* (De Reuse and Bereswill, 2007). A l'heure actuelle, il est estimé que ces gènes variables sont spécifiques de *H. pylori* ou que leurs homologues sont de fonction inconnue (De Reuse and Bereswill, 2007). Un deuxième type de variabilité génétique correspond à l'organisation de l'ordre des gènes sur le génome, différente d'une souche à l'autre (Jiang *et al.*, 1996).

Les taux de mutations et de recombinaisons chez *H. pylori* semblent également être plus importants que chez les autres bactéries (Suerbaum *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1999). Le taux important de mutations, de l'ordre de $6,2-9,2 \times 10^{-7}$, serait dû au manque d'efficacité du système de réparation de *H. pylori* (Bjorkholm *et al.*, 2001). Enfin, un dernier mécanisme potentiellement responsable de l'acquisition d'une grande diversité génétique réside dans les systèmes de Restriction-Modification (R-M). En effet, les souches séquencées de *H. pylori* possèdent un grand nombre de ces systèmes composés d'une endonucléase de restriction et d'une méthyl-transférase (Vale and Vitor, 2007). Ces systèmes permettent d'une part une protection contre l'ADN étranger mais peuvent également jouer un rôle dans la régulation *in vivo* de gènes bactériens (Bjorkholm *et al.*, 2002; Lehours *et al.*, 2007).

Cette grande variabilité génétique pourrait être due à la voie de transmission intrafamiliale de *H. pylori* et de sa grande adaptation à un hôte unique (De Reuse and Bereswill, 2007). De plus, la bactérie peut posséder des plasmides ou des systèmes d'import d'ADN qui lui permettraient d'augmenter son adaptabilité (Hofreuter and Haas, 2002; Karnholz *et al.*, 2006). Ainsi, les analyses *in silico* ont permis de montrer que les gènes, de ménage ou de virulence, pouvaient être transférés entre bactéries (Garcia-Vallve *et al.*, 2002; Saunders *et al.*, 2005). Ces gènes pourraient provenir d'autres espèces du genre *Helicobacter* mais également d'autres genres bactériens (De Reuse and Bereswill, 2007; Garcia-Vallve *et al.*, 2002).

1.3.5. Facteurs de virulence

Les différences observées dans l'évolution de l'infection par *H. pylori*, gastrite superficielle, atrophie gastrique, ulcères ou cancers, proviennent sans doute de trois facteurs distincts, à savoir le fonds génétique de l'hôte, les facteurs environnementaux mais surtout les facteurs de virulence bactériens. Depuis la découverte de la bactérie, de nombreuses études ont essayé de répondre aux deux questions suivantes :

Existe-t-il des souches de *H. pylori* plus virulentes que d'autres ?

Existe-t-il des facteurs de virulence spécifiquement impliqués dans l'évolution de l'infection par *H. pylori* vers un développement tumoral ?

Colonisation de la muqueuse gastrique

- Mobilité et chimiotactisme

Helicobacter pylori doit sa mobilité à la présence de 2 à 6 flagelles polaires. Ces flagelles, constitués de 2 protéines distinctes FlaA et FlaB, sont recouverts d'une gaine permettant une protection contre l'acidité gastrique (Josenhans *et al.*, 1995). Ces flagelles, et la forme spiralée de la bactérie, lui permettent de pénétrer dans le mucus jusqu'à atteindre les couches muqueuses profondes et les cellules épithéliales. On estime que la majorité des bactéries se multiplient dans le mucus alors qu'une plus petite partie colonise la surface des cellules épithéliales (Marais *et al.*, 1999). Les flagelles sont indispensables à la mobilité et aux capacités de colonisation de la bactérie (Eaton *et al.*, 1996; Josenhans *et al.*, 1995).

La mobilité de la bactérie est fonction d'un tropisme particulier pour certains acides aminés, l'urée ou le bicarbonate de sodium (Tomb *et al.*, 1997). Ce chimiotactisme permettrait à la bactérie de se placer dans un milieu favorable à son développement. L'uréase pourrait également jouer un rôle dans le chimiotactisme bactérien (Hazell *et al.*, 1986; Nakamura *et al.*, 1998).

- Résistance à l'acidité gastrique

L'environnement gastrique est un environnement hostile à la majorité des microorganismes, cependant *H. pylori* est capable d'y survivre et de s'y développer. Cette résistance à l'acidité gastrique est essentiellement due à la présence de l'uréase. Le pourcentage de la masse protéique représenté par cette enzyme correspond à 6 à 10% de la masse totale bactérienne, montrant le rôle essentiel de cette molécule (Labigne and De Reuse, 1996). L'uréase transforme l'urée en dioxyde de carbone et ammoniac permettant de neutraliser localement l'acidité gastrique et créant ainsi un microenvironnement favorable au

développement bactérien (Clyne *et al.*, 1995; Marshall *et al.*, 1990). L'uréase de *H. pylori* est composée de deux sous unités UreA et UreB (Mobley *et al.*, 1995). Cette enzyme est indispensable à la colonisation gastrique, bien que la bactérie se développe essentiellement dans le mucus où le pH est beaucoup moins acide (Eaton *et al.*, 1991; Tsuda *et al.*, 1994).

- Adhérence

Les capacités d'adhérence bactérienne sont indispensables à une bonne colonisation et à la persistance de l'infection. En effet, *H. pylori* doit adhérer aux cellules épithéliales gastriques pour éviter d'être éliminé par les mouvements péristaltiques gastriques et le renouvellement du mucus (Finlay and Falkow, 1997). L'adhérence bactérienne constitue ainsi la première étape de pathogénicité en mettant intimement en contact la bactérie et la cellule cible et permet des interactions directes entre bactéries et cellules hôtes. Ce contact permet l'injection de différents facteurs de pathogénicité (toxines et autres) et une récupération des nutriments libérés par les cellules cibles.

En premier lieu, il semblerait que les molécules majeures impliquées dans l'adhérence soient de nature protéique. La première protéine définie comme adhésine a été BabA (*Blood group antigen binding protein*) (Ilver *et al.*, 1998). Le gène correspondant peut exister sous deux formes alléliques : *babA1* et *babA2* qui diffèrent par la présence chez les souches *babA2* d'un codon initiateur de la traduction. Cette différence permet aux souches *babA2* d'exprimer une adhésine fonctionnelle qui se lie avec les antigènes Lewis^b, présents sur les cellules épithéliales gastriques (Ilver *et al.*, 1998). Les souches *babA2* sont significativement associées aux pathologies les plus graves comme l'ulcère et l'adénocarcinome (Gerhard *et al.*, 1999; Oleastro *et al.*, 2003; Prinz *et al.*, 2001). La deuxième adhésine majeure de *H. pylori* est SabA (*Sialic acid-binding adhesin*). Cette adhésine se lie à un lipide particulier (*sialyl-dimeric-Lewis^x glycosphingolipid*) présent à la surface des cellules épithéliales (Mahdavi *et al.*, 2002). SabA serait également l'agent agglutinant des érythrocytes et des neutrophiles (Aspholm *et al.*, 2006; Unemo *et al.*, 2005). La reconnaissance des neutrophiles par SabA permettrait leur activation, et donc un relargage de radicaux oxygénés et azotés, induisant des lésions épithéliales (Unemo *et al.*, 2005; Yoshikawa and Naito, 2000). De manière intéressante, ces deux adhésines majeures, ainsi que les différentes protéines de membranes externes, semblent pouvoir moduler leur expression en fonction du contexte environnemental (Yamaoka *et al.*, 2006). Ainsi, la protéine BabA pourrait être modulée par variation de phase et variation antigénique *in vivo* facilitant l'adhérence à l'épithélium et

permettre une infection chronique (Solnick *et al.*, 2004). De la même façon, l'expression de SabA semble très dépendante du pH (Goodwin *et al.*, 2008).

Deux lipoprotéines ont également été impliquées dans l'adhérence bactérienne AlpA et AlpB (*Adhesion associated protein A et B*). Leur récepteur cellulaire est inconnu mais leur implication dans la pathogénicité de la bactérie est démontrée. Ces lipoprotéines peuvent induire des dommages au niveau gastrique en modulant des voies de signalisation pro-inflammatoire, et l'adhérence bactérienne est diminuée si elles sont mutées (Lu *et al.*, 2007; Odenbreit *et al.*, 2002).

Enfin, l'analyse du génome de *H. pylori* a permis d'identifier plusieurs catégories de gènes impliqués dans l'adhérence, en particulier ceux codant 32 protéines de membranes externes dénommées OMP (*Outer Membrane Protein*) qui pourraient permettre une diversité dans le profil bactérien des protéines de surface (Tomb *et al.*, 1997). Ces protéines de membrane externe sont classées en 5 familles : Hop/Hor, Hof, Hom, FecA/Frp et Hef (Alm *et al.*, 2000). Leurs extrémités N et C terminales sont très conservées, et leur rôle est difficile à estimer dû au manque de connaissances de leurs récepteurs spécifiques. Nous avons montré que l'une de ces protéines de surface, HomB, joue un rôle important dans l'adhérence cellulaire d'une part, mais également dans l'induction d'une réponse pro-inflammatoire. La présence de cette protéine a été associée à la maladie ulcéreuse chez l'enfant et chez l'adulte, et pourrait donc correspondre à un nouveau marqueur de souches virulentes (Oleastro *et al.*, 2008). Le rôle des différentes protéines de surface reste encore à déterminer.

Ainsi, plusieurs adhésines sont identifiées chez *H. pylori*. La présence de ces adhésines, et leur capacité à être exprimées ou non en fonction de l'environnement, permet au pathogène de moduler son adhérence et son profil de protéines de surface et ainsi d'échapper aux mécanismes de défenses de l'hôte.

Inflammation et lésions cellulaires

- Ilot de pathogénicité *cag* et protéine CagA

Chez *H. pylori*, l'îlot de pathogénicité *cag* (*cagPAI*) est la région du chromosome la plus étudiée. Cette région génomique de 40 kb contient jusqu'à 32 gènes putatifs et code pour un système de sécrétion de type IV (TSS4) (Censini *et al.*, 1996; Suerbaum and Josenhans, 2007). Le pourcentage de G+C de ce segment diffère du reste du génome ce qui suggère une acquisition par transfert horizontal (Achtman *et al.*, 1999; Alm *et al.*, 1999). L'un des marqueurs de la présence de l'îlot de pathogénicité est le gène *cagA*. Ce gène est présent chez 90% des souches asiatiques et chez 50 à 70% des souches occidentales (Maeda *et al.*, 1998;

van Doorn *et al.*, 1998). Cependant, la présence du gène *cagA* ne signifie pas forcément la présence d'un îlot entier et fonctionnel, celui-ci pouvant être partiellement délété (Israel *et al.*, 2001; Salama *et al.*, 2000). Le TSS4 est typiquement composé de l'assemblage de 11 protéines (VirB 1 à 11) couplées à une NTPase (VirD4) (**Figure 6A-B**) (Backert and Selbach, 2008). Chez *H. pylori* plusieurs protéines sont associées à cette structure de base, même si le rôle de plusieurs d'entre elles est inconnu. Cependant, il est accepté que la protéine CagF joue un rôle de chaperonne dans la translocation de CagA (Couturier *et al.*, 2006; Pattis *et al.*, 2007). La protéine CagL assure quant à elle la spécificité du TSS4 pour les cellules hôtes en se liant aux intégrines cellulaires de type $\alpha 5\beta 1$ (Kwok *et al.*, 2007).

Ces différentes interactions permettent au TSS4 d'injecter dans le cytoplasme de la cellule cible la protéine CagA (Odenbreit *et al.*, 2000). Une fois transloquée dans la cellule, la cytotoxine peut activer différents effecteurs (**Figure 7**). En premier lieu, CagA est responsable d'une perturbation des jonctions intercellulaires épithéliales perturbant ainsi l'intégrité de l'épithélium gastrique. Ces processus contribuant à la pathogénicité de *H. pylori* passent par des interactions avec les molécules d'adhérence des jonctions (JAM) ou les protéines E-cadhérine et *Zona Occludens 1* (ZO-1) (Amieva *et al.*, 2003; Murata-Kamiya *et al.*, 2007; Saadat *et al.*, 2007). La mauvaise répartition de ces molécules des jonctions serait due à une interaction entre CagA et la kinase *Partitioning-defective 1* (Par1) (Saadat *et al.*, 2007). La perturbation des jonctions serrées peut jouer un rôle dans le développement tumoral comme il en a été discuté dans les paragraphes précédents. D'autre part, CagA est phosphorylée au niveau des séquences répétées Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala (EPIYA) par des tyrosines kinases cellulaires de la famille Src (Stein *et al.*, 2002). La protéine ainsi phosphorylée peut alors activer les voies de signalisation cellulaire SHP2 / ERK affectant le cytosquelette cellulaire (Peek, 2005). Les cellules ainsi infectées développent une morphologie appelée « colibri » correspondant à une élongation cellulaire. CagA phosphorylé inhibe également les tyrosines kinases de la famille Src ce qui entraîne des modifications de la morphologie et de la motilité (Selbach *et al.*, 2004; Selbach *et al.*, 2002; Selbach *et al.*, 2003). Il est intéressant de noter que la protéine CagA peut jouer par elle-même un rôle d'oncogène bactérien. En effet, des souris transgéniques exprimant le gène *cagA* développent des néoplasies gastrointestinales et hématopoïétiques (Ohnishi *et al.*, 2008). Il s'agit ainsi de la première oncoprotéine d'origine bactérienne décrite.

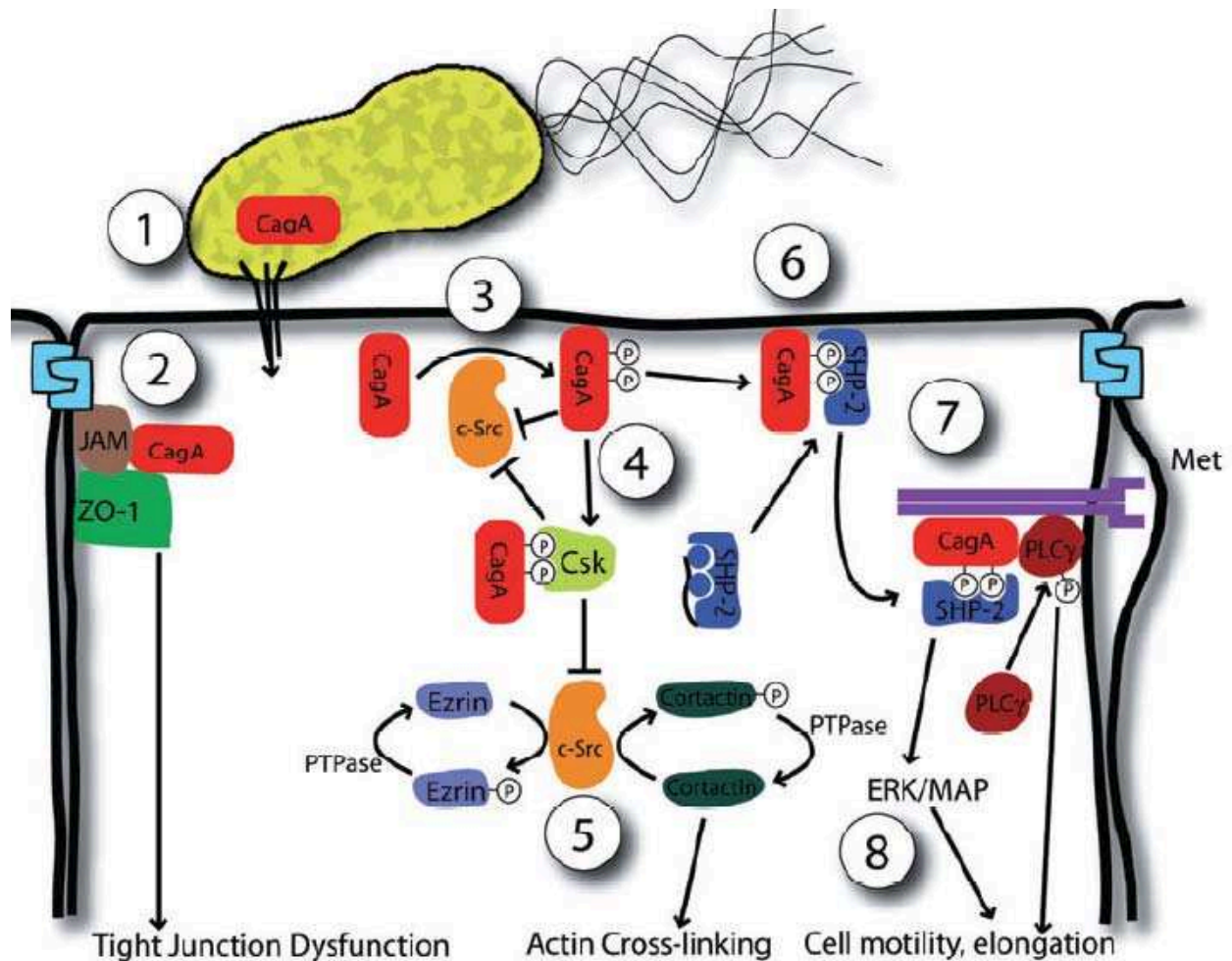


Figure 7. CagA et signalisation cellulaire. 1/ La cytotoxine CagA est injectée à l'intérieur de la cellule cible par le TSS4. 2/ CagA peut se lier avec ZO-1 ou les molécules d'adhérence des jonctions (JAM) et déstabiliser les jonctions serrées. 3/ Les tyrosines kinases de la famille des Src phosphorylent les motifs EPIYA de CagA. 4/ CagA phosphorylé inhibe ces tyrosines-kinases directement ou par l'activation de Csk. 5/ L'inhibition des Src entraîne une déphosphorylation de l'Ezrin et de la cortactine qui contribue au maintien de la morphologie et de la motilité. 6/ CagA phosphorylé peut également s'associer avec les molécules SHP-2. 7/ Cette interaction active la voie de signalisation des récepteurs tyrosines kinases par les biais 8/ des molécules ERK/MAP. Cette activation entraîne une élévation cellulaire et une augmentation de la motilité cellulaire. Détails dans le texte. D'après Bourzac et Guillemin, Cell Microbiol, 2005 (Bourzac and Guillemin, 2005).

Il a également été démontré que les souches possédant un l'îlot *cagPAI* induisent une réponse inflammatoire plus importante que les souches ne le possédant pas (Cox *et al.*, 2001; Peek *et al.*, 1995; Shimoyama *et al.*, 1998). De manière très intéressante, le TSS4 est également responsable de l'injection du peptidoglycane bactérien dans la cellule épithéliale. Ce polymère de glycosaminoglycane est ensuite reconnu par Nod1, une molécule de l'immunité innée reconnaissant ce type de motif bactérien. Cette reconnaissance est responsable de l'activation de la voie de signalisation du NF- κ B, conduisant à une réponse pro-inflammatoire (Fritz *et al.*, 2006; Viala *et al.*, 2004). Cette reconnaissance du peptidoglycane bactérien semble être le mécanisme principal de l'activation de la réponse

inflammatoire pour les souches possédant l'îlot de pathogénicité. Cependant, la protéine CagA elle-même pourrait être responsable de la sécrétion de CXCL8 après activation de la voie du NF- κ B (Brandt *et al.*, 2005; Crabtree *et al.*, 1995a). De nombreuses études préalables avaient montré le rôle de CagA dans la pathogénicité bactérienne mais non dans la réponse inflammatoire (Censini *et al.*, 1996; Crabtree *et al.*, 1995b; Sharma *et al.*, 1995). Les différences de résultats entre ces études pourraient être dues à la différence du nombre de motifs de phosphorylation présents sur la protéine CagA et le temps d'incubation pour les expériences *in vitro* (Brandt *et al.*, 2005). En effet, la protéine CagA possède un nombre variable de motifs de phosphorylation EPIYA en fonction des souches, dénommés EPIYA-A, -B, -C, -D. Ainsi, les souches de type occidental présentent une combinaison de motifs EPIYA-A, -B, -C alors que les souches est-asiatiques présentent une combinaison des motifs EPIYA-A, -B, -D (Argent *et al.*, 2008; Covacci *et al.*, 1993; Higashi *et al.*, 2002a; Higashi *et al.*, 2002b; Nguyen *et al.*, 2008; Stein *et al.*, 2002). Les motifs EPIYA -C et -D sont les sites les plus importants de liaison avec SHP-2, et l'augmentation du nombre de ces motifs est liée à une augmentation de la pathogénicité de la souche (Argent *et al.*, 2004; Azuma *et al.*, 2002; Higashi *et al.*, 2002a; Jones *et al.*, 2009; Satomi *et al.*, 2006; Yamaoka *et al.*, 1999a).

- Cytotoxine vacuolisante VacA

La cytotoxine vacuolisante VacA tient son nom de sa capacité à induire l'apparition de vacuoles après infection de certaines lignées de cellules épithéliales. Le gène *vacA* est présent chez toutes les souches mais seulement certaines d'entre elles possèdent une activité vacuolisante. Cette différence de réponse est due à la présence de régions variables sur le gène (Atherton *et al.*, 1995). Deux zones de variabilité ont tout d'abord été décrites, dénommées s et m et correspondant respectivement à la région codant le peptide signal et à la région située au milieu du gène. Le peptide signal permet la sécrétion de la toxine. Ainsi le génotype s1 correspond à un peptide signal fonctionnel d'où une sécrétion élevée de toxine. A l'inverse, l'allèle s2 est corrélé à une exportation de toxine faible sans doute due à une perte d'hydrophobicité (Atherton *et al.*, 1995). L'allèle m est quant à lui associé à l'activité de la protéine, avec une toxicité élevée pour l'allèle m1 mais faible pour l'allèle m2 (Ji *et al.*, 2000; Pagliaccia *et al.*, 1998; Tombola *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2001b). Les différentes combinaisons entre ces allèles conditionnent donc la pathogénicité potentielle de la toxine VacA. Une troisième région a récemment été identifiée, la région *i* existant sous la forme i1 ou i2 (Rhead *et al.*, 2007). Cette région serait un déterminant de la toxicité de VacA, les souches de type s1m1 possédant la forme i1 et les souches s2m2 la forme i2. Les effets de la

cytotoxine VacA sont nombreux sur les cellules, *in vitro* et *in vivo* (**Figure 8**). En premier lieu, la protéine VacA est sécrétée dans l'espace extracellulaire mais peut également être retrouvée au niveau de la membrane bactérienne où elle pourrait jouer le rôle d'adhésine (Cover and Blaser, 1992; Ilver *et al.*, 2004). D'autre part, VacA peut activer des voies de signalisation cellulaire pro-inflammatoires après liaison à un récepteur cellulaire comme le *protein tyrosine phosphatase receptor type Z* (Ptpz ou RPTP β), le récepteur de l'EGF ou diverses lipides (Cover and Blanke, 2005; Fujikawa *et al.*, 2003; Nakayama *et al.*, 2006; Seto *et al.*, 1998). Il a ensuite été montré que VacA induit l'apoptose de cellules épithéliales à la fois *in vitro* et *in vivo* (Galmiche *et al.*, 2000; Kuck *et al.*, 2001; Peek *et al.*, 1999). L'apoptose serait due à un relargage du cytochrome C qui activerait une voie de signalisation pro-apoptotique (Galmiche *et al.*, 2000). Comme nous l'avons vu précédemment, VacA tient son nom de la capacité à former des vacuoles dans les cellules cibles. Ces vacuoles proviendraient des vésicules d'endocytose après la liaison de VacA au niveau de la membrane cellulaire. Plusieurs molécules de VacA s'organisent en canaux permettant le passage de certains ions chlorure. Ce passage anionique serait compensé par l'entrée d'ions hydrogènes par les canaux cellulaires. Les vacuoles seraient alors une conséquence du rétablissement de la pression osmotique (Cover and Blanke, 2005). Enfin, VacA peut pénétrer dans le cytoplasme des lymphocytes après reconnaissance du CD18 et interférer avec la sécrétion de l'interleukine 2 (Sewald *et al.*, 2008). *In vivo*, l'administration de la protéine purifiée à des souris est responsable d'une dégénération de la muqueuse gastrique et d'un recrutement de cellules inflammatoires (Ghiara *et al.*, 1995; Marchetti *et al.*, 1995). Pour conclure, VacA joue donc un rôle important dans la capacité de colonisation de la bactérie (Salama *et al.*, 2001).

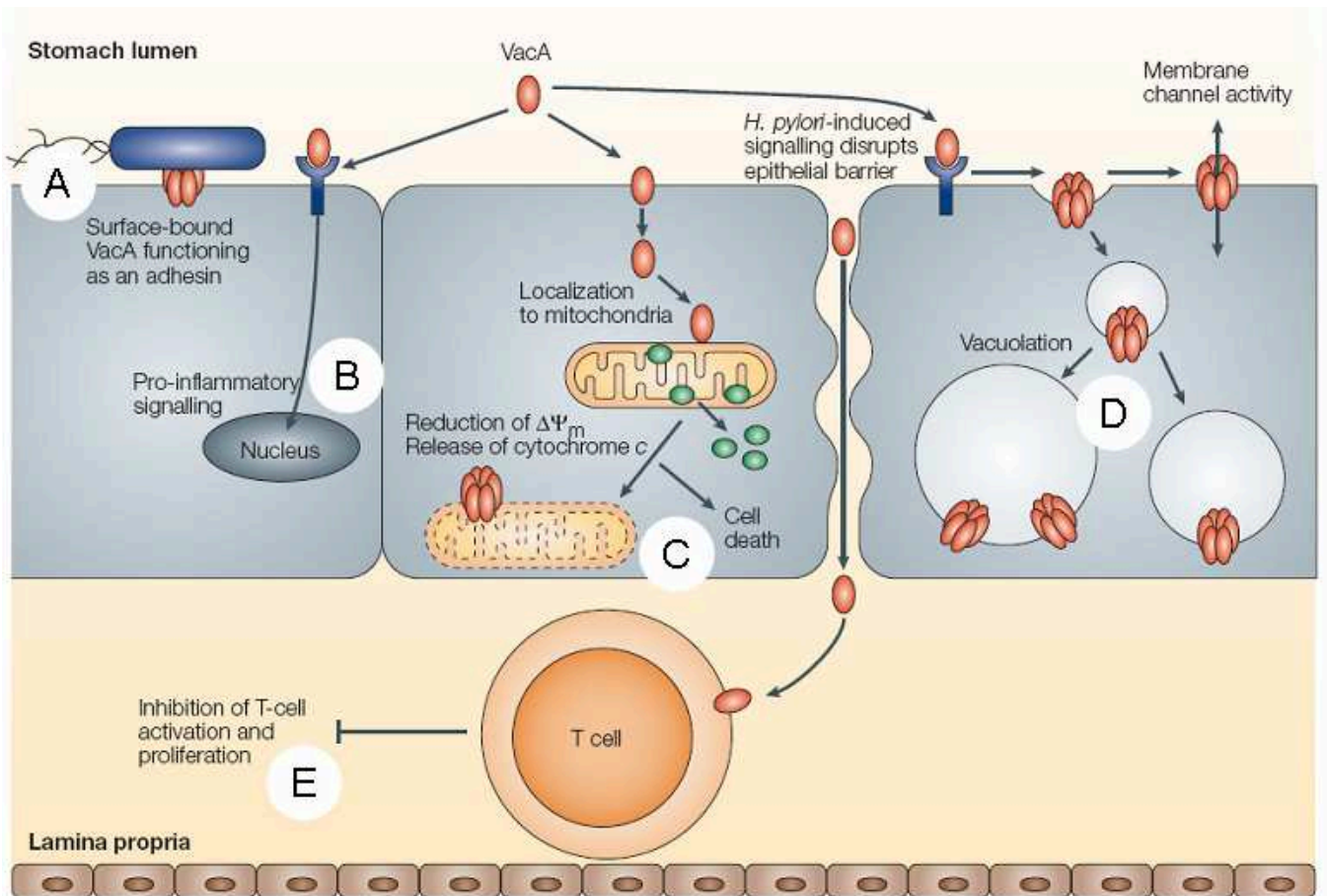


Figure 8. Effets divers de la cytotoxine vacuolisante VacA. A/ La protéine VacA peut être retrouvée au niveau membranaire où elle joue le rôle d'adhésine. B/ VacA peut également être sécrétée et activer des voies de signalisation pro-inflammatoires après activation de récepteurs cellulaires. C/ L'internalisation de VacA et sa localisation mitochondriale induit un relargage du cytochrome C et l'induction de l'apoptose cellulaire. D/ Les protéines VacA endocytées forment des pores à l'intérieur des vésicules d'endocytose responsables de l'apparition de vacuoles. E/ La cytotoxine peut également interférer avec les lymphocytes T présents au niveau de la lamina propria. Détails dans le texte. D'après Cover et Blanke, Nat Rev Microbiol, 2005 (Cover and Blanke, 2005).

- Lipopolysaccharide

Le lipopolysaccharide (LPS) correspond à une région polysaccharidique attachée à une région lipidique (lipide A) comme point d'ancrage. *H. pylori* exprime au niveau de la région polysaccharidique les antigènes de type Lewis X ou Y des groupes sanguins, en mimétisme des cellules épithéliales gastriques (Vandenbroucke-Grauls and Appelmelk, 1998). Ce mimétisme bactérien a deux conséquences majeures dans la pathogénicité de la bactérie. Tout d'abord, le pathogène n'est plus reconnu comme du non-soi et devient ainsi invisible au système immunitaire. D'autre part, le pathogène casse la tolérance auto-immune et les antigènes de Lewis cellulaires peuvent être reconnus comme étranger, induisant des lésions au niveau de la muqueuse (Appelmelk *et al.*, 1998). D'autre part et comme il en sera discuté

dans le paragraphe suivant, le LPS de *H. pylori* n'est que très peu actif sur les récepteurs de l'immunité innée.

- Autres facteurs de virulence

Certaines souches de *H. pylori* *cagA*-négatives sont responsables d'une production importante d'interleukine 8 par les cellules épithéliales (Yamaoka *et al.*, 1999b). Il a été démontré que cette production de CXCL8 faisait suite à l'adhérence de la bactérie sur la cellule (Sharma *et al.*, 1995). Ces données ont permis à certains auteurs de rechercher le rôle potentiel des protéines de la membrane externe dans cette réponse pro-inflammatoire. Ainsi, la protéine OipA serait responsable d'une activation des voies de signalisation pro-inflammatoires conduisant à la libération de CXCL8, mais pourrait également jouer un rôle dans la réorganisation du cytosquelette (Tabassam *et al.*, 2008; Yamaoka *et al.*, 2000).

Le gène *iceA*, induit après contact avec des cellules épithéliales, a été montré être associé à l'ulcère duodéal (Van Doorn *et al.*, 1998). Cependant, sa fonction exacte reste encore inconnue.

Par ailleurs, une forte corrélation existe entre l'infiltration gastrique par des neutrophiles et les dommages occasionnés au niveau de la muqueuse durant l'infection par *H. pylori* (Davies *et al.*, 1994). Ainsi, la protéine NapA, capable de recruter les neutrophiles et monocytes, peut être considérée comme un facteur de virulence (Evans *et al.*, 1995). En outre, des mutants inactivés pour *napA* survivent moins bien que des souches sauvages dans des conditions de stress oxydatif suggérant un rôle de NapA dans ce type de résistance (Cooksley *et al.*, 2003).

Plus récemment, la protéine Tip- α (TNF α inducing protein) a été montrée comme importante dans les capacités de colonisation de la bactérie. De plus, cette protéine soluble peut être retrouvée au niveau du noyau de la cellule cible, suggérant un rôle carcinogène (Godlewska *et al.*, 2008; Suganuma *et al.*, 2008).

Persistance dans la muqueuse gastrique

Les macrophages représentent l'une des premières lignes de défense de l'hôte. Lors d'une infection, *H. pylori* est phagocyté mais peut retarder cette internalisation et rester viable après fusion des phagosomes (Allen *et al.*, 2000). La bactérie est également capable d'induire l'apoptose des macrophages permettant une évasion de la réponse immunitaire innée (Chaturvedi *et al.*, 2004). Ces mécanismes de résistance seraient portés par des facteurs de

virulence, les souches dépourvues de l'îlot de pathogénicité *cag* et du gène *vacA* étant plus sensibles à la phagocytose (Allen *et al.*, 2000).

Enfin, *H. pylori* possède différentes enzymes lui permettant de résister au stress oxydatif généré par les cellules phagocytaires comme l'alkylhydroperoxyde-réductase, la catalase, la superoxyde-dismutase et l'arginase.

Concernant l'immunité adaptative, l'infection par *H. pylori* est responsable d'une forte réponse humorale, cependant non suffisante à l'éradication bactérienne. Cette résistance serait essentiellement due à la localisation dans la muqueuse de la bactérie, permettant une mise hors de portée des anticorps. De plus, comme mentionné dans les paragraphes précédents, le profil protéique de surface de la bactérie est variable avec une forte capacité d'adaptation à l'environnement. Cette variabilité antigénique facilite sans doute l'échappement à la réponse immunitaire. La toxine vacuolisante VacA de *H. pylori* semble également capable de bloquer l'activation des lymphocytes T (Boncristiano *et al.*, 2003). L'îlot de pathogénicité *cag* est par ailleurs responsable d'une activation de la voie Fas-Ligand-Fas des lymphocytes les faisant rentrer en apoptose (Wang *et al.*, 2001a). En outre, nous avons montré que la bactérie est capable d'inhiber la prolifération de lymphocytes T et B activés (Ferrand *et al.*, 2008). Cet effet passerait par la γ -glutamyl transpeptidase bactérienne (Schmees *et al.*, 2007).

1.3.6. Reconnaissance immunitaire

Comme nous venons de le voir, l'infection par *H. pylori* n'est pas contrôlée par le système immunitaire. Les cellules épithéliales gastriques correspondent au premier point de rencontre entre le pathogène bactérien et son hôte. *H. pylori* apparaît comme une bactérie essentiellement extracellulaire, même si quelques études ont montré qu'il était possible de trouver des bactéries à l'intérieur des cellules épithéliales (Amieva *et al.*, 2002; Dubois and Boren, 2007; Kwok *et al.*, 2002; Semino-Mora *et al.*, 2003). Les contacts intimes entre cellules épithéliales et bactéries sont à la base de la réponse immunitaire innée, passant essentiellement par une activation des récepteurs des profils moléculaires spécifiques des pathogènes (*Pathogen-associated molecular patterns*, PAMP).

- Toll-Like Récepteurs

Les Toll-Like Récepteurs (TLR) appartiennent à une classe de molécules retrouvées chez de nombreux organismes vertébrés et invertébrés et des formes légèrement différentes existent chez les plantes. Les TLR sont considérés comme les plus anciens composants de l'immunité innée.

Le rôle de ces molécules a initialement été décrit dans l'embryogenèse, en particulier dans la mise en place de l'axe dorso-ventral chez la drosophile (Belvin and Anderson, 1996). Leur rôle dans l'immunité innée a ensuite été découvert par la mise en évidence de leur capacité à lutter contre les infections par des champignons chez la drosophile (Lemaitre *et al.*, 1996). Depuis, la classe des TLR est considérée comme un composant majeur du système immunitaire inné en participant à la reconnaissance des PAMPs. Cette reconnaissance est responsable d'une activation cellulaire conduisant à la mise en place de mécanismes anti-infectieux et au recrutement de cellules immunitaires. Actuellement, dix TLR sont connus chez l'homme et 13 chez la souris, chacun ayant des ligands (PAMP) et des fonctions spécifiques (Barton and Kagan, 2009).

Les ligands des TLR humains sont répertoriés dans la table suivante (**Table 2**). Ils peuvent correspondre à des composants de la paroi bactérienne ou fongique, à des lipoprotéines bactériennes, des protéines microbiennes conservées ou des acides nucléiques. La localisation des TLR dans la cellule est dépendante de leur spécificité : les récepteurs des acides nucléiques (TLR3, TLR7, TLR8 et TLR9) sont intracellulaires alors que ceux spécifiques de molécules microbiennes sont externalisés (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 et TLR6).

	Origine du ligand	Ligand
TLR1	Bactéries et mycobactéries	Lipopeptide
TLR2	Bactéries Gram +, parasites	Lipopeptide, glycolipide
TLR3	Virus	ARN double brin
TLR4	Bactéries Gram -, plantes	Lipopolysaccharide, taxol
TLR5	Bactéries	Flagelline
TLR6	Mycoplasmes	Lipopeptide
TLR7	Virus	ARN simple brin
TLR8	Virus	ARN simple brin
TLR9	Bactéries et virus	ADN CpG non méthylé
TLR10		Inconnu

Table 2. TLR et leurs ligands. Les différents TLR humains sont spécifiques de certains organismes et plus particulièrement de certains ligands. Détails dans le texte. D'après Chen *et al.*, Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2006 (Chen *et al.*, 2006).

Les TLR sont des glycoprotéines transmembranaires de type I composées de répétitions riches en leucine et d'une région intracellulaire contenant un domaine homologue aux *Terminal Inverted Domain* (TIR) (Bell *et al.*, 2003). Ce domaine interagit avec plusieurs molécules adaptatrices intracellulaires (MyD88, TIRAP, TRIF et TRAM) et active ainsi une

cascade résultant dans l'activation de facteurs de transcription. La voie classique de stimulation des TLR aboutit à l'activation du NF- κ B impliqué dans l'expression de cytokines pro-inflammatoires et dans l'activation des cellules de l'immunité adaptative.

Enfin de manière plus récente, un nouveau rôle des TLR a été découvert. L'activation de ces molécules pourrait maintenir l'homéostasie entre le microbiote intestinal et l'épithélium (Rakoff-Nahoum *et al.*, 2004). Un rôle dans la progression du cycle cellulaire des fibroblastes leur est également attribué (Hasan *et al.*, 2005).

- TLR et réponse immunitaire contre *H. pylori*

L'ARNm *tlr4*, le TLR habituellement impliqué dans la réponse contre le LPS des bactéries Gram négatives, peut être détecté dans différentes lignées de cellules épithéliales gastriques (AGS, MKN45, NCI-87) (Backhed *et al.*, 2003; Ishihara *et al.*, 2004; Su *et al.*, 2003). Les cellules épithéliales gastriques ne répondent cependant pas à la stimulation par de fortes concentrations de LPS de *H. pylori*, et l'utilisation d'anticorps bloquant anti-TLR4 n'inhibe pas la réponse inflammatoire (Backhed *et al.*, 2003; Su *et al.*, 2003). Le LPS de *H. pylori* serait faiblement actif comparé à ceux des enterobactéries et n'active donc que faiblement les macrophages (Moran, 1999). Cependant, le rôle du TLR4 porte encore à controverse. En effet, l'expression basolatérale du TLR4 est augmentée après infection par *H. pylori* (Schmausser *et al.*, 2004). L'utilisation de siRNA dans des modèles *in vitro* a permis de montrer un rôle du TLR4 dans la synthèse de radicaux azotés après infection par *H. pylori* (Uno *et al.*, 2007).

Deux autres membres de la famille des TLR sont importants dans la réponse immunitaire contre l'infection par *H. pylori*. Les TLR2 et TLR5 sont exprimés au niveau des cellules intestinales ou gastriques (Cario *et al.*, 2002; Smith *et al.*, 2003). *H. pylori* serait capable d'activer ces deux voies aboutissant à une translocation de NF- κ B et à une production de CXCL8 *in vitro* (Smith *et al.*, 2003; Torok *et al.*, 2005). Le TLR2 serait activé par le LPS de *H. pylori*, alors que le ligand du TLR5 reste à déterminer. En effet, le ligand classique de ce récepteur correspond aux flagellines bactériennes. Dans le cas de *H. pylori*, des mutants délétés des protéines flagellaires conservent la capacité d'induire une réponse pro-inflammatoire. De plus, des préparations concentrées d'extraits flagellaires n'induisent pas de réponse, à l'inverse d'extraits de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium par exemple (Lee *et al.*, 2003).

Cependant, le récepteur cellulaire le plus important dans la réponse immunitaire innée contre *H. pylori* apparaît être Nod1 (Viala *et al.*, 2004). En effet, l'injection de

peptidoglycane à l'intérieur de la cellule hôte par le TSS4 est capable d'activer ce récepteur induisant une translocation du NF- κ B et une synthèse de CXCL8. Néanmoins, le mécanisme de reconnaissance des bactéries ne possédant pas l'îlot de pathogénicité *cag* reste inconnu.

Les mécanismes pathogènes de *H. pylori* sont résumés dans la figure suivante (**Figure 9**).

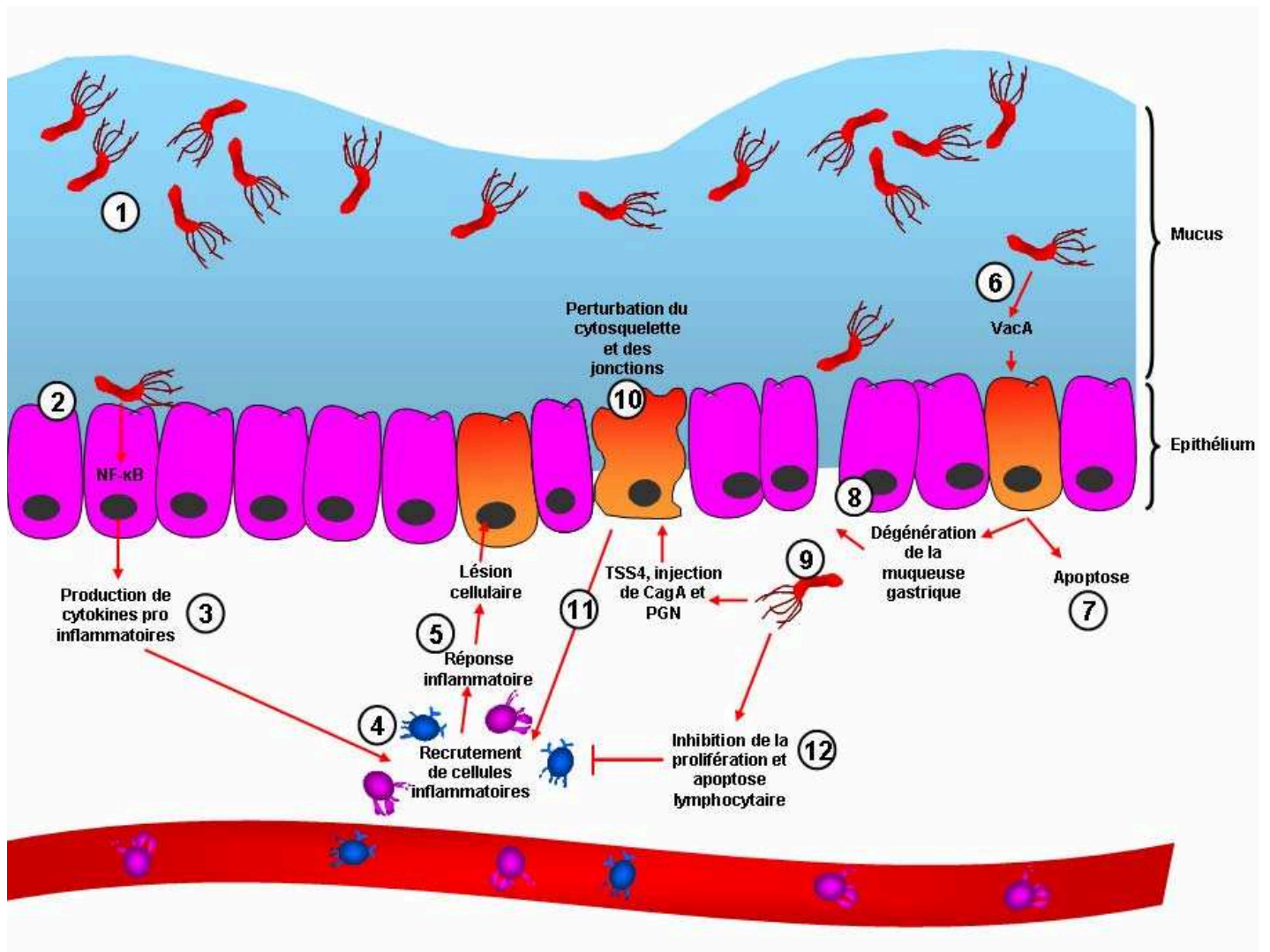


Figure 9. Résumé de la pathogénicité de *H. pylori*. 1/ Les flagelles et la forme spiralée de *H. pylori* permettent une mobilité dans le mucus. L'uréase bactérienne permet de créer un microenvironnement tamponné favorable à sa survie. 2/ La présence d'adhésines permet une adhérence à la surface cellulaire. 3/ Cette liaison stimule la voie d'activation des TLR cellulaires et induit la production de cytokines pro-inflammatoires, essentiellement par l'activation de NF-κB. 4/ Ces cytokines pro-inflammatoires recrutent les cellules de l'immunité circulante. 5/ Ces cellules sont responsables d'une inflammation locale entraînant des lésions cellulaires. 6/ D'autre part, *H. pylori* sécrète la cytotoxine vacuolisante VacA, responsable 7/ d'une apoptose cellulaire et 8/ d'une dégénération de la muqueuse gastrique. Cette altération de l'intégrité de l'épithélium permet un passage de la bactérie à travers l'épithélium. 9/ Les bactéries retrouvées sur la face basale des cellules épithéliales se lient spécifiquement aux intégrines $\alpha 5\beta 1$ et injectent la protéine CagA et le peptidoglycane (PGN) via le TSS4. 10/ CagA perturbe les voies de signalisation cellulaire et modifie la morphologie épithéliale en désorganisant les jonctions intracellulaires. 11/ La sécrétion de NapA et la production de cytokines pro-inflammatoires induite par CagA et le PGN sont responsables d'un recrutement de cellules immunitaires. 12/ *H. pylori* bloque également la maturation des lymphocytes et induit leur apoptose. Détails dans le texte.

2. Un nouveau modèle de carcinogenèse gastrique

En 2004, l'équipe de JeanMarie Houghton s'est intéressée au rôle potentiel des cellules issues de la moelle osseuse (*Bone Marrow Derived Cells*, BMDC) dans la carcinogenèse gastrique (Houghton *et al.*, 2004). En effet, ces auteurs avaient noté que l'environnement inflammatoire favorisant un développement tumoral partageait de nombreuses similitudes avec celui responsable du *homing* et du recrutement des BMDC, suggérant peut être un lien entre développement tumoral et cellules médullaires. Il y avait cependant à l'époque peu de données sur le devenir des cellules recrutées au niveau des sites inflammatoires sur le long terme.

Pour étudier le rôle des BMDC dans le carcinome gastrique, les auteurs ont utilisé le modèle connu de souris C57BL/6 infectées par *H. felis*, un pathogène murin proche de *H. pylori*. Afin de suivre le devenir des BMDC, des souris sauvages ont préalablement reçu une irradiation importante (900 rads) afin de détruire de manière intégrale et irréversible les cellules souches de la moelle osseuse. Après irradiation, ces souris ont été greffées avec de la moelle osseuse provenant de souris transgéniques exprimant de manière constitutive le gène de la β -galactosidase bactérienne de *E. coli*. Ce marqueur permet une détection spécifique chez les souris irradiées et greffées des cellules d'origine médullaire.

Ces souris chimères infectées par *H. felis* reproduisent les différentes étapes de l'initiation et du développement du carcinome gastrique tel qu'il intervient chez l'homme lors de l'infection par *H. pylori* (Fox *et al.*, 2002). Ainsi, une apoptose des cellules épithéliales de la muqueuse gastrique est rapidement détectée 6 à 8 semaines après l'infection. Après 20 semaines, les premiers signes de métaplasie et de dysplasie apparaissent. De manière intéressante, ces premières manifestations pré-néoplasiques sont corrélées avec l'apparition de BMDC au niveau de l'épithélium gastrique. Ainsi, au bout de 20 semaines, 5% des glandes sont positives lors de marquages à la β -galactosidase, et ce pourcentage augmente en fonction du développement de la pathologie. Ainsi, 20% des glandes sont positives après 30 semaines, 50% après 40 semaines et 90% après 52 semaines. Les souris non infectées ne présentent aucune glande positive.

L'infection par *H. pylori* est responsable du développement d'une métaplasie caractérisée par l'expression du marqueur *TreFoil Factor 2* (TFF2). Dans le modèle des souris chimères, l'expression de TFF2 est localisée au niveau des glandes reconstituées par les BMDC, suggérant que les premiers signes histologiques pré-cancéreux sont retrouvés au niveau des sites de recrutement des BMDC. De manière similaire, les glandes présentant des anomalies

de morphologie et de structure et une forte prolifération cellulaire, caractéristiques de l'étape de dysplasie, sont composées de BMDC. Des immuno-marquages révèlent de plus que les BMDC des glandes gastriques ont acquis un phénotype épithélial avec expression de cytokératines, molécules du cytosquelette spécifiques des cellules épithéliales. Ces cellules n'expriment pas le marqueur CD45, caractéristique des cellules d'origine hématopoïétique différenciées, montrant leur nature de leucocytes circulants.

En outre, l'utilisation de produits chimiques ou cryogéniques pour induire des ulcérations gastriques n'induit pas l'apparition de glandes composées de BMDC, indiquant que ce recrutement de cellules médullaires est spécifique d'une inflammation chronique.

Afin d'identifier en détail les mécanismes de cette différenciation, les auteurs ont alors décidé d'utiliser un second modèle. Des souris femelles ont été irradiées avant de recevoir une greffe de moelle osseuse de souris mâles exprimant de manière constitutive la GFP. Ce modèle permet d'obtenir un double marquage des BMDC (chromosome Y et GFP). Quinze mois après l'infection, les tumeurs gastriques obtenues ont été analysées par cytométrie en flux afin de caractériser les différentes cellules les composant. Ainsi, deux populations cellulaires issues des BMDC ont été caractérisées. La population GFP+/CD45+ correspondant aux leucocytes circulants et la population GFP+/CD45- d'origine non-hématopoïétique et exprimant des cytokératines. De plus, l'analyse du contenu chromosomique a révélé que ces cellules sont uniquement mononucléées avec présence d'un chromosome X et d'un chromosome Y. Ces résultats suggèrent que les BMDC ayant été recrutées au niveau de la muqueuse gastrique se sont différenciées en cellules épithéliales sans processus de fusion avec ces dernières. Un argument supplémentaire en défaveur de la fusion est la comparaison du contenu en ADN des cellules gastriques des souris témoins et des souris infectées. Ce contenu apparaît similaire, excluant la présence de cellules fusionnées qui posséderaient un contenu en matériel génétique plus important.

Les auteurs ont ensuite essayé d'identifier la population à l'origine de cette différenciation en cellules épithéliales. Pour cela, les deux populations de cellules souches composant la moelle osseuse (cellules souches hématopoïétiques, HSC ; et cellules souches mésenchymateuses, MSC) ont été séparées et cultivées en présence de surnageant de culture de tissu épithélial gastrique. Après culture, seules les MSC expriment des marqueurs épithéliaux (cytokératine 19 et TFF2).

Enfin, les auteurs ont essayé de comprendre le mécanisme de recrutement des BMDC au niveau de l'épithélium gastrique infecté. Des Western Blots ont montré une augmentation de

l'expression gastrique des facteurs CXCL12 et SCF. Ces deux facteurs sont connus pour leur capacité à recruter les cellules progénitrices médullaires.

Ces travaux proposent donc un nouveau modèle de carcinogenèse gastrique impliquant les cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse.

Dans ce modèle, la bactérie n'est pas éradiquée par l'organisme infecté, et l'infection devient chronique. L'inflammation tissulaire chronique qui en résulte aboutit à l'apparition de lésions tissulaires. Les cellules souches locales (dont le rôle sera discuté dans le paragraphe suivant) ne suffisent pas à régénérer l'épithélium gastrique. Cet échec des cellules souches locales entraîne le recrutement de MSC issues de la moelle osseuse et leur différenciation assurant une réparation tissulaire. Cependant et en raison de l'infection, l'épithélium gastrique demeure un environnement riche en cytokines pro-inflammatoires. Dans ce contexte, les MSC ne se différencient pas correctement en cellules épithéliales gastriques, et progressent vers un état métaplasique, dysplasique et finalement cancéreux. Les différentes étapes représentant l'évolution des cellules souches médullaires vers l'adénocarcinome gastrique en réponse à l'infection par *Helicobacter* sont schématisées dans la figure suivante (**Figure 10**).

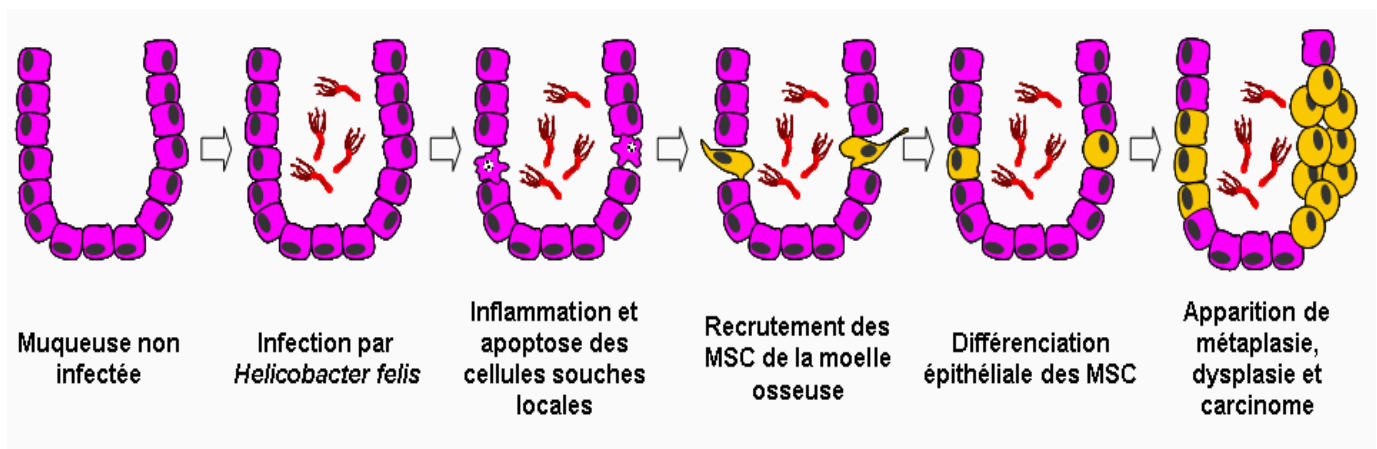


Figure 10. Schéma de l'initiation et du développement tumoral proposé par JeanMarie Houghton. L'infection de la muqueuse gastrique par *Helicobacter* est responsable d'une inflammation chronique et d'une apoptose des cellules souches locales. Les MSC de la moelle osseuse sont alors recrutées afin de rétablir une muqueuse normale. Cependant, dans un microenvironnement infectieux et inflammatoire, les MSC subissent une perturbation de leur différenciation et dérivent vers des cellules cancéreuses. Détails dans le texte. D'après Houghton *et al.*, Gastroenterology, 2005 (Houghton and Wang, 2005).

3. Renouveau tissulaire et cellules souches

Il apparaît nécessaire, afin de comprendre le rôle potentiel des cellules souches dans l'adénocarcinome gastrique, de définir ce type de cellules ainsi que les mécanismes physiologiques mis en jeu lors de la régénération ou réparation tissulaire.

3.1. Généralités

Tout au long de sa vie, le sujet doit remplacer les cellules mortes qui composaient ses tissus, qu'elles soient entrées en apoptose ou qu'elles aient subi une lésion, afin d'assurer le renouvellement tissulaire de ses organes.

Tous les tissus possédant des cellules spécialisées, il apparaît raisonnable de penser que le potentiel et les mécanismes de réparation sont variables entre eux. Cette variabilité de réparation tissulaire est étroitement dépendante de leur capacité proliférative, liée à la régulation du cycle cellulaire. En effet, les différents tissus peuvent être classés en 3 groupes.

Tout d'abord, les tissus dits permanents ou définitifs sont constitués de cellules ne pouvant pas se diviser, et ne possédant donc pas de potentiel de réparation. Ainsi, des lésions des neurones du système nerveux central ne peuvent être régénérées. De même, la régénération des fibres musculaires cardiaques après un infarctus est limitée.

Le second type de tissu correspond aux tissus quiescents ou stables, constitués de cellules qui ont quitté le cycle cellulaire (phase G0) mais qui peuvent le réintégrer sous l'effet de certaines stimulations. Ainsi, les cellules du foie, du rein ou du pancréas se divisent peu à l'état normal. Le potentiel prolifératif peut cependant être stimulé lors d'une augmentation de la mortalité cellulaire au sein du tissu.

Enfin, le dernier type de tissu correspond aux tissus labiles constitués de cellules engagées dans le cycle cellulaire. Les tissus qui se renouvellent tout le long de la vie de l'individu comme les épithélia ou la moelle osseuse entrent dans cette catégorie. En conditions pathologiques, le potentiel de régénération de ces cellules peut être encore augmenté. Ces tissus possèdent des cellules souches aux propriétés de prolifération illimitées. Ces cellules souches se divisent par mitose donnant deux cellules filles pouvant également rentrer en phase de mitose et reconstituer un pool de cellules différenciées suffisant. Les cellules ainsi obtenues subissent ensuite une étape de maturation aboutissant à des cellules adultes et fonctionnelles.

3.2. Renouvellement tissulaire du tractus gastrointestinal

Le tractus gastrointestinal (ou TGI), composé de cellules souches locales au sommet d'une hiérarchie définie, correspond donc à la catégorie des tissus labiles. L'organe du TGI dont les mécanismes de renouvellement cellulaire ont été les plus étudiés est l'intestin. De grandes similarités existent cependant entre la physiologie de l'intestin et de l'estomac, composés tout les deux d'une muqueuse épithéliale glandulaire.

L'épithélium gastrique a une architecture bien définie, avec de nombreuses invaginations appelées glandes (**Figure 11**). Ces repliements permettent d'augmenter la surface de la muqueuse et obtenir une absorption maximale des nutriments. La distribution des cellules à l'intérieur des glandes définit leur fonction (Brittan and Wright, 2002). Ainsi, la partie supérieure de la crypte, en contact avec la lumière gastrique est composée de cellules responsables de la production de mucus tapissant la face interne de l'estomac. La population située en dessous des cellules muqueuses correspond aux cellules souches appelées progéniteurs de part leur capacité de différenciation limitée. Ces cellules sont à elles seules responsables de la totale régénération de l'épithélium. La durée de renouvellement est variable en fonction du type cellulaire (4 à 6 jours pour les cellules muqueuses, 20 jours pour les cellules pariétales et 2 mois pour les cellules principales). Toutes les cellules situées au dessus ou en dessous de ces progéniteurs sont issues du même site et migrent au fur et à mesure du remplacement cellulaire. Les cellules suivantes correspondent aux cellules pariétales qui produisent l'acide chlorhydrique. Enfin, la base de la glande est constituée de cellules principales ou zymogènes, qui secrètent les enzymes du suc gastrique.

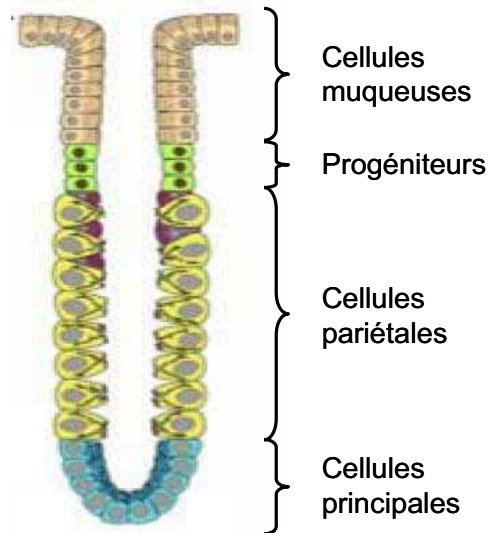


Figure 11. Schéma de l'organisation cellulaire au sein d'une glande de l'épithélium gastrique. Les cellules composant une glande sont organisées et différenciées selon leur localisation. Toutes les cellules sont issues de cellules progénitrices situées dans le premier tiers de la glande. Ces cellules pourront donner naissance aux cellules muqueuses, pariétales et principales. Détails dans le texte. D'après Goldenring *et al.*, *Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2006 (Goldenring and Nomura, 2006).

Le renouvellement de l'épithélium gastrique est donc assuré en permanence par des progéniteurs locaux. Cependant, les travaux de JM Houghton ont montré que, dans certaines circonstances, d'autres cellules souches peuvent se substituer aux cellules souches locales et jouer un rôle dans la réparation tissulaire gastrique : les cellules souches médullaires (Houghton *et al.*, 2004).

3.3. Différents types de cellules souches médullaires

3.3.1. Cellules souches hématopoïétiques

Les cellules souches hématopoïétiques ou HSC sont les cellules souches médullaires les mieux caractérisées donnant naissance à tous les types de cellules hématopoïétiques avec une hiérarchie bien connue (Kondo *et al.*, 2003) (**Figure 12**). Ces cellules sont caractérisées par leur potentiel à reconstituer l'hématopoïèse qui peut correspondre à la production journalière de 2×10^{11} érythrocytes et 10^{10} cellules de la lignée blanche. La différenciation et la maturation de ces cellules sont séquentielles et passent par différents stades correspondant à différents progéniteurs. Ainsi les HSC qui s'engagent dans les voies de différenciation perdent progressivement leur potentiel multipotent et gagnent des capacités de prolifération. Ainsi, ces cellules passent d'un état primitif multipotent à un état différencié.

D'une manière générale, un panel de marqueurs cellulaires de surface ($CD34^+$, $Thy-1^+$, $c-Kit^+$) et l'absence de marqueurs de lignée (Lin^-) caractérisent les HSC primitives. L'évolution de ces marqueurs permet de situer les cellules dans l'hématopoïèse en donnant une indication sur le niveau de différenciation.

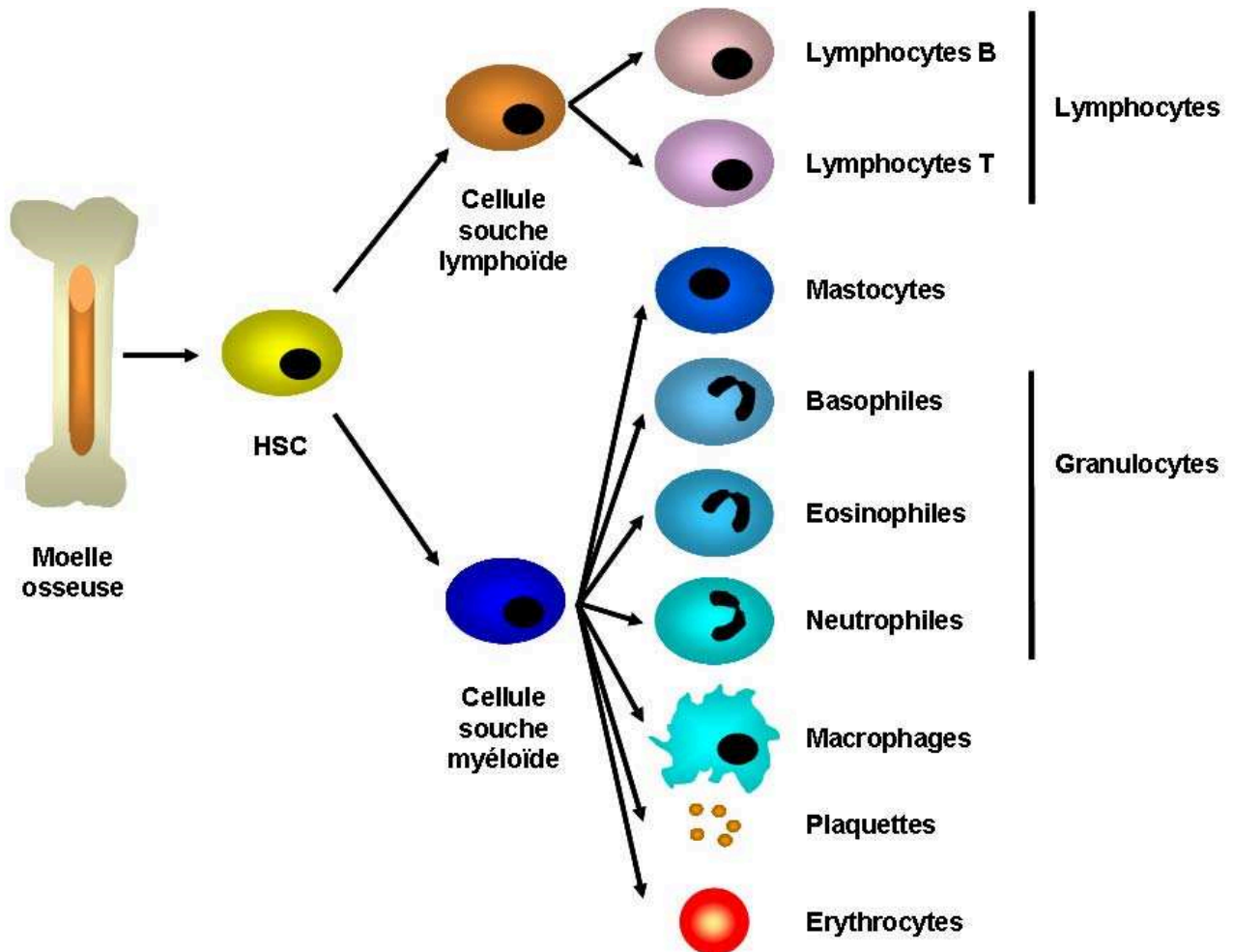


Figure 12. Hématopoïèse simplifiée. La première étape de différenciation permet l'engagement dans les voies myéloïde et lymphoïde. La première est à l'origine des précurseurs de lymphocytes B, des précurseurs thymiques capables de générer des lymphocytes T matures, des lymphocytes NK et des cellules dendritiques lymphoïdes. Le précurseur myéloïde est à l'origine des mastocytes, des granulocytes, des macrophages, des mégacaryocytes produisant des plaquettes et des précurseurs érythrocytaires. D'après Bellantuono *et al.*, Int J Biochem Cell Biol, 2004 (Bellantuono, 2004).

3.3.2. Cellules souches médullaires non hématopoïétiques

La présence de cellules souches non hématopoïétiques dans la moelle osseuse a été suggérée par les observations de Cohnheim, il y a 130 ans (Cohnheim, 1867). Ce pathologiste allemand travaillait sur la réparation tissulaire et a conclu que la plupart des cellules impliquées dans la réparation tissulaire sont issues du flux sanguin, et donc de la moelle

osseuse. Conheim a par la suite démontré que la moelle osseuse pouvait être source de fibroblastes synthétisant du collagène lors du processus de réparation tissulaire. Ces fibroblastes circulants, appelés fibrocytes, sécrètent des facteurs de croissance, cytokines inflammatoires et chimiokines importants pour le microenvironnement lors de la réparation tissulaire (Quan *et al.*, 2004). Les travaux de Friedenstein en 1976 ont par la suite montré que la moelle osseuse contient des cellules capables de se différencier en fibroblastes ou d'autres types cellulaires mésenchymateux (Friedenstein *et al.*, 1976). Pour cela, des biopsies de moelle osseuse ont été cultivées, puis après 4 heures, les cellules hématopoïétiques non adhérentes ont été éliminées. Les cellules adhérentes ainsi obtenues avaient une morphologie hétérogène, mais les plus adhérentes étaient fusiformes. Les cellules restaient en latence pendant une période de 2 à 4 jours avant de se multiplier rapidement. Après plusieurs passages, les cellules s'homogénéisaient avec une morphologie fusiforme. De plus, des colonies de cellules apparaissaient avec des structures morphologiques laissant penser à des dépôts d'os ou de cartilage (Friedenstein *et al.*, 1987).

Ces observations préliminaires ont par la suite été validées par de nombreuses études pendant les années 1980. Ainsi, il a été montré que les cellules adhérentes purifiées par la technique de Friedenstein étaient multipotentes et facilement différenciables en ostéoblastes (Luria *et al.*, 1987; Owen and Friedenstein, 1988), chondroblastes, adipocytes et même myoblastes (Wakitani *et al.*, 1995).

- Cellules Souches Mésenchymateuses (MSC)

Les cellules non hématopoïétiques issues de la moelle osseuse sont actuellement dénommées *Mesenchymal Stem Cells* pour leur capacité à se différencier en cellules de types mésenchymateux, ou *Marrow Stromal Cells* pour le rôle de soutien dans les structures mésenchymateuses. Ces deux dénominations portent le même acronyme : MSC. L'*International Society for Cellular Therapy* (ISCT) recommande comme désignation officielle *Multipotent Mesenchymal Stromal Cells* en gardant l'acronyme MSC (Horwitz *et al.*, 2005). Le *Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee* de l'ISCT a proposé un groupe de critères permettant de définir précisément les MSC humaines (Dominici *et al.*, 2006).

Trois critères ont été retenus :

- adhérence cellulaire au plastique;
- expression d'antigènes de surface spécifiques;
- potentiel de différenciation en adipocytes, ostéoblastes et chondrocytes.

Les techniques d'isolement, de caractérisation et le potentiel de différenciation de ces cellules seront discutées en détail dans les paragraphes suivants.

Il apparaît aujourd'hui qu'il existe de nombreux autres types de cellules souches adhérentes médullaires non hématopoïétiques. Ces différentes populations semblent posséder des potentiels de différenciation variables.

- *Multipotent Adult Progenitor Cells* (MAPC)

Jiang *et al.* ont isolé une population cellulaire de la moelle osseuse adulte dénommée *Multipotential Adult Progenitor Cells* (MAPC) (Jiang *et al.*, 2002a). Ces cellules sont proches des MSC mais elles diffèrent au niveau transcriptomique (Ulloa-Montoya *et al.*, 2007). Les MAPC peuvent être co-purifiées avec les MSC mais possèdent un potentiel de différenciation supérieur aux MSC, laissant penser que les MAPC correspondent à une population plus primitive (Reyes *et al.*, 2001). De plus, ces cellules semblent pouvoir être cultivées *in vitro* de manière infinie dans un milieu relativement pauvre, sans doute grâce à la présence de la télomérase qui permet de conserver la longueur des télomères après de nombreux doublements (Morrison *et al.*, 1996). L'existence des MAPC comme population distincte des MSC ou comme sous population n'est aujourd'hui pas bien définie. La proportion de MAPC serait de l'ordre de 1/1000 à l'intérieur de la sous population CD45⁻ et TER119⁻ (Jiang *et al.*, 2002a). Les MAPC peuvent être obtenues à partir de cultures de MSC après 25 à 30 doublements si les cultures sont réalisées sur fibronectine, en présence d'EGF (*Epithelial Growth Factor*) et de PDGF (*Platelet Derived Growth Factor*) et avec une concentration en sérum faible voir nulle (Verfaillie *et al.*, 2003).

- *Marrow-Isolated Adult Multilineage Inducible* (MIAMI) cells

D'Ippolito *et al.* ont isolé une population, appelée *MIAMI cells*, de cellules médullaires humaines en combinant des conditions de culture particulières (culture sur fibronectine en hypoxie en présence des cellules non adhérentes pendant 14 jours) (D'Ippolito *et al.*, 2004). Ces cellules expriment les marqueurs suivants : CD29, CD49a, CD63, CD81, CD90, CD122, CD164 et sont négatives pour : CD34, CD45. Elles présentent un potentiel de différenciation plus élevé que les MSC avec une possibilité d'engagement dans des voies neurales et endodermales.

- *Bone-Marrow Derived Cells* (BMDC)

De nombreuses études, particulièrement *in vivo*, n'ont pas fait la distinction des cellules souches utilisées. Ces études, utilisant des greffes de moelle osseuse totale, correspondant à un mélange de cellules souches hématopoïétiques, de cellules souches mésenchymateuses et de cellules plus différenciées, ne permettent pas d'associer les effets observés avec une population cellulaire particulière. Dans la suite de l'exposé, cette population très hétérogène de cellules médullaires sera dénommée BMDC pour *Bone-Marrow Derived Cells*.

Ces différentes appellations (MSC, MAPC et MIAMI *cells*) pour des cellules adhérentes médullaires non hématopoïétiques montrent la difficulté de standardisation du matériel biologique entre laboratoires. En effet, les MSC, MAPC et MIAMI *cells* sont des populations très proches partageant de nombreuses caractéristiques. Les techniques de purification de ces différentes populations sont aussi relativement proches indiquant l'importance de l'isolement sur le devenir et sur le potentiel des cellules obtenues.

4. Cellules souches mésenchymateuses (MSC)

4.1. Purification

Des MSC ont été isolées et cultivées à partir de diverses espèces animales incluant la souris (Phinney *et al.*, 1999), le rat (Javazon *et al.*, 2001), le chat (Martin *et al.*, 2002), le chien (Kadiyala *et al.*, 1997), le cochon (Pak *et al.*, 2003), le cochon d'inde (Friedenstein *et al.*, 1970), le cheval (Colleoni *et al.*, 2009) et le babouin (Bartholomew *et al.*, 2001) avec des succès variables dus à la contamination par des populations hématopoïétiques (Javazon *et al.*, 2004). Les différentes cultures obtenues montrent des cellules aux morphologies variables allant de la cellule fusiforme étroite à de larges cellules polygonales et pouvant mener à des cellules cuboïdes lors de la confluence.

De plus en plus d'études tendent à montrer qu'il est possible d'obtenir des MSC à partir de nombreux tissus différents de la moelle. En effet, des cellules aux particularités similaires aux MSC issues de moelle osseuse (adhérence au plastique, expression de marqueurs de surface et potentiel de différenciation) ont été purifiées à partir de tissus adipeux (Zuk *et al.*, 2002), sang périphérique (Kuznetsov *et al.*, 2001), pancréas (Seeberger *et al.*, 2006; Sordi *et al.*, 2005), sang de cordon ombilical (Bieback *et al.*, 2004), liquide amniotique (Nadri and Soleimani, 2007) ou tissu fœtal (O'Donoghue and Chan, 2006). Il apparaît donc clairement que des cellules au potentiel multipotent dérivant du mésenchyme peuvent être retrouvées

dans de nombreux tissus. Toutes les cellules répondant aux critères de MSC ne partagent cependant pas les mêmes propriétés. Ainsi, plusieurs équipes ont montré que l'expression des gènes des MSC peut être variable selon l'origine du tissu à partir duquel elles ont été purifiées (Djouad *et al.*, 2005; Nadri and Soleimani, 2007; Wagner *et al.*, 2005).

A l'heure actuelle, aucune technique d'isolement et de purification des MSC n'est standardisée, et les différences observées entre les études peuvent simplement être dues au fait que le protocole de purification diffère et que les cellules obtenues ne correspondent pas à la même population. Cette absence de standardisation pose donc de nombreuses questions quant aux paramètres importants pouvant influencer sur la qualité de la population cellulaire obtenue (**Figure 13**). Tout d'abord, l'espèce animale utilisée est importante, la même technique de purification chez l'homme ou la souris ne donnant pas le même niveau de succès (Javazon *et al.*, 2004). De même, le tissu à partir duquel les MSC sont purifiées joue une importance cruciale. La manière de cultiver les MSC, avec ou sans matrice, sur différents supports, peut affecter la morphologie, la prolifération ou le potentiel de différenciation des MSC. Les conditions et le temps de culture peuvent jouer un rôle important sur le protéome des MSC (Digirolamo *et al.*, 1999; Fehrer *et al.*, 2006; Javazon *et al.*, 2004; Wagner *et al.*, 2006). La variabilité individuelle du donneur peut jouer un rôle en raison du fonds génétique ou de la présence de certaines anomalies. En outre, l'âge du donneur est également à prendre en compte. Dans les modèles animaux, des souris possédant des fonds génétiques différents n'induisent pas de rendements quantitatifs et qualitatifs similaires (Phinney *et al.*, 1999). Il semble impossible de standardiser cette condition, cependant cette variabilité doit être prise en compte. Enfin, la méthode de purification peut perdre certaines sous populations ou au contraire amplifier uniquement une sous population non représentative. En effet, plusieurs marqueurs ont été utilisés pour purifier les MSC comme STRO-1, CD271, CD73 ou CD105 pour une sélection positive, ou CD45, Ter119 ou la glycophorine pour une sélection négative. Ces différents marqueurs n'étant pas spécifiques des MSC, la purification ne suffit pas à affirmer la pureté de la population.

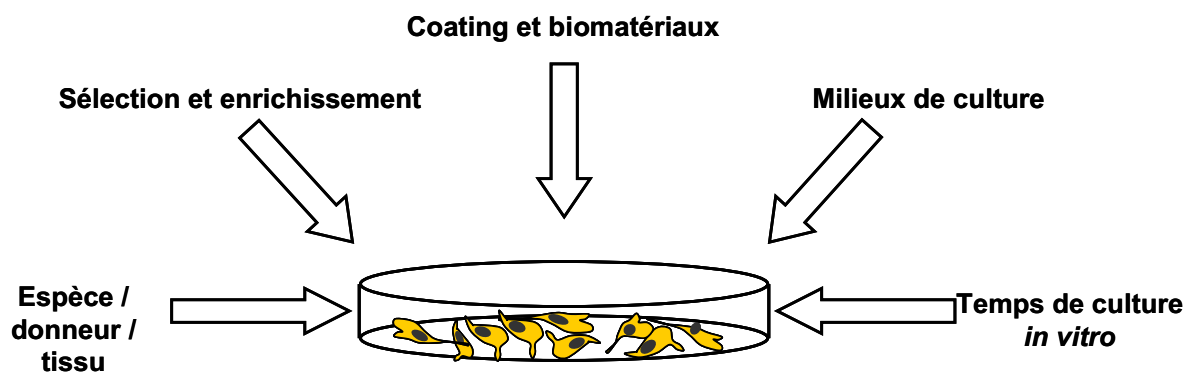


Figure 13. Paramètres critiques pour l'isolement des MSC. Différents protocoles d'isolement des MSC ont été décrits dans différentes études. Chacun des paramètres indiqués a des conséquences sur la composition des populations cellulaires obtenues et doit être pris en compte. D'après Wagner *et al.*, 2007, Stem cell Rev (Wagner *et al.*, 2006).

Le manque de marqueurs spécifiques des MSC contraint à l'utilisation d'un panel de marqueurs afin de pouvoir standardiser au maximum l'obtention de ces cellules. D'après l'ISCT, une population de MSC doit exprimer à plus de 95% les marqueurs CD73, CD90 et CD105. De plus, moins de 2% de la population doit exprimer les marqueurs hématopoïétiques CD11b, CD14, CD19, CD34, CD45 et HLA de classe II (Dominici *et al.*, 2006). Les MSC peuvent exprimer certains marqueurs supplémentaires comme le CD44, CD71, STRO-1 ainsi que les molécules d'adhérence CD106 (VCAM-1), CD166 (ALCAM), ICAM-1 et CD29. Il est généralement accepté que ces cellules n'expriment pas les marqueurs de costimulation CD40, CD80, CD86 ni les molécules d'adhérence CD31 (PECAM-1) CD18 (LFA-1) ou CD56 (NCAM-1) (Conget and Minguell, 1999; Galmiche *et al.*, 1993; Haynesworth *et al.*, 1992; Le Blanc *et al.*, 2003a; Pittenger *et al.*, 1999; Sordi *et al.*, 2005).

Il est très important de rappeler que les MSC n'expriment pas de marqueurs spécifiques et qu'une certaine hétérogénéité peut exister selon les espèces ou la méthode de purification (Ho *et al.*, 2008). De plus, le profil d'expression mesuré *in vitro* ne correspond pas forcément au profil d'expression existant *in vivo*.

Les MSC peuvent être cultivées pendant une période prolongée en culture, cependant à l'inverse des MAPC, elles vont perdre leur capacité de différenciation et rentrer en sénescence après 20 à 40 doublements (Bruder *et al.*, 1997; Deans and Moseley, 2000).

4.2. Potentiel de différenciation

4.2.1. Différenciation des MSC en adipocytes, ostéoblastes et chondrocytes

Les marqueurs de surface exprimés par les MSC n'étant pas spécifiques, il est nécessaire de vérifier les capacités de différenciation en plus des propriétés morphologiques et phénotypiques observées. D'après les recommandations de l'ISCT, il est nécessaire que les MSC disposent d'un potentiel de différenciation en adipocytes, ostéoblastes et chondroblastes en utilisant des conditions standard de différenciation *in vitro* (Dominici *et al.*, 2006).

Pour promouvoir la différenciation en adipocytes, les MSC sont typiquement cultivées en présence de dexaméthasone, d'insuline, d'isobutylxanthine et d'indométhacine. Si les cellules possèdent un potentiel de différenciation en adipocytes, des vésicules lipidiques apparaissent après une dizaine de jours de culture. Ces vésicules peuvent être révélées histologiquement par une coloration à l'Oil Red O. Les cellules expriment également des marqueurs protéiques de différenciation comme le PPAR- γ 2 (*Peroxisome Proliferation Activated Receptor γ 2*) ou le FABP aP2 (*Fatty Acid Binding Protein aP2*) (Pittenger *et al.*, 1999). Il est intéressant de noter que cette capacité de différenciation en cellule adipeuse pourrait être liée à l'observation du remplacement de la moelle par du tissu adipeux lors du vieillissement (Prockop, 1997).

Pour induire une différenciation en ostéoblastes, les MSC sont typiquement cultivées dans un milieu additionné d'acide ascorbique, de β -glycérophosphate et de dexaméthasone. Les MSC forment alors après une dizaine de jours de culture des agrégats surexprimant la phosphatase alcaline et montrant des accumulations calciques, pouvant être colorées à l'Alizarin Red S. Les ostéoblastes ainsi différenciés expriment des marqueurs protéiques de différenciation comme l'ostéopontine ou l'ostéonectine (Pittenger *et al.*, 1999). La capacité de différenciation des MSC en ostéoblastes n'est pas surprenante car la moelle osseuse est constituée de cellules remodelant en permanence les structures osseuses.

Enfin, l'induction de la différenciation chondrogénique est obtenue en cultivant les MSC dans un milieu déplété en sérum mais additionné de dexaméthasone, d'acide ascorbique et surtout de TGF- β 3. La présence de glucose semble également favoriser cette différenciation (Mackay *et al.*, 1998). Les cellules doivent également être cultivées en microculot afin de favoriser les échanges cellulaires et la formation de matrice extra-cellulaire (Johnstone *et al.*, 1998; Mackay *et al.*, 1998). Une coloration histologique montre alors un fort marquage au bleu de toluidine ou à la safranine O indiquant l'abondance de glycosaminoglycanes à

l'intérieur de la matrice extracellulaire. Les cellules expriment alors du collagène de type II, typique du cartilage articulaire (Pittenger *et al.*, 1999). Le potentiel de différenciation des MSC en chondrocytes pourrait expliquer le rôle de ces cellules dans la réparation de fractures (Prockop, 1997).

Pittenger *et al.* ont montré que seulement 1/3 des cellules de la moelle osseuse initialement adhérentes possèdent une capacité à se différencier dans les 3 lignées (100% en ostéoblastes, 80% en adipocytes et 33% en chondrocytes) (Pittenger *et al.*, 1999). D'autres études utilisant des clones ont également confirmé que toutes les cellules ne présentaient pas une capacité de différenciation en 3 lignées (Kuznetsov *et al.*, 1997; Muraglia *et al.*, 2000). Les ratios de cellules différenciées dans ces études varient sans doute en raison des différences dans les protocoles de différenciation ainsi que dans les techniques d'immortalisation des cellules (Muraglia *et al.*, 2000). En outre, Muraglia *et al.* ont montré que l'ajout de FGF-2 dans le milieu de culture des MSC humaines permettait d'augmenter le pourcentage de cellules multipotentes, probablement en évitant la différenciation et en conservant un phénotype multipotent (Muraglia *et al.*, 2000). La fréquence des MSC à l'intérieur de la moelle osseuse étant très faible, il apparaît possible que la très faible population possédant le maximum de capacités de pluripotence soit perdue lors de la purification cellulaire au profit de cellules plus engagées dans les voies de signalisation et donc plus fréquentes (**Figure 14**).

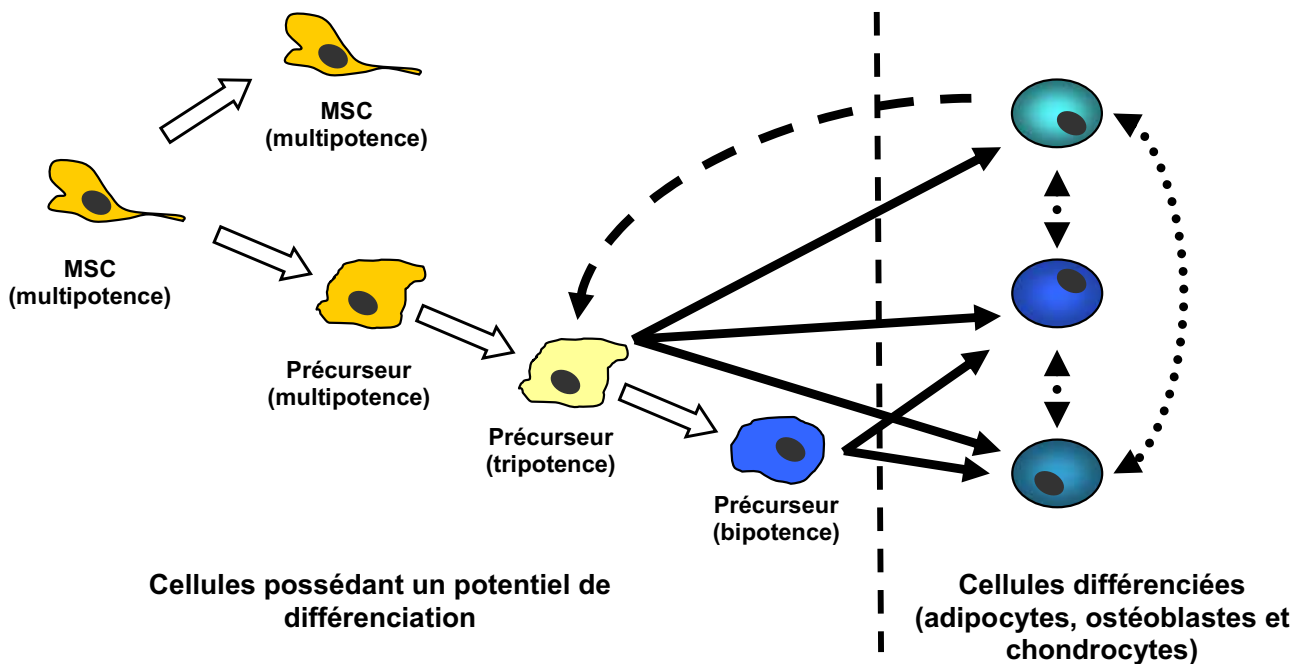


Figure 14. Modèle de la plasticité cellulaire des MSC. Les MSC non engagées dans des voies de différenciation peuvent s'auto-renouveler conservant une population de cellules souches. Les MSC peuvent également s'engager dans des voies de différenciation avec un potentiel de différenciation et une capacité d'autorenouvellement restreints. Ces cellules continuent de se diviser aboutissant à des cellules différenciées. Les MSC différenciées sont cependant capables de transdifférenciation donnant d'autres types cellulaires (pointillés). Il semblerait également que les MSC différenciées soient capables de dédifférenciation retrouvant un potentiel de prolifération et de multipotente plus élevé (tiret). D'après Baksh *et al.*, J. Cell. Mol. Med. 2004 (Baksh *et al.*, 2004).

Les voies conventionnelles de différenciation, qui suivent une hiérarchie linéaire en sens unique allant d'une cellule multipotente à une cellule différenciée, ne semblent pas s'appliquer à la plasticité des MSC. En effet, des expériences *in vitro* ont montré que des MSC différenciées pouvaient acquérir le phénotype d'autres lignées en réponse à des stimuli spécifiques (**Figure 14**) (Song and Tuan, 2004).

4.2.2. Potentiel de différenciation en d'autres lignées

Comme nous l'avons vu précédemment, il existe plusieurs familles de cellules souches adhérentes médullaires non hématopoïétiques (MSC, MAPC et MIAMI *cells*). Cependant, ces populations cellulaires étant très proches, nous pouvons résumer le potentiel de différenciation des cellules souches médullaires en regroupant les différentes appellations.

Différenciation *in vitro*

- Cellules médullaires et foie

Les MAPC sont capables de se différencier en *hepatocyte like cells* avec expression de cytokératine 18 et HNF3 β (*Hepatocyte Nuclear Factor 3 β*) (Schwartz *et al.*, 2002). Ces cellules différenciées partagent de nombreuses similitudes fonctionnelles avec des hépatocytes incluant la production d'urée et d'albumine. Après culture avec un milieu de différenciation endodermal (culture sur matrigel avec du FGF et du HGF), 60% des MAPC montrent une morphologie épithélioïde avec expression de cytokératine 18 (Jiang *et al.*, 2002a). Lysy *et al.* ont obtenu des résultats similaires avec des MSC exprimant l'albumine et le glycogène après culture avec un cocktail de facteurs de croissance (Lysy *et al.*, 2008).

- Cellules médullaires et muscles squelettiques

La coculture entre MSC humaines et myoblastes a montré que les MSC peuvent participer à la formation de myotubes avec expression du marqueur spécifique des chaînes lourdes de la myosine skMHC II (*skeletal Myosin Heavy Chain*) (Goncalves *et al.*, 2006). Cette différenciation passerait plutôt par une fusion entre MSC et myoblastes, et l'équipe a estimé que le nombre de MSC impliquées dans des fusions serait de l'ordre de 1 à 2%.

- Cellules médullaires et système nerveux

Les MAPC peuvent également se différencier en progéniteurs neuronaux après 14 jours de culture en milieu de différenciation (expansion en présence de PDGF-BB puis différenciation avec addition de bFGF) : 15% des MAPC présentent alors une morphologie et un phénotype d'astrocytes, 12% d'oligodendrocytes et 68% de neurones (Jiang *et al.*, 2002a).

La différenciation neurale des MIAMI *cells* a été montrée par expression de la β -tubuline de classe 3 spécifique des neurones et du récepteur au NGF (*Nerve Growth factor*) (D'Ippolito *et al.*, 2004).

- Cellules médullaires et poumons

Des MSC peuvent également se différencier *in vitro* en cellules épithéliales des petites voies aériennes supérieures. Dans un modèle de coculture entre ces cellules épithéliales stressées par un choc thermique à 42°C et des MSC humaines, une modification morphologique très rapide des MSC en cellules épithéliales (24h) et une expression de différents marqueurs épithéliaux (cytokératines 17, 18 et 19) et pulmonaires (CC26) sont observées. Cette différenciation passe par une étape de fusion entre les deux types cellulaires

(Spees *et al.*, 2003). Le choc thermique peut dans cette expérience être associé à une lésion cellulaire.

