

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE



SCIENTIFIQUE  
UNIVERSITE DJILLALI LIABES DE SIDI BEL-ABBES  
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

## THESE

Présentée par

**DRICI Amine El-Mokhtar**

*En vue de l'obtention du diplôme de*

## DOCTORAT EN SCIENCES

Sciences Biologiques

Option : Biologie cellulaire : Biologie de la cellule normale et pathologique, cas des cancers

Thème :

**La carcinogenèse de la muqueuse gastrique, impact de l'*Helicobacter pylori*.**

**Thèse soutenue le :**

**Devant le jury composé de :**

**Président** : Pr. TOU Abdenaceur (Professeur, UDL de Sidi Bel-Abbès)

**Examineur** : Pr. SAHRAOUI Tewfik (Professeur, Université d'Oran)

**Examineur** : Pr. SLIMANI Miloud (Professeur, Université de Saida)

**Examinatrice** : Pr. HARIR Noria (Professeur, UDL de Sidi Bel-Abbès)

**Examinatrice** : Pr. ALLAM Rachida (Professeur, UHBB de Chlef)

**Directrice de Thèse** : Pr. MOULESSEHOUL Soraya (Professeur, UDL de Sidi Bel-Abbès)

**2017**

# REMERCIEMENTS

*À l'occasion de la soutenance de ma thèse de doctorat en sciences, il m'est agréable d'exprimer ma gratitude envers tous ceux qui ont contribué à ma formation et qui m'ont aidé à réaliser ce travail.*

**À mon Encadreur**

**Professeur S. MOULESSEHOUL**

Professeur Enseignante à la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université Djillali Liabes de Sidi Bel-Abbès

*Je vous remercie d'avoir accepté de diriger ce travail de thèse de doctorat en sciences et de l'avoir enrichi de votre expérience et de vos compétences. Vous avez su me guider dans son élaboration avec patience. Je vous remercie également de votre compréhension, de votre gentillesse et de votre bienveillance.*

**Professeur A. TOU**

Chef de service d'Anatomie Pathologie de C.H-U AEK HASSANI de Sidi Bel-Abbès

*Je vous remercie d'avoir mis à mon entière disposition avec grande générosité les données et matériels et de m'avoir accordé la confiance pour mener à terme notre sujet en m'ouvrant grand les portes de votre service en mettant à ma disposition la totalité des moyens à l'origine de ce travail de thèse.*

*Je vous remercie pour votre lecture attentive et vos remarques. Votre participation à ce jury est un honneur pour moi.*

*Nous