A l'inverse, Wang *et al.* ont montré que les MSC étaient capables de se différencier en cellules épithéliales des voies aériennes sans fusion. L'absence de fusion a été montrée d'une part en utilisant un système de coculture entre cellules épithéliales et MSC séparées par un insert de culture ne permettant pas d'échanges de cellules entre le compartiment épithélial et le compartiment mésenchymateux; et d'autre part en réalisant des cocultures directes entre cellules marquées à la GFP (*Green Fluorescent Protein*) ou à la RFP (*Red Fluorescent protein*). Ces travaux ont montré une différenciation pour environ 10% des MSC (Wang *et al.*, 2005).

Un modèle de coculture entre MSC et cellules pulmonaires humaines a également permis d'obtenir une différenciation des MSC et l'apparition de marqueurs épithéliaux (cytokératines 5, 8, 14, 18 et 19 ; ZO-1) et pulmonaires (*Pro-surfactant protein C*) (Popov *et al.*, 2007). Cette étude a utilisé deux modèles, l'un permettant la fusion, par coculture directe, l'autre ne permettant que les échanges moléculaires, par un insert de culture, montrant que les deux mécanismes permettent l'expression de marqueurs épithéliaux par des MSC. Cependant, le mécanisme de fusion serait responsable d'un pourcentage faible de cellules différenciées de l'ordre de 0,1 à 0,5%, alors que le mécanisme de transdifférenciation concernerait de 10 à 15% des MSC.

- Cellules médullaires et pancréas

D'Ippolito *et al.* ont montré que les MIAMI *cells* peuvent se différencier en cellules pancréatiques avec des marqueurs spécifiques ou exprimant des structures proches des îlots pancréatiques avec expression d'insuline, de glucagon et de différents facteurs de transcription impliqués dans le développement des cellules β (D'Ippolito *et al.*, 2004).

- Cellules médullaires et épithélium non différencié

Des MSC de rat peuvent présenter une morphologie et des marqueurs épithéliaux (cytokératines 5 et 8, ZO-1 et des canaux sodium épithéliaux, ENaC) après culture sur des inserts de culture (Shu *et al.*, 2006). Cette différenciation serait essentiellement due à la culture sur insert et à une concentration cellulaire importante.

Un protocole de différenciation en cellules épithéliales a également été proposé par l'équipe de Paunescu (Paunescu *et al.*, 2007). Ces travaux ont montré l'apparition de marqueurs épithéliaux (cytokératines 18 et 19) après culture des MSC humaines en présence

de KGF, EGF, IGF-2 et HGF. Cependant, ce protocole de différenciation ne semble pas avoir été repris dans la littérature.

- Cellules médullaires et disques intervertébraux

Une coculture directe entre des MSC et des cellules du *nucleus pulposus* des disques intervertébraux induit une modification du profil d'expression des gènes des MSC qui devient semblable à celui des cellules du *nucleus pulposus*. Même en réalisant une coculture en microculot, permettant des contacts cellules-cellules accentués, aucun phénomène de fusion n'a été détecté par FISH (Vadala *et al.*, 2008).

Différenciation *in vivo*

Jiang *et al.* ont montré la capacité de différenciation de ces cellules *in vivo* après injection de MAPC marquées dans des blastocytes de souris. La présence de cellules marquées, donc issues de MAPC, a été retrouvée dans de multiples organes incluant la cerveau, les poumons, le myocarde, les muscles striés, le foie, l'intestin, les reins, la rate, la moelle osseuse, le sang et la peau. L'injection de MAPC dans l'animal adulte montre que ces cellules peuvent migrer dans différents organes et s'y différencier comme les tissus hématopoïétiques (sang, moelle osseuse et rate) et l'épithélium des poumons, foie, estomac et intestins (Jiang *et al.*, 2002a).

- Cellules médullaires et foie

Lysy *et al.* ont montré que les MSC différenciées *in vitro* en hépatocytes puis injectées dans le foie de souris conservent les marqueurs hépatocytaires mais perdent les marqueurs mésenchymateux (fibronectine, vimentine). En revanche, l'injection de MSC non différenciées dans le foie confirme la possibilité d'acquisition de marqueurs hépatocytaires avec cependant une conservation des marqueurs mésenchymateux, ce qui montre l'importance du conditionnement pour obtenir une maturation terminale (Lysy *et al.*, 2008). Des greffes de moelle osseuse chez l'animal irradié montrent également une réparation tissulaire par différenciation des cellules médullaires en hépatocytes (Petersen *et al.*, 1999; Theise *et al.*, 2000). Des résultats similaires ont été obtenus chez l'homme (Alison *et al.*, 2000; Korbling *et al.*, 2002)

- Cellules médullaires et muscle cardiaque

Des greffes cardiaques entre patients hommes et femmes ont montré que le cœur après greffe contient des cellules cardiaques provenant du receveur, suggérant l'existence de progéniteurs extracardiaques capables de régénérer des myocytes (Quaini *et al.*, 2002). De

plus, des études sont actuellement en cours pour évaluer l'effet de l'injection de cellules médullaires après greffe cardiaque. Ces études montrent que les cellules médullaires amélioreraient la néovascularisation du greffon et les fonctions cardiaques (Tse *et al.*, 2003a).

Des résultats allant dans le même sens ont été obtenus chez la souris où les MSC peuvent être recrutées au niveau du cœur après un infarctus du myocarde (Fukuda and Fujita, 2005).

- Cellules médullaires et muscles squelettiques

L'injection de cellules médullaires au niveau d'un muscle endommagé entraîne une différenciation myogénique et participe à la réparation des fibres endommagées (Ferrari *et al.*, 1998). Il semblerait que cette réparation soit due aux cellules adhérentes plutôt qu'à la population non adhérente. Une seconde étude a montré la progression du recrutement des cellules médullaires dans la réparation musculaire. Cette étude a montré que les cellules médullaires sont tout d'abord recrutées au niveau de la niche des cellules souches musculaires avant de pouvoir régénérer les fibres. Ces fibres peuvent être obtenues par différenciation ou fusion avec des cellules de l'hôte (LaBarge and Blau, 2002).

- Cellules médullaires et système nerveux

Différentes études ont montré que les cellules issues de la moelle osseuse pouvaient être des progéniteurs des cellules du système nerveux central.

Les BMDC seraient capables de se différencier en *neurone-like cells*, mais leur rôle fonctionnel n'a pas encore été montré (Brazelton *et al.*, 2000; Mezey *et al.*, 2000). Confirmant les phénotypes obtenus *in vitro*, les BMDC seraient également capables de se différencier en oligodendrocytes *in vivo* (Akiyama *et al.*, 2002).

- Cellules médullaires et rein

Des greffes de reins entre patients hommes et femmes ont montré que des cellules extra-rénales pouvaient participer à la régénération tissulaire. De plus, un modèle murin a permis de montrer l'importance de cellules médullaires dans le renouvellement normal mais également dans la réparation tissulaire du rein (Poulsom *et al.*, 2001).

- Cellules médullaires et pancréas

Les BMDC pourraient également exprimer différents marqueurs des cellules β pancréatiques chez la souris (Hess *et al.*, 2003; Ianus *et al.*, 2003). Ce rôle des BMDC dans le renouvellement des cellules pancréatiques passerait par une transdifférenciation et non par fusion avec les cellules de l'hôte (Ianus *et al.*, 2003).

- Cellules médullaires et poumons

Chez la souris, les BMDC sont capables de se différencier en épithélium bronchique, en pneumocytes de type 2 et éventuellement en pneumocytes de type 1 (Krause *et al.*, 2001). Le rôle des MSC dans la réparation pulmonaire a également été démontré chez la souris après avoir induit des cassures de l'ADN par de la bléomycine (Kotton *et al.*, 2001).

- Cellules médullaires et peau

Chez l'homme et la souris, les BMDC peuvent également être recrutées au niveau de la peau (Korbling *et al.*, 2002; Krause *et al.*, 2001). Ce recrutement passerait par deux étapes, tout d'abord un recrutement puis une différenciation en cellules fonctionnelles. Il semblerait qu'une blessure soit indispensable pour qu'il y ait recrutement des cellules médullaires (Badiavas *et al.*, 2003).

- Cellules médullaires et tractus gastrointestinal

Les MAPC injectées par voie intraveineuse sont capables d'être recrutées puis d'être la source de cellules cryptiques intestinales (Jiang *et al.*, 2002a). Des cellules possédant un chromosome Y sont également retrouvées au niveau de l'œsophage, de l'estomac et des intestins chez la femme ayant bénéficiée d'une greffe de moelle osseuse masculine (Korbling *et al.*, 2002). De plus, il apparaît que les zones d'inflammation chronique (suite à l'apparition d'ulcères ou de maladie du greffon contre l'hôte) contiennent un plus grand nombre de cellules médullaires (Okamoto *et al.*, 2002).

Des expériences de greffes de BMDC dans des souris irradiées ont montré que les BMDC sont capables de fusionner avec les cellules épithéliales intestinales normales ou néoplasiques. De manière intéressante, il semblerait que le recrutement de BMDC nécessite une lésion car les BMDC ne sont pas recrutées si les souris ne subissent pas d'irradiation préalable. Cette étude n'exclue pas le phénomène de transdifférenciation, mais la fusion semble être le mécanisme prépondérant dans la réparation épithéliale intestinale. Des résultats similaires ont été obtenus en injectant des HSC au lieu des BMDC montrant sans doute leur rôle prépondérant par rapport aux autres cellules souches médullaires (Rizvi *et al.*, 2006).

Toutes ces données montrent que les cellules issues de la moelle osseuse possèdent un potentiel de différenciation extrêmement important. Il semblerait que les BMDC jouent un rôle crucial dans la réparation tissulaire plus que dans le renouvellement physiologique tissulaire.

4.2.3. Mécanismes de différenciation

Différenciation et fusion

Nous avons vu que les BMDC sont capables d'une grande plasticité en adoptant les caractéristiques et fonctions *in vivo* et *in vitro* de nombreux types cellulaires. Cependant, certaines études montrent que ces différenciations peuvent être dues à des fusions cellulaires ce qui limiterait le caractère multipotent de ces cellules. Les BMDC pourraient ainsi « adopter » le phénotype de n'importe quel type cellulaire en fusionnant avec celui-ci.

Terada *et al.* ont mélangé des BMDC marquées et résistantes à la puromycine avec des cellules souches embryonnaires (cellules ES) murines. Ce mélange aboutit à l'apparition de cellules marquées et résistantes à la puromycine avec un phénotype de cellules ES. Ces BMDC présentant des caractéristiques de cellules ES possèdent un potentiel de différenciation dans les différents linéages mésodermique, endodermique et ectodermique. Toutes ces cellules présentent une hyperploïdie montrant une fusion avec les cellules ES. Il est intéressant de noter que le pourcentage de cellules fusionnées est très faible avec de 2 à 11 clones obtenus pour 10^6 BMDC initiales. Cependant, les cellules fusionnées pourraient avoir un avantage de croissance ou de survie par rapport à leurs cellules d'origine après complémentation de certains gènes déficients (Terada *et al.*, 2002).

Comme nous l'avons vu dans le paragraphe précédent, les MSC peuvent également fusionner avec des myoblastes. Dans ces expériences, le pourcentage de cellules fusionnées est faible, entre 1 et 2% (Goncalves *et al.*, 2006). De manière similaire, dans les expériences *in vitro* de différenciation en cellules épithéliales des petites voies aériennes ou pulmonaires, l'expression de marqueurs épithéliaux passerait par une fusion. Le pourcentage de MSC fusionnées serait inférieur à 4% (Popov *et al.*, 2007; Spees *et al.*, 2003).

Afin de montrer si la différenciation en cellules épithéliales au niveau des poumons, foie et peau est due à une fusion, l'équipe de Harris *et al.* ont mis au point un modèle complexe. Dans ce système, des souris Cre positives sont irradiées puis reçoivent une greffe de moelle osseuse de souris transgéniques possédant un gène rapporteur sous la dépendance de Cre. Ces travaux ont montré que les différentes cellules épithéliales issues des BMDC n'ont pas subi de fusion et se sont bien différenciées (Harris *et al.*, 2004).

Les conséquences possibles du phénomène de fusion dans l'initiation et le développement tumoral seront discutées dans le paragraphe suivant.

Il apparaît donc aujourd'hui que deux mécanismes soient possibles pour que les BMDC puissent acquérir un nouveau phénotype, l'un passant par la transdifférenciation et l'autre par la fusion. La prévalence d'un mécanisme sur l'autre ne fait pas aujourd'hui l'unanimité.

Fusion et cellules cancéreuses

Les cellules résultant de la fusion de deux types cellulaires distincts sont dénommées hétérocaryons, afin de suggérer l'origine hétérologue de ces cellules plurinucléées, à l'inverse des syncytia qui correspondent à des cellules multinucléées issues de la fusion d'un même type cellulaire. Le terme syncaryon correspond lui à des cellules provenant d'une fusion mais possédant un noyau unique (**Figure 15**).

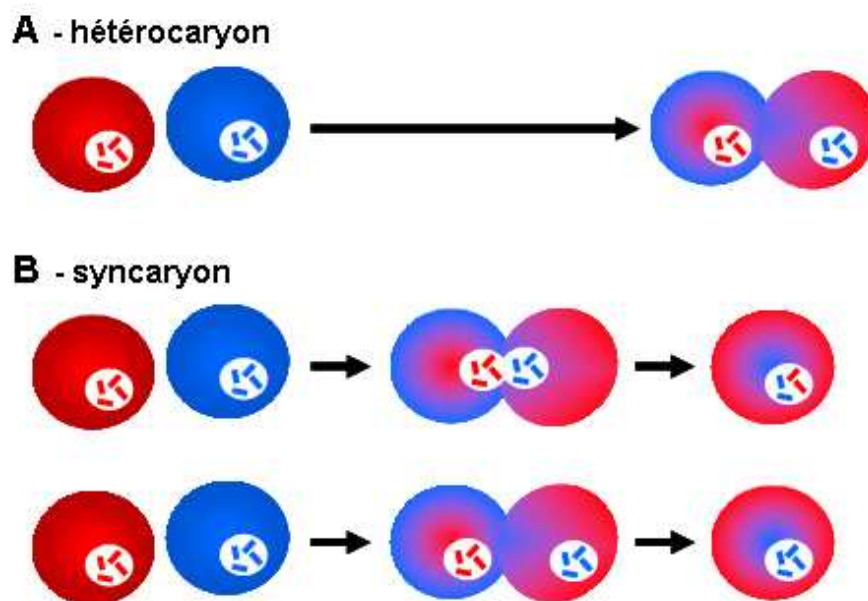


Figure 15. Mécanismes de fusion cellulaire. A/ Des cellules de lignées différentes peuvent fusionner donnant une cellule avec plusieurs noyaux, appelée hétérocaryon. Les deux noyaux ne sont pas fusionnés, et les cellules peuvent alors changer de phénotype. B/ Des cellules de lignées différentes peuvent fusionner donnant une cellule avec un noyau unique, appelé syncaryon. Le syncaryon peut provenir d'une fusion nucléaire ou de la perte d'un des noyaux. D'après Ogle *et al.*, Nat Rev Mol Cell Biol, 2005 (Ogle *et al.*, 2005).

Les mécanismes par lesquels deux cellules ou plus peuvent fusionner, ou la manière dont les chromosomes sont triés ou éliminés dans la formation d'un syncaryon sont encore inconnus (Ogle *et al.*, 2005).

De nombreux arguments plaident actuellement en faveur d'un rôle de ces cellules fusionnées, et plus particulièrement des cellules souches, dans la réparation tissulaire (voir paragraphe précédent). La fusion de cellules aboutissant à la formation de syncaryons peut également expliquer en partie la progression tumorale. La fusion de cellules souches avec des cellules différenciées pourrait reprogrammer le noyau des cellules différenciées, conduisant à

l'apparition de cellules ayant un avantage prolifératif ou de survie. La fusion des noyaux et le mélange de matériel génétique pourraient par la suite expliquer l'apparition de cellules cancéreuses. Cette hypothèse est étayée par l'observation que les cellules tumorales contiennent un nombre anormal de centrosomes, pouvant être expliqué par un phénomène de fusion (Lingle *et al.*, 1998; Ogle *et al.*, 2005). George E. Parris va plus loin en suggérant que la fusion est un évènement indispensable à l'apparition de tumeurs (Parris, 2005). Selon cette hypothèse, le génome de cellules cancéreuses devrait être suffisamment stable pour permettre une réplication rapide, ce qui serait en contradiction avec l'apparition de mutations génétiques comme seule origine tumorale ; ces mutations aléatoires ayant une grande probabilité de toucher des gènes essentiels. Pour cet auteur, une cellule anormale est vouée à disparaître à moins qu'elle ne fusionne avec une cellule saine. Cette fusion entraînerait l'apparition d'un hétérocaryon qui subirait une « catastrophe mitotique » menant à l'apparition de cellules aneuploïdes responsables de la progression tumorale.

De plus, le rôle de la fusion cellulaire a également été évoqué dans l'apparition de métastases. En effet, l'apparition de cellules tumorales possédant un phénotype invasif pourrait être la conséquence d'une fusion entre une cellule possédant des anomalies génétiques avec une cellule aux propriétés migratoires comme des macrophages ou des BMDC. Ainsi, la fusion d'une cellule mélanomateuse avec un macrophage entraîne la formation d'une cellule fille possédant le matériel génétique des deux cellules mères. Cette cellule provenant d'une fusion possède des capacités migratoires et métastatiques lorsqu'elle est injectée chez l'animal (Pawelek and Chakraborty, 2008).

Il n'est cependant pas exclu que la fusion cellulaire puisse également correspondre à un mécanisme anti-tumoral. En effet, la fusion d'une cellule possédant des anomalies génétiques (par exemple mutation de gènes suppresseurs de tumeur) avec une cellule normale pourrait conduire à une réparation ou à une compensation des anomalies génétiques à l'origine de l'initiation tumorale.

4.3. Recrutement

De nombreuses études ont montré la capacité des MSC à être recrutées dans différents tissus et organes. L'injection systémique de MSC conduit à une colonisation de la moelle osseuse, de la rate, des intestins, des reins, des poumons, du foie, du thymus, de la peau et des tissus mésenchymateux (Allers *et al.*, 2004; Devine *et al.*, 2001; Devine *et al.*, 2003). Ce recrutement apparaît spécifique et consécutif à l'apparition d'inflammation, de lésions ou de tumeurs (voir paragraphe sur la différenciation).

Le recrutement de ces cellules au niveau d'un tissu spécifique nécessite la mise en place de mécanismes particuliers permettant le passage dans la circulation sanguine, l'attachement à l'endothélium vasculaire et enfin la diapédèse des MSC.

Ce mécanisme de recrutement n'est pas à l'heure actuelle entièrement défini mais il semblerait que le processus soit similaire au recrutement des leucocytes aux sites inflammatoires.

4.3.1. Modèle de recrutement, l'exemple des leucocytes

Le mécanisme du *homing* des leucocytes en réponse à des stimuli inflammatoires est un processus bien caractérisé qui met en jeu des sélectines, intégrines et autres molécules d'adhérence.

La cascade de réactions entrant en jeu débute par l'expression de sélectines par les cellules endothéliales à proximité d'une zone inflammatoire. Ces sélectines sont la cible spécifique de molécules exprimées sur les leucocytes circulants. Ainsi, ces interactions de faible intensité entre les cellules endothéliales et les leucocytes permettent un ralentissement des cellules circulatoires par rapport au flux sanguin. Ce phénomène est communément appelé roulement ou *rolling* (**Figure 16**).

Les cellules endothéliales présentent également à leur surface certaines chimiokines qui sont capables d'activer les cellules possédant des récepteurs spécifiques. Par exemple, les cellules endothéliales peuvent exprimer la chimiokine CCL21 dont le récepteur est présent sur les lymphocytes naïfs. La liaison de CCL21 à son récepteur est responsable de l'activation des lymphocytes qui adhèrent alors à l'intégrine endothéliale ICAM-1 (Miyasaka and Tanaka, 2004). Ainsi, les cellules circulantes sont activées par différentes chimiokines et expriment les récepteurs spécifiques des intégrines à la surface des cellules endothéliales. Cette adhérence est responsable d'un arrêt de la cellule immunitaire par rapport au flux sanguin (Miyasaka and Tanaka, 2004).

Les différents types cellulaires seront plus ou moins spécifiques d'un panel de plusieurs intégrines. Ainsi, de nombreuses interactions ont alors lieu entre les cellules endothéliales et les cellules circulantes impliquant PECAM-1, ICAM-1, VE-cadhérine, CD11a/CD18, IAP, VLA-4. La cellule circulante ainsi stoppée traverse ensuite la membrane endothéliale par diapédèse (Fox *et al.*, 2007; Vestweber, 2007).

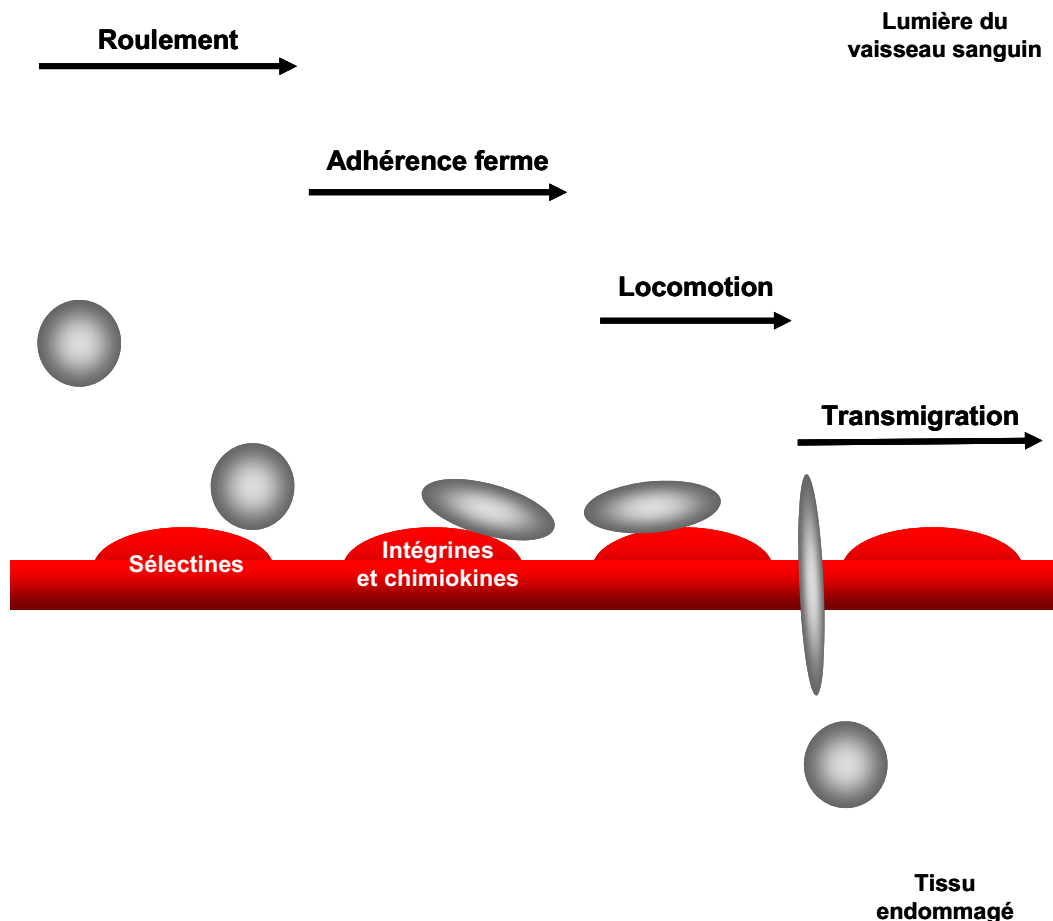


Figure 16. Modèle de recrutement des MSC. Le processus de la migration transendothéliale des MSC semble similaire à celui des leucocytes. Une première reconnaissance entre les sélectines et les MSC permet un ralentissement cellulaire. Puis des interactions plus importantes impliquant intégrines et chimiokines sont responsables d'un arrêt de la cellule. Les signaux provenant du site inflammatoire ou lésé activent la diapédèse des MSC à travers la membrane endothéliale. D'après Fox *et al.*, Br J Haematol, 2007 (Fox *et al.*, 2007).

4.3.2. Différences entre migration des leucocytes et MSC

Même si le principe de migration apparaît similaire entre les leucocytes et les MSC, le jeu de molécules impliquées est différent. Ainsi, les récepteurs endothéliaux des leucocytes circulants correspondent essentiellement à des L- et E-sélectines, alors que les MSC reconnaîtraient plutôt des P-sélectines. En effet, Ruster *et al.* ont montré que des MSC injectées en intraveineuse chez la souris présentaient une capacité diminuée de *rolling* si les souris étaient déficientes en P-sélectines. Cependant, les récepteurs connus de la P-sélectine (CD24, *P-Selectin Glycoprotein Ligand-1*) ne sont pas exprimés sur les MSC, suggérant le rôle de molécules différentes (Ruster *et al.*, 2006).

Concernant l'activation des capacités migratoires des MSC, il a été montré que ces cellules expriment de nombreux récepteurs aux chimiokines comme CCR1, CCR4, CCR6,

CCR7, CCR9, CCR10, CXCR4, CXCR5, CXCR6 et CX3CR1 sur les MSC humaines ou CCR2, CCR5, CXCR4 et CX3CR1 sur les MSC de rat (Honczarenko *et al.*, 2006; Ji *et al.*, 2004; Ruster *et al.*, 2006; Sordi *et al.*, 2005; Von Luttichau *et al.*, 2005; Wynn *et al.*, 2004).

4.3.3. Existence de MSC circulantes

L'existence de MSC circulantes dans des conditions physiologiques normales prête encore à controverse. Kutznetsov *et al.* ont réussis à isoler à partir du sang de 4 espèces animales des cellules aux phénotypes et aux capacités de différenciation proches des MSC mais présentant un profil d'expression de marqueurs de surface diff rent (Kuznetsov *et al.*, 2001). De manière plus intéressante, Mansilla *et al.* ont caractérisé des MSC dans le sang de patients sains ou présentant des brûlures (Mansilla *et al.*, 2006). Des tests d'identification des MSC par cytométrie ont été réalisés 3 jours après la blessure et ont permis de corréler le nombre de MSC présentes dans le sang avec l'importance de la brûlure. Des MSC peuvent également être retrouvées chez le patient sain mais à des concentrations bien inférieures à celle des patients blessés, montrant encore une fois le rôle des MSC dans la réparation tissulaire (Mansilla *et al.*, 2006). De même, Wang *et al.* ont démontré une diminution de la concentration de MSC circulantes une semaine après un infarctus du myocarde, suggérant ici aussi un rôle de ces cellules dans la réparation tissulaire (Wang *et al.*, 2006). Des études montrant la présence de cellules présentant un phénotype de MSC peuvent également être retrouvées chez les patients souffrant d'un cancer du sein et traités au G-CSF ou GM-CSF (Fernandez *et al.*, 1997). Cependant, ces résultats ont été critiqués par la suite, les cellules ainsi isolées pouvant simplement correspondre à des monocytes (Purton *et al.*, 1998). Cependant, d'autres études n'ont pas confirmé l'existence de MSC circulantes (Lazarus *et al.*, 1997; Wexler *et al.*, 2003).

4.3.4. Recrutement *in vitro*

Plusieurs équipes ont travaillé sur les capacités invasives et migratoires des MSC *in vitro*. Ces études ont permis de montrer que les récepteurs de chimiokines à la surface des MSC étaient fonctionnels et spécifiques. Ainsi, certains facteurs de croissance comme le BMP-2, BMP-4 et le PDGF-BB sont capables de stimuler la migration des MSC (Fiedler *et al.*, 2002). Par ailleurs, le HGF, les PDGF-AA, PDGF-AB, VEGF, IGF-1, CXCL12, CCL25 et le BMP-7 peuvent avoir un effet chimioattractant (Binger *et al.*, 2009; Forte *et al.*, 2006; Mishima and Lotz, 2008; Son *et al.*, 2006). Le PDGF combiné au VEGF peut induire la migration de MSC à travers une couche de matrigel (Spaeth *et al.*, 2008).

Ponte *et al.* ont étudié *in vitro* les effets de 16 chimiokines et facteurs de croissance sur les capacités migratoires des MSC à travers une couche de gélatine (Ponte *et al.*, 2007). Cette équipe a montré que les effets les plus importants étaient obtenus avec les PDGF, IGF-1, EGF, HGF, CCL22, CCL5 et CXCL12. De plus, la préincubation des cellules avec du TNF α augmente les capacités migratoires des MSC exercées par les chimiokines (CXCL12, CCL5 et CCL22). Ces résultats montrent l'importance de l'état inflammatoire dans la mobilisation des MSC.

Des résultats similaires ont été montrés en utilisant des cellules issues du rat, avec un rôle du PDGF-BB, BMP-2 et FGF-2 et du lapin avec PDGF-BB, HB-EGF, PDGF-AB, EGF, thrombine et FGF-2 (Li *et al.*, 2007c; Ozaki *et al.*, 2007; Uchida *et al.*, 2007).

D'autres types de molécules peuvent être responsables de l'activation des capacités migratoires de MSC. Ainsi, les ligands des TLR 4, 9 et surtout 3 peuvent jouer un rôle chimioattractant important (Tomchuck *et al.*, 2008). En revanche, l'activation du TLR 2 inhiberait les capacités migratoires des MSC (Pevsner-Fischer *et al.*, 2007).

Une étude intéressante de Secchiero *et al.* a également permis de montrer un rôle de TRAIL dans le recrutement des MSC *in vitro* (Secchiero *et al.*, 2008). TRAIL est un facteur cytotoxique dont le récepteur spécifique est exprimé en particulier sur les cellules tumorales (Zauli and Secchiero, 2006). Les MSC possèdent également certains récepteurs de ce facteur mais ne sont pas sensibles à ses effets cytotoxiques (Secchiero *et al.*, 2008). Les capacités de lutte contre le développement tumoral de TRAIL associées au recrutement des MSC renforcent l'idée du rôle des MSC comme agent anti-tumoral. Par ailleurs, des cellules tumorales issues de cancer du sein secrètent de la cyclophiline B, du HDGF, VEGF, FGF-2 capables de recruter des MSC (Lin *et al.*, 2008; Ritter *et al.*, 2008).

4.3.5. Recrutement *in vivo*

Après un infarctus du myocarde, les MSC peuvent être recrutées au niveau du ventricule lésé suite à une production de CXCL12 (Abbott *et al.*, 2004). De même, après apparition de lésions cérébrales, le niveau de CCL2 augmente. Un extrait de ce tissu est alors capable d'activer les capacités migratoires des MSC (Wang *et al.*, 2002a). CCL3 ou CXCL8 peuvent également jouer un rôle dans la migration des MSC au niveau des lésions cérébrales (Wang *et al.*, 2002b). Dans le cadre du cancer du sein, CCL2 peut également être responsable du recrutement des MSC au niveau des cellules tumorales (Dwyer *et al.*, 2007). Le rôle du CCL2 n'a pas été retrouvé *in vitro* par l'équipe de Ries, en revanche cette étude a validé celui de CXCL8 et CXCL12 (Ringe *et al.*, 2007). Enfin, l'équipe de Houghton a démontré une

augmentation des concentrations de CXCL12 et de SCF lors de l'infection par *H. felis* préalable au recrutement de MSC (Houghton *et al.*, 2004).

Il apparaît nécessaire de rappeler que les conditions environnementales jouent un rôle dans le profil d'expression des récepteurs aux chimiokines des MSC. Ainsi, le TNF α , cytokine pro-inflammatoire, augmente l'expression des récepteurs des MSC, montrant l'importance du milieu inflammatoire (Ponte *et al.*, 2007).

4.3.6. Rôle des métalloprotéases matricielles

L'invasion vers un site spécifique nécessite que les MSC puissent traverser la matrice extracellulaire qui se trouve entre les différentes cellules d'un tissu. La dégradation de ces matrices est en partie due aux métalloprotéases matricielles (MMP) qui correspondent à une famille de différents membres ayant chacun une spécificité pour un type de matrice extracellulaire. Ries *et al.* et Son *et al.* ont montré l'importance de ces protéines pour permettre l'invasion des MSC et plus particulièrement de MMP2 (clivage des collagènes et laminines) et MMP14 (clivage et activation de la pro-MMP2). De plus, le rôle des régulateurs de ces MMP, comme celui du *Tissue Inhibitor Metalloproteinase 2* (TIMP-2) semble être important (Ries *et al.*, 2007; Son *et al.*, 2006).

5. Cellules souches mésenchymateuses et cancers

5.1. Cellules Souches Cancéreuses (CSC)

Le terme cellules souches cancéreuses (CSC) a été employé pour la première fois en 1982 pour décrire les cellules issues d'un cancer du poumon capables de former des colonies *in vitro* et d'initier une croissance tumorale lorsqu'elles sont injectées chez l'animal (Carney *et al.*, 1982). Des cellules présentant des caractéristiques de CSC ont ensuite été isolées à partir de leucémies myéloïdes aigues (LMA). Dans ce modèle, seule une petite population, correspondant à une cellule sur 100 000 et possédant des propriétés de différenciation et d'auto renouvellement, est capable d'induire une LMA chez des souris immunodéficientes (Bonnet and Dick, 1997). Ces travaux princeps ont permis d'identifier par la suite de nombreuses CSC dans différents myélomes ou dans des tumeurs solides du colon, sein, prostate, cerveau, rétine, poumon, pancréas, peau, rein et foie (Al-Hajj *et al.*, 2003; Bruno *et al.*, 2006; Dalerba *et al.*, 2007; Dirks, 2006; Gu *et al.*, 2007; Hilbe *et al.*, 2004; Lawson *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2007a; Ma *et al.*, 2008; Matsui *et al.*, 2004; Monzani *et al.*, 2007; O'Brien *et al.*, 2007; Patrawala *et al.*, 2006; Ricci-Vitiani *et al.*, 2007; Seigel *et al.*, 2007;

Singh *et al.*, 2004; Suetsugu *et al.*, 2006). Les CSC ne sont actuellement pas caractérisées phénotypiquement, et il semblerait que les marqueurs soient différents suivant l'origine de la tumeur et suivant le modèle expérimental utilisé (voir paragraphe suivant). Cependant, certains marqueurs de surface sont retrouvés dans plusieurs études. Ainsi, CD24 et CD29 sont retrouvés dans les CSC de cancer du sein, l'Epithelial Specific Antigen (ESA) dans les cancers du sein et du pancréas, CD44, CD133 et le Stem Cell Antigen dans les cancers du sein et de la prostate et CD34 dans les cancers de l'intestin (Al-Hajj *et al.*, 2003; Brown *et al.*, 2007; Collins *et al.*, 2005; Lawson *et al.*, 2005; Patrawala *et al.*, 2006; Richardson *et al.*, 2004; Roskams, 2006; Shackleton *et al.*, 2006; Wright *et al.*, 2008).

Les CSC, à l'origine du développement tumoral, pourraient donc constituer des cibles thérapeutiques prometteuses (Milas and Hittelman, 2009).

L'existence des CSC n'est cependant pas encore aujourd'hui prouvée et leur présence est source de débats (Rosen and Jordan, 2009). En effet, l'une des critiques les plus importantes concerne la manière de détecter des CSC. La plupart des auteurs montrent la présence de ces cellules en dissociant des tumeurs humaines puis en greffant des sous populations cellulaires chez l'animal immunodéficient. Il est aujourd'hui clair que le microenvironnement (fibroblastes, cellules endothéliales, matrice extracellulaire et système immunitaire) joue un rôle important dans la croissance tumorale (Bissell and Labarge, 2005; Mantovani, 2009). Ainsi, en fonction du degré d'immunodéficiences de l'animal utilisé dans le système expérimental, le pourcentage de cellules possédant des capacités à donner des tumeurs secondaires varie (Quintana *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2008). Cependant, quels que soient les modèles expérimentaux utilisés, les différentes études montrent que seulement une sous population, plus ou moins importante dans la tumeur initiale, est capable d'induire un développement tumoral, répondant ainsi au critère de CSC.

De nombreux arguments viennent conforter le rôle possible des MSC dans la tumorigenèse, par leur ressemblance phénotypique (expression de marqueurs communs) et fonctionnelle avec les CSC ou leur capacité de modulation de la réponse de l'organisme.

5.2. Rôle dans l'initiation tumorale

Dans le contexte de l'identification des cellules cibles de la transformation néoplasique, les MSC, de par leurs propriétés de cellules souches et leur capacité à être recrutées dans différents organes sont une cible de choix.

La transduction de MSC avec le gène de la télomérase reverse transcriptase (TERT), favorisant une conservation de la longueur du chromosome, augmente leur durée de vie et

maintient leurs caractéristiques fonctionnelles en dépit de leur prolifération extensive (Simonsen *et al.*, 2002). Les cellules ainsi transduites peuvent alors être cultivées pendant plus de 260 doublements de population comparés aux 26 doublements observés avec des cellules non transduites. Ces cellules conservent leur potentiel de différenciation, un caryotype normal et ne forment pas de tumeurs. Par la suite, cette équipe a montré que ces cellules transduites peuvent perdre leur capacité d'inhibition de la prolifération par contact. De plus, ces cellules peuvent donner des tumeurs lorsqu'elles sont injectées chez la souris immunodéficiente (Serakinci *et al.*, 2004). L'apparition d'un potentiel tumorigénique serait corrélé à l'apparition d'une modification épigénétique, correspondant à une perte de l'hyperméthylation du promoteur de *DBCCR1* (*deleted in bladder cancer 1*), un gène impliqué dans le cycle cellulaire. Ainsi, la surexpression de la télomérase permettrait de démasquer un potentiel tumorigénique des MSC.

Il a ensuite été montré que des MSC sauvages humaines étaient capables de se transformer spontanément après une culture à long terme (Rubio *et al.*, 2005). Dans ces expériences, les MSC en culture entrent en phase de sénescence après 2 mois de culture. Mais l'entretien continu de ces cellules montre que la phase de sénescence n'est qu'une étape transitoire de 6 à 8 semaines avant une reprise de la croissance. Cette nouvelle croissance aboutit à une phase de « crise » durant laquelle les MSC perdent leur phénotype fibroblastoïde au profit d'une morphologie plus compacte. Les cellules en phase de « crise » présentent une instabilité chromosomique (trisomie, tétraploïdie, réarrangements chromosomiques) et une modification du profil d'expression des marqueurs de surface. De manière intéressante, les instabilités chromosomiques observées sont retrouvées entre les différentes MSC montrant une origine commune à ces modifications. Cette étude suggère que l'origine de l'instabilité pourrait résider dans une modification d'expression de l'oncogène *c-myc* ou de la télomérase. Les MSC transformées de manière spontanée sont également capables de provoquer des tumeurs. De manière intéressante, le VEGF, impliqué dans l'angiogenèse, est plus exprimé par ces cellules transformées. Ces résultats ont été confirmés dans un modèle utilisant des MSC murines (Miura *et al.*, 2006). Des études plus poussées ont défini toutes les modifications moléculaires entre MSC normales et transformées spontanément. La majorité des modifications concerne des modulations du métabolisme mitochondrial, des protéines impliquées dans la réparation de l'ADN et des régulateurs du cycle cellulaire (Rubio *et al.*, 2008b).

En outre, nous avons vu que l'équipe de JeanMarie Houghton avait montré le rôle des MSC dans l'adénocarcinome gastrique dû à l'infection par *Helicobacter* (Houghton *et al.*,

2004). Des résultats ont aussi évoqué le rôle de ces cellules dans la métaplasie du syndrome de Barrett induit expérimentalement chez le rat (Sarosi *et al.*, 2008).

Une étude réalisée sur le sarcome de Ewing a également montré que le profil d'expression de ces cellules était très proche de celui des MSC suggérant une origine commune (Tirode *et al.*, 2007). De manière très intéressante, les cellules issues de ce cancer expriment des marqueurs épithéliaux suggérant un début de différenciation épithéliale (Schuetz *et al.*, 2005). Il a également été montré que les fibrosarcomes, un type de cancer qui apparaît classiquement chez la souris âgée, dérivait des MSC (Li *et al.*, 2007b).

En revanche, certaines données suggèrent un rôle anti-tumoral des BMDC. Ainsi, l'injection de MSC transformées spontanément chez la souris permet un recrutement des BMDC de l'hôte. Une fusion peut alors avoir lieu entre MSC transformées et BMDC de l'hôte. De manière très intéressante, cette fusion inhiberait les propriétés tumorigéniques des MSC transformées (Li *et al.*, 2007b).

5.3. Croissance tumorale

Plusieurs études ont démontré la capacité des MSC à moduler la croissance tumorale. Cependant, à l'heure actuelle, les résultats sont encore contradictoires et le rôle des MSC dans la croissance tumorale porte à controverse (Lazennec and Jorgensen, 2008). Il est important de noter que les mécanismes régulant les échanges entre cellules cancéreuses et MSC semblent très complexes et bidirectionnels. Ainsi, les propriétés des MSC sur la croissance tumorale peuvent dépendre du type de cellules tumorales présent.

- Inhibition de la croissance tumorale

Les premières démonstrations du rôle des MSC dans l'inhibition de la croissance tumorale ont été obtenues par co-injection dans un modèle murin de MSC avec des cellules mélanomateuses. Cette co-injection permettait de diminuer la croissance tumorale ainsi que la formation de métastases (Maestroni *et al.*, 1999). Cette inhibition serait due à des facteurs sécrétés. Des résultats similaires ont été obtenus dans le cadre du cancer du colon chez le rat, où la co-injection permettait, de plus, une infiltration des monocytes et granulocytes plus importante, éventuellement responsables d'un contrôle de la croissance tumorale (Ohlsson *et al.*, 2003). Dans un modèle de développement du sarcome de Kaposi, l'injection de MSC permet également une diminution de la croissance tumorale chez la souris immunodéficente (Khakoo *et al.*, 2006). Cet effet passerait par une inactivation de l'activité de la protéine kinase Akt, responsable de la levée de l'inhibition de l'apoptose.

- Stimulation de la croissance tumorale

D'autres études orientent plutôt la modulation des MSC vers une stimulation de la croissance tumorale. Ainsi, les MSC favorisent l'apparition de cancer lorsqu'elles sont co-injectées en même temps que des cellules tumorales (coliques ou dérivées de MSC mutées tumorales) (Zhu *et al.*, 2006). Dans ce modèle, les MSC favoriseraient également la croissance tumorale, l'angiogenèse et la formation de métastases. Des résultats similaires ont été observés dans des expériences de co-injection de MSC avec des cellules de lymphome de Burkitt, de cancer du rein ou de mélanome (Djouad *et al.*, 2006; Kyriakou *et al.*, 2006). L'utilisation de MSC marquées ne permet pas de les retrouver au sein de l'extrait tumoral, suggérant que des contacts cellulaires ne sont pas nécessaires et que les MSC agissent par voie systémique (Djouad *et al.*, 2006).

Des études *in vitro* ont également rapporté ce phénomène où la coculture de MSC avec des cellules de cancer du sein permet de modifier la morphologie et les capacités de prolifération des cellules cancéreuses (Fierro *et al.*, 2004). Dans ce modèle, les effets induits par les MSC passeraient par la sécrétion de VEGF et d'IL6. Le rôle de l'IL6 dans la prolifération des cellules de cancer du sein a été confirmé et impliquerait une phosphorylation du facteur de transcription STAT3, impliqués dans des mécanismes anti-apoptotiques et pro-prolifératifs (Sasser *et al.*, 2007).

De manière particulièrement intéressante, le ratio entre le nombre de cellules tumorales et de MSC injectées apparaît être important dans la différence de réponse vis-à-vis de la croissance tumorale. Ainsi, Djouad *et al.* ont montré que l'injection chez la souris de 10^5 MSC induisait une augmentation de la croissance tumorale alors que l'injection de 10^2 MSC n'avait pas d'effet pour une même quantité de cellules tumorales (Djouad *et al.*, 2006).

- Absence de modulation de la croissance tumorale

Quelques études ont par ailleurs montré que l'injection de MSC dans différents modèles de cancérogenèse ovarienne ou colique chez la souris n'avait pas d'effet sur la croissance tumorale (Komarova *et al.*, 2006; Kucerova *et al.*, 2007). Les effets sur les cellules de cancer du sein sont variables selon les lignées cellulaires utilisées. Karnoub *et al.* ont montré que pour 3 lignées sur 4, l'addition de MSC ne modifiait pas la croissance tumorale de manière significative (Karnoub *et al.*, 2007).

- Modulation des capacités métastatiques

De la même manière que la modulation de la croissance tumorale, les modifications des capacités métastatiques d'une tumeur par les MSC sont sujettes à controverse. Cependant, peu d'équipes ont actuellement étudié le phénomène en détail. Ainsi, l'injection de MSC peut être la cause d'une diminution (Maestroni *et al.*, 1999) ou d'une augmentation du nombre de métastases (Karnoub *et al.*, 2007). Dans ce dernier modèle, il semblerait que les cellules tumorales stimulent la sécrétion de CCL5 par les MSC qui favorise la mobilité des cellules tumorales et l'apparition de métastases.

5.4. Fibroblastes associés aux tumeurs

Les tumeurs ne sont pas des entités à part dans l'organisme et les cellules les composant nécessitent une certaine communication avec le micro-environnement pour se développer. Ainsi, les cellules cancéreuses ne sont pas seules et se retrouvent mélangées à des macrophages, des lymphocytes, des cellules endothéliales, des péricytes ou des fibroblastes. Toutes ces cellules sont capables d'interagir avec la tumeur par une production d'hormones, de cytokines, de chimiokines ou de protéases.

Les MSC, cellules de soutien, peuvent être recrutées au niveau tumoral (voir paragraphes précédents). Spaeth *et al.* ont montré que les MSC étaient alors capables de se différencier en fibroblastes associés aux tumeurs (TAF) dans différents modèles de carcinomes (sein, pancréas et ovaires) (Spaeth *et al.*, 2009). Les TAF sont des cellules définies par l'expression de marqueurs de fibroblastes du stroma, de protéines d'invasion, de facteurs pro-tumorigéniques et de facteurs pro-angiogéniques (Spaeth *et al.*, 2009). Ainsi, les effets stimulateurs des MSC sur la croissance tumorale pourraient être dus à un support offert par des MSC différenciées.

5.5. Réponse immunitaire

5.5.1. Immunoévasion

Les MSC expriment peu de marqueurs de surface impliqués dans la reconnaissance cellulaire par les lymphocytes T. Ainsi, dans des conditions de culture normale, les MSC expriment un faible taux de molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH I) mais n'expriment pas les molécules du CMH de classe II. De plus, les molécules de co-stimulation, telles que le CD86, CD40 ou CD40L, ne sont pas présentes à la surface des MSC (Dominici *et al.*, 2006; Pittenger *et al.*, 1999). De manière intéressante, les MSC

différenciées en adipocytes, chondrocytes ou ostéoblastes expriment un taux de molécules du CMH I supérieur aux cellules non différenciées alors que le niveau d'expression des molécules du CMH II n'est pas modifié (Le Blanc *et al.*, 2003a). Cette absence de molécules impliquées dans la reconnaissance immunitaire pourrait permettre aux MSC de ne pas être reconnues par les lymphocytes T et de ne pas être éliminées lors de greffes allogéniques. En effet, plusieurs études ont montré que des injections allogéniques de MSC, chez l'homme ou l'animal, sont bien supportées (Bartholomew *et al.*, 2001; Bartholomew *et al.*, 2002; Devine *et al.*, 2001).

5.5.2. Immunomodulation

Les capacités immunomodulatrices des MSC *in vivo* et *in vitro* ont fait l'objet de nombreuses études et semblent pouvoir jouer un rôle important dans les maladies liées au système immunitaire (Siegel *et al.*, 2009).

- Inhibition de la prolifération lymphocytaire T

Les premiers travaux montrant une inhibition de la prolifération des lymphocytes T CD3, CD4 ou CD8+ se sont basés sur des expériences de culture mixte de lymphocytes (*mixed lymphocyte cultures*, MLC) consistant à mesurer la prolifération des lymphocytes en présence de cellules allogéniques (Bartholomew *et al.*, 2002; Di Nicola *et al.*, 2002; Le Blanc *et al.*, 2004a; Le Blanc *et al.*, 2003b; Maccario *et al.*, 2005; Potian *et al.*, 2003). Les MSC sont par ailleurs capables d'inhiber la prolifération de lymphocytes T stimulés par des mitogènes tels la phytohématagglutinine (PHA) (Di Nicola *et al.*, 2002; Le Blanc *et al.*, 2004a; Le Blanc *et al.*, 2003b), la concanavaline A (Djouad *et al.*, 2003; Le Blanc *et al.*, 2003b) la tuberculine (Maitra *et al.*, 2004) mais également les anticorps anti-CD3 ou CD28 (Aggarwal and Pittenger, 2005; Krampera *et al.*, 2003; Tse *et al.*, 2003b). La capacité d'inhibition augmenterait proportionnellement à la quantité de MSC présentes, et il semblerait qu'un effet inverse soit observé avec des quantités faibles de MSC (Le Blanc *et al.*, 2003b). Plusieurs études ont montré que la séparation physique des MSC et des lymphocytes à l'aide d'inserts de culture poreux n'empêche pas cette capacité immunosuppressive, suggérant que cet effet passerait par un facteur sécrété par les MSC (Djouad *et al.*, 2003; Klyushnenkova *et al.*, 2005). Cependant, ces données sont contestées par d'autres études ne montrant pas de rôle immunosuppresseur des surnageants de culture de MSC (Augello *et al.*, 2005; Maitra *et al.*, 2004). Il semblerait dans ce cas, qu'un contact préalable entre les deux populations soit

nécessaire pour que les MSC puissent sécréter un facteur immunosuppresseur (Djouad *et al.*, 2003; Maitra *et al.*, 2004).

L'identification du ou des facteurs, synthétisés par les MSC et responsables de cet effet, porte encore à controverse comme l'indique les résultats divergents de différentes équipes. En effet, le rôle de diverses molécules a été supposé. Tout d'abord, Di Nicoli *et al.* ont montré le rôle potentiel du TGF- β et du HGF (Di Nicola *et al.*, 2002). Cependant, l'ajout d'anticorps dirigés contre le TGF- β et le HGF ne semble pas restaurer la prolifération lymphocytaire (Le Blanc *et al.*, 2004a). D'autres molécules plus prometteuses ont été évoquées comme les interleukines 2 et 10 (Rasmusson *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2009), les interleukines 2, 7 et 15 (Bocelli-Tyndall *et al.*, 2009), la prostaglandine E2 dont l'inhibition annule les effets immunosuppresseurs (Spaggiari *et al.*, 2008) ou encore le monoxyde d'azote synthétisé par les MSC après contact avec des lymphocytes T CD4 ou CD8⁺ activés (Sato *et al.*, 2007). Le rôle de cette dernière molécule a été confirmé et un modèle d'inhibition de la prolifération des lymphocytes T a été proposé. La libération de cytokines pro-inflammatoires par les cellules T activées induirait une sécrétion de monoxyde d'azote par les MSC qui inhiberait la phosphorylation de Stat5 et donc la prolifération cellulaire (Ren *et al.*, 2008; Sato *et al.*, 2007). D'autres expériences ont renforcé l'idée d'un rôle de l'interleukine 10 dans l'inhibition de la prolifération des lymphocytes. Dans un modèle expérimental *in vitro*, les MSC induiraient une augmentation de la production d'interleukine 10 par les splénocytes et cette interleukine serait ensuite responsable de l'inhibition de la prolifération lymphocytaire T (Yang *et al.*, 2009).

Les MSC semblent devoir être activées pour pouvoir exercer leur activité immunosuppressive. En effet, Krampera *et al.* ont montré que la présence d'interféron γ sécrété par les lymphocytes T était nécessaire pour que les MSC puissent inhiber leur prolifération (Krampera *et al.*, 2006).

Cet effet immunosuppresseur est transitoire, et l'élimination des MSC permet une restauration des capacités prolifératives des lymphocytes T (Krampera *et al.*, 2003).

De manière intéressante, des MSC porcines peuvent inhiber la prolifération de lymphocytes de sang périphérique humain montrant que l'effet immunosuppresseur n'est pas exclusivement espèce dépendant (Liu *et al.*, 2004).

- Stimulation des lymphocytes T régulateurs

Par ailleurs, les MSC peuvent induire une expansion des lymphocytes T régulateurs (T_{reg}) *in vitro* (Aggarwal and Pittenger, 2005) et *in vivo* (Augello *et al.*, 2007). Ces cellules,

caractérisées par les marqueurs de surface CD4 et CD25, pourraient ensuite participer à l'inhibition de la prolifération des lymphocytes T. Cependant, il a été montré que la déplétion en lymphocytes T_{reg} ne modifie pas les capacités immunosuppressives des MSC chez l'animal (Krampera *et al.*, 2003).

- Inhibition de la prolifération et de la maturation des lymphocytes B

De manière similaire aux effets observés sur les lymphocytes T, la prolifération de lymphocytes B murins, activés par de l'interleukine 4, un anticorps dirigé contre le CD40 ou le mitogène du phytolaque (*pokeweed mitogen*) est inhibée lorsque des MSC sont ajoutés (Augello *et al.*, 2005; Glennie *et al.*, 2005). Ces effets ont par la suite été observés sur des cellules humaines (Corcione *et al.*, 2006). Les MSC sont également capables de modifier le potentiel chimiotactique des lymphocytes B ainsi que leur différenciation en plasmocytes. L'effet immunosuppresseur des MSC sur les lymphocytes B semble très proche du mécanisme observé sur les lymphocytes T avec un arrêt du cycle cellulaire en phase G0/G1 induit par un effecteur sécrété. De manière intéressante, il semble nécessaire qu'il y ait un signal paracrine des lymphocytes B car des surnageants de culture de MSC ne possèdent pas ces capacités immunomodulatrices (Corcione *et al.*, 2006). Krampera *et al.* ont montré que les MSC ne pouvaient pas inhiber la prolifération des lymphocytes B en absence d'interféron γ . Les voies de signalisation impliquées sont encore peu connues mais il a cependant été suggéré un rôle de la voie du tryptophane des lymphocytes B permettant une inhibition de la prolifération. Cette voie serait activée après expression d'indoléamine 2,3-dioxygénase par les MSC (Krampera *et al.*, 2006).

- Inhibition des cellules *Natural Killer* (NK)

Les cellules NK sont des cellules de l'immunité qui reconnaissent et lysent les cellules ne présentant pas de CMH de classe I. Les MSC sont capables d'inhiber la prolifération des cellules NK stimulées par de l'interleukine 2 ou 15 (Krampera *et al.*, 2006; Sotiropoulou *et al.*, 2006; Spaggiari *et al.*, 2008). La sécrétion d'interféron γ est aussi modifiée lorsque ces cellules sont mises en présence de MSC (Sotiropoulou *et al.*, 2006). Le rôle des MSC sur les capacités cytotoxiques des cellules NK porte à controverse et les résultats semblent aujourd'hui contradictoires. Krampera *et al.* ont montré que des cellules NK cultivées en présence de MSC subissent une diminution de leurs capacités cytotoxiques envers les cellules n'exprimant pas le CMH I. En revanche, les équipes de Rasmusson et de Sotiropoulou, en utilisant la même lignée de cellules CMH I négative, n'ont pas montré ces résultats (Krampera *et al.*, 2006; Rasmusson *et al.*, 2003; Sotiropoulou *et al.*, 2006).

Cependant, plusieurs équipes s'accordent à dire que les MSC, exprimant un faible taux de molécules du CMH I, sont sensibles à la lyse des cellules NK (Sotiropoulou *et al.*, 2006; Spaggiari *et al.*, 2008).

De la même manière que l'inhibition de prolifération des lymphocytes T et B, l'effet suppresseur de la prolifération des cellules NK pourrait être la conséquence de facteurs sécrétés par les MSC (Sotiropoulou *et al.*, 2006).

- Modulation de l'activité des cellules dendritiques

Enfin, les MSC peuvent interférer avec la différenciation, la fonction et la maturation des cellules dendritiques, cellules clés dans l'induction d'une réponse immunitaire.

Tout d'abord, l'addition de MSC entraîne une inhibition de la différenciation des monocytes et des progéniteurs CD34+ en cellules dendritiques lorsque ceux-ci sont cultivés en présence de GM-CSF et d'interleukine 4 (Jiang *et al.*, 2005; Nauta *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2004). De plus, la présence de MSC dans des cultures de cellules dendritiques matures diminue le taux d'expression des marqueurs de surface de cellules matures CD83, des molécules de présentations d'antigènes (HLA-Dr et DC1a), des molécules de co-stimulation (CD80 et CD86) et de l'interleukine 10 (Jiang *et al.*, 2005). Il a été suggéré que la diminution de l'expression de ces marqueurs soit liée à la diminution des capacités de stimulation de la prolifération des lymphocytes T naïfs (Nauta *et al.*, 2006).

Des expériences utilisant des inserts de culture poreux ont permis de montrer que ces effets sont dus à des molécules solubles sécrétées par les MSC (Nauta *et al.*, 2006). Les molécules suspectées responsables de ces effets sont les mêmes que celles induisant une diminution de la prolifération des lymphocytes T, à savoir l'interleukine 10 ou la prostaglandine E2 (Aggarwal and Pittenger, 2005; Beyth *et al.*, 2005).

Les différents effets immunomodulateurs des MSC sont résumés dans la figure suivante (**Figure 17**). Les effets immunomodulateurs des MSC pourraient inhiber la mise en place d'une réponse immunitaire anti-tumorale et ainsi favoriser le développement de cellules cancéreuses

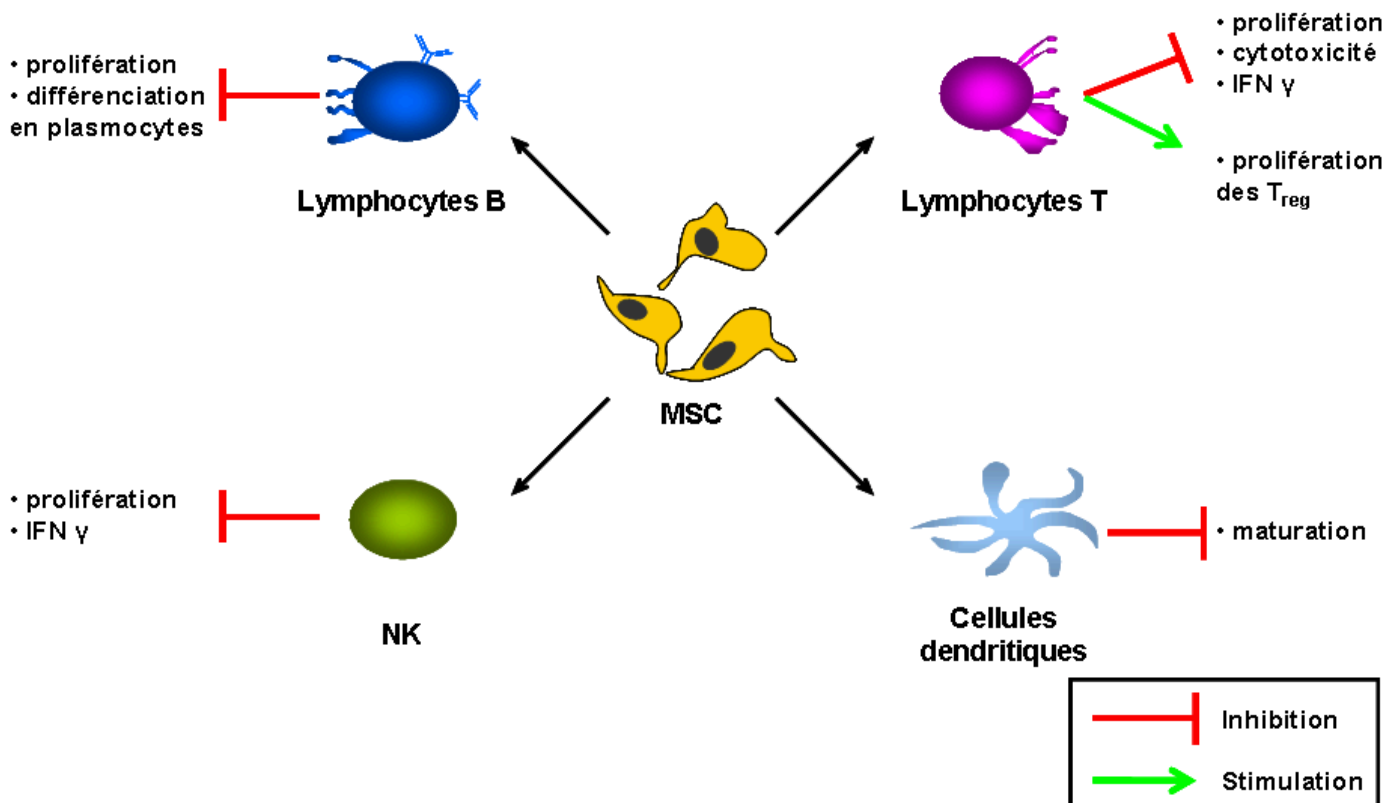


Figure 17. Modulation du système immunitaire par les MSC. Les MSC peuvent inhiber la prolifération des lymphocytes T, B et des cellules NK, la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes et des monocytes en cellules dendritiques, les propriétés cytotoxiques des cellules NK et des lymphocytes T. Enfin, les MSC peuvent stimuler la prolifération des lymphocytes T régulateurs (T_{reg}). D'après Rasmusson *et al.*, Exp Cell Res, 2006 (Rasmusson, 2006).

L'une des applications les plus convaincantes du caractère immunosuppresseur des MSC *in vivo* a été réalisé par le traitement d'un enfant de 9 ans ayant bénéficié d'une greffe de cellules souches sanguines mais souffrant par la suite d'une maladie du greffon contre l'hôte extrêmement sévère. L'enfant a reçu plusieurs injections de MSC cultivées à partir de la moelle osseuse de sa mère. Ce traitement, à l'inverse des différents traitements disponibles qui se sont retrouvés inefficaces, a permis de diminuer de manière drastique et rapide les symptômes de la maladie (Le Blanc *et al.*, 2004b). Ainsi, les MSC, en raison de leurs propriétés immunosuppressives, apparaissent comme un nouvel outil thérapeutique prometteur dans les rejets de greffe ou les maladies auto-immunes.

5.5.3. MSC et Toll-Like Récepteurs

Suivant les études, et sans doute selon les méthodes de purification et de culture, l'expression mesurée des TLR est variable. Cependant, il semblerait que les MSC humaines expriment des niveaux élevés de TLR3 et TLR4 et des faibles niveaux de TLR1, TLR2 et TLR5. Il semblerait que ces cellules n'expriment pas les TLR7, TLR8, TLR9 et TLR10 (Hwa

Cho *et al.*, 2006; Liotta *et al.*, 2008; Tomchuck *et al.*, 2008). Les MSC murines exprimeraient les différents membres de la famille des TLR à l'exception du TLR9 (Pevsner-Fischer *et al.*, 2007; Romieu-Mourez *et al.*, 2009).

A l'heure actuelle, peu d'études ont investigué le rôle des TLR dans la physiologie des MSC. En premier lieu, l'activation du TLR2 murin par un ligand chimique (Pam3Cys) induit une translocation de NF- κ B et entraîne une diminution de la mobilité et une augmentation de la prolifération cellulaire. De plus, cette activation entraîne une inhibition des capacités de différenciation des MSC en adipocytes, chondrocytes et ostéoblastes ainsi qu'une diminution des capacités immunosuppressives (Pevsner-Fischer *et al.*, 2007). Des effets similaires ont été observés sur des cellules humaines où l'activation des TLR3 et TLR4 inhibe la capacité des MSC à supprimer la prolifération des lymphocytes T, sans cependant modifier leurs capacités de différenciation (Liotta *et al.*, 2008). Il semblerait que l'activation des TLR soit responsable de la production de l'enzyme indoléamine-2,3-dioxygénase (voir paragraphe inhibition des lymphocytes B) (Opitz *et al.*, 2009).

Chez l'animal, l'activation des TLR des MSC permet une augmentation du recrutement de cellules immunitaires (Romieu-Mourez *et al.*, 2009). Il semblerait également qu'après exposition prolongée à des toxines bactériennes, l'expression des TLR des MSC soit réprimée (Mo *et al.*, 2008). De manière intéressante, l'activation du TLR4 par le lipopolysaccharide favorise la survie et la prolifération des MSC (Wang *et al.*, 2009).

En conclusion, les TLR et leurs ligands peuvent servir de régulateurs de la prolifération, de la différenciation et des capacités immunosuppressives des MSC. Cependant, à l'heure actuelle, aucune étude n'a investigué le rôle de ces molécules dans les cancers infectieux.

5.6. Angiogenèse

Les MSC pourraient également jouer un rôle dans l'angiogenèse impliquée dans la réparation tissulaire ou le développement tumoral.

L'injection de MSC au niveau de blessures cutanées favorise la réparation tissulaire (Chen *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2007). En effet, les blessures traitées avec une injection de MSC présentent une augmentation de la ré-épithélialisation et de l'angiogenèse. Les MSC ne sont pas retrouvées dans les structures vasculaires mais dans le stroma sous-jacent suggérant un rôle de soutien des MSC dans ce mécanisme. Ce soutien passerait par des facteurs pro-angiogéniques sécrétés par les MSC comme le VEGF ou l'angiopoïétine-1 (Chen *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2007). Le VEGF est connu pour stimuler la prolifération des cellules endothéliales, leur migration et favoriser leur organisation en tubes. Le VEGF sécrété par les MSC

contribue à l'angiogenèse tumorale dans les cancers pancréatiques. Les angiopoïétines représentent une seconde famille importante impliquée dans l'angiogenèse en favorisant la maturation et l'intégrité des vaisseaux (Arnold and West, 1991; Fam *et al.*, 2003). Les MSC peuvent également sécréter CXCL12, un facteur chimioattractant des progéniteurs des cellules endothéliales (Chen *et al.*, 2008; Urbich and Dimmeler, 2004). *In vivo*, les blessures traitées avec du milieu conditionné de MSC montrent une présence de cellules de la lignée endothéliale (CD34, C-kit, Flk-1) plus importante qu'au niveau des blessures non traitées par ces cellules (Chen *et al.*, 2008).

Les MSC seraient également capables de s'incorporer au niveau des nouveaux vaisseaux et présenteraient des phénotypes de cellules endothéliales ou de cellules musculaires lisses (Al-Khaldi *et al.*, 2003; Tomita *et al.*, 2002). Les conséquences de cette incorporation portent encore à controverse (Kinnaird *et al.*, 2004).

5.7. Transition mésenchymo-épithéliale (MET)

La transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) est un mécanisme physiologique présent lors du développement (Thiery, 2003). Ce mécanisme peut également être retrouvé dans la cancérogenèse où les cellules épithéliales acquièrent un phénotype mésenchymateux au cours de la transformation cancéreuse. Cette transformation est accompagnée d'une sécrétion de protéases, responsables de la dégradation de la matrice extracellulaire, et de l'acquisition de capacités migratoires, responsables de la formation de métastases (Kang and Massague, 2004). Cependant, les métastases issues d'un carcinome présentent souvent un phénotype de type épithélial suggérant que le phénomène est réversible, correspondant cette fois-ci à une transition mésenchymo-épithéliale (MET), une fois que les cellules métastatiques ont atteint un organe cible (Kang and Massague, 2004).

L'équipe qui a étudié pour la première fois la transformation spontanée des MSC en culture à long terme (Rubio *et al.*, 2005) a montré que l'injection de ces cellules était responsable de l'apparition de carcinomes peu différenciés (Rubio *et al.*, 2008a). Ce type de carcinome est défini par des cellules possédant un ratio noyau/cytoplasme élevé et une perte de la morphologie fibroblastoïde associée à l'apparition de desmosomes et filopodes, non présents sur les MSC. Les MSC devenues tumorales n'expriment plus de vimentine, un marqueur mésenchymateux, mais expriment des cytokératines, un marqueur épithélial.

Ainsi, les MSC semblent pouvoir subir des transitions mésenchymo-épithéliales qui pourraient être impliquées dans le développement de carcinomes.

5.8. Résistance thérapeutique

Les agents thérapeutiques visant l'inhibition du développement cancéreux sont toxiques pour les cellules tumorales, mais également pour les cellules saines. Il est intéressant de noter que les cellules souches saines semblent avoir développé des mécanismes de protection vis-à-vis de ces agents. Ainsi, après un traitement utilisant un agent anti-cancéreux, le patient subit une déplétion importante des cellules rouges et blanches, mais ces effets ne sont que transitoires et après quelques semaines l'homéostasie cellulaire est rétablie. Ce rétablissement ne serait pas possible si les cellules souches hématopoïétique étaient touchées par le traitement. L'existence de CSC, aux propriétés proches des cellules souches saines, pourrait alors expliquer certains échecs thérapeutiques.

La première explication de ce phénomène pourrait être donnée par l'état de quiescence du cycle cellulaire de nombreuses cellules souches. Ainsi, il a été montré l'existence d'une sous population de cellules souches leucémiques quiescentes résistantes aux chimiothérapies (Ishikawa *et al.*, 2007). Cependant, dans le cas du cancer du sein, aucune différence de cycles cellulaires entre CSC et cellules non tumorales n'a pas été observée (Al-Hajj *et al.*, 2003).

Les autres mécanismes habituellement évoqués correspondent à la présence de transporteurs d'efflux de drogues, des capacités de réparation de l'ADN élevées et la présence d'enzymes détoxifiantes (Dalerba *et al.*, 2007; Donnenberg and Donnenberg, 2005; Dylla *et al.*, 2008; Ginestier *et al.*, 2007; Hirschmann-Jax *et al.*, 2004).

Concernant les MSC, il a été montré que ces cellules sont capables de résister à des doses importantes de rayonnement (Chen *et al.*, 2006). Ainsi, l'utilisation de radiothérapies pour traiter des cancers originaires de MSC ne semble pas adéquate.

La résistance des MSC aux agents thérapeutiques pourrait jouer un rôle intéressant en thérapie anti-cancéreuse où ces cellules pourraient être utilisées comme vecteur pour cibler les cellules tumorales (Kucerova *et al.*, 2007).

6. Les MSC, des cellules vulnérables à la tumorigenèse ?

En résumé, des nombreuses études ont plaidé en faveur d'arguments forts impliquant les MSC dans l'initiation et le développement tumoral.

Ainsi, nous pouvons comparer les caractéristiques des MSC avec celles habituellement acceptées des cellules cancéreuses. En effet, Hanahan et Weinberg ont proposé un ensemble de six propriétés qui définissent les tumeurs (**Figure 18**) (Hanahan and Weinberg, 2000).

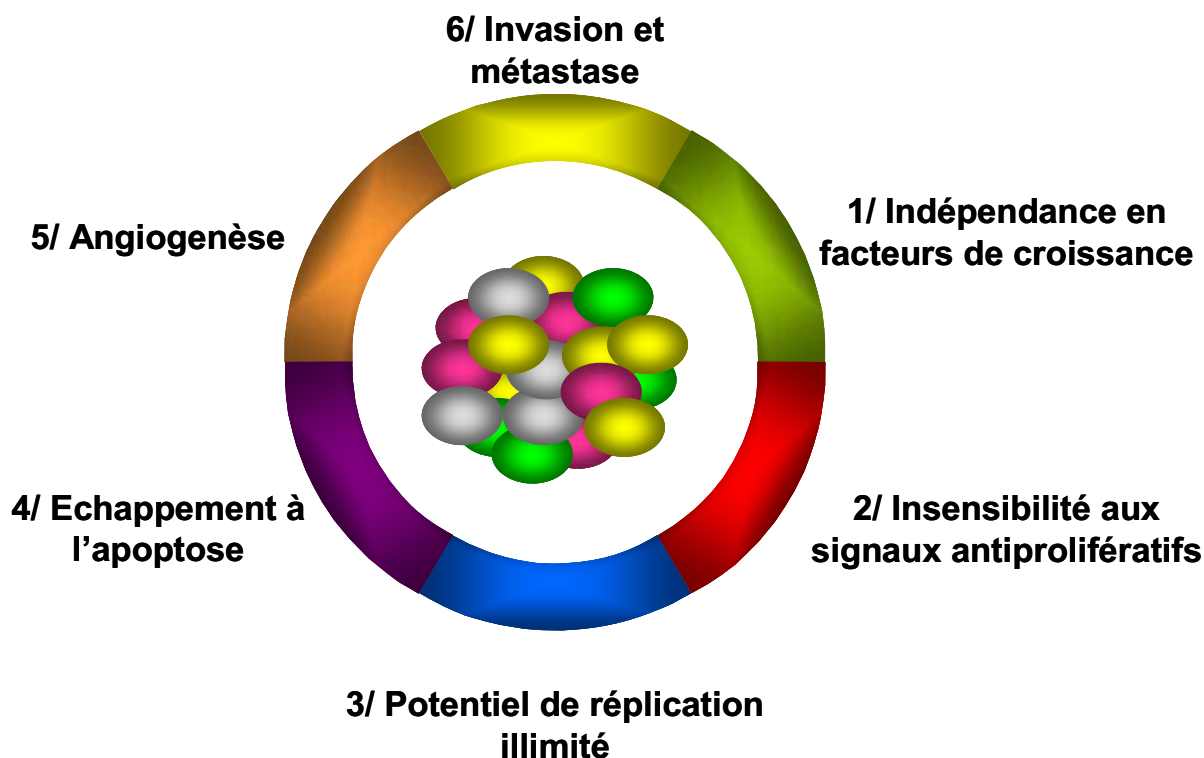


Figure 18. Caractéristiques des cellules cancéreuses. En 2000, Hanahan et Weinberg ont proposé un modèle permettant de définir les 6 propriétés que doivent acquérir les cellules tumorales. Elles correspondent à un potentiel **1/** d'indépendance en facteurs de croissance, **2/** d'insensibilité aux signaux antiprolifératifs, **3/** de réplication illimitée, **4/** d'échappement à l'apoptose, **5/** de stimulation de l'angiogenèse et **6/** d'invasion et de métastase. D'après Hanahan et Weinberg, *Cell*, 2000 (Hanahan and Weinberg, 2000).

Tout d'abord, les cellules tumorales possèdent une indépendance vis-à-vis des facteurs de croissance permettant un entretien de leur propre prolifération. Cette propriété d'auto-renouvellement est partagée par les MSC qui n'ont pas besoin de signaux extra-cellulaires pour passer d'un état de quiescence à un état prolifératif. Il apparaît cependant que la croissance des MSC est contrôlée *in vivo* et que la prolifération est hautement régulée.

Les cellules tumorales ne répondent pas aux signaux anti-prolifératifs du micro-environnement tumoral. Nous avons vu que les MSC injectées sont capables de donner des tumeurs, suggérant leur absence de réponse à ce type de signaux régulateurs (paragraphe 5.7).

Les cellules tumorales possèdent également un potentiel de réplication illimité, semblable à celui des MSC (paragraphe 5.7).

Par ailleurs, les cellules tumorales sont capables d'échapper à l'induction de l'apoptose. Nous avons vu que les MSC possèdent de fortes capacités à moduler la réponse immunitaire et à échapper aux différents mécanismes mis en jeu par le système immunitaire de l'hôte pour supprimer les cellules présentant des anomalies. Nous pouvons donc penser à une capacité particulière de ces cellules à résister à l'apoptose induite (paragraphe 5.4).

La croissance tumorale nécessitant un apport en oxygène et nutriments, la capacité des MSC à promouvoir l'angiogenèse facilite ainsi la croissance des tumeurs solides (paragraphe 5.6).

Enfin, les cellules tumorales sont dotées de propriétés invasives pour donner des métastases. Comme nous l'avons vu tout au long de cette introduction, les MSC possèdent des capacités d'invasion et leur rôle permettant le développement des métastases a été démontré (paragraphe 5.1).

En conclusion, les MSC semblent être de bons candidats pour expliquer l'origine de cellules tumorales dans différents modèles.

7.Objectifs de ces travaux

Les objectifs de ces travaux sont donc d'étudier le rôle des MSC dans l'initiation et le développement de l'adénocarcinome gastrique dû à l'infection par *H. pylori*. Nous espérons ainsi mieux appréhender le rôle de ces cellules dans l'initiation ou le développement tumoral gastrique. Pour cela, nous avons **1/** caractérisé différentes populations de MSC, **2/** développé un modèle *in vitro* permettant l'étude du recrutement des MSC après infection de cellules épithéliales par *H. pylori*, puis **3/** étudié le potentiel de différenciation épithéliale des MSC et enfin **4/** étudié la réponse des MSC après infection par *H. pylori*.

Nous espérons que ces travaux permettent une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques aboutissant à l'apparition de tumeurs. L'identification des cellules à l'origine de ce développement cancéreux permettra à terme de connaître les cellules à cibler spécifiquement dans le cadre de traitements thérapeutiques.

Matériel et méthodes

1. Matériel biologique

1.1. Obtention et culture des MSC

1.1.1. Purification

Dans un premier temps, nous avons purifié des MSC à partir de moelle osseuse de fémurs de souris femelles C57BL/6JGtrosa26 exprimant de manière constitutive le gène de la β -galactosidase bactérienne. Les souris ont été sacrifiées par dislocation cervicale et les cellules médullaires issues des fémurs ont été récupérées par aspiration-refoulement dans du milieu MesenCult additionné de facteurs de croissance comme préconisé par le fournisseur (StemCell Technologies, Grenoble, France). Les cellules issues de deux fémurs d'une souris ont été récupérées et mises en culture dans un flacon de 25 cm². Vingt-quatre heures après la mise en culture, les cellules non adhérentes ont été éliminées par un lavage en PBS et les cellules adhérentes cultivées dans du milieu frais, changé 3 fois par semaine. Un mois après la purification, les cellules sont arrivés à confluence et ont été réensemencées diluées au tiers. Les cellules ont ensuite été amplifiées avec une dilution croissante à chaque passage. Durant le processus de purification, l'expression des marqueurs de surface CD90 et CD105 (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France) a été évaluée par cytométrie en flux afin de contrôler l'émergence d'une population positive pour ces marqueurs. Lorsque la population a atteint environ 50% de positivité pour ces marqueurs, les cellules ont été triées par cytométrie en flux (FACS ARIA, BD Biosciences) en fonction de l'expression du CD90. Les cellules exprimant le marqueur CD90 ont été dénommées mMSC.

Enfin, nous disposons de MSC humaines, suite à une collaboration développée avec Danièle Noël de l'Unité INSERM 844 de Montpellier. Ces cellules ont été obtenues à partir de moelle osseuse de patients ayant subis une opération pour prothèse de hanche (Djouad *et al.*, 2005). Nous disposons de deux prélèvements, l'un provenant d'un patient de sexe féminin de 66 ans et l'autre d'un patient de sexe masculin de 82 ans. Ces cellules ont été dénommées dans la suite de l'exposé PMo24 et PM7 respectivement ou hMSC quand il s'agit des MSC humaines en général.

Les cellules sont cultivées après purification dans un milieu d'amplification composé de DMEM (1 g/l de glucose) additionné de 10% de sérum de veau fœtal (SVF), de glutamine à 20 mM, de pénicilline à 100 U/ml et de streptomycine à 100 μ g/ml (Gibco, Invitrogen, Cergy Pontoise, France). Ces antibiotiques ont toujours été utilisées à la même concentration dans

ces travaux et seront dénommés PS dans la suite de l'exposé. Les hMSC sont en plus cultivées en présence de FGF2 à 1 ng/ml (Fibroblast Growth Factor 2, R&D Systems, Lille, France).

1.1.2. Caractérisation

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, les MSC ne possèdent pas de marqueurs spécifiques permettant leur caractérisation. L'expression de différents marqueurs de surface ainsi que leur potentiel de différenciation en adipocytes, ostéoblastes et chondrocytes ont donc été vérifiés afin de valider leur identité cellulaire (Dominici *et al.*, 2006).

1.1.3. Potentiel de différenciation *in vitro*

Les protocoles de différenciation utilisés sont les mêmes pour les cellules d'origines murine et humaine. Nous avons effectué les expériences de différenciation dans notre laboratoire uniquement pour les cellules que nous avons purifiées. Les autres résultats ont été obtenus dans les laboratoires ayant isolé les cellules, ce qui explique les différences de techniques de révélation utilisées pour les mMSC et les hMSC.

- Différenciation adipogénique

Pour initier la différenciation en adipocytes, les MSC ont étéensemencées à une concentration de 5000 cellules par cm². Les cellules ont ensuite été cultivées pendant 3 jours dans le milieu d'amplification additionné de dexaméthasone à 0,1 µM, de méthylisobutylxanthine à 0,5 mM, d'indométhacine à 100 µM et d'insuline à 100 ng/ml (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France). Après ces 3 jours d'induction, le milieu a été remplacé par un milieu de différenciation correspondant au milieu d'amplification additionné d'insuline à 100 ng/ml uniquement. Les cellules ont été cultivées pendant 14 à 21 jours.

La présence de vésicules lipidiques a été confirmée par un marquage à l'Oil Red O (Sigma). Pour cela, les cellules ont été fixées en paraformaldéhyde à 3% dans du PBS. Puis, après 2 lavages en PBS et 2 lavages en eau distillée, les lipides ont été colorés avec 3 volumes de solution d'Oil Red O à 1% dans de l'isopropanol 100% et 2 volumes d'eau distillée. Après 10 minutes de coloration à température ambiante, les cellules ont été lavées 2 fois avec de l'eau distillée puis contre-colorées avec une solution de thiazine (Diff-Quick II, Medion Diagnostics, Dürdingen, Suisse). Après 2 lavages à l'eau distillée, les cellules ont été étudiées en microscopie à lumière blanche. La différenciation a été validée par un marquage rouge des lipides neutres composant les vésicules lipidiques.

Pour les hMSC, une vérification de la différenciation a également été menée par qRT-PCR. Le protocole de transcription inverse est détaillé dans le paragraphe 2 du Matériel et Méthodes. La différenciation adipogénique est validée par une augmentation de l'expression des transcrits du *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ* (PPAR- γ), de la LipoProtein Lipase (LPL) et du *Fatty Acid Binding Protein 4* (FABP4).

- Différenciation ostéogénique

Pour obtenir une différenciation ostéogénique, les MSC ont étéensemencées à une concentration cellulaire de l'ordre de 1000 cellules par cm². Elles ont alors été cultivées en milieu d'amplification additionné de sodium β -glycérophosphate à 10 mM, de dexaméthasone à 0,1 μ M et d'acide ascorbique à 0,5 mM (Sigma). Les cellules ont été cultivées pendant 14 à 21 jours.

La différenciation des mMSC a été validée par un marquage des sites d'activité de la phosphatase alcaline. Des frottis sanguins de patients atteints d'hyperleucocytose ont été utilisés comme contrôle positif. Le protocole a été adapté selon les recommandations du fournisseur (Sigma). Brièvement, les cellules ont été fixées 30 secondes dans une solution composée de méthanol et de formaldéhyde à 36,5% (1:1, Sigma). Après un lavage à l'eau du robinet, les cellules ont été incubées 1 h à l'obscurité avec le substrat de la phosphatase alcaline (1 capsule de Fast Blue RR dans 48 ml d'eau distillée et 2 ml de naphthol AS-MX). Les cellules ont ensuite été lavées à l'eau distillée puis contre-colorées avec une solution de rouge neutre (Sigma) à 1% dans de l'eau distillée. Les cellules ont été lavées et la différenciation validée par l'apparition de pigments violets.

La différenciation des hMSC a été validée par un marquage du calcium par l'Alizarine Red S. Les cellules sont fixées en formol à 3,7% puis lavées à l'eau distillée. La coloration avec de l'alizarine à 2% dans de l'eau distillée a été réalisée pendant 2 minutes, puis les cellules ont été lavées avec un mélange acétone/méthanol (1:1). La différenciation a été validée par la visualisation d'un complexe entre le calcium et l'alizarine.

Pour les hMSC, une vérification de la différenciation a également été menée par qRT-PCR. La différenciation ostéogénique est validée par une augmentation de l'expression des transcrits de l'ostéocalcine (OC), de la phosphatase alcaline (AP), du facteur de transcription Runx2 et du collagène de type I (Col1).

- Différenciation chondrogénique

Pour faciliter la différenciation en chondrocytes, les MSC ont été cultivées en microculots. Pour cela, $5 \cdot 10^5$ cellules sont suspendues dans 500 μ l de milieu de

différenciation puis centrifugées à 600 g pendant 5 minutes. Les cellules ont ensuite été cultivées à 37°C en microculots. Le milieu de différenciation était composé de DMEM (4,5g/l de glucose) additionné de dexaméthasone à 0,1 µM, de pyruvate de sodium à 1 mM, d'acide ascorbique à 0.17 mM, de proline à 35 mM et d'un mélange ITS à 1% (Insuline, Transferrine et Sélénium, Sigma). Extemporaneusement, du TGF-β3 à 10 ng/ml a été rajouté (R&D Systems). Les culots ont été récoltés après 14 à 28 jours de culture.

La différenciation des mMSC est validée par une coloration de la matrice cartilagineuse par la safranine O (Sigma). Pour cela, les culots ont été fixés en formol à 3,7% une nuit puis lavés en PBS. Les culots ont ensuite été déshydratés puis inclus en paraffine. Les blocs de paraffine ainsi obtenus ont été découpés afin d'obtenir des coupes de 7 µm déposées sur lame. Ces lames ont enfin été déshydratées, colorées à la safranine O à 0,1% dans de l'eau distillée, déshydratées et montées en Eukitt (Labonord, Villeneuve d'Asq, France). La différenciation est validée par l'apparition d'une coloration rouge au niveau des vésicules lipidiques.

Pour les hMSC, une vérification de la différenciation a également été menée par qRT-PCR. Le protocole de transcription inverse est détaillé dans le paragraphe 2 du Matériel et Méthodes. La différenciation chondrogénique est validée par une augmentation de l'expression des transcrits de l'aggrégane (AGG), du collagène de type II (Col2), du collagène de type X (Col10) et du COMP (*Cartilage Oligomeric Matrix Protein*).

1.2. Culture de cellules épithéliales

1.2.1. Cellules épithéliales gastriques humaines

Nous avons utilisé comme modèle de cellules épithéliales gastriques humaines la lignée AGS (numéro ATCC : CRL-1739, ATCC, Molsheim, France) purifiée en 1979 à partir d'un adénocarcinome gastrique d'un patient de sexe féminin de 54 ans. Cette lignée est tumorigénique lorsqu'elle est injectée chez l'animal et présente un faible de taux de polyploïdie.

Ces cellules sont cultivées à 37°C dans un milieu composé de DMEM/F12 (1:1), additionné de 10% de SVF et de PS (Gibco, Invitrogen).

1.2.2. Cellules épithéliales coliques gastriques

Nous avons utilisé comme modèle de cellules épithéliales coliques humaines la lignée HT-29 (numéro ATCC : HTB-38, ATCC) purifiée en 1964 à partir d'un adénocarcinome colorectal d'un patient de sexe féminin de 44 ans. Cette lignée est tumorigénique chez la souris nude et présente une hypertriploïdie élevée.

Ces cellules sont cultivées à 37°C dans un milieu composé de McCoy's additionné de 10% de SVF et de PS (Gibco, Invitrogen).

1.2.3. Cellules épithéliales intestinales murines

Nous avons utilisé comme modèle de cellules épithéliales intestinales murines la lignée mIC_{c12} (*transimmortalized mouse intestinal cells*) purifiée en 1996 par l'équipe d'Alain Vandewalle à partir des villi du petit intestin d'une souris transgénique exprimant de manière constitutive l'antigène T du SV40 sous la dépendance du promoteur du gène *l-pk* (Bens *et al.*, 1996). Cette lignée n'est pas tumorigénique chez la souris nude. Ces cellules ont été gracieusement fournies par Alain Vandewalle (INSERM U246, Paris).

Ces cellules sont cultivées à 37°C dans un milieu composé de DMEM/F12 (1:1) additionné d'insuline à 5 µg/ml, de dexaméthasone à 50 nM, d'ITS à 1%, de triiodothyronine à 1 nM, d'EGF à 10 ng/ml, d'HEPES à 20 mM, de glutamine à 2 mM, et de D-glucose à 0,2% et de SVF à 2 % (Gibco et Sigma).

1.3. Transduction lentivirale

Deux vecteurs lentiviraux codant des protéines fluorescentes sous la dépendance d'un promoteur constitutif fort ont été fournis par la plateforme de vectorologie de l'Université *Victor Segalen* Bordeaux 2 (Bordeaux, France). Les hMSC ont été transduites à l'aide du vecteur pRRLSIN.cPPT.MND.eGFP.WPRE codant la eGFP alors que les cellules épithéliales (AGS et HT-29) ont été transduites avec le vecteur pRRLSIN.cPPT.MND.DsRED2.WPRE codant la DsRED. Après 24 h d'infection à différentes MOI (multiplicité d'infection) comprises entre 0 et 20, les cellules ont été lavées 2 fois en PBS et reprises dans leurs milieux de culture respectifs. L'efficacité de la transduction a été évaluée par cytométrie en flux. Il est accepté que l'obtention de 30% de cellules positives corresponde à la présence chez les cellules positives d'une seule copie lentivirale. Nous estimons qu'à cette concentration, les effets de la transduction sont minimes. Afin d'éviter une accumulation du nombre de passages, les MSC n'ont pas été triées et la population correspondant à 30% de cellules eGFP positives a été conservée (MOI 10). Les populations correspondant à 30% de cellules épithéliales DsRED positives ont également été conservées (MOI 1 pour les AGS et MOI 3 pour les HT-29) puis triées par cytométrie en flux en fonction de l'expression de la DsRED afin d'obtenir une population avec plus de 70% de cellules positives.

1.4. Marquage chimique des membranes

Les membranes des hMSC ont été marquées chimiquement par un composé fluorescent vert en utilisant le kit PKH2 *Green Fluorescent Cell Linker Kit* (Sigma) et celles des cellules épithéliales par un composé fluorescent rouge en utilisant la solution *CM-Dil cell labeling solution* (Vybrant, Invitrogen) selon les recommandations des fournisseurs. Brièvement, les cellules ont été récupérées et lavées en PBS afin d'éliminer les débris cellulaires. Les cellules ont ensuite été reprises dans un milieu de coloration correspondant à 2 µl de PKH2 dans 1 ml de Diluent A ou 2,5 µl de CM-Dil dans 1 ml de PBS). Après incubation selon les recommandations des fournisseurs, les cellules ont été lavées 3 fois avec du milieu contenant 10% de sérum afin d'éliminer les colorants en excès.

1.5. Culture bactérienne

Différentes souches de *H. pylori* ont été utilisées. Les caractéristiques de ces bactéries sont détaillées dans la table suivante (**Table 3**) (Alm *et al.*, 1999; Ferrero *et al.*, 1998; Handt *et al.*, 1995; Marshall and Warren, 1984; McClain *et al.*, 2009; Oh *et al.*, 2006; Tomb *et al.*, 1997; Watanabe *et al.*, 1998).

Toutes les souches de *H. pylori* sont cultivées en atmosphère microaérobie (5% O₂) à 37°C sur des milieux spécifiques composés de 21,5 g de base Wilkins Chalgren, 50 ml de sang humain, 10 µg/ml de vancomycine, 10 µg/ml de cefsulodine, 5 µg/ml de triméthoprime, 10 µg/ml de fungizone, H₂O qsp 500 ml.

Avant chaque mise en suspension des bactéries, leur morphologie, leur pureté et leur mobilité ont été vérifiées par un état frais et une coloration de Gram. Seules les cultures présentant moins de 5% de formes coccoïdes ont été utilisées. La présence des activités enzymatiques catalase, uréase et oxydase a également été vérifiée.

Les bactéries, ayant 48 h de culture sur milieu solide, ont été récupérées avec un écouvillon et mises en suspension dans du PBS. La DO_{600nm} a ensuite été ajustée à 1 afin d'obtenir une concentration bactérienne de 2.10⁸ UFC (Unité Formant une Colonie) par ml. Les cellules ont ensuite été infectées à une MOI de 50, concentration déterminée dans des expériences préliminaires.

Nom	Origine pathologique	Ilôt de pathogénicité cag	CagA	VacA	BabA	Séquençage	Références
J99	Ulcère	Présent	Présent	s1m1i1	A2	Complet	Alm, 1999
26695	Gastrite	Présent	Présent	s1m1i1	A1	Complet	Tomb, 1997
X47		Absent	Absent	s1m2i2	A1		Handt, 1995
HPAG1	Gastrite atrophique	Présent	Présent	s1m1i1	A2	Complet	Oh, 2006
7.13	Ulcère	Présent	Présent	s1m2i2	A2	Incomplet	McClain, 2009
43504		Présent	Présent	s1m1i1	A1		
SS1	Ulcère	Présent	Présent	s2m2i2	A1		Ferrero, 1998
TN2GF4	Ulcère	Présent	Présent	s1m1i1	A2		Watanabe, 1998
B38	Lymphome gastrique du MALT	Absent	Absent	s2m2i2	A1	Complet	Non publié

Table 3. Souches de *H. pylori* utilisées. L'origine pathologique des souches utilisées, leur statut pour différents facteurs de virulence et les références correspondantes sont indiquées.

2. Transcription inverse et PCR en temps réel

2.1. Extraction d'ARN et transcription inverse

Les ARN totaux ont été extraits avec le kit Qiagen RNeasy mini kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) selon les recommandations du fournisseur. Tous les ARN ont été traités à la DNase RNA-free (Ambion, Huntingdon, Cambridgeshire, UK) avant d'être rétrotranscrits en ADNc avec la transcriptase inverse Superscript III selon les recommandations du fournisseur (Invitrogen). La réaction de rétrotranscription a été réalisée à partir de 1 µg d'ARN total dans un volume total de 100 µl. Le rendement et la qualité de chaque étape ont été évalués par dosage des acides nucléiques au Nanodrop (Thermo, Illkirch, France).

La présence d'ADN complémentaire et l'absence d'ADN génomique ont été vérifiées par PCR spécifique de l'ADN complémentaire (amorces à la jonction de deux exons) de la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH). Les ADN complémentaires ont été stockés à -20°C avant utilisation.

2.2. PCR quantitative

Chaque échantillon a été analysé en duplicat à partir d'1 µg d'ADN complémentaire en plaque de 96 puits. L'amplification a été réalisée avec le kit Platinum SYBR-Green qPCR Mix (Invitrogen) en présence d'amorces et de sondes fluorescentes spécifiques. Brièvement, les échantillons ont été chauffés 2 min à 50°C, puis dénaturés 10 min à 95°C et subissent 40 cycles de dénaturation et d'amplification (15 sec à 95°C puis 1 min à 60°C). La fluorescence émise a été analysée à chaque cycle par un Abi Prism 7900 (Applied, Courtaboeuf, France). Les résultats obtenus ont été normalisés en fonction des conditions à l'aide de 4 gènes de ménage (ACTB : β-actine, GAPDH, HPRT : Hypoxanthine-guanine

phosphoribosyltransférase et UBIQ : ubiquitine B). Les données normalisées sont exprimées en ratio d'expression par rapport aux cellules non infectées.

3.Migration

Une quantité de 100 000 cellules épithéliales gastriques humaines (AGS) ou intestinales murines (mIC_{cl2}) a étéensemencée dans une plaque de 24 puits. Les cellules ont adhéré pendant 24 h dans leurs milieux de culture respectifs puis ont été lavées deux fois en PBS. Le milieu a alors été remplacé par 600 µl de milieu de migration correspondant à du DMEM (1 g/l de glucose) additionné de 1% de SVF et de glutamine à 20 mM. Les cellules ont alors été infectées par *H. pylori* à une MOI égale à 50 (i.e. 5 millions d'UFC par puits, correspondant à 25 µl d'une suspension bactérienne avec une DO_{600nm} égale à 1).

Après 36 h de coculture, un insert de culture (BD Falcon) de porosité 8 µm a été ajouté. 75 000 MSC humaines ou murines dans 250 µl de milieu de migration ont alors étéensemencées dans la chambre supérieure ainsi formée. Ce système permet de séparer les cellules épithéliales infectées des MSC (**Figure 19**).

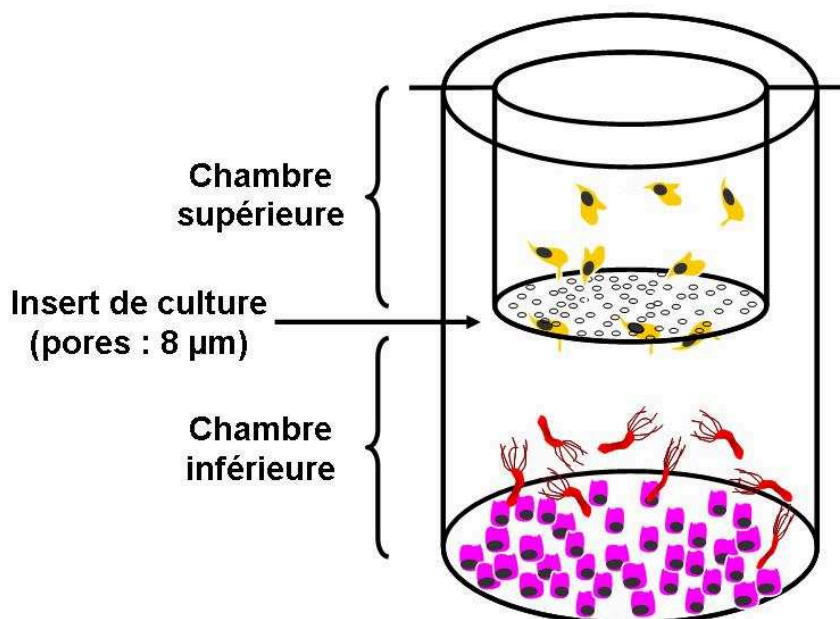


Figure 19. Principe de la chambre de migration. Les cellules épithéliales (violet) sont infectées par *H. pylori* (rouge) avant qu'un insert de culture microporeux contenant les MSC (jaune) ne soit ajouté. Après 6 h de coculture, les inserts sont enlevés et les MSC les ayant traversés sont comptées après coloration au MGG.

Après 6 h de migration, les inserts de culture ont été récupérés. Les cellules ont été fixées et colorées par May-Grünwald Giemsa (Diff-Quick, Medion Diagnostics) puis rincées à l'eau. Les cellules ayant adhéré à la face supérieure de l'insert ont alors été supprimées par le

passage répété d'un écouvillon. Les inserts ont été lavés à l'eau distillée puis montés entre lame et lamelle pour une observation ultérieure au microscope.

Pour étudier les capacités d'invasion des MSC, les inserts ont été coatés avec 250 µl de gélatine à 0,2% en PBS (Sigma) ou 10 µg/ml de fibronectine (BD Biosciences) ou 200 µg/ml de collagène (BD Biosciences). Les inserts ont ensuite été lavés deux fois en PBS avant d'être utilisés dans les 24 h.

Pour l'analyse, les inserts ont été pris en photo à l'aide d'un microscope droit Nikon Eclipse 50i (Nikon, Chagny sur Marne, France) équipé du logiciel d'imagerie Nis-Element et un objectif sec 10X ou 20X. En raison du manque d'homogénéité de la migration des MSC sur l'insert, 5 photos ont été prises par insert.

Les noyaux cellulaires colorés ont été ensuite comptés sur chaque photo et le nombre moyen a été calculé. Toutes les expériences ont été réalisées en duplicat.

4. Apoptose

Une quantité de 100 000 cellules a étéensemencée dans des plaques de 24 puits. Après 24 h de culture, les cellules ont été lavées en PBS afin d'éliminer les cellules mortes et ont été reprises dans un milieu sans antibiotiques. Les cellules ont alors été infectées pendant 48 h à une MOI de 50.

Les cellules adhérentes et non adhérentes ont été récupérées, centrifugées et reprises dans un tampon de marquage. Ce tampon, composé de 0,1% de citrate de sodium, 0,1% de Triton X100 et 50 µg/ml d'iodure de propidium, permet une perméabilisation des cellules et un marquage des acides nucléiques. Après 4 h d'incubation à 4°C à l'obscurité, les cellules ont été analysées par cytométrie en flux. Les agrégats cellulaires ont été exclus de l'analyse par cytométrie en flux (FACS Canto I ou FACS Canto II, BD Biosciences en sélectionnant seulement les cellules uniques à l'aide du logiciel Diva (version 6.1.2, BD Biosciences).

5. Différenciation épithéliale

5.1. *In vitro*

5.1.1. Coculture directe

Les cocultures *in vitro* entre hMSC et cellules épithéliales ont été réalisées à un ratio de 8:1 correspondant à 20 000 MSC pour 2 500 cellules épithéliales dans une plaque de 24 puits (Falcon, BD). Ce ratio largement en faveur des MSC est destiné à compenser leur plus faible cinétique de croissance. Pour les expériences d'immunomarquages, les cellules ont été

cultivées sur une lamelle de verre permettant de récupérer les cellules adhérentes. Le milieu de culture est constitué de DMEM additionné de 10% de SVF et de PS (Invitrogen). Le milieu est changé trois fois sur 8 jours avant analyse.

5.1.2. Coculture indirecte

Afin d'estimer les capacités de transdifférenciation, les hMSC ont été cultivées séparées des cellules épithéliales par un insert de culture poreux (pores de 0,4 μm , BD Falcon) permettant le passage de cytokines et facteurs de croissance mais pas celui des cellules. Dans ce modèle, 2 500 hMSC ont été cultivées en présence de 2 500 cellules épithéliales. Le milieu de culture est similaire à celui des expériences de coculture directe et est changé trois fois sur 8 jours avant analyse.

5.2. In vivo

Concernant les injections chez la souris immunodéficiente NOG (*Non Obese Diabetous /Shi-severe combined immunodeficiency /Interleukin-2R γ ^{null}*), les cellules AGS et les MSC PM7 ont été remises en suspension à un ratio de 8:1 correspondant à 2 250 000 PM7 et 375 000 AGS. Une quantité de 375 000 cellules AGS seules ont été injectées dans les souris témoins. Les suspensions cellulaires ont été préparées avec 200 μl de Matrigel froid à 7 mg/ml dans du PBS (BD Biosciences). Les souris ont été anesthésiées avec 3% d'isoflurane (Belamont, Boulogne Billancourt, France) puis les suspensions cellulaires ont été injectées par voie sous cutanée. Quatre souris ont été utilisées par groupe.

Trois semaines après les injections, la croissance tumorale a été évaluée en mesurant le volume de la tumeur au site d'injection avec un pied à coulisse et suivie chaque semaine. Quand la surface des tumeurs a atteint 100 mm^2 , les souris ont été sacrifiées par dislocation cervicale et les tumeurs ont été récupérées dans de l'OCT (*Optimal Cutting Temperature*, Sakura, Labonord) et congelées immédiatement dans de l'isopentane refroidi à l'azote liquide. Les tissus sont conservés à -80°C avant d'être coupés selon des sections sériées de 7 μm d'épaisseur à l'aide d'un cryostat à -20°C (Leica, Microsystems, Rueil Malmaison, France). Les échantillons sont ensuite colorés par les protocoles d'immunomarquages présentés dans le paragraphe 6.

Certains échantillons de tumeurs ont été remis en culture. Pour cela, les tumeurs ont été émincées au scalpel puis dissociées enzymatiquement avec de la collagénase à 0,1% et de la hyaluronidase à 0,0125% (Sigma) pendant 45 minutes à 37°C (O'Brien *et al.*, 2007). Les

amas de cellules ont été éliminés par filtration sur un tamis cellulaire de 70 μm puis lavés en PBS. Les érythrocytes ont été lysés par incubation 10 minutes à 4°C dans une solution de NH_4Cl 170 mM, KHCO_3 2 mM et EDTA 0,1 mM (Sigma). Les cellules ont ensuite été ensemencées sur des lamelles de verres.

6. Immunomarquages

6.1. Immunofluorescence optique

Les cellules cultivées sur lamelles ont été lavées deux fois en PBS afin d'éliminer les débris cellulaires, puis fixées pendant 10 minutes au formaldéhyde à 3% en PBS D+ (PBS additionné de MgCl_2 à 1 mM et de CaCl_2 à 1 mM). Les cellules ont ensuite été perméabilisées 1 minute avec du Triton à 0,1% en PBS afin de permettre un passage des anticorps ou molécules spécifiques lors des marquages intracellulaires. Les cellules ont alors été lavées deux fois en PBS, puis incubées en présence de BSA à 3% en PBS afin de bloquer les sites aspécifiques de liaison des anticorps. Les anticorps ou les molécules ont été diluées à leur concentration optimale en PBS D+ : souris anti-ESA à 1/100 (StemCell Technologies), souris anti-panCytokératines à 1/100 (Ozyme, St Quentin Fallavier, France), chèvre anti-souris couplé à des molécules de type AlexaFluor à 1/500 (Alexa-405, Alexa-488, Alexa-568 ou Alexa-647 selon les expériences, Molecular Probes, Invitrogen) et Hoechst 33342 à 1/10 000 (Molecular Probes, Invitrogen). Les cellules ont été incubées 25 minutes en présence d'anticorps primaires et lavées trois fois en PBS D+ puis incubées 20 minutes en présence d'anticorps secondaires et de colorant de Hoechst et lavées trois fois en PBS D+. Les lamelles ont ensuite été rincées en eau distillée avant d'être montées sur lame avec 3 μl de milieu de montage Fluoromount (Clinisciences SA, Montrouge, France).

6.2. FISH et FICTION

Les cellules cultivées sur lamelles ont été lavées deux fois en PBS puis fixées 10 minutes dans du formaldéhyde à 3,7% dans du PBS. Le marquage de la région centromérique alpha du chromosome X et de la région satellite III (Yq12) du chromosome Y ont été réalisés selon les recommandations du fournisseur (Cep X/Y, Abbott Molecular, Rungis, France). Brièvement, les lamelles ont tout d'abord subi une étape de prétraitement dans un bain de SSC 2X (Saline Sodium Citrate) à 73°C pendant 3 minutes, puis un rinçage en eau distillée à température ambiante pendant 1 minute. Les cellules ont ensuite été perméabilisées dans du Triton à 1% en PBS pendant 1 minute et lavées deux fois en PBS. Les échantillons ont ensuite été

déshydratés dans des bains successifs de 1 minute dans de l'éthanol à 70%, 80% et enfin 100%. Les lamelles ainsi déshydratées ont été conservées 24 h à température ambiante à l'obscurité avant d'être marquées.

L'ADN cellulaire a ensuite été dénaturé en incubant les lamelles 3 minutes à 73°C dans une solution de formamide à 70% dans du SSC 2X. La dénaturation a été stoppée brutalement par un bain d'éthanol 70% à -20°C pendant 1 minute, puis les échantillons ont été déshydratés dans des bains d'éthanol à 80% et 100%.

2,5 µl de solution de sondes ont ensuite été déposés sur du Parafilm et les cellules ont été incubées 3h à 42°C dans une chambre noire humide. Les cellules ont ensuite été lavées en SSC 0,4X à 73°C pendant 2,5 minutes avant d'être rincées dans une solution de SSC 0,4X et de NP40 à 0,1% pendant 1 minute à température ambiante afin d'éliminer les sondes non fixées.

Les lamelles ont enfin été montées sur lame avec 3 µl de milieu de montage contenant du DAPI.

Pour les expériences de FICTION, les cellules hybridées par FISH ont ensuite été marquées selon le protocole d'immunofluorescence décrit ci-dessus.

6.3. Microscopie

Les échantillons pour lesquels un immunomarquage a été réalisé ont été révélés par microscopie à fluorescence avec un microscope droit Nikon Eclipse 50i (Nikon, Champigny sur Marne, France) équipé d'un objectif à immersion 40X (ouverture numérique de 1,3) et du logiciel d'acquisition Nis-Element (Nikon) ou avec un microscope confocal inversé Leica DMI6000 (Leica Microsystems) équipé d'un objectif à immersion 63X (ouverture numérique de 0,63) et du logiciel d'acquisition Las (Leica). Les piles d'images ont été obtenues après acquisition de prises de vue de la base vers le sommet des cellules par paliers de 0,5 µm.

Les photos ont ensuite été analysées avec le logiciel Nis-Element.

6.4. Cytométrie en flux

Les cellules ont été lavées en PBS puis décollées avec de la trypsine. Les cellules ont ensuite été lavées en PBS puis reprises dans une solution d'anticorps primaire pendant 20 minutes (concentrations identiques au marquage par immunofluorescence optique). Après un lavage en PBS, le culot a été repris dans une solution d'anticorps secondaire. Les cellules marquées ont ensuite été analysées par cytométrie en flux avec un FACS Canto I ou un FACS Canto II à l'aide du logiciel Diva.

7. Adhérence bactérienne

7.1. Marquage bactérien antigénique

15 000 MSC ont étéensemencées sur lamelles puis infectées par différentes souches de *H. pylori* à une MOI de 50. Après 16 h d'infection, les cellules ont été fixées puis les bactéries ont été marquées selon le protocole d'immunofluorescence en utilisant un anticorps polyclonal anti-*H. pylori* au 1/100 en PBS D+ (Dako, Trappes, France) et révélés par un anticorps secondaire couplé au fluorochrome Alexa-568 (1/500). Afin d'identifier la morphologie cellulaire, le cytosquelette (Phalloïdine couplé Alexa-488, 1/250, Molecular Probes) et le noyau des cellules (Hoechst 33342, 1/10 000, Molecular Probes) ont également été marqués.

Le nombre de bactéries par cellule a ensuite été déterminé par comptage microscopique.

7.2. Marquage bactérien chimique

Avant infection, les bactéries ont été marquées chimiquement par un composé fluorescent vert en utilisant le kit PKH2 *Green Fluorescent Cell Linker Kit* selon les recommandations du fournisseur pour des marquages cellulaires (voir paragraphe 1.4). La viabilité des bactéries marquées a été vérifiée par culture.

Après marquage, les bactéries ont été lavées puis récupérées dans du PBS avant d'infecter les cellules à une MOI de 50. Après 16 h d'infection, les cellules ont été récupérées, lavées plusieurs fois en PBS pour éliminer les bactéries non adhérentes et analysées par cytométrie en flux (FACS Canto I ou II). La fluorescence cellulaire est proportionnelle à l'adhérence bactérienne.

8. Analyse statistique

Les valeurs quantitatives représentent la moyenne de triplicats \pm l'écart-type sauf indications contraires. La significativité est déterminée par le test t de Student. Une valeur de t inférieure à un seuil de $p < 0,05$ est considérée comme significative.

Résultats expérimentaux

1.Chapitre I : Obtention de MSC

1.1. MSC d'origine murine

L'obtention de MSC murines est reconnue comme étant longue et difficile en raison de la présence de cellules précurseurs hématopoïétiques capables de perdurer dans les cultures adhérentes (Phinney *et al.*, 1999). Plusieurs protocoles de purification ont ainsi été testés afin d'obtenir une population exprimant les marqueurs de surface qui caractérise les MSC. Les cellules de la moelle osseuse ont été prélevées à partir de fémurs de souris de fonds génétique C57BL/6 par aspiration-refoulement avec du milieu de culture. La totalité des cellules récupérées des deux fémurs d'une souris a ensuite été cultivée dans des flacons de culture de 25 cm², et les cellules non adhérentes ont été éliminées 48h après l'ensemencement. La culture de cellules de la moelle osseuse dans un milieu de type DMEM (1 ou 4,5g/l de glucose) n'a pas permis d'obtenir après amplification une population exprimant les marqueurs CD90 et CD105 (**Figure 20A**). En revanche, l'utilisation du milieu commercial MesenCult de StemCell Technologies, et des passages à des dilutions croissantes, a permis d'obtenir et d'amplifier les cellules possédant les marqueurs de MSC. Cependant, la population n'étant toujours pas homogène au huitième passage, les cellules ont été triées en fonction de l'expression du CD90. Le tri a été basé sur l'expression de CD90 en raison d'un décalage du pic d'intensité de fluorescence important en cytométrie en flux permettant un tri de manière aisée (**Figure 20B**). Une population exprimant à plus de 98% les marqueurs CD90 et CD105 a ainsi pu être obtenue (**Figure 20C**). Ces cellules murines ont été dénommées mMSC.

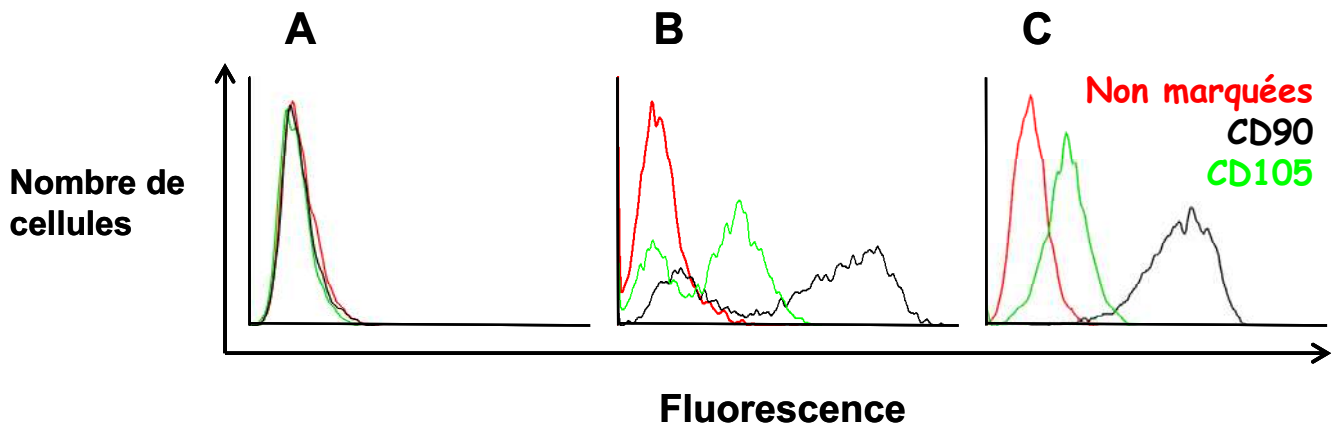
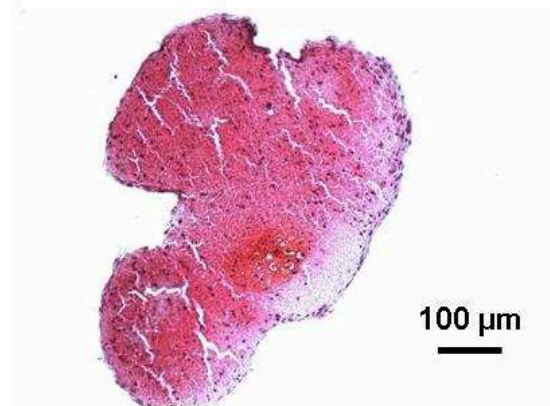
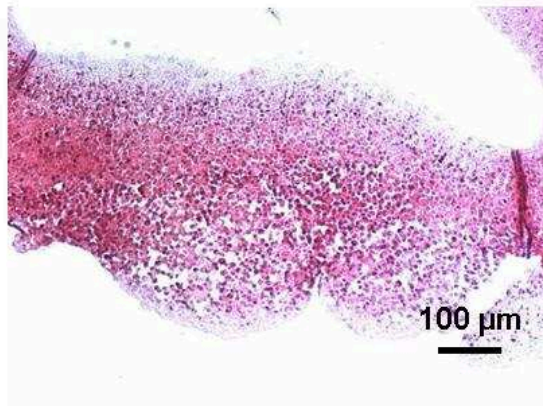


Figure 20. Purification des MSC murines. Représentation graphique de la moyenne d'intensité de fluorescence des cellules issues de la moelle osseuse de fémurs de souris. La courbe rouge représente les cellules non marquées. Les courbes noire et verte représentent les expressions respectives des marqueurs CD90 et CD105 mesurées par cytométrie en flux après marquage par un anticorps primaire révélé par un anticorps secondaire couplé à l'Alexa-488. Différentes conditions de culture de cellules médullaires ont été analysées : **A/** culture en DMEM, **B/** culture en MesenCult et **C/** culture en MesenCult après tri cellulaire en fonction de l'expression du CD90.

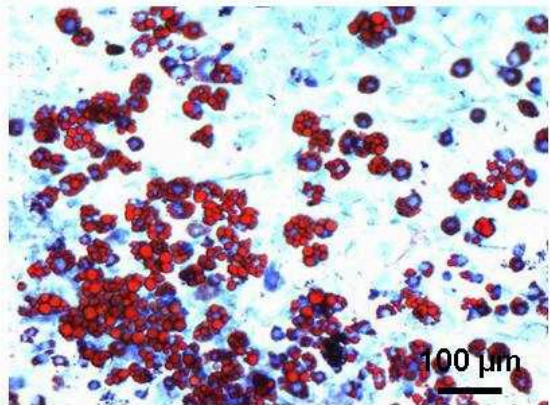
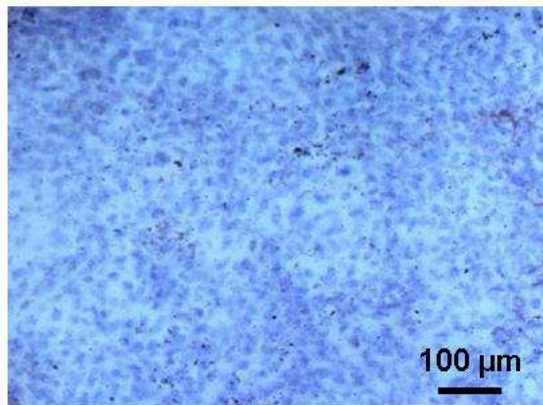
Afin de caractériser la nature des cellules obtenues et de vérifier leurs propriétés de cellules souches, leur potentiel de différenciation dans les trois lignées définissant les MSC a été évalué. Ainsi, après 21 jours de culture en microculot dans un milieu de différenciation chondrogénique, les mMSC synthétisaient une matrice extracellulaire cartilagineuse permettant le développement d'un culot cellulaire dense et viable (**Figure 21A droite**). La culture en microculot dans un milieu de culture classique n'a pas permis l'obtention de cellules viables formant un culot dense (**Figure 21A gauche**). Après 14 jours de culture dans un milieu de différenciation adipogénique, les cellules isolées présentaient des vésicules lipidiques caractéristiques des adipocytes (**Figure 21B droite vs gauche**). Enfin, après 10 jours de culture dans un milieu de différenciation ostéogénique, les cellules surexprimaient la phosphatase alcaline, marqueur des ostéoblastes (**Figure 21C droite vs gauche**).

Nous avons donc montré que les cellules purifiées à partir de fémurs de souris expriment les marqueurs de surface CD90 et CD105 et possèdent la capacité de se différencier en adipocytes, ostéoblastes et chondrocytes. Ces cellules répondent donc aux critères d'identification des MSC.

A/ Différenciation chondrogénique (J21)



B/ Différenciation adipogénique (J14)



C/ Différenciation ostéogénique (J10)

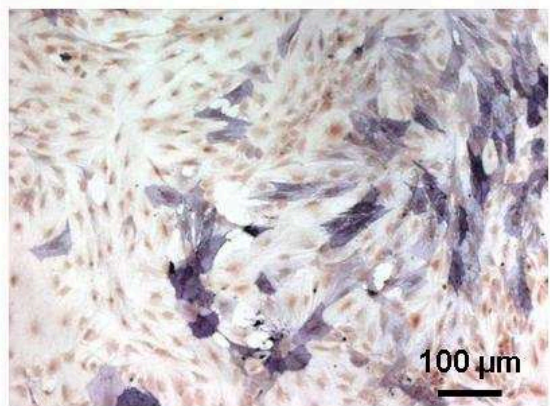
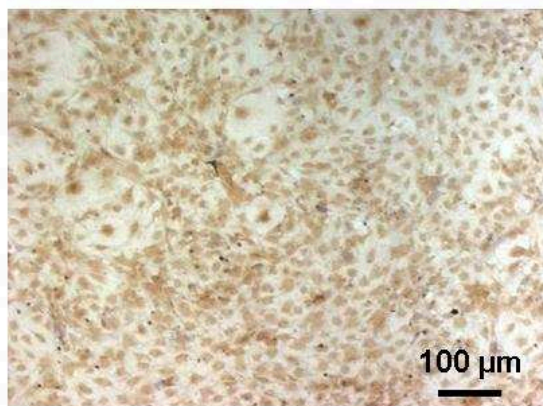


Figure 21. Potentiel de différenciation des mMSC. Les photographies de gauche correspondent aux mMSC cultivées dans le milieu de culture classique des cellules, celles de droite aux cellules cultivées dans les milieux de différenciation. **A/** Après 21 jours de culture en milieu de différenciation chondrogénique les MSC synthétisaient de la matrice extracellulaire cartilagineuse détectée par coloration à la Safranine O, rouge. **B/** Après 14 jours de culture en milieu adipogénique, les MSC présentaient des vésicules lipidiques détectées par coloration à l'Oil Red O, rouge. **C/** Après 10 jours de culture en milieu ostéogénique, les MSC présentaient une expression intense de phosphatase alcaline détectée par son substrat coloré en violet. Détails des colorations dans la section Matériel et Méthodes. Barre d'échelle : 100 μm.

1.2. MSC d'origine humaine

Les MSC humaines (hMSC) ont été isolées en collaboration avec Danièle Noël de l'Unité INSERM 844 de Montpellier. Les cellules de moelle osseuse ont été prélevées à partir de la moelle osseuse de deux patients ayant bénéficié d'une opération pour prothèse de hanche et donné leurs consentements. Ces deux sources de MSC ont par la suite été dénommées PM7 (pour les cellules issues d'un patient homme de 82 ans) et PMo24 (pour les cellules issues d'un patient femme de 66 ans). L'expression des marqueurs de surface cellulaires CD73, CD90 et CD105 a été validée (données non présentées). Le potentiel de différenciation de ces cellules a également été évalué après culture dans les différents milieux de différenciation pendant 21 jours par analyse des transcrits ARNm et par colorations phénotypiques. Ainsi, la différenciation en chondrocytes a été validée par augmentation de l'expression des transcrits de l'aggrégane (AGG), du collagène de type II (Col2), du collagène de type X (Col10) et de la protéine de matrice oligomérique du cartilage (COMP), caractéristiques des cellules chondrocytaires (**Figure 22A**). La différenciation en adipocytes a été caractérisée par l'augmentation des transcrits du *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor* γ (PPAR- γ), de la LipoProtéine-Lipase (LPL) et du *Fatty Acid Binding Protein 4* (FABP4) ainsi que l'apparition de vésicules lipidiques révélées par coloration à l'Oil Red O, caractéristiques des adipocytes (**Figure 22B**). Enfin, la différenciation en ostéoblastes a été validée par l'augmentation des transcrits de l'ostéocalcine (OC), de la phosphatase alcaline (AP), du facteur de transcription Runx2 et du collagène de type I (Col1), et l'apparition de dépôts calciques a été démontrée par coloration à l'Alizarine Red S (**Figure 22C**).

Les cellules ainsi purifiées répondent bien aux différents critères des MSC. Trois modèles de MSC, un murin et deux humains, ont donc été caractérisés et validés.

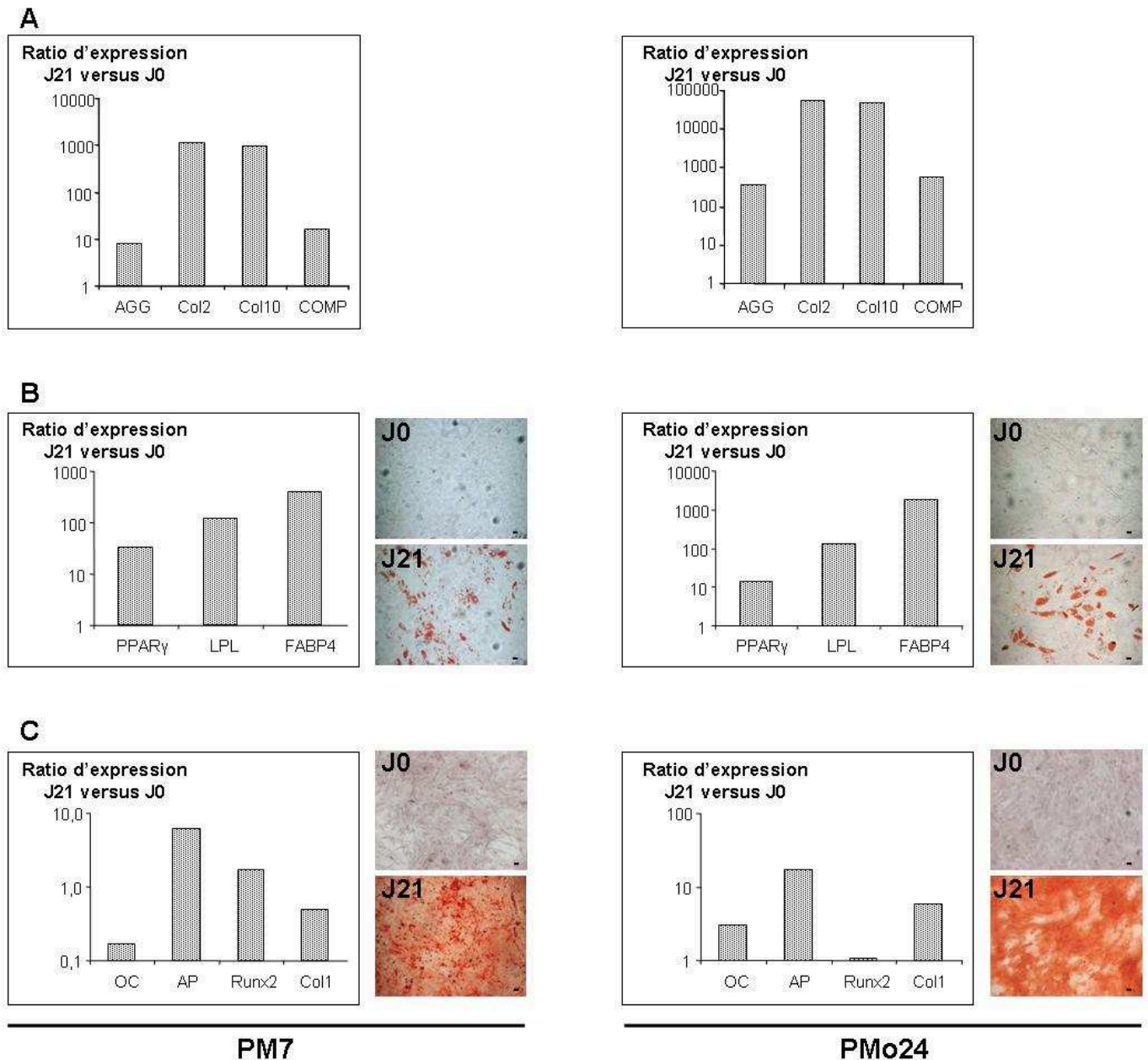


Figure 22. Potentiel de différenciation des hMSC. Les hMSC PM7 (planche de gauche) et les PMo24 (planche de droite) ont été cultivées pendant 21 jours dans un milieu de différenciation. **A/** Après culture dans un milieu chondrogénique, les deux sources de hMSC exprimaient les marqueurs chondrocytaires AGG, Col2, Col10 et COMP. **B/** Après culture en milieu adipogénique, les hMSC exprimaient les marqueurs PPAR γ , LPL et FABP4. L'apparition de vésicules lipidiques a été révélée après coloration à l'Oil Red O effectuée au début ou après 21 jours de culture en milieu de différenciation. **C/** Après culture en milieu ostéogénique, les hMSC exprimaient les marqueurs OC, AP, Runx2 et Col1. L'apparition de dépôts calciques a été révélée après coloration à l'Alizarine Red S effectuée au début ou après 21 jours de culture en milieu de différenciation. Le détail des transcrits et des colorations est présenté dans la section Matériel et Méthodes. Barre d'échelle : 10 μ m.

2. Chapitre II : Etude du potentiel chimiotactique des cellules épithéliales infectées par *H. pylori*

2.1. Introduction

Le modèle de carcinogénèse proposé par l'équipe de JeanMarie Houghton démontre un recrutement des MSC issues de la moelle osseuse au niveau de la muqueuse gastrique infectée par *H. felis* (Houghton *et al.*, 2004). Ce recrutement serait consécutif à la libération de facteurs chimiotactiques sécrétés exclusivement par les cellules épithéliales infectées. Ainsi, l'induction de lésions par des composés chimiques ou par application d'azote liquide au niveau gastrique n'induit pas le recrutement des MSC observé lors de l'infection par *H. felis* suggérant que l'apparition de dommages n'est pas suffisante pour induire une migration cellulaire. La spécificité du recrutement après infection par *Helicobacter* suppose la mise en place d'une voie de signalisation particulière, qui pourrait aboutir à la sécrétion de CXCL12 et SCF (Houghton *et al.*, 2004).

La migration et l'invasion cellulaire des MSC ne sont pas encore définies sur le plan mécanistique. Cependant, la cascade de réactions semble être proche de celle observée lors du *homing* des leucocytes. Ainsi, les cellules médullaires sont dans un premier temps recrutées par des chimiokines avant de passer dans la circulation sanguine (Miyasaka and Tanaka, 2004). Les cellules circulantes établissent alors des liaisons avec des sélectines exprimées spécifiquement à la surface de certaines cellules endothéliales des vaisseaux sanguins au niveau des sites de lésion ou d'inflammation. Cette première interaction entre cellules circulantes et cellules endothéliales permet un ralentissement des cellules par rapport au flux sanguin. Des liaisons plus importantes se mettent ensuite en place entre les deux types cellulaires par l'intermédiaire d'intégrines. Ces interactions aboutissent alors à un arrêt des leucocytes à la surface des cellules endothéliales. La traversée de la membrane endothéliale, ou extravasation, est ensuite réalisée par un mécanisme de diapédèse impliquant l'activation de propriétés invasives. Les différences entre le recrutement des leucocytes et celui des MSC semblent résider dans les facteurs impliqués dans cette migration et invasion (Ruster *et al.*, 2006). En effet, les chimiokines, sélectines et intégrines semblent être spécifiques d'une population cellulaire. Concernant les MSC, les facteurs spécifiques ne sont pas entièrement définis. Cependant, plusieurs molécules candidates ont été suggérées.

In vivo, et comme cela a été détaillé dans la partie bibliographique, une corrélation peut être retrouvée entre certaines cytokines, comme CCL2, CCL3, CXCL8, CXCL12 ou SCF, sécrétées suite à des lésions et un recrutement de MSC issues de la moelle osseuse (Abbott *et al.*, 2004; Dwyer *et al.*, 2007; Ringe *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2002a; Wang *et al.*, 2002b).

In vitro, il est possible d'étudier la capacité de différents facteurs à induire une migration des MSC en utilisant une chambre de migration, également appelée chambre de Boyden. Pour cela, le fond de la chambre est rempli avec un milieu de culture contenant le facteur à tester. Puis un insert de culture microporeux (pores de 8 µm permettant le passage actif des cellules) contenant les MSC est ajouté afin de séparer le facteur à tester des cellules. Si le facteur est effectivement chimioattractant, les MSC sont attirées et traversent l'insert microporeux. En revanche, si le facteur n'est pas impliqué dans la migration, les voies de signalisation cellulaire régissant les mécanismes de migration ne sont pas activées et les cellules restent sur la face supérieure du filtre (Ponte *et al.*, 2007). Ces expériences ont permis de montrer le rôle de différents facteurs de croissance et cytokines comme BMP-2, BMP-4, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL22, CCL25, CXCL8, CXCL12, IL1, EGF, FGF-2, HGF, IGF, TNF α , TGF β , les différentes isoformes du PDGF, TRAIL ou VEGF (Binger *et al.*, 2009; Dwyer *et al.*, 2007; Fiedler *et al.*, 2006; Fiedler *et al.*, 2002; Ozaki *et al.*, 2007; Ponte *et al.*, 2007; Ries *et al.*, 2007; Ringe *et al.*, 2007; Ritter *et al.*, 2008; Secchiero *et al.*, 2008; Son *et al.*, 2006; Spaeth *et al.*, 2008; Uchida *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2002b). L'ensemble des facteurs chimiotactiques pour les MSC est résumé dans la table suivante (**Table 4A**).

Que cela se produise *in vivo* ou *in vitro*, les conditions environnementales semblent être importantes. Ainsi, un contexte inflammatoire, avec présence de TNF α , potentialise les capacités migratoires des MSC. Cet effet passerait par une augmentation de l'expression des récepteurs sur les MSC (Ponte *et al.*, 2007).

Il est important de rappeler que le recrutement des MSC semble intimement lié à l'apparition de lésions cellulaires, tissulaires ou tumorales.

Parallèlement à ces études focalisées sur le recrutement des MSC, différentes équipes ont étudié la réponse des cellules épithéliales gastriques à l'infection par *H. pylori*. La réponse inflammatoire cellulaire induite est variable selon les souches bactériennes utilisées et est essentiellement dépendante de la présence du système de sécrétion de type IV codé par l'îlot de pathogénicité *cag* (Viala *et al.*, 2004).

Des études de transcriptomique et de protéomique ont permis d'identifier de nombreux facteurs potentiellement sécrétés après infection par *H. pylori*. Ces facteurs sont

essentiellement associés à une réponse de type pro-inflammatoire. Ainsi, l'analyse des transcrits ou des protéines synthétisés par des cellules gastriques humaines ou murines infectées par *H. pylori* a montré une augmentation de la sécrétion de différents facteurs CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL8, IL1 β , IL2, IL6, IL7, IL10, IL17, IL18, CCL2, CCL5, PAI-1, TRAIL, TNF α et de différentes métalloprotéases matricielles (Argent *et al.*, 2008; Bauer *et al.*, 2005; Day *et al.*, 2004; Futagami *et al.*, 2003; Hirata *et al.*, 2006; Keates *et al.*, 2008; Kudo *et al.*, 2005; Kundu *et al.*, 2006; Martin *et al.*, 2004; Mori *et al.*, 2001; Peek *et al.*, 1995; Seo *et al.*, 2004; Shimoyama *et al.*, 1998; Torok *et al.*, 2005; Wen *et al.*, 2004; Yamaoka *et al.*, 1996; Yamaoka *et al.*, 1997) (**Table 4B**).

Une étude comparative des facteurs susceptibles de recruter les MSC et des facteurs sécrétés par les cellules épithéliales infectées par *H. pylori* a été menée afin de mettre en évidence des cytokines communes jouant un rôle potentiel dans le recrutement des MSC au niveau de la muqueuse gastrique infectée. Par la suite, nous avons également décidé d'inclure d'autres facteurs que nous pensions potentiellement impliqués.

A

Facteurs chimioattractants pour les MSC	Références
BMP2, BMP4, PDGF	Fiedler, 2002
CCL2, CCL3, CXCL8	Wang, 2002
IGF	Fiedler, 2006
HGF, CXCL12	Son, 2006
CCL2	Dwyer, 2007
PDGF, EGF, TGF α , FGF2	Ozaki, 2007
PDGF, VEGF, IGF, CCL5, CCL22, CXCL12	Ponte, 2007
TGF β , TNF α , IL1, CXCL12	Ries, 2007
CXCL8, CXCL12	Ringe, 2007
PDGF, BMP2, FGF2	Uchida, 2007
VEGF, FGF2	Ritter, 2008
TRAIL	Secchiero, 2008
PDGF, VEGF, TGF β , FGF2, IGF, CCL4, CCL5, CXCL12	Spaeth, 2008
CCL25	Binger, 2009

B

Facteurs sécrétés par les cellules épithéliales infectées par <i>H. pylori</i>	Références
IL1, IL2, CXCL8	Peek, 1995
IL6, IL7, IL10, CXCL8, TNFα	Yamaoka, 1996
IL1 β , IL6, CXCL8, TNFα	Yamaoka, 1997
CXCL1, CXCL8, CCL2, CCL5	Shimoyama, 1998
CCL2	Mori, 2001
CCL2	Futagami, 2003
IL18	Day, 2004
TRAIL	Martin, 2004
CXCL1, CXCL8	Seo, 2004
IL10, IL18, CXCL2, CXCL3	Wen, 2004
CXCL1, CXCL8, IL17	Bauer, 2005
CCL5	Kudo, 2005
CXCL8	Torok, 2005
MMP3, MMP9, TNF α	Kundu, 2006
CXCL1, CXCL2, CXCL3	Hirata, 2006
CXCL8	Argent, 2008
PAI-1	Keates, 2008

Table 4. Etude des facteurs potentiellement impliqués dans le recrutement des MSC suite à l'infection de cellules épithéliales par *H. pylori*. A/ Facteurs chimioattractants pour les MSC *in vivo* ou *in vitro*. B/ Facteurs sécrétés suite à l'infection de cellules épithéliales par *H. pylori*, *in vivo* ou *in vitro*. Les facteurs indiqués en gras sont les facteurs retrouvés dans les deux conditions.

Le but de cette partie de nos travaux a donc été de démontrer la capacité des cellules épithéliales infectées par *H. pylori* à recruter les MSC, puis d'identifier les facteurs impliqués.

2.2. Etude du recrutement des MSC en réponse à l'infection de cellules épithéliales par *H. pylori*

Afin d'étudier le potentiel chimiotactique pour les MSC des cellules épithéliales infectées par *H. pylori*, la technique standard de la chambre de Boyden a été utilisée. Le protocole habituel a été modifié afin de pouvoir étudier les mécanismes de migration impliquant trois partenaires : MSC, cellules épithéliales et *H. pylori*. Pour cela, les cellules épithéliales ont été infectées par différentes souches de *H. pylori* pendant 36 h afin de permettre la sécrétion des facteurs pro-inflammatoires. Dans un second temps, un insert de culture contenant les MSC a été rajouté. Le système contenant les 3 partenaires a alors été incubé à 37°C afin de permettre l'activation des voies de signalisation cellulaire et ainsi la migration et l'invasion des MSC. Après 6h d'incubation, l'insert a été récupéré et les cellules migratoires comptées comme indiqué dans la section Matériel et Méthodes.

2.2.1. Validation du modèle d'étude des capacités migratoires des MSC

Avant de réaliser les cocultures impliquant les trois partenaires, la solidité du système et les capacités migratoires des MSC ont été vérifiées. Pour cela, deux modèles ont été développés, l'un basé sur des cellules humaines en utilisant des cellules épithéliales gastriques de la lignée AGS et des MSC PM7 et le second sur des cellules épithéliales intestinales murines de la lignée mIC_{C12} et des mMSC. Le modèle murin est basé sur l'utilisation de cellules épithéliales intestinales en raison de l'absence de modèles cellulaires gastriques compatibles avec les techniques développées. Il sera montré par la suite que ces cellules répondent à l'infection par *H. pylori*.

Le niveau basal de migration des MSC non stimulées a tout d'abord été déterminé. Pour cela, les MSC ont été incubées dans un milieu de culture additionné d'une faible concentration de sérum (témoin négatif, 1% de sérum), puis stimulées avec le même milieu (**Figure 23A**). Les capacités de migration de ces cellules ont ensuite été validées en utilisant une concentration élevée de sérum (témoin positif, 30% de sérum) qui est un inducteur de migration reconnu (**Figure 23B**) (Ponte *et al.*, 2007).

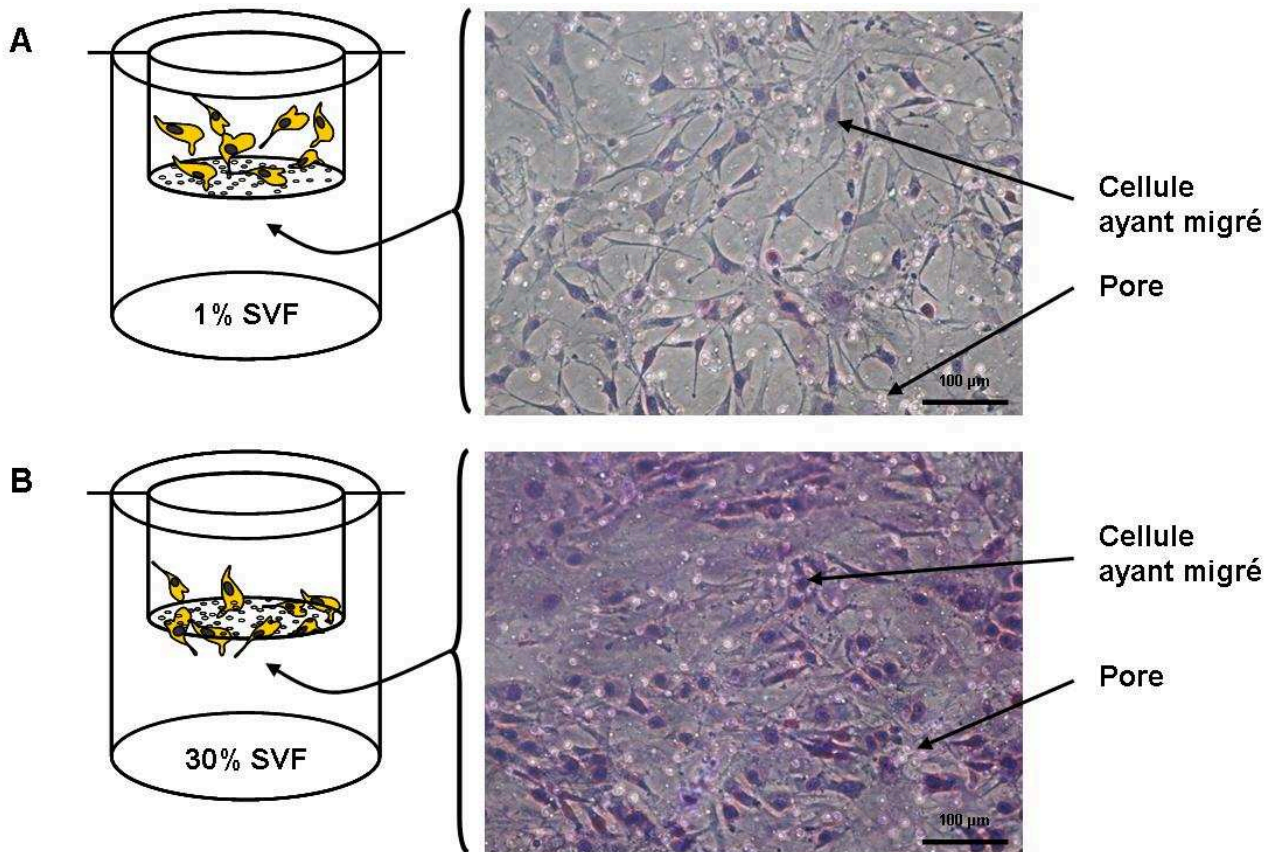


Figure 23. Validation des capacités migratoires des MSC. Les capacités de migration des MSC PM7 ont été investigués. Les inserts de culture ont été récupérés et colorés au MGG après 6 h de migration des MSC. **A/** Les MSC ont été stimulées par du milieu de migration seul (1% de sérum) afin d'évaluer le niveau basal de migration. **B/** Après stimulation avec 30% de sérum, une augmentation du nombre de MSC invasives a été observée. Barre d'échelle : 100 µm.

Après 6 heures de migration, les MSC PM7 stimulées par 30% de sérum ont migré de manière beaucoup plus importante qu'après stimulation avec 1% de sérum ($97,8 \pm 10,3$ cellules par insert vs $67,6 \pm 11,6$; $p < 0,05$). Ces résultats princeps montrent qu'il est possible d'activer les voies de signalisation cellulaire permettant le développement des capacités migratoires des MSC *in vitro*. Des résultats similaires ont été obtenus avec le modèle murin (données non présentées).

La migration cellulaire n'était cependant pas homogène sur un même insert, les résultats quantitatifs présentés par la suite correspondent donc à la moyenne des résultats obtenus pour deux inserts et 5 champs quantifiés (objectif x20) par insert.

Par ailleurs, des inserts contenant différents types de matrice extracellulaire (gélatine, collagène de type I, fibronectine) ont été utilisés. Les profils de migration obtenus lors de l'utilisation d'inserts revêtus ou non de matrice étaient similaires, mais les résultats sur inserts non revêtus des différentes matrices étaient plus homogènes (données non présentées). Ces données suggèrent que les voies de signalisation impliquées dans la migration (inserts nus) et

l'invasion (inserts revêtus de matrice) sont activées dans le modèle proposé. Par la suite, les inserts ont été utilisés nus afin d'étudier les propriétés migratoires des MSC.

2.2.2. Potentiel chimiotactique des cellules épithéliales infectées par *H. pylori*

Une fois le modèle mis au point, le potentiel chimiotactique des cellules épithéliales pour les MSC a été testé après infection par un panel de 5 souches différentes de *H. pylori*. Les souches utilisées, incluant 3 souches dont le génome a été séquencé et annoté, correspondent à des modèles bien caractérisés et couramment utilisés (**Table 3, section Matériel et Méthodes**). Afin de permettre la production de facteurs chimioattractants par les cellules épithéliales infectées dans le milieu de culture, l'infection à une MOI de 50 a été réalisée 36 h avant l'ajout de l'insert de culture contenant les MSC.

Les effets de l'infection des cellules épithéliales ont tout d'abord été évalués dans le modèle humain en utilisant les cellules épithéliales gastriques de la lignée AGS et les hMSC d'origine PM7.

L'infection de cellules épithéliales gastriques par certaines souches de *H. pylori* a été responsable d'une augmentation significative de l'induction des capacités de migration des MSC (**Figure 24A**). En effet, l'infection par les souches X47, HPAG1 et 7.13 a entraîné une augmentation du nombre de MSC sur la face inférieure de l'insert par rapport aux cellules épithéliales seules. Cet effet n'a pas été retrouvé avec toutes les souches, la différence de migration obtenue n'étant pas significative après infection par les souches J99 et 26695. Cette différence d'effets entre les souches suggère une différence de réponse des cellules épithéliales après infection. Il existerait donc des facteurs bactériens spécifiques induisant la sécrétion de molécules chimioattractantes pour les MSC par les cellules épithéliales infectées.

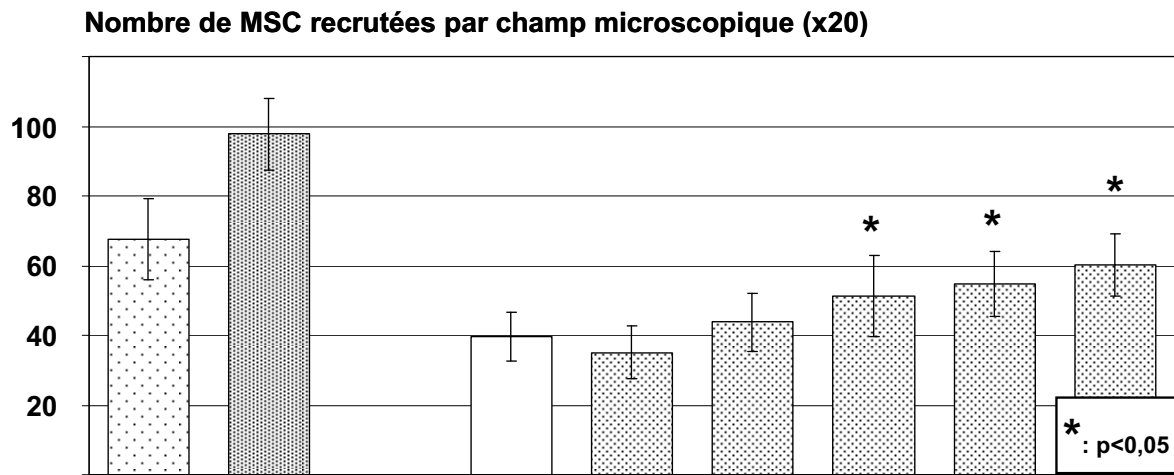
Un modèle basé sur l'utilisation de cellules d'origine murine a ensuite été développé. Pour cela, la migration des mMSC a été évaluée en réponse à l'infection de cellules épithéliales intestinales murines de la lignée mIC_{C12} par *H. pylori*.

Le profil de migration obtenu avec le modèle murin se rapprochait de celui obtenu avec le modèle humain (**Figure 24B**). En effet, l'infection par les 3 souches de *H. pylori* induisant un recrutement des MSC PM7 (X47, HPAG1 et 7.13) a également été responsable du recrutement des mMSC alors que l'infection de cellules épithéliales par les souches J99 et 26695 n'a pas induit de réponse dans les deux modèles développés.

Il a par ailleurs été vérifié que les souches de *H. pylori* seules, reprises dans un milieu à 1% de sérum, n'induisaient pas de recrutement des MSC, validant l'hypothèse d'une sécrétion de facteurs chimioattractants par les cellules épithéliales infectées ($1,25 \pm 0,4$ cellules par insert après stimulation par la souche X47 vs $67,6 \pm 11,6$ pour les cellules stimulées par 1% de sérum, $p < 0,05$).

Les deux modèles obtenus montrent que l'infection de cellules épithéliales par certaines souches induit un recrutement des MSC. L'analyse des résultats obtenus après infection par ces 6 souches n'a pas permis de rapprocher les effets observés des facteurs de virulence CagA et VacA. Ainsi, en prenant l'exemple de deux souches qui induisent un recrutement des MSC, X47 et HPAG1, il apparaît que les statuts CagA et VacA n'entrent pas en jeu (X47 : CagA-, VacA s1m2 et HPAG1 : CagA+, VacA s1m1). Des expériences mettant en jeu un panel de souches plus important restent à réaliser afin d'identifier un facteur de virulence impliqué dans ce phénomène.

A/ Modèle humain



B/ Modèle murin

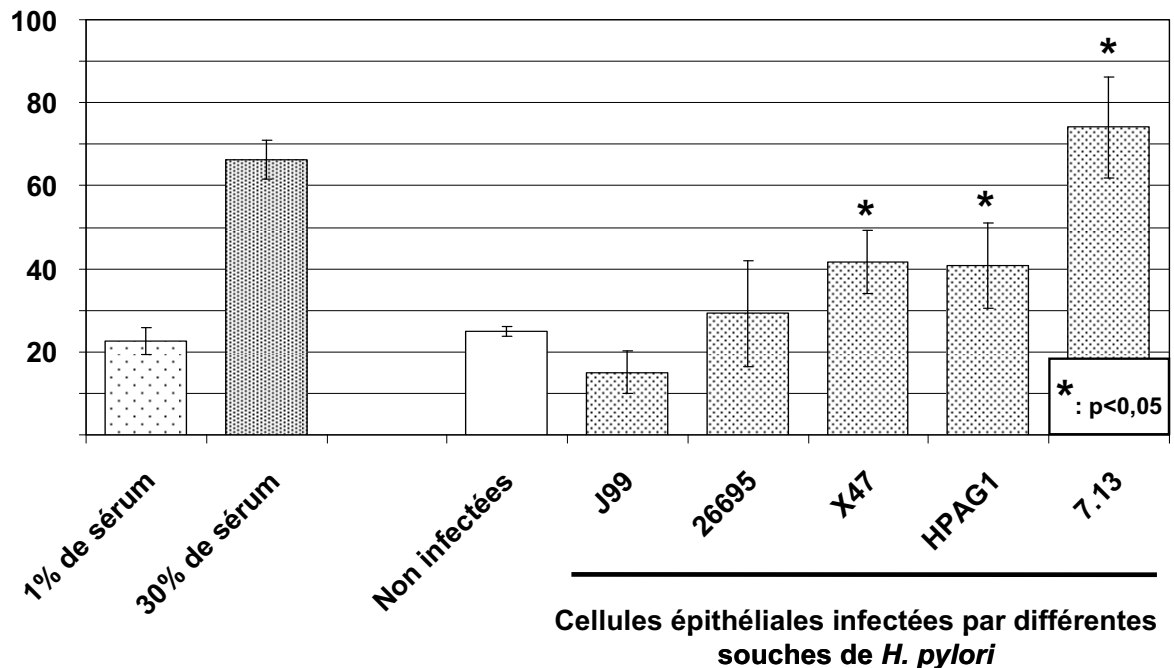


Figure 24. Potentiel chimiotactique des cellules épithéliales infectées par *H. pylori*. La migration des MSC humaines PM7 ou murines mMSC a été évaluée en réponse à une stimulation de 6 h dans diverses conditions (1 et 30% de sérum, cellules épithéliales humaines AGS ou murines mIC_{C12} non infectées, ou infectées par les souches de *H. pylori* J99, 26695, X47, HPAG1 et 7.13 pendant 36 h). Le nombre de cellules ayant été recrutées par champs microscopique (objectif x20, n=5) a été déterminé. **A/** La migration des MSC PM7 a été mesurée en réponse à l'infection de cellules épithéliales gastriques humaines de la lignée AGS. **B/** La migration des mMSC a été mesurée en réponse à l'infection de cellules épithéliales intestinales murines de la lignée mIC_{C12}. * : p<0,05, comparé aux cellules non infectées.

2.3. Etude de l'induction de l'apoptose des cellules épithéliales par *H. pylori*

De nombreux arguments suggèrent que le recrutement des MSC s'inscrit dans un mécanisme de réparation tissulaire consécutif à l'apparition de dommages cellulaires. Pour explorer cette hypothèse, les effets des 6 souches de *H. pylori* ont été mesurés sur l'apoptose des cellules épithéliales puis comparés aux résultats obtenus dans le modèle de migration précédent. Le pourcentage de cellules en apoptose a été évalué en mesurant la fragmentation de l'ADN. Cet état de fragmentation présente un profil caractéristique par cytométrie en flux après marquage des acides nucléiques avec un agent intercalant fluorescent comme l'iodure de propidium. La fragmentation de l'ADN est une phase tardive de l'apoptose et en est un bon marqueur.

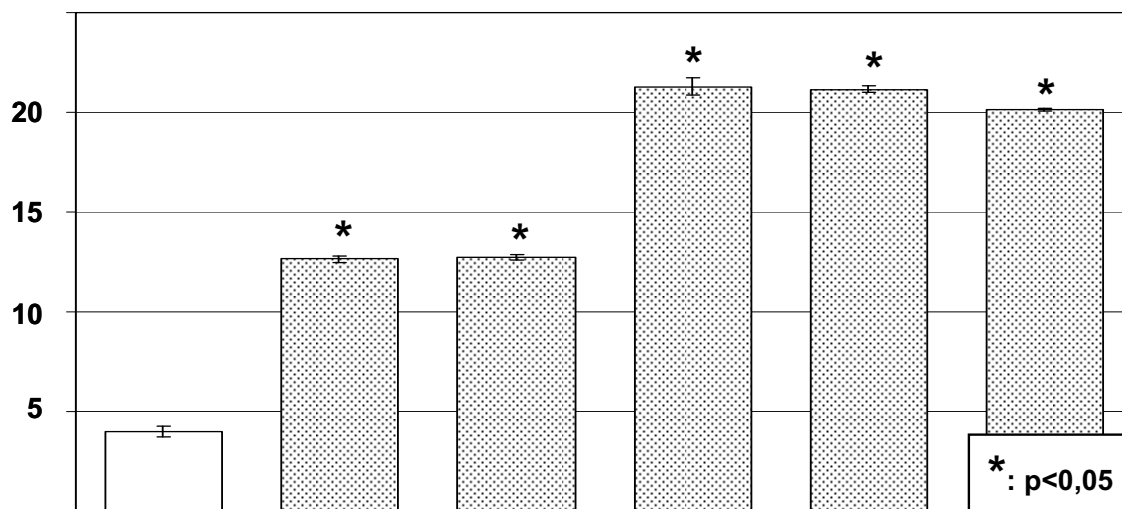
Afin de mesurer l'induction de l'apoptose, les cellules épithéliales ont été infectées pendant 48 h à une MOI de 50 par les différentes souches de *H. pylori* puis ont été perméabilisées, marquées à l'iodure de propidium et analysées par cytométrie en flux.

Concernant les cellules épithéliales humaines, les différentes souches de *H. pylori* ont induit l'apoptose des cellules épithéliales AGS (**Figure 25A**). De manière intéressante, les 3 souches qui ont induit le maximum d'apoptose (X47, HPAG1 et 7.13) ont été celles capables d'induire un recrutement significatif des MSC dans notre modèle de migration. Les souches J99 et 26695, qui n'ont pas induit de recrutement, ont présenté des propriétés pro-apoptotiques plus faibles. De plus, la moyenne du pourcentage des cellules épithéliales apoptotiques infectées par les souches J99 et 26695 était significativement inférieure à celle des cellules infectées par les souches X47, HPAG1 et 7.13 ($12,7 \pm 0,2$ vs $20,9 \pm 0,6$; $p < 0,001$). Ces résultats suggèrent donc un lien de causalité entre l'apoptose des cellules épithéliales infectées et le recrutement des MSC, ce qui renforce l'hypothèse d'un rôle des MSC dans la réparation tissulaire consécutive aux lésions cellulaires induites par l'infection par *H. pylori*.

Concernant le modèle murin, le profil d'apoptose obtenu a été similaire à celui obtenu avec les cellules humaines, suggérant des voies de pathogénicité similaires (**Figure 25B**). Dans ce modèle, seules les souches X47, HPAG1 et 7.13 ont été responsables d'une augmentation significative de l'apoptose des cellules épithéliales.

A/ Modèle humain

Pourcentage de cellules
en apoptose



B/ Modèle murin

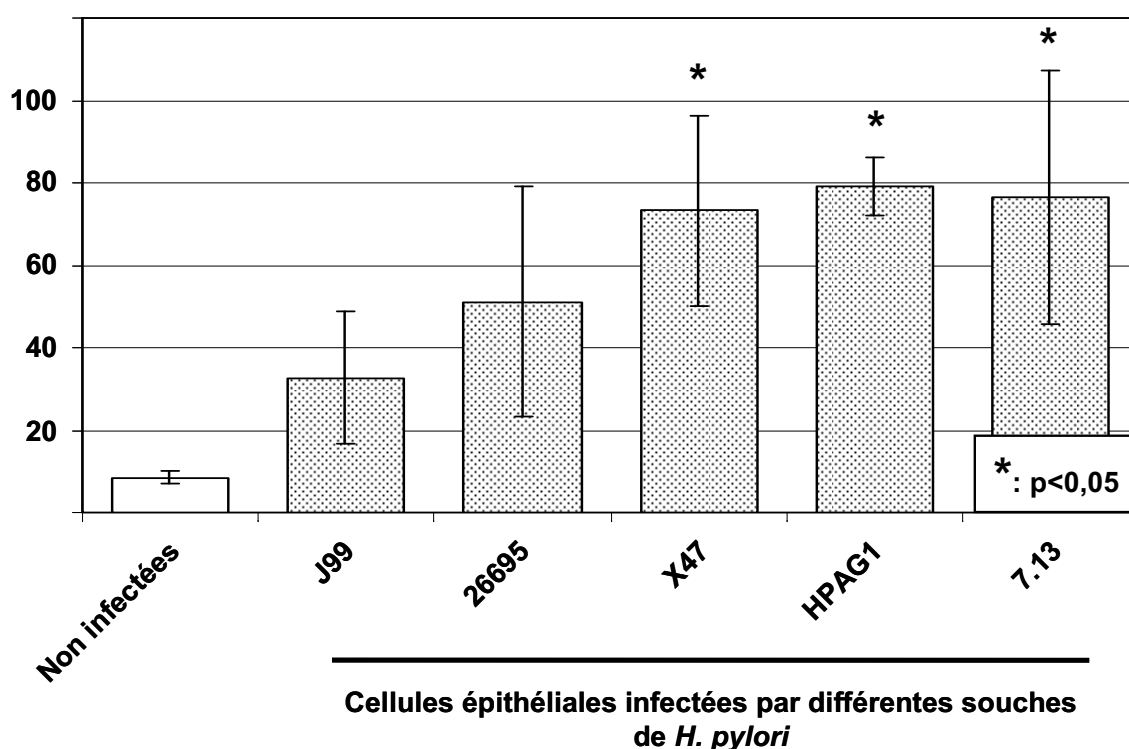


Figure 25. Analyse de l'apoptose des cellules épithéliales induite par l'infection par *H. pylori*. L'induction de l'apoptose des cellules épithéliales par différentes souches de *H. pylori* (J99, 26695, X47, HPAG1 et 7.13) a été évaluée par mesure de la fragmentation de l'ADN par cytométrie en flux après incorporation d'iodure de propidium. Les cellules épithéliales ont été infectées à une MOI de 50 pendant 48 h. **A/** L'apoptose de cellules épithéliales gastriques humaines AGS a été mesurée. **B/** L'apoptose de cellules épithéliales intestinales murines mIC₁₂ a été mesurée. *: $p < 0,05$, comparé aux cellules non infectées.

La capacité à induire l'apoptose ne semble pas être corrélée à la présence de la protéine CagA ou de la cytotoxine VacA de type s1m1. En effet, la souche X47 ne possède pas l'îlot de pathogénicité *cag* et possède une forme s2m2 de VacA (**Table 3**, Section Matériel et Méthodes). Par ailleurs les souches J99 et 26695, qui n'induisent pas d'apoptose, possèdent l'îlot de pathogénicité *cag* et un phénotype de type s1m1 pour la protéine VacA. Ces résultats suggèrent la présence d'un facteur de virulence responsable de ce mécanisme autre que les deux les plus majoritairement décrits chez *H. pylori*, CagA et VacA. Il apparaît cependant nécessaire de tester un plus grand nombre de souches afin d'exclure complètement un rôle de ces facteurs dans l'induction de l'apoptose.

2.4. Etude des facteurs chimioattractants

2.4.1. Choix des facteurs étudiés

Afin d'identifier les facteurs chimiotactiques responsables du recrutement des MSC, le transcriptome des cellules épithéliales infectées ou non infectées a été analysé. Dans une première approche, l'étude a été limitée à l'expression des facteurs connus comme possédant une activité chimiotactique sur les MSC d'une part et comme potentiellement surexprimés par les cellules épithéliales lors de l'infection par *H. pylori* d'autre part.

L'analyse bibliographique a abouti à l'identification de 15 facteurs pour les cellules murines et de 26 facteurs pour les cellules humaines. Cette différence est due à l'absence de certains facteurs chez la souris, mais également à l'absence de sondes spécifiques permettant de les détecter. Ces facteurs correspondent à différentes familles de molécules incluant des cytokines (CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL22, CXCL2/3, CXCL8, CXCL12, CX3CL1, IFN α , IFN β , IFN γ , IL1 β , IL6, IL7, IL10, TNF α et TNF β), des facteurs de croissance (SCF, EGF, HGF, IGF-1, VEGF-A, VEGF-B et VEGF-C) et une protéine cytotoxique (TRAIL) (**Annexe 1**, noms complets et alias des facteurs).

2.4.2. Analyse transcriptomique

Une approche d'analyse transcriptomique, réalisée par qRT-PCR en collaboration avec le Dr. Annie Schmid-Alliana (INSERM U576, Nice), a été menée sur les deux modèles, humain et murin. Les modifications de transcrits ont été étudiées après infection par deux souches de *H. pylori* qui induisent des effets différents. Ainsi, la souche 7.13, responsable d'un recrutement significatif dans les deux modèles, et la souche 26695, n'induisant pas de recrutement, ont été choisies. Les résultats présentés dans ce document ont été obtenus lors d'une seule expérience et doivent donc être reproduits.

Les ARNm ont été extraits des cellules épithéliales AGS et mIC_{C12} non infectées ou infectées par l'une des deux souches bactériennes à une MOI de 50. Les effets de deux durées d'infection, 6h et 18h, ont été évalués. Les acides nucléiques purifiés ont ensuite été soumis à une DNase afin d'éliminer l'ADN génomique, puis les ADN complémentaires (ADNc) ont été synthétisés par transcription inverse. La qualité de la transcription inverse et l'absence d'ADN génomique ont été estimées par réalisation d'une PCR spécifique de l'ADNc (amorces à la jonction de deux exons) de la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) et par dosage des ratios ADN/ARN (données non présentées).

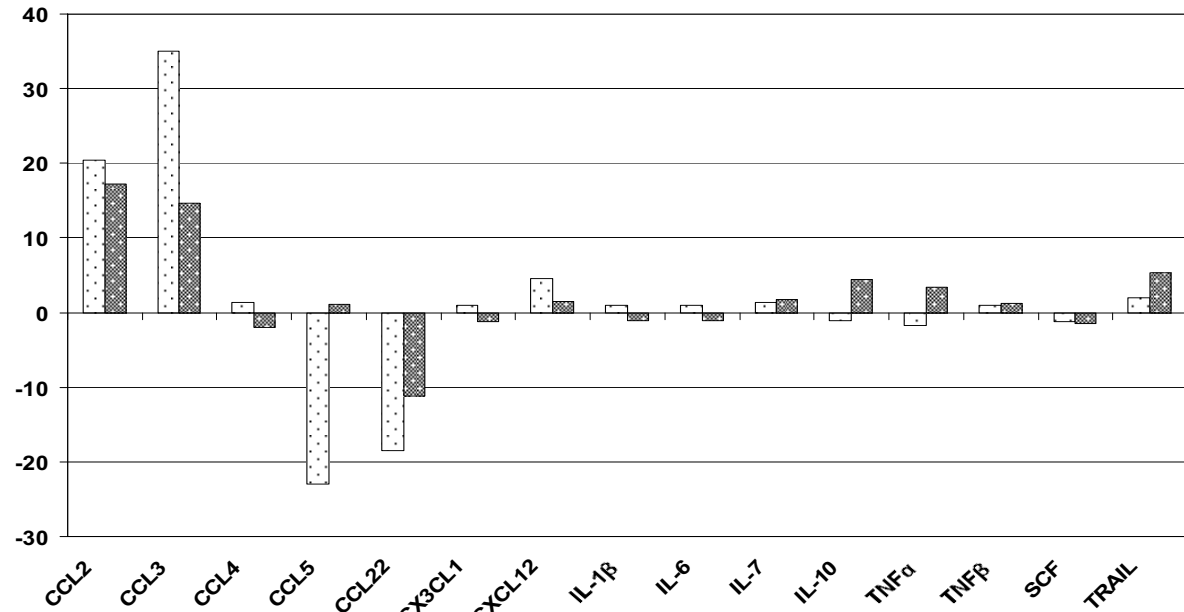
L'analyse de ces ADNc a été réalisée à l'INSERM U576. Les taux de transcription des gènes d'intérêts ont été normalisés à l'aide de 4 gènes de ménage (ACTB, GAPDH, HPRT et UBIQ) afin d'exprimer les résultats en ratio par rapport aux cellules épithéliales non infectées.

Concernant le modèle murin, deux facteurs, CCL2 et CCL3 sont apparus comme largement surexprimés lors de l'infection des cellules épithéliales par la souche 7.13 par rapport à l'infection par la souche 26695 après 6 h ou 18 h d'infection (**Figure 26A-B**). Le TNF α a uniquement été surexprimé après 18h d'infection pour la souche 7.13, suggérant l'implication d'une voie de signalisation indirecte nécessitant la mise en place de régulations plus complexes. Deux autres facteurs semblaient également varier : le CXCL12 mais avec des taux d'augmentation plus faible, et enfin le CCL22 surexprimé lors de l'infection par la souche 7.13 à 18 h post-infection. Dans une phase de réponse précoce (6h post-infection), les cytokines CCL5 et CCL22 étaient sous-exprimées, cependant ce profil n'a pas été retrouvé à des temps plus tardifs. Les autres facteurs ne subissent pas de modifications d'expression importantes.

En résumé, cinq facteurs, CCL2, CCL3, CCL22, CXCL12 et TNF α , semblent potentiellement impliqués dans le recrutement des mMSC par les cellules épithéliales mIC_{C12} infectées dans le modèle murin.

A/ 6h post-infection

Expression des transcrits après infection (ratios de l'expression des cellules infectées vs non infectées)



B/ 18h post-infection

Expression des transcrits après infection (ratios de l'expression des cellules infectées vs non infectées)

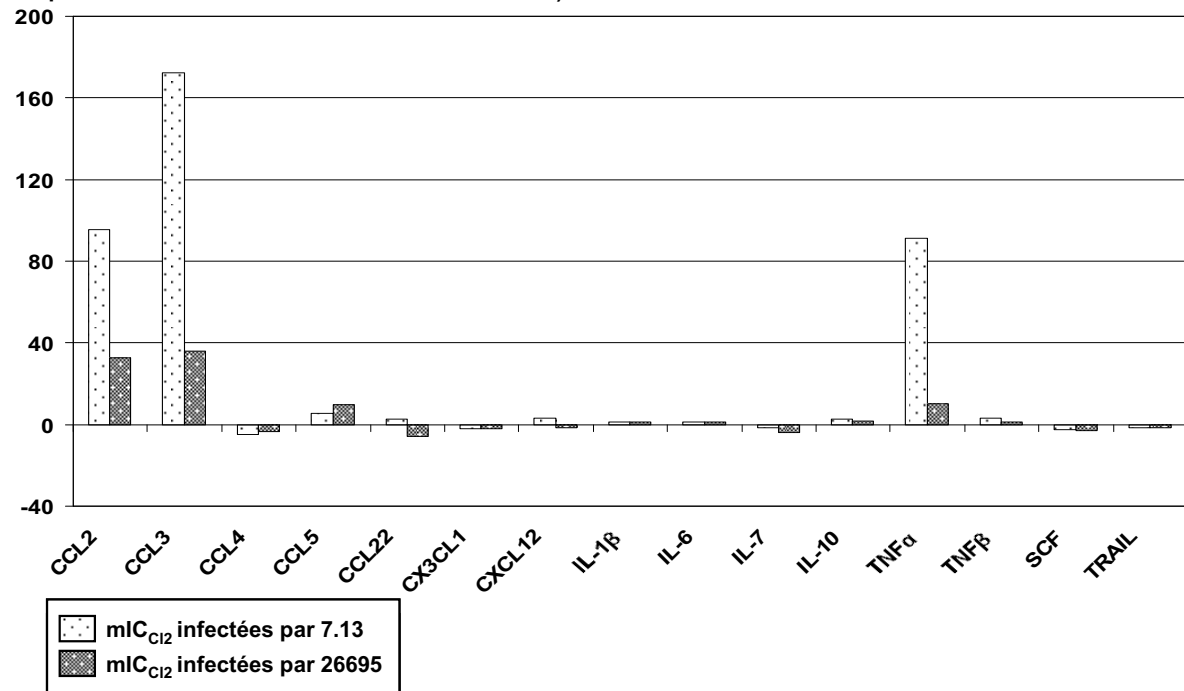


Figure 26. Analyse quantitative des transcrits des chimiokines produites par les cellules épithéliales murines mIC_{C12} infectées par *H. pylori*. L'analyse des transcrits a été réalisée en duplicat par qRT-PCR après infection des cellules à une MOI de 50 pendant A/ 6h ou B/ 18 h. Les valeurs d'expression des transcrits ont été normalisées par rapport à l'expression de 4 gènes de ménage. Les valeurs exprimées correspondent aux ratios d'expression des chimiokines dans les cellules infectées par rapport aux cellules non infectées.

Concernant le modèle humain, les résultats obtenus étaient plus hétérogènes en raison de quantités de matériel nucléaire peu importantes entraînant des résultats discordants sur les gènes de ménage. Cependant, les résultats préliminaires obtenus nous ont permis de montrer une surexpression importante de facteurs proinflammatoires (CXCL8 et TNF α) après 6 h d'infection par les deux souches de *H. pylori* (données non présentées). Cette surexpression précoce était suivie à 18 h par une augmentation des transcrits des facteurs CCL3, CCL22 et TNF α préalablement identifiés dans le modèle murin.

En conclusion, différentes cytokines semblent surexprimées par les cellules épithéliales infectées par la souche 7.13 dans nos deux modèles murins et humains. Si ces résultats sont reproduits lors d'expériences ultérieures, le rôle des facteurs CCL2, CCL3, CCL22, CXCL12 et TNF α dans le recrutement des MSC méritera alors d'être étudié en détail.

2.5. Conclusion

L'infection de cellules épithéliales par différentes souches de *H. pylori* est donc capable d'induire la migration et le recrutement des MSC, à la fois dans un modèle humain et dans un modèle murin. Des arguments en faveur du rôle de cette migration dans la réparation cellulaire ont été donnés en démontrant un lien entre l'apoptose des cellules épithéliales induite par l'infection par *H. pylori* et la migration des MSC. La voie de signalisation responsable du recrutement des MSC pourrait être liée à l'expression de certaines cytokines en réponse à l'infection et à l'apoptose des cellules épithéliales.

Ces résultats, et les nouvelles perspectives qu'ils apportent, seront discutés dans la partie « Discussion » en les replaçant dans le contexte général du rôle des MSC dans la carcinogenèse gastrique induite par l'infection par *H. pylori*.

3. Chapitre III : Etude du potentiel de différenciation épithélial des MSC

3.1. Introduction

Les résultats de la première partie de notre étude ont permis de montrer que les cellules épithéliales infectées par *H. pylori* étaient susceptibles de libérer des facteurs chimioattractants pour les MSC et d'induire la migration de ces cellules.

D'un point de vue physiologique, le rôle et les conséquences de ce recrutement restent inconnus. Dans son article princeps, JM Houghton propose que ces cellules soient recrutées en réponse à l'induction de l'apoptose des cellules souches épithéliales locales des glandes avant de les remplacer (Houghton *et al.*, 2004).

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, de nombreux autres arguments sont en faveur d'un rôle des MSC dans la réparation tissulaire, avec l'acquisition d'un phénotype de cellules différenciées aux sites ayant subi les lésions.

Ainsi, le renouvellement des cellules épithéliales gastriques est permis par la présence de cellules souches locales au niveau de chaque glande composant l'épithélium de la muqueuse gastrique. Ces cellules souches locales sont à l'origine de toutes les autres cellules épithéliales différenciées de la glande (Paragraphe 3.2 de l'étude bibliographique : renouvellement tissulaire du tractus gastrointestinal). Cependant, plusieurs équipes ont montré la présence de cellules différenciées originaires de la moelle osseuse dans le tractus digestif. Ces études, basées sur des transplantations de moelle osseuse entre un donneur et un receveur de sexe différent, ne déterminent pas le rôle précis des MSC, mais indiquent la possibilité que des BMDC puissent se différencier en cellules épithéliales gastrointestinales. Ainsi, Okamoto *et al.* ont montré que des cellules médullaires provenant d'un donneur masculin peuvent être retrouvées au niveau de la muqueuse gastrique d'un receveur féminin. De manière intéressante, ces cellules n'expriment pas le CD45, marqueur de surface des cellules d'origine hématopoïétique, mais expriment des cytokératines, molécules spécifiques du cytosquelette des cellules épithéliales (Okamoto and Watanabe, 2004). Ces cellules sont retrouvées à un taux relativement faible, compris entre 0,4 et 3,1% des cellules de l'épithélium. Cependant, ce taux est corrélé avec le niveau de lésions au niveau de l'épithélium comme la présence d'ulcères gastriques ou d'une maladie du greffon contre l'hôte. Des études chez la souris ont confirmé ces résultats en montrant que des BMDC pouvaient être retrouvées au niveau gastrique, et que la proportion pouvait être augmentée suite à une irradiation ou à l'apparition

d'un cancer intestinal (Francois *et al.*, 2006; Jiang *et al.*, 2002a; Krause *et al.*, 2001; Rizvi *et al.*, 2006).

A l'heure actuelle, peu de modèles *in vitro* de différenciation épithéliale des MSC existent. Des modèles de différenciation en cellules épithéliales des voies respiratoires ont été mis au point après coculture entre des MSC et des cellules des petites voies aériennes supérieures. Ces modèles, utilisant des cocultures directes ou séparées par des inserts de culture, ont permis de montrer que les MSC sont capables d'acquérir des marqueurs épithéliaux après transdifférenciation ou fusion (Popov *et al.*, 2007; Spees *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2005). Des modèles de culture organotypiques, habituellement utilisés pour la culture des kératinocytes, ont également permis de montrer une différenciation épithéliale des MSC (Laco *et al.*, 2009; Ma *et al.*, 2009). Deux autres modèles de différenciation utilisant uniquement des conditions de culture particulières ont également été mis au point. La culture de MSC de rat sur des inserts de culture microporeux permet l'expression de marqueurs épithéliaux (cytokératine 5 et 8 et ZO-1) (Shu *et al.*, 2006). L'équipe de Paunescu a ensuite proposé un protocole de différenciation épithéliale après culture avec un cocktail de facteurs de croissance. Ainsi, cette équipe a montré que la culture des MSC en présence de KGF, EGF, IGF-2 et HGF permettait l'expression de cytokératine 19 et une augmentation des transcrits de cytokératine 18 par ces cellules (Paunescu *et al.*, 2007). Nous n'avons pas reproduit ces résultats avec les MSC disponibles au laboratoire. Les différences observées entre les protocoles publiés et les expériences menées au laboratoire peuvent être dues à des différences dans les méthodes de purification des MSC aboutissant à l'isolement de sous populations différentes. En effet, comme nous l'avons vu dans l'introduction, de nombreux facteurs peuvent influencer sur la qualité et le type de sous population purifiée. Cependant, il est intéressant de noter qu'à l'heure actuelle aucun de ces deux protocoles n'a été reproduit dans la littérature. Par ailleurs, aucun modèle *in vitro* de différenciation des MSC dans un contexte gastrointestinal n'a été développé.

Parallèlement à leur rôle dans la réparation tissulaire, plusieurs arguments sont en faveur d'un rôle des MSC dans la carcinogenèse même si leur rôle dans la croissance tumorale porte encore à discussion à la vue des résultats discordants obtenus dans les différentes études (Lazennec and Jorgensen, 2008). Les MSC peuvent migrer au niveau des sites tumoraux et être à l'origine des fibroblastes associés aux tumeurs (Spaeth *et al.*, 2009). Les MSC possèdent par ailleurs des propriétés intrinsèques favorisant le développement tumoral comme des capacités immunosuppressives, angiogéniques et favorisant la formation de métastases (Sun *et al.*, 2005). Finalement, certains cancers, particulièrement les cancers

épithéliaux, peuvent survenir à partir de BMDC. Ainsi, les MSC pourraient être à l'origine d'adénocarcinomes gastriques, du syndrome de Barrett, de fibrosarcomes et du sarcome de Ewing (Houghton *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2007b; Sarosi *et al.*, 2008; Tirode *et al.*, 2007).

Afin d'obtenir une meilleure compréhension du rôle des MSC dans la réparation cellulaire et dans la carcinogenèse du tractus gastrointestinal, nous avons décidé d'évaluer leur capacité de différenciation en cellules épithéliales dans un contexte gastrointestinal. Pour cela, l'approche qui nous a semblé la plus physiologique consistait en une coculture de cellules épithéliales et de MSC.

3.2. Coculture directe entre MSC et cellules épithéliales

3.2.1. Approche phénotypique

Afin de déterminer le devenir de MSC humaines recrutées au niveau de la muqueuse épithéliale gastrique, nous avons cultivé ces cellules en présence de cellules épithéliales gastrointestinales (lignées AGS ou HT-29). Pour pouvoir identifier et différencier chacun des deux types cellulaires, nous avons préalablement marqué, à l'aide d'un vecteur lentiviral, les MSC avec la protéine fluorescente verte eGFP et les cellules épithéliales gastrointestinales avec la protéine fluorescente rouge DsRED.

Une quantité de 20 000 MSC marquées à la eGFP a ensuite été cultivée avec 2 500 cellules épithéliales marquées à la DsRED (AGS ou HT-29) dans le milieu de culture des MSC déplété en bFGF pour éviter d'inhiber leur potentiel de différenciation (Baddoo *et al.*, 2003). Après 8 jours de coculture, des cellules exprimant simultanément les deux marqueurs sont apparues (**Figure 27**, flèches blanches). Ces cellules possèdent donc à la fois une origine médullaire, confirmée par le marquage vert, et une origine épithéliale, confirmée par le marquage rouge. De manière intéressante, un marquage par immunofluorescence dirigé contre les cytokératines, protéines du cytosquelette spécifiques des cellules épithéliales, a montré que ces cellules doublement positives expriment ce marqueur épithélial. La présence de cellules doublement marquées eGFP et DsRED suggère un événement de fusion entre MSC et cellules épithéliales. Des résultats similaires ont été obtenus avec les cellules épithéliales gastriques de la lignée AGS et les cellules épithéliales intestinales de la lignée HT-29 (**Figure 27**). De manière intéressante, la majorité des cellules eGFP et DsRED positives sont multinucléées confirmant l'hypothèse de la fusion.

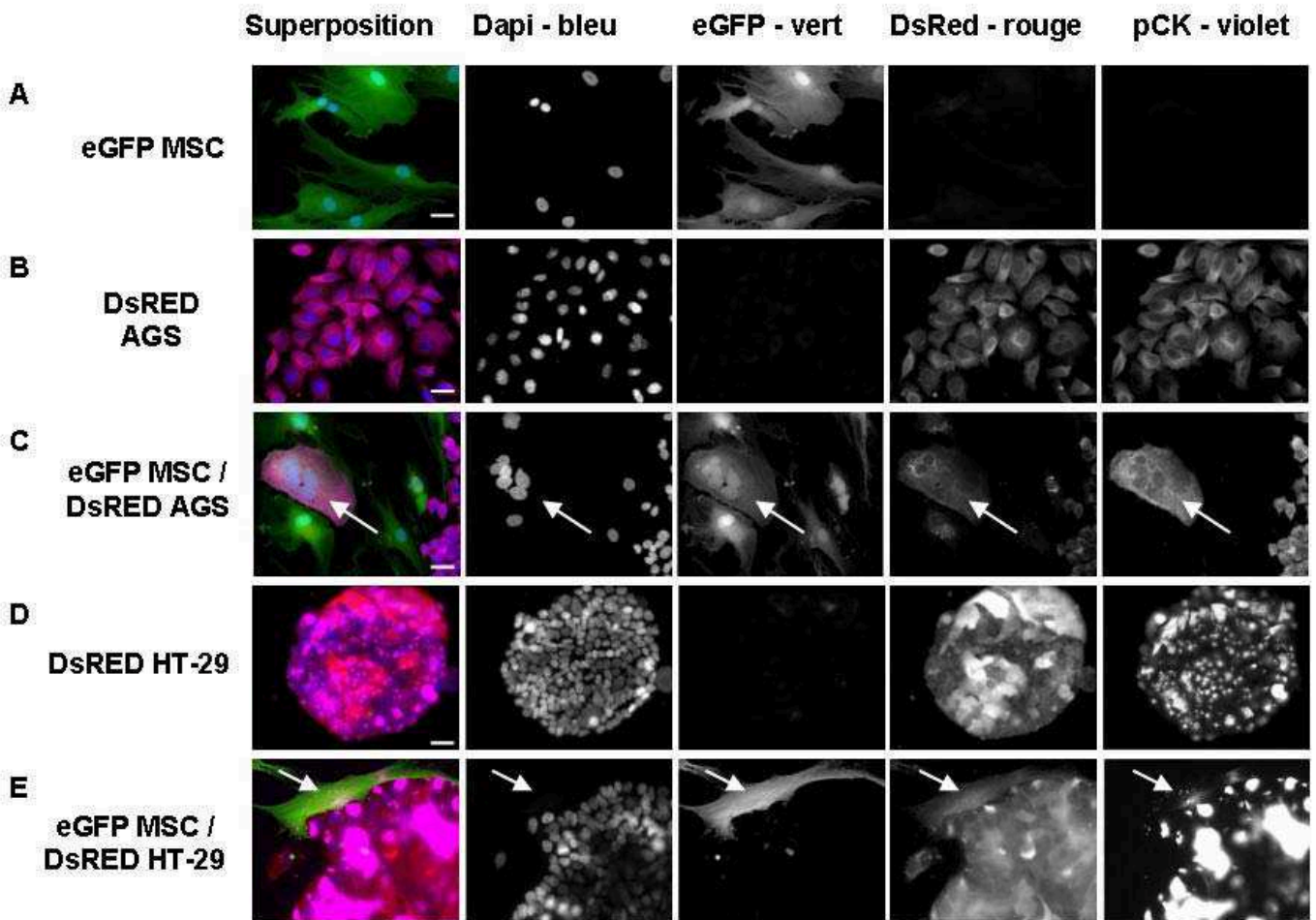


Figure 27. Coculture directe entre MSC et cellules épithéliales et marquage des cytokératines. 20 000 MSC (PM7) marquées à la eGFP et 2 500 cellules épithéliales marquées à la DsRED ont été cultivées pendant 8 jours puis un marquage par immunofluorescence des cytokératines a été réalisé. **A/** Les MSC marquées exprimaient la protéine eGFP (vert) mais n'exprimaient pas de cytokératines. **B et D/** Les cellules épithéliales (B : AGS, D : HT-29) exprimaient à la fois la protéine DsRED (rouge) et les cytokératines (violet). **C et E/** Les cocultures ont permis l'apparition de cellules présentant les 3 marquages, suggérant des événements de fusion (flèches). Le premier quadrant correspond à la superposition colorée des différents canaux seuls représentés en noir et blanc. Barre d'échelle : 10 µm.

Une étude transcriptomique réalisée sur des MSC humaines a montré que ces cellules dans un stade indifférencié sont capables d'exprimer les ARNm des cytokératines (Tremain *et al.*, 2001). Même si dans nos conditions, l'expression protéique de cytokératines n'a jamais été détectée sur les MSC, nous avons utilisé un second marqueur épithélial l'*Epithelial Specific Antigen* (ESA) afin de valider ces résultats. Dans ces nouvelles conditions et de manière similaire aux résultats préalablement obtenus, des cellules exprimant à la fois la eGFP, la DsRED et l'ESA ont été retrouvées par immunofluorescence (**Figure 28**, flèches blanches). Ces résultats valident donc l'apparition de marqueurs épithéliaux sur des cellules issues des MSC après coculture et éventuellement fusion avec des cellules épithéliales.

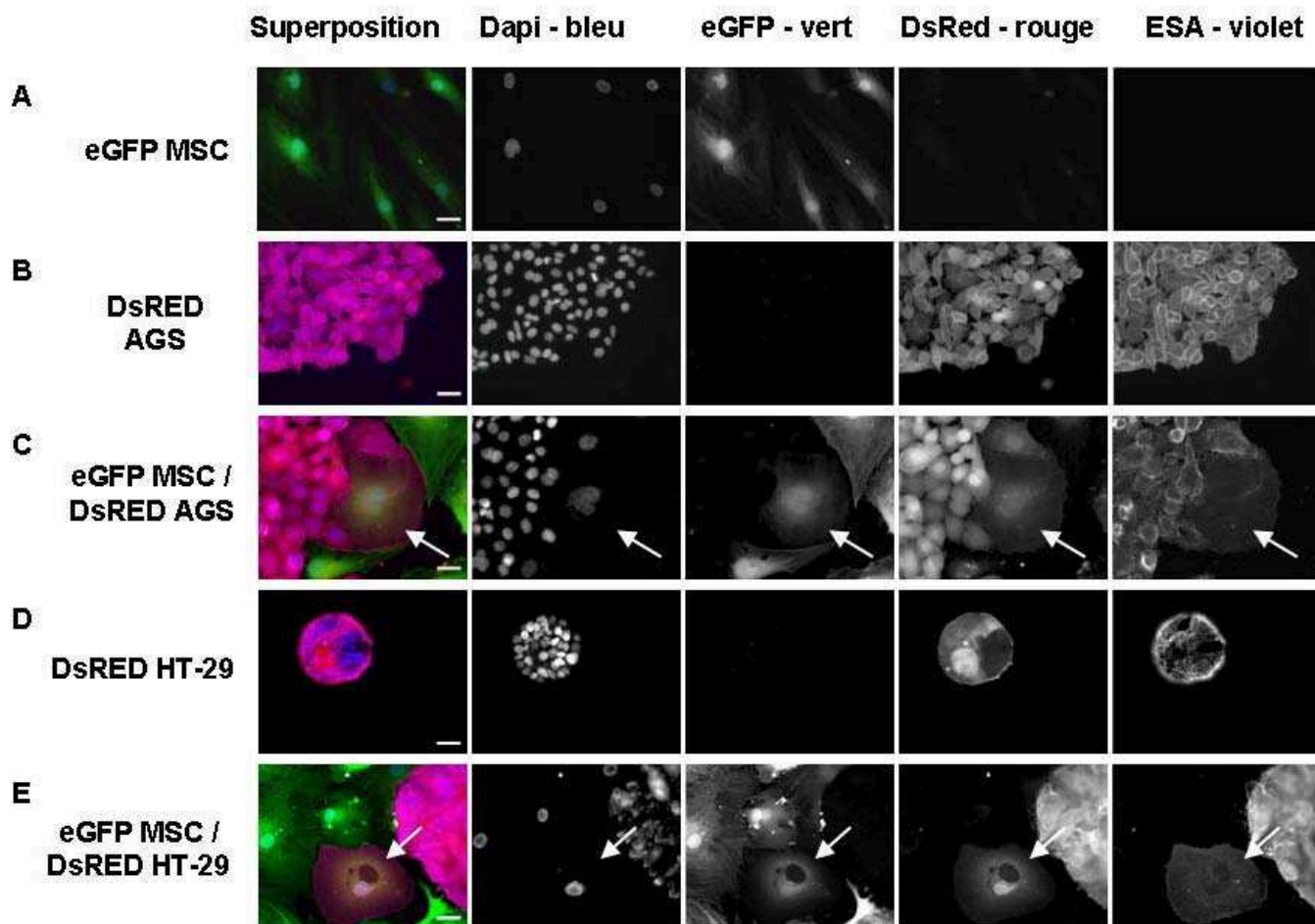


Figure 28. Coculture directe entre MSC et cellules épithéliales et marquage de l'*Epithelial Specific Antigen*. 20 000 MSC (PM7) marquées à la eGFP et 2 500 cellules épithéliales marquées à la DsRED ont été cultivées pendant 8 jours puis un marquage par immunofluorescence de l'ESA a été réalisé. **A/** Les MSC marquées exprimaient le eGFP (vert) mais n'exprimaient pas l'ESA. **B et D/** Les cellules épithéliales (B : AGS, D : HT-29) exprimaient à la fois la DsRED (rouge) et l'ESA (violet). **E et F/** Les cocultures ont permis l'apparition de cellules présentant les 3 marquages, suggérant des événements de fusion (flèches). Le premier quadrant correspond à la superposition colorée des différents canaux seuls représentés en noir et blanc. Barre d'échelle : 10 μ m.

Afin de vérifier que les effets observés n'étaient pas consécutifs à la transduction lentivirale, une seconde stratégie a été mise en place. Les MSC et les cellules épithéliales ont été marquées en utilisant des composés chimiques n'influant pas sur la régulation génétique des cellules. Les membranes des MSC ont été marquées à l'aide de molécules fluorescentes vertes (PKH2), et celles des cellules épithéliales en rouge (CM-Dil). Avec cette technique, des cellules exprimant à la fois un marquage vert et rouge ainsi qu'un marqueur épithélial ont également été retrouvées. Il est intéressant de noter que ces marquages sont plus sujets à caution, car l'intensité de fluorescence diminue au cours du temps et les interprétations microscopiques apparaissent donc plus difficiles à valider (**Figure 29**).

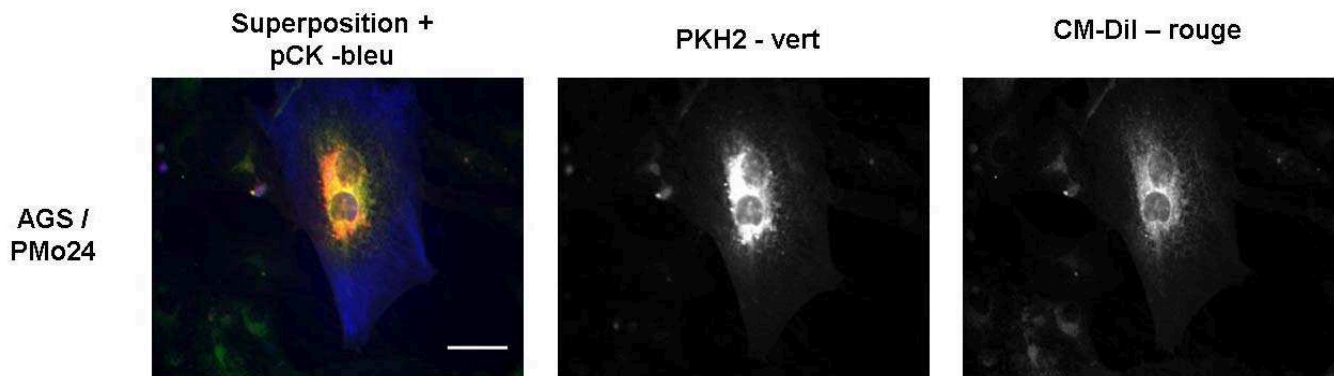


Figure 29. Coculture directe entre MSC et cellules épithéliales marquées au niveau des membranes. 20 000 MSC (PMo24) marquées au PKH2 et 2 500 cellules épithéliales marquées au CM-Dil ont été cultivées pendant 8 jours puis un marquage par immunofluorescence des cytokératines (bleu) a été réalisé. Le premier quadrant correspond à la superposition colorée des différents canaux seuls représentés en noir et blanc. Barre d'échelle : 10 μ m.

Par ailleurs, des résultats similaires ont été obtenus à partir des deux sources de MSC humaines dont nous disposons au laboratoire à savoir les PM7 et PMo24.

Les photos précédentes ayant été obtenues avec un microscope à épifluorescence à champ large, il était impossible de réfuter l'hypothèse d'une superposition d'une MSC avec une cellule épithéliale aboutissant à l'impression d'une cellule triplement marquée. Une analyse des lames par microscopie confocale a alors été réalisée afin d'exclure ce risque de superposition. Cette technique a permis de confirmer que les trois marquages, eGFP, DsRED et ESA, étaient situés sur le même plan focal, excluant les risques de superposition de cellules (Figure 30).

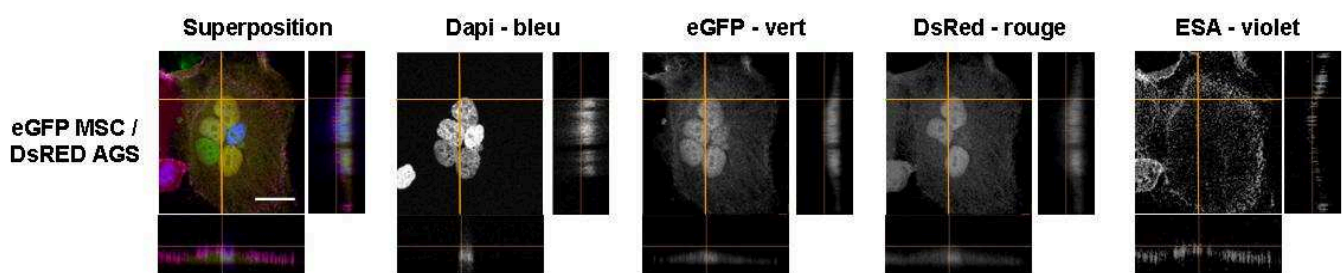


Figure 30. Analyse par microscopie confocale de la coculture directe entre MSC et cellules épithéliales et marquage de l'*Epithelial Specific Antigen*. 20 000 MSC (PM7) marquées à la eGFP et 2 500 cellules épithéliales marquées à la DsRED ont été cultivées pendant 8 jours puis un marquage par immunofluorescence de l'ESA a été réalisé. Les lames ont été analysées par microscopie confocale. Les images correspondent à une reconstruction fusion 3D avec une projection des maxima d'intensité en x - y et la projection des coupes orthogonales de l'empilement en z , représentées par les lignes discontinues jaunes. Le premier quadrant correspond à la superposition colorée des différents canaux seuls représentés en noir et blanc. Barre d'échelle : 10 μ m.

3.2.2. Approche chromosomique

Afin d'analyser plus en détail ces mécanismes de fusion, un protocole de FICTION (*Fluorescence-Immunophenotyping and Interphase Cytogenetics as a Tool for Investigation of Neoplasms*), basé sur la technique de FISH (*Fluorescence In Situ Hybridation*) couplée à un marquage par immunofluorescence, a été mis au point au laboratoire. Pour cela, des MSC issues d'un donneur de sexe masculin (PM7) et des cellules épithéliales gastriques issues d'un patient de sexe féminin (AGS) ont été utilisées. Une première analyse du contenu chromosomique des PM7 et des AGS a permis de vérifier que ces cellules ne possédaient pas de contenu nucléaire anormal concernant les chromosomes sexuels. Ainsi, les cellules AGS issues d'un patient femme possèdent deux chromosomes X et ne présentent aucun chromosome Y ; en revanche, toutes les PM7, issus d'un patient de sexe masculin, présentent un chromosome X et un chromosome Y (**Figure 31A-B**). L'analyse de cellules multinucléées résultant de la coculture a permis de montrer que ces cellules possédaient deux noyaux provenant des deux populations cellulaires, l'un caractéristique des cellules féminines et le second caractéristique des cellules masculines (**Figure 31C**). Ces résultats ont confirmé que les MSC sont capables de fusionner avec les cellules épithéliales gastriques. De plus, le marquage par immunofluorescence des cytokératines a montré que les cellules ainsi fusionnées acquièrent un phénotype épithélial. De manière intéressante, il a été possible de retrouver des cellules exprimant des cytokératines avec un contenu chromosomique anormal (**Figure 31D**). Dans cette figure, il apparaît clairement que la cellule mononucléée contient 3 chromosomes X pour un seul chromosome Y. Cette combinaison chromosomique ne peut être obtenue de manière naturelle lors d'une mitose d'une cellule mâle ou femelle et est donc la conséquence d'une fusion entre deux noyaux issus de cellules de sexe différent. Ces résultats ont donc montré que la fusion des membranes cytoplasmiques peut également conduire à une fusion des noyaux. Enfin, quelques cellules présentaient un contenu chromosomique caractéristique d'une cellule mâle mais expriment des cytokératines (**Figure 31E**). Plusieurs hypothèses peuvent être avancées quant à l'origine de ces cellules. En premier lieu, ces cellules pourraient correspondre au résultat d'une mitose d'une cellule issue d'une fusion. Ainsi, les cellules fusionnées pourraient rentrer en mitose et retrouver un contenu chromosomique normal et donc une stabilité génétique. La deuxième possibilité correspond à une transdifférenciation d'une MSC sans événement de fusion. Cette hypothèse pourrait être rapprochée des données obtenues par les équipes proposant des conditions de culture particulière permettant l'acquisition de marqueurs épithéliaux par les MSC (Popov *et al.*, 2007; Shu *et al.*, 2006).

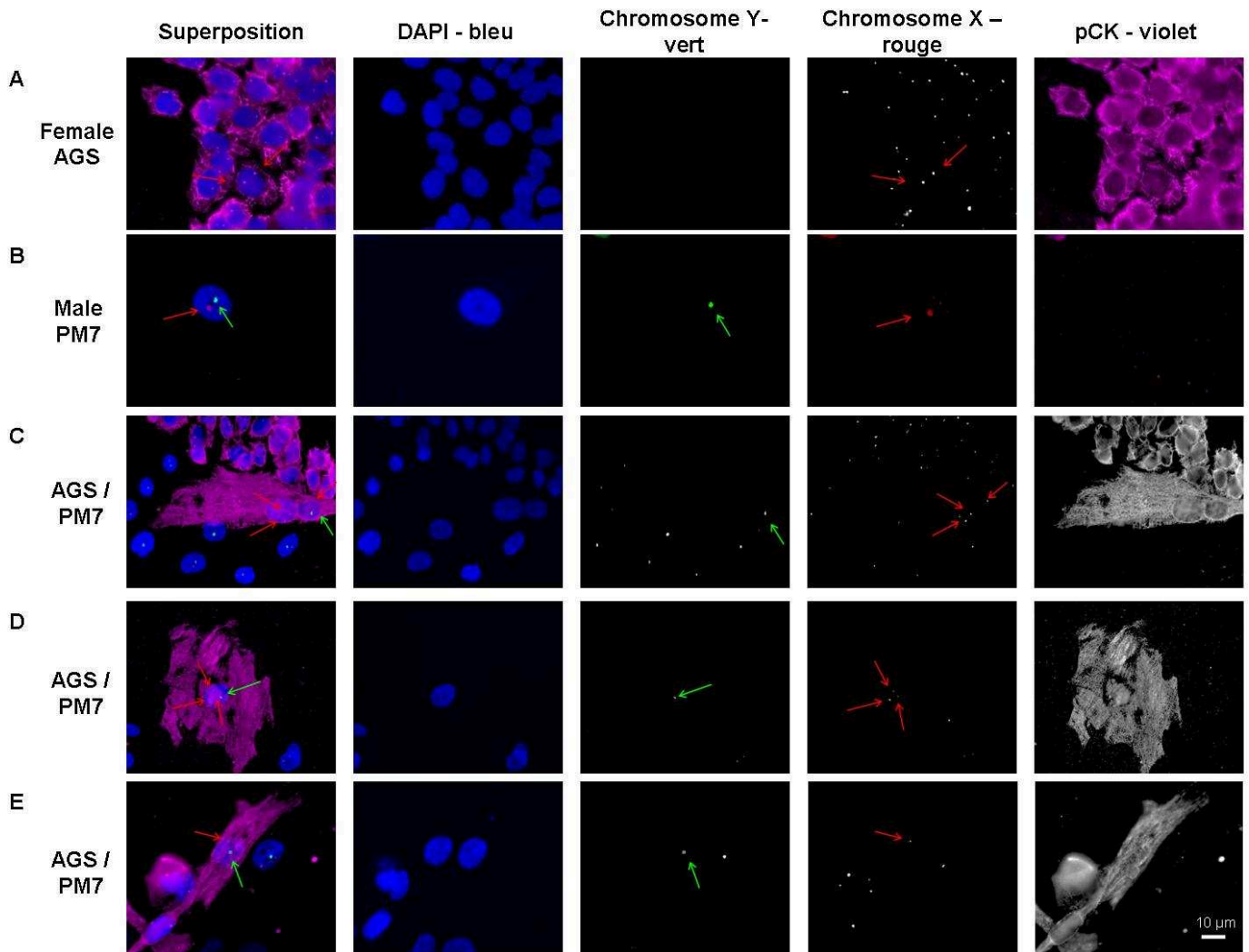


Figure 31. Analyse par FICTION de la coculture directe entre MSC et cellules épithéliales et marquage des cytokératines. 20 000 MSC mâles (PM7) et 2 500 cellules épithéliales gastriques femelles ont été cultivées pendant 8 jours puis un marquage par FICTION (chromosome Y révélé par SpectrumGreen, chromosome X révélé par SpectrumOrange, cytokératines révélées par un marquage violet) a été réalisé. **A-B/** Les PM7 mâles (XY) et les AGS femelles (XX) présentaient un contenu chromosomique sexuel normal. **C/** Exemple d'une cellule exprimant un marquage épithélial et présentant un noyau mâle et un noyau femelle (XY+XX). **D/** Exemple d'une cellule exprimant un marquage épithélial et présentant un noyau au contenu anormal (XXXY). **E/** Exemple d'une cellule exprimant un marquage épithélial et présentant un contenu chromosomique caractéristique d'un donneur mâle (XY). Le premier quadrant correspond à la superposition colorée des différents canaux seuls représentés en noir et blanc. Barre d'échelle : 10 µm.

Les différents marquages réalisés ont permis d'affirmer que les MSC sont capables d'acquérir des marqueurs épithéliaux après fusion avec des cellules épithéliales. Ces expériences n'ont cependant pas permis d'exclure la possibilité d'événement de transdifférenciation sans fusion. Afin de répondre à cette problématique, des travaux préliminaires ont été conduits.

3.3. Coculture indirecte entre MSC et cellules épithéliales

Dans cette nouvelle approche, les MSC et les cellules épithéliales n'ont pas été cultivées de manière directe mais séparées par un insert de culture. La présence de cet insert de culture poreux (pores de 0,4 μm) a permis un échange de molécules solubles (cytokines ou facteurs de croissance par exemple) entre les deux populations, mais a exclu un passage des cellules ou des mécanismes nécessitant un contact cellulaire. Ainsi, l'insert de culture a permis de séparer une chambre inférieure dans laquelle sont ensemencées les MSC sur une lamelle de verre d'une chambre supérieure dans laquelle sont ensemencées les cellules épithéliales (**Figure 32A**). Ce modèle a permis d'identifier des mécanismes de transdifférenciation en excluant ceux de fusion.

En premier lieu, le modèle a été établi en se basant sur une coculture de hMSC avec des cellules épithéliales pulmonaires de la lignée A549. Popov *et al.* ont en effet montré que la coculture de MSC avec ces cellules permettait l'expression de marqueurs épithéliaux par les MSC (Popov *et al.*, 2007). La coculture a effectivement permis l'apparition dans la chambre inférieure contenant les MSC de cellules présentant un phénotype épithélial caractéristique avec des cellules cuboïdes établissant des jonctions intercellulaires (**Figure 32B**). Afin de valider ce phénotype épithélial, un marquage par immunofluorescence des cytokératines a été réalisé (**Figure 32C**). Certaines cellules de la chambre inférieure, donc issues de MSC, exprimaient bien des marqueurs épithéliaux, suggérant que les MSC peuvent exprimer des marqueurs épithéliaux sans fusionner avec des cellules épithéliales. Cependant, ces résultats étaient peu reproductibles et les pourcentages de cellules différenciées étaient faibles. Ainsi, la figure 32B montre un résultat optimal non représentatif de l'ensemble des expériences réalisées. Dans un second temps, nous avons modifié le modèle pour utiliser des cellules épithéliales gastriques de la lignée AGS. Des résultats similaires ont été obtenus avec une reproductibilité également assez faible (**Figure 32D**).

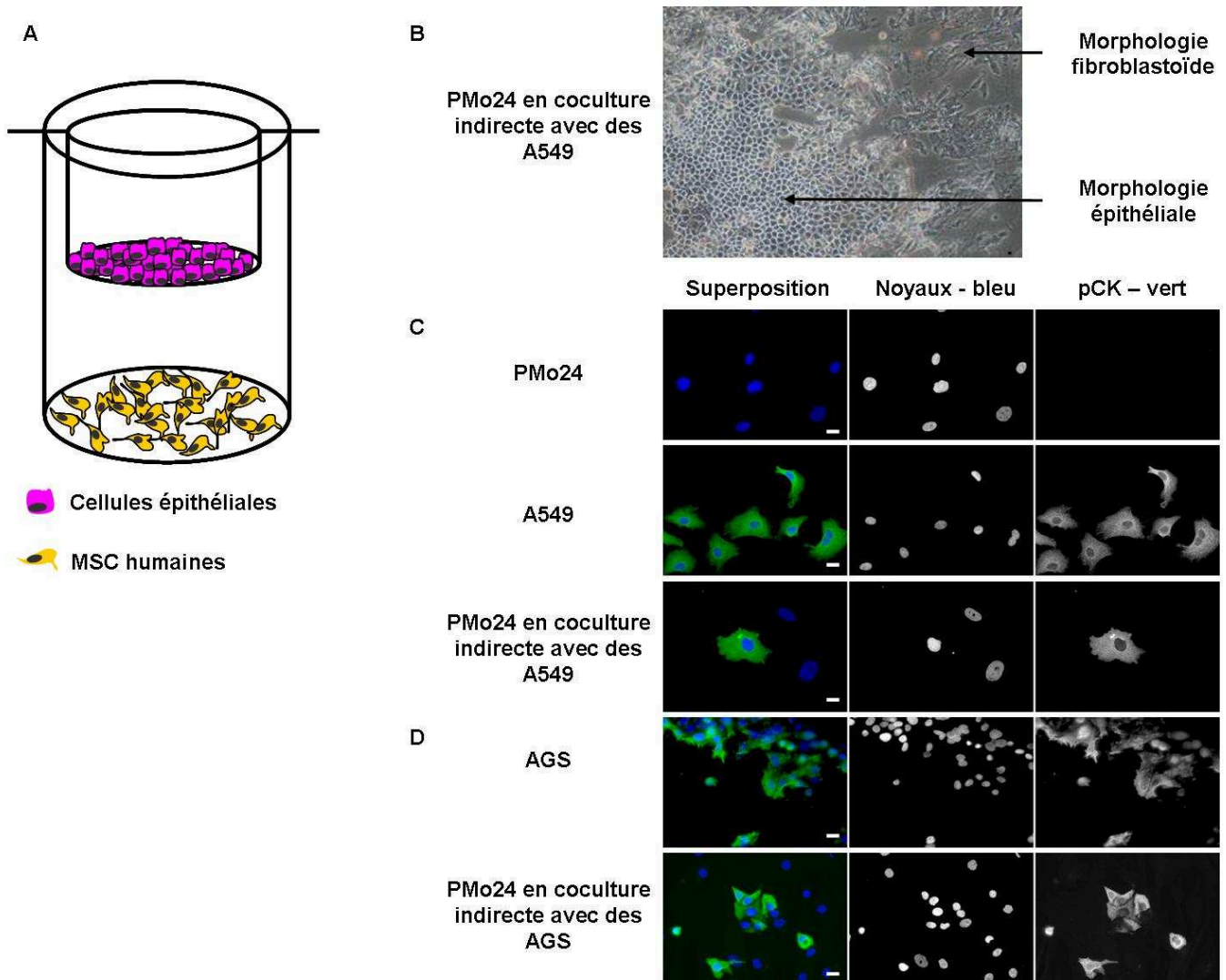


Figure 32. Coculture indirecte entre MSC et cellules épithéliales. **A/** Les MSC PMo24 et les cellules épithéliales A549 ou AGS ont été cultivées séparées par un insert de culture ne permettant pas le passage cellulaire. **B/** Après 8 jours de coculture, des cellules au phénotype épithélial sont apparues dans la chambre inférieure contenant les MSC. **C/** Un marquage par immunofluorescence des cytokératines (vert) a montré que les MSC cultivées seules n’exprimaient pas ce marqueur à l’inverse des cellules épithéliales pulmonaires (A549). Après coculture, des cellules positives pour les cytokératines sont apparues dans la chambre contenant les MSC. **D/** Après coculture avec des cellules épithéliales gastriques (AGS), des cellules exprimant les cytokératines ont émergé au sein de la population des MSC. Barre d’échelle : 10 μ m.

Il semble donc que les MSC soient capables d’exprimer des marqueurs épithéliaux par transdifférenciation. Cependant, le peu de reproductibilité de ces expériences limite la pertinence de ces résultats. Ainsi, une mauvaise répartition des pores au niveau de l’insert pourrait aboutir à la présence de pores se superposant et donc de grande taille, permettant le passage des cellules. Afin de pallier ce problème, nous avons décidé d’utiliser des MSC marquées au PKH2. Cependant, les résultats obtenus ne nous ont pas permis de conclure de manière certaine à la présence de transdifférenciation en raison de la présence de cellules

exprimant des marqueurs épithéliaux mais non marquées au PKH2. Ces cellules pourraient provenir de cellules épithéliales non marquées (données non présentées).

La conclusion pourrait être donnée par des expériences de FICTION sur les chromosomes sexuels en utilisant des MSC et des cellules épithéliales de genres différents. Cependant, les expériences étant peu reproductibles, et les cellules différenciées pas forcément observables en lumière blanche, il serait nécessaire de réaliser ces marquages sur un nombre important d'échantillons afin d'optimiser les chances d'observer le phénomène.

3.4. Coculture *in vivo* entre MSC et cellules épithéliales

Pour évaluer la pertinence des mécanismes de fusion ou de transdifférenciation dans un contexte *in vivo*, nous avons utilisé un modèle, préalablement établi au laboratoire, de xélogreffe de cellules AGS chez la souris immunodéficiente NOG (*Non Obese Diabetous /Shi-severe combined immunodeficiency /Interleukin-2R γ ^{null}*) conduisant au développement de tumeur.

Dans cette première approche expérimentale, des cellules AGS seules ou un mélange de cellules AGS et PM7 ont été injectées par voie sous-cutanée à la souris NOG. La prise de la greffe et la croissance tumorale ont ensuite été évaluées en mesurant le diamètre de la tumeur obtenue tous les sept jours. Les deux conditions ont permis l'apparition d'une tumeur mesurable après 28 jours. Cependant, la cinétique de croissance a été différente et 50 jours après l'injection, les diamètres des tumeurs obtenues avec les cellules AGS et PM7 étaient significativement inférieurs à ceux obtenus avec les AGS seules ($63 \pm 8,0$ vs $92 \pm 18,7$ cm² ; $p < 0,05$). Il est intéressant de noter que ces résultats suggèrent un rôle potentiellement anti-tumoral des MSC.

Cinquante jours après l'injection, les souris ont été sacrifiées et les cellules composant la tumeur ont été analysées par FICTION afin de déterminer leurs origines. L'analyse des échantillons a montré la présence de nodules de cellules humaines entourés de cellules murines, non reconnues par les sondes de FISH (**Figure 33A-B**). A l'intérieur de ces nodules, quelques rares cellules présentant un chromosome Y, montrant leur origine de MSC, ont été retrouvées. Des analyses complémentaires, en microscopie confocale, ont montré qu'il est possible de retrouver des cellules avec des contenus chromosomiques anormaux, par exemple 1 Y et plusieurs X, suggérant que des événements de fusion peuvent également se produire dans un contexte *in vivo* (**Figure 33C**).

Afin d'explorer cette hypothèse, les tumeurs ont été dissociées enzymatiquement dans le but de remettre les cellules en culture. Ces cellules ont ensuite été analysées par FICTION

afin de déterminer leur contenu chromosomique. De rares cellules possédant un chromosome Y mais plusieurs chromosomes X ont été retrouvées suggérant que les événements de fusion aboutissent à l'obtention de cellules viables, capables d'adhérer et d'être sub-cultivées (Figure 33D).

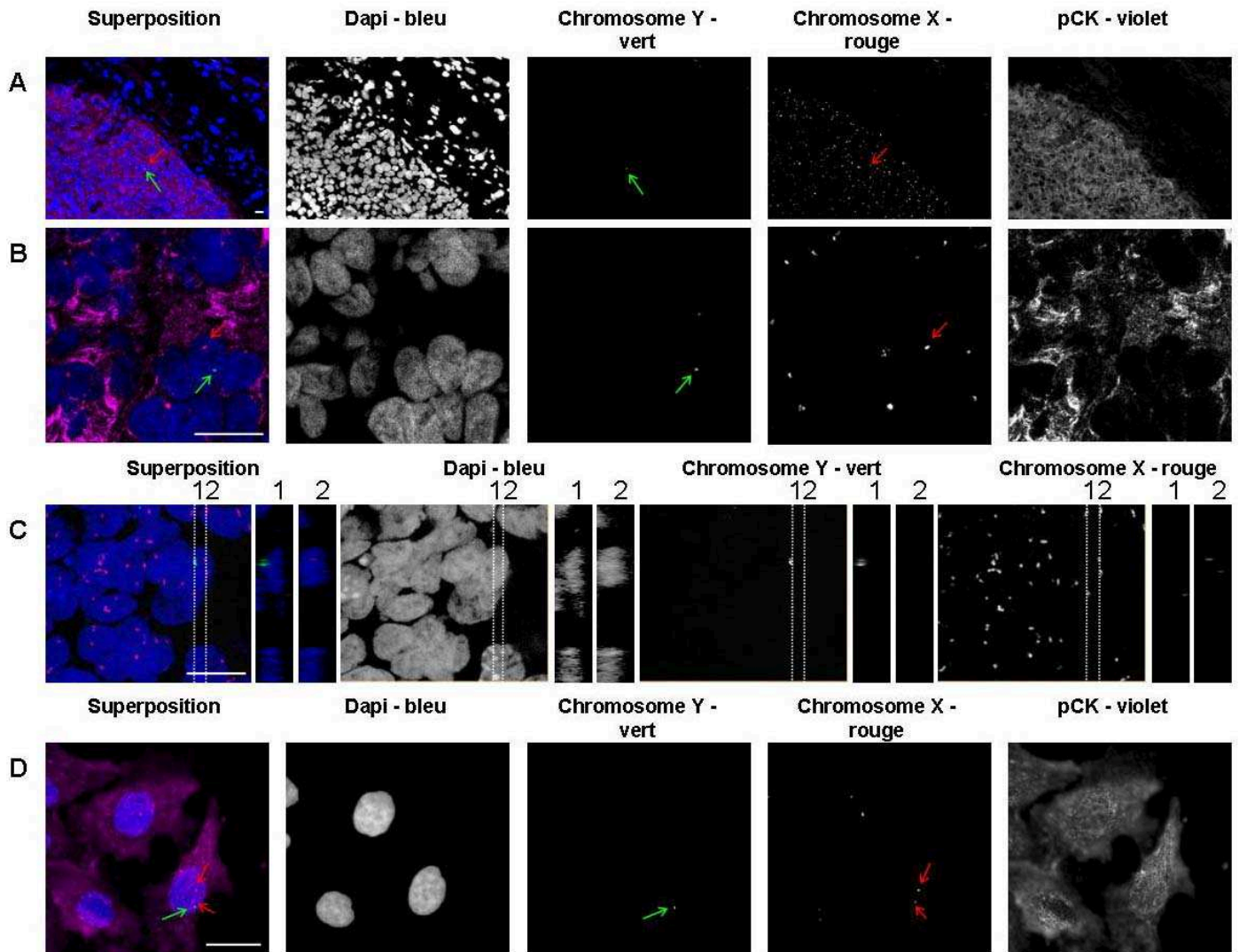


Figure 33. Analyse par FISH et FICTION des tumeurs obtenues après injection concomittante de MSC et de cellules épithéliales AGS dans un modèle murin. Des cellules AGS femelles et des MSC ont été injectées par voie sous cutanée dans une souris immunodéficiente NOG. Après 50 jours, les souris ont été sacrifiées et les tumeurs analysées par FISH ou FICTION. **A-B/** Les tumeurs étaient composées de nodules de cellules humaines, entourées de cellules murines. De rares cellules mâles ont été retrouvées. **C/** Reconstruction en 3 dimensions d'une section en z de photos obtenus par microscopie confocale. Les panneaux à droite de la photo montrent les projections orthogonales des sections 1 et 2. Les rares cellules mâles peuvent présenter un contenu chromosomique anormal (1 chromosome Y et 2 chromosomes X). **D/** Culture *ex vivo* des cellules tumorales. Les cellules possédant un contenu chromosomique anormal étaient viables et capables d'être sub-cultivées. Le premier panneau vertical montre la superposition colorée, alors que les suivants sont les canaux en noir et blanc seuls. Barre d'échelle : 10 μ m.

3.5. Quantification des cellules différenciées par coculture directe

Nous avons obtenu différents modèles permettant l'expression de marqueurs épithéliaux par les MSC. Le modèle de coculture directe est celui donnant les résultats les plus robustes, car de nombreux contrôles ont pu être réalisés, attestant de la valeur des résultats obtenus. Ce modèle, permettant les contacts cellulaires, se rapproche également le plus des conditions physiologiques retrouvées *in vivo*.

Les événements de fusion observés dans ce modèle ont ensuite été quantifiés en utilisant des cellules épithéliales gastriques de la lignée AGS transduites à la DsRED et des MSC PM7 transduites à la eGFP. Après 8 jours de coculture, les cellules ont été récupérées, marquées pour l'expression de l'ESA puis analysées par cytométrie en flux. Les cellules épithéliales AGS cultivées seules exprimaient les deux marqueurs DsRED et ESA (**Figure 34A**). Les MSC PM7 cultivés seules n'exprimaient que la eGFP (**Figure 34B**). Ces cellules n'ont pas été triées afin de ne pas accumuler de passages excessifs, ce qui explique que seulement 30% de la population exprime ce marqueur. Afin de quantifier les cellules issues des MSC exprimant des marqueurs épithéliaux, l'analyse de l'expression de la DsRED et de l'ESA n'a été réalisée que sur les cellules eGFP positives (**Figure 34B-C**). Après coculture, 6% des cellules exprimant la eGFP étaient positives pour la DsRED et l'ESA (**Figure 34C**). Ces cellules triplement positives ne pouvaient être obtenues qu'après fusion entre MSC et cellules épithéliales. D'autre part, 5,5% des cellules exprimant la eGFP étaient positives pour le marqueur ESA mais non pour la DsRED. Différentes explications peuvent être avancées quant à l'origine de ces cellules doublement positives. Tout d'abord, il peut s'agir de MSC eGFP ayant fusionné avec des cellules AGS non transduites à la DsRED. En effet, même après tri, les cellules AGS n'exprimaient pas à 100% la DsRED (**Figure 34A**, 74,5% de cellules exprimant ESA). Une autre possibilité serait que l'expression de la DsRED ne soit pas stable tout au long du cycle cellulaire, et ces cellules pourraient donc correspondre à des cellules fusionnées mais n'exprimant pas la DsRED au moment de l'analyse. Enfin, la dernière explication serait que les MSC n'ont pas fusionné et se sont transdifférenciées en cellules épithéliales à la manière du modèle de différenciation par coculture indirecte.

Il est intéressant de noter qu'aucune cellule eGFP positive n'exprimait la DsRED sans exprimer l'ESA, ce qui suggère que la fusion des MSC avec des cellules épithéliales entraîne une transition mésenchymo-épithéliale plutôt qu'une transition épithélio-mésenchymateuse. Des marqueurs mésenchymateux restent cependant à tester afin de valider cette transition.

En conclusion, plus de 11% des cellules eGFP positives, donc ayant pour origine les MSC, pouvaient exprimer un marqueur épithélial après coculture avec des cellules épithéliales gastriques.

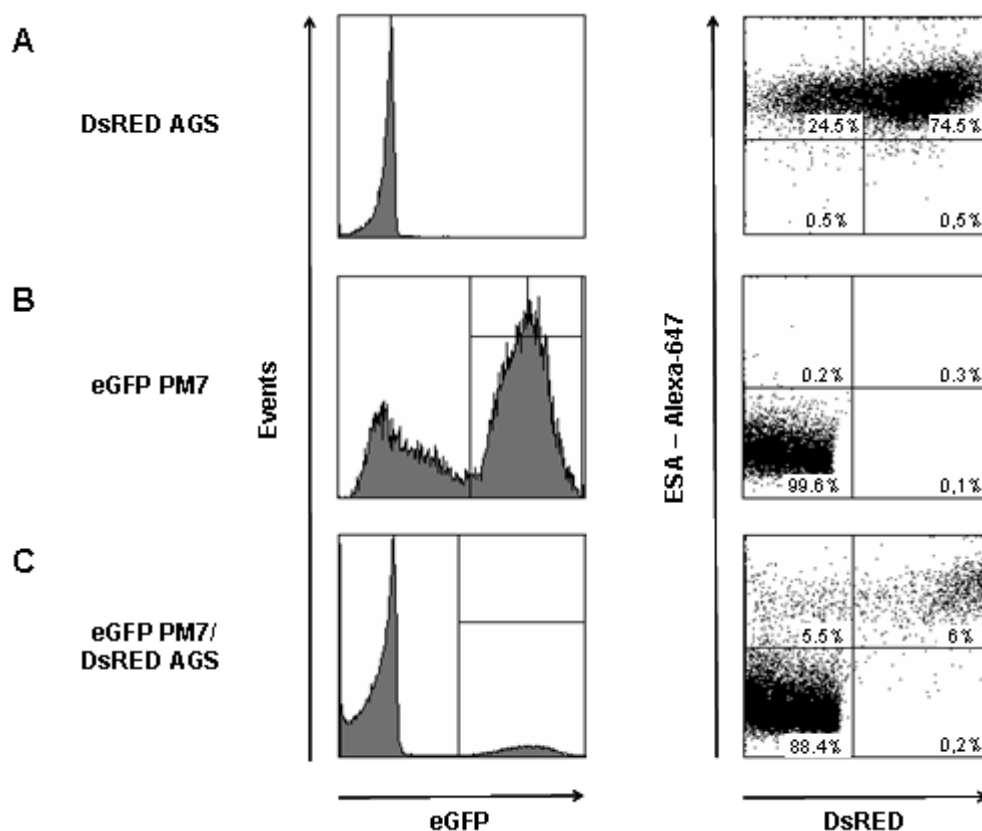


Figure 34. Quantification de l'acquisition de marqueurs épithéliaux par les MSC. Les cellules AGS DsRED ont été cultivées en présence de cellules PM7 eGFP. Après 8 jours de coculture, les cellules ont été récupérées, marquées pour l'expression de l'ESA et analysées par cytométrie en flux. **A/** Les cellules AGS DsRED étaient négatives pour l'expression de eGFP mais positives à 74,5% pour la DsRED et 99% pour l'ESA. **B-C/** Seules les cellules eGFP positives ont été sélectionnées afin de ne compter que les cellules issues des MSC eGFP. **B/** Les MSC eGFP n'exprimaient ni la DsRED ni l'ESA. **C/** Après coculture, 6% des cellules eGFP exprimaient la DsRED et l'ESA et 5,5% uniquement la DsRED. Détails dans le texte.

3.6. Conclusion

Différents modèles permettant d'obtenir une expression de marqueurs épithéliaux sur les MSC ont donc été obtenus. Ces modèles ont permis de montrer que les MSC sont capables de fusionner avec des cellules épithéliales gastriques aussi bien *in vitro* et qu'*in vivo*. Toutefois, une capacité de transdifférenciation de ces cellules ne peut être exclue à l'heure actuelle.

Une partie des données présentées ici a fait l'objet d'un article actuellement soumis pour publication au journal Gut. Une copie de cette soumission d'article est présentée en annexe (Annexe 2).

Les différents résultats obtenus seront discutés dans la partie « Discussion » dans le contexte général du rôle des MSC dans la carcinogenèse gastrique induite par l'infection par *H. pylori*.

4. Chapitre IV : Etude de l'infection des MSC par *H. pylori*

4.1. Introduction

Les résultats présentés précédemment ont permis de donner des arguments en faveur d'un recrutement des MSC en réponse à l'infection de cellules épithéliales par *H. pylori*. Ces cellules ainsi recrutées seraient alors capables d'acquérir des marqueurs des cellules épithéliales et réparer les dommages cellulaires créés par l'infection.

Le modèle proposé par JM Houghton suggère que ces cellules différenciées, dans un contexte infectieux et inflammatoire particulier, ne seraient pas capables de mener à terme leur différenciation et seraient à l'origine de l'initiation et du développement tumoral (Houghton *et al.*, 2004; Houghton and Wang, 2005). L'infection serait donc capable d'inhiber la différenciation mésenchymo-épithéliale, et favoriserait l'apparition de néoplasie. En effet, comme décrit dans l'introduction, l'une des caractéristiques de certaines cellules carcinomateuses est une perte des jonctions cellulaires associée à une sécrétion de protéases, facilitant la trans-migration tissulaire et l'apparition de métastases (Kang and Massague, 2004).

Il apparaît ainsi que l'infection par *H. pylori* pourrait inhiber la différenciation épithéliale des MSC, qui conserveraient alors leurs propriétés de cellules souches incluant des capacités invasives, angiogéniques, d'autorenouvellement, de résistance à l'induction de l'apoptose et de modulation de la réponse immunitaire.

Les effets de l'infection par *H. pylori* sur les MSC sont actuellement entièrement inconnus. La première étape de la pathogénicité bactérienne pourrait être une adhérence aux MSC permettant des contacts et une interaction hôte-pathogène. L'activation de certaines voies de signalisation cellulaire par liaison avec des récepteurs et/ou par l'injection de cytotoxines bactériennes pourrait ensuite être responsable de modifications morphologiques ou du cycle cellulaire des MSC.

Des expériences montrant le rôle de la voie de signalisation des TLR dans les capacités de différenciation des MSC donnent des arguments en faveur d'un potentiel des bactéries à inhiber la différenciation épithéliale. Ainsi, l'activation du TLR2 de MSC murines par un ligand chimique, le Pam3Cys, entraîne une inhibition des capacités de différenciation en ostéoblastes, chondrocytes et adipocytes (Pevsner-Fischer *et al.*, 2007). L'activation d'autres membres de la famille des TLR comme le TLR3 et le TLR4 ne modifie pas les capacités de

différenciation des MSC mais module en revanche leurs capacités immunosuppressives (Liotta *et al.*, 2008; Opitz *et al.*, 2009). Des effets similaires sont observés lors de l'activation de la voie de signalisation du TLR2 (Pevsner-Fischer *et al.*, 2007). De plus, le lipopolysaccharide de *E. coli*, un des ligands des TLR2 et 4, protège les MSC de l'apoptose due au stress oxydatif et augmente leurs capacités de prolifération (Wang *et al.*, 2009).

Ces données suggèrent qu'en plus de jouer un rôle sur les capacités de différenciation des MSC, l'activation des membres de la famille des TLR permettrait la constitution d'un terrain favorable au développement tumoral, avec une augmentation des capacités prolifératives et une modulation des propriétés immunitaires.

Parallèlement, plusieurs travaux ont étudié le rôle des TLR lors de l'infection par *H. pylori*. Ainsi, le LPS et la flagelline de *H. pylori* semblent peu actifs sur l'activation du TLR4 et du TLR5 (Lee *et al.*, 2003; Moran, 1999). Cependant, la bactérie est capable d'activer le TLR2 et le TLR5 des cellules épithéliales gastriques et d'induire une réponse pro-inflammatoire (Lee *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 2003; Torok *et al.*, 2005).

Par ailleurs, le récepteur majoritaire de *H. pylori* dans la réponse inflammatoire des cellules épithéliales est Nod1, récepteur intracellulaire activé par les souches possédant un îlot de pathogénicité *cag* capable d'injecter le peptidoglycane bactérien à l'intérieur de la cellule (Viala *et al.*, 2004). De manière intéressante mais encore non explorée, les MSC expriment ce récepteur Nod1 (Sioud and Floisand, 2009).

Ces données montrent que *H. pylori* est capable d'activer les voies de signalisation des récepteurs aux PAMP.

Avant d'étudier le rôle de l'infection par *H. pylori* dans les modèles de différenciation obtenus, il était nécessaire de définir les effets de l'infection bactérienne sur les MSC. Dans une première approche, 1/ les capacités d'adhérence bactérienne et leurs effets sur 2/ la morphologie et 3/ l'induction de l'apoptose des MSC ont donc été étudiés.

4.2. Adhérence de *H. pylori* et modifications morphologiques des MSC

Afin d'étudier les capacités d'adhérence de différentes souches de *H. pylori* aux MSC, deux approches distinctes ont été menées.

L'adhérence aux MSC murines de quatre souches de *H. pylori*, présentant des facteurs de virulence et des adhésines variables (**Table 3**, Section Matériel et Méthodes) a tout d'abord été mesurée par microscopie à fluorescence par immuno-détection à l'aide d'un anticorps polyclonal dirigé contre *H. pylori*. Le cytosquelette d'actine a par ailleurs été marqué afin de repérer les cellules et d'identifier des modifications morphologiques.

L'infection par les différentes souches de *H. pylori* n'induit pas de modifications significatives de la morphologie cellulaire des MSC (**Figure 35**). Il est intéressant de noter que les MSC ne répondent pas de la même manière que les cellules épithéliales dans lesquelles un phénotype dit colibri (*hummingbird*) apparaît en réponse aux souches exprimant la protéine CagA telles que J99, 26695 et TN2GF4.

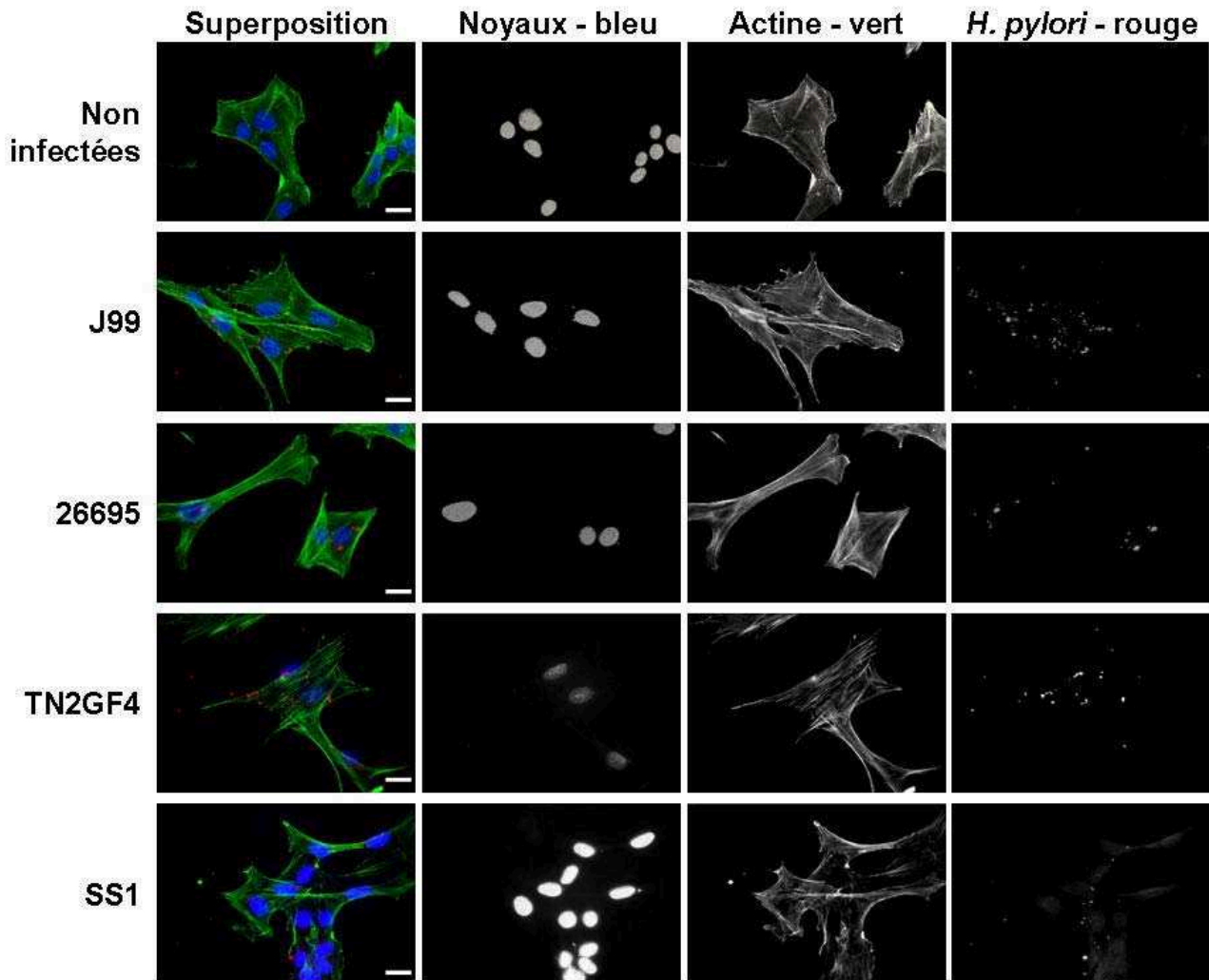


Figure 35. Effets de l'infection par *H. pylori* sur la morphologie des MSC. Les MSC murines ont été infectées à une MOI de 50 pendant 16 h par différentes souches de *H. pylori* (J99, 26695, TN2GF4 et SS1). Les cellules ont été fixées, perméabilisées, puis les acides nucléiques, l'actine polymérisée et *H. pylori* ont été révélés par marquages fluorescents en bleu, vert et rouge respectivement. Barre d'échelle : 10 µm. Les résultats représentent une expérience représentative de trois.

Cependant, les techniques de microscopie ne permettant pas d'obtenir des données quantitatives précises, une seconde technique a été développée. Pour cela, les bactéries ont préalablement été marquées par le composé chimique fluorescent PKH2. Après avoir vérifié que ce marquage membranaire ne modifiait pas la viabilité bactérienne (données non présentées), les MSC murines ont été infectées par les bactéries fluorescentes. Après

infection, les cellules ont été lavées puis la fluorescence émise par les bactéries ayant adhéré a été mesurée par cytométrie en flux (**Figure 36**). Selon cette seconde approche, toutes les souches de bactéries adhèrent aux MSC murines, indépendamment du génotype de l'adhésine majoritaire de *H. pylori*, BabA (moyenne de fluorescence pour les souches BabA1 8295 ± 2133 vs 8193 ± 2537 pour les souches BabA2, $p=0,9$).

Les deux types d'approches expérimentales ont permis de montrer que toutes les souches de *H. pylori* testées sont capables d'adhérer aux cellules épithéliales, ce qui pourrait correspondre à la première étape de pathogénicité et d'interactions bactériennes sur les MSC. Les résultats obtenus n'ont pas permis de mettre en évidence la présence d'un facteur particulier permettant l'adhérence bactérienne.

Par ailleurs, la technique utilisant des bactéries fluorescentes et une révélation de l'adhérence par cytométrie a par la suite été utilisée pour mesurer les modifications des capacités d'adhérence bactérienne après inactivation des gènes de certaines protéines de surface de *H. pylori* (Article présenté en **Annexe 4**). Dans ce travail, nous avons montré que les protéines membranaires de la famille des Hom jouent un rôle important dans l'adhérence bactérienne aux cellules épithéliales et dans l'apparition de pathologies ulcéreuses chez les sujets jeunes. Cette famille de protéines reste à tester dans l'adhérence aux MSC.

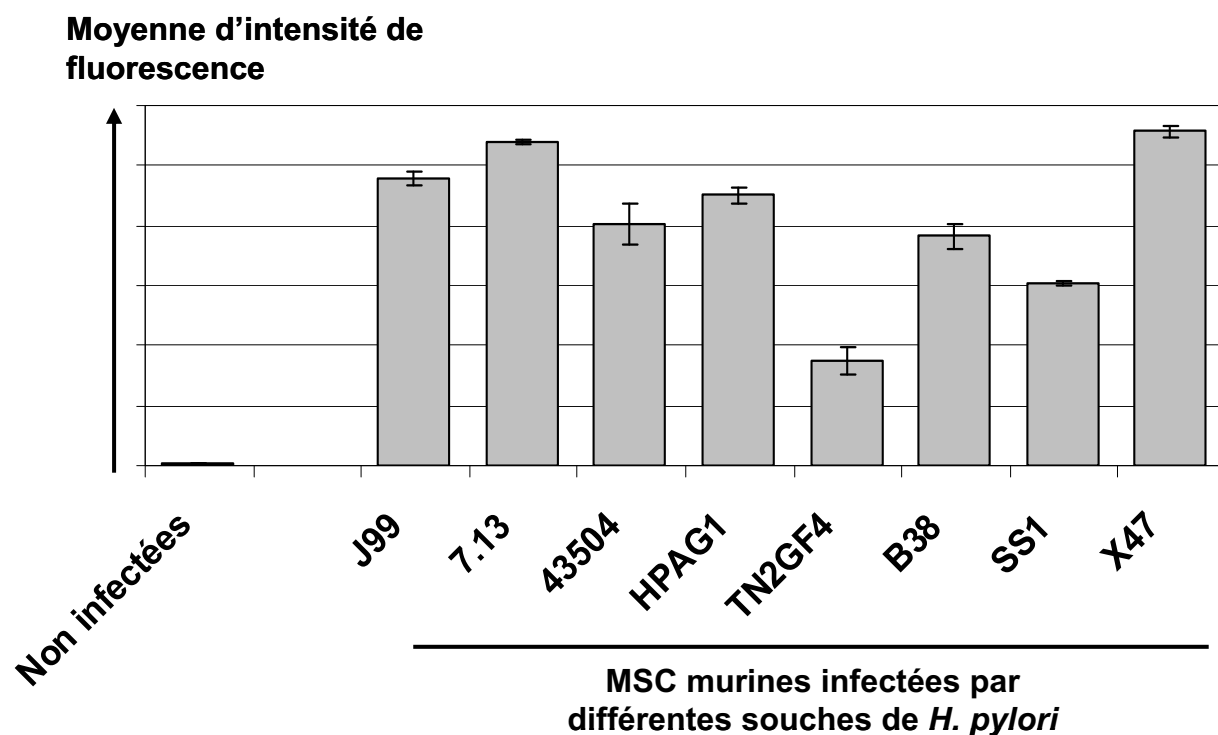


Figure 36. Mesure de l'adhérence de différentes souches de *H. pylori* aux MSC. Les MSC murines ont été infectées à une MOI de 50 pendant 16 h par différentes souches de *H. pylori* préalablement marquées à l'aide du composé chimique fluorescent PKH2. La fluorescence cellulaire a ensuite été analysée par cytométrie en flux. Huit souches de *H. pylori* ont été utilisées (J99, 7.13, 43504, HPAG1 et TN2GF4, B38, SS1 et X47). Les résultats représentent une expérience représentative de trois.

4.3. Induction de l'apoptose cellulaire par *H. pylori*

Les effets de l'infection par *H. pylori* sur l'apoptose des MSC murines ont été évalués par incorporation d'iodure de propidium et analyse par cytométrie en flux. Cette incorporation a été mesurée après 48 h d'infection à une MOI de 50. Les résultats obtenus ont permis de mettre en évidence une capacité pour certaines souches de *H. pylori* à induire l'apoptose cellulaire (**Figure 37A**). Cette capacité d'induction de l'apoptose ne semble pas liée à la présence des gènes codant les facteurs de virulence les plus habituellement mis en cause comme CagA ou VacA. En effet, pour les souches n'induisant pas une augmentation significative de l'apoptose (SS1, 43504, TN2GF4, J99) toutes les souches possèdent le gène *cagA*, trois possèdent une cytotoxine VacA de type s1m1 et une de type s2m2. Parmi les souches qui induisent une augmentation significative de l'apoptose (26695, 7.13, X47, HPAG1, B38), trois possèdent le gène *cagA*, deux possèdent le gène *vacA* sous la forme s1m1, deux sous la forme s2m2 et une sous la forme s1m2 (**Table 3**, Section Matériel et Méthodes).

Nous pouvons également comparer l'apoptose induite par les différentes souches de *H. pylori* sur les MSC avec celle sur les cellules épithéliales (**Figure 25 et 37**). Les trois souches induisant l'augmentation de l'apoptose la plus importante chez les cellules épithéliales (X47, HPAG1 et 7.13) sont également celles induisant une apoptose significative chez les MSC. Les profils d'induction de l'apoptose apparaissent ainsi très proches entre les deux modèles, suggérant des mécanismes impliquant des voies de signalisation similaires.

Afin de déterminer la nature du mécanisme et du facteur bactérien responsable de l'apoptose des MSC, différents traitements ont été appliqués sur les bactéries avant coculture. Pour cela, la souche X47 a été inactivée à la chaleur (62°C pendant 30 minutes ou 100°C pendant 10 minutes) afin de déterminer la nature protéique ou autre du facteur bactérien impliqué ou cultivée séparément des cellules à l'aide d'un insert de culture de porosité 0,2 µm permettant le passage de molécules solubles mais non de bactéries afin de déterminer la nature soluble ou contact-dépendante du facteur (**Figure 37B**). Ces traitements ont entraîné une diminution significative de l'apoptose induite, suggérant que cet effet nécessite un processus actif dans l'interaction bactérie-hôte, dépendant de l'adhérence bactérienne et porté par un facteur thermolabile certainement protéique non sécrété.

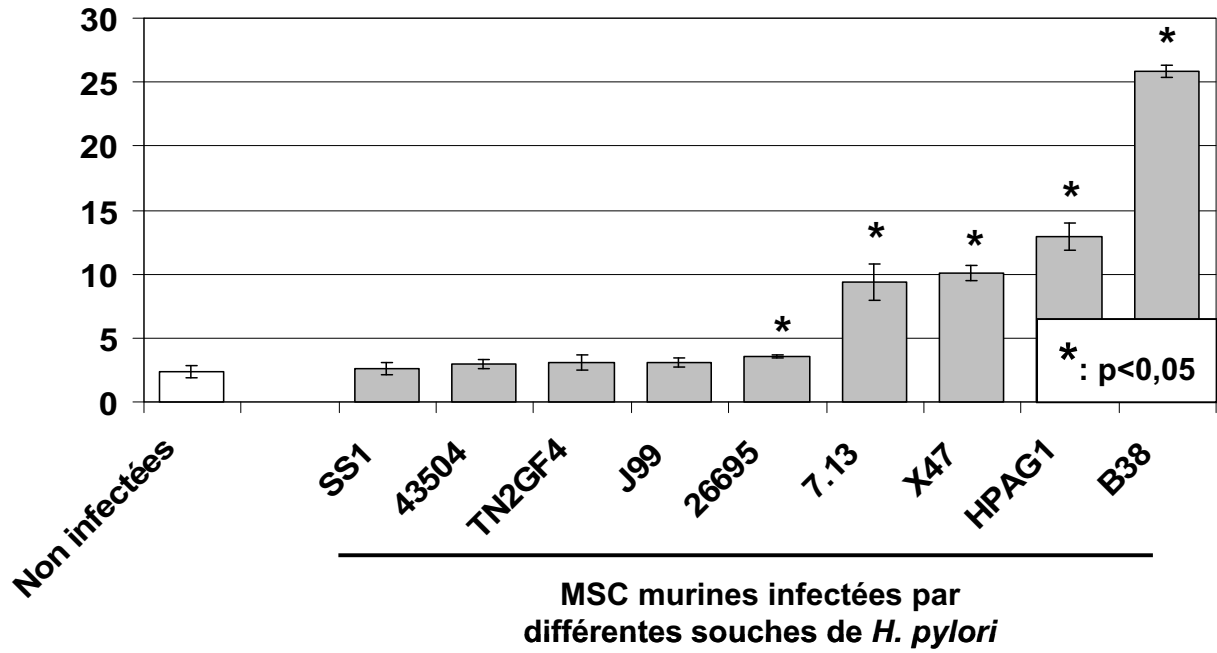
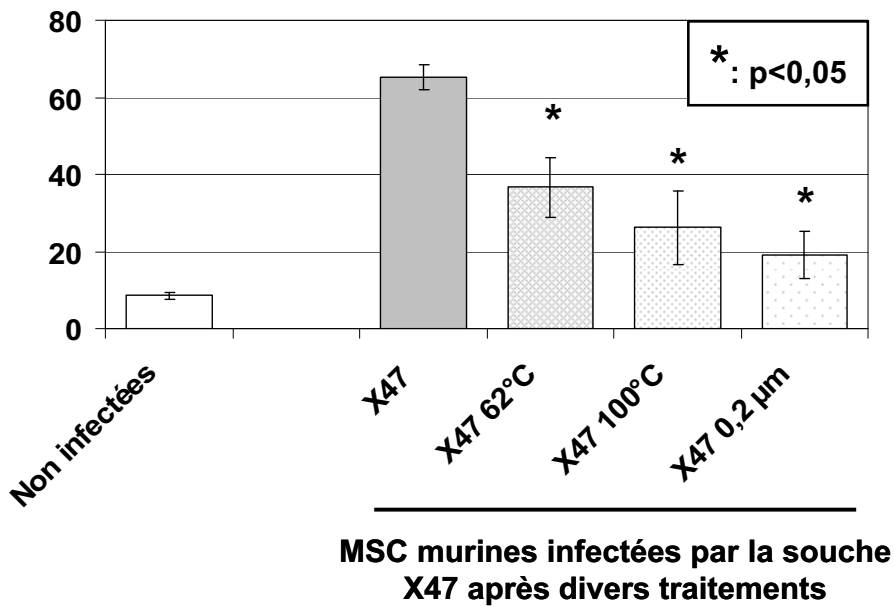
A**Pourcentage de cellules apoptotiques****B****Pourcentage de cellules apoptotiques**

Figure 37. Analyse de l'induction de l'apoptose des MSC par l'infection par *H. pylori*. Les MSC murines ont été infectées pendant 48 h à une MOI de 50 par différentes souches de *H. pylori*. L'induction de l'apoptose a été évaluée par mesure de la fragmentation de l'ADN par cytométrie en flux. **A/** Neuf souches de *H. pylori* ont été utilisées (SS1, 43504, TN2GF4, J99, 26695, 7.13, X47, HPAG1 et B38). $p < 0,05$, comparé aux cellules non infectées. **B/** L'apoptose des MSC induite par la souche X47 a été évaluée après divers traitements permettant l'identification des propriétés du facteur proapoptotique (bactérie viable, inactivée à la chaleur pendant 30 minutes à 62°C ou 10 minutes à 100°C et coculture séparée par un insert de culture de porosité 0,2µm. $p < 0,05$, comparé à l'induction de l'apoptose induite par la bactérie viable. Les résultats **A/** et **B/** ont été obtenus lors de deux expériences indépendantes. Les résultats représentent une expérience représentative de trois.

4.4. Conclusion

Les différentes souches de *H. pylori* testées dans cette étude sont capables d'adhérer aux MSC murines. Cette partie mérite d'être approfondie afin de mieux comprendre les molécules bactériennes et les récepteurs cellulaires impliqués dans ce mécanisme qui pourrait correspondre à la première étape de pathogénicité bactérienne. Certaines souches bactériennes possèdent une capacité pro-apoptotique supérieure à d'autres, suggérant l'existence de différents facteurs de virulence responsables de cet effet. A l'heure actuelle, ces facteurs n'ont pas été identifiés et il serait intéressant de tester un nombre de souches plus important afin de pouvoir réaliser une étude statistique. Il sera ensuite nécessaire de tester des bactéries inactivées pour ces facteurs afin de confirmer leur rôle. Les premiers effets de l'infection par *H. pylori* sur les MSC ont donc été déterminés et il reste désormais à tester le rôle de ces bactéries sur la différenciation de ces cellules, particulièrement en cellules épithéliales.

Les différents résultats obtenus seront discutés dans la partie « Discussion » dans le contexte général du rôle des MSC dans la carcinogenèse gastrique due à *H. pylori*.

Discussion

A l'heure actuelle, le rôle des cellules issues de la moelle osseuse dans la réparation tissulaire mais également dans la carcinogenèse est de plus en plus évoqué. Parmi l'ensemble des populations cellulaires issues de la moelle osseuse, les MSC apparaissent d'une part comme un outil thérapeutique potentiellement révolutionnaire, mais d'autre part comme susceptibles à la transformation tumorale ou capables de jouer un rôle de support dans la croissance tumorale. De nombreuses réponses restent encore à apporter sur la responsabilité de ces cellules dans ces différents mécanismes.

1. Les MSC, une population unique et définie ?

La première partie de ces travaux a consisté à isoler et purifier des MSC à partir de différentes espèces, humaines et murines. A l'heure actuelle, le manque de standards définissant les MSC reste un obstacle évident à l'étude de ces cellules.

1.1. MSC et fibroblastes

L'existence des cellules stromales mésenchymateuses multipotentes ne prête pas aujourd'hui à controverse. Cependant, peu d'études s'accordent sur une définition exacte et précise de ces cellules et cette confusion a mené à l'apparition de nombreux acronymes (MSC, MIAMI *cells*, MAPC) pour des cellules partageant de nombreuses similarités.

Les MSC sont définies comme des cellules stromales adhérentes, initialement isolées de la moelle osseuse et possédant un potentiel de différenciation en plusieurs lignées et des propriétés immunosuppressives.

De nombreuses questions restent cependant en suspens par rapport à l'origine des MSC et à leur relation avec d'autres types de cellules stromales comme les fibroblastes. Les fibroblastes, présents au niveau de tous les tissus, sont définis comme des cellules adhérentes, qui n'appartiennent pas aux lignées de l'endothélium, de l'épithélium ou hématopoïétique et qui ont la capacité de remodeler la matrice extracellulaire (Haniffa *et al.*, 2009).

Les MSC et les fibroblastes expriment un panel de marqueurs de surface similaire (positifs pour CD73, CD90 et CD105; négatifs pour CD31, CD34 et CD45) (Haniffa *et al.*, 2007). Les caractéristiques majeures et discriminantes des MSC ne seraient donc pas phénotypiques mais fonctionnelles avec un potentiel de différenciation important et des capacités immunosuppressives. Cependant, la capacité de certains fibroblastes à acquérir les marqueurs des types adipocytaires, ostéoblastiques ou chondrocytaires après culture en milieux spécifiques ou moduler la réponse immunitaire a été montré (Haniffa *et al.*, 2007). De

plus, il a été montré que les MSC, comme les fibroblastes, pouvaient être purifiées à partir de différents tissus. La définition des MSC proposée par l'ISCT, basée sur l'adhérence au plastique, l'expression de marqueurs de surface et un potentiel de différenciation, ne semble donc pas réussir à discriminer MSC et fibroblastes (Dominici *et al.*, 2006).

Ainsi, des études ultérieures permettant de hiérarchiser ces différentes populations sont nécessaires afin de ne pas considérer tous les types de cellules stromales comme des fibroblastes et d'identifier en leur sein une population particulière correspondant aux MSC.

En conclusion, les travaux présentés dans ce rapport ont porté sur le rôle de cellules stromales mésenchymateuses multipotentes dénommées cellules souches mésenchymateuses pour des raisons d'harmonie avec la littérature. Les cellules utilisées dans nos travaux répondent à l'heure actuelle à tous les critères permettant d'obtenir l'appellation MSC (Dominici *et al.*, 2006).

1.2. MSC et cultures *in vitro*

L'obtention de modèles *in vitro* permettant d'une part une normalisation des méthodes et une reproductibilité importante des résultats et d'autre part l'obtention de conclusions rapides par rapport aux modèles animaux est indispensable dans l'étude des caractéristiques des MSC.

Le passage par des cultures *in vitro* apporte, pour les études portant sur les cellules souches en particulier, un biais important. Ces cellules sont en effet hautement régulées dans un contexte physiologique et le passage dans des milieux de culture ne reproduisant pas fidèlement les conditions naturelles, comporte le risque de modifier les caractéristiques cellulaires. La niche écologique correspond aux éléments entourant localement les MSC quand elles sont dans leur état indifférencié. Ces éléments comprennent les cellules de soutien, qui peuvent être au contact des MSC, mais aussi les matrices extracellulaires ou des molécules solubles, et des propriétés physico-chimiques telles que des concentrations en oxygène particulières. Cet environnement permet de maintenir les cellules souches dans un état indifférencié. A l'heure actuelle, la nature exacte des éléments nécessaires aux MSC reste à identifier.

Par ailleurs, d'autres types de facteurs extracellulaires retrouvés aux sites physiologiques des MSC peuvent stimuler ces cellules et favoriser leur renouvellement, leur migration hors de la moelle osseuse ou leur différenciation. Tout d'abord, certains facteurs sont capables de perturber cet équilibre et d'induire le renouvellement cellulaire permettant le maintien d'un pool de cellules souches indifférenciées. Ainsi le *Leukemia Inhibitory Factor* (LIF), les

homologues des protéines *Drosophila wingless* (Wnts) et les membres de la famille des *Fibroblast Growth Factors* (FGF) jouent un rôle important dans ce renouvellement (Boland *et al.*, 2004; Jiang *et al.*, 2002b; Kleber and Sommer, 2004; Metcalf, 2003; Tsutsumi *et al.*, 2001; Zaragosi *et al.*, 2006). D'autre part, lors de la réparation tissulaire, certains facteurs, impliquant des molécules inflammatoires, pourraient également modifier cet équilibre et induire une migration hors de la moelle et une différenciation des cellules souches nécessaires à la régénération. Ces facteurs commencent à être identifiés et les résultats obtenus au laboratoire seront discutés dans la suite de l'exposé.

Ainsi, la culture *in vitro* de MSC ne permet pas de reproduire la niche écologique de ces cellules. Ces différences d'environnement pourraient être à l'origine de l'obtention et de l'amplification de sous populations dont les caractéristiques peuvent être variables. Cette problématique est particulièrement vraie pour la purification des MSC murines. En effet, l'isolement des MSC murines est long et difficile en raison de la présence de précurseurs hématopoïétiques capables de perdurer dans les cultures adhérentes (Phinney *et al.*, 1999). Ainsi, dans nos travaux, l'obtention d'une population homogène a nécessité une culture *in vitro* de plusieurs mois suivie d'un tri cellulaire au huitième passage. La présence des marqueurs de surface et des capacités de différenciation de ces cellules purifiées a cependant été vérifiée attestant de leur nature MSC. La durée importante nécessaire à leur obtention soulève cependant un certain nombre de questions notamment la purification d'une sous population possédant des capacités différentes des cellules retrouvées au niveau médullaire.

La culture *in vitro* des MSC humaines porte moins à controverse car la purification est plus rapide et n'implique pas de sélection cellulaire, diminuant le risque d'amplification de sous populations. En outre, ces cellules n'ont pas des capacités de croissance et de prolifération aussi importantes que les MSC murines *in vitro* et ne peuvent pas être utilisées après le dixième passage, limitant les risques d'apparition d'anomalies chromosomiques.

En conclusion, la mise au point de techniques d'étude *in vitro* des MSC est indispensable afin de pouvoir identifier et étudier les différentes étapes des mécanismes observés *in vivo*. Les différents résultats obtenus sont en cours de validation au laboratoire dans des modèles animaux cependant plus complexes à développer et apportant difficilement des éléments de mécanistique.

2. Rôle des MSC dans la carcinogenèse gastrique

2.1. Infections de cellules épithéliales par *H. pylori* et recrutement des MSC

2.1.1. Sécrétion de facteurs chimioattractants par les cellules épithéliales infectées par *H. pylori*

Les résultats des travaux réalisés par JM Houghton ont pour la première fois permis de proposer un lien entre l'infection par *Helicobacter* et les MSC (Houghton *et al.*, 2004). Dans ce modèle, l'infection de la muqueuse gastrique de la souris par un pathogène animal proche de *H. pylori*, *H. felis*, induit un recrutement des MSC de la moelle osseuse. Les cellules ainsi recrutées seraient capables de se différencier en cellules épithéliales gastriques et de réparer les dommages locaux engendrés par l'infection chronique. Les résultats préliminaires de cette équipe ont suggéré un rôle dans le recrutement des MSC des chimiokines CXCL12 et SCF produites au site de l'infection.

La première étape de nos travaux a donc été de définir les mécanismes existant entre l'infection des cellules épithéliales gastriques par *H. pylori* et le recrutement de MSC de la moelle osseuse. Pour cela, un modèle *in vitro* de chimiotactisme et de migration impliquant ces trois partenaires a été développé.

Nous avons montré, pour la première fois dans un modèle *in vitro*, que les cellules épithéliales infectées par *H. pylori* induisent l'activation de la migration des MSC. Cette activation a été observée dans des modèles utilisant des cellules d'espèces différentes, humaines et murines. Par ailleurs, nos résultats ont montré que toutes les souches de *H. pylori* ne possèdent pas une faculté similaire à induire la sécrétion par les cellules épithéliales de facteurs chimioattractants pour les MSC, mettant en évidence l'existence de facteurs bactériens non ubiquistes responsables de cet effet.

La réponse de cellules épithéliales à l'infection par *H. pylori* a déjà été évaluée dans différentes études et a abouti à la mise en évidence d'une activation de différentes voies de signalisation de type pro-inflammatoires avec sécrétion de CXCL8 et IL10. Cette activation est consécutive à la reconnaissance bactérienne par les membres de la famille des récepteurs des profils moléculaires spécifiques des pathogènes comme les TLR ou les Nod. A l'heure actuelle, les souches induisant la réponse inflammatoire la plus importante semblent être les souches exprimant le TSS4 qui permet l'injection intracellulaire de la protéine CagA et de

composants du peptidoglycane. Ces composés seraient reconnus par le récepteur intracellulaire Nod1 et induiraient l'activation de la voie du NF- κ B responsable de la mise en place d'une réponse pro-inflammatoire caractérisée par la sécrétion de CXCL8 (Viala *et al.*, 2004). Cependant, il apparaît clairement que les cellules infectées sont également capables de sécréter de nombreuses molécules impliquées dans différentes voies de signalisation, telles que celles aboutissant à la sécrétion de facteurs chimioattractants.

Identification des facteurs chimioattractants

Dans le modèle développé au laboratoire, nous avons identifié une surexpression des cytokines : CCL2, CCL3, CCL22, CXCL12 et TNF α par les cellules épithéliales infectées, corrélée à un recrutement des MSC.

Les cytokines CCL2, CCL3, CCL22 et CXCL12 font partie de la famille des chimiokines. Les chimiokines sont définies comme des protéines liant l'héparine dont la fonction est de réguler le trafic cellulaire. Elles sont classées en fonction du nombre et de la position de cystéines sur la partie N-terminale de la protéine. Ainsi, ces molécules peuvent être classées en 4 grandes familles CXC, CC, CX3C et C (Rollins, 1997). Les chimiokines sont habituellement sécrétées après stimulation par des cytokines pro-inflammatoires (Deshmane *et al.*, 2009). Les cellules exprimant les récepteurs appropriés peuvent alors migrer en fonction d'un gradient de concentration de la chimiokine jusqu'au site de concentration le plus important (Callewaere *et al.*, 2007). Ce mécanisme sera discuté dans la partie suivante (**Paragraphe 2.1.2** de la partie discussion).

La cytokine CCL2, ou *Monocyte Chemoattractant Protein 1* (MCP-1), est un facteur particulièrement connu dans la migration des monocytes. CCL2 est produit par une grande variété de types cellulaires, soit de manière constitutive, soit après induction par un stress oxydatif ou stimulation par des cytokines comme IL1 α , TNF α ou des composés bactériens comme le LPS (Leonard and Yoshimura, 1990).

La cytokine CCL3, ou *Macrophage Inflammatory Protein 1 α* (MIP-1 α), est connue pour induire un recrutement des lymphocytes B, éosinophiles et cellules dendritiques. CCL3 est produit essentiellement par les monocytes, macrophages et lymphocytes T, cependant d'autres types cellulaires comme les astrocytes, les cellules musculaires lisses ou les cellules épithéliales semblent pouvoir la sécréter (Lukacs *et al.*, 1995; Menten *et al.*, 2002; Miyamoto and Kim, 1999; Yang *et al.*, 1997). La sécrétion de CCL3 est consécutive à une stimulation par différents inducteurs incluant le LPS, les acides lipoteichoïques bactériens, l'IL1 β et l'IFN γ (Menten *et al.*, 2002). En plus des capacités à induire une migration, CCL3 est

également capable d'inhiber la prolifération des cellules souches ou progénitrices hématopoïétiques (Menten *et al.*, 2002). De manière intéressante, des niveaux élevés de CCL3 sont présents chez les patients infectés par *H. pylori* souffrant de gastrites, suggérant un rôle important de cette chimiokine dans le recrutement de cellules mononuclées au niveau de la muqueuse gastrique (Ando *et al.*, 1998; Kusugami *et al.*, 1999).

La cytokine CCL22, ou *Macrophage-Derived Chemokine* (MDC), exerce une activité chimiotactique sur les monocytes, les cellules dendritiques et les cellules NK. CCL22 est sécrétée par les macrophages, les lymphocytes T et B et les cellules épithéliales (Berin *et al.*, 2001; Godiska *et al.*, 1997; Mantovani *et al.*, 2000). La chimiokine CCL22 est exprimée de manière constitutive ou régulée par différents facteurs comme le LPS ou l'IL1 et le TNF α (Mantovani *et al.*, 2000).

La cytokine CXCL12, ou *Stromal cell-Derived Factor 1* (SDF-1), est exprimée par les cellules endothéliales ainsi que par divers types de cellules stromales ou épithéliales gastrointestinales (Dotan *et al.*, 2009; Ratajczak *et al.*, 2006). L'expression de CXCL12 augmente lors de l'apparition de dommages tissulaires et serait sous la dépendance du facteur de transcription *Hypoxia Inductible Factor 1 α* (HIF-1 α) (Ratajczak *et al.*, 2006).

Enfin, la cytokine TNF α , caractérisée initialement pour son rôle dans l'induction de la nécrose des tumeurs, a depuis été identifiée comme une molécule clé de la réponse inflammatoire. Le TNF α est produit essentiellement par les macrophages et les lymphocytes T mais peut également être sécrété par de nombreux types cellulaires comme les lymphocytes B ou NK, les neutrophiles, les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses, les fibroblastes, les ostéoclastes mais également les cellules épithéliales gastriques (Algood *et al.*, 2007; Bradley, 2008). Le TNF α n'est pas détecté chez des patients sains, mais des taux sériques élevés peuvent être retrouvés dans des conditions inflammatoires ou infectieuses (Nurnberger *et al.*, 1995; Robak *et al.*, 1998). De manière intéressante et en plus de ses capacités à induire un recrutement cellulaire, le TNF α est également capable de moduler les réponses immunosuppressives des MSC (English *et al.*, 2007; Ryan *et al.*, 2007).

De manière intéressante, les travaux de JM Houghton avaient identifié une surexpression de CXCL12 et SCF. Les expériences réalisées *in vitro* dans ce travail confirment le rôle de CXCL12 mais ne permettent pas de montrer une surexpression de SCF.

Ainsi, les différentes cytokines que nous avons identifiées comme étant potentiellement impliquées dans le recrutement des MSC s'inscrivent toutes dans le cadre d'une réponse pro-inflammatoire. Il est intéressant de corréliser ces résultats avec l'évolution de l'adénocarcinome

gastrique dans les modèles animaux. En effet, les stades pré-néoplasiques de métaplasie et de dysplasie, sont toujours précédés d'un recrutement important de cellules immunitaires responsables d'une inflammation chronique. Les mécanismes de recrutement des MSC identifiés dans notre étude donnent de nouveau un argument fort en faveur de leur rôle dans la réparation cellulaire en réponse aux dommages créés par une inflammation locale importante et chronique.

Voies de signalisation de la sécrétion des facteurs chimioattractants

Les voies de signalisation induisant la sécrétion de ces chimiokines ne sont actuellement pas entièrement connues. Il semblerait cependant que le NF- κ B soit un modulateur essentiel de la transcription des cytokines CCL2, CCL3, CXCL12 et TNF α . Cependant, l'organisation des éléments de réponse au NF- κ B présents dans les promoteurs des gènes de ces différentes protéines varient suggérant qu'il existe des mécanismes plus subtils de régulation impliquant d'autres co-facteurs (Richmond, 2002).

Les études *in vitro* ont montré que l'induction d'une réponse pro-inflammatoire NF- κ B-dépendante par les cellules épithéliales était observée uniquement lors de l'infection par des souches exprimant l'îlot de pathogénicité *cag* codant pour un TSS4 (Fischer *et al.*, 2001). Alors que l'apparition de modifications morphologiques cellulaires requiert l'injection et la phosphorylation de la protéine CagA, il semblerait que l'induction de la réponse NF- κ B-dépendante ne passe pas par cette molécule (Fischer *et al.*, 2001; Selbach *et al.*, 2003). L'effet serait porté sur l'injection TSS4-dépendante de peptidoglycane, qui serait reconnu par le récepteur intracellulaire Nod1 (**Figure 38**) (Viala *et al.*, 2004). Les polymorphismes du récepteur Nod1 ont par la suite été impliqués dans l'évolution pathologique de l'infection par *H. pylori* en augmentant le risque de développer un ulcère (Hofner *et al.*, 2007). Certaines études ont cependant montré un rôle potentiel de CagA dans l'activation de la voie NF- κ B par les MAP kinases dépendantes de Ras ERK1/2 (Brandt *et al.*, 2005) (**Figure 38**). Notre modèle d'étude n'a pas permis de déterminer le ou les facteurs bactériens impliqués dans les mécanismes observés.

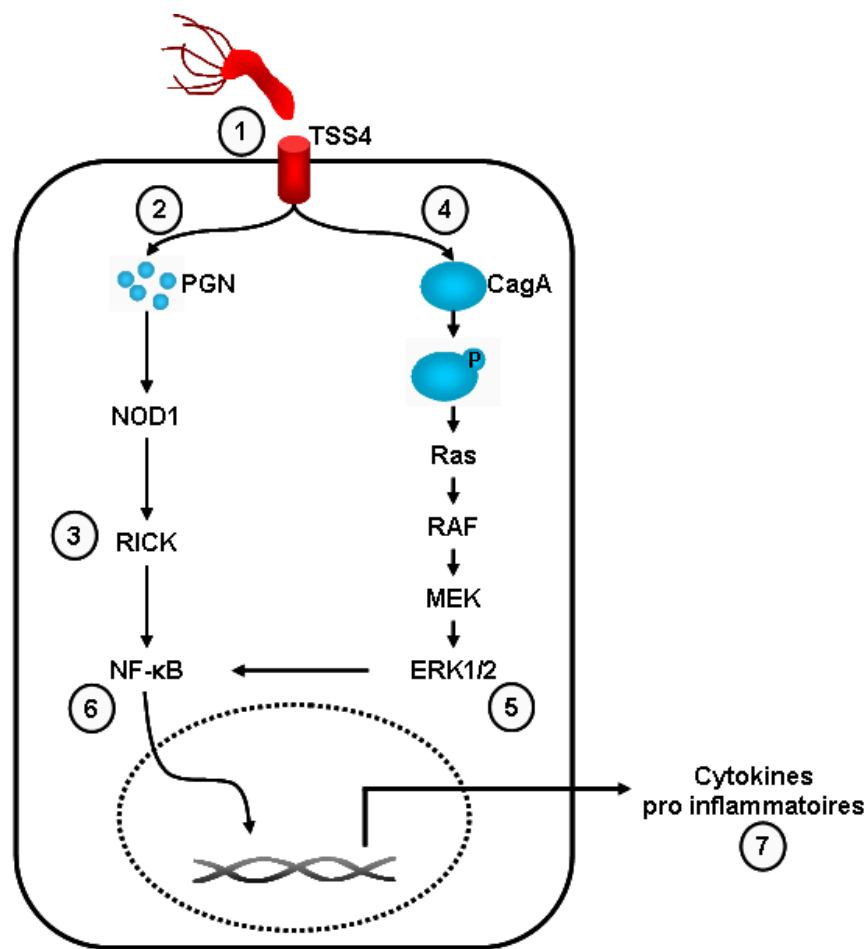


Figure 38. Activation de la voie NF- κ B après infection par *H. pylori*. 1/ Les souches de *H. pylori* exprimant le TSS4 injectent dans le cytoplasme des cellules épithéliales du peptidoglycane et la protéine CagA. 2/ Le peptidoglycane bactérien est reconnu par le récepteur cellulaire Nod1, ce qui 3/ active la voie du receptor-interacting serine-threonine kinase (RICK). 4/ Par ailleurs, le TSS4 permet l'injection de CagA. 5/ La phosphorylation de CagA entraîne une cascade de réactions impliquant les kinases dépendantes de Ras ERK1/2. 6/ RICK et ERK1/2 activent le facteur de transcription NF- κ B, responsable de la synthèse de différentes cytokines pro-inflammatoires. Détails dans le texte. D'après Fox et Wang, J Clin Invest, 2007 (Fox and Wang, 2007).

L'activation de la voie du NF- κ B des cellules épithéliales est observée dans les 30 premières minutes après infection par *H. pylori* (Naumann, 2000). Elle aboutit à l'expression de différents facteurs tels que CCL2, CCL3, CCL5, CXCL1, CXCL8, IL1, IL6 et TNF α (Bodger and Crabtree, 1998). La sécrétion de ces facteurs pro-inflammatoires amplifie la réponse cellulaire en permettant l'expression de diverses chimiokines responsables du recrutement des MSC. En effet, le rôle du TNF α en particulier est connu pour son activation des voies permettant la sécrétion de CCL2, CCL3, CCL5 dans divers types cellulaires (Hornung *et al.*, 2000; Tessier *et al.*, 1997; Wong *et al.*, 2006).

Le rôle des chimiokines dans la biologie du cancer est aujourd'hui de plus en plus étudié. Ainsi, ces molécules pourraient favoriser la croissance tumorale en jouant au moins à 5 niveaux : le contrôle de l'infiltration leucocytaire, la modulation de la réponse immune anti-tumorale, la régulation de l'angiogenèse, la stimulation de facteurs de survie ou de croissance cellulaires et l'évolution vers les métastases (Balkwill, 2004; Slettenaar and Wilson, 2006). De plus, la présence de chimiokines peut augmenter la réponse pro-inflammatoire locale, favorisant le développement de cellules stromales et ainsi le développement tumoral (Balkwill, 2004).

A l'heure actuelle, de nombreux travaux sur la sécrétion de molécules pro-inflammatoires par les cellules épithéliales infectées par *H. pylori* se basent sur l'étude de la cytokine CXCL8. Cependant, il est intéressant de noter que l'expression *in vivo* de certaines chimiokines de la famille CC comme les CCL2 ou CCL5 est aussi élevée que celle de CXCL8 (Watanabe *et al.*, 1997). Même si la majorité de ces chimiokines sont sécrétées par des cellules de type inflammatoire, il a été montré, et nous l'avons vérifié dans ces travaux, que les cellules épithéliales peuvent les libérer après infection (Watanabe *et al.*, 1997). Ainsi, il apparaît important de ne pas négliger l'étude de ces chimiokines dans la réponse inflammatoire locale.

Dans ces travaux, l'augmentation de l'expression de ces cytokines a été détectée par une méthode transcriptomique. Ces résultats devront être validés par des techniques permettant de valider une augmentation de l'expression protéique de type Western-Blot ou ELISA. Il sera également nécessaire de tester la capacité de recrutement des MSC après stimulation par des protéines recombinantes purifiées afin de valider les caractères chimioattractants de ces facteurs sur les cellules utilisées.

2.1.2. Activation des propriétés migratoires des MSC

Les différents récepteurs des chimiokines identifiées sont connus pour être exprimés à la surface des MSC comme CCR1 ou CCR5 (récepteurs du CCL3), CCR2 (récepteur du CCL2), CCR4 (récepteur du CCL22) et CXCR4 (récepteur du CXCL12) et les TNFR1 et 2 (récepteurs du TNF α) (Crisostomo *et al.*, 2008; Spaeth *et al.*, 2008).

Les taux d'expression des récepteurs des cytokines évalués dans différentes études sont variables, sans doute en raison des différences des méthodes d'isolement et de culture des MSC (Fox *et al.*, 2007). Il semblerait également que la culture *in vitro* soit responsable d'une diminution de l'expression de différents récepteurs (Honczarenko *et al.*, 2006). Néanmoins, la

fonctionnalité de ces différents récepteurs a été validée par des expériences *in vitro* de migration (Fox *et al.*, 2007; Honczarenko *et al.*, 2006; Ponte *et al.*, 2007; Sordi *et al.*, 2005).

Les chimiokines se lient à la surface des cellules cibles par des récepteurs transmembranaires couplés aux protéines G (Garrington and Johnson, 1999). La liaison de la chimiokine au récepteur permet sa dimérisation et active diverses cascades de signalisation intracellulaire aboutissant à l'expression de différents gènes, à l'activation des voies d'adhérence, de chimiotaxie et de polarisation et enfin à l'internalisation et au recyclage ou à la dégradation du récepteur (**Figure 39**) (Honczarenko *et al.*, 2006; Mellado *et al.*, 2001). L'étape préliminaire à la signalisation est une activation des Janus kinases induisant une réponse des voies STAT ou de différentes kinases (Mellado *et al.*, 2001).

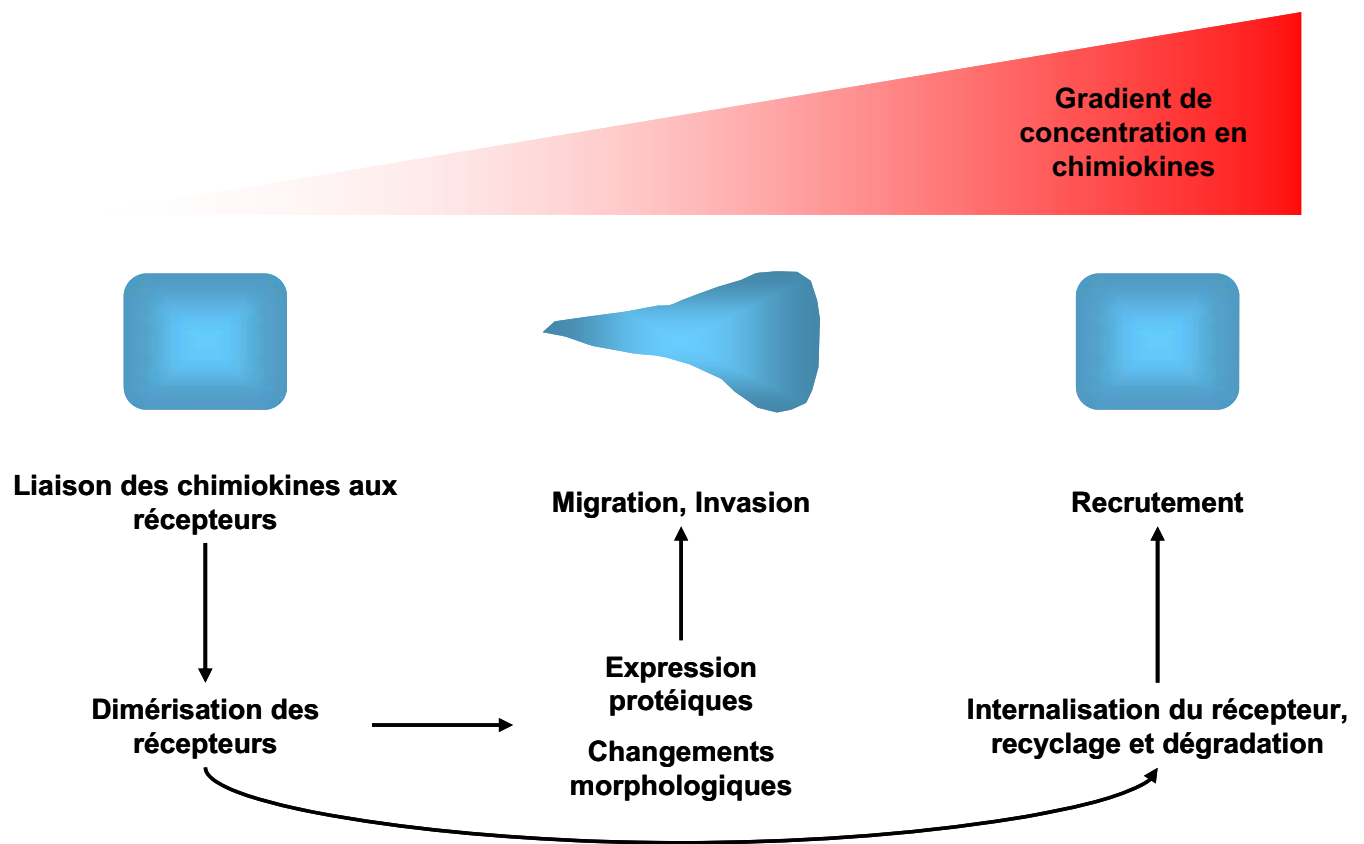


Figure 39. Mécanisme de l'activation des récepteurs aux chimiokines. Modèle schématisé des événements intervenant après liaison des chimiokines aux récepteurs. Cette liaison est responsable de la dimérisation du récepteur, activant ainsi des voies de signalisation intracellulaire qui sont responsables de la synthèse de nouvelles protéines impliquées dans les phénomènes d'adhésion, de chimiotaxie et de polarisation nécessaires à la migration cellulaire. Par ailleurs, le récepteur dimérisé est ensuite internalisé et recyclé, ce qui permet un arrêt de la stimulation de ces voies. D'après Mellado *et al.*, *Annu Rev Immunol*, 2001 (Mellado *et al.*, 2001).

Les mécanismes ainsi mis en jeu permettent une migration cellulaire en fonction d'un gradient de concentration en chimiokines. Ainsi, la cellule développe une polarisation cellulaire lui permettant de se positionner et de détecter le facteur chimioattractant. Cette polarisation est caractérisée par l'acquisition d'une morphologie particulière et d'une localisation des différentes molécules de signalisation cellulaire au front de migration (Mellado *et al.*, 2001).

De manière intéressante, le TNF α semble également jouer un rôle important dans l'expression des récepteurs aux chimiokines. Ainsi, les récepteurs aux chimiokines de type CC- (dont CCR2 et CCR4) des MSC sont surexprimés après stimulation par le TNF α (Ponte *et al.*, 2007). Ces résultats suggèrent une amplification des mécanismes de recrutement cellulaire dans un contexte infectieux ou inflammatoire. Ainsi, l'infection de cellules épithéliales par *H. pylori*, responsable d'une sécrétion de TNF α comme nous l'avons montré par analyse transcriptomique, pourrait constituer un environnement favorable à la migration en permettant une augmentation de l'expression des récepteurs spécifiques des chimiokines libérées également lors de l'infection. Il serait ainsi intéressant de mesurer l'expression des récepteurs à la surface des MSC en contact ou non avec du milieu conditionné de culture de cellules épithéliales infectées. De plus, l'évaluation de cette expression permettrait d'identifier les voies de signalisation impliquées.

2.1.3. Migration des MSC

L'étude bibliographique présentée dans ce mémoire a permis de montrer que les MSC peuvent être recrutées dans de nombreux organes après différents types de stimuli, particulièrement en réponse à un environnement pro-inflammatoire. Ainsi, les MSC peuvent être recrutées au niveau du myocarde en réponse à la survenue d'un infarctus, au niveau des sites d'infection par *Helicobacter*, au niveau de lésions cérébrales ou au niveau des tumeurs (Abbott *et al.*, 2004; Dwyer *et al.*, 2007; Houghton *et al.*, 2004; Ringe *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2002b).

La libération de chimiokines apparaît extrêmement importante dans le cadre du cancer où, à l'instar de l'hypoxie, cette sécrétion favorise l'angiogenèse et ainsi la croissance tumorale. D'un autre côté, la libération de chimiokines est également un phénomène permettant un recrutement de cellules immunitaires contrôlant la croissance tumorale. Finalement, l'activation des voies de migration des cellules tumorales par les chimiokines peut favoriser l'apparition de métastases (Koizumi *et al.*, 2007).

Par ailleurs, l'infection par *H. pylori* est responsable d'une augmentation de l'apoptose des cellules épithéliales. Il est intéressant de noter que les souches qui induisent une apoptose importante sont aussi celles capables d'induire un recrutement cellulaire. Ainsi, il existerait un lien entre l'induction de la mort des cellules épithéliales et le recrutement des MSC suggérant leur rôle dans la réparation tissulaire. En replaçant ces résultats dans un contexte physiologique, il est possible d'imaginer que les MSC soient recrutées aux sites d'infection ce qui permettrait d'aider à la régénération cellulaire via leurs propriétés de prolifération et de différenciation importantes et ainsi remplacer les cellules souches locales.

Ces résultats méritent d'être approfondis afin de confirmer le rôle des facteurs identifiés dans le modèle de migration développé au laboratoire. L'ensemble de ces résultats permettra alors de valider le rôle chimioattractant des facteurs identifiés, de montrer leur importance relative dans le phénomène de recrutement et à terme d'identifier les voies de signalisation responsables.

Afin de valider le rôle potentiel des MSC dans la réparation cellulaire et d'étudier le rôle de l'infection par *H. pylori* sur ce processus, il était nécessaire de développer des modèles permettant d'obtenir une différenciation épithéliale des MSC.

2.1.4. Infection par *H. pylori* et apoptose des cellules épithéliales gastriques

Nous avons ensuite montré que l'infection par *H. pylori* permettait une induction importante de l'apoptose des cellules épithéliales; les souches induisant l'apoptose étant celles capables de stimuler la sécrétion de facteurs chimioattractants pour les MSC.

Les bactéries ont développé différents mécanismes induisant l'apoptose cellulaire, ce qui permet une augmentation de l'inflammation et une altération des capacités de réponse de l'hôte (Chen and Zychlinsky, 1994). Il est ainsi connu que l'infection à *H. pylori* induit une apoptose des cellules épithéliales au niveau de la muqueuse gastrique des patients présentant des gastrites ou des ulcères gastroduodénaux. Cette induction de l'apoptose entraîne une dérégulation de la balance physiologique entre la mort cellulaire et la prolifération assurant le renouvellement de l'épithélium de la muqueuse gastrique (Brenes *et al.*, 1993; Cahill *et al.*, 1996; Cahill *et al.*, 1995; Lynch *et al.*, 1995; Olivares *et al.*, 2005). Les mécanismes d'induction de l'apoptose ne sont pas encore complètement élucidés et l'identification des facteurs pro-apoptotiques impliqués porte à controverse.

Ainsi, la plupart des études *in vitro* ou chez l'animal montre que les souches exprimant ou non la protéine CagA induisent de l'apoptose (Li *et al.*, 1998; Li *et al.*, 1997; Shirin *et al.*, 1999; Wagner *et al.*, 1997). Cependant, des études ont montré que les patients infectés par les souches CagA positives présentent un index apoptotique plus faible mais une prolifération plus importante que les patients infectés par des souches n'exprimant pas CagA (Peek *et al.*, 1997; Rokkas *et al.*, 1999).

Certaines études ont montré une corrélation entre la présence de VacA et l'induction de l'apoptose (Galmiche *et al.*, 2000; Kuck *et al.*, 2001; Manente *et al.*, 2008; Peek *et al.*, 1999). Cependant, ces résultats portent encore à controverse et les conclusions sur le rôle pro-apoptotique de VacA divergent (de Freitas *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2000). Certains auteurs évoquent un mécanisme apoptotique exercé par VacA mais qui serait compensé par les propriétés favorisant la prolifération de CagA (Oldani *et al.*, 2009). Cette hypothèse pourrait expliquer les différences de résultats obtenues entre les études en suggérant un mécanisme de contrôle de la balance entre prolifération et apoptose plus subtil, contrôlé à la fois par des facteurs de pathogénicité bactériens pro-apoptotique (VacA) ou pro-prolifératif (CagA).

D'autres facteurs bactériens ont été impliqués comme cause possible de l'induction de l'apoptose par *H. pylori*. Ainsi, l'application intragastrique de LPS de *H. pylori* entraîne une augmentation significative de l'apoptose des cellules épithéliales de surface mais également de celles situées à l'intérieur des glandes (Piotrowski *et al.*, 1997). L'uréase bactérienne pourrait également jouer un rôle en accélérant la survenue de l'apoptose (Kohda *et al.*, 1999).

En conclusion et à l'heure actuelle, les facteurs bactériens induisant l'apoptose ne sont pas complètement définis. Les souches induisant de l'apoptose utilisées au laboratoire n'ont pas pu être classées en fonction de la présence de certains facteurs de virulence tels que CagA, VacA, BabA ou IceA. Cependant et dans l'optique d'obtenir des résultats plus significatifs, il sera nécessaire de tester un panel de souches plus important, ainsi que de réaliser des inactivations des gènes de virulence potentiels afin d'identifier les mécanismes responsables.

2.2. Différenciation épithéliale des MSC

2.2.1. Cellules médullaires et renouvellement tissulaire

Nous avons montré dans ces travaux que les MSC peuvent acquérir des marqueurs épithéliaux lors de leur culture en présence de cellules épithéliales. Ces résultats suggèrent un rôle pour ces cellules dans le renouvellement cellulaire de l'épithélium.

L'entretien d'un état physiologique optimal de la muqueuse épithéliale gastrique nécessite un renouvellement cellulaire important. Ce renouvellement est dû à la présence d'une zone de cellules souches locales située à l'intérieur des glandes gastriques (Goldenring and Nomura, 2006). En plus de ces cellules souches locales impliquées dans le renouvellement physiologique de la muqueuse, de nombreuses études ont montré l'origine médullaire de certaines cellules épithéliales du tractus gastrointestinal. En effet, des transplantations entre un receveur et un donneur de sexes différents ont permis de démontrer la présence de cellules du donneur dans des tissus non hématopoïétiques humains ou murins (Jiang *et al.*, 2002a; Korbling *et al.*, 2002; Okamoto *et al.*, 2002; Rizvi *et al.*, 2006). Le recrutement de ces cellules médullaires est corrélé à la présence de lésions dans divers tissus comme la peau, le rein, les fibres musculaires, le coeur, le foie ou les poumons (Badiavas *et al.*, 2003; Ferrari *et al.*, 1998; Fukuda and Fujita, 2005; Kotton *et al.*, 2001; LaBarge and Blau, 2002; Petersen *et al.*, 1999; Poulsom *et al.*, 2001; Theise *et al.*, 2000; Tse *et al.*, 2003a). Le recrutement au niveau du tractus gastrointestinal semble être particulièrement important et fréquent, des cellules médullaires pouvant y migrer après une infection par *Helicobacter*, une maladie du greffon contre l'hôte, un ulcère gastrique, une irradiation ou une oesophagojejunostomie (Francois *et al.*, 2006; Houghton *et al.*, 2004; Okamoto *et al.*, 2002; Rizvi *et al.*, 2006; Sarosi *et al.*, 2008).

Ces différentes données suggèrent la présence de deux mécanismes de régénération tissulaire gastrique, l'un dans des conditions physiologiques impliquant les cellules souches locales alors que le second serait spécifique de conditions pathologiques en impliquant les cellules médullaires. Par ailleurs, l'équipe de JM Houghton a observé un recrutement de MSC après apoptose des cellules souches locales. Les cellules médullaires pourraient ainsi jouer un rôle dans le renouvellement tissulaire en régénérant les cellules souches locales. Cette différenciation des MSC en cellules souches locales permettrait une régénération durable des tissus. Ainsi, dans le modèle développé par l'équipe de JM Houghton, des glandes entières sont issues des MSC après infection par *Helicobacter*.

Aujourd'hui, le mécanisme de réparation tissulaire par les cellules médullaires incluant le recrutement et la différenciation de ces cellules reste inconnu, et peu d'études *in vitro* ont analysé ces phénomènes afin d'en expliquer les mécanismes.

2.2.2. Fusion et différenciation épithéliale des MSC

Nous avons démontré que les MSC peuvent exprimer des marqueurs épithéliaux spécifiques (cytokératines et Epithelial Specific Antigen) après culture avec des cellules épithéliales gastrointestinales. A l'heure actuelle, peu de travaux ont été réalisés pour étudier la capacité des MSC à se différencier en cellules épithéliales *in vitro*.

Nous avons démontré le rôle prépondérant des événements de fusion dans l'acquisition de marqueurs épithéliaux. Ainsi, la coculture entre des MSC d'un patient de sexe masculin et cellules épithéliales gastriques d'un patient de sexe féminin aboutit à une fusion des membranes cytoplasmiques mais également des membranes nucléaires. La présence de certaines cellules diploïdes issues de MSC, mais exprimant des marqueurs épithéliaux, ouvre de nouvelles perspectives. Tout d'abord, ces cellules pourraient correspondre à des cellules ayant fusionné puis ayant subi un événement de division cellulaire aboutissant à l'obtention d'une cellule au contenu chromosomique normal. Ces cellules pourraient également correspondre à des MSC ayant acquis des marqueurs épithéliaux par un phénomène de trans-différenciation et non de fusion. Les résultats préliminaires obtenus dans le système de coculture indirecte utilisant un insert poreux tendent à confirmer cette dernière hypothèse.

Le fusion entre cellules médullaires et cellules différenciées est un événement déjà décrit pour différents types cellulaires comme les cellules souches embryonnaires, les myoblastes, les hépatocytes, les neurones de Purkinje dans le cerveau, le muscle cardiaque et les cellules épithéliales des voies respiratoires (Alvarez-Dolado *et al.*, 2003; Goncalves *et al.*, 2006; Popov *et al.*, 2007; Spees *et al.*, 2003; Terada *et al.*, 2002). Dans ces études, le pourcentage de cellules fusionnées était relativement faible correspondant à 0,001% et 4% des cellules d'origine médullaire. Les résultats obtenus dans notre étude, mesurés par cytométrie en flux sur un nombre important d'évènements, montrent un pourcentage de cellules fusionnées beaucoup plus important (jusqu'à 11%). Ces résultats indiquent que les MSC pourraient jouer un rôle important dans la physiopathologie du tractus gastrointestinal. Cependant, d'autres études ont exclu les phénomènes de fusion dans différents tissus comme le poumon, la peau, le pancréas, l'œsophage, et le foie (Harris *et al.*, 2004; Ianus *et al.*, 2003; Sarosi *et al.*, 2008). Il est important de noter que de nombreuses limites techniques se posent concernant l'identification des phénomènes de fusion. En effet, ces événements peuvent être rares et les

techniques de détection difficiles et peu sensibles. Ainsi, il apparaît techniquement difficile d'exclure des phénomènes de fusion.

2.2.3. Différenciation épithéliale et développement tumoral

Par ailleurs, plusieurs arguments suggèrent un rôle de la fusion dans l'initiation et le développement tumoral. La fusion peut correspondre à un mécanisme de reprogrammation cellulaire passant par un phénomène de mitose pouvant aboutir à une sélection des cellules ayant des capacités de survie particulières (Gurdon and Melton, 2008; Ogle *et al.*, 2005). D'autre part, l'apparition d'un nombre anormal de centrosomes dans les cellules issues du cancer du sein pourrait être la conséquence d'évènements de fusion (Lingle *et al.*, 1998). D'autres auteurs suggèrent même que les évènements de fusion seraient une étape indispensable dans l'apparition de cellules cancéreuses. Par exemple, la fusion pourrait être nécessaire à la survie d'une cellule ayant acquis des anomalies génétiques affectant la viabilité cellulaire. Ainsi, les conséquences délétères de ces mutations seraient compensées par un mécanisme de fusion avec une cellule souche sauvage permettant d'assurer une transmission des mutations aux générations ultérieures (Parris, 2005). De plus, la fusion entre une MSC et une cellule épithéliale pourrait aboutir à une transition épithélio-mésenchymateuse favorisant l'apparition de cellules cancéreuses (Mani *et al.*, 2008). Ce mécanisme pourrait ensuite jouer un rôle dans l'apparition et le développement de métastases. En effet, la fusion entre une cellule issue de mélanome et un macrophage possédant des propriétés migratoires aboutit à l'apparition d'une cellule hybride exprimant les gènes des deux cellules mères. Cette cellule est alors capable de proliférer de manière anarchique, mais possède également des capacités de migration conduisant à de nombreuses métastases chez la souris (Pawelek and Chakraborty, 2008).

A l'opposé, la fusion cellulaire pourrait également correspondre à un mécanisme anti-tumoral, en permettant une réparation des dommages de l'ADN par complémentation. En effet, la reprogrammation des noyaux de cellules somatiques à un stade de totipotence par transfert dans des oocytes est un mécanisme bien connu (Ambrosi and Rasmussen, 2005). La fusion entre une cellule cancéreuse et une cellule saine peut également favoriser la reconnaissance par le système immunitaire (Cao *et al.*, 2009). Nous avons effectivement observé que la coinjection de MSC a permis de ralentir la croissance tumorale des cellules épithéliales gastriques de la lignée AGS après xénotransgreffe chez la souris immunodéficiente. Différentes études ont également démontré l'inhibition de la croissance tumorale par les MSC (Khakoo *et al.*, 2006; Maestroni *et al.*, 1999; Ohlsson *et al.*, 2003). Cependant, cet effet porte

encore à controverse et certains auteurs ne trouvent pas d'effet ou un effet stimulateur de la croissance tumorale (Djouad *et al.*, 2003; Kucerova *et al.*, 2007; Kyriakou *et al.*, 2006; Zhu *et al.*, 2006).

De manière intéressante, le modèle développé au laboratoire a permis de cultiver *in vitro* des cellules ayant fusionné, montrant que les cellules fusionnées peuvent s'autorenouveler *in vivo*. Ainsi, la fusion cellulaire n'aboutirait pas à l'apparition de cellules aberrantes mais à des cellules viables capables de se multiplier.

2.2.4. Différenciation épithéliale et modèle de carcinogenèse gastrique

Selon notre hypothèse, les MSC seraient recrutées et repeuplèrent les glandes gastriques endommagées par l'infection par *Helicobacter*. Dans ce contexte et en considérant nos résultats, la fusion entre MSC et cellules épithéliales pourrait aboutir à l'apparition de cellules épithéliales ayant conservé les propriétés de cellules souches, susceptibles, dans un contexte infectieux et inflammatoire, d'évoluer au cours du temps vers des cellules cancéreuses. De plus, la conservation des propriétés immunosuppressives ou pro-angiogéniques des MSC pourrait conférer aux cellules cancéreuses des avantages de survie et d'échappement au système immunitaire importants (Siegel *et al.*, 2009).

Ces résultats méritent d'être approfondis afin d'identifier le devenir et de caractériser les propriétés des cellules fusionnées *in vitro* et *in vivo*.

2.3. Infection des MSC par *H. pylori*

Comme cela a été décrit dans la partie précédente, la fusion pourrait correspondre à la première étape d'initiation tumorale en raison de la vulnérabilité génétique des cellules fusionnées. Cependant, il est important de replacer la différenciation des MSC en cellules épithéliales dans un contexte infectieux et inflammatoire important dû à l'infection chronique par *Helicobacter*.

Ainsi, l'infection bactérienne pourrait favoriser le développement tumoral en interférant avec la différenciation des MSC qui pourraient ainsi conserver des propriétés de cellules souches, proches des caractéristiques de cellules cancéreuses.

2.3.1. Infection par *H. pylori* et adhérence aux MSC

La première étape de pathogénicité bactérienne pourrait résider dans l'adhérence des bactéries aux MSC. Ainsi, la liaison de la bactérie à des récepteurs de surface cellulaire pourrait activer des voies de signalisation qui interféreraient avec la différenciation de ces cellules.

En premier lieu, nous avons démontré que toutes les souches de *H. pylori* adhèrent aux MSC. Comme cela a été détaillé dans la partie bibliographique de ce rapport, *H. pylori* possède de nombreuses molécules impliquées dans l'adhérence aux cellules épithéliales. A l'heure actuelle, aucune étude n'a évalué l'adhérence de *H. pylori* sur les MSC. Nos travaux ont montré que l'intensité de l'adhérence ne pouvait être corrélée à la présence de l'adhésine majoritaire de *H. pylori* BabA, comme cela a été démontré pour les cellules épithéliales (Ilver *et al.*, 1998).

2.3.2. Infection par *H. pylori* et modifications morphologiques des MSC

Nous avons également démontré que, contrairement à ce qui est connu pour les cellules épithéliales, l'infection des MSC par *H. pylori* n'est pas responsable de l'apparition de modifications morphologiques du cytosquelette d'actine. L'apparition d'un phénotype dit « colibri » chez les cellules épithéliales infectées par *H. pylori* est due à l'injection de la protéine bactérienne CagA (**Paragraphe 1.3.5** de l'étude bibliographique). Ainsi, nos résultats suggèrent que la voie de signalisation induite par CagA pourrait être différente entre les cellules épithéliales et les MSC, éventuellement en raison de l'absence d'expression des molécules de jonction par les MSC. Cependant le rôle de CagA sur les voies de signalisation des MSC infectées n'impliquant pas les molécules des jonctions n'a pas été investigué.

2.3.3. Infection par *H. pylori* et apoptose des MSC

Les résultats obtenus sur les MSC murines ont permis de montrer que seulement certaines souches possédaient la capacité d'induire une augmentation significative de l'apoptose cellulaire. Les résultats préliminaires obtenus dans cette étude suggèrent que les souches les plus pro-apoptotiques pour les MSC sont également celles induisant la plus forte apoptose des cellules épithéliales. Ainsi, les mécanismes d'interaction et les voies de signalisation mises en jeu semblent identiques. A l'heure actuelle, et en raison d'un nombre faible de souches testées, il a été impossible d'associer ces capacités d'induction d'apoptose à un facteur de virulence bactérien particulier. Des études plus poussées utilisant un panel de souches bactériennes plus important et des souches inactivées pour certains gènes connus de virulence

seront nécessaires pour identifier les mécanismes bactériens impliqués. Cependant, il semblerait que le ou les facteurs pro-apoptotiques ne soient pas sécrétés, démontrant l'importance de l'adhérence bactérienne, et qu'ils soient de nature thermolabile, probablement protéiques.

L'induction de l'apoptose des MSC pourrait correspondre à une étape cruciale de la pathogénicité bactérienne et de l'initiation tumorale. Deux phénomènes importants pourraient entrer en jeu 1/ la modification du cycle cellulaire et l'apparition d'instabilités au niveau des différents points de contrôle aboutissant à l'apparition de cellules possédant des propriétés prolifératives élevées et 2/ une augmentation de l'apoptose pourrait être compensée par une hyperprolifération favorisant l'apparition d'instabilités génétiques. Comme cela a été décrit précédemment, *H. pylori* peut modifier la régulation de nombreux gènes cellulaires en activant différentes voies de signalisation cellulaire.

2.3.4. Infection par *H. pylori* et carcinogenèse gastrique

Nous avons montré que *H. pylori* adhère et induit l'apoptose des MSC. Ces effets pourraient correspondre à la première étape de perturbation des capacités de différenciation des MSC. De plus, l'activation de récepteurs cellulaires spécifiques des PAMP des familles TLR ou Nod pourrait également perturber ces capacités.

En effet, l'activation de certains TLR exprimés par les MSC est responsable d'une inhibition de leur potentiel de différenciation en adipocytes, chondrocytes et ostéoblastes (Pevsner-Fischer *et al.*, 2007). Par ailleurs, l'activation des TLR pourrait également modifier leurs capacités immunosuppressives et donc favoriser un développement tumoral (Liotta *et al.*, 2008; Opitz *et al.*, 2009).

Ainsi, il apparaît nécessaire d'étudier les voies de signalisation des MSC activées lors de l'infection par *H. pylori*. Le rôle des TLR dans la réponse à l'infection sera évalué sur le modèle de différenciation épithéliale développé au laboratoire.

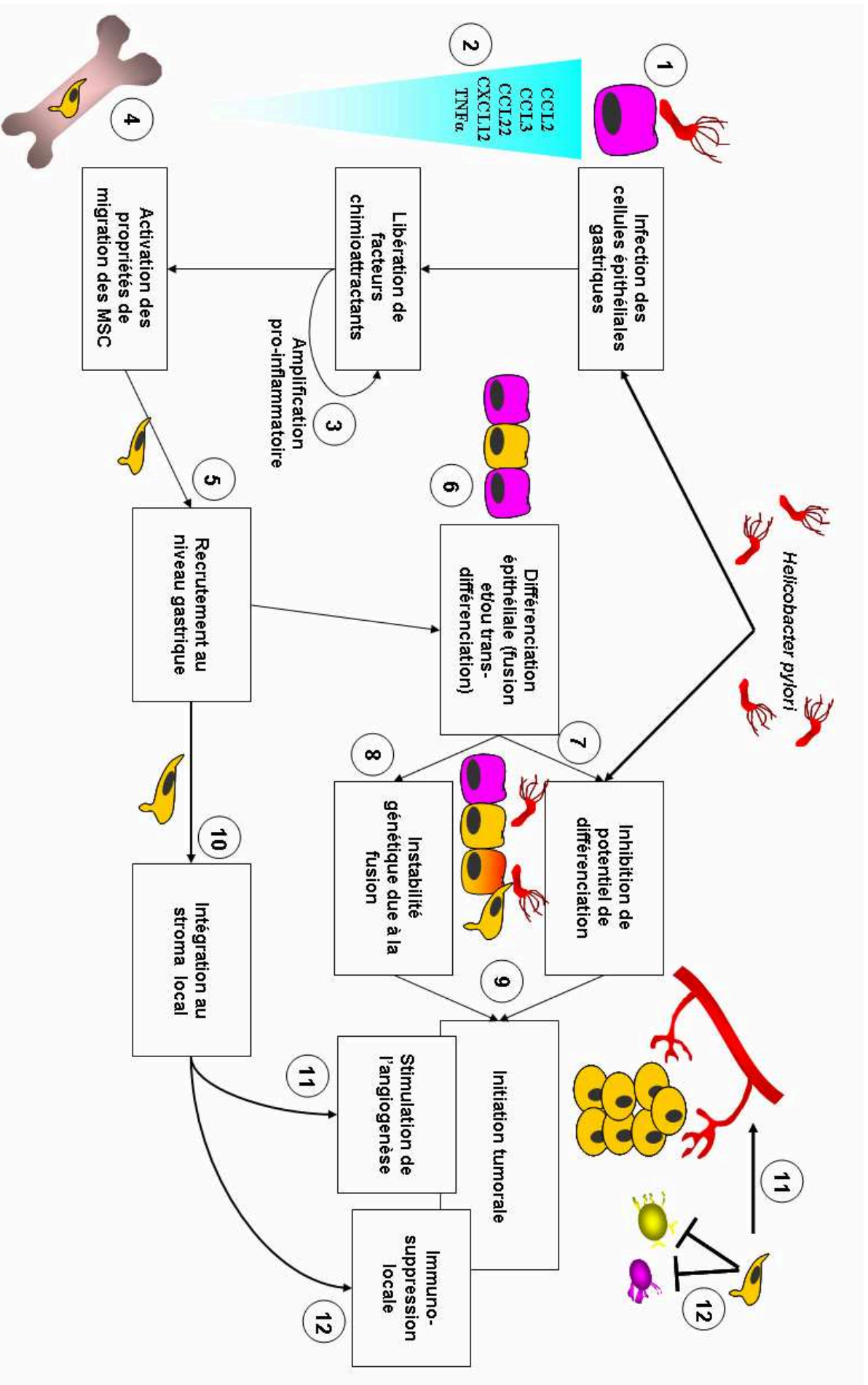
L'ensemble des données qui seront obtenues dans cette partie permettra de mieux appréhender le rôle de *H. pylori* dans l'initiation tumorale. Ainsi, la présence d'une infection bactérienne chronique au contact des MSC pourrait être responsable d'une perturbation de leur état de différenciation favorisant l'acquisition de propriétés cancéreuses.

3. Conclusion

Les résultats obtenus dans ce travail ont permis d'apporter des arguments forts en faveur d'un rôle des MSC dans l'initiation et le développement tumoral consécutifs à l'infection par *H. pylori*. Pour la première fois, le lien entre l'infection des cellules épithéliales par *H. pylori* et le recrutement des MSC de la moelle osseuse a été démontré de manière expérimentale *in vitro*. Des travaux réalisés par ailleurs au laboratoire ont permis de confirmer que les MSC de la moelle osseuse peuvent être recrutées au niveau de la muqueuse épithéliale gastrique en réponse à l'infection par *H. pylori*. L'identification de facteurs chimioattractants sera vérifiée *in vivo* afin de valider les résultats obtenus *in vitro*. Le recrutement de MSC de la moelle osseuse au niveau de la muqueuse épithéliale gastrique permet un contact intime de ces cellules avec les cellules épithéliales gastriques. Nous avons démontré pour la première fois que ces deux types cellulaires peuvent fusionner en donnant des cellules au phénotype épithélial. De nombreuses données suggèrent que les MSC seraient une population particulièrement vulnérable au développement tumoral. Nos travaux ont permis de suggérer que cette dérive tumorale pourrait être consécutive à l'apparition de phénomènes de fusion ou d'infection par *H. pylori*.

Même si de nombreuses questions restent encore sans réponses quant au rôle des MSC de la moelle osseuse comme cellules initiatrices de tumeurs dans l'adénocarcinome gastrique, nos travaux nous permettent de proposer un schéma récapitulant les différentes étapes impliquant le recrutement, la différenciation et la transformation tumorale des MSC en réponse à l'infection par *H. pylori* (**Figure 40**).

Figure 40. Schéma de l'implication des MSC dans la carcinogenèse gastrique due à *H. pylori*.
1/ L'infection des cellules épithéliales gastriques par *H. pylori* induit 2/ la sécrétion de différents facteurs chimioattractants pour les MSC. 3/ La sécrétion de molécules pro-inflammatoires (comme le TNF α) pourrait potentialiser cette sécrétion. 4/ Les MSC de la moelle osseuse sont stimulées par ce gradient de chimiokines et 5/ migrent au site infectieux. 6/ Les MSC se différencient en cellules épithéliales par fusion ou transdifférenciation et réparent les dommages créés par l'infection. 7/ L'infection par *H. pylori* interférerait sur la différenciation épithéliale préservant les propriétés de cellules souches des MSC. 8/ Les cellules fusionnées, dans un contexte infectieux et inflammatoire chronique, pourraient devenir génétiquement instables et acquérir des mutations. 9/ La perturbation de la différenciation associée aux instabilités génétiques permettrait à ces cellules de s'engager dans la transformation tumorale. De plus, 10/ les MSC recrutées pourraient jouer un rôle de soutien au niveau du stroma de la tumeur en inhibant 11/ la réponse immunitaire et 12/ en stimulant l'angiogenèse, favorisant le développement tumoral.



Bibliographie

- Abbott, J.D., Huang, Y., Liu, D., Hickey, R., Krause, D.S. and Giordano, F.J.** (2004) Stromal cell-derived factor-1alpha plays a critical role in stem cell recruitment to the heart after myocardial infarction but is not sufficient to induce homing in the absence of injury. *Circulation*, **110**, 3300-3305.
- Abu Al-Soud, W., Stenram, U., Ljungh, A., Tranberg, K.G., Nilsson, H.O. and Wadstrom, T.** (2008) DNA of *Helicobacter spp.* and common gut bacteria in primary liver carcinoma. *Dig Liver Dis*, **40**, 126-131.
- Achtman, M., Azuma, T., Berg, D.E., Ito, Y., Morelli, G., Pan, Z.J., Suerbaum, S., Thompson, S.A., van der Ende, A. and van Doorn, L.J.** (1999) Recombination and clonal groupings within *Helicobacter pylori* from different geographical regions. *Mol Microbiol*, **32**, 459-470.
- Aggarwal, S. and Pittenger, M.F.** (2005) Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*, **105**, 1815-1822.
- Akiyama, Y., Radtke, C. and Kocsis, J.D.** (2002) Remyelination of the rat spinal cord by transplantation of identified bone marrow stromal cells. *J Neurosci*, **22**, 6623-6630.
- Al-Hajj, M., Wicha, M.S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S.J. and Clarke, M.F.** (2003) Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 3983-3988.
- Al-Khalidi, A., Al-Sabti, H., Galipeau, J. and Lachapelle, K.** (2003) Therapeutic angiogenesis using autologous bone marrow stromal cells: improved blood flow in a chronic limb ischemia model. *Ann Thorac Surg*, **75**, 204-209.
- Al-Saleem, T. and Al-Mondhiry, H.** (2005) Immunoproliferative small intestinal disease (IPSID): a model for mature B-cell neoplasms. *Blood*, **105**, 2274-2280.
- Algood, H.M., Gallo-Romero, J., Wilson, K.T., Peek, R.M., Jr. and Cover, T.L.** (2007) Host response to *Helicobacter pylori* infection before initiation of the adaptive immune response. *FEMS Immunol Med Microbiol*, **51**, 577-586.
- Alison, M.R., Poulson, R., Jeffery, R., Dhillon, A.P., Quaglia, A., Jacob, J., Novelli, M., Prentice, G., Williamson, J. and Wright, N.A.** (2000) Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells. *Nature*, **406**, 257.
- Allen, L.A., Schlesinger, L.S. and Kang, B.** (2000) Virulent strains of *Helicobacter pylori* demonstrate delayed phagocytosis and stimulate homotypic phagosome fusion in macrophages. *J Exp Med*, **191**, 115-128.
- Allers, C., Sierralta, W.D., Neubauer, S., Rivera, F., Minguell, J.J. and Conget, P.A.** (2004) Dynamic of distribution of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells after transplantation into adult unconditioned mice. *Transplantation*, **78**, 503-508.
- Alm, R.A., Bina, J., Andrews, B.M., Doig, P., Hancock, R.E. and Trust, T.J.** (2000) Comparative genomics of *Helicobacter pylori*: analysis of the outer membrane protein families. *Infect Immun*, **68**, 4155-4168.
- Alm, R.A., Ling, L.S., Moir, D.T., King, B.L., Brown, E.D., Doig, P.C., Smith, D.R., Noonan, B., Guild, B.C., deJonge, B.L., Carmel, G., Tummino, P.J., Caruso, A., Uria-Nickelsen, M., Mills, D.M., Ives, C., Gibson, R., Merberg, D., Mills, S.D., Jiang, Q., Taylor, D.E., Vovis, G.F. and Trust, T.J.** (1999) Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature*, **397**, 176-180.
- Alvarez-Dolado, M., Pardal, R., Garcia-Verdugo, J.M., Fike, J.R., Lee, H.O., Pfeffer, K., Lois, C., Morrison, S.J. and Alvarez-Buylla, A.** (2003) Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature*, **425**, 968-973.

- Ambrosi, D.J. and Rasmussen, T.P.** (2005) Reprogramming mediated by stem cell fusion. *J Cell Mol Med*, **9**, 320-330.
- Amieva, M.R., Salama, N.R., Tompkins, L.S. and Falkow, S.** (2002) *Helicobacter pylori* enter and survive within multivesicular vacuoles of epithelial cells. *Cell Microbiol*, **4**, 677-690.
- Amieva, M.R., Vogelmann, R., Covacci, A., Tompkins, L.S., Nelson, W.J. and Falkow, S.** (2003) Disruption of the epithelial apical-junctional complex by *Helicobacter pylori* CagA. *Science*, **300**, 1430-1434.
- Ando, T., Kusugami, K., Ohsuga, M., Ina, K., Ichiyama, S., Nada, T. and Ohta, M.** (1998) Mucosal macrophage inflammatory protein-1 α levels are increased in *Helicobacter pylori* infection. *J Clin Gastroenterol*, **27 Suppl 1**, S144-149.
- Appelmelk, B.J., Faller, G., Claeys, D., Kirchner, T. and Vandenbroucke-Grauls, C.M.** (1998) Bugs on trial: the case of *Helicobacter pylori* and autoimmunity. *Immunol Today*, **19**, 296-299.
- Argent, R.H., Hale, J.L., El-Omar, E.M. and Atherton, J.C.** (2008) Differences in *Helicobacter pylori* CagA tyrosine phosphorylation motif patterns between western and East Asian strains, and influences on interleukin-8 secretion. *J Med Microbiol*, **57**, 1062-1067.
- Argent, R.H., Kidd, M., Owen, R.J., Thomas, R.J., Limb, M.C. and Atherton, J.C.** (2004) Determinants and consequences of different levels of CagA phosphorylation for clinical isolates of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology*, **127**, 514-523.
- Arisawa, K., Soda, M., Endo, S., Kurokawa, K., Katamine, S., Shimokawa, I., Koba, T., Takahashi, T., Saito, H., Doi, H. and Shirahama, S.** (2000) Evaluation of adult T-cell leukemia/lymphoma incidence and its impact on non-Hodgkin lymphoma incidence in southwestern Japan. *Int J Cancer*, **85**, 319-324.
- Arnold, F. and West, D.C.** (1991) Angiogenesis in wound healing. *Pharmacol Ther*, **52**, 407-422.
- Aspholm, M., Olfat, F.O., Norden, J., Sonden, B., Lundberg, C., Sjostrom, R., Altraja, S., Odenbreit, S., Haas, R., Wadstrom, T., Engstrand, L., Semino-Mora, C., Liu, H., Dubois, A., Teneberg, S., Arnqvist, A. and Boren, T.** (2006) SabA is the *H. pylori* hemagglutinin and is polymorphic in binding to sialylated glycans. *PLoS Pathog*, **2**, e110.
- Atherton, J.C.** (2006) The pathogenesis of *Helicobacter pylori*-induced gastro-duodenal diseases. *Annu Rev Pathol*, **1**, 63-96.
- Atherton, J.C., Cao, P., Peek, R.M., Jr., Tummuru, M.K., Blaser, M.J. and Cover, T.L.** (1995) Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. Association of specific vacA types with cytotoxin production and peptic ulceration. *J Biol Chem*, **270**, 17771-17777.
- Augello, A., Tasso, R., Negrini, S.M., Amateis, A., Indiveri, F., Cancedda, R. and Pennesi, G.** (2005) Bone marrow mesenchymal progenitor cells inhibit lymphocyte proliferation by activation of the programmed death 1 pathway. *Eur J Immunol*, **35**, 1482-1490.
- Augello, A., Tasso, R., Negrini, S.M., Cancedda, R. and Pennesi, G.** (2007) Cell therapy using allogeneic bone marrow mesenchymal stem cells prevents tissue damage in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum*, **56**, 1175-1186.
- Azuma, T., Yamakawa, A., Yamazaki, S., Fukuta, K., Ohtani, M., Ito, Y., Dojo, M., Yamazaki, Y. and Kuriyama, M.** (2002) Correlation between variation of the 3' region of the cagA gene in *Helicobacter pylori* and disease outcome in Japan. *J Infect Dis*, **186**, 1621-1630.

- Backert, S. and Selbach, M.** (2008) Role of type IV secretion in *Helicobacter pylori* pathogenesis. *Cell Microbiol*, **10**, 1573-1581.
- Backhed, F., Rokbi, B., Torstensson, E., Zhao, Y., Nilsson, C., Seguin, D., Normark, S., Buchan, A.M. and Richter-Dahlfors, A.** (2003) Gastric mucosal recognition of *Helicobacter pylori* is independent of Toll-like receptor 4. *J Infect Dis*, **187**, 829-836.
- Baddoo, M., Hill, K., Wilkinson, R., Gaupp, D., Hughes, C., Kopen, G.C. and Phinney, D.G.** (2003) Characterization of mesenchymal stem cells isolated from murine bone marrow by negative selection. *J Cell Biochem*, **89**, 1235-1249.
- Badiavas, E.V., Abedi, M., Butmarc, J., Falanga, V. and Quesenberry, P.** (2003) Participation of bone marrow derived cells in cutaneous wound healing. *J Cell Physiol*, **196**, 245-250.
- Baik, S.C., Youn, H.S., Chung, M.H., Lee, W.K., Cho, M.J., Ko, G.H., Park, C.K., Kasai, H. and Rhee, K.H.** (1996) Increased oxidative DNA damage in *Helicobacter pylori*-infected human gastric mucosa. *Cancer Res*, **56**, 1279-1282.
- Baksh, D., Song, L. and Tuan, R.S.** (2004) Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *J Cell Mol Med*, **8**, 301-316.
- Balkwill, F.** (2004) Cancer and the chemokine network. *Nat Rev Cancer*, **4**, 540-550.
- Banatvala, N., Mayo, K., Megraud, F., Jennings, R., Deeks, J.J. and Feldman, R.A.** (1993) The cohort effect and *Helicobacter pylori*. *J Infect Dis*, **168**, 219-221.
- Bangham, C.R.** (2000) HTLV-1 infections. *J Clin Pathol*, **53**, 581-586.
- Barber, M., Fitzgerald, R.C. and Caldas, C.** (2006) Familial gastric cancer - aetiology and pathogenesis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, **20**, 721-734.
- Bartholomew, A., Patil, S., Mackay, A., Nelson, M., Buyaner, D., Hardy, W., Mosca, J., Sturgeon, C., Siatskas, M., Mahmud, N., Ferrer, K., Deans, R., Moseley, A., Hoffman, R. and Devine, S.M.** (2001) Baboon mesenchymal stem cells can be genetically modified to secrete human erythropoietin *in vivo*. *Hum Gene Ther*, **12**, 1527-1541.
- Bartholomew, A., Sturgeon, C., Siatskas, M., Ferrer, K., McIntosh, K., Patil, S., Hardy, W., Devine, S., Ucker, D., Deans, R., Moseley, A. and Hoffman, R.** (2002) Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation *in vitro* and prolong skin graft survival *in vivo*. *Exp Hematol*, **30**, 42-48.
- Barton, G.M. and Kagan, J.C.** (2009) A cell biological view of Toll-like receptor function: regulation through compartmentalization. *Nat Rev Immunol*, **9**, 535-542.
- Bauer, B., Moese, S., Bartfeld, S., Meyer, T.F. and Selbach, M.** (2005) Analysis of cell type-specific responses mediated by the type IV secretion system of *Helicobacter pylori*. *Infect Immun*, **73**, 4643-4652.
- Bayerdorffer, E., Neubauer, A., Rudolph, B., Thiede, C., Lehn, N., Eidt, S. and Stolte, M.** (1995) Regression of primary gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue type after cure of *Helicobacter pylori* infection. MALT Lymphoma Study Group. *Lancet*, **345**, 1591-1594.
- Bazzoli, F., Zagari, M. and Fossi, S.** (1993) Efficacy and tolerability of a short-term low-dose triple therapy for eradication of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology*, **104**:40A.
- Bell, J.K., Mullen, G.E., Leifer, C.A., Mazzoni, A., Davies, D.R. and Segal, D.M.** (2003) Leucine-rich repeats and pathogen recognition in Toll-like receptors. *Trends Immunol*, **24**, 528-533.
- Bellantuono, I.** (2004) Haemopoietic stem cells. *Int J Biochem Cell Biol*, **36**, 607-620.
- Belvin, M.P. and Anderson, K.V.** (1996) A conserved signaling pathway: the Drosophila toll-dorsal pathway. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **12**, 393-416.

- Ben-Khelifa, H.** (2002) Gastric lymphoma: is the worldwide incidence rising? *Gastrointest Endosc*, **56**, 955.
- Bens, M., Bogdanova, A., Cluzeaud, F., Miquerol, L., Kerneis, S., Kraehenbuhl, J.P., Kahn, A., Pringault, E. and Vandewalle, A.** (1996) Transimmortalized mouse intestinal cells (m-ICc12) that maintain a crypt phenotype. *Am J Physiol*, **270**, C1666-1674.
- Berin, M.C., Dwinell, M.B., Eckmann, L. and Kagnoff, M.F.** (2001) Production of MDC/CCL22 by human intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, **280**, G1217-1226.
- Beyth, S., Borovsky, Z., Mevorach, D., Liebergall, M., Gazit, Z., Aslan, H., Galun, E. and Rachmilewitz, J.** (2005) Human mesenchymal stem cells alter antigen-presenting cell maturation and induce T-cell unresponsiveness. *Blood*, **105**, 2214-2219.
- Bieback, K., Kern, S., Kluter, H. and Eichler, H.** (2004) Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Stem Cells*, **22**, 625-634.
- Binger, T., Stich, S., Andreas, K., Kaps, C., Sezer, O., Notter, M., Sittlinger, M. and Ringe, J.** (2009) Migration potential and gene expression profile of human mesenchymal stem cells induced by CCL25. *Exp Cell Res*, **315**, 1468-1479.
- Bissell, M.J. and Labarge, M.A.** (2005) Context, tissue plasticity, and cancer: are tumor stem cells also regulated by the microenvironment? *Cancer Cell*, **7**, 17-23.
- Bjorkholm, B., Sjolund, M., Falk, P.G., Berg, O.G., Engstrand, L. and Andersson, D.I.** (2001) Mutation frequency and biological cost of antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 14607-14612.
- Bjorkholm, B.M., Guruge, J.L., Oh, J.D., Syder, A.J., Salama, N., Guillemin, K., Falkow, S., Nilsson, C., Falk, P.G., Engstrand, L. and Gordon, J.I.** (2002) Colonization of germ-free transgenic mice with genotyped *Helicobacter pylori* strains from a case-control study of gastric cancer reveals a correlation between host responses and HsdS components of type I restriction-modification systems. *J Biol Chem*, **277**, 34191-34197.
- Blair, V., Martin, I., Shaw, D., Winship, I., Kerr, D., Arnold, J., Harawira, P., McLeod, M., Parry, S., Charlton, A., Findlay, M., Cox, B., Humar, B., More, H. and Guilford, P.** (2006) Hereditary diffuse gastric cancer: diagnosis and management. *Clin Gastroenterol Hepatol*, **4**, 262-275.
- Bocelli-Tyndall, C., Bracci, L., Schaeren, S., Feder-Mengus, C., Barbero, A., Tyndall, A. and Spagnoli, G.C.** (2009) Human bone marrow mesenchymal stem cells and chondrocytes promote and/or suppress the *in vitro* proliferation of lymphocytes stimulated by interleukins 2, 7 and 15. *Ann Rheum Dis*, **68**, 1352-1359.
- Bode, G., Rothenbacher, D., Brenner, H. and Adler, G.** (1998) Pets are not a risk factor for *Helicobacter pylori* infection in young children: results of a population-based study in Southern Germany. *Pediatr Infect Dis J*, **17**, 909-912.
- Bodger, K. and Crabtree, J.E.** (1998) *Helicobacter pylori* and gastric inflammation. *Br Med Bull*, **54**, 139-150.
- Bohr, U.R., Kuester, D., Meyer, F., Wex, T., Stillert, M., Csepregi, A., Lippert, H., Roessner, A. and Malfertheiner, P.** (2007) Low prevalence of *Helicobacteraceae* in gall-stone disease and gall-bladder carcinoma in the German population. *Clin Microbiol Infect*, **13**, 525-531.
- Boland, G.M., Perkins, G., Hall, D.J. and Tuan, R.S.** (2004) Wnt 3a promotes proliferation and suppresses osteogenic differentiation of adult human mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem*, **93**, 1210-1230.

- Boncristiano, M., Paccani, S.R., Barone, S., Ulivieri, C., Patrussi, L., Ilver, D., Amedei, A., D'Elios, M.M., Telford, J.L. and Baldari, C.T.** (2003) The *Helicobacter pylori* vacuolating toxin inhibits T cell activation by two independent mechanisms. *J Exp Med*, **198**, 1887-1897.
- Boneca, I.G., De Reuse, H., Epinat, J.C., Pupin, M., Labigne, A. and Moszer, I.** (2003) A revised annotation and comparative analysis of *Helicobacter pylori* genomes. *Nucleic Acids Res*, **31**, 1704-1714.
- Bonnet, D. and Dick, J.E.** (1997) Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med*, **3**, 730-737.
- Bosch, F.X., Lorincz, A., Munoz, N., Meijer, C.J. and Shah, K.V.** (2002) The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol*, **55**, 244-265.
- Bourzac, K.M. and Guillemin, K.** (2005) *Helicobacter pylori*-host cell interactions mediated by type IV secretion. *Cell Microbiol*, **7**, 911-919.
- Boyanova, L., Lazarova, E., Jeleu, C., Gergova, G. and Mitov, I.** (2007) *Helicobacter pylori* and *Helicobacter heilmannii* in untreated Bulgarian children over a period of 10 years. *J Med Microbiol*, **56**, 1081-1085.
- Bradley, J.R.** (2008) TNF-mediated inflammatory disease. *J Pathol*, **214**, 149-160.
- Brandt, S., Kwok, T., Hartig, R., Konig, W. and Backert, S.** (2005) NF-kappaB activation and potentiation of proinflammatory responses by the *Helicobacter pylori* CagA protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 9300-9305.
- Brazelton, T.R., Rossi, F.M., Keshet, G.I. and Blau, H.M.** (2000) From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science*, **290**, 1775-1779.
- Brenes, F., Ruiz, B., Correa, P., Hunter, F., Rhamakrishnan, T., Fontham, E. and Shi, T.Y.** (1993) *Helicobacter pylori* causes hyperproliferation of the gastric epithelium: pre- and post-eradication indices of proliferating cell nuclear antigen. *Am J Gastroenterol*, **88**, 1870-1875.
- Bretagne, J.F.** (2003) [Could *Helicobacter pylori* treatment reduce stomach cancer risk?]. *Gastroenterol Clin Biol*, **27**, 440-452.
- Brittan, M. and Wright, N.A.** (2002) Gastrointestinal stem cells. *J Pathol*, **197**, 492-509.
- Brown, M.D., Gilmore, P.E., Hart, C.A., Samuel, J.D., Ramani, V.A., George, N.J. and Clarke, N.W.** (2007) Characterization of benign and malignant prostate epithelial Hoechst 33342 side populations. *Prostate*, **67**, 1384-1396.
- Bruder, S.P., Jaiswal, N. and Haynesworth, S.E.** (1997) Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. *J Cell Biochem*, **64**, 278-294.
- Bruno, S., Bussolati, B., Grange, C., Collino, F., Graziano, M.E., Ferrando, U. and Camussi, G.** (2006) CD133+ renal progenitor cells contribute to tumor angiogenesis. *Am J Pathol*, **169**, 2223-2235.
- Bublil, E.M. and Yarden, Y.** (2007) The EGF receptor family: spearheading a merger of signaling and therapeutics. *Curr Opin Cell Biol*, **19**, 124-134.
- Cahill, R.J., Kilgallen, C., Beattie, S., Hamilton, H. and O'Morain, C.** (1996) Gastric epithelial cell kinetics in the progression from normal mucosa to gastric carcinoma. *Gut*, **38**, 177-181.
- Cahill, R.J., Xia, H., Kilgallen, C., Beattie, S., Hamilton, H. and O'Morain, C.** (1995) Effect of eradication of *Helicobacter pylori* infection on gastric epithelial cell proliferation. *Dig Dis Sci*, **40**, 1627-1631.
- Calle, E.E., Rodriguez, C., Walker-Thurmond, K. and Thun, M.J.** (2003) Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *N Engl J Med*, **348**, 1625-1638.

- Callewaere, C., Banisadr, G., Rostene, W. and Parsadaniantz, S.M.** (2007) Chemokines and chemokine receptors in the brain: implication in neuroendocrine regulation. *J Mol Endocrinol*, **38**, 355-363.
- Cao, D.Y., Yang, J.Y., Yue, S.Q., Tao, K.S., Song, Z.S., Wang, D.S., Yang, Y.L. and Dou, K.F.** (2009) Comparative analysis of DC fused with allogeneic hepatocellular carcinoma cell line HepG2 and autologous tumor cells as potential cancer vaccines against hepatocellular carcinoma. *Cell Immunol*, **259**, 13-20.
- Carbone, A. and Gloghini, A.** (2008) KSHV/HHV8-associated lymphomas. *Br J Haematol*, **140**, 13-24.
- Cario, E., Brown, D., McKee, M., Lynch-Devaney, K., Gerken, G. and Podolsky, D.K.** (2002) Commensal-associated molecular patterns induce selective toll-like receptor-trafficcking from apical membrane to cytoplasmic compartments in polarized intestinal epithelium. *Am J Pathol*, **160**, 165-173.
- Carney, D.N., Gazdar, A.F., Bunn, P.A., Jr. and Guccion, J.G.** (1982) Demonstration of the stem cell nature of clonogenic tumor cells from lung cancer patients. *Stem Cells*, **1**, 149-164.
- Cave, D.R.** (1997) How is *Helicobacter pylori* transmitted? *Gastroenterology*, **113**, S9-14.
- Caygill, C.P., Braddick, M., Hill, M.J., Knowles, R.L. and Sharp, J.C.** (1995) The association between typhoid carriage, typhoid infection and subsequent cancer at a number of sites. *Eur J Cancer Prev*, **4**, 187-193.
- Censini, S., Lange, C., Xiang, Z., Crabtree, J.E., Ghiara, P., Borodovsky, M., Rappuoli, R. and Covacci, A.** (1996) cag, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 14648-14653.
- Chaturvedi, R., Cheng, Y., Asim, M., Bussiere, F.I., Xu, H., Gobert, A.P., Hacker, A., Casero, R.A., Jr. and Wilson, K.T.** (2004) Induction of polyamine oxidase 1 by *Helicobacter pylori* causes macrophage apoptosis by hydrogen peroxide release and mitochondrial membrane depolarization. *J Biol Chem*, **279**, 40161-40173.
- Chen, L., Tredget, E.E., Wu, P.Y. and Wu, Y.** (2008) Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing. *PLoS One*, **3**, e1886.
- Chen, M.F., Lin, C.T., Chen, W.C., Yang, C.T., Chen, C.C., Liao, S.K., Liu, J.M., Lu, C.H. and Lee, K.D.** (2006) The sensitivity of human mesenchymal stem cells to ionizing radiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, **66**, 244-253.
- Chen, Y. and Zychlinsky, A.** (1994) Apoptosis induced by bacterial pathogens. *Microb Pathog*, **17**, 203-212.
- Cheng, T.Y., Lin, J.T., Chen, L.T., Shun, C.T., Wang, H.P., Lin, M.T., Wang, T.E., Cheng, A.L. and Wu, M.S.** (2006) Association of T-cell regulatory gene polymorphisms with susceptibility to gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *J Clin Oncol*, **24**, 3483-3489.
- Chow, W.H., Blot, W.J., Vaughan, T.L., Risch, H.A., Gammon, M.D., Stanford, J.L., Dubrow, R., Schoenberg, J.B., Mayne, S.T., Farrow, D.C., Ahsan, H., West, A.B., Rotterdam, H., Niwa, S. and Fraumeni, J.F., Jr.** (1998) Body mass index and risk of adenocarcinomas of the esophagus and gastric cardia. *J Natl Cancer Inst*, **90**, 150-155.
- Christofori, G. and Semb, H.** (1999) The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumour-suppressor gene. *Trends Biochem Sci*, **24**, 73-76.
- Chu, Z.L., McKinsey, T.A., Liu, L., Gentry, J.J., Malim, M.H. and Ballard, D.W.** (1997) Suppression of tumor necrosis factor-induced cell death by inhibitor of apoptosis c-IAP2 is under NF-kappaB control. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 10057-10062.

- Clyne, M., Labigne, A. and Drumm, B.** (1995) *Helicobacter pylori* requires an acidic environment to survive in the presence of urea. *Infect Immun*, **63**, 1669-1673.
- Cogliano, V., Baan, R., Straif, K., Grosse, Y., Secretan, B. and El Ghissassi, F.** (2005) Carcinogenicity of human papillomaviruses. *Lancet Oncol*, **6**, 204.
- Cohnheim, J.** (1867) Über Entzündung und Eiterung. *Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie und für klinische Medizin*, **40**, 1-79.
- Colleoni, S., Bottani, E., Tessaro, I., Mari, G., Merlo, B., Romagnoli, N., Spadari, A., Galli, C. and Lazzari, G.** (2009) Isolation, growth and differentiation of equine mesenchymal stem cells: effect of donor, source, amount of tissue and supplementation with basic fibroblast growth factor. *Vet Res Commun*.
- Collins, A.T., Berry, P.A., Hyde, C., Stower, M.J. and Maitland, N.J.** (2005) Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res*, **65**, 10946-10951.
- Conget, P.A. and Minguell, J.J.** (1999) Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *J Cell Physiol*, **181**, 67-73.
- Cooksley, C., Jenks, P.J., Green, A., Cockayne, A., Logan, R.P. and Hardie, K.R.** (2003) NapA protects *Helicobacter pylori* from oxidative stress damage, and its production is influenced by the ferric uptake regulator. *J Med Microbiol*, **52**, 461-469.
- Corcione, A., Benvenuto, F., Ferretti, E., Giunti, D., Cappiello, V., Cazzanti, F., Riso, M., Gualandi, F., Mancardi, G.L., Pistoia, V. and Uccelli, A.** (2006) Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood*, **107**, 367-372.
- Correa, P., Haenszel, W., Cuello, C., Tannenbaum, S. and Archer, M.** (1975) A model for gastric cancer epidemiology. *Lancet*, **2**, 58-60.
- Couturier, M.R., Tasca, E., Montecucco, C. and Stein, M.** (2006) Interaction with CagF is required for translocation of CagA into the host via the *Helicobacter pylori* type IV secretion system. *Infect Immun*, **74**, 273-281.
- Covacci, A., Censini, S., Bugnoli, M., Petracca, R., Burroni, D., Macchia, G., Massone, A., Papini, E., Xiang, Z., Figura, N. and et al.** (1993) Molecular characterization of the 128-kDa immunodominant antigen of *Helicobacter pylori* associated with cytotoxicity and duodenal ulcer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 5791-5795.
- Covacci, A. and Rappuoli, R.** (1998) *Helicobacter pylori*: molecular evolution of a bacterial quasi-species. *Curr Opin Microbiol*, **1**, 96-102.
- Cover, T.L. and Blanke, S.R.** (2005) *Helicobacter pylori* VacA, a paradigm for toxin multifunctionality. *Nat Rev Microbiol*, **3**, 320-332.
- Cover, T.L. and Blaser, M.J.** (1992) Purification and characterization of the vacuolating toxin from *Helicobacter pylori*. *J Biol Chem*, **267**, 10570-10575.
- Cox, J.M., Clayton, C.L., Tomita, T., Wallace, D.M., Robinson, P.A. and Crabtree, J.E.** (2001) cDNA array analysis of cag pathogenicity island-associated *Helicobacter pylori* epithelial cell response genes. *Infect Immun*, **69**, 6970-6980.
- Crabtree, J.E., Covacci, A., Farmery, S.M., Xiang, Z., Tompkins, D.S., Perry, S., Lindley, I.J. and Rappuoli, R.** (1995a) *Helicobacter pylori* induced interleukin-8 expression in gastric epithelial cells is associated with CagA positive phenotype. *J Clin Pathol*, **48**, 41-45.
- Crabtree, J.E., Xiang, Z., Lindley, I.J., Tompkins, D.S., Rappuoli, R. and Covacci, A.** (1995b) Induction of interleukin-8 secretion from gastric epithelial cells by a cagA negative isogenic mutant of *Helicobacter pylori*. *J Clin Pathol*, **48**, 967-969.
- Crew, K.D. and Neugut, A.I.** (2006) Epidemiology of gastric cancer. *World J Gastroenterol*, **12**, 354-362.
- Crisostomo, P.R., Wang, Y., Markel, T.A., Wang, M., Lahm, T. and Meldrum, D.R.** (2008) Human mesenchymal stem cells stimulated by TNF-alpha, LPS, or hypoxia

- produce growth factors by an NF kappa B- but not JNK-dependent mechanism. *Am J Physiol Cell Physiol*, **294**, C675-682.
- D'Elios, M.M., Amedei, A., Manghetti, M., Costa, F., Baldari, C.T., Quazi, A.S., Telford, J.L., Romagnani, S. and Del Prete, G.** (1999) Impaired T-cell regulation of B-cell growth in *Helicobacter pylori*-related gastric low-grade MALT lymphoma. *Gastroenterology*, **117**, 1105-1112.
- D'Ippolito, G., Diabira, S., Howard, G.A., Menei, P., Roos, B.A. and Schiller, P.C.** (2004) Marrow-isolated adult multilineage inducible (MIAMI) cells, a unique population of postnatal young and old human cells with extensive expansion and differentiation potential. *J Cell Sci*, **117**, 2971-2981.
- Dalerba, P., Dylla, S.J., Park, I.K., Liu, R., Wang, X., Cho, R.W., Hoey, T., Gurney, A., Huang, E.H., Simeone, D.M., Shelton, A.A., Parmiani, G., Castelli, C. and Clarke, M.F.** (2007) Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 10158-10163.
- Davies, G.R., Banatvala, N., Collins, C.E., Sheaff, M.T., Abdi, Y., Clements, L. and Rampton, D.S.** (1994) Relationship between infective load of *Helicobacter pylori* and reactive oxygen metabolite production in antral mucosa. *Scand J Gastroenterol*, **29**, 419-424.
- Day, A.S., Su, B., Ceponis, P.J., Jones, N.L., Yau, E., Sieveking, D. and Sherman, P.M.** (2004) *Helicobacter pylori* infection induces interleukin-18 production in gastric epithelial (AGS) cells. *Dig Dis Sci*, **49**, 1830-1835.
- De Freitas, D., Urbano, M., Goulao, M.H., Donato, M.M., Baldaia, C., Martins, M.I., Souto, P., Gregorio, C., Figueiredo, P., Gouveia, H. and Romaozinho, J.M.** (2004) The effect of *Helicobacter pylori* infection on apoptosis and cell proliferation in gastric epithelium. *Hepatogastroenterology*, **51**, 876-882.
- De Reuse, H. and Bereswill, S.** (2007) Ten years after the first *Helicobacter pylori* genome: comparative and functional genomics provide new insights in the variability and adaptability of a persistent pathogen. *FEMS Immunol Med Microbiol*, **50**, 165-176.
- De Villiers, E.M., Fauquet, C., Broker, T.R., Bernard, H.U. and zur Hausen, H.** (2004) Classification of papillomaviruses. *Virology*, **324**, 17-27.
- De Vries, A.C. and Kuipers, E.J.** (2007) Epidemiology of premalignant gastric lesions: implications for the development of screening and surveillance strategies. *Helicobacter*, **12 Suppl 2**, 22-31.
- Deans, R.J. and Moseley, A.B.** (2000) Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Exp Hematol*, **28**, 875-884.
- Deshmane, S.L., Kremlev, S., Amini, S. and Sawaya, B.E.** (2009) Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *J Interferon Cytokine Res*, **29**, 313-326.
- Devine, S.M., Bartholomew, A.M., Mahmud, N., Nelson, M., Patil, S., Hardy, W., Sturgeon, C., Hewett, T., Chung, T., Stock, W., Sher, D., Weissman, S., Ferrer, K., Mosca, J., Deans, R., Moseley, A. and Hoffman, R.** (2001) Mesenchymal stem cells are capable of homing to the bone marrow of non-human primates following systemic infusion. *Exp Hematol*, **29**, 244-255.
- Devine, S.M., Cobbs, C., Jennings, M., Bartholomew, A. and Hoffman, R.** (2003) Mesenchymal stem cells distribute to a wide range of tissues following systemic infusion into nonhuman primates. *Blood*, **101**, 2999-3001.
- Di Nicola, M., Carlo-Stella, C., Magni, M., Milanese, M., Longoni, P.D., Matteucci, P., Grisanti, S. and Gianni, A.M.** (2002) Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood*, **99**, 3838-3843.

- Dierlamm, J., Baens, M., Wlodarska, I., Stefanova-Ouzounova, M., Hernandez, J.M., Hossfeld, D.K., De Wolf-Peeters, C., Hagemeyer, A., Van den Berghe, H. and Marynen, P.** (1999) The apoptosis inhibitor gene API2 and a novel 18q gene, MLT, are recurrently rearranged in the t(11;18)(q21;q21) associated with mucosa-associated lymphoid tissue lymphomas. *Blood*, **93**, 3601-3609.
- Digirolamo, C.M., Stokes, D., Colter, D., Phinney, D.G., Class, R. and Prockop, D.J.** (1999) Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate. *Br J Haematol*, **107**, 275-281.
- Dirks, P.B.** (2006) Cancer: stem cells and brain tumours. *Nature*, **444**, 687-688.
- Dixon, M.F., Genta, R.M., Yardley, J.H. and Correa, P.** (1996) Classification and grading of gastritis. The updated Sydney System. International Workshop on the Histopathology of Gastritis, Houston 1994. *Am J Surg Pathol*, **20**, 1161-1181.
- Djouad, F., Bony, C., Apparailly, F., Louis-Pence, P., Jorgensen, C. and Noel, D.** (2006) Earlier onset of syngeneic tumors in the presence of mesenchymal stem cells. *Transplantation*, **82**, 1060-1066.
- Djouad, F., Bony, C., Haupl, T., Uze, G., Lahlou, N., Louis-Pence, P., Apparailly, F., Canovas, F., Reme, T., Sany, J., Jorgensen, C. and Noel, D.** (2005) Transcriptional profiles discriminate bone marrow-derived and synovium-derived mesenchymal stem cells. *Arthritis Res Ther*, **7**, R1304-1315.
- Djouad, F., Pence, P., Bony, C., Tropel, P., Apparailly, F., Sany, J., Noel, D. and Jorgensen, C.** (2003) Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals. *Blood*, **102**, 3837-3844.
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D. and Horwitz, E.** (2006) Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, **8**, 315-317.
- Donnenberg, V.S. and Donnenberg, A.D.** (2005) Multiple drug resistance in cancer revisited: the cancer stem cell hypothesis. *J Clin Pharmacol*, **45**, 872-877.
- Dotan, I., Werner, L., Vigodman, S., Weiss, S., Brazowski, E., Maharshak, N., Chen, O., Tulchinsky, H., Halpern, Z. and Guzner-Gur, H.** (2009) CXCL12 Is a constitutive and inflammatory chemokine in the intestinal immune system. *Inflamm Bowel Dis*.
- Dubois, A., Berg, D.E., Incecik, E.T., Fiala, N., Heman-Ackah, L.M., Perez-Perez, G.I. and Blaser, M.J.** (1996) Transient and persistent experimental infection of nonhuman primates with *Helicobacter pylori*: implications for human disease. *Infect Immun*, **64**, 2885-2891.
- Dubois, A. and Boren, T.** (2007) *Helicobacter pylori* is invasive and it may be a facultative intracellular organism. *Cell Microbiol*, **9**, 1108-1116.
- Dwyer, R.M., Potter-Beirne, S.M., Harrington, K.A., Lowery, A.J., Hennessy, E., Murphy, J.M., Barry, F.P., O'Brien, T. and Kerin, M.J.** (2007) Monocyte chemotactic protein-1 secreted by primary breast tumors stimulates migration of mesenchymal stem cells. *Clin Cancer Res*, **13**, 5020-5027.
- Dylla, S.J., Beviglia, L., Park, I.K., Chartier, C., Raval, J., Ngan, L., Pickell, K., Aguilar, J., Lazetic, S., Smith-Berdan, S., Clarke, M.F., Hoey, T., Lewicki, J. and Gurney, A.L.** (2008) Colorectal cancer stem cells are enriched in xenogeneic tumors following chemotherapy. *PLoS One*, **3**, e2428.
- Eaton, K.A., Brooks, C.L., Morgan, D.R. and Krakowka, S.** (1991) Essential role of urease in pathogenesis of gastritis induced by *Helicobacter pylori* in gnotobiotic piglets. *Infect Immun*, **59**, 2470-2475.

- Eaton, K.A., Suerbaum, S., Josenhans, C. and Krakowka, S.** (1996) Colonization of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori* deficient in two flagellin genes. *Infect Immun*, **64**, 2445-2448.
- El-Omar, E.M.** (2001) The importance of interleukin 1beta in *Helicobacter pylori* associated disease. *Gut*, **48**, 743-747.
- El-Omar, E.M., Carrington, M., Chow, W.H., McColl, K.E., Bream, J.H., Young, H.A., Herrera, J., Lissowska, J., Yuan, C.C., Rothman, N., Lanyon, G., Martin, M., Fraumeni, J.F., Jr. and Rabkin, C.S.** (2000) Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer. *Nature*, **404**, 398-402.
- El-Omar, E.M., Carrington, M., Chow, W.H., McColl, K.E., Bream, J.H., Young, H.A., Herrera, J., Lissowska, J., Yuan, C.C., Rothman, N., Lanyon, G., Martin, M., Fraumeni, J.F., Jr. and Rabkin, C.S.** (2001) The role of interleukin-1 polymorphisms in the pathogenesis of gastric cancer. *Nature*, **412**, 99.
- El-Omar, E.M., Rabkin, C.S., Gammon, M.D., Vaughan, T.L., Risch, H.A., Schoenberg, J.B., Stanford, J.L., Mayne, S.T., Goedert, J., Blot, W.J., Fraumeni, J.F., Jr. and Chow, W.H.** (2003) Increased risk of noncardia gastric cancer associated with proinflammatory cytokine gene polymorphisms. *Gastroenterology*, **124**, 1193-1201.
- English, K., Barry, F.P., Field-Corbett, C.P. and Mahon, B.P.** (2007) IFN-gamma and TNF-alpha differentially regulate immunomodulation by murine mesenchymal stem cells. *Immunol Lett*, **110**, 91-100.
- Enno, A., O'Rourke, J., Braye, S., Howlett, R. and Lee, A.** (1998) Antigen-dependent progression of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT)-type lymphoma in the stomach. Effects of antimicrobial therapy on gastric MALT lymphoma in mice. *Am J Pathol*, **152**, 1625-1632.
- Epstein, M.A.** (2001) Historical background. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **356**, 413-420.
- Epstein, M.A., Achong, B.G. and Barr, Y.M.** (1964) Virus Particles in Cultured Lymphoblasts from Burkitt's Lymphoma. *Lancet*, **1**, 702-703.
- Erdman, S.E., Correa, P., Coleman, L.A., Schrenzel, M.D., Li, X. and Fox, J.G.** (1997) *Helicobacter mustelae*-associated gastric MALT lymphoma in ferrets. *Am J Pathol*, **151**, 273-280.
- Eslick, G.D.** (2006) *Helicobacter pylori* infection causes gastric cancer? A review of the epidemiological, meta-analytic, and experimental evidence. *World J Gastroenterol*, **12**, 2991-2999.
- Evans, D.J., Jr., Evans, D.G., Takemura, T., Nakano, H., Lampert, H.C., Graham, D.Y., Granger, D.N. and Kviety, P.R.** (1995) Characterization of a *Helicobacter pylori* neutrophil-activating protein. *Infect Immun*, **63**, 2213-2220.
- Fagioli, F., Rigolin, G.M., Cuneo, A., Scapoli, G., Spanedda, R., Cavazzini, P. and Castoldi, G.** (1994) Primary gastric lymphoma: distribution and clinical relevance of different epidemiological factors. *Haematologica*, **79**, 213-217.
- Falush, D., Wirth, T., Linz, B., Pritchard, J.K., Stephens, M., Kidd, M., Blaser, M.J., Graham, D.Y., Vacher, S., Perez-Perez, G.I., Yamaoka, Y., Megraud, F., Otto, K., Reichard, U., Katzowitsch, E., Wang, X., Achtman, M. and Suerbaum, S.** (2003) Traces of human migrations in *Helicobacter pylori* populations. *Science*, **299**, 1582-1585.
- Fam, N.P., Verma, S., Kutryk, M. and Stewart, D.J.** (2003) Clinician guide to angiogenesis. *Circulation*, **108**, 2613-2618.
- Fehrer, C., Laschober, G. and Lepperdinger, G.** (2006) Aging of murine mesenchymal stem cells. *Ann N Y Acad Sci*, **1067**, 235-242.

- Fernandez, M., Simon, V., Herrera, G., Cao, C., Del Favero, H. and Minguell, J.J.** (1997) Detection of stromal cells in peripheral blood progenitor cell collections from breast cancer patients. *Bone Marrow Transplant*, **20**, 265-271.
- Ferrand, J., Roumanes, D., Pitard, V., Moreau, J.F., Megraud, F. and Lehours, P.** (2008) Modulation of lymphocyte proliferation induced by gastric MALT lymphoma-associated *Helicobacter pylori* strains. *Helicobacter*, **13**, 167-173.
- Ferrari, G., Cusella-De Angelis, G., Coletta, M., Paolucci, E., Stornaiuolo, A., Cossu, G. and Mavilio, F.** (1998) Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science*, **279**, 1528-1530.
- Ferrero, R.L., Thiberge, J.M., Huerre, M. and Labigne, A.** (1998) Immune responses of specific-pathogen-free mice to chronic *Helicobacter pylori* (strain SS1) infection. *Infect Immun*, **66**, 1349-1355.
- Fiedler, J., Brill, C., Blum, W.F. and Brenner, R.E.** (2006) IGF-I and IGF-II stimulate directed cell migration of bone-marrow-derived human mesenchymal progenitor cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **345**, 1177-1183.
- Fiedler, J., Roderer, G., Gunther, K.P. and Brenner, R.E.** (2002) BMP-2, BMP-4, and PDGF-bb stimulate chemotactic migration of primary human mesenchymal progenitor cells. *J Cell Biochem*, **87**, 305-312.
- Fierro, F.A., Sierralta, W.D., Epanan, M.J. and Minguell, J.J.** (2004) Marrow-derived mesenchymal stem cells: role in epithelial tumor cell determination. *Clin Exp Metastasis*, **21**, 313-319.
- Finlay, B.B. and Falkow, S.** (1997) Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiol Mol Biol Rev*, **61**, 136-169.
- Fischer, W., Puls, J., Buhrdorf, R., Gebert, B., Odenbreit, S. and Haas, R.** (2001) Systematic mutagenesis of the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island: essential genes for CagA translocation in host cells and induction of interleukin-8. *Mol Microbiol*, **42**, 1337-1348.
- Forman, D. and Burley, V.J.** (2006) Gastric cancer: global pattern of the disease and an overview of environmental risk factors. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, **20**, 633-649.
- Forman, D., Sitas, F., Newell, D.G., Stacey, A.R., Boreham, J., Peto, R., Campbell, T.C., Li, J. and Chen, J.** (1990) Geographic association of *Helicobacter pylori* antibody prevalence and gastric cancer mortality in rural China. *Int J Cancer*, **46**, 608-611.
- Forte, G., Minieri, M., Cossa, P., Antenucci, D., Sala, M., Gnocchi, V., Fiaccavento, R., Carotenuto, F., De Vito, P., Baldini, P.M., Prat, M. and Di Nardo, P.** (2006) Hepatocyte growth factor effects on mesenchymal stem cells: proliferation, migration, and differentiation. *Stem Cells*, **24**, 23-33.
- Fox, J.G., Sheppard, B.J., Dangler, C.A., Whary, M.T., Ihrig, M. and Wang, T.C.** (2002) Germ-line *p53*-targeted disruption inhibits *helicobacter*-induced premalignant lesions and invasive gastric carcinoma through down-regulation of Th1 proinflammatory responses. *Cancer Res*, **62**, 696-702.
- Fox, J.G. and Wang, T.C.** (2007) Inflammation, atrophy, and gastric cancer. *J Clin Invest*, **117**, 60-69.
- Fox, J.M., Chamberlain, G., Ashton, B.A. and Middleton, J.** (2007) Recent advances into the understanding of mesenchymal stem cell trafficking. *Br J Haematol*, **137**, 491-502.
- Franceschi, S. and La Vecchia, C.** (1994) Alcohol and the risk of cancers of the stomach and colon-rectum. *Dig Dis*, **12**, 276-289.
- Franco, A.T., Israel, D.A., Washington, M.K., Krishna, U., Fox, J.G., Rogers, A.B., Neish, A.S., Collier-Hyams, L., Perez-Perez, G.I., Hatakeyama, M., Whitehead,**

- R., Gaus, K., O'Brien, D.P., Romero-Gallo, J. and Peek, R.M., Jr.** (2005) Activation of beta-catenin by carcinogenic *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 10646-10651.
- Francois, S., Bensidhoum, M., Mouiseddine, M., Mazurier, C., Allenet, B., Semont, A., Frick, J., Sache, A., Bouchet, S., Thierry, D., Gourmelon, P., Gorin, N.C. and Chapel, A.** (2006) Local irradiation not only induces homing of human mesenchymal stem cells at exposed sites but promotes their widespread engraftment to multiple organs: a study of their quantitative distribution after irradiation damage. *Stem Cells*, **24**, 1020-1029.
- Friedenstein, A.J., Chailakhjan, R.K. and Lalykina, K.S.** (1970) The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet*, **3**, 393-403.
- Friedenstein, A.J., Chailakhyan, R.K. and Gerasimov, U.V.** (1987) Bone marrow osteogenic stem cells: *in vitro* cultivation and transplantation in diffusion chambers. *Cell Tissue Kinet*, **20**, 263-272.
- Friedenstein, A.J., Gorskaja, J.F. and Kulagina, N.N.** (1976) Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol*, **4**, 267-274.
- Fritz, J.H., Ferrero, R.L., Philpott, D.J. and Girardin, S.E.** (2006) Nod-like proteins in immunity, inflammation and disease. *Nat Immunol*, **7**, 1250-1257.
- Fujikawa, A., Shirasaka, D., Yamamoto, S., Ota, H., Yahiro, K., Fukada, M., Shintani, T., Wada, A., Aoyama, N., Hirayama, T., Fukamachi, H. and Noda, M.** (2003) Mice deficient in protein tyrosine phosphatase receptor type Z are resistant to gastric ulcer induction by VacA of *Helicobacter pylori*. *Nat Genet*, **33**, 375-381.
- Fukuda, K. and Fujita, J.** (2005) Mesenchymal, but not hematopoietic, stem cells can be mobilized and differentiate into cardiomyocytes after myocardial infarction in mice. *Kidney Int*, **68**, 1940-1943.
- Furuta, T. and Delchier, J.C.** (2009) *Helicobacter pylori* and Non-malignant Diseases. *Helicobacter*, **14**, 29-35.
- Futagami, S., Hiratsuka, T., Tatsuguchi, A., Suzuki, K., Kusunoki, M., Shinji, Y., Shinoki, K., Iizumi, T., Akamatsu, T., Nishigaki, H., Wada, K., Miyake, K., Gudis, K., Tsukui, T. and Sakamoto, C.** (2003) Monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) released from *Helicobacter pylori* stimulated gastric epithelial cells induces cyclooxygenase 2 expression and activation in T cells. *Gut*, **52**, 1257-1264.
- Galmiche, A., Rassow, J., Doye, A., Cagnol, S., Chambard, J.C., Contamin, S., de Thillot, V., Just, I., Ricci, V., Solcia, E., Van Obberghen, E. and Boquet, P.** (2000) The N-terminal 34 kDa fragment of *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin targets mitochondria and induces cytochrome c release. *Embo J*, **19**, 6361-6370.
- Galmiche, M.C., Koteliansky, V.E., Briere, J., Herve, P. and Charbord, P.** (1993) Stromal cells from human long-term marrow cultures are mesenchymal cells that differentiate following a vascular smooth muscle differentiation pathway. *Blood*, **82**, 66-76.
- Ganem, D. and Prince, A.M.** (2004) Hepatitis B virus infection--natural history and clinical consequences. *N Engl J Med*, **350**, 1118-1129.
- Garcia-Vallve, S., Janssen, P.J. and Ouzounis, C.A.** (2002) Genetic variation between *Helicobacter pylori* strains: gene acquisition or loss? *Trends Microbiol*, **10**, 445-447.
- Garrington, T.P. and Johnson, G.L.** (1999) Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Curr Opin Cell Biol*, **11**, 211-218.

- Garrity, G.M., Bell, J.A. and Lilburn, T.** (2005) Family II. *Helicobacteraceae fam. nov.* In Garrity, G.M., Boone, D.R. and Castenholz, R.W. (eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Springer, New York, Vol. 2, pp. 1168-1194.
- Gerhard, M., Lehn, N., Neumayer, N., Boren, T., Rad, R., Schepp, W., Miehle, S., Classen, M. and Prinz, C.** (1999) Clinical relevance of the *Helicobacter pylori* gene for blood-group antigen-binding adhesin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 12778-12783.
- Ghiara, P., Marchetti, M., Blaser, M.J., Tummuru, M.K., Cover, T.L., Segal, E.D., Tompkins, L.S. and Rappuoli, R.** (1995) Role of the *Helicobacter pylori* virulence factors vacuolating cytotoxin, CagA, and urease in a mouse model of disease. *Infect Immun*, **63**, 4154-4160.
- Ginestier, C., Hur, M.H., Charafe-Jauffret, E., Monville, F., Dutcher, J., Brown, M., Jacquemier, J., Viens, P., Kleer, C.G., Liu, S., Schott, A., Hayes, D., Birnbaum, D., Wicha, M.S. and Dontu, G.** (2007) ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell*, **1**, 555-567.
- Glennie, S., Soeiro, I., Dyson, P.J., Lam, E.W. and Dazzi, F.** (2005) Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells. *Blood*, **105**, 2821-2827.
- Godiska, R., Chantry, D., Raport, C.J., Sozzani, S., Allavena, P., Leviten, D., Mantovani, A. and Gray, P.W.** (1997) Human macrophage-derived chemokine (MDC), a novel chemoattractant for monocytes, monocyte-derived dendritic cells, and natural killer cells. *J Exp Med*, **185**, 1595-1604.
- Godlewska, R., Pawlowski, M., Dzwonek, A., Mikula, M., Ostrowski, J., Drela, N. and Jagusztyn-Krynicka, E.K.** (2008) Tip-alpha (hp0596 gene product) is a highly immunogenic *Helicobacter pylori* protein involved in colonization of mouse gastric mucosa. *Curr Microbiol*, **56**, 279-286.
- Goldenring, J.R. and Nomura, S.** (2006) Differentiation of the gastric mucosa III. Animal models of oxyntic atrophy and metaplasia. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, **291**, G999-1004.
- Goncalves, M.A., de Vries, A.A., Holkers, M., van de Watering, M.J., van der Velde, I., van Nierop, G.P., Valerio, D. and Knaan-Shanzer, S.** (2006) Human mesenchymal stem cells ectopically expressing full-length dystrophin can complement Duchenne muscular dystrophy myotubes by cell fusion. *Hum Mol Genet*, **15**, 213-221.
- Gonzalez, C.A., Pera, G., Agudo, A., Palli, D., Krogh, V., Vineis, P., Tumino, R., Panico, S., Berglund, G., Siman, H., Nyren, O., Agren, A., Martinez, C., Dorronsoro, M., Barricarte, A., Tormo, M.J., Quiros, J.R., Allen, N., Bingham, S., Day, N., Miller, A., Nagel, G., Boeing, H., Overvad, K., Tjonneland, A., Bueno-De-Mesquita, H.B., Boshuizen, H.C., Peeters, P., Numans, M., Clavel-Chapelon, F., Helen, I., Agapitos, E., Lund, E., Fahey, M., Saracci, R., Kaaks, R. and Riboli, E.** (2003) Smoking and the risk of gastric cancer in the European Prospective Investigation Into Cancer and Nutrition (EPIC). *Int J Cancer*, **107**, 629-634.
- Goodwin, A.C., Weinberger, D.M., Ford, C.B., Nelson, J.C., Snider, J.D., Hall, J.D., Paules, C.I., Peek, R.M., Jr. and Forsyth, M.H.** (2008) Expression of the *Helicobacter pylori* adhesin SabA is controlled via phase variation and the ArsRS signal transduction system. *Microbiology*, **154**, 2231-2240.
- Goodwin, C.S., Armstrong, J.A., Chilvers, T., Peters, M., Collins, M.D., Sly, L., McConnell, W. and Harper, W.E.S.** (1989) Transfer of *Campylobacter pylori* and

- Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen. nov. as *Helicobacter pylori* comb. nov. and *Helicobacter mustelae* comb. nov., Respectively. Vol. 39, pp. 397-405.
- Gore, R.M.** (1997) Gastric cancer. Clinical and pathologic features. *Radiol Clin North Am*, **35**, 295-310.
- Gressmann, H., Linz, B., Ghai, R., Pleissner, K.P., Schlapbach, R., Yamaoka, Y., Kraft, C., Suerbaum, S., Meyer, T.F. and Achtman, M.** (2005) Gain and loss of multiple genes during the evolution of *Helicobacter pylori*. *PLoS Genet*, **1**, e43.
- Gu, G., Yuan, J., Wills, M. and Kasper, S.** (2007) Prostate cancer cells with stem cell characteristics reconstitute the original human tumor *in vivo*. *Cancer Res*, **67**, 4807-4815.
- Guilford, P., Hopkins, J., Harraway, J., McLeod, M., McLeod, N., Harawira, P., Taite, H., Scoular, R., Miller, A. and Reeve, A.E.** (1998) E-cadherin germline mutations in familial gastric cancer. *Nature*, **392**, 402-405.
- Gurdon, J.B. and Melton, D.A.** (2008) Nuclear reprogramming in cells. *Science*, **322**, 1811-1815.
- Haesebrouck, F., Pasmans, F., Flahou, B., Chiers, K., Baele, M., Meyns, T., Decostere, A. and Ducatelle, R.** (2009) Gastric helicobacters in domestic animals and nonhuman primates and their significance for human health. *Clin Microbiol Rev*, **22**, 202-223, Table of Contents.
- Hanahan, D. and Weinberg, R.A.** (2000) The hallmarks of cancer. *Cell*, **100**, 57-70.
- Handt, L.K., Fox, J.G., Stalis, I.H., Rufo, R., Lee, G., Linn, J., Li, X. and Kleanthous, H.** (1995) Characterization of feline *Helicobacter pylori* strains and associated gastritis in a colony of domestic cats. *J Clin Microbiol*, **33**, 2280-2289.
- Haniffa, M.A., Collin, M.P., Buckley, C.D. and Dazzi, F.** (2009) Mesenchymal stem cells: the fibroblasts' new clothes? *Haematologica*, **94**, 258-263.
- Haniffa, M.A., Wang, X.N., Holtick, U., Rae, M., Isaacs, J.D., Dickinson, A.M., Hilkens, C.M. and Collin, M.P.** (2007) Adult human fibroblasts are potent immunoregulatory cells and functionally equivalent to mesenchymal stem cells. *J Immunol*, **179**, 1595-1604.
- Hansson, L.E., Engstrand, L., Nyren, O., Evans, D.J., Jr., Lindgren, A., Bergstrom, R., Andersson, B., Athlin, L., Bendtsen, O. and Tracz, P.** (1993) *Helicobacter pylori* infection: independent risk indicator of gastric adenocarcinoma. *Gastroenterology*, **105**, 1098-1103.
- Harris, R.G., Herzog, E.L., Bruscia, E.M., Grove, J.E., Van Arnem, J.S. and Krause, D.S.** (2004) Lack of a fusion requirement for development of bone marrow-derived epithelia. *Science*, **305**, 90-93.
- Hasan, U.A., Trinchieri, G. and Vlach, J.** (2005) Toll-like receptor signaling stimulates cell cycle entry and progression in fibroblasts. *J Biol Chem*, **280**, 20620-20627.
- Haynesworth, S.E., Baber, M.A. and Caplan, A.I.** (1992) Cell surface antigens on human marrow-derived mesenchymal cells are detected by monoclonal antibodies. *Bone*, **13**, 69-80.
- Hazell, S.L., Lee, A., Brady, L. and Hennessy, W.** (1986) *Campylobacter pyloridis* and gastritis: association with intercellular spaces and adaptation to an environment of mucus as important factors in colonization of the gastric epithelium. *J Infect Dis*, **153**, 658-663.
- Helicobacter and Cancer Collaborative Group** (2001) Gastric cancer and *Helicobacter pylori*: a combined analysis of 12 case control studies nested within prospective cohorts. *Gut*, **49**, 347-353.

- Hellmig, S., Bartscht, T., Fischbach, W., Folsch, U.R. and Schreiber, S.** (2008) Interleukin-10 (-819 C/T) and TNF-A (-308 G/A) as risk factors for *H. pylori*-associated gastric MALT-lymphoma. *Dig Dis Sci*, **53**, 2007-2008.
- Hess, D., Li, L., Martin, M., Sakano, S., Hill, D., Strutt, B., Thyssen, S., Gray, D.A. and Bhatia, M.** (2003) Bone marrow-derived stem cells initiate pancreatic regeneration. *Nat Biotechnol*, **21**, 763-770.
- Higashi, H., Tsutsumi, R., Fujita, A., Yamazaki, S., Asaka, M., Azuma, T. and Hatakeyama, M.** (2002a) Biological activity of the *Helicobacter pylori* virulence factor CagA is determined by variation in the tyrosine phosphorylation sites. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 14428-14433.
- Higashi, H., Tsutsumi, R., Muto, S., Sugiyama, T., Azuma, T., Asaka, M. and Hatakeyama, M.** (2002b) SHP-2 tyrosine phosphatase as an intracellular target of *Helicobacter pylori* CagA protein. *Science*, **295**, 683-686.
- Hilbe, W., Dirnhofer, S., Oberwasserlechner, F., Schmid, T., Gunsilius, E., Hilbe, G., Woll, E. and Kahler, C.M.** (2004) CD133 positive endothelial progenitor cells contribute to the tumour vasculature in non-small cell lung cancer. *J Clin Pathol*, **57**, 965-969.
- Hill, A.B.** (1965) The Environment and Disease: Association or Causation? *Proc R Soc Med*, **58**, 295-300.
- Hirata, Y., Maeda, S., Ohmae, T., Shibata, W., Yanai, A., Ogura, K., Yoshida, H., Kawabe, T. and Omata, M.** (2006) *Helicobacter pylori* induces IkappaB kinase alpha nuclear translocation and chemokine production in gastric epithelial cells. *Infect Immun*, **74**, 1452-1461.
- Hirschmann-Jax, C., Foster, A.E., Wulf, G.G., Nuchtern, J.G., Jax, T.W., Gobel, U., Goodell, M.A. and Brenner, M.K.** (2004) A distinct "side population" of cells with high drug efflux capacity in human tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 14228-14233.
- Ho, A.D., Wagner, W. and Franke, W.** (2008) Heterogeneity of mesenchymal stromal cell preparations. *Cytotherapy*, **10**, 320-330.
- Hobsley, M., Tovey, F.I. and Holton, J.** (2008) Controversies in the *Helicobacter pylori*/duodenal ulcer story. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, **102**, 1171-1175.
- Hofner, P., Gyulai, Z., Kiss, Z.F., Tiszai, A., Tiszlavicz, L., Toth, G., Szoke, D., Molnar, B., Lonovics, J., Tulassay, Z. and Mandi, Y.** (2007) Genetic polymorphisms of NOD1 and IL-8, but not polymorphisms of TLR4 genes, are associated with *Helicobacter pylori*-induced duodenal ulcer and gastritis. *Helicobacter*, **12**, 124-131.
- Hofreuter, D. and Haas, R.** (2002) Characterization of two cryptic *Helicobacter pylori* plasmids: a putative source for horizontal gene transfer and gene shuffling. *J Bacteriol*, **184**, 2755-2766.
- Honczarenko, M., Le, Y., Swierkowski, M., Ghiran, I., Glodek, A.M. and Silberstein, L.E.** (2006) Human bone marrow stromal cells express a distinct set of biologically functional chemokine receptors. *Stem Cells*, **24**, 1030-1041.
- Hornung, F., Scala, G. and Lenardo, M.J.** (2000) TNF-alpha-induced secretion of C-C chemokines modulates C-C chemokine receptor 5 expression on peripheral blood lymphocytes. *J Immunol*, **164**, 6180-6187.
- Horwitz, E.M., Le Blanc, K., Dominici, M., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F.C., Deans, R.J., Krause, D.S. and Keating, A.** (2005) Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, **7**, 393-395.

- Houghton, J., Stoicov, C., Nomura, S., Rogers, A.B., Carlson, J., Li, H., Cai, X., Fox, J.G., Goldenring, J.R. and Wang, T.C. (2004) Gastric cancer originating from bone marrow-derived cells. *Science*, **306**, 1568-1571.
- Houghton, J. and Wang, T.C. (2005) *Helicobacter pylori* and gastric cancer: a new paradigm for inflammation-associated epithelial cancers. *Gastroenterology*, **128**, 1567-1578.
- Huh, W.K. (2009) Human papillomavirus infection: a concise review of natural history. *Obstet Gynecol*, **114**, 139-143.
- Hussell, T., Isaacson, P.G., Crabtree, J.E. and Spencer, J. (1993) The response of cells from low-grade B-cell gastric lymphomas of mucosa-associated lymphoid tissue to *Helicobacter pylori*. *Lancet*, **342**, 571-574.
- Hussell, T., Isaacson, P.G., Crabtree, J.E. and Spencer, J. (1996) *Helicobacter pylori*-specific tumour-infiltrating T cells provide contact dependent help for the growth of malignant B cells in low-grade gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue. *J Pathol*, **178**, 122-127.
- Hwa Cho, H., Bae, Y.C. and Jung, J.S. (2006) Role of toll-like receptors on human adipose-derived stromal cells. *Stem Cells*, **24**, 2744-2752.
- Ianus, A., Holz, G.G., Theise, N.D. and Hussain, M.A. (2003) *In vivo* derivation of glucose-competent pancreatic endocrine cells from bone marrow without evidence of cell fusion. *J Clin Invest*, **111**, 843-850.
- IARC. (1994) Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. Lyon, 7-14 June 1994. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum*, **61**, 1-241.
- IARC. (2008) *World Cancer Report 2008*. IARC Press, Lyon.
- Ilver, D., Arnqvist, A., Ogren, J., Frick, I.M., Kersulyte, D., Incecik, E.T., Berg, D.E., Covacci, A., Engstrand, L. and Boren, T. (1998) *Helicobacter pylori* adhesin binding fucosylated histo-blood group antigens revealed by retagging. *Science*, **279**, 373-377.
- Ilver, D., Barone, S., Mercati, D., Lupetti, P. and Telford, J.L. (2004) *Helicobacter pylori* toxin VacA is transferred to host cells via a novel contact-dependent mechanism. *Cell Microbiol*, **6**, 167-174.
- Isaacson, P. and Wright, D.H. (1983) Malignant lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue. A distinctive type of B-cell lymphoma. *Cancer*, **52**, 1410-1416.
- Ishihara, S., Rumi, M.A., Kadowaki, Y., Ortega-Cava, C.F., Yuki, T., Yoshino, N., Miyaoka, Y., Kazumori, H., Ishimura, N., Amano, Y. and Kinoshita, Y. (2004) Essential role of MD-2 in TLR4-dependent signaling during *Helicobacter pylori*-associated gastritis. *J Immunol*, **173**, 1406-1416.
- Ishikawa, F., Yoshida, S., Saito, Y., Hijikata, A., Kitamura, H., Tanaka, S., Nakamura, R., Tanaka, T., Tomiyama, H., Saito, N., Fukata, M., Miyamoto, T., Lyons, B., Ohshima, K., Uchida, N., Taniguchi, S., Ohara, O., Akashi, K., Harada, M. and Shultz, L.D. (2007) Chemotherapy-resistant human AML stem cells home to and engraft within the bone-marrow endosteal region. *Nat Biotechnol*, **25**, 1315-1321.
- Israel, D.A., Salama, N., Arnold, C.N., Moss, S.F., Ando, T., Wirth, H.P., Tham, K.T., Camorlinga, M., Blaser, M.J., Falkow, S. and Peek, R.M., Jr. (2001) *Helicobacter pylori* strain-specific differences in genetic content, identified by microarray, influence host inflammatory responses. *J Clin Invest*, **107**, 611-620.
- Javazon, E.H., Beggs, K.J. and Flake, A.W. (2004) Mesenchymal stem cells: paradoxes of passaging. *Exp Hematol*, **32**, 414-425.
- Javazon, E.H., Colter, D.C., Schwarz, E.J. and Prockop, D.J. (2001) Rat marrow stromal cells are more sensitive to plating density and expand more rapidly from single-cell-derived colonies than human marrow stromal cells. *Stem Cells*, **19**, 219-225.

- Jeanes, A., Gottardi, C.J. and Yap, A.S.** (2008) Cadherins and cancer: how does cadherin dysfunction promote tumor progression? *Oncogene*, **27**, 6920-6929.
- Ji, J.F., He, B.P., Dheen, S.T. and Tay, S.S.** (2004) Interactions of chemokines and chemokine receptors mediate the migration of mesenchymal stem cells to the impaired site in the brain after hypoglossal nerve injury. *Stem Cells*, **22**, 415-427.
- Ji, X., Fernandez, T., Burroni, D., Pagliaccia, C., Atherton, J.C., Reyrat, J.M., Rappuoli, R. and Telford, J.L.** (2000) Cell specificity of *Helicobacter pylori* cytotoxin is determined by a short region in the polymorphic midregion. *Infect Immun*, **68**, 3754-3757.
- Jiang, Q., Hiratsuka, K. and Taylor, D.E.** (1996) Variability of gene order in different *Helicobacter pylori* strains contributes to genome diversity. *Mol Microbiol*, **20**, 833-842.
- Jiang, X.X., Zhang, Y., Liu, B., Zhang, S.X., Wu, Y., Yu, X.D. and Mao, N.** (2005) Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood*, **105**, 4120-4126.
- Jiang, Y., Jahagirdar, B.N., Reinhardt, R.L., Schwartz, R.E., Keene, C.D., Ortiz-Gonzalez, X.R., Reyes, M., Lenvik, T., Lund, T., Blackstad, M., Du, J., Aldrich, S., Lisberg, A., Low, W.C., Largaespada, D.A. and Verfaillie, C.M.** (2002a) Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*, **418**, 41-49.
- Jiang, Y., Vaessen, B., Lenvik, T., Blackstad, M., Reyes, M. and Verfaillie, C.M.** (2002b) Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain. *Exp Hematol*, **30**, 896-904.
- Johnstone, B., Hering, T.M., Caplan, A.I., Goldberg, V.M. and Yoo, J.U.** (1998) *In vitro* chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Exp Cell Res*, **238**, 265-272.
- Jones, K.R., Joo, Y.M., Jang, S., Yoo, Y.J., Lee, H.S., Chung, I.S., Olsen, C.H., Whitmire, J.M., Merrell, D.S. and Cha, J.H.** (2009) Polymorphism in the CagA EPIYA motif impacts development of gastric cancer. *J Clin Microbiol*, **47**, 959-968.
- Josenshans, C., Beier, D., Linz, B., Meyer, T.F. and Suerbaum, S.** (2007) Pathogenomics of helicobacter. *Int J Med Microbiol*, **297**, 589-600.
- Josenshans, C., Labigne, A. and Suerbaum, S.** (1995) Comparative ultrastructural and functional studies of *Helicobacter pylori* and *Helicobacter mustelae* flagellin mutants: both flagellin subunits, FlaA and FlaB, are necessary for full motility in *Helicobacter* species. *J Bacteriol*, **177**, 3010-3020.
- Kadiyala, S., Young, R.G., Thiede, M.A. and Bruder, S.P.** (1997) Culture expanded canine mesenchymal stem cells possess osteochondrogenic potential *in vivo* and *in vitro*. *Cell Transplant*, **6**, 125-134.
- Kang, Y. and Massague, J.** (2004) Epithelial-mesenchymal transitions: twist in development and metastasis. *Cell*, **118**, 277-279.
- Karnholz, A., Hoefler, C., Odenbreit, S., Fischer, W., Hofreuter, D. and Haas, R.** (2006) Functional and topological characterization of novel components of the comB DNA transformation competence system in *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol*, **188**, 882-893.
- Karnoub, A.E., Dash, A.B., Vo, A.P., Sullivan, A., Brooks, M.W., Bell, G.W., Richardson, A.L., Polyak, K., Tubo, R. and Weinberg, R.A.** (2007) Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature*, **449**, 557-563.
- Keates, A.C., Tummala, S., Peek, R.M., Jr., Csizmadia, E., Kunzli, B., Becker, K., Correa, P., Romero-Gallo, J., Piazuelo, M.B., Sheth, S., Kelly, C.P., Robson, S.C. and Keates,**

- S. (2008) *Helicobacter pylori* infection stimulates plasminogen activator inhibitor 1 production by gastric epithelial cells. *Infect Immun*, **76**, 3992-3999.
- Khakoo, A.Y., Pati, S., Anderson, S.A., Reid, W., Elshal, M.F., Rovira, II, Nguyen, A.T., Malide, D., Combs, C.A., Hall, G., Zhang, J., Raffeld, M., Rogers, T.B., Stetler-Stevenson, W., Frank, J.A., Reitz, M. and Finkel, T.** (2006) Human mesenchymal stem cells exert potent antitumorigenic effects in a model of Kaposi's sarcoma. *J Exp Med*, **203**, 1235-1247.
- Khurana, S., Dubey, M.L. and Malla, N.** (2005) Association of parasitic infections and cancers. *Indian J Med Microbiol*, **23**, 74-79.
- Kim, J.M., Kim, J.S., Jung, H.C., Song, I.S. and Kim, C.Y.** (2000) Virulence factors of *Helicobacter pylori* in Korean isolates do not influence proinflammatory cytokine gene expression and apoptosis in human gastric epithelial cells, nor do these factors influence the clinical outcome. *J Gastroenterol*, **35**, 898-906.
- Kinnaird, T., Stabile, E., Burnett, M.S. and Epstein, S.E.** (2004) Bone-marrow-derived cells for enhancing collateral development: mechanisms, animal data, and initial clinical experiences. *Circ Res*, **95**, 354-363.
- Kivi, M. and Tindberg, Y.** (2006) *Helicobacter pylori* occurrence and transmission: a family affair? *Scand J Infect Dis*, **38**, 407-417.
- Kleber, M. and Sommer, L.** (2004) Wnt signaling and the regulation of stem cell function. *Curr Opin Cell Biol*, **16**, 681-687.
- Klein, P.D., Graham, D.Y., Gaillour, A., Opekun, A.R. and Smith, E.O.** (1991) Water source as risk factor for *Helicobacter pylori* infection in Peruvian children. Gastrointestinal Physiology Working Group. *Lancet*, **337**, 1503-1506.
- Klyushnenkova, E., Mosca, J.D., Zernetkina, V., Majumdar, M.K., Beggs, K.J., Simonetti, D.W., Deans, R.J. and McIntosh, K.R.** (2005) T cell responses to allogeneic human mesenchymal stem cells: immunogenicity, tolerance, and suppression. *J Biomed Sci*, **12**, 47-57.
- Kohda, K., Tanaka, K., Aiba, Y., Yasuda, M., Miwa, T. and Koga, Y.** (1999) Role of apoptosis induced by *Helicobacter pylori* infection in the development of duodenal ulcer. *Gut*, **44**, 456-462.
- Koizumi, K., Hojo, S., Akashi, T., Yasumoto, K. and Saiki, I.** (2007) Chemokine receptors in cancer metastasis and cancer cell-derived chemokines in host immune response. *Cancer Sci*, **98**, 1652-1658.
- Koizumi, Y., Tsubono, Y., Nakaya, N., Kuriyama, S., Shibuya, D., Matsuoka, H. and Tsuji, I.** (2004) Cigarette smoking and the risk of gastric cancer: a pooled analysis of two prospective studies in Japan. *Int J Cancer*, **112**, 1049-1055.
- Komarova, S., Kawakami, Y., Stoff-Khalili, M.A., Curiel, D.T. and Pereboeva, L.** (2006) Mesenchymal progenitor cells as cellular vehicles for delivery of oncolytic adenoviruses. *Mol Cancer Ther*, **5**, 755-766.
- Kondo, M., Wagers, A.J., Manz, M.G., Prohaska, S.S., Scherer, D.C., Beilhack, G.F., Shizuru, J.A. and Weissman, I.L.** (2003) Biology of hematopoietic stem cells and progenitors: implications for clinical application. *Annu Rev Immunol*, **21**, 759-806.
- Konturek, S.J., Konturek, P.C., Konturek, J.W., Plonka, M., Czesnikiewicz-Guzik, M., Brzozowski, T. and Bielanski, W.** (2006) *Helicobacter pylori* and its involvement in gastritis and peptic ulcer formation. *J Physiol Pharmacol*, **57 Suppl 3**, 29-50.
- Korbling, M., Katz, R.L., Khanna, A., Ruifrok, A.C., Rondon, G., Albitar, M., Champlin, R.E. and Estrov, Z.** (2002) Hepatocytes and epithelial cells of donor origin in recipients of peripheral-blood stem cells. *N Engl J Med*, **346**, 738-746.

- Kotton, D.N., Ma, B.Y., Cardoso, W.V., Sanderson, E.A., Summer, R.S., Williams, M.C. and Fine, A.** (2001) Bone marrow-derived cells as progenitors of lung alveolar epithelium. *Development*, **128**, 5181-5188.
- Krampera, M., Cosmi, L., Angeli, R., Pasini, A., Liotta, F., Andreini, A., Santarlasci, V., Mazzinghi, B., Pizzolo, G., Vinante, F., Romagnani, P., Maggi, E., Romagnani, S. and Annunziato, F.** (2006) Role for interferon-gamma in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, **24**, 386-398.
- Krampera, M., Glennie, S., Dyson, J., Scott, D., Laylor, R., Simpson, E. and Dazzi, F.** (2003) Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. *Blood*, **101**, 3722-3729.
- Krause, D.S., Theise, N.D., Collector, M.I., Henegariu, O., Hwang, S., Gardner, R., Neutzel, S. and Sharkis, S.J.** (2001) Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell*, **105**, 369-377.
- Kucerova, L., Altanerova, V., Matuskova, M., Tyciakova, S. and Altaner, C.** (2007) Adipose tissue-derived human mesenchymal stem cells mediated prodrug cancer gene therapy. *Cancer Res*, **67**, 6304-6313.
- Kuck, D., Kolmerer, B., Iking-Konert, C., Krammer, P.H., Stremmel, W. and Rudi, J.** (2001) Vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori* induces apoptosis in the human gastric epithelial cell line AGS. *Infect Immun*, **69**, 5080-5087.
- Kudo, T., Lu, H., Wu, J.Y., Graham, D.Y., Casola, A. and Yamaoka, Y.** (2005) Regulation of RANTES promoter activation in gastric epithelial cells infected with *Helicobacter pylori*. *Infect Immun*, **73**, 7602-7612.
- Kundu, P., Mukhopadhyay, A.K., Patra, R., Banerjee, A., Berg, D.E. and Swarnakar, S.** (2006) Cag pathogenicity island-independent up-regulation of matrix metalloproteinases-9 and -2 secretion and expression in mice by *Helicobacter pylori* infection. *J Biol Chem*, **281**, 34651-34662.
- Kusugami, K., Ando, T., Imada, A., Ina, K., Ohsuga, M., Shimizu, T., Sakai, T., Konagaya, T. and Kaneko, H.** (1999) Mucosal macrophage inflammatory protein-1alpha activity in *Helicobacter pylori* infection. *J Gastroenterol Hepatol*, **14**, 20-26.
- Kuznetsov, S.A., Krebsbach, P.H., Satomura, K., Kerr, J., Riminucci, M., Benayahu, D. and Robey, P.G.** (1997) Single-colony derived strains of human marrow stromal fibroblasts form bone after transplantation *in vivo*. *J Bone Miner Res*, **12**, 1335-1347.
- Kuznetsov, S.A., Mankani, M.H., Gronthos, S., Satomura, K., Bianco, P. and Robey, P.G.** (2001) Circulating skeletal stem cells. *J Cell Biol*, **153**, 1133-1140.
- Kwok, T., Backert, S., Schwarz, H., Berger, J. and Meyer, T.F.** (2002) Specific entry of *Helicobacter pylori* into cultured gastric epithelial cells via a zipper-like mechanism. *Infect Immun*, **70**, 2108-2120.
- Kwok, T., Zabler, D., Urman, S., Rohde, M., Hartig, R., Wessler, S., Misselwitz, R., Berger, J., Sewald, N., Konig, W. and Backert, S.** (2007) *Helicobacter* exploits integrin for type IV secretion and kinase activation. *Nature*, **449**, 862-866.
- Kyriakou, C.A., Yong, K.L., Benjamin, R., Pizzey, A., Dogan, A., Singh, N., Davidoff, A.M. and Nathwani, A.C.** (2006) Human mesenchymal stem cells (hMSCs) expressing truncated soluble vascular endothelial growth factor receptor (tsFlk-1) following lentiviral-mediated gene transfer inhibit growth of Burkitt's lymphoma in a murine model. *J Gene Med*, **8**, 253-264.
- LaBarge, M.A. and Blau, H.M.** (2002) Biological progression from adult bone marrow to mononucleate muscle stem cell to multinucleate muscle fiber in response to injury. *Cell*, **111**, 589-601.
- Labigne, A. and De Reuse, H.** (1996) Determinants of *Helicobacter pylori* pathogenicity. *Infect Agents Dis*, **5**, 191-202.

- Laco, F., Kun, M., Weber, H.J., Ramakrishna, S. and Chan, C.K.** (2009) The dose effect of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells on epidermal development in organotypic co-culture. *J Dermatol Sci*, **55**, 150-160.
- Lamouliatte, H., Cayla, R. and Regland, F.** (1993) Amoxicillin-clarithromycin-omeprazole: the best therapy for *Helicobacter pylori* infection. *Acta Gastroenterol Belg*, **56**:A139.
- Lauren, P.** (1965) The Two Histological Main Types of Gastric Carcinoma: Diffuse and So-Called Intestinal-Type Carcinoma. an Attempt at a Histo-Clinical Classification. *Acta Pathol Microbiol Scand*, **64**, 31-49.
- Lawson, D.A., Xin, L., Lukacs, R., Xu, Q., Cheng, D. and Witte, O.N.** (2005) Prostate stem cells and prostate cancer. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **70**, 187-196.
- Lax, A.J. and Grigoriadis, A.E.** (2001) Pasteurella multocida toxin: the mitogenic toxin that stimulates signalling cascades to regulate growth and differentiation. *Int J Med Microbiol*, **291**, 261-268.
- Lazarus, H.M., Haynesworth, S.E., Gerson, S.L. and Caplan, A.I.** (1997) Human bone marrow-derived mesenchymal (stromal) progenitor cells (MPCs) cannot be recovered from peripheral blood progenitor cell collections. *J Hematother*, **6**, 447-455.
- Lazennec, G. and Jorgensen, C.** (2008) Concise review: adult multipotent stromal cells and cancer: risk or benefit? *Stem Cells*, **26**, 1387-1394.
- Le Blanc, K., Rasmusson, I., Gotherstrom, C., Seidel, C., Sundberg, B., Sundin, M., Rosendahl, K., Tammik, C. and Ringden, O.** (2004a) Mesenchymal stem cells inhibit the expression of CD25 (interleukin-2 receptor) and CD38 on phytohaemagglutinin-activated lymphocytes. *Scand J Immunol*, **60**, 307-315.
- Le Blanc, K., Rasmusson, I., Sundberg, B., Gotherstrom, C., Hassan, M., Uzunel, M. and Ringden, O.** (2004b) Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet*, **363**, 1439-1441.
- Le Blanc, K., Tammik, C., Rosendahl, K., Zetterberg, E. and Ringden, O.** (2003a) HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Exp Hematol*, **31**, 890-896.
- Le Blanc, K., Tammik, L., Sundberg, B., Haynesworth, S.E. and Ringden, O.** (2003b) Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex. *Scand J Immunol*, **57**, 11-20.
- Lee, A.** (1999) Animal models of Helicobacter infection. *Mol Med Today*, **5**, 500-501.
- Lee, S.K., Stack, A., Katzowitsch, E., Aizawa, S.I., Suerbaum, S. and Josenhans, C.** (2003) *Helicobacter pylori* flagellins have very low intrinsic activity to stimulate human gastric epithelial cells via TLR5. *Microbes Infect*, **5**, 1345-1356.
- Lehours, P., Dupouy, S., Chaineux, J., Ruskone-Fourmestreaux, A., Delchier, J.C., Morgner, A., Megraud, F. and Menard, A.** (2007) Genetic diversity of the HpyC11 restriction modification system in *Helicobacter pylori*. *Res Microbiol*, **158**, 265-271.
- Lehours, P. and Yilmaz, O.** (2007) Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*, **12 Suppl 1**, 1-3.
- Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J.M. and Hoffmann, J.A.** (1996) The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*, **86**, 973-983.
- Leonard, E.J. and Yoshimura, T.** (1990) Human monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). *Immunol Today*, **11**, 97-101.

- Li, C., Heidt, D.G., Dalerba, P., Burant, C.F., Zhang, L., Adsay, V., Wicha, M., Clarke, M.F. and Simeone, D.M.** (2007a) Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res*, **67**, 1030-1037.
- Li, H., Fan, X., Kovi, R.C., Jo, Y., Moquin, B., Konz, R., Stoicov, C., Kurt-Jones, E., Grossman, S.R., Lyle, S., Rogers, A.B., Montrose, M. and Houghton, J.** (2007b) Spontaneous expression of embryonic factors and p53 point mutations in aged mesenchymal stem cells: a model of age-related tumorigenesis in mice. *Cancer Res*, **67**, 10889-10898.
- Li, H., Kalies, I., Mellgard, B. and Helander, H.F.** (1998) A rat model of chronic *Helicobacter pylori* infection. Studies of epithelial cell turnover and gastric ulcer healing. *Scand J Gastroenterol*, **33**, 370-378.
- Li, H., Mellgard, B. and Helander, H.F.** (1997) Inoculation of VacA- and CagA-*Helicobacter pylori* delays gastric ulcer healing in the rat. *Scand J Gastroenterol*, **32**, 439-444.
- Li, Y., Yu, X., Lin, S., Li, X., Zhang, S. and Song, Y.H.** (2007c) Insulin-like growth factor 1 enhances the migratory capacity of mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **356**, 780-784.
- Liang, T.J., Rehermann, B., Seeff, L.B. and Hoofnagle, J.H.** (2000) Pathogenesis, natural history, treatment, and prevention of hepatitis C. *Ann Intern Med*, **132**, 296-305.
- Lin, S.Y., Yang, J., Everett, A.D., Clevenger, C.V., Koneru, M., Mishra, P.J., Kamen, B., Banerjee, D. and Glod, J.** (2008) The isolation of novel mesenchymal stromal cell chemotactic factors from the conditioned medium of tumor cells. *Exp Cell Res*.
- Ling, L., Nurcombe, V. and Cool, S.M.** (2009) Wnt signaling controls the fate of mesenchymal stem cells. *Gene*, **433**, 1-7.
- Lingle, W.L., Lutz, W.H., Ingle, J.N., Maihle, N.J. and Salisbury, J.L.** (1998) Centrosome hypertrophy in human breast tumors: implications for genomic stability and cell polarity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 2950-2955.
- Linz, B., Balloux, F., Moodley, Y., Manica, A., Liu, H., Roumagnac, P., Falush, D., Stamer, C., Prugnolle, F., van der Merwe, S.W., Yamaoka, Y., Graham, D.Y., Perez-Trallero, E., Wadstrom, T., Suerbaum, S. and Achtman, M.** (2007) An African origin for the intimate association between humans and *Helicobacter pylori*. *Nature*, **445**, 915-918.
- Liotta, F., Angeli, R., Cosmi, L., Fili, L., Manuelli, C., Frosali, F., Mazzinghi, B., Maggi, L., Pasini, A., Lisi, V., Santarlasci, V., Consoloni, L., Angelotti, M.L., Romagnani, P., Parronchi, P., Krampera, M., Maggi, E., Romagnani, S. and Annunziato, F.** (2008) Toll-like receptors 3 and 4 are expressed by human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and can inhibit their T-cell modulatory activity by impairing Notch signaling. *Stem Cells*, **26**, 279-289.
- Liu, C. and Russell, R.M.** (2008) Nutrition and gastric cancer risk: an update. *Nutr Rev*, **66**, 237-249.
- Liu, J., Lu, X.F., Wan, L., Li, Y.P., Li, S.F., Zeng, L.Y., Zeng, Y.Z., Cheng, L.H., Lu, Y.R. and Cheng, J.Q.** (2004) Suppression of human peripheral blood lymphocyte proliferation by immortalized mesenchymal stem cells derived from bone marrow of Banna Minipig inbred-line. *Transplant Proc*, **36**, 3272-3275.
- Lochhead, P. and El-Omar, E.M.** (2007) *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, **21**, 281-297.
- Lochhead, P. and El-Omar, E.M.** (2008) Gastric cancer. *Br Med Bull*, **85**, 87-100.
- Logan, C.Y. and Nusse, R.** (2004) The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **20**, 781-810.

- Lu, H., Wu, J.Y., Beswick, E.J., Ohno, T., Odenbreit, S., Haas, R., Reyes, V.E., Kita, M., Graham, D.Y. and Yamaoka, Y.** (2007) Functional and intracellular signaling differences associated with the *Helicobacter pylori* AlpAB adhesin from Western and East Asian strains. *J Biol Chem*, **282**, 6242-6254.
- Lukacs, N.W., Kunkel, S.L., Allen, R., Evanoff, H.L., Shaklee, C.L., Sherman, J.S., Burdick, M.D. and Strieter, R.M.** (1995) Stimulus and cell-specific expression of C-X-C and C-C chemokines by pulmonary stromal cell populations. *Am J Physiol*, **268**, L856-861.
- Luria, E.A., Owen, M.E., Friedenstein, A.J., Morris, J.F. and Kuznetsow, S.A.** (1987) Bone formation in organ cultures of bone marrow. *Cell Tissue Res*, **248**, 449-454.
- Lynch, D.A., Mapstone, N.P., Clarke, A.M., Sobala, G.M., Jackson, P., Morrison, L., Dixon, M.F., Quirke, P. and Axon, A.T.** (1995) Cell proliferation in *Helicobacter pylori* associated gastritis and the effect of eradication therapy. *Gut*, **36**, 346-350.
- Lysy, P.A., Campard, D., Smets, F., Malaise, J., Mourad, M., Najimi, M. and Sokal, E.M.** (2008) Persistence of a chimerical phenotype after hepatocyte differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Cell Prolif*, **41**, 36-58.
- Ma, K., Laco, F., Ramakrishna, S., Liao, S. and Chan, C.K.** (2009) Differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells into multi-layered epidermis-like cells in 3D organotypic coculture. *Biomaterials*, **30**, 3251-3258.
- Ma, S., Lee, T.K., Zheng, B.J., Chan, K.W. and Guan, X.Y.** (2008) CD133+ HCC cancer stem cells confer chemoresistance by preferential expression of the Akt/PKB survival pathway. *Oncogene*, **27**, 1749-1758.
- Maccario, R., Podesta, M., Moretta, A., Cometa, A., Comoli, P., Montagna, D., Daudt, L., Ibatci, A., Piaggio, G., Pozzi, S., Frassoni, F. and Locatelli, F.** (2005) Interaction of human mesenchymal stem cells with cells involved in alloantigen-specific immune response favors the differentiation of CD4+ T-cell subsets expressing a regulatory/suppressive phenotype. *Haematologica*, **90**, 516-525.
- Mackay, A.M., Beck, S.C., Murphy, J.M., Barry, F.P., Chichester, C.O. and Pittenger, M.F.** (1998) Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from marrow. *Tissue Eng*, **4**, 415-428.
- Maeda, S., Ogura, K., Yoshida, H., Kanai, F., Ikenoue, T., Kato, N., Shiratori, Y. and Omata, M.** (1998) Major virulence factors, VacA and CagA, are commonly positive in *Helicobacter pylori* isolates in Japan. *Gut*, **42**, 338-343.
- Maestroni, G.J., Hertens, E. and Galli, P.** (1999) Factor(s) from nonmacrophage bone marrow stromal cells inhibit Lewis lung carcinoma and B16 melanoma growth in mice. *Cell Mol Life Sci*, **55**, 663-667.
- Mahdavi, J., Sonden, B., Hurtig, M., Olfat, F.O., Forsberg, L., Roche, N., Angstrom, J., Larsson, T., Teneberg, S., Karlsson, K.A., Altraja, S., Wadstrom, T., Kersulyte, D., Berg, D.E., Dubois, A., Petersson, C., Magnusson, K.E., Norberg, T., Lindh, F., Lundskog, B.B., Arnqvist, A., Hammarstrom, L. and Boren, T.** (2002) *Helicobacter pylori* SabA adhesin in persistent infection and chronic inflammation. *Science*, **297**, 573-578.
- Maitra, B., Szekely, E., Gjini, K., Laughlin, M.J., Dennis, J., Haynesworth, S.E. and Koc, O.N.** (2004) Human mesenchymal stem cells support unrelated donor hematopoietic stem cells and suppress T-cell activation. *Bone Marrow Transplant*, **33**, 597-604.
- Malfertheiner, P., Megraud, F., O'Morain, C., Bazzoli, F., El-Omar, E., Graham, D., Hunt, R., Rokkas, T., Vakil, N. and Kuipers, E.J.** (2007) Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection: the Maastricht III Consensus Report. *Gut*, **56**, 772-781.

- Manente, L., Perna, A., Buommino, E., Altucci, L., Lucariello, A., Citro, G., Baldi, A., Iaquinto, G., Tufano, M.A. and De Luca, A.** (2008) The *Helicobacter pylori*'s protein VacA has direct effects on the regulation of cell cycle and apoptosis in gastric epithelial cells. *J Cell Physiol*, **214**, 582-587.
- Mani, S.A., Guo, W., Liao, M.J., Eaton, E.N., Ayyanan, A., Zhou, A.Y., Brooks, M., Reinhard, F., Zhang, C.C., Shipitsin, M., Campbell, L.L., Polyak, K., Brisken, C., Yang, J. and Weinberg, R.A.** (2008) The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell*, **133**, 704-715.
- Mannick, E.E., Bravo, L.E., Zarama, G., Realpe, J.L., Zhang, X.J., Ruiz, B., Fontham, E.T., Mera, R., Miller, M.J. and Correa, P.** (1996) Inducible nitric oxide synthase, nitrotyrosine, and apoptosis in *Helicobacter pylori* gastritis: effect of antibiotics and antioxidants. *Cancer Res*, **56**, 3238-3243.
- Mansilla, E., Marin, G.H., Drago, H., Sturla, F., Salas, E., Gardiner, C., Bossi, S., Lamonega, R., Guzman, A., Nunez, A., Gil, M.A., Piccinelli, G., Ibar, R. and Soratti, C.** (2006) Bloodstream cells phenotypically identical to human mesenchymal bone marrow stem cells circulate in large amounts under the influence of acute large skin damage: new evidence for their use in regenerative medicine. *Transplant Proc*, **38**, 967-969.
- Mantovani, A.** (2009) Cancer: Inflaming metastasis. *Nature*, **457**, 36-37.
- Mantovani, A., Gray, P.A., Van Damme, J. and Sozzani, S.** (2000) Macrophage-derived chemokine (MDC). *J Leukoc Biol*, **68**, 400-404.
- Marais, A., Mendz, G.L., Hazell, S.L. and Megraud, F.** (1999) Metabolism and genetics of *Helicobacter pylori*: the genome era. *Microbiol Mol Biol Rev*, **63**, 642-674.
- Marchetti, M., Arico, B., Burrioni, D., Figura, N., Rappuoli, R. and Ghiara, P.** (1995) Development of a mouse model of *Helicobacter pylori* infection that mimics human disease. *Science*, **267**, 1655-1658.
- Marcos, L.A., Terashima, A. and Gotuzzo, E.** (2008) Update on hepatobiliary flukes: fascioliasis, opisthorchiasis and clonorchiasis. *Curr Opin Infect Dis*, **21**, 523-530.
- Markowitz, L.E., Dunne, E.F., Saraiya, M., Lawson, H.W., Chesson, H. and Unger, E.R.** (2007) Quadrivalent Human Papillomavirus Vaccine: Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Recomm Rep*, **56**, 1-24.
- Marshall, B.J., Barrett, L.J., Prakash, C., McCallum, R.W. and Guerrant, R.L.** (1990) Urea protects *Helicobacter (Campylobacter) pylori* from the bactericidal effect of acid. *Gastroenterology*, **99**, 697-702.
- Marshall, B.J. and Warren, J.R.** (1984) Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet*, **1**, 1311-1315.
- Martin, D.R., Cox, N.R., Hathcock, T.L., Niemeyer, G.P. and Baker, H.J.** (2002) Isolation and characterization of multipotential mesenchymal stem cells from feline bone marrow. *Exp Hematol*, **30**, 879-886.
- Martin, J.H., Potthoff, A., Ledig, S., Cornberg, M., Jandl, O., Manns, M.P., Kubicka, S., Flemming, P., Athmann, C., Beil, W. and Wagner, S.** (2004) Effect of *H. pylori* on the expression of TRAIL, FasL and their receptor subtypes in human gastric epithelial cells and their role in apoptosis. *Helicobacter*, **9**, 371-386.
- Matsui, W., Huff, C.A., Wang, Q., Malehorn, M.T., Barber, J., Tanhehco, Y., Smith, B.D., Civin, C.I. and Jones, R.J.** (2004) Characterization of clonogenic multiple myeloma cells. *Blood*, **103**, 2332-2336.
- Matsuoka, M. and Jeang, K.T.** (2007) Human T-cell leukaemia virus type 1 (HTLV-1) infectivity and cellular transformation. *Nat Rev Cancer*, **7**, 270-280.

- McClain, M.S., Shaffer, C.L., Israel, D.A., Peek, R.M., Jr. and Cover, T.L.** (2009) Genome sequence analysis of *Helicobacter pylori* strains associated with gastric ulceration and gastric cancer. *BMC Genomics*, **10**, 3.
- McMichael, A.J., McCall, M.G., Hartshorne, J.M. and Woodings, T.L.** (1980) Patterns of gastro-intestinal cancer in European migrants to Australia: the role of dietary change. *Int J Cancer*, **25**, 431-437.
- Megraud, F.** (2005) A humble bacterium sweeps this year's Nobel Prize. *Cell*, **123**, 975-976.
- Megraud, F., Bonnet, F., Garnier, M. and Lamouliatte, H.** (1985) Characterization of "*Campylobacter pyloridis*" by culture, enzymatic profile, and protein content. *J Clin Microbiol*, **22**, 1007-1010.
- Megraud, F., Brassens-Rabbe, M.P., Denis, F., Belbouri, A. and Hoa, D.Q.** (1989) Seroepidemiology of *Campylobacter pylori* infection in various populations. *J Clin Microbiol*, **27**, 1870-1873.
- Megraud, F. and Broutet, N.** (2000) [Epidemiology, acquisition and transmission of *Helicobacter pylori*]. *Rev Prat*, **50**, 1414-1417.
- Mellado, M., Rodriguez-Frade, J.M., Manes, S. and Martinez, A.C.** (2001) Chemokine signaling and functional responses: the role of receptor dimerization and TK pathway activation. *Annu Rev Immunol*, **19**, 397-421.
- Menten, P., Wuyts, A. and Van Damme, J.** (2002) Macrophage inflammatory protein-1. *Cytokine Growth Factor Rev*, **13**, 455-481.
- Metcalfe, D.** (2003) The unsolved enigmas of leukemia inhibitory factor. *Stem Cells*, **21**, 5-14.
- Mezey, E., Chandross, K.J., Harta, G., Maki, R.A. and McKecher, S.R.** (2000) Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated *in vivo* from bone marrow. *Science*, **290**, 1779-1782.
- Milas, L. and Hittelman, W.N.** (2009) Cancer stem cells and tumor response to therapy: current problems and future prospects. *Semin Radiat Oncol*, **19**, 96-105.
- Mishima, Y. and Lotz, M.** (2008) Chemotaxis of human articular chondrocytes and mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*.
- Miura, M., Miura, Y., Padilla-Nash, H.M., Molinolo, A.A., Fu, B., Patel, V., Seo, B.M., Sonoyama, W., Zheng, J.J., Baker, C.C., Chen, W., Ried, T. and Shi, S.** (2006) Accumulated chromosomal instability in murine bone marrow mesenchymal stem cells leads to malignant transformation. *Stem Cells*, **24**, 1095-1103.
- Miyamoto, Y. and Kim, S.U.** (1999) Cytokine-induced production of macrophage inflammatory protein-1 α (MIP-1 α) in cultured human astrocytes. *J Neurosci Res*, **55**, 245-251.
- Miyasaka, M. and Tanaka, T.** (2004) Lymphocyte trafficking across high endothelial venules: dogmas and enigmas. *Nat Rev Immunol*, **4**, 360-370.
- Mo, I.F., Yip, K.H., Chan, W.K., Law, H.K., Lau, Y.L. and Chan, G.C.** (2008) Prolonged exposure to bacterial toxins downregulated expression of toll-like receptors in mesenchymal stromal cell-derived osteoprogenitors. *BMC Cell Biol*, **9**, 52.
- Mobley, H.L., Island, M.D. and Hausinger, R.P.** (1995) Molecular biology of microbial ureases. *Microbiol Rev*, **59**, 451-480.
- Monzani, E., Facchetti, F., Galmozzi, E., Corsini, E., Benetti, A., Cavazzin, C., Gritti, A., Piccinini, A., Porro, D., Santinami, M., Invernici, G., Parati, E., Alessandri, G. and La Porta, C.A.** (2007) Melanoma contains CD133 and ABCG2 positive cells with enhanced tumorigenic potential. *Eur J Cancer*, **43**, 935-946.
- Moran, A.P.** (1999) *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide-mediated gastric and extragastric pathology. *J Physiol Pharmacol*, **50**, 787-805.

- Mori, N., Ueda, A., Geleziunas, R., Wada, A., Hirayama, T., Yoshimura, T. and Yamamoto, N.** (2001) Induction of monocyte chemoattractant protein 1 by *Helicobacter pylori* involves NF-kappaB. *Infect Immun*, **69**, 1280-1286.
- Morrison, S.J., Prowse, K.R., Ho, P. and Weissman, I.L.** (1996) Telomerase activity in hematopoietic cells is associated with self-renewal potential. *Immunity*, **5**, 207-216.
- Moss, S.F.** (1998) Review article: Cellular markers in the gastric precancerous process. *Aliment Pharmacol Ther*, **12 Suppl 1**, 91-109.
- Munoz, N. and Franceschi, S.** (1997) Epidemiology of gastric cancer and perspectives for prevention. *Salud Publica Mex*, **39**, 318-330.
- Muraglia, A., Cancedda, R. and Quarto, R.** (2000) Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate *in vitro* according to a hierarchical model. *J Cell Sci*, **113 (Pt 7)**, 1161-1166.
- Murata-Kamiya, N., Kurashima, Y., Teishikata, Y., Yamahashi, Y., Saito, Y., Higashi, H., Aburatani, H., Akiyama, T., Peek, R.M., Jr., Azuma, T. and Hatakeyama, M.** (2007) *Helicobacter pylori* CagA interacts with E-cadherin and deregulates the beta-catenin signal that promotes intestinal transdifferentiation in gastric epithelial cells. *Oncogene*, **26**, 4617-4626.
- Nadri, S. and Soleimani, M.** (2007) Comparative analysis of mesenchymal stromal cells from murine bone marrow and amniotic fluid. *Cytotherapy*, 1-9.
- Nakamura, H., Yoshiyama, H., Takeuchi, H., Mizote, T., Okita, K. and Nakazawa, T.** (1998) Urease plays an important role in the chemotactic motility of *Helicobacter pylori* in a viscous environment. *Infect Immun*, **66**, 4832-4837.
- Nakayama, M., Hisatsune, J., Yamasaki, E., Nishi, Y., Wada, A., Kurazono, H., Sap, J., Yahiro, K., Moss, J. and Hirayama, T.** (2006) Clustering of *Helicobacter pylori* VacA in lipid rafts, mediated by its receptor, receptor-like protein tyrosine phosphatase beta, is required for intoxication in AZ-521 Cells. *Infect Immun*, **74**, 6571-6580.
- Nardone, G.** (2003) Review article: molecular basis of gastric carcinogenesis. *Aliment Pharmacol Ther*, **17 Suppl 2**, 75-81.
- Natalwala, A., Spychal, R. and Tselepis, C.** (2008) Epithelial-mesenchymal transition mediated tumorigenesis in the gastrointestinal tract. *World J Gastroenterol*, **14**, 3792-3797.
- Naumann, M.** (2000) Nuclear factor-kappa B activation and innate immune response in microbial pathogen infection. *Biochem Pharmacol*, **60**, 1109-1114.
- Nauta, A.J., Kruisselbrink, A.B., Lurvink, E., Willemze, R. and Fibbe, W.E.** (2006) Mesenchymal stem cells inhibit generation and function of both CD34+-derived and monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol*, **177**, 2080-2087.
- Nedrud, J.G.** (1999) Animal models for gastric *Helicobacter* immunology and vaccine studies. *FEMS Immunol Med Microbiol*, **24**, 243-250.
- Newman, J.V., Kosaka, T., Sheppard, B.J., Fox, J.G. and Schauer, D.B.** (2001) Bacterial infection promotes colon tumorigenesis in Apc(Min/+) mice. *J Infect Dis*, **184**, 227-230.
- Ng, W.W., Lam, C.P., Chau, W.K., Fen-Yau Li, A., Huang, C.C., Chang, F.Y. and Lee, S.D.** (2000) Regression of high-grade gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma with *Helicobacter pylori* after triple antibiotic therapy. *Gastrointest Endosc*, **51**, 93-96.
- Nguyen, L.T., Uchida, T., Murakami, K., Fujioka, T. and Moriyama, M.** (2008) *Helicobacter pylori* virulence and the diversity of gastric cancer in Asia. *J Med Microbiol*, **57**, 1445-1453.

- Nishikawa, K., Nakamura, M., Takahashi, S., Matsui, H., Murayama, S.Y., Matsumoto, T., Yamada, H. and Tsuchimoto, K.** (2007) Increased apoptosis and angiogenesis in gastric low-grade mucosa-associated lymphoid tissue-type lymphoma by *Helicobacter heilmannii* infection in C57/BL6 mice. *FEMS Immunol Med Microbiol*, **50**, 268-272.
- Nurnberger, W., Platonov, A., Stannigel, H., Beloborodov, V.B., Michelmann, I., von Kries, R., Burdach, S. and Gobel, U.** (1995) Definition of a new score for severity of generalized Neisseria meningitidis infection. *Eur J Pediatr*, **154**, 896-900.
- O'Brien, C.A., Pollett, A., Gallinger, S. and Dick, J.E.** (2007) A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature*, **445**, 106-110.
- O'Donoghue, K. and Chan, J.** (2006) Human fetal mesenchymal stem cells. *Curr Stem Cell Res Ther*, **1**, 371-386.
- Odenbreit, S., Faller, G. and Haas, R.** (2002) Role of the alpAB proteins and lipopolysaccharide in adhesion of *Helicobacter pylori* to human gastric tissue. *Int J Med Microbiol*, **292**, 247-256.
- Odenbreit, S., Puls, J., Sedlmaier, B., Gerland, E., Fischer, W. and Haas, R.** (2000) Translocation of *Helicobacter pylori* CagA into gastric epithelial cells by type IV secretion. *Science*, **287**, 1497-1500.
- Ogle, B.M., Cascalho, M. and Platt, J.L.** (2005) Biological implications of cell fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **6**, 567-575.
- Ogura, K., Hirata, Y., Yanai, A., Shibata, W., Ohmae, T., Mitsuno, Y., Maeda, S., Watabe, H., Yamaji, Y., Okamoto, M., Yoshida, H., Kawabe, T. and Omata, M.** (2008) The effect of *Helicobacter pylori* eradication on reducing the incidence of gastric cancer. *J Clin Gastroenterol*, **42**, 279-283.
- Oh, J.D., Kling-Backhed, H., Giannakis, M., Xu, J., Fulton, R.S., Fulton, L.A., Cordum, H.S., Wang, C., Elliott, G., Edwards, J., Mardis, E.R., Engstrand, L.G. and Gordon, J.I.** (2006) The complete genome sequence of a chronic atrophic gastritis *Helicobacter pylori* strain: evolution during disease progression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 9999-10004.
- Ohlsson, L.B., Varas, L., Kjellman, C., Edvardsen, K. and Lindvall, M.** (2003) Mesenchymal progenitor cell-mediated inhibition of tumor growth *in vivo* and *in vitro* in gelatin matrix. *Exp Mol Pathol*, **75**, 248-255.
- Ohnishi, N., Yuasa, H., Tanaka, S., Sawa, H., Miura, M., Matsui, A., Higashi, H., Musashi, M., Iwabuchi, K., Suzuki, M., Yamada, G., Azuma, T. and Hatakeyama, M.** (2008) Transgenic expression of *Helicobacter pylori* CagA induces gastrointestinal and hematopoietic neoplasms in mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, 1003-1008.
- Okamoto, R. and Watanabe, M.** (2004) Molecular and clinical basis for the regeneration of human gastrointestinal epithelia. *J Gastroenterol*, **39**, 1-6.
- Okamoto, R., Yajima, T., Yamazaki, M., Kanai, T., Mukai, M., Okamoto, S., Ikeda, Y., Hibi, T., Inazawa, J. and Watanabe, M.** (2002) Damaged epithelia regenerated by bone marrow-derived cells in the human gastrointestinal tract. *Nat Med*, **8**, 1011-1017.
- Okoli, A.S., Menard, A. and Mendz, G.L.** (2009) *Helicobacter* spp. other than *Helicobacter pylori*. *Helicobacter*, **14 Suppl 1**, 69-74.
- Oldani, A., Cormont, M., Hofman, V., Chiozzi, V., Oregioni, O., Canonici, A., Sciullo, A., Sommi, P., Fabbri, A., Ricci, V. and Boquet, P.** (2009) *Helicobacter pylori* counteracts the apoptotic action of its VacA toxin by injecting the CagA protein into gastric epithelial cells. *PLoS Pathog*, **5**, e1000603.

- Oleastro, M., Cordeiro, R., Ferrand, J., Nunes, B., Lehours, P., Carvalho-Oliveira, I., Mendes, A.I., Penque, D., Monteiro, L., Megraud, F. and Menard, A.** (2008) Evaluation of the clinical significance of homB, a novel candidate marker of *Helicobacter pylori* strains associated with peptic ulcer disease. *J Infect Dis*, **198**, 1379-1387.
- Oleastro, M., Gerhard, M., Lopes, A.I., Ramalho, P., Cabral, J., Sousa Guerreiro, A. and Monteiro, L.** (2003) *Helicobacter pylori* virulence genotypes in Portuguese children and adults with gastroduodenal pathology. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, **22**, 85-91.
- Olivares, D., Gisbert, J.P. and Pajares, J.M.** (2005) *Helicobacter pylori* infection and gastric mucosal epithelial cell apoptosis. *Rev Esp Enferm Dig*, **97**, 505-520.
- Opitz, C.A., Litzenger, U.M., Lutz, C., Lanz, T.V., Tritschler, I., Koppel, A., Tolosa, E., Hoberg, M., Anderl, J., Aicher, W.K., Weller, M., Wick, W. and Platten, M.** (2009) Toll-like receptor engagement enhances the immunosuppressive properties of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells by inducing indoleamine-2,3-dioxygenase-1 via interferon-beta and protein kinase R. *Stem Cells*, **27**, 909-919.
- Owen, M. and Friedenstein, A.J.** (1988) Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors. *Ciba Found Symp*, **136**, 42-60.
- Owen, R.J.** (1995) Bacteriology of *Helicobacter pylori*. *Baillieres Clin Gastroenterol*, **9**, 415-446.
- Ozaki, Y., Nishimura, M., Sekiya, K., Suehiro, F., Kanawa, M., Nikawa, H., Hamada, T. and Kato, Y.** (2007) Comprehensive analysis of chemotactic factors for bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev*, **16**, 119-129.
- Pagliaccia, C., de Bernard, M., Lupetti, P., Ji, X., Burroni, D., Cover, T.L., Papini, E., Rappuoli, R., Telford, J.L. and Reyrat, J.M.** (1998) The m2 form of the *Helicobacter pylori* cytotoxin has cell type-specific vacuolating activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 10212-10217.
- Pak, H.N., Qayyum, M., Kim, D.T., Hamabe, A., Miyauchi, Y., Lill, M.C., Frantzen, M., Takizawa, K., Chen, L.S., Fishbein, M.C., Sharifi, B.G., Chen, P.S. and Makkar, R.** (2003) Mesenchymal stem cell injection induces cardiac nerve sprouting and increased tenascin expression in a Swine model of myocardial infarction. *J Cardiovasc Electrophysiol*, **14**, 841-848.
- Pandey, M.** (2007) *Helicobacter* species are associated with possible increase in risk of biliary lithiasis and benign biliary diseases. *World J Surg Oncol*, **5**, 94.
- Parkin, D.M.** (2006) The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. *Int J Cancer*, **118**, 3030-3044.
- Parkin, D.M., Bray, F., Ferlay, J. and Pisani, P.** (2005) Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin*, **55**, 74-108.
- Parris, G.E.** (2005) Clinically significant cancer evolves from transient mutated and/or aneuploid neoplasia by cell fusion to form unstable syncytia that give rise to ecologically viable parasite species. *Med Hypotheses*, **65**, 846-850.
- Parsonnet, J., Hansen, S., Rodriguez, L., Gelb, A.B., Warnke, R.A., Jellum, E., Orentreich, N., Vogelman, J.H. and Friedman, G.D.** (1994) *Helicobacter pylori* infection and gastric lymphoma. *N Engl J Med*, **330**, 1267-1271.
- Patrawala, L., Calhoun, T., Schneider-Broussard, R., Li, H., Bhatia, B., Tang, S., Reilly, J.G., Chandra, D., Zhou, J., Claypool, K., Coghlan, L. and Tang, D.G.** (2006) Highly purified CD44+ prostate cancer cells from xenograft human tumors are enriched in tumorigenic and metastatic progenitor cells. *Oncogene*, **25**, 1696-1708.
- Pattis, I., Weiss, E., Laugks, R., Haas, R. and Fischer, W.** (2007) The *Helicobacter pylori* CagF protein is a type IV secretion chaperone-like molecule that binds close to the

- C-terminal secretion signal of the CagA effector protein. *Microbiology*, **153**, 2896-2909.
- Paunescu, V., Deak, E., Herman, D., Siska, I.R., Tanasie, G., Bunu, C., Anghel, S., Tatu, C.A., Oprea, T.I., Henschler, R., Ruster, B., Bistriean, R. and Seifried, E.** (2007) *In vitro* differentiation of human mesenchymal stem cells to epithelial lineage. *J Cell Mol Med*, **11**, 502-508.
- Pawelek, J.M. and Chakraborty, A.K.** (2008) The cancer cell--leukocyte fusion theory of metastasis. *Adv Cancer Res*, **101**, 397-444.
- Peek, R.M., Jr.** (2005) Orchestration of aberrant epithelial signaling by *Helicobacter pylori* CagA. *Sci STKE*, **2005**, pe14.
- Peek, R.M., Jr. and Blaser, M.J.** (2002) *Helicobacter pylori* and gastrointestinal tract adenocarcinomas. *Nat Rev Cancer*, **2**, 28-37.
- Peek, R.M., Jr., Blaser, M.J., Mays, D.J., Forsyth, M.H., Cover, T.L., Song, S.Y., Krishna, U. and Pietenpol, J.A.** (1999) *Helicobacter pylori* strain-specific genotypes and modulation of the gastric epithelial cell cycle. *Cancer Res*, **59**, 6124-6131.
- Peek, R.M., Jr., Miller, G.G., Tham, K.T., Perez-Perez, G.I., Zhao, X., Atherton, J.C. and Blaser, M.J.** (1995) Heightened inflammatory response and cytokine expression *in vivo* to cagA+ *Helicobacter pylori* strains. *Lab Invest*, **73**, 760-770.
- Peek, R.M., Jr., Moss, S.F., Tham, K.T., Perez-Perez, G.I., Wang, S., Miller, G.G., Atherton, J.C., Holt, P.R. and Blaser, M.J.** (1997) *Helicobacter pylori* cagA+ strains and dissociation of gastric epithelial cell proliferation from apoptosis. *J Natl Cancer Inst*, **89**, 863-868.
- Petersen, B.E., Bowen, W.C., Patrene, K.D., Mars, W.M., Sullivan, A.K., Murase, N., Boggs, S.S., Greenberger, J.S. and Goff, J.P.** (1999) Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science*, **284**, 1168-1170.
- Pevsner-Fischer, M., Morad, V., Cohen-Sfady, M., Rouso-Noori, L., Zanin-Zhorov, A., Cohen, S., Cohen, I.R. and Zipori, D.** (2007) Toll-like receptors and their ligands control mesenchymal stem cell functions. *Blood*, **109**, 1422-1432.
- Phinney, D.G., Kopen, G., Isaacson, R.L. and Prockop, D.J.** (1999) Plastic adherent stromal cells from the bone marrow of commonly used strains of inbred mice: variations in yield, growth, and differentiation. *J Cell Biochem*, **72**, 570-585.
- Piotrowski, J., Piotrowski, E., Skrodzka, D., Slomiany, A. and Slomiany, B.L.** (1997) Induction of acute gastritis and epithelial apoptosis by *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide. *Scand J Gastroenterol*, **32**, 203-211.
- Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C., Jaiswal, R.K., Douglas, R., Mosca, J.D., Moorman, M.A., Simonetti, D.W., Craig, S. and Marshak, D.R.** (1999) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, **284**, 143-147.
- Plummer, M., Vivas, J., Lopez, G., Bravo, J.C., Peraza, S., Carillo, E., Cano, E., Castro, D., Andrade, O., Sanchez, V., Garcia, R., Buiatti, E., Aebischer, C., Franceschi, S., Oliver, W. and Munoz, N.** (2007) Chemoprevention of precancerous gastric lesions with antioxidant vitamin supplementation: a randomized trial in a high-risk population. *J Natl Cancer Inst*, **99**, 137-146.
- Ponte, A.L., Marais, E., Gallay, N., Langonne, A., Delorme, B., Herault, O., Charbord, P. and Domenech, J.** (2007) The *in vitro* migration capacity of human bone marrow mesenchymal stem cells: comparison of chemokine and growth factor chemotactic activities. *Stem Cells*, **25**, 1737-1745.
- Popov, B.V., Serikov, V.B., Petrov, N.S., Izusova, T.V., Gupta, N. and Matthay, M.A.** (2007) Lung epithelial cells induce endodermal differentiation in mouse

- mesenchymal bone marrow stem cells by paracrine mechanism. *Tissue Eng*, **13**, 2441-2450.
- Pot, R.G., Stoof, J., Nuijten, P.J., de Haan, L.A., Loeffen, P., Kuipers, E.J., van Vliet, A.H. and Kusters, J.G.** (2007) UreA2B2: a second urease system in the gastric pathogen *Helicobacter felis*. *FEMS Immunol Med Microbiol*, **50**, 273-279.
- Potian, J.A., Aviv, H., Ponzio, N.M., Harrison, J.S. and Rameshwar, P.** (2003) Veto-like activity of mesenchymal stem cells: functional discrimination between cellular responses to alloantigens and recall antigens. *J Immunol*, **171**, 3426-3434.
- Poulsom, R., Forbes, S.J., Hodivala-Dilke, K., Ryan, E., Wyles, S., Navaratnarasah, S., Jeffery, R., Hunt, T., Alison, M., Cook, T., Pusey, C. and Wright, N.A.** (2001) Bone marrow contributes to renal parenchymal turnover and regeneration. *J Pathol*, **195**, 229-235.
- Prinz, C., Schoniger, M., Rad, R., Becker, I., Keiditsch, E., Wagenpfeil, S., Classen, M., Rosch, T., Schepp, W. and Gerhard, M.** (2001) Key importance of the *Helicobacter pylori* adherence factor blood group antigen binding adhesin during chronic gastric inflammation. *Cancer Res*, **61**, 1903-1909.
- Prockop, D.J.** (1997) Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science*, **276**, 71-74.
- Proietti, F.A., Carneiro-Proietti, A.B., Catalan-Soares, B.C. and Murphy, E.L.** (2005) Global epidemiology of HTLV-I infection and associated diseases. *Oncogene*, **24**, 6058-6068.
- Purton, L.E., Mielcarek, M. and Torok-Storb, B.** (1998) Monocytes are the likely candidate 'stromal' cell in G-CSF-mobilized peripheral blood. *Bone Marrow Transplant*, **21**, 1075-1076.
- Qian, X., Karpova, T., Sheppard, A.M., McNally, J. and Lowy, D.R.** (2004) E-cadherin-mediated adhesion inhibits ligand-dependent activation of diverse receptor tyrosine kinases. *Embo J*, **23**, 1739-1748.
- Quaini, F., Urbanek, K., Beltrami, A.P., Finato, N., Beltrami, C.A., Nadal-Ginard, B., Kajstura, J., Leri, A. and Anversa, P.** (2002) Chimerism of the transplanted heart. *N Engl J Med*, **346**, 5-15.
- Qualia, C.M., Katzman, P.J., Brown, M.R. and Kooros, K.** (2007) A report of two children with *Helicobacter heilmannii* gastritis and review of the literature. *Pediatr Dev Pathol*, **10**, 391-394.
- Quan, T.E., Cowper, S., Wu, S.P., Bockenstedt, L.K. and Bucala, R.** (2004) Circulating fibrocytes: collagen-secreting cells of the peripheral blood. *Int J Biochem Cell Biol*, **36**, 598-606.
- Quintana, E., Shackleton, M., Sabel, M.S., Fullen, D.R., Johnson, T.M. and Morrison, S.J.** (2008) Efficient tumour formation by single human melanoma cells. *Nature*, **456**, 593-598.
- Rakoff-Nahoum, S., Paglino, J., Eslami-Varzaneh, F., Edberg, S. and Medzhitov, R.** (2004) Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell*, **118**, 229-241.
- Rasmusson, I.** (2006) Immune modulation by mesenchymal stem cells. *Exp Cell Res*, **312**, 2169-2179.
- Rasmusson, I., Ringden, O., Sundberg, B. and Le Blanc, K.** (2003) Mesenchymal stem cells inhibit the formation of cytotoxic T lymphocytes, but not activated cytotoxic T lymphocytes or natural killer cells. *Transplantation*, **76**, 1208-1213.
- Rasmusson, I., Ringden, O., Sundberg, B. and Le Blanc, K.** (2005) Mesenchymal stem cells inhibit lymphocyte proliferation by mitogens and alloantigens by different mechanisms. *Exp Cell Res*, **305**, 33-41.

- Ratajczak, M.Z., Zuba-Surma, E., Kucia, M., Reza, R., Wojakowski, W. and Ratajczak, J.** (2006) The pleiotropic effects of the SDF-1-CXCR4 axis in organogenesis, regeneration and tumorigenesis. *Leukemia*, **20**, 1915-1924.
- Ren, G., Zhang, L., Zhao, X., Xu, G., Zhang, Y., Roberts, A.I., Zhao, R.C. and Shi, Y.** (2008) Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide. *Cell Stem Cell*, **2**, 141-150.
- Reyes, M., Lund, T., Lenvik, T., Aguiar, D., Koodie, L. and Verfaillie, C.M.** (2001) Purification and *ex vivo* expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood*, **98**, 2615-2625.
- Rhead, J.L., Letley, D.P., Mohammadi, M., Hussein, N., Mohagheghi, M.A., Eshagh Hosseini, M. and Atherton, J.C.** (2007) A new *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin determinant, the intermediate region, is associated with gastric cancer. *Gastroenterology*, **133**, 926-936.
- Ricci-Vitiani, L., Lombardi, D.G., Pilozzi, E., Biffoni, M., Todaro, M., Peschle, C. and De Maria, R.** (2007) Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature*, **445**, 111-115.
- Richardson, G.D., Robson, C.N., Lang, S.H., Neal, D.E., Maitland, N.J. and Collins, A.T.** (2004) CD133, a novel marker for human prostatic epithelial stem cells. *J Cell Sci*, **117**, 3539-3545.
- Richmond, A.** (2002) Nf-kappa B, chemokine gene transcription and tumour growth. *Nat Rev Immunol*, **2**, 664-674.
- Rickes, S., Schultze, U., Monkemuller, K. and Malfertheiner, P.** (2006) [Walter Krienitz--his life and intuitive description of bacteria in the stomach]. *Dtsch Med Wochenschr*, **131**, 1341-1343.
- Ries, C., Egea, V., Karow, M., Kolb, H., Jochum, M. and Neth, P.** (2007) MMP-2, MT1-MMP, and TIMP-2 are essential for the invasive capacity of human mesenchymal stem cells: differential regulation by inflammatory cytokines. *Blood*, **109**, 4055-4063.
- Ringe, J., Strassburg, S., Neumann, K., Endres, M., Notter, M., Burmester, G.R., Kaps, C. and Sittlinger, M.** (2007) Towards *in situ* tissue repair: Human mesenchymal stem cells express chemokine receptors CXCR1, CXCR2 and CCR2, and migrate upon stimulation with CXCL8 but not CCL2. *J Cell Biochem*, **101**, 135-146.
- Ritter, E., Perry, A., Yu, J., Wang, T., Tang, L. and Bieberich, E.** (2008) Breast cancer cell-derived fibroblast growth factor 2 and vascular endothelial growth factor are chemoattractants for bone marrow stromal stem cells. *Ann Surg*, **247**, 310-314.
- Rizvi, A.Z., Swain, J.R., Davies, P.S., Bailey, A.S., Decker, A.D., Willenbring, H., Grompe, M., Fleming, W.H. and Wong, M.H.** (2006) Bone marrow-derived cells fuse with normal and transformed intestinal stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 6321-6325.
- Robak, T., Gladalska, A. and Stepien, H.** (1998) The tumour necrosis factor family of receptors/ligands in the serum of patients with rheumatoid arthritis. *Eur Cytokine Netw*, **9**, 145-154.
- Rokkas, T., Ladas, S., Liatsos, C., Petridou, E., Papatheodorou, G., Theocharis, S., Karameris, A. and Raptis, S.** (1999) Relationship of *Helicobacter pylori* CagA status to gastric cell proliferation and apoptosis. *Dig Dis Sci*, **44**, 487-493.
- Rollins, B.J.** (1997) Chemokines. *Blood*, **90**, 909-928.
- Romieu-Mourez, R., Francois, M., Boivin, M.N., Bouchentouf, M., Spaner, D.E. and Galipeau, J.** (2009) Cytokine modulation of TLR expression and activation in mesenchymal stromal cells leads to a proinflammatory phenotype. *J Immunol*, **182**, 7963-7973.

- Rosen, J.M. and Jordan, C.T.** (2009) The increasing complexity of the cancer stem cell paradigm. *Science*, **324**, 1670-1673.
- Roskams, T.** (2006) Liver stem cells and their implication in hepatocellular and cholangiocarcinoma. *Oncogene*, **25**, 3818-3822.
- Rubio, D., Garcia-Castro, J., Martin, M.C., de la Fuente, R., Cigudosa, J.C., Lloyd, A.C. and Bernad, A.** (2005) Spontaneous human adult stem cell transformation. *Cancer Res*, **65**, 3035-3039.
- Rubio, D., Garcia, S., De la Cueva, T., Paz, M.A., Lloyd, A.C., Bernad, A. and Garcia-Castro, J.** (2008a) Human mesenchymal stem cell transformation is associated with a mesenchymal-epithelial transition. *Exp Cell Res*, **314**, 691-698.
- Rubio, D., Garcia, S., Paz, M.F., De la Cueva, T., Lopez-Fernandez, L.A., Lloyd, A.C., Garcia-Castro, J. and Bernad, A.** (2008b) Molecular characterization of spontaneous mesenchymal stem cell transformation. *PLoS ONE*, **3**, e1398.
- Ruskone-Fourmesttraux, A., Aegerter, P., Delmer, A., Brousse, N., Galian, A. and Rambaud, J.C.** (1993) Primary digestive tract lymphoma: a prospective multicentric study of 91 patients. Groupe d'Etude des Lymphomes Digestifs. *Gastroenterology*, **105**, 1662-1671.
- Ruskone-Fourmesttraux, A. and Rambaud, J.C.** (2001) Gastrointestinal lymphoma: prevention and treatment of early lesions. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, **15**, 337-354.
- Ruster, B., Gottig, S., Ludwig, R.J., Bistrrian, R., Muller, S., Seifried, E., Gille, J. and Henschler, R.** (2006) Mesenchymal stem cells display coordinated rolling and adhesion behavior on endothelial cells. *Blood*, **108**, 3938-3944.
- Ryan, J.M., Barry, F., Murphy, J.M. and Mahon, B.P.** (2007) Interferon-gamma does not break, but promotes the immunosuppressive capacity of adult human mesenchymal stem cells. *Clin Exp Immunol*, **149**, 353-363.
- Saadat, I., Higashi, H., Obuse, C., Umeda, M., Murata-Kamiya, N., Saito, Y., Lu, H., Ohnishi, N., Azuma, T., Suzuki, A., Ohno, S. and Hatakeyama, M.** (2007) *Helicobacter pylori* CagA targets PAR1/MARK kinase to disrupt epithelial cell polarity. *Nature*, **447**, 330-333.
- Salama, N., Guillemin, K., McDaniel, T.K., Sherlock, G., Tompkins, L. and Falkow, S.** (2000) A whole-genome microarray reveals genetic diversity among *Helicobacter pylori* strains. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 14668-14673.
- Salama, N.R., Otto, G., Tompkins, L. and Falkow, S.** (2001) Vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori* plays a role during colonization in a mouse model of infection. *Infect Immun*, **69**, 730-736.
- Sarosi, G., Brown, G., Jaiswal, K., Feagins, L.A., Lee, E., Crook, T.W., Souza, R.F., Zou, Y.S., Shay, J.W. and Spechler, S.J.** (2008) Bone marrow progenitor cells contribute to esophageal regeneration and metaplasia in a rat model of Barrett's esophagus. *Dis Esophagus*, **21**, 43-50.
- Sasser, A.K., Sullivan, N.J., Studebaker, A.W., Hendey, L.F., Axel, A.E. and Hall, B.M.** (2007) Interleukin-6 is a potent growth factor for ER-alpha-positive human breast cancer. *Faseb J*, **21**, 3763-3770.
- Sato, K., Ozaki, K., Oh, I., Meguro, A., Hatanaka, K., Nagai, T., Muroi, K. and Ozawa, K.** (2007) Nitric oxide plays a critical role in suppression of T-cell proliferation by mesenchymal stem cells. *Blood*, **109**, 228-234.
- Satomi, S., Yamakawa, A., Matsunaga, S., Masaki, R., Inagaki, T., Okuda, T., Suto, H., Ito, Y., Yamazaki, Y., Kuriyama, M., Keida, Y., Kutsumi, H. and Azuma, T.** (2006) Relationship between the diversity of the cagA gene of *Helicobacter pylori* and gastric cancer in Okinawa, Japan. *J Gastroenterol*, **41**, 668-673.

- Saunders, N.J., Boonmee, P., Peden, J.F. and Jarvis, S.A.** (2005) Inter-species horizontal transfer resulting in core-genome and niche-adaptive variation within *Helicobacter pylori*. *BMC Genomics*, **6**, 9.
- Schmausser, B., Andrulis, M., Endrich, S., Lee, S.K., Josenhans, C., Muller-Hermelink, H.K. and Eck, M.** (2004) Expression and subcellular distribution of toll-like receptors TLR4, TLR5 and TLR9 on the gastric epithelium in *Helicobacter pylori* infection. *Clin Exp Immunol*, **136**, 521-526.
- Schmees, C., Prinz, C., Treptau, T., Rad, R., Hengst, L., Volland, P., Bauer, S., Brenner, L., Schmid, R.M. and Gerhard, M.** (2007) Inhibition of T-cell proliferation by *Helicobacter pylori* gamma-glutamyl transpeptidase. *Gastroenterology*, **132**, 1820-1833.
- Schuetz, A.N., Rubin, B.P., Goldblum, J.R., Shehata, B., Weiss, S.W., Liu, W., Wick, M.R. and Folpe, A.L.** (2005) Intercellular junctions in Ewing sarcoma/primitive neuroectodermal tumor: additional evidence of epithelial differentiation. *Mod Pathol*, **18**, 1403-1410.
- Schulz, T.F.** (2000) KSHV (HHV8) infection. *J Infect*, **41**, 125-129.
- Schwartz, R.E., Reyes, M., Koodie, L., Jiang, Y., Blackstad, M., Lund, T., Lenvik, T., Johnson, S., Hu, W.S. and Verfaillie, C.M.** (2002) Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J Clin Invest*, **109**, 1291-1302.
- Secchiero, P., Melloni, E., Corallini, F., Beltrami, A.P., Alviano, F., Milani, D., D'Aurizio, F., di Iasio, M.G., Cesselli, D., Bagnara, G.P. and Zauli, G.** (2008) Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand promotes migration of human bone marrow multipotent stromal cells. *Stem Cells*, **26**, 2955-2963.
- Seeberger, K.L., Dufour, J.M., Shapiro, A.M., Lakey, J.R., Rajotte, R.V. and Korbitt, G.S.** (2006) Expansion of mesenchymal stem cells from human pancreatic ductal epithelium. *Lab Invest*, **86**, 141-153.
- Seigel, G.M., Hackam, A.S., Ganguly, A., Mandell, L.M. and Gonzalez-Fernandez, F.** (2007) Human embryonic and neuronal stem cell markers in retinoblastoma. *Mol Vis*, **13**, 823-832.
- Selbach, M., Moese, S., Backert, S., Jungblut, P.R. and Meyer, T.F.** (2004) The *Helicobacter pylori* CagA protein induces tyrosine dephosphorylation of ezrin. *Proteomics*, **4**, 2961-2968.
- Selbach, M., Moese, S., Hauck, C.R., Meyer, T.F. and Backert, S.** (2002) Src is the kinase of the *Helicobacter pylori* CagA protein *in vitro* and *in vivo*. *J Biol Chem*, **277**, 6775-6778.
- Selbach, M., Moese, S., Hurwitz, R., Hauck, C.R., Meyer, T.F. and Backert, S.** (2003) The *Helicobacter pylori* CagA protein induces cortactin dephosphorylation and actin rearrangement by c-Src inactivation. *Embo J*, **22**, 515-528.
- Semino-Mora, C., Doi, S.Q., Marty, A., Simko, V., Carlstedt, I. and Dubois, A.** (2003) Intracellular and interstitial expression of *Helicobacter pylori* virulence genes in gastric precancerous intestinal metaplasia and adenocarcinoma. *J Infect Dis*, **187**, 1165-1177.
- Seo, J.H., Lim, J.W., Kim, H. and Kim, K.H.** (2004) *Helicobacter pylori* in a Korean isolate activates mitogen-activated protein kinases, AP-1, and NF-kappaB and induces chemokine expression in gastric epithelial AGS cells. *Lab Invest*, **84**, 49-62.
- Serakinci, N., Guldberg, P., Burns, J.S., Abdallah, B., Schrodder, H., Jensen, T. and Kassem, M.** (2004) Adult human mesenchymal stem cell as a target for neoplastic transformation. *Oncogene*, **23**, 5095-5098.

- Seto, K., Hayashi-Kuwabara, Y., Yoneta, T., Suda, H. and Tamaki, H.** (1998) Vacuolation induced by cytotoxin from *Helicobacter pylori* is mediated by the EGF receptor in HeLa cells. *FEBS Lett*, **431**, 347-350.
- Sewald, X., Gebert-Vogl, B., Prassl, S., Barwig, I., Weiss, E., Fabbri, M., Osicka, R., Schiemann, M., Busch, D.H., Semmrich, M., Holzmann, B., Sebo, P. and Haas, R.** (2008) Integrin subunit CD18 Is the T-lymphocyte receptor for the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin. *Cell Host Microbe*, **3**, 20-29.
- Shackleton, M., Vaillant, F., Simpson, K.J., Stingl, J., Smyth, G.K., Asselin-Labat, M.L., Wu, L., Lindeman, G.J. and Visvader, J.E.** (2006) Generation of a functional mammary gland from a single stem cell. *Nature*, **439**, 84-88.
- Shahamat, M., Mai, U., Paszko-Kolva, C., Kessel, M. and Colwell, R.R.** (1993) Use of autoradiography to assess viability of *Helicobacter pylori* in water. *Appl Environ Microbiol*, **59**, 1231-1235.
- Sharma, S.A., Tummuru, M.K., Miller, G.G. and Blaser, M.J.** (1995) Interleukin-8 response of gastric epithelial cell lines to *Helicobacter pylori* stimulation *in vitro*. *Infect Immun*, **63**, 1681-1687.
- Shimoyama, T., Everett, S.M., Dixon, M.F., Axon, A.T. and Crabtree, J.E.** (1998) Chemokine mRNA expression in gastric mucosa is associated with *Helicobacter pylori* cagA positivity and severity of gastritis. *J Clin Pathol*, **51**, 765-770.
- Shirin, H., Sordillo, E.M., Oh, S.H., Yamamoto, H., Delohery, T., Weinstein, I.B. and Moss, S.F.** (1999) *Helicobacter pylori* inhibits the G1 to S transition in AGS gastric epithelial cells. *Cancer Res*, **59**, 2277-2281.
- Shu, C., Li, T.Y., Tsang, L.L., Fok, K.L., Lo, P.S., Zhu, J.X., Ho, L.S., Chung, Y.W. and Chan, H.C.** (2006) Differentiation of adult rat bone marrow stem cells into epithelial progenitor cells in culture. *Cell Biol Int*, **30**, 823-828.
- Siegel, G., Schafer, R. and Dazzi, F.** (2009) The immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells. *Transplantation*, **87**, S45-49.
- Simonsen, J.L., Rosada, C., Serakinci, N., Justesen, J., Stenderup, K., Rattan, S.I., Jensen, T.G. and Kassem, M.** (2002) Telomerase expression extends the proliferative life-span and maintains the osteogenic potential of human bone marrow stromal cells. *Nat Biotechnol*, **20**, 592-596.
- Singh, S.K., Hawkins, C., Clarke, I.D., Squire, J.A., Bayani, J., Hide, T., Henkelman, R.M., Cusimano, M.D. and Dirks, P.B.** (2004) Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature*, **432**, 396-401.
- Sioud, M. and Floisand, Y.** (2009) NOD2/CARD15 on bone marrow CD34+ hematopoietic cells mediates induction of cytokines and cell differentiation. *J Leukoc Biol*, **85**, 939-946.
- Sipponen, P., Kosunen, T.U., Valle, J., Riihela, M. and Seppala, K.** (1992) *Helicobacter pylori* infection and chronic gastritis in gastric cancer. *J Clin Pathol*, **45**, 319-323.
- Sipponen, P. and Marshall, B.J.** (2000) Gastritis and gastric cancer. Western countries. *Gastroenterol Clin North Am*, **29**, 579-592, v-vi.
- Slettenaar, V.I. and Wilson, J.L.** (2006) The chemokine network: a target in cancer biology? *Adv Drug Deliv Rev*, **58**, 962-974.
- Smith, D.G. and Lawson, G.H.** (2001) *Lawsonia intracellularis*: getting inside the pathogenesis of proliferative enteropathy. *Vet Microbiol*, **82**, 331-345.
- Smith, M.F., Jr., Mitchell, A., Li, G., Ding, S., Fitzmaurice, A.M., Ryan, K., Crowe, S. and Goldberg, J.B.** (2003) Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR5, but not TLR4, are required for *Helicobacter pylori*-induced NF-kappa B activation and chemokine expression by epithelial cells. *J Biol Chem*, **278**, 32552-32560.

- Solnick, J.V., Hansen, L.M., Salama, N.R., Boonjakuakul, J.K. and Syvanen, M.** (2004) Modification of *Helicobacter pylori* outer membrane protein expression during experimental infection of rhesus macaques. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 2106-2111.
- Son, B.R., Marquez-Curtis, L.A., Kucia, M., Wysoczynski, M., Turner, A.R., Ratajczak, J., Ratajczak, M.Z. and Janowska-Wieczorek, A.** (2006) Migration of bone marrow and cord blood mesenchymal stem cells *in vitro* is regulated by stromal-derived factor-1-CXCR4 and hepatocyte growth factor-c-met axes and involves matrix metalloproteinases. *Stem Cells*, **24**, 1254-1264.
- Song, L. and Tuan, R.S.** (2004) Transdifferentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow. *Faseb J*, **18**, 980-982.
- Sordi, V., Malosio, M.L., Marchesi, F., Mercalli, A., Melzi, R., Giordano, T., Belmonte, N., Ferrari, G., Leone, B.E., Bertuzzi, F., Zerbini, G., Allavena, P., Bonifacio, E. and Piemonti, L.** (2005) Bone marrow mesenchymal stem cells express a restricted set of functionally active chemokine receptors capable of promoting migration to pancreatic islets. *Blood*, **106**, 419-427.
- Sotiropoulou, P.A., Perez, S.A., Gritzapis, A.D., Baxevanis, C.N. and Papamichail, M.** (2006) Interactions between human mesenchymal stem cells and natural killer cells. *Stem Cells*, **24**, 74-85.
- Spaeth, E., Klopp, A., Dembinski, J., Andreeff, M. and Marini, F.** (2008) Inflammation and tumor microenvironments: defining the migratory itinerary of mesenchymal stem cells. *Gene Ther*, **15**, 730-738.
- Spaeth, E.L., Dembinski, J.L., Sasser, A.K., Watson, K., Klopp, A., Hall, B., Andreeff, M. and Marini, F.** (2009) Mesenchymal stem cell transition to tumor-associated fibroblasts contributes to fibrovascular network expansion and tumor progression. *PLoS One*, **4**, e4992.
- Spaggiari, G.M., Capobianco, A., Abdelrazik, H., Becchetti, F., Mingari, M.C. and Moretta, L.** (2008) Mesenchymal stem cells inhibit natural killer-cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2. *Blood*, **111**, 1327-1333.
- Spees, J.L., Olson, S.D., Ylostalo, J., Lynch, P.J., Smith, J., Perry, A., Peister, A., Wang, M.Y. and Prockop, D.J.** (2003) Differentiation, cell fusion, and nuclear fusion during *ex vivo* repair of epithelium by human adult stem cells from bone marrow stroma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 2397-2402.
- Stein, M., Bagnoli, F., Halenbeck, R., Rappuoli, R., Fantl, W.J. and Covacci, A.** (2002) c-Src/Lyn kinases activate *Helicobacter pylori* CagA through tyrosine phosphorylation of the EPIYA motifs. *Mol Microbiol*, **43**, 971-980.
- Su, B., Ceponis, P.J., Lebel, S., Huynh, H. and Sherman, P.M.** (2003) *Helicobacter pylori* activates Toll-like receptor 4 expression in gastrointestinal epithelial cells. *Infect Immun*, **71**, 3496-3502.
- Suerbaum, S. and Josenhans, C.** (2007) *Helicobacter pylori* evolution and phenotypic diversification in a changing host. *Nat Rev Microbiol*, **5**, 441-452.
- Suerbaum, S., Smith, J.M., Bapumia, K., Morelli, G., Smith, N.H., Kunstmann, E., Dyrek, I. and Achtman, M.** (1998) Free recombination within *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 12619-12624.
- Suetsugu, A., Nagaki, M., Aoki, H., Motohashi, T., Kunisada, T. and Moriwaki, H.** (2006) Characterization of CD133+ hepatocellular carcinoma cells as cancer stem/progenitor cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **351**, 820-824.
- Suganuma, M., Yamaguchi, K., Ono, Y., Matsumoto, H., Hayashi, T., Ogawa, T., Imai, K., Kuzuhara, T., Nishizono, A. and Fujiki, H.** (2008) TNF-alpha-inducing

- protein, a carcinogenic factor secreted from *H. pylori*, enters gastric cancer cells. *Int J Cancer*, **123**, 117-122.
- Sun, B., Zhang, S., Ni, C., Zhang, D., Liu, Y., Zhang, W., Zhao, X., Zhao, C. and Shi, M.** (2005) Correlation between melanoma angiogenesis and the mesenchymal stem cells and endothelial progenitor cells derived from bone marrow. *Stem Cells Dev*, **14**, 292-298.
- Tabassam, F.H., Graham, D.Y. and Yamaoka, Y.** (2008) OipA plays a role in *Helicobacter pylori*-induced focal adhesion kinase activation and cytoskeletal re-organization. *Cell Microbiol*, **10**, 1008-1020.
- Tahara, E.** (1995) Genetic alterations in human gastrointestinal cancers. The application to molecular diagnosis. *Cancer*, **75**, 1410-1417.
- Takahashi, M. and Hasegawa, R.** (1985) Enhancing effects of dietary salt on both initiation and promotion stages of rat gastric carcinogenesis. *Princess Takamatsu Symp*, **16**, 169-182.
- Takaishi, S., Okumura, T. and Wang, T.C.** (2008) Gastric cancer stem cells. *J Clin Oncol*, **26**, 2876-2882.
- Tapon, N. and Hall, A.** (1997) Rho, Rac and Cdc42 GTPases regulate the organization of the actin cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol*, **9**, 86-92.
- Tatematsu, M., Takahashi, M., Fukushima, S., Hananouchi, M. and Shirai, T.** (1975) Effects in rats of sodium chloride on experimental gastric cancers induced by N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine or 4-nitroquinoline-1-oxide. *J Natl Cancer Inst*, **55**, 101-106.
- Terada, N., Hamazaki, T., Oka, M., Hoki, M., Mastalerz, D.M., Nakano, Y., Meyer, E.M., Morel, L., Petersen, B.E. and Scott, E.W.** (2002) Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature*, **416**, 542-545.
- Tessier, P.A., Naccache, P.H., Clark-Lewis, I., Gladue, R.P., Neote, K.S. and McColl, S.R.** (1997) Chemokine networks *in vivo*: involvement of C-X-C and C-C chemokines in neutrophil extravasation *in vivo* in response to TNF-alpha. *J Immunol*, **159**, 3595-3602.
- The EUROGAST Study Group** (1993) An international association between *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer. *Lancet*, **341**, 1359-1362.
- Theise, N.D., Badve, S., Saxena, R., Henegariu, O., Sell, S., Crawford, J.M. and Krause, D.S.** (2000) Derivation of hepatocytes from bone marrow cells in mice after radiation-induced myeloablation. *Hepatology*, **31**, 235-240.
- Thiberge, J.M., Dillies, M.A., Coppée, J.Y., Burucoa, C., Lehours, P., Raymond, J., Vincent, P., Ruskoné-Foumestroux, A., Courillon-Mallet, A., Lamarque, D., Delchier, J.C. and Labigne, A.** (2004) Analyse comparative du génome de 120 souches de *H. pylori* associées à différentes pathologies., Vol. Gastroenterol. Clin. Biol. 2004(28) A94.
- Thiery, J.P.** (2003) Epithelial-mesenchymal transitions in development and pathologies. *Curr Opin Cell Biol*, **15**, 740-746.
- Tirode, F., Laud-Duval, K., Prieur, A., Delorme, B., Charbord, P. and Delattre, O.** (2007) Mesenchymal stem cell features of Ewing tumors. *Cancer Cell*, **11**, 421-429.
- Tomb, J.F., White, O., Kerlavage, A.R., Clayton, R.A., Sutton, G.G., Fleischmann, R.D., Ketchum, K.A., Klenk, H.P., Gill, S., Dougherty, B.A., Nelson, K., Quackenbush, J., Zhou, L., Kirkness, E.F., Peterson, S., Loftus, B., Richardson, D., Dodson, R., Khalak, H.G., Glodek, A., McKenney, K., Fitzgerald, L.M., Lee, N., Adams, M.D., Hickey, E.K., Berg, D.E., Gocayne, J.D., Utterback, T.R., Peterson, J.D., Kelley, J.M., Cotton, M.D., Weidman, J.M., Fujii, C., Bowman, C., Watthey, L., Wallin, E., Hayes, W.S., Borodovsky, M., Karp, P.D., Smith,**

- H.O., Fraser, C.M. and Venter, J.C.** (1997) The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature*, **388**, 539-547.
- Tombola, F., Pagliaccia, C., Campello, S., Telford, J.L., Montecucco, C., Papini, E. and Zoratti, M.** (2001) How the loop and middle regions influence the properties of *Helicobacter pylori* VacA channels. *Biophys J*, **81**, 3204-3215.
- Tomchuck, S.L., Zvezdaryk, K.J., Coffelt, S.B., Waterman, R.S., Danka, E.S. and Scandurro, A.B.** (2008) Toll-like receptors on human mesenchymal stem cells drive their migration and immunomodulating responses. *Stem Cells*, **26**, 99-107.
- Tomita, S., Mickle, D.A., Weisel, R.D., Jia, Z.Q., Tumiati, L.C., Allidina, Y., Liu, P. and Li, R.K.** (2002) Improved heart function with myogenesis and angiogenesis after autologous porcine bone marrow stromal cell transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg*, **123**, 1132-1140.
- Torok, A.M., Bouton, A.H. and Goldberg, J.B.** (2005) *Helicobacter pylori* induces interleukin-8 secretion by Toll-like receptor 2- and Toll-like receptor 5-dependent and -independent pathways. *Infect Immun*, **73**, 1523-1531.
- Tremain, N., Korkko, J., Ibberson, D., Kopen, G.C., DiGirolamo, C. and Phinney, D.G.** (2001) MicroSAGE analysis of 2,353 expressed genes in a single cell-derived colony of undifferentiated human mesenchymal stem cells reveals mRNAs of multiple cell lineages. *Stem Cells*, **19**, 408-418.
- Tse, H.F., Kwong, Y.L., Chan, J.K., Lo, G., Ho, C.L. and Lau, C.P.** (2003a) Angiogenesis in ischaemic myocardium by intramyocardial autologous bone marrow mononuclear cell implantation. *Lancet*, **361**, 47-49.
- Tse, W.T., Pendleton, J.D., Beyer, W.M., Egalka, M.C. and Guinan, E.C.** (2003b) Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. *Transplantation*, **75**, 389-397.
- Tsuda, M., Karita, M., Mizote, T., Morshed, M.G., Okita, K. and Nakazawa, T.** (1994) Essential role of *Helicobacter pylori* urease in gastric colonization: definite proof using a urease-negative mutant constructed by gene replacement. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, **6 Suppl 1**, S49-52.
- Tsutsumi, S., Shimazu, A., Miyazaki, K., Pan, H., Koike, C., Yoshida, E., Takagishi, K. and Kato, Y.** (2001) Retention of multilineage differentiation potential of mesenchymal cells during proliferation in response to FGF. *Biochem Biophys Res Commun*, **288**, 413-419.
- Ture-Ozdemir, F., Gazouli, M., Tzivras, M., Panagos, C., Bovaretos, N., Petraki, K., Giannakopoulos, A., Korkolopoulou, P. and Mantzaris, G.J.** (2008) Association of polymorphisms of NOD2, TLR4 and CD14 genes with susceptibility to gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Anticancer Res*, **28**, 3697-3700.
- Uchida, K., Urabe, K., Naruse, K., Ujihira, M., Mabuchi, K. and Itoman, M.** (2007) Comparison of the cytokine-induced migratory response between primary and subcultured populations of rat mesenchymal bone marrow cells. *J Orthop Sci*, **12**, 484-492.
- Uemura, N., Okamoto, S., Yamamoto, S., Matsumura, N., Yamaguchi, S., Yamakido, M., Taniyama, K., Sasaki, N. and Schlemper, R.J.** (2001) *Helicobacter pylori* infection and the development of gastric cancer. *N Engl J Med*, **345**, 784-789.
- Ulloa-Montoya, F., Kidder, B.L., Pauwelyn, K.A., Chase, L.G., Luttun, A., Crabbe, A., Geraerts, M., Sharov, A.A., Piao, Y., Ko, M.S., Hu, W.S. and Verfaillie, C.M.** (2007) Comparative transcriptome analysis of embryonic and adult stem cells with extended and limited differentiation capacity. *Genome Biol*, **8**, R163.
- Ullrich, A., Fischbach, W. and Blettner, M.** (2002) Incidence of gastric B-cell lymphomas: a population-based study in Germany. *Ann Oncol*, **13**, 1120-1127.

- Unemo, M., Aspholm-Hurtig, M., Ilver, D., Bergstrom, J., Boren, T., Danielsson, D. and Teneberg, S.** (2005) The sialic acid binding SabA adhesin of *Helicobacter pylori* is essential for nonopsonic activation of human neutrophils. *J Biol Chem*, **280**, 15390-15397.
- Uno, K., Kato, K., Atsumi, T., Suzuki, T., Yoshitake, J., Morita, H., Ohara, S., Kotake, Y., Shimosegawa, T. and Yoshimura, T.** (2007) Toll-like receptor (TLR) 2 induced through TLR4 signaling initiated by *Helicobacter pylori* cooperatively amplifies iNOS induction in gastric epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, **293**, G1004-1012.
- Urbich, C. and Dimmeler, S.** (2004) Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology. *Circ Res*, **95**, 343-353.
- Uren, A.G., O'Rourke, K., Aravind, L.A., Pisabarro, M.T., Seshagiri, S., Koonin, E.V. and Dixit, V.M.** (2000) Identification of paracaspases and metacaspases: two ancient families of caspase-like proteins, one of which plays a key role in MALT lymphoma. *Mol Cell*, **6**, 961-967.
- Vadala, G., Studer, R.K., Sowa, G., Spiezia, F., Iucu, C., Denaro, V., Gilbertson, L.G. and Kang, J.D.** (2008) Coculture of bone marrow mesenchymal stem cells and nucleus pulposus cells modulate gene expression profile without cell fusion. *Spine*, **33**, 870-876.
- Vale, F.F. and Vitor, J.M.** (2007) Genomic methylation: a tool for typing *Helicobacter pylori* isolates. *Appl Environ Microbiol*, **73**, 4243-4249.
- Van Doorn, L.J., Figueiredo, C., Sanna, R., Plaisier, A., Schneeberger, P., de Boer, W. and Quint, W.** (1998) Clinical relevance of the *cagA*, *vacA*, and *iceA* status of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology*, **115**, 58-66.
- Vandenbroucke-Grauls, C.M. and Appelmek, B.J.** (1998) *Helicobacter pylori* LPS: molecular mimicry with the host and role in autoimmunity. *Ital J Gastroenterol Hepatol*, **30 Suppl 3**, S259-260.
- Vaughan, T.L., Davis, S., Kristal, A. and Thomas, D.B.** (1995) Obesity, alcohol, and tobacco as risk factors for cancers of the esophagus and gastric cardia: adenocarcinoma versus squamous cell carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **4**, 85-92.
- Verfaillie, C.M., Schwartz, R., Reyes, M. and Jiang, Y.** (2003) Unexpected potential of adult stem cells. *Ann N Y Acad Sci*, **996**, 231-234.
- Vestweber, D.** (2007) Adhesion and signaling molecules controlling the transmigration of leukocytes through endothelium. *Immunol Rev*, **218**, 178-196.
- Viala, J., Chaput, C., Boneca, I.G., Cardona, A., Girardin, S.E., Moran, A.P., Athman, R., Memet, S., Huerre, M.R., Coyle, A.J., DiStefano, P.S., Sansonetti, P.J., Labigne, A., Bertin, J., Philpott, D.J. and Ferrero, R.L.** (2004) Nod1 responds to peptidoglycan delivered by the *Helicobacter pylori cag* pathogenicity island. *Nat Immunol*, **5**, 1166-1174.
- Vivekanandan, P. and Torbenson, M.** (2008) Low frequency of *Helicobacter* DNA in benign and malignant liver tissues from Baltimore, United States. *Hum Pathol*, **39**, 213-216.
- Von Luttichau, I., Notohamiprodjo, M., Wechselberger, A., Peters, C., Henger, A., Seliger, C., Djafarzadeh, R., Huss, R. and Nelson, P.J.** (2005) Human adult CD34- progenitor cells functionally express the chemokine receptors CCR1, CCR4, CCR7, CXCR5, and CCR10 but not CXCR4. *Stem Cells Dev*, **14**, 329-336.
- Wagner, S., Beil, W., Westermann, J., Logan, R.P., Bock, C.T., Trautwein, C., Bleck, J.S. and Manns, M.P.** (1997) Regulation of gastric epithelial cell growth by

- Helicobacter pylori*: evidence for a major role of apoptosis. *Gastroenterology*, **113**, 1836-1847.
- Wagner, W., Feldmann, R.E., Jr., Seckinger, A., Maurer, M.H., Wein, F., Blake, J., Krause, U., Kalenka, A., Burgers, H.F., Saffrich, R., Wuchter, P., Kuschinsky, W. and Ho, A.D.** (2006) The heterogeneity of human mesenchymal stem cell preparations--evidence from simultaneous analysis of proteomes and transcriptomes. *Exp Hematol*, **34**, 536-548.
- Wagner, W., Wein, F., Seckinger, A., Frankhauser, M., Wirkner, U., Krause, U., Blake, J., Schwager, C., Eckstein, V., Ansorge, W. and Ho, A.D.** (2005) Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Exp Hematol*, **33**, 1402-1416.
- Wakitani, S., Saito, T. and Caplan, A.I.** (1995) Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. *Muscle Nerve*, **18**, 1417-1426.
- Wang, C.Y., Mayo, M.W., Korneluk, R.G., Goeddel, D.V. and Baldwin, A.S., Jr.** (1998) NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science*, **281**, 1680-1683.
- Wang, G., Bunnell, B.A., Painter, R.G., Quiniones, B.C., Tom, S., Lanson, N.A., Jr., Spees, J.L., Bertucci, D., Peister, A., Weiss, D.J., Valentine, V.G., Prockop, D.J. and Kolls, J.K.** (2005) Adult stem cells from bone marrow stroma differentiate into airway epithelial cells: potential therapy for cystic fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 186-191.
- Wang, G., Humayun, M.Z. and Taylor, D.E.** (1999) Mutation as an origin of genetic variability in *Helicobacter pylori*. *Trends Microbiol*, **7**, 488-493.
- Wang, H.D., Ren, J. and Zhang, L.** (2004) CDH1 germline mutation in hereditary gastric carcinoma. *World J Gastroenterol*, **10**, 3088-3093.
- Wang, J., Brooks, E.G., Bamford, K.B., Denning, T.L., Pappo, J. and Ernst, P.B.** (2001a) Negative selection of T cells by *Helicobacter pylori* as a model for bacterial strain selection by immune evasion. *J Immunol*, **167**, 926-934.
- Wang, L., Li, Y., Chen, J., Gautam, S.C., Zhang, Z., Lu, M. and Chopp, M.** (2002a) Ischemic cerebral tissue and MCP-1 enhance rat bone marrow stromal cell migration in interface culture. *Exp Hematol*, **30**, 831-836.
- Wang, L., Li, Y., Chen, X., Chen, J., Gautam, S.C., Xu, Y. and Chopp, M.** (2002b) MCP-1, MIP-1, IL-8 and ischemic cerebral tissue enhance human bone marrow stromal cell migration in interface culture. *Hematology*, **7**, 113-117.
- Wang, W.C., Wang, H.J. and Kuo, C.H.** (2001b) Two distinctive cell binding patterns by vacuolating toxin fused with glutathione S-transferase: one high-affinity m1-specific binding and the other lower-affinity binding for variant m forms. *Biochemistry*, **40**, 11887-11896.
- Wang, Y., Johnsen, H.E., Mortensen, S., Bindslev, L., Ripa, R.S., Haack-Sorensen, M., Jorgensen, E., Fang, W. and Kastrup, J.** (2006) Changes in circulating mesenchymal stem cells, stem cell homing factor, and vascular growth factors in patients with acute ST elevation myocardial infarction treated with primary percutaneous coronary intervention. *Heart*, **92**, 768-774.
- Wang, Z.J., Zhang, F.M., Wang, L.S., Yao, Y.W., Zhao, Q. and Gao, X.** (2009) Lipopolysaccharides can protect mesenchymal stem cells (MSCs) from oxidative stress-induced apoptosis and enhance proliferation of MSCs via Toll-like receptor(TLR)-4 and PI3K/Akt. *Cell Biol Int*, **33**, 665-674.

- Watanabe, N., Shimada, T., Ohtsuka, Y., Hiraishi, H. and Terano, A.** (1997) Proinflammatory cytokines and *Helicobacter pylori* stimulate CC-chemokine expression in gastric epithelial cells. *J Physiol Pharmacol*, **48**, 405-413.
- Watanabe, T., Tada, M., Nagai, H., Sasaki, S. and Nakao, M.** (1998) *Helicobacter pylori* infection induces gastric cancer in mongolian gerbils. *Gastroenterology*, **115**, 642-648.
- Webb, P.M., Knight, T., Elder, J.B., Newell, D.G. and Forman, D.** (1996) Is *Helicobacter pylori* transmitted from cats to humans? *Helicobacter*, **1**, 79-81.
- Wen, S., Felley, C.P., Bouzourene, H., Reimers, M., Michetti, P. and Pan-Hammarstrom, Q.** (2004) Inflammatory gene profiles in gastric mucosa during *Helicobacter pylori* infection in humans. *J Immunol*, **172**, 2595-2606.
- Wexler, S.A., Donaldson, C., Denning-Kendall, P., Rice, C., Bradley, B. and Hows, J.M.** (2003) Adult bone marrow is a rich source of human mesenchymal 'stem' cells but umbilical cord and mobilized adult blood are not. *Br J Haematol*, **121**, 368-374.
- Wong, B.C., Lam, S.K., Wong, W.M., Chen, J.S., Zheng, T.T., Feng, R.E., Lai, K.C., Hu, W.H., Yuen, S.T., Leung, S.Y., Fong, D.Y., Ho, J., Ching, C.K. and Chen, J.S.** (2004) *Helicobacter pylori* eradication to prevent gastric cancer in a high-risk region of China: a randomized controlled trial. *Jama*, **291**, 187-194.
- Wong, C.K., Tsang, C.M., Ip, W.K. and Lam, C.W.** (2006) Molecular mechanisms for the release of chemokines from human leukemic mast cell line (HMC)-1 cells activated by SCF and TNF-alpha: roles of ERK, p38 MAPK, and NF-kappaB. *Allergy*, **61**, 289-297.
- Wotherspoon, A.C., Doglioni, C., Diss, T.C., Pan, L., Moschini, A., de Boni, M. and Isaacson, P.G.** (1993) Regression of primary low-grade B-cell gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue type after eradication of *Helicobacter pylori*. *Lancet*, **342**, 575-577.
- Wright, M.H., Calcagno, A.M., Salcido, C.D., Carlson, M.D., Ambudkar, S.V. and Varticovski, L.** (2008) Brca1 breast tumors contain distinct CD44+/CD24- and CD133+ cells with cancer stem cell characteristics. *Breast Cancer Res*, **10**, R10.
- Wu, Y., Chen, L., Scott, P.G. and Tredget, E.E.** (2007) Mesenchymal stem cells enhance wound healing through differentiation and angiogenesis. *Stem Cells*, **25**, 2648-2659.
- Wynn, R.F., Hart, C.A., Corradi-Perini, C., O'Neill, L., Evans, C.A., Wraith, J.E., Fairbairn, L.J. and Bellantuono, I.** (2004) A small proportion of mesenchymal stem cells strongly expresses functionally active CXCR4 receptor capable of promoting migration to bone marrow. *Blood*, **104**, 2643-2645.
- Yamaoka, Y., El-Zimaity, H.M., Gutierrez, O., Figura, N., Kim, J.G., Kodama, T., Kashima, K. and Graham, D.Y.** (1999a) Relationship between the cagA 3' repeat region of *Helicobacter pylori*, gastric histology, and susceptibility to low pH. *Gastroenterology*, **117**, 342-349.
- Yamaoka, Y., Kita, M., Kodama, T., Sawai, N. and Imanishi, J.** (1996) *Helicobacter pylori* cagA gene and expression of cytokine messenger RNA in gastric mucosa. *Gastroenterology*, **110**, 1744-1752.
- Yamaoka, Y., Kita, M., Kodama, T., Sawai, N., Kashima, K. and Imanishi, J.** (1997) Induction of various cytokines and development of severe mucosal inflammation by cagA gene positive *Helicobacter pylori* strains. *Gut*, **41**, 442-451.
- Yamaoka, Y., Kodama, T., Kita, M., Imanishi, J., Kashima, K. and Graham, D.Y.** (1999b) Relation between clinical presentation, *Helicobacter pylori* density, interleukin 1beta and 8 production, and cagA status. *Gut*, **45**, 804-811.

- Yamaoka, Y., Kwon, D.H. and Graham, D.Y.** (2000) A M(r) 34,000 proinflammatory outer membrane protein (oipA) of *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 7533-7538.
- Yamaoka, Y., Ojo, O., Fujimoto, S., Odenbreit, S., Haas, R., Gutierrez, O., El-Zimaity, H.M., Reddy, R., Arnqvist, A. and Graham, D.Y.** (2006) *Helicobacter pylori* outer membrane proteins and gastroduodenal disease. *Gut*, **55**, 775-781.
- Yang, S.H., Park, M.J., Yoon, I.H., Kim, S.Y., Hong, S.H., Shin, J.Y., Nam, H.Y., Kim, Y.H., Kim, B. and Park, C.G.** (2009) Soluble mediators from mesenchymal stem cells suppress T cell proliferation by inducing IL-10. *Exp Mol Med*, **41**, 315-324.
- Yang, S.K., Eckmann, L., Panja, A. and Kagnoff, M.F.** (1997) Differential and regulated expression of C-X-C, C-C, and C-chemokines by human colon epithelial cells. *Gastroenterology*, **113**, 1214-1223.
- Yoshikawa, T. and Naito, Y.** (2000) The role of neutrophils and inflammation in gastric mucosal injury. *Free Radic Res*, **33**, 785-794.
- Young, L.S. and Rickinson, A.B.** (2004) Epstein-Barr virus: 40 years on. *Nat Rev Cancer*, **4**, 757-768.
- Zaragosi, L.E., Ailhaud, G. and Dani, C.** (2006) Autocrine fibroblast growth factor 2 signaling is critical for self-renewal of human multipotent adipose-derived stem cells. *Stem Cells*, **24**, 2412-2419.
- Zauli, G. and Secchiero, P.** (2006) The role of the TRAIL/TRAIL receptors system in hematopoiesis and endothelial cell biology. *Cytokine Growth Factor Rev*, **17**, 245-257.
- Zhang, M., Behbod, F., Atkinson, R.L., Landis, M.D., Kittrell, F., Edwards, D., Medina, D., Tsimelzon, A., Hilsenbeck, S., Green, J.E., Michalowska, A.M. and Rosen, J.M.** (2008) Identification of tumor-initiating cells in a p53-null mouse model of breast cancer. *Cancer Res*, **68**, 4674-4682.
- Zhang, Q., Siebert, R., Yan, M., Hinzmann, B., Cui, X., Xue, L., Rakestraw, K.M., Naeve, C.W., Beckmann, G., Weisenburger, D.D., Sanger, W.G., Nowotny, H., Vesely, M., Callet-Bauchu, E., Salles, G., Dixit, V.M., Rosenthal, A., Schlegelberger, B. and Morris, S.W.** (1999) Inactivating mutations and overexpression of BCL10, a caspase recruitment domain-containing gene, in MALT lymphoma with t(1;14)(p22;q32). *Nat Genet*, **22**, 63-68.
- Zhang, W., Ge, W., Li, C., You, S., Liao, L., Han, Q., Deng, W. and Zhao, R.C.** (2004) Effects of mesenchymal stem cells on differentiation, maturation, and function of human monocyte-derived dendritic cells. *Stem Cells Dev*, **13**, 263-271.
- Zhu, W., Xu, W., Jiang, R., Qian, H., Chen, M., Hu, J., Cao, W., Han, C. and Chen, Y.** (2006) Mesenchymal stem cells derived from bone marrow favor tumor cell growth *in vivo*. *Exp Mol Pathol*, **80**, 267-274.
- Zong, W.X., Edelstein, L.C., Chen, C., Bash, J. and Gelinas, C.** (1999) The prosurvival Bcl-2 homolog Bfl-1/A1 is a direct transcriptional target of NF-kappaB that blocks TNFalpha-induced apoptosis. *Genes Dev*, **13**, 382-387.
- Zuk, P.A., Zhu, M., Ashjian, P., De Ugarte, D.A., Huang, J.I., Mizuno, H., Alfonso, Z.C., Fraser, J.K., Benhaim, P. and Hedrick, M.H.** (2002) Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell*, **13**, 4279-4295.

Annexe

1.Nomenclature des cytokines

Nomenclature	Nom complet	Alias	Récepteurs connus
CXCL1		GRO- α , MGSA- α , MIP-2 α	CXCR2/CXCR1
CXCL2		GRO- β , MGSA- β , MIP-2 β	CXCR2
CXCL3		GRO- γ , MGSA- γ	CXCR2
CXCL8		Interleukine 8	CXCR1, CXCR2
CXCL12		SDF-1 α/β	CCR4
CX3CL1		Fractalkine, Neuroactine	CX3CR1
CCL2		MCP-1	CCR2
CCL3		MIP-1 α	CCR1, CCR5
CCL4		MIP-1 β	CCR5
CCL5		RANTES	CCR1, CCR3, CCR5
CCL22		MDC, STCP-1	CCR4
CCL25		TECK	CCR9
BMP-2	Bone Morphogenetic Protein 2		
BMP-4	Bone Morphogenetic Protein 4		
BMP-7	Bone Morphogenetic Protein 7		
EGF	Epithelial Growth Factor	urogastrone	EGF-R (c-erbB)
FGF2	Fibroblast Growth Factor basic	prostastropin	FGFR 1b,1c,2c,3c,4
G-CSF	Granulocyte Colony-Stimulating Factor	pluripoietin, CSF-3	
GM-CSF	Granulocyte/Macrophage Colony-Stimulating Factor	pluripoietin- α , CSF-2	
HDGF	Hepatoma-Derived Growth Factor		
HGF	Hepatocyte Growth Factor	Scatter facor, hepatopoietin	MET
IGF (I,II)	Insulin-like Growth Factor		IGF-IR, IGF-IIR
PAI-1	Plasminogen Activator Inhibitor 1		
PDGF (AA, BB, AB)	Platelet-derived Growth Factor		PDGFR- α/β
TRAIL	TNF-Related Apoptosis Ligand	Apo2L	DR4, DR5
VEGF	Vascular Endothelial Growth factor	VPF	flt-1, flt-4
SCF	Stem Cell Factor	c-kit Ligand, MGF, Steel factor	c-kit
TGF-β	Transforming Growth Factor β		

2.Article 1 : *Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells differentiate into gastrointestinal epithelial cells through cell fusion*

Ferrand J, Noël D, Lehours P, Chambonnier L, Ménard A, Mégraud F et Varon C

Soumis pour publication dans Gut

**HUMAN BONE MARROW-DERIVED MESENCHYMAL STEM CELLS
DIFFERENTIATE INTO GASTROINTESTINAL EPITHELIAL CELLS THROUGH
CELL FUSION**

SHORT RUNNING HEAD:

Epithelial differentiation of human MSC

CORRESPONDING AUTHOR:

Professor Francis Mégraud

INSERM U853, Université Victor Segalen Bordeaux 2, 146 rue Leo Saignat, Bat. 2B RDC-
Zone Nord, F-33076 Bordeaux cedex, France

francis.megraud@chu-bordeaux.fr

CO-AUTHORS:

Jonathan Ferrand ^{1,2}, Danièle Noël ^{3,4}, Philippe Lehours ^{1,2}, Lucie Chambonnier ^{1,2}, Armelle
Ménard ^{1,2}, Francis Mégraud ^{1,2} and Christine Varon ^{1,2}.

¹INSERM U853, Bordeaux, F33076, France

²Université *Victor Segalen* Bordeaux 2, Bordeaux, F33076, France

³INSERM U844, Hôpital Saint Eloi, Montpellier, F34295, France

⁴Université Montpellier 1, UFR de Médecine, Montpellier, F34967, France

KEYWORDS:

Mesenchymal stem cells, gastrointestinal epithelial differentiation, fusion

WORD COUNT (MAIN TEXT):

3989

ABSTRACT

Objective and design

Bone marrow-derived mesenchymal stem cells (MSC) have the potential to differentiate into a variety of cell types and are a potential source for tissue repair in response to injury, particularly in gastrointestinal tract. Mechanisms of MSC differentiation in epithelial cells are controversial as fusion or trans-differentiation events may be evoked. Moreover, MSC-derived epithelial cells may be responsible for development of gastrointestinal carcinoma.

To evaluate the mechanisms of MSC differentiation, this study investigated the ability of MSC to differentiate into epithelial lineage after *in vitro* or *in vivo* coculture experiments with gastrointestinal epithelial cell lines.

Results

More than 11% of the MSC expressed epithelial markers after 8 days coculture with gastrointestinal epithelial cells. Epithelial differentiation mainly resulted from cellular and nuclear fusion events. MSC epithelial differentiation by fusion with gastric epithelial cells was confirmed *in vivo* in a mouse model of tumor xenograft.

Conclusions

MSC may acquire an epithelial phenotype after fusion with epithelial cells from gastrointestinal origin both *in vitro* and *in vivo*. The mechanism demonstrated herein reinforces the role of MSC in gastrointestinal epithelium repair and carcinogenesis.

INTRODUCTION

The continuous turnover of gastrointestinal mucosa is supported by the presence of stem cells in the gastric gland which can give rise to the different kinds of epithelial-cell lineage.[1, 2] However, several studies suggest that cells originating from extra-gastrointestinal sites participate in repopulation and re-epithelialization of damaged mucosa. Bone marrow transplantation with gender-mismatched cases showed that donor-derived cells can be retrieved in diverse non-hematopoietic tissues including the gastrointestinal tract (GIT). Donor-derived cells can be found in the esophagus, stomach, small intestine and colon at a frequency ranging from 0.6 to 4.6 percent of the nucleated cells in the epithelium.[3] These cells can be detected up to eight years after transplantation, suggesting their continuous renewal. In addition, analysis of biopsy samples from patients with grafts versus host disease or gastric ulcer revealed a close relationship between the number of repopulated donor-derived cells and the clinical course of tissue regeneration. Other studies in mice using transplantation of bone marrow-derived cells (BMDC) confirmed these results of engraftment in the GIT after irradiation.[4, 5] BMDC engraftment was closely related to the level of damage after local irradiation in various tissues.[6] The mechanism by which BMDC can repopulate the epithelium of the GIT is not yet well understood, but BMDC may adopt the phenotype of intestinal cells by fusion with local epithelial cells after irradiation or in the context of intestinal cancer development.[7]

BMDC include a minority population called mesenchymal stem cells (MSC). MSC are non-hematopoietic cells which were first isolated from bone marrow but retrieved from several tissues such as adipose tissue, amniotic fluid and umbilical cord blood.[8-11] In addition to their stromal role, MSC can trans-differentiate *in vitro* and *in vivo* into diverse cells like osteoblasts, chondrocytes, adipocytes, myocytes, tenocytes and possibly neural

cells.[4, 12, 13] All these data suggest that these cells may be good candidates for regenerative medicine.[14]

On the other hand, MSC may also be involved in carcinogenesis.[15] First, MSC have the ability to home to the primary tumor site where they may be the source of tumor associated fibroblasts.[16] The role of MSC in tumor growth is a controversial issue as some studies showed an inhibition of tumor growth, whereas others observed enhancement or no effects.[15] MSC may also modulate angiogenesis and contribute to metastasis formation.[17] In addition, some cancers and particularly epithelial cancers can originate from MSC. Using the well-described *Helicobacter felis* infected mouse model of gastric cancer, chronic infection resulted in homing and differentiation of BMDC into gastric epithelial cells.[18] Infection led to the appearance of neoplasia arising from donor-MS, suggesting that this population of cells is inherently vulnerable to malignant progression. Similar results were obtained in a rat model of Barrett's esophagus where BMDC contributed to epithelial regeneration and were the source of metaplasia.[19] MSC may also play a role in the initiation and development of fibrosarcoma and Ewing's sarcoma.[20, 21]

To date, some *in vivo* studies in humans and animals shown that BMDC could be a source of epithelial cells in different tissues but very few studies included an *in vitro* demonstration of MSC differentiation into epithelial cells. These rare studies focused on differentiation into epithelial cells of the respiratory tract or undifferentiated epithelium but differentiation into gastrointestinal epithelial cells was not evaluated.[22-25]

In order to better understand the role of MSC in the GIT epithelium repair and in the development of gastric carcinoma, this study aimed to evaluate the ability of bone marrow-derived MSC to differentiate into gastrointestinal epithelial cells.

RESULTS

Characterization of isolated MSC from bone marrow.

Human MSC cultures were established from bone marrow samples from two patients corresponding to PM7 and PM24 MSC. After isolation, BMDC exhibited fibroblast-like cell morphology, typical phenotypes and possessed self renewal properties (data not shown). The cells were submitted to trilineage differentiation protocols as previously described.[26] After chondrogenic induction, significant increases in aggrecan (AGG), collagen type II (Col2), collagen type X (Col10) and cartilage oligomeric matrix protein (COMP) mRNAs were detected in both induced PM7 and PM24 MSC compared to non-induced cells (Fig 1.A). When cultured in an adipogenic medium, expression of peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ), lipoprotein lipase (LPL) and fatty acid binding protein 4 (FABP4) mRNAs was increased for both PM7 and PM24 MSC. In addition, differentiated cells displayed a positive staining of cytoplasmic lipid droplets with oil red O (Fig 1.B). Induction of osteogenesis in MSC resulted in an increase of osteocalcin (OC), alkaline phosphatase (AP), Runx2 and collagen type I (Col1) transcripts. Furthermore, mineralized nodular structures stained by alizarin red S appeared in differentiated cells (Fig 1.C). The two human bone marrow cell preparations obtained possessed morphological and differentiation properties of MSC.

Human MSC can differentiate into epithelial cells of the gastrointestinal tract by a mechanism of cellular fusion.

In order to study the ability of MSC to differentiate into gastric epithelial cells, PM7 MSC were cocultured with AGS gastric epithelial cells at a ratio of 8:1 in culture plates. bFGF which maintains stem cell fate was removed to facilitate differentiation.[27] Prior to coculture, MSC and AGS cells were transduced with lentiviral vectors encoding the

fluorescent proteins eGFP and DsRED, respectively. After 8 days of coculture, cells expressing both eGFP and DsRED appeared (Fig 2.A, white arrows). Interestingly, the presence of two or more nuclei was detected in most of these cells. These heterokaryons were probably the consequence of plasma membrane fusion between the two cell populations. In addition, these fused cells were positive for epithelial cytokeratins, whereas MSC alone were negative (pCK, Fig 2.A). In order to confirm that MSC could fuse or express epithelial specific markers after coculture with epithelial cells, the expression of a more specific epithelial marker, the Epithelial Specific Antigen (ESA) was evaluated. ESA was expressed at the cell surface of epithelial cells but not on the MSC (Fig 2.B). eGFP and DsRED double positive cells also expressed this specific epithelial cell marker (Fig 2.B). These fusion events were not restricted to AGS cells. Indeed, similar results were obtained by direct coculture of MSC with another digestive epithelial cell line, the colon carcinoma cell line HT-29. After coculture with DsRED transduced HT-29 cells, eGFP and DsRED double positive cells appeared, and these cells were positive for cytokeratins and ESA (Fig 2.A and 2.B). We confirmed by confocal microscopy and 3D reconstitution that cells expressing eGFP, DsRED and ESA were single cells, as shown by the 3 labellings on the same z-level (Fig 2.C).

The same results were obtained using PM24 MSC (data not shown). We also verified that cell transduction by lentiviral vectors was not responsible for an increased capacity of cells to fuse. Using fluorescent dyes with high affinity for cellular membranes, MSC and AGS cells were labelled green or red with PKH2 or CM-Dil compounds, respectively. After coculture of PKH2-labelled MSC and CM-Dil-labelled AGS cells, results similar to those previously observed using lentivirally transduced cells were obtained (data not shown).

To further confirm cell fusion, coculture of gender-mismatched MSC and AGS cells was performed, and sex chromosome contents were evaluated. For this purpose, the Fluorescence-Immunophenotyping and Interphase Cytogenetics as a Tool for Investigation of Neoplasms

(FICTION) method, corresponding to Fluorescence *In Situ* Hybridization (FISH) combined with immunofluorescence staining, was performed. First, verification that male MSC (PM7) and female epithelial cells (AGS) had a normal sex chromosome content was made (Fig 3.A-B). Cell coculture led to the appearance of multi-nucleated cells which were positive for pancytokeratins by immunostaining. Some of the cells contained two nuclei, one with an X and one with an Y (from male MSC) and the other with two X (from female AGS cell). This result indicated that a male MSC cell had fused with a female epithelial cell and that the two nuclei did not fuse (Fig 3.C). In addition, some cells contained a single nucleus with abnormal content, corresponding to one Y and three X chromosomes, indicating that one male MSC nucleus had fused with one female AGS nucleus (Fig 3.D). Finally, some cells expressed epithelial markers and contained only one nucleus with a male content, suggesting mitosis of fused multinucleated cells leading to mononucleated daughter cells (Fig 3.E).

Fusion of human MSC and gastrointestinal cells occurs at a relatively important frequency *in vitro*.

To evaluate the frequency of MSC fusion with epithelial cells, eGFP MSC and DsRED AGS cells were cocultured for 8 days, harvested, immunostained for the surface epithelial marker ESA and analyzed by flow cytometry. First, AGS cells were DsRED and ESA double positive (Fig 4.A). As eGFP PM7 were not transduced with 100% efficiency, only eGFP positive cells were gated (Fig 4.B and 4.C, left panel). PM7 MSC alone were negative for DsRED and ESA staining (Fig 4.B). After an 8 day coculture, 6% of the initial eGFP positive PM7 cells expressed ESA and DsRED staining, corresponding to cells that underwent fusion events (Fig 4.C). An additional 5.5% of eGFP positive, ESA positive but DsRED negative cells was found (Fig 4.C), possibly corresponding to 1) fused cells which lost their DsRED expression or 2) MSC fused with non-transduced epithelial cells as the DsRED transduction efficiency

was equal to 74.5% (Fig 4.A). Finally, 11.5% of eGFP MSC expressed the epithelial marker ESA (6% triple positive cells and 5.5% double positive cells, Fig 4.C), showing the strong ability of these cells to acquire an epithelial phenotype.

Fusion of MSC and epithelial cells can be observed *in vivo*

We previously developed a model of tumor formation in immunodeficient Non Obese Diabetous/Shi-severe combined immunodeficiency/Interleukin-2R γ^{null} (NOG) mice after xenograft of AGS cells. AGS cells alone or AGS cells mixed with MSC (AGS:MSC) at a ratio of 1:8 were xenografted by subcutaneous injection in NOG immunodeficient mice. Cellular engraftment and proliferation were followed by measuring tumor formation and growth. AGS cells alone or AGS:MSC were able to give rise to a tumor after 28 days. Interestingly, after 50 days, tumors in AGS:MSC injected mice appeared significantly smaller than tumors in mice injected with AGS cells alone (63 ± 8.0 vs 92 ± 18.7 cm²; $p < 0.05$). This result suggests an anti-tumoral role of MSC. Fifty days post-injection, the mice were sacrificed and cells composing the tumors were analysed by FISH. As shown in Fig 5.A, tumors were composed of nodules of human tumor cells surrounded by murine cells (ie not recognized in the human specific FISH experiment). Rare MSC-derived cells displaying a nucleus with one Y chromosome and expressing cytokeratins were observed (Fig 5.A and 5.B arrows). However, confocal microscopy revealed that some single cells had nuclei with abnormal content which may have resulted from a fusion event (nucleus with one Y and several X chromosomes) (Fig 5.C). In addition, cells from fresh tumors were dissociated and cultured on glass coverslips. Nuclei contents were analyzed by FISH, and fused cells were observed (Fig 5.D). These results indicate that fusion events led to viable cells able to adhere and grow *ex vivo*.

DISCUSSION

BMDC could be the source of epithelial cells in gastrointestinal mucosa. Indeed, gender-mismatched bone transplantation showed that donor cells could be recovered in non-hematopoietic tissues and in the GIT of humans and mice.[3, 4, 7, 28] Engraftment of BMDC appears to be related to injury in diverse tissues, e.g. wounded skin,[29] kidney with damages from a variety of causes,[30] muscle fibers after chemically induced muscle degeneration or exercise-induced damage,[31, 32] cardiomyocytes after myocardial infarction,[33] liver after hepatic injury and irradiation [34, 35] or bleomycin-injured lung.[36] BMDC may be recruited in the GIT after *Helicobacter* infection, graft versus host disease, gastric ulcer, irradiation or esophagojejunostomy.[3, 6, 7, 18, 19] Therefore, two mechanisms of gastric tissue regeneration may coexist, one under physiological conditions carried by local stem cells and another under pathological conditions carried by BMDC after local stem cell failure.

The mechanism of tissue repair by BMDC remains unclear, and no *in vitro* model to study these mechanisms has been proposed.

In this study, we explored the capacity of MSC to differentiate into epithelial cells of the GIT. We showed that MSC could express epithelial markers such as cytokeratins and ESA when cultured with gastrointestinal epithelial cells. To date, very few articles have explored the *in vitro* capacity of BMDC to differentiate into airway epithelial cells [23, 25, 37] or undifferentiated epithelium when cultured on semi-permeable supports [24] or in a growth factor enriched medium.[22] We were unsuccessful in reproducing these results, most likely due to the diversity of MSC preparations and culture parameters affecting the reproducibility of these experiments.[38] Nevertheless, we fulfilled the criteria proposed by the Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee of the International Society for Cellular Therapy to define MSC.[39]

Cellular fusion is a predominant event in this differentiation process. These results were confirmed by FICTION experiments on gender-mismatched cocultured cells proving that not only cells but also nuclei were able to fuse. The observation of cells positive for eGFP and DsRED expression and displaying a single nucleus with a normal sexual content suggested that a fusion event may be followed by a normal mitosis.

Fusion between BMDC and other tissue specific cells has already been showed as BMDC can fuse *in vivo* and *in vitro* with embryonic stem cells, myoblasts, hepatocytes in the liver, Purkinje neurons in the brain, cardiac muscle in the heart and airway epithelial cells.[12, 23, 25, 40, 41] In these studies, the percentage of fused cells was very low: in the range of 0.001% to 4%. Our study demonstrated a higher percentage (up to 6%) of fused cells, reinforcing the relevance of this phenomenon in the GIT. However, other studies showed that BMDC were not able to fuse with tissue specific cells such as lung, skin, pancreas, esophagus and liver but that they can acquire their phenotype by trans-differentiation.[19, 42, 43] In our model, fusion was however the predominant mechanism by which MSC can express epithelial markers.

Fusion may be responsible for nuclei reprogramming of differentiated cells resulting in mitosis and selection for survival.[44] Human breast cancer cells harbor an abnormal number of centrosomes reinforcing the potential of cell fusion in cancer development.[45] Some authors suggested that fusion events are an obligatory step in the occurrence of cancer cells.[46] Cellular fusion could also play a role in metastasis. Indeed, fusion between melanoma cells and migratory macrophages led to hybrid cells expressing genes from both parents allowing a high number of metastases in mice.[47] Epithelial cells fused with MSC may undergo an epithelial to mesenchymal transition (EMT) promoting transformation to cancer cells.[48] On the other hand, cellular fusion could also be an anti-tumoral mechanism, DNA damages being repaired by fusion with a normal cell using a complementation-like

process. Indeed, reprogramming of somatic cells to a state of totipotency by transfer into oocytes is well known.[49] In our model, we showed that fusion of MSC with gastric epithelial cancer cells may delay tumor growth *in vivo*, suggesting an anti-tumoral role of MSC. Inhibition of tumor growth by MSC has already been evoked in some studies.[50, 51] However, this effect is controversial since other authors have found that MSC could favor or have no effects on tumor growth.[52-54]

In a new model of gastric carcinogenesis, *H. felis* chronic infection in mice induced a repopulation of the stomach with MSC and these cells progressed through metaplasia, dysplasia and then to carcinoma.[18] In this context and considering our results, MSC fusion with epithelial cells may involve a reprogramming of the fused cells leading to the appearance of cancer stem cells. In addition, the immunosuppressive properties of MSC may confer an immune system escape ability to cancer cells resulting from cell fusion with MSC.[55]

To investigate the role of MSC in the regeneration and/or transformation of the epithelium of the GIT, a better understanding of the MSC engraftment mechanism is necessary. Several studies showed that MSC migratory properties can be stimulated by growth factor such as RANTES, TRAIL, MCP1, interleukin 8 and tumor necrosis factor.[56-60] Expression of these markers has to be investigated in injured or *Helicobacter* infected gastric epithelial cell to explain the homing of MSC.

In conclusion, we demonstrated that MSC may fuse with gastrointestinal epithelial cells without any extracellular stimulation. The models proposed allow the study of the differentiation mechanisms, the long term evolution of differentiated MSC and their potential role in carcinogenesis.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Cell culture

Human gastric carcinoma cell line AGS (CRL-1739, ATCC, Molsheim, France) and colon carcinoma cell line HT-29 (ACC 299, DSMZ collection, Braunschweig, Germany) were used. AGS cells were cultured in DMEM-F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium - nutrient mixture F12) and HT-29 in McCoy's 5A medium, supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) and antibiotics (100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin, all from Invitrogen, Cergy Pontoise, France).

MSC cultures were established from bone marrow samples of donors undergoing hip replacement after obtaining their consent. Cells were plated at a density of 5×10^4 cells/cm² in Minimal Essential Medium α (Invitrogen) supplemented with 10% FBS, 1 ng/ml basic fibroblast growth factor (bFGF; R&D Systems, Lille, France) and antibiotics. At subconfluence, cells were harvested and plated at a density of 1000 cells/cm². Samples from two donors, an 82 year old man and a 66 year old woman, were called PM7 and PM24, respectively. Cells were used between passages 3 to 9.

Differentiation assays

For chondrogenic differentiation, 2.5×10^5 cells were centrifugated at 600 g for 5 min. The resulting pellets were cultured in DMEM supplemented with 0.1 µM dexamethasone, 0.17 mM ascorbate-2-phosphate, 1% insulin-transferrin-sodium selenite supplement (all from Sigma) and 10 ng/ml of recombinant Transforming Growth Factor β 3 (R&D Systems). The medium was changed every 2 to 3 days. Differentiation was assessed on day 21 by real-time reverse transcription PCR (RT-qPCR) on extracted mRNAs.

For adipogenic differentiation, cells were plated at a density of 8×10^3 cells/cm². Adipogenic differentiation was induced in DMEM-F12 containing 5% newborn calf serum

(Invitrogen), 1 μM dexamethasone, 50 μM isobutyl-methylxanthine and 60 μM indomethacin (all from Sigma, l'Isle d'Abeau, France) with the media changed every 2 to 3 days. Differentiation was assessed on day 21 by visualization of lipid droplets after oil red O staining and by real-time RT-qPCR on extracted mRNAs.

Osteogenesis was induced by culture at low density (2.5×10^3 cells/cm²) in DMEM (4.5 g/l glucose) with 10% FCS, 10 mM β -glycerophosphate, 0.1 μM dexamethasone and 0.05 mM ascorbic acid (all from Sigma). The medium was changed every 3 days. Differentiation was assessed on day 21 by visualization of matrix calcification after Alizarin red S staining and by RT-qPCR on extracted mRNAs.

RNA preparation and RT-qPCR

MSC were pelleted at 4°C before RNA extraction. For chondrogenesis, micropellets were washed in PBS and mechanically dissociated. For adipogenic and osteogenic pathways, cells undergoing differentiation were rinsed with PBS and the lysis buffer was added on top of the cells. Total RNA was extracted using the RNeasy Kit according to the manufacturer's recommendations (Qiagen S.A., Courtaboeuf, France). Chondrogenic differentiation was visualized by detection of AGG, Col2, Col10 and COMP mRNAs; adipogenic differentiation by detection of PPAR γ , LPL and FABP4 mRNAs and osteogenic differentiation by OC, AP, Runx2 and Col1 mRNAs (personal data). RT-PCR was performed on day 21 as compared with undifferentiated MSC on day 0.

Cellular labelling

The eGFP encoding TMEW and the DsRED encoding TMDW lentiviral vectors were kindly provided by F. Moreau Gaudry (Vectorology Platform, University Victor Segalen Bordeaux 2, Bordeaux, France). Gastrointestinal epithelial cells (AGS and HT-29) and MSC were transduced respectively with lentiviral particles containing the vectors encoding DsRED

and eGFP at multiplicities of infections ranging from 1 to 20 (MOIs). Twenty-four hours after transduction, cells were harvested and transduction efficiency was measured by flow cytometry. Epithelial cell samples with 30% of DsRED positive epithelial cells were sorted by flow cytometry to obtain a homogeneous population (>70% of DsRED positive cells). Transduced MSC were not sorted to avoid passage-dependent derivations, and a stable population was maintained with 30% of eGFP positive cells corresponding to an MOI of 10. For staining with fluorescent chemical compounds, the PKH2 Green Fluorescent Cell Linker Kit (Sigma) and CM-Dil cell labelling solution (Vybrant, Invitrogen) were used according to the manufacturer's recommendations. Briefly, cells were harvested and resuspended in 1 ml of labelling solutions (2 μ l of PKH2 in Diluent A or 2.5 μ l of CM-Dil in PBS) for the indicated time in manufacturer's instructions. Cells were washed three times in culture medium with 10% FCS before use.

Coculture experiments and fluorescent staining

Coculture experiments of MSC and epithelial cells were performed at a ratio of 8:1 (20,000 MSC:2,500 epithelial cells). Cells were cultured on glass coverslips for immunofluorescent stainings. Coculture experiments were performed for 8 days in DMEM supplemented with 10% FBS and antibiotics and the medium was changed three times a week.

For immunofluorescent staining, cells were washed twice with PBS to remove cellular debris, then fixed with 3% paraformaldehyde prepared in cytoskeletal buffer for 10 min and processed as previously described.[61] Primary and secondary antibodies were used at the following concentrations: 1:100 for mouse anti-ESA antibodies (StemCell Technologies, Grenoble, France), 1:100 for mouse anti-pancytokeratin antibodies (Ozyme, St Quentin Yvelines, France), 1:500 for Alexa-647 labelled goat anti-mouse antibodies (Molecular Probes, Invitrogen), 1:10,000 for Hoechst 33342 compound (Molecular Probes, Invitrogen).

Coverslips were washed in water and mounted on microscope slides with Fluoromount mounting medium (Clinisciences SA, Montrouge, France).

For FISH or FICTION protocol, cells were fixed in 3.7% formaldehyde solution in PBS for 10 min and FISH for the alpha satellite centromeric region of chromosome X and the satellite III (Yq12) region of chromosome Y were performed according to manufacturer's instructions (Abbott Molecular, Rungis, France). For FICTION protocol, coverslips were washed in PBS, and stained as previously described. Coverslips were mounted on microscope slides with DAPI II counterstain (Abbott Molecular).

Cells were analyzed using a Nikon Eclipse 50i epi-fluorescence microscope (Nikon, Champigny sur Marne, France) equipped with the Nis Element acquisition software and a x40 (numerical aperture, 1.3) oil immersion objective or a Leica DMI6000 confocal microscope (Leica Microsystems, Rueil Malmaison, France) equipped with the LEICA acquisition software and a x63 (numerical aperture, 1.4) oil immersion objective. Z-stack acquisitions were performed by 0.5 μm slicing.

For flow cytometry analysis, cells were incubated at room temperature with mouse anti-ESA antibodies in PBS (1:100) for 20 min, washed and incubated with Alexa-647 labelled anti-mouse secondary antibodies in PBS (1:200) for 15 min. Cells were resuspended in PBS before being analyzed in a BD FACSCanto II flow cytometer using FACSDiva software (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France).

In vivo xenografts

For injections in immunodeficient NOG mice, PM7 MSC and AGS were mixed at a ratio of 8:1 corresponding to 2,250,000 and 375,000 cells respectively. Control mice were injected with 375,000 AGS cells resuspended in 200 μl of 7 mg/ml Matrigel (BD Biosciences) in ice cold PBS. Four mice for each group were injected. Mice were anesthetized with 3% isofluran (Belamont, Boulogne Billancourt, France) before subcutaneous injection into the right flank.

Volumes of the neoforming tumors were measured each week. When tumor sizes reached 100 mm², mice were sacrificed by cervical dislocation and tumors immediately harvested. Tumors were embedded in Optimal Cutting Temperature (OCT) compound (Sakura, Labonord, Villeneuve d'Asq, France) and snap frozen in cooled isopentane with liquid nitrogen. Tissues were stored at -80°C before being cut into 7 µm thick serial sections on a cryostat (Leica Microsystems, Nanterre, France). Tissue sections mounted on glass slides were processed as previously described.

Some tumor samples were cultured on glass coverslips after dissociation. Briefly, after mechanical mincing, samples were dissociated by incubation with 0.1% collagenase and 0.0125% hyaluronidase in PBS (all from Sigma) for 45 min at 37°C and filtered on a 70 µm cell strainer. Erythrocytes were lysed at 4°C for 10 min with 170 mM NH₄Cl, 2 mM KHCO₃ and 0.1 mM ethylene-diamine-tetra-acetic acid (EDTA) before plating cells on glass coverslips. After a 24 h culture, cells were fixed with 3.7% formaldehyde and processed for stainings.

Statistical analysis

For *in vivo* experiments, quantification values represent the means of the quadruplicate ± standard deviation (SD). Significance was determined using the Student's t-test.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Professor Jean-Philippe Merlio and Dr Martina Carlotti (EA 2406, University *Victor Segalen* Bordeaux 2, Bordeaux, France) for providing helpful advice on FISH experiments and Dr Philippe Tropel (INSERM U318, Grenoble, France) for helpful discussions on MSC. We also thank Lucie Chambonnier (INSERM U853), Dr Véronique Guyonnet-Duperat, Vincent Pitard and Nathalie Senant from the vectorology, cytometry and

confocal microscopy platforms of University *Victor Segalen* Bordeaux 2 (Bordeaux, France) for their technical assistance.

COMPETING INTERESTS

None

FUNDINGS

This project was financially supported by the Institut de Recherche des Maladies de l'Appareil Digestif, the Institut Fédératif de Recherche 66 (University *Victor Segalen* Bordeaux 2, Bordeaux, France), the Association pour la Recherche contre le Cancer (project number: 8412) and the Institut National du Cancer (project number: 07/3D1616/IABC-23-12/NC-NG).

COPYRIGHT LICENCE STATEMENT

« I Francis Mégraud The Corresponding Author of this article (the Contribution”) has the right to grant on behalf of all authors and does grant on behalf of all authors, a licence to the BMJ Publishing Group Ltd and its licensees, to permit this Contribution (if accepted) to be published in *Gut* and any other BMJ Group products and to exploit all subsidiary rights, as set out in our licence set out at: (<http://gut.bmj.com//ifora/licence.pdf>).

REFERENCES

- 1 Cheng H, Leblond CP. Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine. V. Unitarian Theory of the origin of the four epithelial cell types. *Am J Anat* 1974;4:537-61
- 2 Okamoto R, Watanabe M. Molecular and clinical basis for the regeneration of human gastrointestinal epithelia. *J Gastroenterol* 2004;1:1-6

- 3 Okamoto R, Yajima T, Yamazaki M, et al. Damaged epithelia regenerated by bone marrow-derived cells in the human gastrointestinal tract. *Nat Med* 2002;9:1011-7
- 4 Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 2002;6893:41-9
- 5 Krause DS, Theise ND, Collector MI, et al. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell* 2001;3:369-77
- 6 Francois S, Bensidhoum M, Mouiseddine M, et al. Local irradiation not only induces homing of human mesenchymal stem cells at exposed sites but promotes their widespread engraftment to multiple organs: a study of their quantitative distribution after irradiation damage. *Stem cells* 2006;4:1020-9
- 7 Rizvi AZ, Swain JR, Davies PS, et al. Bone marrow-derived cells fuse with normal and transformed intestinal stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;16:6321-5
- 8 Bieback K, Kern S, Kluter H, et al. Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Stem cells* 2004;4:625-34
- 9 Nadri S, Soleimani M. Comparative analysis of mesenchymal stromal cells from murine bone marrow and amniotic fluid. *Cytotherapy* 2007;1-9
- 10 Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 2002;12:4279-95
- 11 Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol* 1976;5:267-74
- 12 Goncalves MA, de Vries AA, Holkers M, et al. Human mesenchymal stem cells ectopically expressing full-length dystrophin can complement Duchenne muscular dystrophy myotubes by cell fusion. *Hum Mol Genet* 2006;2:213-21
- 13 Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999;5411:143-7

- 14 Sensebe L, Bourin P. Mesenchymal stem cells for therapeutic purposes. *Transplantation* 2009;9 Suppl:S49-53
- 15 Lazennec G, Jorgensen C. Concise review: adult multipotent stromal cells and cancer: risk or benefit? *Stem cells (Dayton, Ohio)* 2008;6:1387-94
- 16 Spaeth EL, Dembinski JL, Sasser AK, et al. Mesenchymal stem cell transition to tumor-associated fibroblasts contributes to fibrovascular network expansion and tumor progression. *PLoS ONE* 2009;4:e4992
- 17 Sun B, Zhang S, Ni C, et al. Correlation between melanoma angiogenesis and the mesenchymal stem cells and endothelial progenitor cells derived from bone marrow. *Stem Cells Dev* 2005;3:292-8
- 18 Houghton J, Stoicov C, Nomura S, et al. Gastric cancer originating from bone marrow-derived cells. *Science* 2004;5701:1568-71
- 19 Sarosi G, Brown G, Jaiswal K, et al. Bone marrow progenitor cells contribute to esophageal regeneration and metaplasia in a rat model of Barrett's esophagus. *Dis Esophagus* 2008;1:43-50
- 20 Li H, Fan X, Kovi RC, et al. Spontaneous expression of embryonic factors and p53 point mutations in aged mesenchymal stem cells: a model of age-related tumorigenesis in mice. *Cancer Res* 2007;22:10889-98
- 21 Tirode F, Laud-Duval K, Prieur A, et al. Mesenchymal stem cell features of Ewing tumors. *Cancer cell* 2007;5:421-9
- 22 Paunescu V, Deak E, Herman D, et al. *In vitro* differentiation of human mesenchymal stem cells to epithelial lineage. *J Cell Mol Med* 2007;3:502-8
- 23 Popov BV, Serikov VB, Petrov NS, et al. Lung epithelial cells induce endodermal differentiation in mouse mesenchymal bone marrow stem cells by paracrine mechanism. *Tissue Eng* 2007;10:2441-50

- 24 Shu C, Li TY, Tsang LL, et al. Differentiation of adult rat bone marrow stem cells into epithelial progenitor cells in culture. *Cell Biol Int* 2006;10:823-8
- 25 Spees JL, Olson SD, Ylostalo J, et al. Differentiation, cell fusion, and nuclear fusion during *ex vivo* repair of epithelium by human adult stem cells from bone marrow stroma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;5:2397-402
- 26 Noel D, Caton D, Roche S, et al. Cell specific differences between human adipose-derived and mesenchymal-stromal cells despite similar differentiation potentials. *Exp Cell Res* 2008;7:1575-84
- 27 Baddoo M, Hill K, Wilkinson R, et al. Characterization of mesenchymal stem cells isolated from murine bone marrow by negative selection. *J Cell Biochem* 2003;6:1235-49
- 28 Korbling M, Katz RL, Khanna A, et al. Hepatocytes and epithelial cells of donor origin in recipients of peripheral-blood stem cells. *N Engl J Med* 2002;10:738-46
- 29 Badiavas EV, Abedi M, Butmarc J, et al. Participation of bone marrow derived cells in cutaneous wound healing. *J Cell Physiol* 2003;2:245-50
- 30 Poulosom R, Forbes SJ, Hodivala-Dilke K, et al. Bone marrow contributes to renal parenchymal turnover and regeneration. *J Pathol* 2001;2:229-35
- 31 Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, et al. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 1998;5356:1528-30
- 32 LaBarge MA, Blau HM. Biological progression from adult bone marrow to mononucleate muscle stem cell to multinucleate muscle fiber in response to injury. *Cell* 2002;4:589-601
- 33 Tse HF, Kwong YL, Chan JK, et al. Angiogenesis in ischaemic myocardium by intramyocardial autologous bone marrow mononuclear cell implantation. *Lancet* 2003;9351:47-9
- 34 Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, et al. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 1999;5417:1168-70

- 35 Theise ND, Badve S, Saxena R, et al. Derivation of hepatocytes from bone marrow cells in mice after radiation-induced myeloablation. *Hepatology* 2000;1:235-40
- 36 Kotton DN, Ma BY, Cardoso WV, et al. Bone marrow-derived cells as progenitors of lung alveolar epithelium. *Development* 2001;24:5181-8
- 37 Wang G, Bunnell BA, Painter RG, et al. Adult stem cells from bone marrow stroma differentiate into airway epithelial cells: potential therapy for cystic fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;1:186-91
- 38 Wagner W, Ho AD. Mesenchymal stem cell preparations--comparing apples and oranges. *Stem Cell Rev* 2007;4:239-48
- 39 Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006;4:315-7
- 40 Alvarez-Dolado M, Pardal R, Garcia-Verdugo JM, et al. Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature* 2003;6961:968-73
- 41 Terada N, Hamazaki T, Oka M, et al. Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature* 2002;6880:542-5
- 42 Harris RG, Herzog EL, Bruscia EM, et al. Lack of a fusion requirement for development of bone marrow-derived epithelia. *Science* 2004;5680:90-3
- 43 Ianus A, Holz GG, Theise ND, et al. *In vivo* derivation of glucose-competent pancreatic endocrine cells from bone marrow without evidence of cell fusion. *J Clin Invest* 2003;6:843-50
- 44 Ogle BM, Cascalho M, Platt JL. Biological implications of cell fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005;7:567-75
- 45 Lingle WL, Lutz WH, Ingle JN, et al. Centrosome hypertrophy in human breast tumors: implications for genomic stability and cell polarity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;6:2950-5

- 46 Parris GE. Clinically significant cancer evolves from transient mutated and/or aneuploid neoplasia by cell fusion to form unstable syncytia that give rise to ecologically viable parasite species. *Med Hypotheses* 2005;5:846-50
- 47 Pawelek JM, Chakraborty AK. The cancer cell--leukocyte fusion theory of metastasis. *Adv Cancer Res* 2008;397-444
- 48 Mani SA, Guo W, Liao MJ, et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* 2008;4:704-15
- 49 Ambrosi DJ, Rasmussen TP. Reprogramming mediated by stem cell fusion. *J Cell Mol Med* 2005;2:320-30
- 50 Maestroni GJ, Hertens E, Galli P. Factor(s) from nonmacrophage bone marrow stromal cells inhibit Lewis lung carcinoma and B16 melanoma growth in mice. *Cell Mol Life Sci* 1999;4:663-7
- 51 Ohlsson LB, Varas L, Kjellman C, et al. Mesenchymal progenitor cell-mediated inhibition of tumor growth *in vivo* and *in vitro* in gelatin matrix. *Exp Mol Pathol* 2003;3:248-55
- 52 Djouad F, Plence P, Bony C, et al. Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals. *Blood* 2003;10:3837-44
- 53 Kyriakou CA, Yong KL, Benjamin R, et al. Human mesenchymal stem cells (hMSCs) expressing truncated soluble vascular endothelial growth factor receptor (tsFlk-1) following lentiviral-mediated gene transfer inhibit growth of Burkitt's lymphoma in a murine model. *J Gene Med* 2006;3:253-64
- 54 Zhu W, Xu W, Jiang R, et al. Mesenchymal stem cells derived from bone marrow favor tumor cell growth *in vivo*. *Exp Mol Pathol* 2006;3:267-74
- 55 Siegel G, Schafer R, Dazzi F. The immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells. *Transplantation* 2009;9 Suppl:S45-9

56 Dwyer RM, Potter-Beirne SM, Harrington KA, et al. Monocyte chemotactic protein-1 secreted by primary breast tumors stimulates migration of mesenchymal stem cells. Clin Cancer Res 2007;17:5020-7

57 Fiedler J, Etzel N, Brenner RE. To go or not to go: Migration of human mesenchymal progenitor cells stimulated by isoforms of PDGF. J Cell Biochem 2004;5:990-8

58 Ries C, Egea V, Karow M, et al. MMP-2, MT1-MMP, and TIMP-2 are essential for the invasive capacity of human mesenchymal stem cells: differential regulation by inflammatory cytokines. Blood 2007;9:4055-63

59 Secchiero P, Melloni E, Corallini F, et al. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand promotes migration of human bone marrow multipotent stromal cells. Stem cells 2008;11:2955-63

60 Spaeth E, Klopp A, Dembinski J, et al. Inflammation and tumor microenvironments: defining the migratory itinerary of mesenchymal stem cells. Gene Ther 2008;10:730-8

61 Varon C, Tatin F, Moreau V, et al. Transforming growth factor beta induces rosettes of podosomes in primary aortic endothelial cells. Mol Cell Biol 2006;9:3582-94

FIGURES LEGENDS

4 colour figures (1-2-3-5) and 1 black and white figure (4)

Figure 1. Trilineage differentiation of MSC. Left panels show differentiation of PM7 and right ones show that of PM24. **A/** Chondrogenic differentiation was visualized by detection of AGG, Col2, Col10 and COMP mRNAs using RT-PCR. **B/** Adipogenic differentiation was visualized by PPAR γ , LPL and FABP4 mRNAs using RT-PCR and Oil Red O staining of lipid droplets on day 0 (**D0**) and 21 (**D21**). **C/** Osteogenic differentiation was visualized by OC, AP, Runx2 and Col1 mRNAs using RT-PCR and Alizarin Red S staining on day 0 (**D0**) and 21 (**D21**). RT-PCR were performed on day 21 as compared to undifferentiated MSC on

day 0 and normalized with RSP9 mRNAs. One representative experiment out of three is presented. Original magnification x50. Scale bar, 10 μ m.

Figure 2. Immunofluorescent staining of epithelial markers in MSC co-cultured with gastro-intestinal epithelial cells *in vitro*. eGFP PM7 cells were cocultured with DsRED epithelial cells (AGS and HT-29 cell lines) for 8 days and fixed for immunofluorescent staining. **A/** Cytokeratins (pCK) or **B/** ESA primary antibodies were revealed with secondary AlexaFluor 647 labelled antibodies, and nuclei were stained with Hoechst 33342 compound. **C/** Three-dimensional reconstruction of confocal laser microscopy imaging. Images shown represent maximum intensity projection on *x-y* of the *z*-stack and the projections of the orthogonal sections (1 and 2 dotted white lines) of the *z*-stack at the right sides of each images. First vertical panel shows colored merge image, whereas following are black and white channels alone. White arrows show MSC fused with epithelial cell and expressing cytokeratins. Scale bar, 10 μ m.

Figure 3. FICTION analysis in a coculture of MSC and AGS cells. eGFP male MSC (PM7) cells were cultured with DsRED female epithelial cells (AGS cell lines) for 8 days and fixed. FISH (Y chromosome revealed with SpectrumGreen and X chromosome with SpectrumOrange) was performed before immunofluorescent staining. Cytokeratins were stained with secondary AlexaFluor 647 labelled antibodies, and nuclei were stained with DAPI. First vertical panel shows colored merge images, whereas following are black and white channels alone. Green arrows show Y chromosomes and red arrow X chromosomes. **A- B/** Male PM7 and female AGS cells have a normal chromosome content consisting of 1 X chromosome and 1 Y chromosome and 2 X chromosomes respectively. In PM7 / AGS cocultured cells: **C/** example of one cell expressing cytokeratins and harboring one male and

one female nuclei; **D/** example of one cell expressing cytokeratins and harboring one nucleus with 1 Y chromosome and 3 X chromosomes and **E/** example of one cell expressing cytokeratins and harboring one nucleus with 1 Y chromosome and one X chromosome. Scale bar, 10 μ m.

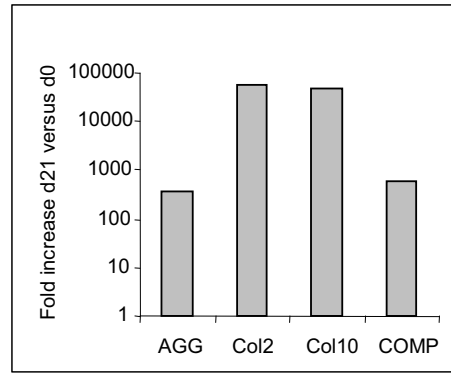
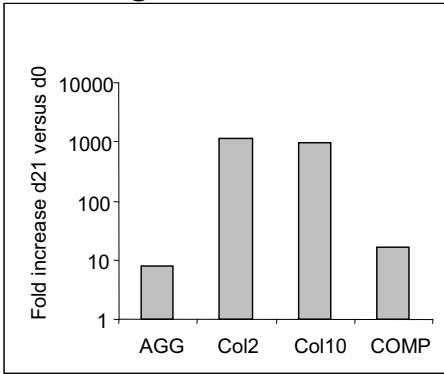
Figure 4. Quantification of fused MSC with epithelial cells. eGFP MSC (PM7) cells were cultured with DsRED epithelial cells (AGS cells) for 8 days, harvested, stained with anti-ESA antibodies and detected by secondary Alexa-647 antibodies and analyzed by flow cytometry. **A/** AGS cells were 74.5% positive for DsRED and 99% positive for ESA staining. **B-C/** eGFP positive cells were gated (left panel) to select MSCs derived cells. Inside eGFP positive cells, DsRED et ESA expressing cells were analyzed. **B/** eGFP PM7 did not express ESA and were negative for DsRED staining. **C/** Coculture of eGFP PM7 and DsRED AGS led to appearance of fused cells with phenotype eGFP⁺, DsRED⁺ and ESA⁺ (6% of eGFP⁺ cells).

Figure 5. FICTION analysis of chromosome content of MSC and AGS cells in tumors resulting from mouse xenograft transplant cells. Male MSC and female AGS cells were injected subcutaneously in NOG mice in matrigel plug. After 50 days, mice were sacrificed and tumors resulting from transplant cells were processed and analyzed by FICTION as previously described. FISH (Y chromosome revealed with SpectrumGreen and X chromosome with SpectrumOrange) was performed before immunofluorescent staining. Cytokeratins were stained with secondary AlexaFluor 647 labelled antibodies, and nuclei were stained with DAPI. First vertical panel shows colored merge images, whereas following are black and white channels alone. **A/** Tumors were composed of human cells expressing cytokeratins and human chromosomes surrounded by mice cells not detected by FICTION probes specific of human chromosomes. **B/** Example of one male-derived cell expressing

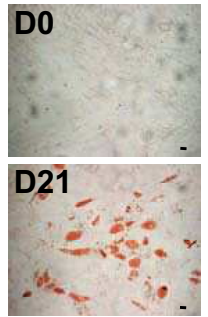
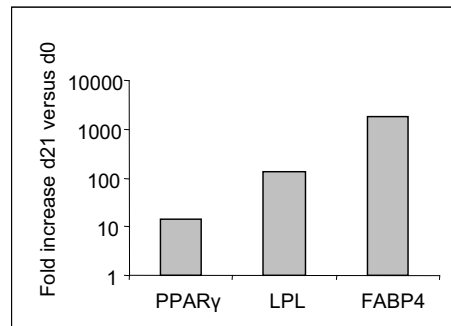
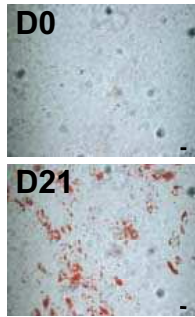
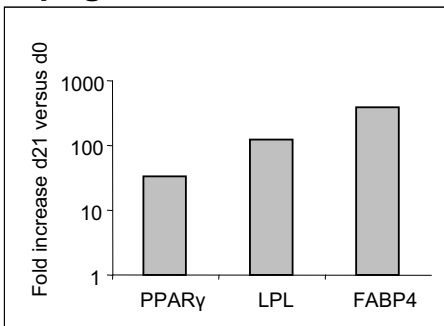
cytokeratins. **C/** Three-dimensional reconstitution of confocal laser scanning microscopy images. Images shown represent maximum intensity projection on *x-y* axis on the *z*-stack and the projections of the orthogonal sections (1 and 2 dotted white lines) of the *z*-stack at the right sides of each images. Male derived cells can exhibit a nucleus with an abnormal content (1 Y chromosome and 2 X chromosome). *Z*-sectionning projection indicate that the three sex chromosomes are on the level of only one nucleus. **D/** FICTION experiment on cells dissociated from tumor after 24h culture *in vitro*. Male derived cells expressing cytokeratins possess abnormal chromosome content but are viable and adhere on coverslips. White bar, 10 μ m.

Figure 1

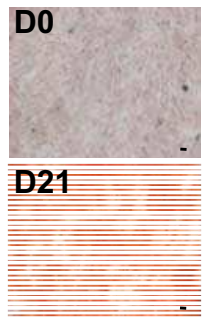
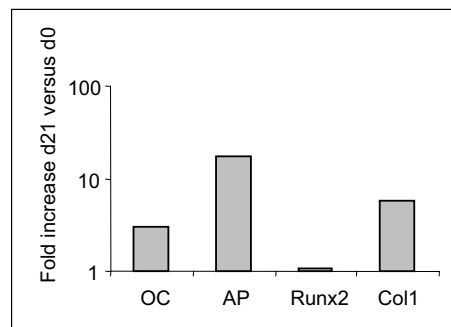
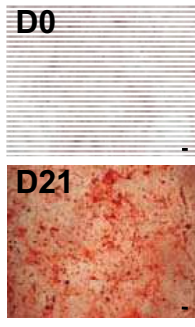
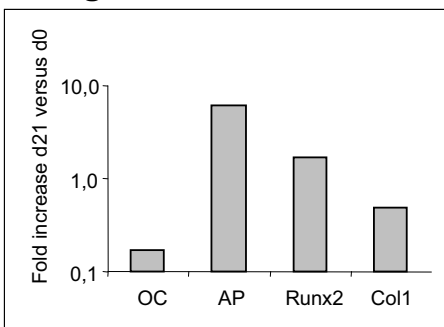
A/ chondrogenic differentiation



B/ adipogenic differentiation



C/ osteogenic differentiation



PM7 hMSC

PM24 hMSC

Figure 2

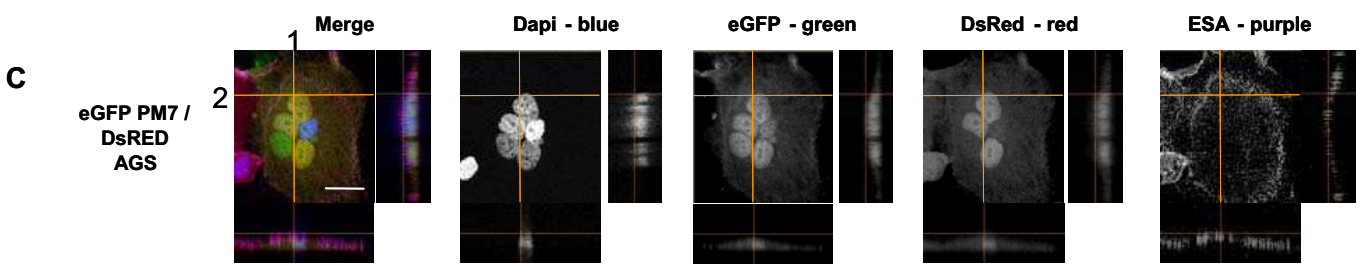
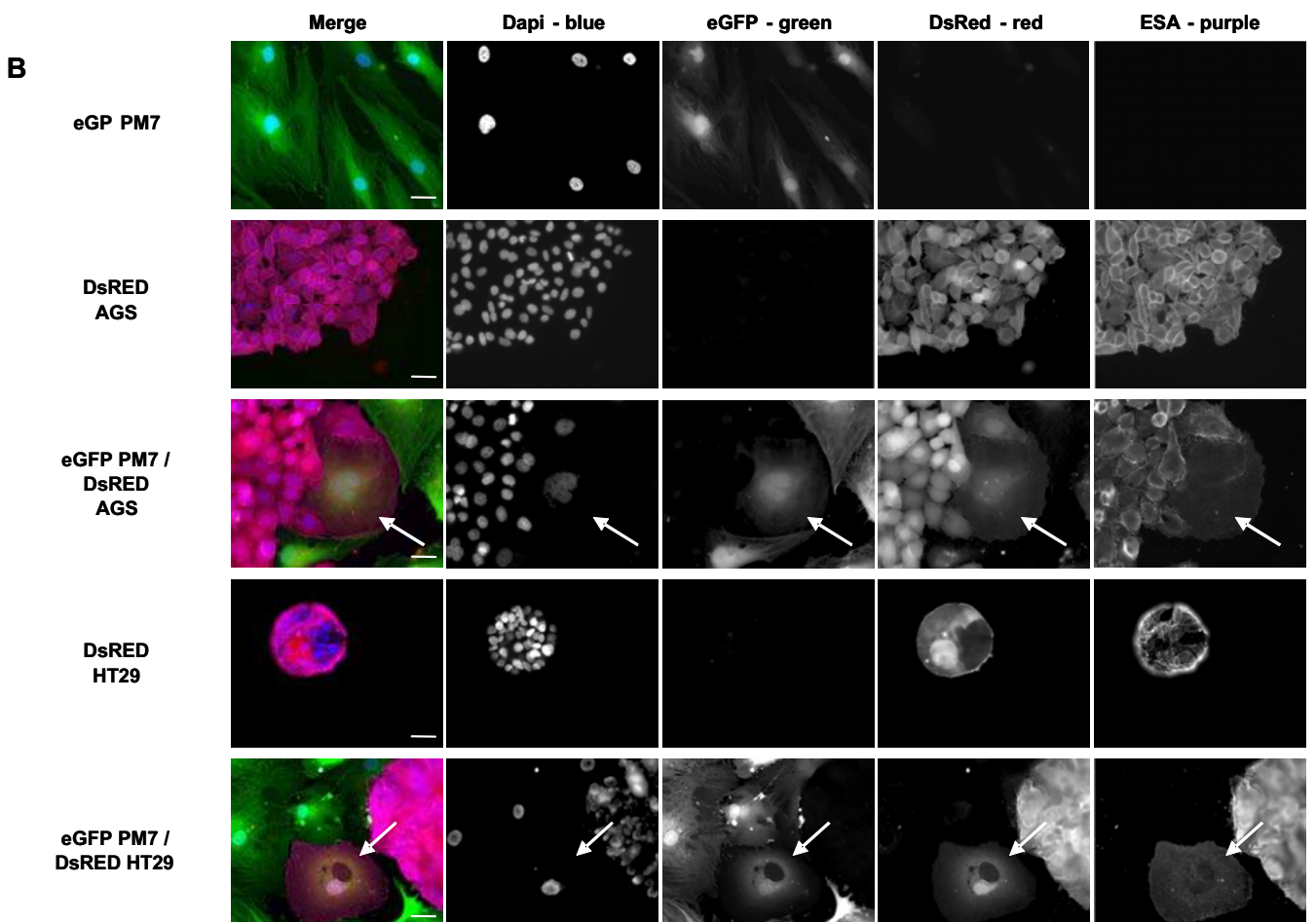
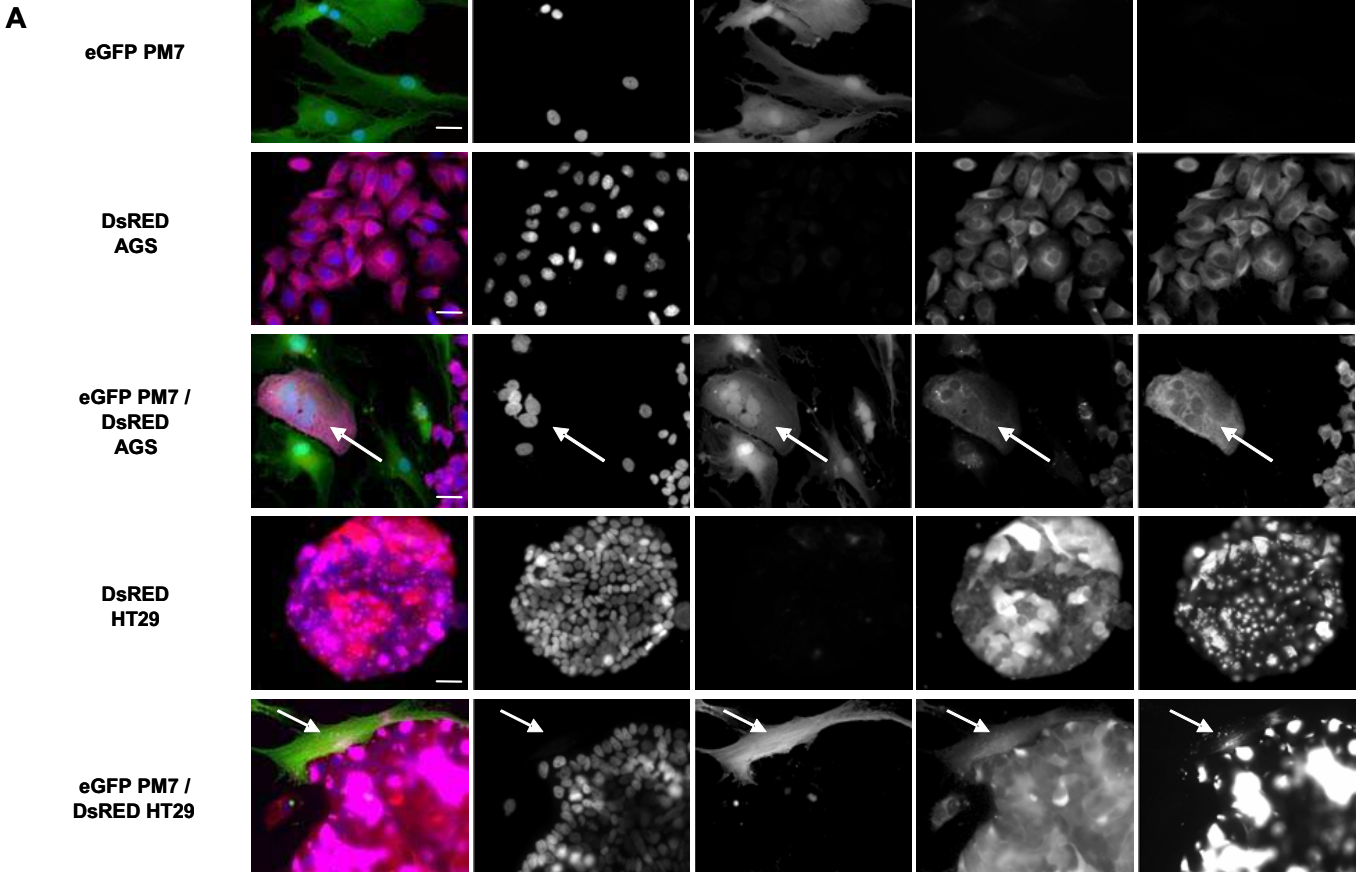


Figure 3

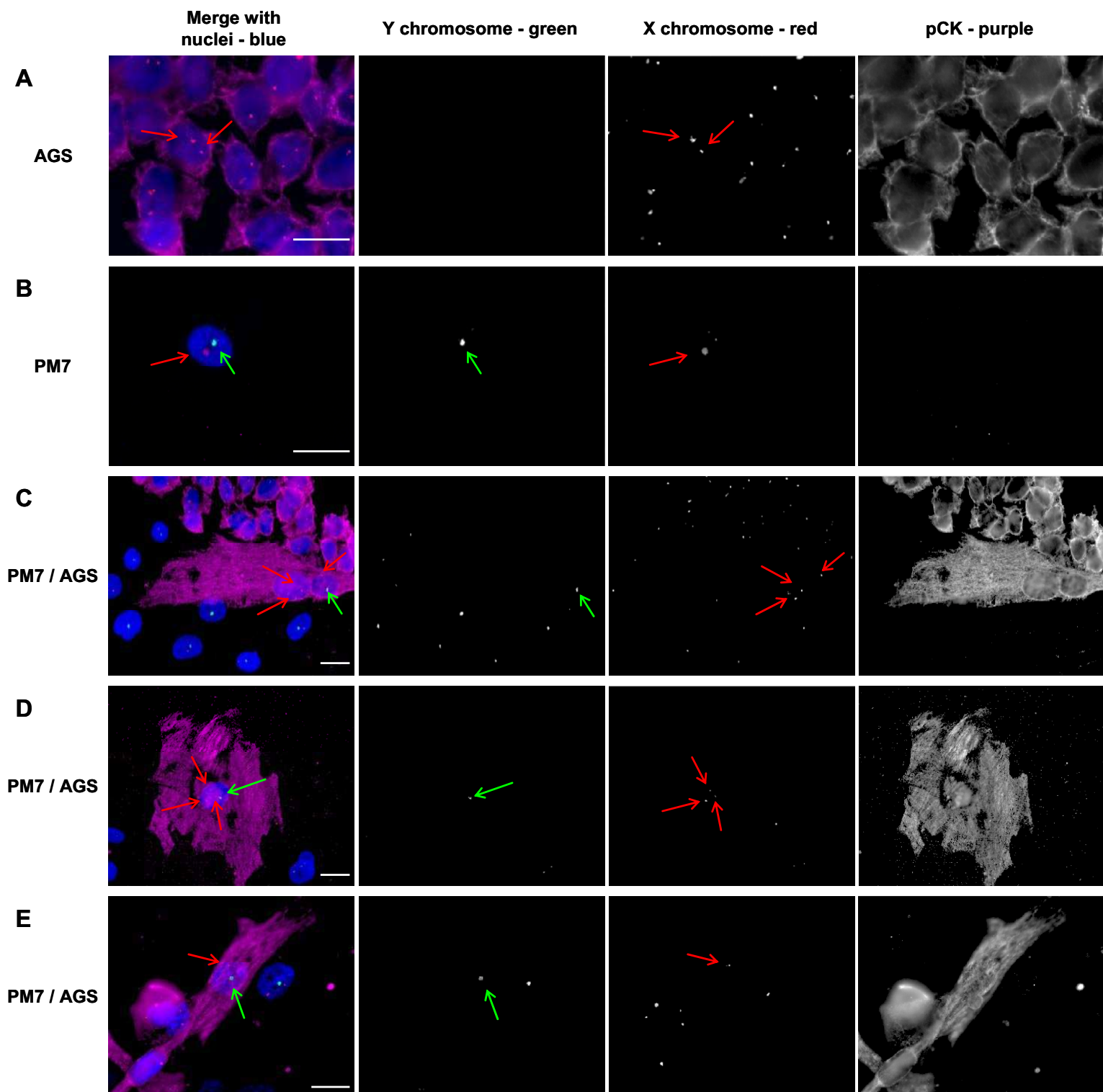


Figure 4

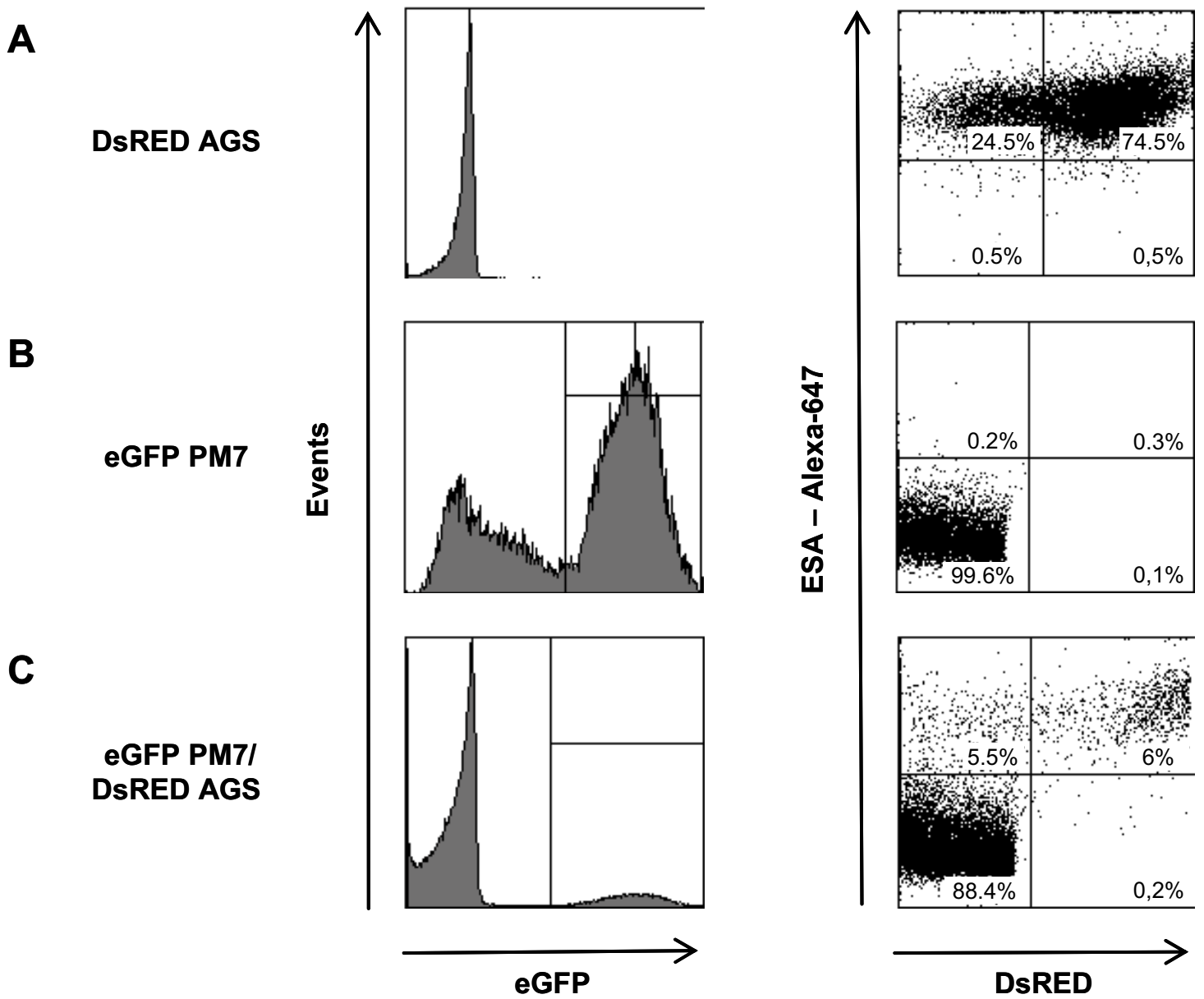
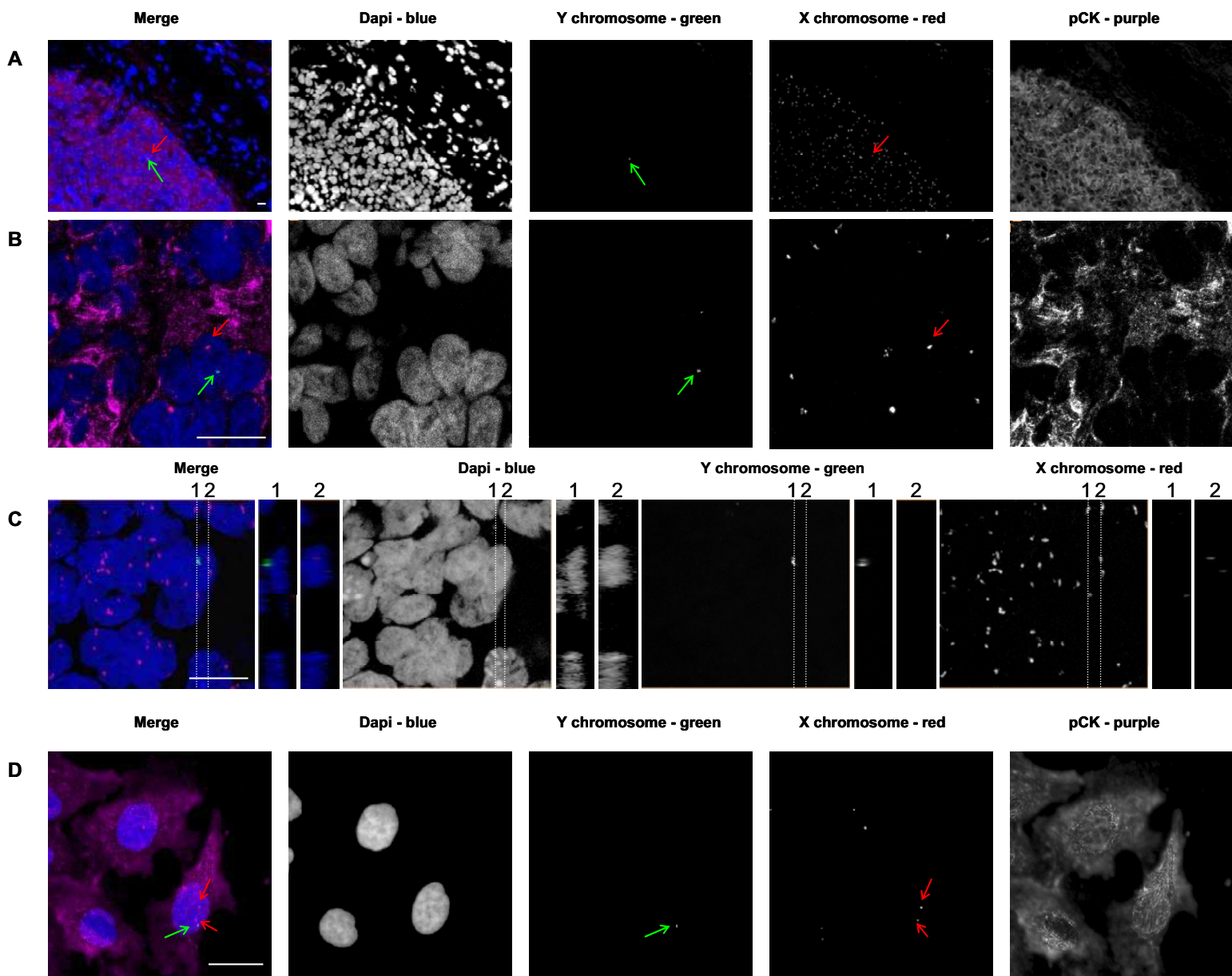


Figure 5



3. Article 2 : *Modulation of lymphocyte proliferation induced by gastric MALT lymphoma-associated H. pylori strains*

Ferrand J, Roumanes D, Pitard V, Moreau JF, Mégraud F et Lehours P

Helicobacter (2008) 13(3): 167-73

Les objectifs de cet article ont été de caractériser les effets sur la prolifération lymphocytaire de souches de *H. pylori* isolées de patients présentant un lymphome gastrique du MALT. La prolifération *in vitro* de lymphocytes humains purifiés à partir d'échantillons sanguins ou d'amygdales a ainsi été mesurée en présence de bactéries viables ou lysées par sonication. Les résultats obtenus ont permis de montrer que les souches de *H. pylori* associées au lymphome gastrique du MALT ne sont pas responsables d'une prolifération anarchique des lymphocytes B *in vitro*. En revanche, la prolifération de lymphocytes T stimulés par de la phytohémagglutinine et de l'IL 2 est inhibée lors de l'infection par *H. pylori*. L'immunosuppression observée pourrait jouer un rôle important dans la colonisation et la persistance bactérienne ainsi que dans l'apparition d'une prolifération non-contrôlée des lymphocytes B à l'origine du lymphome gastrique du MALT.

Modulation of Lymphocyte Proliferation Induced by Gastric MALT Lymphoma-Associated *Helicobacter pylori* Strains

Jonathan Ferrand,*† David Roumanes,†† Vincent Pitard,†† Jean-François Moreau,†† Francis Mégraud*† and Philippe Lehours*†

*INSERM U853, Bordeaux, F 33076 France; †Université Victor Segalen Bordeaux 2, Bordeaux, F 33076 France; ‡CNRS UMR5164, Bordeaux, F 33076 France

Keywords

Helicobacter pylori, gastric MALT lymphoma, lymphocyte, proliferation.

Reprint requests to: Francis Mégraud, INSERM U853, Laboratoire de Bactériologie, Université Victor Segalen Bordeaux 2, 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux cedex, France.

Tel.: 33-[0]5.56.79.59.77;

Fax: 33-[0]5.56.79.60.18;

E-mail: francis.megraud@chu-bordeaux.fr

Abstract

Background: *Helicobacter pylori* infection leads to different chronic diseases, suggesting that this bacterium can evade the host immune defense system. The ability to control lymphocyte proliferation may be a mechanism leading to the development of gastric pathologies. Our aim was to characterize the effects of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) associated *H. pylori* strains on lymphocyte proliferation.

Materials and methods: We measured the in vitro proliferation of human lymphocytes originally from blood or tonsil samples in the presence or absence of viable bacteria or lysates.

Results: We showed that MALT lymphoma-associated strains are not likely to be directly responsible for anarchical B-cell proliferation in vitro. On the other hand, proliferation of prestimulated T lymphocytes was abolished in vitro by the presence of all *H. pylori* strains, whether associated with MALT lymphoma or not.

Conclusion: Inhibition of T-cell proliferation may be of major importance in the gastric colonization and in the persistence of the infection. Furthermore, this inhibition may favor anarchical B-cell proliferation in vivo and predispose the host to gastric MALT lymphoma, whereas MALT-associated *H. pylori* strains do not appear to possess a specific capability to directly stimulate B-lymphocyte proliferation.

Helicobacter pylori is a gram-negative pathogen that colonizes the human gastric mucosa of approximately 50% of the worldwide population. Most of those infected develop a chronic gastritis but many remain asymptomatic. Peptic ulcer disease occurs in only 10% of the infected population, gastric adenocarcinoma in 1%, and gastric mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma in less than 0.1%. Gastric MALT lymphoma is the most prevalent low-grade marginal zone lymphoma and its observation was first made by Isaacson and Wright in 1983 [1]. *H. pylori* infection leads to formation of lymphoid follicles composed of B cells responsible for initiating a clonal expansion of centrocyte-like cells that form the basic histology of MALT lymphoma [2].

Effects of *H. pylori* strains on lymphocyte proliferation may be dual showing either enhancement or inhibition of proliferation [3,4]. Gastric MALT *H. pylori*-associated strains effects are currently unknown.

First, the role of *H. pylori* strains on cell proliferation from low-grade MALT lymphoma patients was studied by

Hussell et al. [4]. When B cells purified from gastric biopsies of MALT lymphoma patients were co-cultured with heat-killed *H. pylori*, a proliferative response was observed. Removal of T cells from the tumor cell suspension abolished proliferation, indicating that tumor cells require T cells for proliferation. The same team also showed that the specificity of the response to *H. pylori* was linked to the tumor-infiltrating T cells, since the tumor B cells alone were unable to respond to the bacteria, suggesting that MALT B-cell proliferation (early in the low grade) is driven by T cells somehow activated by *H. pylori* antigens [5]. These findings were confirmed by showing the importance of Th2 cytokines [6]. In addition, tumor growth may depend on cancer cell evasion from T-cell-mediated cytotoxicity. Gastric T-cell clones from MALT lymphoma showed an impaired cytotoxicity, providing a possible explanation for their enhanced helper activity on B-cell proliferation [7]. Proliferation may create conditions favoring genetic instability and the apparition of structural abnormalities leading to NF- κ B activation and apoptosis protection [8,9].

The model of lymphocyte proliferation developed by Hussell et al. [4] could be a very good model to test different *H. pylori* strains and to identify virulence factors responsible for B-cell proliferation. However, it is currently impossible to reproduce this model because it involves a gastrectomy and antibiotic treatment is now the usual treatment for gastric MALT lymphoma. As the biologic material is therefore no longer available, a new model of lymphocyte proliferation responding to gastric MALT lymphoma-associated *H. pylori* strains needs to be developed to have a better molecular understanding of pathogenesis.

Conversely, several studies have also shown a proliferation-inhibiting capacity of *H. pylori* strains. Gebert et al. demonstrated that bacteria could block proliferation of T cells (Jurkat T cells and peripheral blood lymphocytes: PBL) by inducing a G1/S cell cycle arrest [3]. The vacuolating cytotoxin VacA was incriminated. VacA is a secreted cytotoxin that causes vacuolar degeneration of epithelial cells in vitro and which is believed to play a role in ulcer formation by damaging gastric epithelium. VacA interferes with T-cell activation in vitro by preventing calcium influx and by inhibiting NF-AT activation [10]. A high concentration of VacA (10–20 µg/mL) also inhibits the proliferation of primary human CD4+ T cells [11]. However, the low levels of VacA detected in gastric juice samples (20–800 pg/mL) from *H. pylori*-positive patients contradict these results [12]. Other studies also highlighted an inhibitory effect of *H. pylori*, but the role of VacA was ruled out; the phenomenon was attributed to a noncharacterized protein present in all *H. pylori* strains [13,14]. The immunosuppressive factor, *H. pylori* γ-glutamyl transpeptidase (HPGGT) was recently identified by Schmees et al. [15].

Few data are available concerning the proliferative or antiproliferative properties of gastric MALT lymphoma-associated *H. pylori* strains. Therefore, our aim was to determine the ability of these particular strains to stimulate or to inhibit lymphocyte proliferation, in comparison to strains isolated from patients with ulcers or gastritis. Consequently, we also aimed to determine whether such strains possess specific factors that drive cell proliferation and therefore contribute to MALT lymphoma. We measured the in vitro proliferation of human lymphocytes originally from blood or tonsil samples in the presence or absence of viable bacteria or lysates.

Material and Methods

Bacterial Strains

H. pylori strains J99 and 26695, isolated from patients with peptic ulcer and gastritis and for which the complete genome has been sequenced, were used. *H. pylori* strains called “gastritis” were clinical isolates from gastric biopsy

samples from patients with gastritis [16]. The MALT lymphoma *H. pylori* strains were isolated from gastric biopsy samples taken from patients suffering from low-grade gastric MALT lymphoma [16]. All *H. pylori* strains were cultured on Wilkins–Chalgren agar plates (Oxoid, Dardilly, France) supplemented with human blood (10% v/v) and antibiotics (vancomycin, 10 µg/mL; cefsulodin, 10 µg/mL; trimethoprim, 5 µg/mL; and fungizone, 10 µg/mL) under microaerobic conditions. Broth cultures were carried out in brucella broth supplemented with fetal calf serum (FCS) (Gibco, Invitrogen, Cergy Pontoise, France) (10% v/v) and vancomycin (50 µg/mL).

The *Escherichia coli* strain was isolated from a patient at the Bordeaux University Hospital (Bordeaux, France) on bromocresolpurple agar plates (bioMérieux, Marcy l’Etoile, France). *Campylobacter jejuni* type strain CIP 70.2 was cultured on blood agar plates under microaerobic conditions (bioMérieux).

For lysates, *H. pylori* strains were grown on agar plates at 37°C for 48 hours (24 hours for *E. coli* and *C. jejuni*), washed in phosphate-buffered saline (PBS, Invitrogen), and adjusted to OD_{600nm} = 1 (corresponding to 2 × 10⁸ CFU/mL) in PBS. Bacteria were sonicated (Vibra Cell, Sonics and Materials, Meryin/Satigny, Switzerland) for eight cycles of 1 minute on ice (power 4, frequency 70%). Lysates were spun down at 11 000 g for 10 minutes to remove remaining cells and debris. Protein content of the supernatants was measured using the Bradford assay (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). Lysates were used at a final concentration of 20 µg/mL, after heat inactivation (70 °C for 20 minutes, 56 °C for 4 hours) or after trypsin digestion (0.025% w/v, 30 minutes) (Invitrogen).

Lymphocytes Sources

Lymphocytes were purified from tonsil samples obtained at the Ear, Nose and Throat Department of Bordeaux University Hospital or from peripheral blood samples (peripheral blood lymphocytes) obtained from normal blood donors (Etablissement Français du Sang Aquitaine Limousin, Bordeaux, France).

Tonsillar lymphocytes and PBL were isolated by Ficoll density-gradient centrifugation (Lymphoprep, Abcys, Paris, France). The lymphocyte layer was aspirated, washed in PBS, and resuspended in RPMI 1640 supplemented with 8% FCS and antibiotics (penicillin, 100 U/mL; streptomycin, 100 µg/mL). In addition, vancomycin (50 µg/mL) was added for tonsil cells.

Cell Proliferation Assays

One million viable PBL or 2.5 × 10⁵ tonsil lymphocytes were incubated in 24-well plates in 1 mL of RPMI 1640

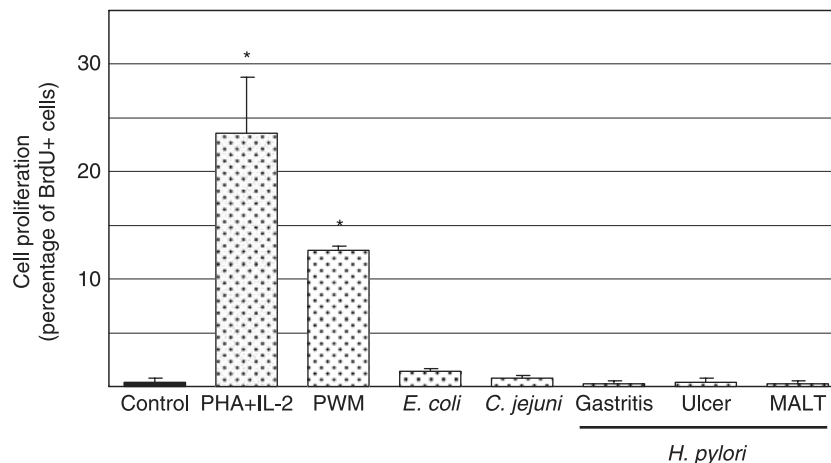


Figure 1 Effects of bacterial *Helicobacter pylori* lysates on peripheral blood lymphocyte (PBL) proliferation. The effects of bacterial *Helicobacter pylori* lysates were studied on PBL proliferation. *H. pylori* lysates were obtained from five gastritis strains including the reference strain 26695, the reference ulcer strain J99, and 14 gastric MALT lymphoma strains. Lymphocytes were purified from human blood samples and incubated with bacterial lysates (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Proliferation was determined by BrdU incorporation after 48 hours. Effects of lysates were compared to unstimulated PBL (in PBS only) and stimulated PBL in presence of mitogens: PHA+IL-2 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 20 IU/mL, respectively) for T cells and pokeweed mitogen (PWM) (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for B cells. Quantification values correspond to the means of four different experiments with standard deviations. *: $p < .05$ as compared to the control.

supplemented with 8% FCS and antibiotics (penicillin, 100 U/mL; streptomycin, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), with bacteria in their exponential growth phase at a multiplicity of infection of 20 (MOI 20) corresponding to 20×10^6 bacteria for purified PBL (or 50×10^5 for tonsil cells), or with sonicated bacteria (20 μg protein/mL). The concentrations of bacteria or lysates were adjusted in order to obtain the same dilution factor for each condition.

T- and B-cell activators were used: 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ phytohemagglutinin (PHA, Sigma, Lyon, France) associated with 20 IU/mL of interleukin 2 (IL-2) (Chiron, Suresnes, France) or 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of pokeweed mitogen (PWM) (Sigma).

After a 48-hour incubation, cell proliferation was measured by flow cytometry following bromodeoxyuridine (BrdU) incorporation (BrdU Flow Kit, BD Biosciences, Le Pont de Claix, France). Cells were stained with an FITC-anti-BrdU monoclonal antibody before assessment of fluorescence intensity with an FACSCalibur apparatus (BD Biosciences) using the CELLQUEST software (BD Biosciences). To determine background staining by the FITC-conjugated antibody, cells were cultured in the absence of BrdU but stained with anti-BrdU fluorescent antibodies. Compared to this negative control, cells that showed a positive fluorescence were considered to synthesize DNA and to proliferate. Statistical significance (indicated by an asterisk) was determined using the Student's *t*-test.

To determine the nature of proliferating T cells by flow cytometry, we used phycoerythrin-conjugated anti-CD3 antibody (BD Biosciences) according to the manufacturer's instructions.

Results

Direct Role of *H. pylori* on Stimulation of Lymphocyte Proliferation

H. pylori's ability to induce lymphocyte proliferation was tested on PBL and tonsillar lymphocytes. We examined the effect of 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ samples of lysates from 14 strains associated with MALT lymphoma, four strains associated with chronic gastritis, and the two reference strains J99 and 26695. Normal PBL were obtained from four individuals including two *H. pylori* positives. *H. pylori* status was determined by ELISA Pyloriset EIA-G III (Kit Orion Diagnostica, Espoo, Finland). The results are presented in Fig. 1. As a positive control, lymphocyte proliferation was measured after 48 hours of culture in the presence of PHA and IL-2 for T cells or PWM alone for B cells (BrdU-positive cell mean of $23.58 \pm 5.27\%$ for PHA+IL-2 and $12.62 \pm 0.49\%$ for PWM; $p < .05$ when compared to unstimulated lymphocytes). After 48 hours of culture with lysates, 1.34 \pm 0.37% of the total cells were BrdU positive in the presence of *E. coli*, 0.79 \pm 0.19% for *C. jejuni*, 0.26 \pm 0.23% for gastritis-associated *H. pylori* strains, 0.38 \pm 0.39% for J99, and 0.24 \pm 0.24% for MALT-associated strains. In comparison, 0.26 \pm 0.30% of the total cells were BrdU positive when challenged with PBS alone. These results were not statistically significant, with a $p > .05$ for all of the bacterial strains tested. Similar results were obtained with PBL co-cultured with viable (MOI = 20) or with tonsil lymphocytes co-cultured with lysates or viable bacteria (data not shown). To avoid the risk of excessive protein

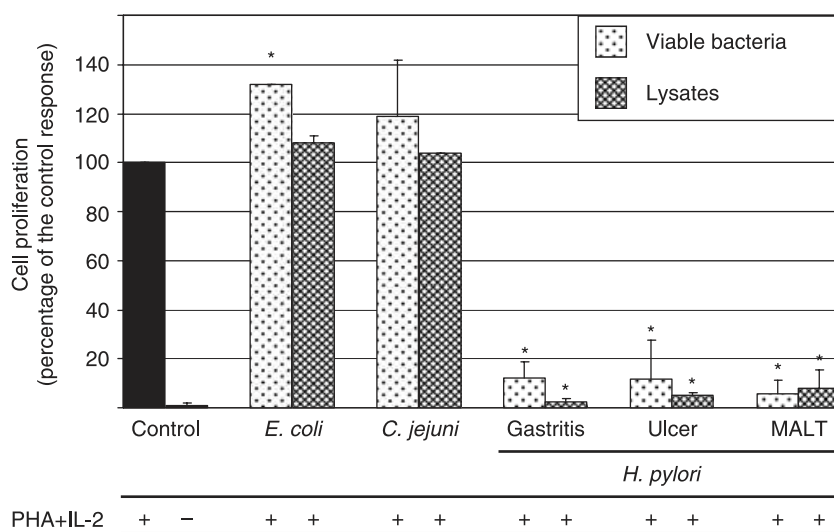


Figure 2 Effects of bacterial *Helicobacter pylori* lysates on peripheral blood lymphocyte (PBL) proliferation inhibition. PBLs were stimulated with PHA+IL-2 (1 µg/mL and 20 IU/mL) and further co-incubated with lysates (20 µg) or viable bacteria (MOI = 20). Proliferation was determined by BrdU incorporation after 24 hours of co-culture. *Helicobacter pylori* lysates were obtained from five gastritis strains including the reference strain 26695, the reference ulcer strain J99, and 17 gastric MALT lymphoma strains. Results are expressed as the percentage of the proliferative response obtained in the presence of lysate or viable bacteria compared to the 100% obtained without bacterial components for six blood samples. *: $p < .05$ as compared to the stimulated control.

lysate concentrations that could promote an inhibitory effect instead of a proliferative one, proliferation assays were first performed with a range of lysate concentrations from 0.5 to 20 µg/mL. Even at the lower concentration, no proliferation was observed (data not shown).

Direct Role of *H. pylori* on Inhibition of T-lymphocyte Proliferation

The ability of MALT lymphoma-associated *H. pylori* strains to inhibit T-cell proliferation was examined next, after setting up a specific T-cell proliferation assay based on PHA polyclonal proliferation in the presence of recombinant human IL-2. After a 48-hour incubation in the presence of PHA+IL-2, 20.13 ± 0.92% of the total cells were BrdU positive. Among these proliferating cells, 83.50 ± 0.50% were CD3 positive and were consequently considered as proliferating T lymphocytes. At the culture onset, T cells corresponded to 74.53 ± 0.02% of the total cells and were verified as not proliferating in the absence of PHA+IL-2.

Seventeen viable *H. pylori* strains (MOI = 20) associated with MALT lymphoma were tested on PHA+IL-2-activated PBL and compared to five viable gastritis-associated strains (including 26695), J99, and *E. coli* and *C. jejuni* control strains. PBL were obtained from six patients, including three *H. pylori* positives. Results are expressed as the percentage of proliferation obtained in the presence of the added bacteria compared to 100% when the proliferation was obtained with PHA+IL-2 alone (Fig. 2). The percentage of proliferating cells after T-cell stimulation and co-incubation with viable bacteria was 5.5 ± 5.7% ($p = 2 \times 10^{-8}$) for MALT strains, 12.4 ± 6.4% ($p = 6 \times 10^{-4}$) for gastritis strains, and 11.7 ± 15.7% ($p = 8 \times 10^{-3}$) for the ulcer-associated strain, whereas unstimulated cells did not proliferate (1.06 ± 1.02%

of positive controls, $p = 6 \times 10^{-7}$). In contrast, *E. coli* or *C. jejuni* did not lead to an inhibition of lymphocyte proliferation induced by the addition of PHA+IL-2, but to its potentiation (131.7 ± 0.25% ($p = 6 \times 10^{-5}$) and 119 ± 22.7% ($p = .4$, none statistically significant), respectively). As the inhibition of lymphocyte proliferation induced by *H. pylori* could be linked to an impoverishment of the medium due to the bacteria itself, lymphocytes were then co-cultured with bacterial lysates. Thirteen *H. pylori* lysates from MALT strains, six from gastritis strains and one from J99 were tested on PBL from four patients, including two *H. pylori* positive (Fig. 2). The mean percentage of BrdU-positive cells was 8.2 ± 7.4% ($p = 1.5 \times 10^{-5}$) for the MALT lysates, 2.2 ± 1.4% ($p = 2 \times 10^{-4}$) for the gastritis lysates, and 5.1 ± 0.7% ($p = 2 \times 10^{-4}$) for the J99 lysate, compared to 100% for the positive control. In comparison, proliferation rates obtained with lysates from *E. coli* and *C. jejuni* were similar again 107.9 ± 3.1% ($p = .12$) and 104 ± 0.0% ($p = .09$), respectively, compared to the positive control.

In order to check whether the inhibition of proliferation could be due to an artifactual death of the cells, they were stained with trypan blue after 48 hours of co-culture with lysates or viable bacteria. No difference between the death rates under all of the conditions tested: PBS alone, lysates, or viable bacteria, was observed (average of 26 ± 10% dead cells).

In addition, because proliferation inhibition could be due to a cross-linking between *H. pylori* and the T-cell activator PHA, resulting in a decreased availability of the mitogen for the lymphocytes, the inhibitory effect of lysates and viable bacteria was evaluated by its addition to the culture medium 24 hours after addition of PHA+IL-2. Under these conditions, the inhibition of lymphocyte proliferation after co-culture for another 24 hours was not

altered and was comparable to the aforementioned conditions ($56 \pm 5.9\%$ inhibition compared to the positive control, data not shown).

Characterization of the Factor Inhibiting T-lymphocyte Proliferation

Since the crude proliferation inhibitory actions of MALT-associated *H. pylori* strains were similar, the results of inhibitory assays of four different strains (three MALT lymphoma strains and the reference strain J99) were pooled. The inhibitory effects on PBL proliferation were tested after various chemical or physical treatments. The proliferation was restored to nearly 70% of the positive control ($p = 5 \times 10^{-4}$) after only 30 minutes in trypsin at 0.025%, which suggests a trypsin-resistant residual inhibitory activity in comparison to the control. However, there was no significant difference between trypsin alone and trypsin-digested lysates ($p = .59$, not shown). The inhibitory effect also disappeared after heat inactivation for 4 hours at 56 °C or 20 minutes at 70 °C. Indeed, addition of the previously treated lysates had no effect on T-lymphocyte proliferation as it was restored to a level close to the positive control (PHA+IL-2) and was statistically significant when compared to stimulated lymphocytes incubated with untreated lysates ($p = 9 \times 10^{-5}$ and 1×10^{-9} for 56 °C and 70 °C heat inactivated lysates) (Fig. 3).

Discussion

Although the causal role of *H. pylori* chronic infection in the development of gastric MALT lymphoma has been clearly proven, the mechanism of immune defense evasion remains unknown. The use of a model of lymphocyte proliferation induced by *H. pylori* strains was therefore central to the study of *H. pylori* infection in general and of the gastric MALT lymphoma mechanism in particular.

Based on the work of Hussell et al., PBL and tonsil cell proliferation was tested in the presence of various *H. pylori* strains, including numerous strains isolated from MALT lymphoma patients [4]. In contrast to this previous study, no lymphocyte proliferation was observed in our co-culture model with viable bacteria or bacterial lysates. Several hypotheses can be proposed to explain this discrepancy.

First, the lymphocytes tested by Hussell et al. were originated from stomach walls and were obtained during gastrectomy surgery on patients suffering from MALT lymphoma, whereas the lymphocytes used in the present study were purified from blood or tonsil samples from normal subjects. Indeed, lymphocytes present in gastric MALT lymphoma tumors are essentially B cells [17], whereas PBL are essentially T cells and tonsil lymphocytes have the same proportion of both B and T cells [18].

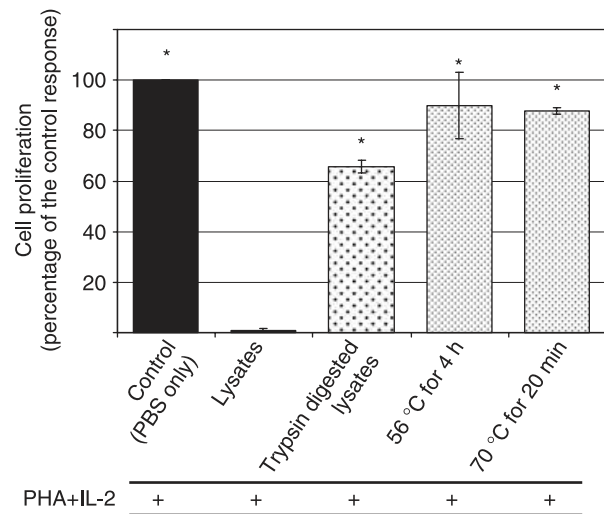


Figure 3 Effects of protease and heating on the inhibition properties of *H. pylori* lysates. Peripheral blood lymphocytes (PBL) were stimulated with PHA+IL-2 and further co-incubated with 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of *H. pylori* lysates (three gastric MALT-associated strains and J99) after various treatments. Protease digestion was carried out using trypsin for 30 minutes. The samples were heated for 4 hours at 56 °C or for 20 minutes at 70 °C. Proliferation was determined by BrdU incorporation after 24 hours of co-culture. Results are expressed as the percentage of the proliferative response obtained in the presence of lysate compared to the 100% obtained without bacterial components for one blood sample. *: $p < .05$ as compared to stimulated lymphocytes incubated with untreated lysates.

Because similar results were obtained between our two sources of lymphocytes, the absence of proliferation could not be explained by a low level of B cells present in our biologic tissues.

Second, a possible and simple reason for the discrepancy in Hussell et al.'s study is that they used heat-killed *H. pylori* instead of lysates or viable bacteria. We believe that sonication results in a better disruption of bacteria than heat killing because the risk of protein denaturation is lower. We also verified that our lysates always possessed some enzymatic activities like urease and catalase. Finally, on a limited number of heat-killed bacteria, similar results to lysates and viable bacteria were obtained (data not shown).

Third, the spectrum of cell responses displayed by lymphocytes from peripheral blood does not necessarily reflect the pattern of cell responses displayed by lymphocytes present at the site of infection. Di Tommaso et al. analyzed the specificity and functions of CD4+ T lymphocytes from both peripheral blood and gastric biopsies of patients with chronic *H. pylori* infection, but not of patients with MALT lymphoma [19]. They suggested that there was no compartmentalized expansion of T cells with a particular specificity and function at the site of tissue injury, as

demonstrated for other infections such as hepatitis C [20], and that *H. pylori*-specific CD4 T cells are detectable both in the peripheral blood and in the gastric mucosa of infected patients [19]. If indeed the ability of lymphocytes to proliferate in the presence of *H. pylori* was restrained to bacteria-specific cells, it should have been feasible to obtain a proliferation model on PBL from infected patients. However, this may not be the case as we did not observe any difference between T lymphocytes from infected or noninfected individuals.

Fourth, differences could be due to the genetic background of the patients. Lymphocytes purified from MALT lymphomas may possess genetic or phenotypic differences compared to those from healthy patients used here. However, we tested the proliferation ability of infected lymphocytes from an *H. pylori*-positive patient with MALT lymphoma. Lymphocytes were collected from antral and fundic biopsies, but we obtained too few lymphocytes to carry out meaningful experiments. Nevertheless, one *H. pylori* MALT lymphoma strain was tested on these lymphocytes and did not lead to a significant proliferation (not shown). Such an exciting approach can only be done after partial or total gastric mucosal resection and therefore cannot be proposed for ethical reasons.

Finally, the cytokinic and cellular environment present in the gastric wall must be considered. A Th2 response (IL-4, IL-10) seems to be important in the context of gastric MALT lymphoma [6]. Indeed, BALB/c mice in which a Th2 response is predominant are a good model of *Helicobacter* infection, including *H. pylori* infection, leading to gastric MALT lymphoma [21]. Conversely, a Th1 response (IFN- γ , TNF- α , IL-12) is believed to be more frequently associated with peptic ulcer disease [7,22]. Moreover, studies have shown that the presence and number of dendritic cells are closely linked with gastric MALT lymphoma and, in particular, with the predictive treatment outcome [23].

The combination of these observations indicates that a more complex in vitro model of lymphocyte proliferation, which would include antigen presenting cells like dendritic cells and/or addition of Th2 cytokines in the culture medium, should be developed to better understand the pathomechanism of *H. pylori* infection.

On the other hand, the persistence of *H. pylori* infection appears to be a prerequisite for the development of gastric pathologies, particularly for gastric MALT lymphoma. Previous studies showed that *H. pylori* suppresses the in vitro proliferative response of human T cells to mitogens, but the ability of MALT-associated strains to do so was not evaluated, and the importance of this mechanism in this cancer is not known.

The inhibition of proliferation observed in this study was not related to a particular bacterial strain class (ulcer,

gastritis, or MALT-associated strains), leading to the conclusion that these bacteria contain a ubiquitous moiety mediating this effect.

Because this effect was observed with sonicates as well as with viable bacteria, a toxic role of sonicates can be excluded. In this study, the inhibition of lymphocyte proliferation was not correlated with cellular death, as suggested by Betten et al. [24]. The mechanism is presumably similar to that described by Gebert et al., i.e. a G1 phase T-cell arrest [3]. A hypothesis to explain this arrest is an IL-2 depletion [25]. However, according to Schmees et al., our study does not confirm this conclusion since the culture medium was supplemented with a saturated amount of exogenous IL-2 [15]. In this context, we can conclude that all of the *H. pylori* strains, even those associated with gastric MALT lymphoma, are able to inhibit T-cell proliferation. The immunosuppressive factor could be *H. pylori* γ -glutamyl transpeptidase, recently identified by Schmees et al. [15].

The *H. pylori* inhibitory effect on T lymphocytes may be of major importance in gastric colonization and persistence of the infection. Concerning *H. pylori* infection and, in particular, gastric MALT lymphoma, an inhibition of T-cell proliferation may lead to an unregulated B-cell proliferation and may easily predispose the host to developing the disease. Indeed, the importance of modulations in T-cell regulation has already been shown in vivo in gastric MALT lymphoma tumor-infiltrating T cells which have an impaired cytotoxicity [26]. Therefore, an impaired cytotoxic regulation of B-cell growth associated with an inhibition of T-cell proliferation may well play an important role in lymphoma development. Furthermore, the combination of both proliferative and antiproliferative properties could lead to an imbalanced induction and proliferation of B cells, increasing the risk of neoplastic transformation and the development of low-grade gastric MALT lymphoma.

Further studies focusing on the genetic background, the role of cytokines and the cellular context are required to explain the mechanism underlying this disease.

The study was financially supported by the Institut de Recherche des Maladies de l'Appareil Digestif (IRMAD), the Association pour la Recherche contre le Cancer (ARC) as well as the Conseil Régional d'Aquitaine. The authors would like to thank Dr Devars from the ENT Department of Bordeaux Hospital for providing tonsils and Dr Ferrer from the Etablissement Français du Sang Aquitaine-Limousin.

References

- 1 Isaacson P, Wright DH. Malignant lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue. A distinctive type of B-cell lymphoma. *Cancer* 1983;52:1410–6.
- 2 Ahmad A, Govil Y, Frank BB. Gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Am J Gastroenterol* 2003;98:975–86.

- 3 Gebert B, Fischer W, Weiss E, Hoffmann R, Haas R. *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin inhibits T lymphocyte activation. *Science* 2003;301:1099–102.
- 4 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* 1993;342:571–4.
- 5 Hussell T, Isaacson PG, Crabtree JE, Spencer J. *Helicobacter pylori*-specific tumour-infiltrating T cells provide contact dependent help for the growth of malignant B cells in low-grade gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue. *J Pathol* 1996;178:122–7.
- 6 Greiner A, Knorr C, Qin Y, et al. 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;150:1583–93.
- 7 D'Elisio MM, Amedei A, Manghetti M, et al. Impaired T-cell regulation of B-cell growth in *Helicobacter pylori*-related gastric low-grade MALT lymphoma. *Gastroenterology* 1999;117:1105–12.
- 8 Auer IA, Gascoyne RD, Connors JM, et al. t(11;18)(q21;q21) is the most common translocation in MALT lymphomas. *Ann Oncol* 1997;8:979–85.
- 9 Uren AG, O'Rourke K, Aravind LA, et al. Identification of paracaspases and metacaspases: two ancient families of caspase-like proteins, one of which plays a key role in MALT lymphoma. *Mol Cell* 2000;6:961–7.
- 10 Boncristiano M, Paccani SR, Barone S, et al. The *Helicobacter pylori* vacuolating toxin inhibits T cell activation by two independent mechanisms. *J Exp Med* 2003;198:1887–97.
- 11 Sundrud MS, Torres VJ, Unutmaz D, Cover TL. Inhibition of primary human T cell proliferation by *Helicobacter pylori* vacuolating toxin (VacA) is independent of VacA effects on IL-2 secretion. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:7727–32.
- 12 Shirasaka D, Aoyama N, Sakashita M, et al. Relationship between gastric ulcer and *Helicobacter pylori* VacA detected in gastric juice using bead-ELISA method. *Helicobacter* 2002;7:281–6.
- 13 Gerhard M, Schmees C, Volland P, et al. A secreted low-molecular-weight protein from *Helicobacter pylori* induces cell-cycle arrest of T cells. *Gastroenterology* 2005;128:1327–39.
- 14 Knipp U, Birkholz S, Kaup W, Opferkuch W. Partial characterization of a cell proliferation-inhibiting protein produced by *Helicobacter pylori*. *Infect Immun* 1996;64:3491–6.
- 15 Schmees C, Prinz C, Treptau T, et al. Inhibition of T-cell proliferation by *Helicobacter pylori* gamma-glutamyl transpeptidase. *Gastroenterology* 2007;132:1820–33.
- 16 Lehours P, Menard A, Dupouy S, 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* 2004;72:880–8.
- 17 Matsushima Y, Kinoshita Y, Fukui H, et al. Immunological and molecular analysis of B lymphocytes in low-grade MALT lymphoma of the stomach. Are there any useful markers for predicting outcome after *Helicobacter pylori* eradication? *J Gastroenterol* 2002;37:428–33.
- 18 Hsu SM, Cossman J, Jaffe ES. Lymphocyte subsets in normal human lymphoid tissues. *Am J Clin Pathol* 1983;80:21–30.
- 19 Di Tommaso A, Xiang Z, Bugnoli M, et al. *Helicobacter pylori*-specific CD4+ T-cell clones from peripheral blood and gastric biopsies. *Infect Immun* 1995;63:1102–6.
- 20 Minutello MA, Pileri P, Unutmaz D, et al. Compartmentalization of T lymphocytes to the site of disease: intrahepatic CD4+ T cells specific for the protein NS4 of hepatitis C virus in patients with chronic hepatitis C. *J Exp Med* 1993;178:17–25.
- 21 Mueller A, O'Rourke J, Grimm J, et al. Distinct gene expression profiles characterize the histopathological stages of disease in *Helicobacter*-induced mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:1292–7.
- 22 Bamford KB, Fan X, Crowe SE, et al. Lymphocytes in the human gastric mucosa during *Helicobacter pylori* have a T helper cell 1 phenotype. *Gastroenterology* 1998;114:482–92.
- 23 Mueller A, O'Rourke J, Chu P, et al. 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.
- 24 Betten A, Bylund J, Christophe T, et al. A proinflammatory peptide from *Helicobacter pylori* activates monocytes to induce lymphocyte dysfunction and apoptosis. *J Clin Invest* 2001;108:1221–8.
- 25 Meyer F, Wilson KT, James SP. Modulation of innate cytokine responses by products of *Helicobacter pylori*. *Infect Immun* 2000;68:6265–72.
- 26 Koulis A, Diss T, Isaacson PG, Dogan A. Characterization of tumor-infiltrating T lymphocytes in B-cell lymphomas of mucosa-associated lymphoid tissue. *Am J Pathol* 1997;151:1353–60.

4. Article 3 : *Evaluation of the clinical significance of homB, a novel candidate marker of Helicobacter pylori strains associated with peptic ulcer disease*

Oleastro M, Cordeiro R, Ferrand J, Nunes B, Lehours P, Carvalho-Oliveira I, Mendes A. I, Penque D, Monteiro L, Megraud F et Menard A

The Journal of Infectious Diseases (2008) 198(9): 1379-87

Les objectifs de cet article ont été d'étudier l'importance clinique de l'expression du gène *homB* par *H. pylori*. L'étude de 190 souches de *H. pylori* a permis de montrer que la présence de *homB* est significativement associée à l'ulcère peptique chez l'enfant et l'adulte. Le gène *homB* est également associé à la présence des gènes *cagA*, *babA2*, *vacAs1*, *hopQI* et *oipA* « on » codant des facteurs de virulence connus de *H. pylori*. Enfin, des souches de *H. pylori* inactivées pour le gène *homB* présentent une capacité à induire une sécrétion d'IL 8 par les cellules épithéliales gastriques humaines réduite, ainsi que des capacités d'adhérence limitées. Ainsi, *homB* peut être considéré comme un comarqueur des souches de *H. pylori* associées avec l'ulcère peptique. Ces résultats suggèrent fortement que la protéine HomB est impliquée dans l'adhérence bactérienne et dans la réponse inflammatoire des cellules épithéliales, constituant ainsi un nouveau facteur de virulence putatif.

Evaluation of the Clinical Significance of *homB*, a Novel Candidate Marker of *Helicobacter pylori* Strains Associated with Peptic Ulcer Disease

Mónica Oleastro,^{1,4} Rita Cordeiro,¹ Jonathan Ferrand,^{4,5} Baltazar Nunes,³ Philippe Lehours,^{4,5} Isabel Carvalho-Oliveira,² Ana I. Mendes,² Deborah Penque,² Lurdes Monteiro,¹ Francis Mégraud,^{4,5} and Armelle Ménard^{4,5}

Departamento de ¹Doenças Infecciosas and ²Genética and ³Departamento de Epidemiologia, Instituto Nacional Saúde Dr Ricardo Jorge, Lisbon, Portugal; ⁴INSERM U853 and ⁵Laboratoire de Bactériologie, Université Victor Segalen Bordeaux 2, Bordeaux, France

Background. *homB* codes for a putative *Helicobacter pylori* outer membrane protein and has previously been associated with peptic ulcer disease (PUD) in children.

Methods. A total of 190 *H. pylori* strains isolated from children and adults were studied to evaluate the clinical importance of the *homB* gene. In vitro experiments were performed to identify HomB mechanisms of bacterial pathogenicity.

Results. Characterization of the isolates demonstrated that *homB* was significantly associated with PUD in 86 children (odds ratio [OR], 7.64 [95% confidence interval {CI}, 2.65–22.05]) and in 32 adults ≤ 40 years of age (OR, 11.25 [95% CI, 1.86–68.13]). *homB* was correlated with the presence of *cagA*, *babA2*, *vacAs1*, *hopQI*, and *oipA* “on” genotype ($P < .001$). The HomB protein was found to be expressed in the *H. pylori* outer membrane and was noted to be antigenic in humans. *H. pylori homB* knockout mutant strains presented reduced ability to induce interleukin-8 secretion from human gastric epithelial cells, as well as reduced capacity to bind to these cells. Both of these functions correlated with the number of *homB* copies present in a strain.

Conclusion. *homB* can be considered a comarker of *H. pylori* strains associated with PUD. Moreover, results strongly suggest that HomB is involved in the inflammatory response and in *H. pylori* adherence, constituting a novel putative virulence factor.

Helicobacter pylori is the major causative agent of peptic ulcer disease (PUD), chronic active gastritis, gastric carcinoma, and gastric mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma [1]. Progression to more-severe disease occurs only in some infected individuals and depends on a number of factors, including host genetic susceptibility, environmental factors, and differences in the virulence of *H. pylori* strains. To date, the best rec-

ognized bacterial marker of *H. pylori* pathogenicity is *cagA*. The *cagA* gene is a marker for the *cag* pathogenicity island (*cagPAI*), which, when intact, encodes the components of a type IV secretion system responsible for delivering the CagA protein into the cytoplasm of the host cell, where it becomes tyrosine phosphorylated and initiates changes in cell signalling, coupled with induction of the proinflammatory interleukin (IL)-8 [2].

The onset of *H. pylori* infection occurs primarily during childhood [3], but severe gastroduodenal diseases appear primarily in adulthood, after a long-term infection [4, 5]. In young children, the development of a peptic ulcer occurs soon after *H. pylori* infection, suggesting that the implicated strain may be potentially more pathogenic. A putative ulcer-associated outer membrane protein (OMP), *jhp0870*, was recently identified, by means of subtractive hybridization, in an *H. pylori* strain isolated from a young child presenting with a duodenal ulcer [6].

The *jhp0870* open-reading frame (ORF), *homB*, is 90% identical to another member of the *H. pylori* OMPs,

Received 12 January 2008; accepted 14 May 2008; electronically published XX August 2008.

Potential conflicts of interest: none reported.

Presented in part: XXth International Workshop on *Helicobacter* and Related Bacteria in Chronic Digestive Inflammation, Istanbul, Turkey, September 2007 (abstract W3.05) (oral communication).

Financial support: Sociedade Portuguesa de Gastrenterologia; Programme de Cooperation Scientifique et Technique Franco-Portugais, sponsored by the French Embassy in Portugal.

Reprints or correspondence: Dr. Francis Mégraud, INSERM U853, Université Victor Segalen Bordeaux 2, Laboratoire de Bactériologie, Bat. 2B RDC Zone Nord, 33076 Bordeaux cedex, France (francis.megraud@chu-bordeaux.fr).

The Journal of Infectious Diseases 2008; 198:xxx

© 2008 by the Infectious Diseases Society of America. All rights reserved.

0022-1899/2008/19809-00XX\$15.00

DOI: 10.1086/592166

Table 1. Distribution of the 190 *Helicobacter pylori* strains isolated from Portuguese patients and included in the present study, according to disease status and patient age.

Patient group (no. of strains)	Disease status	Strains, no.	Sex of patients, male, %	Patient age, median \pm SD, years
Children (<i>n</i> = 84)	NUD	53	56.6	9.1 \pm 3.6
	PUD	31 ^a	67.7	12.3 \pm 3.8
Adults (<i>n</i> = 106)	NUD	56	44.7	51.3 \pm 14.6
	PUD	50 ^b	52.0	49.5 \pm 16.2

NOTE. None of the patients enrolled in the present study had a history of uptake of nonsteroidal anti-inflammatory drugs or had received antiacid therapy (e.g., proton pump inhibitors and H₂ antagonists). NUD, nonulcer dyspepsia; PUD, peptic ulcer disease.

^a Twenty-eight duodenal ulcers and 3 gastric ulcers.

^b Thirty-six duodenal ulcers and 14 gastric ulcers.

the *jhp0649* ORF *homA*, with the differences between the two confined to the middle region of these ORFs. According to the sequenced *H. pylori* strains [7–9], both genes occupy well-conserved loci, with the *homA* locus occupied either by *homA* or *homB*, and with the *homB* locus either occupied by one of these ORFs or remaining empty with a segment displaying 96.8% similarity with *homB*. This finding suggests that *homB* can exchange positions with *homA* and, also, that the presence of *homB* may have resulted from gene duplication [10].

The clinical importance of *homB* was evaluated by analyzing its distribution and diversity in a collection of 190 *H. pylori* strains isolated from patients presenting only with PUD or gastritis, as well as its association with the previously described *H. pylori* virulence-associated genes. The exposed components, usually OMPs, can contribute to the colonization and persistence of *H. pylori*, by allowing the bacteria to adhere to gastric cells [11, 12]. The OMPs can also influence the pathogenesis of the disease process, by stimulation of the inflammatory response of the host [13]. Considering that the product of *homB*, HomB, is a virulence-associated OMP candidate, we also investigated its surface membrane localization and the immunological response of the patient. The contribution of HomB to the inflammatory response of *H. pylori* and to the bacterial adherence properties was also investigated in vitro.

MATERIAL AND METHODS

Bacterial strains. A total of 190 *H. pylori* clinical strains were cultured from antral biopsy specimens [14] (table 1). Two *H. pylori* sequenced strains, 26695 (ATCC 700392), positive for *homA* and negative for *homB*, and J99 (ATCC 700824), positive for both *homA* and *homB*, were used as reference strains [7, 8]. Genomic DNA was extracted as described elsewhere [6].

Polymerase chain reaction (PCR)–based genotyping of virulence factors. Genotyping of the virulence factors was performed by PCR for *cagA* [15], *cagE*, *cagG*, *cagM* [16], and the

“*cag* empty site” [17], *vacAsI* [18], *babA2* [19], *iceA* [20], *hopQ* [21], *homB*, and *homA* [6]. The frame status of *oipA*, *sabA*, *hopZ*, and *dupA* was determined by sequencing [16, 22–24]. The sequence diversity of *homB* and *homA* was evaluated by sequencing entire genes [6].

Construction of *homB* knockout mutant strains. The pILL570Hp710ΔTnKm suicide plasmid containing a *homB* homologue disrupted by a kanamycin resistance gene cassette (supplied by I. Boneca, Microbiology Department of Institut Pasteur, Paris) was used for natural transformation of *H. pylori* strains. The correct and unique insertion of the kanamycin cassette in the target region was confirmed by PCR, sequencing, and Southern blot analysis. For further discussion of this procedure, see the Appendix (which is available only in the online version of the *Journal*).

Two-dimensional gel electrophoresis (2DE) and analysis of protein spots. A total of 200 μg of protein membrane pellets (i.e., sarcosine-insoluble outer membrane fractions) [25] of the *H. pylori* strain were separated by 2DE, by means of isoelectric focusing performed with the use of an immobilized pH gradient strip with a nonlinear pH of 3–10 (GE Healthcare), followed by SDS-PAGE performed in 10% w/v polyacrylamide gels with the use of SE 600 Ruby equipment (GE Healthcare). Gels were either stained with Coomassie blue [26] or used for Western blot analysis.

Selected protein spots were excised from the gel and digested with trypsin. Peptides were analyzed by means of capillary liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). For further discussion of this procedure, see the Appendix (which is available only in the online version of the *Journal*).

Preparation of recombinant HomB and immunoproteomics. A recombinant HomB protein (rHpHomB) with the *homB* ORF of the J99 strain cloned (*jhp0870*, GenBank accession no. NC_000921) was prepared using a glutathione S-transferase (GST) gene fusion vector pGEX-4T-3 (GE Healthcare). The purified protein was probed with an anti-GST antibody (1:1000) (Chemicon Australia), to confirm its expression.

The 2DE or SDS-PAGE (purified rHpHomB) gels were transferred onto nitrocellulose or polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes and incubated with a pool of 10 serum samples obtained from patients (64.7% of whom were male; mean age \pm SD, 51.2 \pm 6.8 years) who had IgG antibodies against *H. pylori*. A pool of 5 serum samples obtained from *H. pylori*–uninfected individuals (53.3% of whom were male; mean age \pm SD, 42.7 \pm 5.4 years) who had an anti-*H. pylori* IgG antibody level below the threshold denoting positivity was used as negative control. The level of IgG antibodies against *H. pylori* was quantified using the serological test Pyloriset EIA-G III (Orion Diagnostica). For further discussion of this procedure, see the Appendix (which is available only in the online version of the *Journal*).

Table 2. Univariate analysis of the relationship between *Helicobacter pylori* virulence genotypes and clinical outcome in strains isolated from patients presenting with peptic ulcer disease (PUD) or nonulcer dyspepsia (NUD).

Genotype	Strains isolated from children				Strains isolated from adults			
	PUD associated (n = 31)	NUD associated (n = 53)	P ^a	OR (95% CI)	PUD associated (n = 50)	NUD associated (n = 56)	P ^a	OR (95% CI)
<i>cagA</i> ⁺	23(74.2)	9(17.0)	<.001	14.06 (4.78–41.29)	34(68.0)	27(48.2)	.050	2.28 (1.03–5.04)
<i>vacAs1</i>	23(74.2)	10(18.9)	<.001	14.13 (4.75–42.04)	31(62.0)	26(46.4)	.116	1.99 (0.91–4.35)
<i>oipA</i> “on”	26(83.9)	17(32.1)	<.001	14.06 (4.78–41.29)	34(68.0)	28(50.0)	.076	2.13 (0.96–4.69)
<i>hopQ</i> type I	17(54.8)	15(28.3)	.004	5.67 (1.73–18.53)	29(58.0)	25(44.6)	.163	2.09 (0.82–5.35)
<i>babA2</i> ⁺	9(29.0)	6(11.3)	.074	3.21 (1.01–10.13)	25(50.0)	18(32.1)	.076	2.11 (0.96–4.64)
<i>iceA1</i>	5(16.1)	14(26.4)	.562	0.603 (0.18–2.00)	9(18.0)	10(17.9)	1.000	1.13 (0.40–3.18)
<i>hopZ</i> “on”	16(51.6)	34(64.2)	.357	0.60 (0.24–1.47)	30(60.0)	27(48.2)	.328	1.56 (0.72–3.37)
<i>sabA</i> “on”	7(22.6)	30(56.6)	.028	0.298 (0.11–0.83)	28(56.0)	39(69.6)	.163	0.56 (0.25–1.23)
<i>homB</i> ⁺	25(80.6)	18(34.0)	<.001	7.64 (2.65–22.05)	29(58.0)	31(55.6)	.841	1.13 (0.51–2.50)
<i>homA</i> ⁺	12(38.7)	36(67.9)	.006	0.263 (0.10–0.67)	20(40.0)	25(44.6)	.692	0.83 (0.38–1.82)

NOTE. Data are no. (%) of strains, unless otherwise indicated. CI, confidence interval; NUD, nonulcer dyspepsia; OR, odds ratio; PUD, peptic ulcer disease.

^a P values were determined using Fisher’s exact test.

IL-8 secretion and adherence assays. The induction of IL-8 secretion and adherence in vitro was evaluated after 18 h of coculture of *H. pylori* with human gastric adenocarcinoma epithelial AGS cells (ATCC CRL-173). IL-8 was quantified by ELISA, by use of the Quantikine Human IL-8 Immunoassay (R & D Systems Europe). For the adherence assay, the bacterial suspensions were labelled with a PKH2 green fluorescent linker kit (Sigma) [27]. Fluorescence was measured using the FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson).

Statistical analysis. Statistical analysis was performed using the statistical software package SPSS (version 14.0; SPSS). The level of significance was set at 5%, with the null hypothesis rejected when $P < .05$.

RESULTS

Prevalence of *homB*, *homA*, and other virulence genes in relation to clinical outcome. A total of 190 *H. pylori* clinical strains (table 1) isolated from Portuguese children ($n = 84$) and adults ($n = 106$) were examined for the presence of the *homB*, *homA*, *cagPAI*, *vacAs1*, *babA2*, *iceA*, *hopQ*, *oipA*, *sabA*, *hopZ*, and *dupA* genes.

Overall, with regard to the *cagPAI* markers of these 190 patients, a concordance between the presence of the *cagA*, *cagE*, *cagG*, and *cagM* genes and the simultaneous absence of a *cag* empty site product—or vice versa (i.e., absence of the genes and presence of the *cag* empty site)—was observed in 135 (71.0%) of the 190 strains, suggesting that mixed infections with or without *cagPAI* were not frequently observed in this group of strains. For 28 (50.9%) of the remaining 55 strains, a discrepancy was observed between the presence of *cagA*, *cagE*, *cagG*, and *cagM* genes, suggesting the presence of an incomplete island or mixed

infections, of which only 5 were *cagA* positive (17.9%). According to these results, the *cagA* gene was considered to be representative of an intact *cagPAI* in this study. The prevalence and the univariate statistical significance of the association between the *H. pylori* virulence genotypes, the *homB* and *homA* genotypes, and the clinical outcome are presented in table 2.

In strains isolated from children (31 with PUD and 53 with NUD), 5 genotypes were associated with PUD: *cagA* ($P < .001$; odds ratio [OR], 14.06), *vacAs1* ($P < .001$; OR, 14.13), *oipA* “on” genotype ($P < .001$; OR, 14.06), *hopQI* ($P = .004$; OR, 5.67), and *homB* ($P < .001$; OR, 7.64). Two genotypes were strongly associated with NUD: the *sabA* “on” genotype ($P = .028$; OR, 0.298) and *homA* ($P = .006$; OR, 0.263). Concerning *dupA*, a PCR fragment corresponding to *jhp0917–jhp0918* was detected in all tested strains, and the presence of an entire gene was confirmed by sequencing.

In strains isolated from adults (50 with PUD and 56 with NUD), only *cagA* was significantly associated with PUD ($P = .05$; OR, 2.28), indicating that *cagPAI* is the major independent predictor of disease in the study population. Similarly to strains isolated in children, all isolates recovered from adults had an entire *dupA* gene.

It is likely that environmental factors play a greater role in the development of PUD in older adult populations than in younger populations, as has been demonstrated for smoking and nonsteroidal inflammatory drug (NSAID) consumption [28]. Accordingly, the adult population was stratified by age, and 2 groups were formed: adults ≤ 40 years of age and those > 40 years of age. In the group of patients ≤ 40 years of age ($n = 32$; 17 of whom had PUD [64.7% of whom were male; mean age \pm SD, 33.5 ± 6.5 years] and 15 of whom had NUD [58.3% of whom

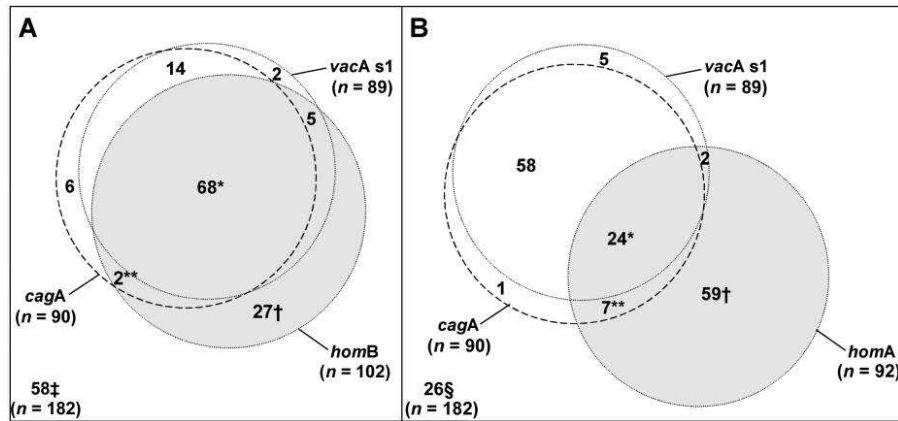


Figure 1. Venn diagram showing the distribution of *homB*, *homA*, *cagA*, and *vacA* genotypes in *Helicobacter pylori* strains. The presence of *homB* (A) and *homA* (B) was compared with that of *cagA* and *vacA* genotypes. There was a total 182 strains for which simultaneous information for all 4 genotypes was available. *Ten of these strains harbored the *homB*, *homA*, *cagA*, and *vacA* genes at the same time. **One of these strains harbored the *homB*, *homA*, and *cagA* genes at the same time. †Two of these strains harbored only the *homB* and *homA* genes. ‡None of these 58 strains harbor the *homB* gene. §None of these 26 strains harbor the *homA* gene. Venn diagrams were constructed using the software available from the Department of Computer Science at the University of Victoria [29].

were male; mean age \pm SD, 34.7 \pm 5.4 years), *homB* was associated with PUD (88.2% vs. 40.0% [$P = .008$]; OR, 11.25 [95% CI, 1.86–68.13]). Compared with strains isolated from patients with NUD, strains isolated from patients with PUD had a higher prevalence of *cagA* (82.4% vs. 53.3%), *vacAs1* (82.4% vs. 53.3%), *oipA* “on” genotype (88.2% vs. 60.0%), and *hopZ* “on” genotype (70.6% vs. 40.0%), although the differences were not statistically significant. *homA* was a marker for NUD (60.0% vs. 17.6% [$P = .027$]; OR, 7.0 [95% CI, 1.11–50.44]). In the group of adults >40 years of age, no genotype was significantly associated with clinical outcome (not shown).

Association of *homB* and *homA* with other virulence genes. Globally, the presence of *homB* was associated with *cagA* ($P < .001$), *vacAs1* ($P < .001$), *babA2* ($P < .001$), *hopQI* ($P < .001$), and *oipA* “on” genotype ($P < .001$), whereas *homA* was strongly associated with *cagA*⁻ ($P = .01$), *vacAs2* ($P < .001$), *babA2*⁻ ($P = .001$), *hopQII* ($P < .001$), and *oipA* “off” ($P < .001$). The presence of *homB* was also significantly associated with the absence of *homA* ($P < .001$). Figure 1 illustrates the association of *homB* with *cagA* and *vacAs1* (figure 1A), as well as that of *homA* with *cagA* and *vacAs1* (figure 1B). The same degree of association was found when strains isolated from children and adults were analyzed separately and, also, when strains of different clinical origins were considered (data not shown).

Binary logistic regression analysis. A binary logistic regression analysis was performed to evaluate which combinations of genotypes presented the most discriminatory capacity to distinguish between PUD and NUD (table 3).

In *H. pylori* strains isolated from children, combinations of genotypes including *homB* and the other genotypes presenting the highest risk for PUD were tested. The analysis of the adjusted

OR showed that, when present in a model, the *cagA* gene was the most important predictor of PUD. Both *vacAs1* and *oipA* “on” genotype when combined with *homB* also presented the highest

Table 3. Binary logistic regression analysis to discriminate between peptic ulcer disease and nonulcer dyspepsia, using as predictors different associations of the *Helicobacter pylori* virulence genotypes, in strains isolated from Portuguese children and from adults aged ≤ 40 years.

Patient group, model	<i>P</i>	Adjusted OR (95% CI) ^a	Area under the ROC curve % (<i>P</i>) ^b	H-L test
Children (<i>n</i> = 84)				
<i>cagA</i> ⁺	.019	5.94 (1.34–26.23)		
<i>vacAs1</i>	.062	4.12 (0.93–18.22)	83.4 (<.001)	0.056
<i>cagA</i> ⁺	<.001	8.26 (2.58–26.44)		
<i>homB</i> ⁺	.054	3.31 (0.98–11.18)	83.4 (<.001)	0.005
<i>vacAs1</i>	.001	8.42 (2.41–29.47)		
<i>homB</i> ⁺	.182	2.43 (0.66–8.98)	81.6 (<.001)	0.438
<i>oipA</i> “on”	.003	6.12 (1.83–20.40)		
<i>homB</i> ⁺	.026	3.81 (1.17–12.36)	82.1 (<.001)	0.209
Adults (<i>n</i> = 32)				
<i>cagA</i> ⁺	.366	2.33 (0.37–14.65)		
<i>homB</i> ⁺	.020	9.00 (1.41–57.44)	77.8 (.007)	0.885
<i>vacAs1</i>	.366	2.33 (0.37–14.65)		
<i>homB</i> ⁺	.020	9.00 (1.41–57.44)	77.8 (.007)	0.885
<i>oipA</i> “on”	.366	3.00 (0.40–22.77)		
<i>homB</i> ⁺	.020	9.00 (1.41–57.44)	78.6 (.006)	0.553
<i>hopZ</i> “on”	.066	2.06 (0.89–36.17)		
<i>homB</i> ⁺	.008	15.81 (2.06–121.61)	82.0 (.002)	0.762

NOTE. CI, confidence interval; H-L, Hosmer-Lemeshow; OR, odds ratio; ROC, receiver operating characteristic.

^a Reference category is the absence of the *H. pylori* virulence genotypes.

^b As determined by the Wald test.

and most significant adjusted OR when combined with *homB*. Analysis of the area under the receiver operating characteristic curves showed that all models proposed presented a high and similar discriminatory capacity to distinguish between PUD and gastritis, whereas the goodness of fit of each model to the data, as evaluated by the Hosmer-Lemeshow test, showed that only the models *vacAs1* with *homB* and *oipA* “on” with *homB* showed a good adjustment (H-L test, >0.05).

In strains isolated from adults ≤ 40 years the age, *homB* was the most important predictor of PUD, showing the highest value for the adjusted OR in every model considered and, therefore, corroborating the univariate analysis. Overall, the best model for discriminating between PUD and NUD in young adults was the combination of *homB* with *hopZ* “on genotype.”

Diversity in *homB* and *homA* genes. The presence of *homB* and *homA* and their genomic positions were analyzed in 190 *H. pylori* clinical strains. At least 1 of these 2 genes was always present in the genome of the clinical strains, with different combinations observed: a single-copy genotype (*homA* or *homB*) or a 2-copy genotype (either 2 copies of *homA* or *homB*, or 1 copy of each gene). The entire nucleotide sequence of both the *homB* and *homA* genes was determined in 58 clinical strains, which were randomly chosen, presenting different *homB/homA* combinations: 13 strains had 2 copies of *homB*, 6 had 2 copies of *homA*, 16 had 1 copy of *homB*, 10 had 1 copy of *homA*, and 13 had 1 copy of each gene. Both genes presented a variable length: from 1974 to 2025 bp for *homB* and from 1941 to 1998 bp for *homA*. In cases where only 1 copy of *homB* or *homA* was present, the gene was present in the *jhp0649* locus, whereas a conserved intergenic space was observed at the *jhp0870* locus, according to the numbering of the J99 strain [10]. When 2 copies were found in the same strain, genes were present indifferently in one of these loci. Whenever duplicates of the same gene were present in a single strain, their identity varied between 98% and 99%.

The presence of *homB* and/or *homA* in a single- or 2-copy genotype varied significantly among PUD- and NUD-associated strains isolated from children and young adults. The single-copy genotype (*homB* or *homA*) was more frequently associated with NUD (79.4% vs. 37.5%), whereas the 2-copy genotype (*homB/homA*, *homB/homB*, or *homA/homA*) was more frequently associated with PUD (62.5% vs. 20.6%). More specifically, a single-copy of *homA* was the genotype most frequently associated with NUD (61.8% vs. 10.4% [$P < .001$]; OR, 13.89 [95% CI, 4.49–45.99]), whereas 2 copies of *homB* was the genotype most strongly associated with PUD (39.9% vs. 11.8% [$P = .001$]; OR, 4.91 [95% CI, 1.77–14.02]).

Evaluation of *HomB* surface expression and antigenicity. Nine spots were identified as being expressed differentially among the 2DE OMP fractions of the wild-type (*wt*) strain 1776/05 and the corresponding *homB* mutant (figure 2A). In 2 spots, the *H. pylori* putative OMPs HomD and HopN, which have not yet been described in *H. pylori* proteomic studies, were

identified by LC-MS/MS analysis. The other 6 spots corresponded to previously described surface proteins, validating the preparation of the OMP extracts [30–33] (table 4) (for further discussion, see the Appendix, which is available only in the online version of the *Journal*). The remaining spot, which had an isoelectric point and a molecular weight similar to those deduced for HomB, was identified in the 2DE of the *wt* strain, and the LC-MS/MS analysis confirmed that this spot was the HomB protein. This spot was absent in the *homB* knockout mutant on 2DE (not shown).

The immunoblot showed that HomB was immunoreactive to serum samples obtained from *H. pylori*-positive patients (figure 2B). This result was confirmed by the immunoreaction with the rHpHomB (figure 2C). Neither the 2DE HomB spot nor the rHpHomB showed reactivity with the pool of serum samples obtained from *H. pylori*-negative patients (data not shown). The Western blot of the 2DE also showed that HomD and HopN were immunoreactive (figure 2B).

In vitro cellular IL-8 secretion, according to the *homB* status of the strains. The level of IL-8 secretion was evaluated for the 2 *H. pylori* reference strains (26695 and J99) and the 7 pairs of *wt* and corresponding *homB* mutants (figure 3A). IL-8 secretion by epithelial cells is dependent on the presence of a functional *cagPAI* [35, 36]. As expected, the mean amount of IL-8 secretion was significantly higher in *cagPAI*-positive strains (mean \pm SD, 772.1 ± 215.7 pg/mL) than in *cagPAI*-negative strains (mean \pm SD, 102.5 ± 12 pg/mL). Concerning the 5 *cagPAI*-positive strains, IL-8 levels obtained with the *homB* single mutants were significantly lower than those obtained with the parent strains (figure 3A). For strain 417/02, which carried 2 copies of *homB*, the IL-8 level obtained for the double mutant was significantly lower than that observed for the corresponding single mutant. A significant reduction in IL-8 secretion was also observed for the strain 565/99, 1 of the 2 *cagPAI*-negative *homB* single mutants.

Adherence according to the *homB* status of the strains. All of the *H. pylori* strains tested were able to adhere to the human cells (figure 3B). The *homB* disruption of strains 771/99 and 36/00 did not lead to a significant modification in adherence properties. Concerning strains 1776/05, 559/02, 351/99, and 565/99, the inactivation of the single genomic copy of *homB* led to a significant decrease in adherence. For strain 417/02, which carried 2 copies of *homB*, the disruption of 1 copy of *homB* led to a significant decrease in adherence, compared with the *wt* strain, and this decrease was more important when the 2 copies were disrupted, compared with the single mutant strain (figure 3B).

DISCUSSION

The present study attempts to bring insight to the clinical significance of a novel *H. pylori* ulcer marker candidate, the *homB* gene, coding for an OMP, aiming to clarify its role as a virulence

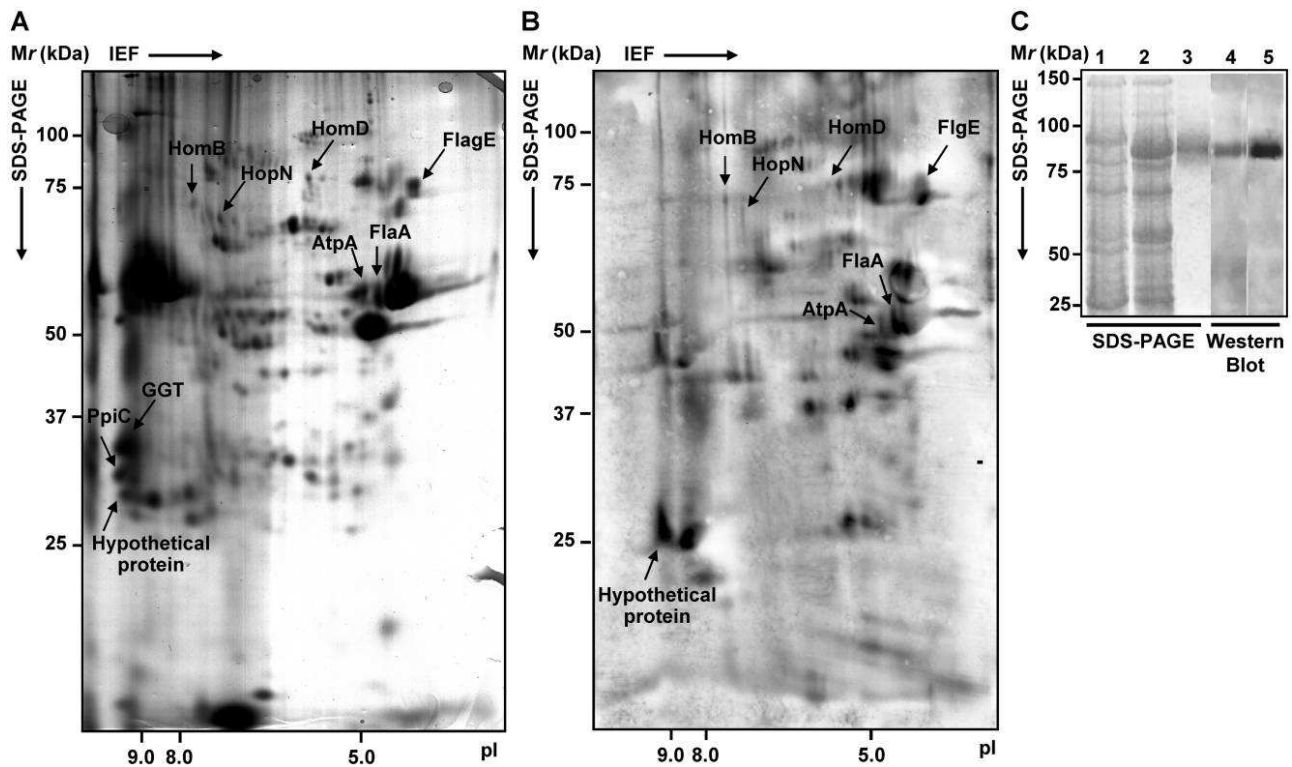


Figure 2. A, Coomassie blue–stained 2-dimensional gel electrophoresis (2DE) of the outer membrane protein (OMP) fraction of a *Helicobacter pylori* clinical strain with a single complete copy of the *hombB* open reading frame. Shown are the positions of the 9 identified spots: γ -glutamyltranspeptidase (GGT), adenosine triphosphate synthase F1 (subunit alpha) (AtpA), flagellar hook protein (FlgE), flagellin A (FlaA), peptidyl-prolyl *cis*-trans isomerase C (PpiC), hypothetical protein (*hjp0216*), OMP HomB, OMP HomD, and OMP HopN. For each protein spot, the no. of matching peptides, the cross-correlation score (with charge) for each peptide, and the sequence coverage are described in table 4. B, Western blot of a duplicate 2DE hybridized with the pool of serum samples obtained from *H. pylori*-positive patients, showing the positions of the 7 immunoreactive spots. In both panel A and panel B, the isoelectric point (pI) of some proteins present in the gel is indicated at the bottom and was deduced from the theoretical pI of the corresponding proteins of the 3 *H. pylori* reference strains 26695, J99, and HPAG1 [7–9]. IEF, isoelectric focusing. C, Analysis of the purification and antigenicity of the recombinant HomB protein (rHpHomB). Shown are the Coomassie blue–stained SDS-PAGE of (1) crude extract of *Escherichia coli* BL21 cells not expressing rHpHomB, (2) crude extract of *E. coli* BL21 cells expressing the rHpHomB, and (3) purified rHpHomB, and Western blot of the purified protein with (4) anti–glutathione S-transferase (GST) antibody and (5) a pool of serum samples obtained from *H. pylori*-positive patients. In all 3 panels, the positions of the molecular weights (Mr) are indicated on the left.

factor associated with the development of PUD. The distribution of *hombB* in clinical *H. pylori* strains showed that *hombB* was significantly associated with PUD in children and young adults (≤ 40 years of age). In contrast, *hombA*, the gene to which *hombB* was 90% similar, was a marker for NUD in those strains. In addition, *cagA*⁺, *vacAs1*, *hopQI*, and *oipA* “on” genotypes were also strongly associated with PUD in children, whereas, in adults, only *cagA* was a marker for PUD. Several studies reported such differences in strains infecting the mucosa of adults and

children [6, 37–40]. On the other hand, the fact that *hombB* was a marker for PUD in children and young adults suggests that disease severity in younger populations is more closely related to the virulence of the infecting strain than to environmental factors, such as smoking and high NSAID consumption, which play a major role in older populations [28]. Nevertheless, these results were obtained with small groups of strains, particularly those isolated from young adults, and they therefore require future validation. Overall, it should be emphasized that, among the *H. pylori* virulence genotypes analyzed, *cagA*, as a marker for the *cagPAI*, was the only predictor of PUD in both children and adults; this finding is in agreement with other studies and thereby reconfirms that *cagPAI* is one of the major *H. pylori* virulence factors [41, 42].

The overall profile of the association of *hombB* with clinical outcome is supported by the correlation of this factor with the other *H. pylori*-associated virulence genotypes, independent of

Table 4. Proteins identified, by mass spectrometry, in the 9 spots differentially expressed in 2-dimensional gel electrophoresis of the outer membrane proteome of 2 *Helicobacter pylori* 1776/05 strains: the *hombB* knockout mutant and the wild type.

The table is available in its entirety in the online edition of the *Journal of Infectious Diseases*.

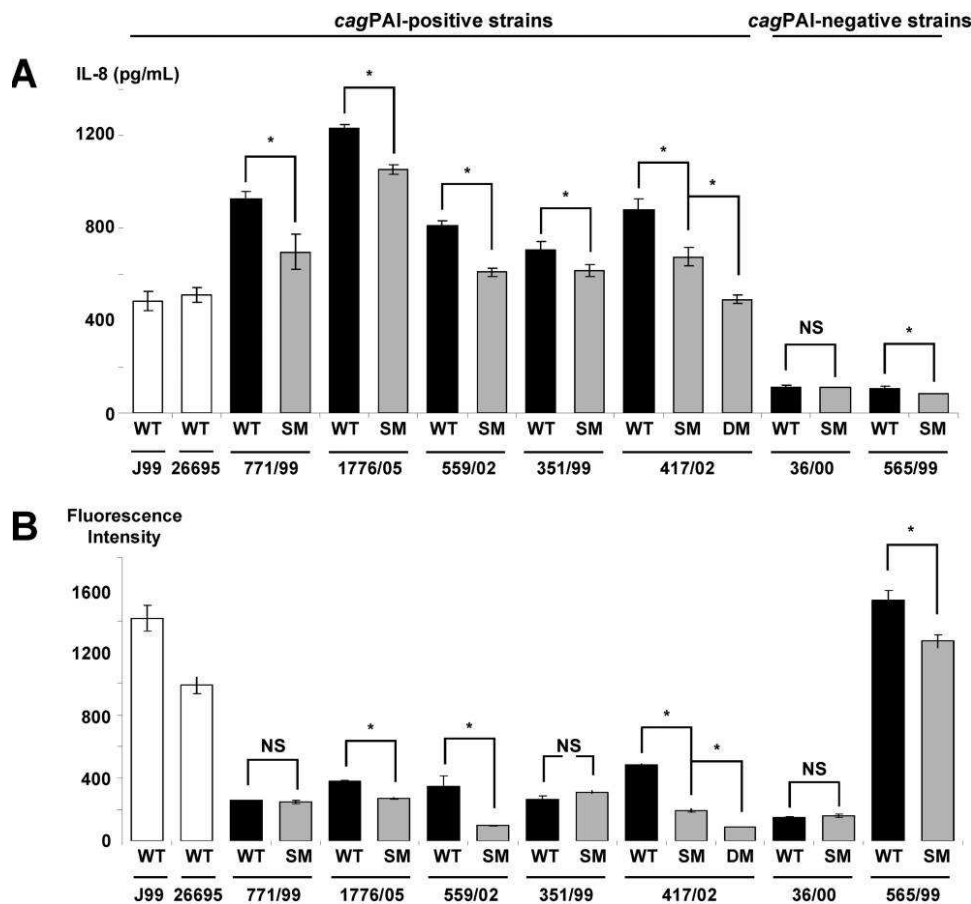


Figure 3. Involvement of HomB in interleukin 8 (IL-8) secretion and adherence. In vitro IL-8 secretion from gastric epithelial AGS cells (A) and adherence on AGS cells (B), as determined after 18 h of incubation with *Helicobacter pylori* wild-type (*wt*) and *homB* knockout mutant strains at an MOI of 100. IL-8 secretion was determined by ELISA, and results were expressed after deduction of the basal secretion by bacteria-free AGS cells. Adherence was determined by flow cytometry performed with labeled bacteria. Values denote the means of the triplicate (\pm SD). Two sequenced *H. pylori* strains—26695 (ATCC 700392), which was positive for *homA* and negative for *homB*, and J99 (ATCC 700824), which was positive for both *homA* and *homB*—were used as reference strains [7, 8]. Seven *H. pylori* clinical strains were used. Of the 6 strains that carried a single copy of *homB*, 4 were *cagPAI* positive (strains 771/99, 1776/05, 559/02, and 351/99 [GenBank accession nos. EF648357 and EF656577–EF656579]) and 2 were *cagPAI* negative (strains 36/00 and 565/99 [GenBank accession nos. EF648369–EF648370]). One strain, 417/02, contained 2 copies of *homB* and was *cagPAI* positive (GenBank accession nos. EF648377–EF648378 for both loci, respectively). All these strains were *homA* negative. * $P < .05$. DM, double mutant; NS, not significant; SM, single mutant; *wt*, wild-type.

the age of the patient and the clinical origin of the strain. Thus, *homB* is observed much more frequently in highly virulent strains, suggesting that *homB* status may be useful in determining a genetic pattern associated with a higher degree of *H. pylori* pathogenicity.

The *homA* gene, a 90% homologue and duplicate of *homB*, was strongly associated with both NUD and the less virulent genotypes. Moreover, 2 copies of *homB* in a single strain was the genotype most strongly associated with ulcerogenic strains, whereas the strongest marker of nonulcerogenic strains was 1 copy of *homA*. These results suggest that, although *homB* and *homA* share a high similarity, they probably evolved for different functions, with *homB* most likely contributing more to the pro-inflammatory properties of *H. pylori* strains. Other *H. pylori*

genes encoding OMPs are present in duplicate copies within the same strain, and functional diversification has been observed; for example, *babA* codes for the blood group antigen-binding adhesin BabA, whereas the *babB* product is associated with a nonbinding phenotype [11].

The existence of duplicated genes in a single genome can lead to gene conversion, by recombination between loci, leading to the duplication of a unique gene [11, 43, 44]. Sequence analysis of *homB* and *homA*, which showed that they are present as single- or 2-copy genotypes in conserved loci, suggests that the duplication phenomenon can occur between these 2 genes. Thus, it seems that different strains may duplicate different genes, and whether this constitutes a random event or confers any biological advantage to the bacterial cells remains unknown.

The observation that the 2-copy genotype was more prevalent in strains associated with PUD than in strains associated with NUD points to a nonrandom event of duplication, suggesting a biological advantage, either by facilitating elevated expression of a particular protein or by facilitating adaptation to an individual host.

HomB was shown to be expressed at the *H. pylori* outer membrane and recognized by human serum samples, indicating that it possesses surface-exposed regions. The inactivation of *homB* caused a significant reduction in IL-8 production, a phenomenon observed in all of the *cagPAI*-positive strains and in 1 of the 2 *cagPAI*-negative strains tested. The double knockout of *homB* had a stronger reduction effect, suggesting that both HomB proteins are active and share the same function. This is in accordance with the finding that the presence of 2 copies of *homB* in a single strain was the genotype most frequently found in ulcerogenic strains. It should, however, be emphasized that the level of reduction in IL-8 secretion obtained with the *homB* mutants was low compared with what was previously observed with *cagPAI* mutants [35, 36]. These results suggest that, in the presence of *cagPAI*, HomB is able to promote an in vitro proinflammatory response by gastric epithelial cells. This hypothesis is supported by the finding that *homB* is strongly associated with *cagA*, as well as with other *H. pylori* virulence factors, because it has been described for other *H. pylori* OMPs [19, 45], and it suggests a shared selective pressure favoring the expression of multiple virulence determinants.

Helicobacter pylori-related IL-8 induction requires attachment of live bacteria to epithelial cells [46, 47], a prerequisite required for CagA translocation and consequent induction of IL-8 secretion [48]. Accordingly, it is likely that the mechanism underlying the involvement of HomB in inflammation is bacterial adherence. Indeed, it was demonstrated that *H. pylori wt* strains adhered to human gastric epithelial cells, whereas the corresponding *homB* knockout mutant strains showed significantly reduced binding. However, the fact that the disruption of *homB* did not completely abolish adherence suggests that HomB is not the major OMP involved in this mechanism. Indeed, adherence of *H. pylori* to the human gastric epithelium is mediated by the BabA major adhesin to the fucosylated Lewis b blood group antigen [11]. Because the AGS cells express variable levels of Lewis b blood group antigen [49], it would be interesting to test other cell lines—for example, the gastric epithelial Kato III cells deficient in Lewis b epitope—for which *H. pylori* adherence is independent of the BabA–Lewis b binding [49].

In conclusion, *homB* can be considered a comarker of *H. pylori* strains associated with PUD. HomB is immunogenic and is likely involved in the inflammatory response and in adherence, suggesting its contribution to the development of a more severe clinical outcome. Overall, results suggest that *homB* is a novel *H. pylori* putative virulence factor.

Acknowledgments

We thank Paul Jenö and his team from the Mass Spectrometry Biozentrum, University of Basel (Basel, Switzerland), for performing the LC-MS/MS analysis of the protein spots. We also thank Ivo Boneca (Unité de Pathogénie Bactérienne des Muqueuses, Département de Microbiologie, Institut Pasteur, Paris, France) for kindly providing the pILL570Hp710ΔTnKm plasmid. Finally, we thank the Sociedade Portuguesa de Gastroenterologia and the Programme de Cooperation Scientifique et Technique Franco-Portugais, sponsored by the French Embassy in Portugal, for supporting the project. We are grateful to Paulo Matos for technical assistance.

References

1. Suerbaum S, Michetti P. *Helicobacter pylori* infection. *N Engl J Med* **2002**; 347:1175–86.
2. 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* **2000**; 287:1497–500.
3. Goodman KJ, Correa P. The transmission of *Helicobacter pylori*: a critical review of the evidence. *Int J Epidemiol* **1995**; 24:875–87.
4. Gillen D, McColl KE. Gastrointestinal disease, *Helicobacter pylori*, and genetic polymorphisms. *Clin Gastroenterol Hepatol* **2005**; 3:1180–6.
5. Peek RM Jr, Crabtree JE. *Helicobacter* infection and gastric neoplasia. *J Pathol* **2006**; 208:233–48.
6. Oleastro M, Monteiro L, Lehours P, Mégraud F, Menard A. Identification of markers for *Helicobacter pylori* strains isolated from children with peptic ulcer disease by suppressive subtractive hybridization. *Infect Immun* **2006**; 74:4064–74.
7. Tomb JF, White O, Kerlavage AR, et al. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* **1997**; 388:539–47.
8. Alm RA, Ling LSL, Moir DT, et al. Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* **1999**; 397:176–80.
9. Oh JD, Kling-Bäckhed H, Giannakis M, et al. The complete genome sequence of a chronic atrophic gastritis *Helicobacter pylori* strain: evolution during disease progression. *Proc Natl Acad Sci USA* **2006**; 103:9999–10004.
10. Alm RA, Bina J, Andrews BM, Doig P, Hancock REW, Trust TJ. Comparative genomics of *Helicobacter pylori*: analysis of the outer membrane protein families. *Infect Immun* **2000**; 68:4155–68.
11. Ilver D, Arnqvist A, Ögren J, et al. *Helicobacter pylori* adhesin binding fucosylated histo-blood group antigens revealed by retagging. *Science* **1998**; 279:373–7.
12. Mahdavi J, Sondén B, Hurtig M, et al. *Helicobacter pylori* SabA adhesin in persistent infection and chronic inflammation. *Science* **2002**; 297:573–8.
13. Yamaoka Y, Ojo O, Fujimoto S, et al. *Helicobacter pylori* outer membrane proteins and gastroduodenal disease. *Gut* **2006**; 55:775–81.
14. Mégraud F, Lehn N, Lind T, et al. Antimicrobial susceptibility testing of *Helicobacter pylori* in a large multicenter trial: the MACH 2 Study. *Antimicrob Agents Chemother* **1999**; 43:2747–52.
15. Tummuru MKR, Cover TL, Blaser MJ. Cloning and expression of a high-molecular-mass major antigen of *Helicobacter pylori*: evidence of linkage to cytotoxin production. *Infect Immun* **1993**; 61:1799–1809.
16. Yamaoka Y, Kikuchi S, El-Zimaity HMT, Gutierrez O, Osato MS, Graham DY. Importance of *Helicobacter pylori oipA* in clinical presentation, gastric inflammation, and mucosal interleukin 8 production. *Gastroenterology* **2002**; 123:414–24.
17. Akopyants NS, Clifton SW, Kersulyte D, et al. Analyses of the *cag* pathogenicity island of *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol* **1998**; 28:37–53.
18. Atherton JC, Cao P, Peek RM Jr, Tummuru MKR, 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* **1995**; 270:17771–7.
19. Gerhard M, Lehn N, Neumayer N, et al. Clinical relevance of the *Helicobacter pylori* gene for blood-group antigen-binding adhesin. *Proc Natl Acad Sci USA* **1999**; 96:12778–83.

20. van Doorn LJ, Figueiredo C, Sanna R, et al. Clinical relevance of the *cagA*, *vacA*, and *iceA* status of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* **1998**; 115:58–66.
21. Cao P, Cover TL. Two different families of *hopQ* alleles in *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol* **2002**; 40:4504–11.
22. Lehours P, Menard A, Dupouy S, 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* **2004**; 72:880–8.
23. Peck B, Ortkamp M, Diehl KD, Hundt E, Knapp B. Conservation, localization and expression of HopZ, a protein involved in adhesion of *Helicobacter pylori*. *Nucleic Acids Res* **1999**; 27:3325–33.
24. Gomes LI, Rocha GA, Rocha AM, et al. Lack of association between *Helicobacter pylori* infection with *dupA*-positive strains and gastroduodenal diseases in Brazilian patients. *Int J Med Microbiol* **2008**; 298:223–30.
25. Baik SC, Kim KM, Song SM, et al. Proteomic analysis of the sarcosine-insoluble outer membrane fraction of *Helicobacter pylori* strain 26695. *J Bacteriol* **2004**; 186:949–55.
26. Candiano G, Bruschi M, Musante L, et al. Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis* **2004**; 25:1327–33.
27. Sheu SM, Sheu BS, Yang HB, Lei HY, Wu JJ. Anti-Lewis X antibody promotes *Helicobacter pylori* adhesion to gastric epithelial cells. *Infect Immun* **2007**; 75:2661–7.
28. Salles N, Megraud F. Current management of *Helicobacter pylori* infections in the elderly. *Expert Rev Anti Infect Ther* **2007**; 5:845–56.
29. Ruskey F, Weston M. A survey of Venn diagrams. *Electronic Journal of Combinatorics*. Department of Computer Science, University of Victoria, Canada. Available at: <http://theory.cs.uvic.ca/venn/EulerianCircles/>. Accessed 27 August 2008.
30. Bumann D, Aksu S, Wendland M, et al. Proteome analysis of secreted proteins of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Infect Immun* **2002**; 70:3396–403.
31. Krah A, Miehle S, Pleissner KP, et al. Identification of candidate antigens for serologic detection of *Helicobacter pylori*-infected patients with gastric carcinoma. *Int J Cancer* **2004**; 108:456–63.
32. Kimmel B, Bosserhoff A, Frank R, Gross R, Goebel W, Beier D. Identification of immunodominant antigens from *Helicobacter pylori* and evaluation of their reactivities with sera from patients with different gastroduodenal pathologies. *Infect Immun* **2000**; 68:915–20.
33. Sabarth N, Lamer S, Zimny-Arndt U, Jungblut PR, Meyer TF, Bumann D. Identification of surface proteins of *Helicobacter pylori* by selective biotinylation, affinity purification, and two-dimensional gel electrophoresis. *J Biol Chem* **2002**; 277:27896–902.
34. Institut Pasteur. PyloriGene data release R1.6 (Aug 30, 2002). Available at: <http://genolist.pasteur.fr/PyloriGene/genome.cgi>. Accessed 12 August 2008.
35. Yamaoka Y, Kwon DH, Graham DY. A *M^r* 34,000 proinflammatory outer membrane protein (*OipA*) of *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci USA* **2000**; 97:11133.
36. Fischer W, Püls J, Buhrdorf R, Gebert B, Odenbreit S, Haas R. Systematic mutagenesis of the *Helicobacter pylori* *cag* pathogenicity island: essential genes for CagA translocation in host cells and induction of interleukin-8. *Mol Microbiol* **2001**; 42:1337–48.
37. Alarcón T, Domingo D, Martínez MJ, López-Brea M. *cagA* gene and *vacA* alleles in Spanish *Helicobacter pylori* clinical isolates from patients of different ages. *FEMS Immunol Med Microbiol* **1999**; 24:215–9.
38. González-Valencia G, Atherton JC, Muñoz O, Dehesa M, Madrazo de la Garza A, Torres J. *Helicobacter pylori vacA* and *cagA* genotypes in Mexican adults and children. *J Infect Dis* **2000**; 182:1450–4.
39. Oleastro M, Gerhard M, Lopes AI, et al. *Helicobacter pylori* virulence genotypes in Portuguese children and adults with gastroduodenal pathology. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **2003**; 22:85–91.
40. Queiroz DM, Bittencourt P, Guerra JB, Rocha AM, Rocha GA, Carvalho AS. IL1RN polymorphism and *cagA*-positive *Helicobacter pylori* strains increase the risk of duodenal ulcer in children. *Pediatr Res* **2005**; 58:892–6.
41. Crabtree JE, Taylor JD, Wyatt JL, et al. Mucosal IgA recognition of *Helicobacter pylori* 120 kDa protein, peptic ulceration, and gastric pathology. *Lancet* **1991**; 338:332–5.
42. Nomura AMY, Pérez-Pérez GI, Lee J, Stemmermann G, Blaser MJ. Relation between *Helicobacter pylori cagA* status and risk of peptic ulcer disease. *Am J Epidemiol* **2002**; 155:1054–9.
43. Pride DT, Blaser MJ. Concerted evolution between duplicated genetic elements in *Helicobacter pylori*. *J Mol Biol* **2002**; 316:629–42.
44. Solnick JV, Hansen LM, Salama NR, Boonjakuakul JK, Syvanen M. Modification of *Helicobacter pylori* outer membrane protein expression during experimental infection of rhesus macaques. *Proc Natl Acad Sci USA* **2004**; 101:2106–11.
45. Dossumbekova A, Prinz C, Mages J, et al. *Helicobacter pylori* HopH (*OipA*) and bacterial pathogenicity: genetic and functional genomic analysis of *hopH* gene polymorphisms. *J Infect Dis* **2006**; 194:1346–55.
46. Aihara M, Tsuchimoto D, Takizawa H, et al. Mechanisms involved in *Helicobacter pylori*-induced interleukin-8 production by a gastric cancer cell line, MKN45. *Infect Immun* **1997**; 65:3218–24.
47. Keates S, Keates AC, Warny M, Peek RM, Murray PG, Kelly CP. Differential activation of mitogen-activated protein kinases in AGS gastric epithelial cells by *cag⁺* and *cag⁻* *Helicobacter pylori*. *J Immunol* **1999**; 163:5552–9.
48. 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 USA* **1999**; 96:14559–64.
49. Su B, Hellström PM, Rubio C, Celik J, Granström M, Normark S. Type I *Helicobacter pylori* shows Lewis^b-independent adherence to gastric cells requiring de novo protein synthesis in both host and bacteria. *J Infect Dis* **1998**; 178:1379–90.

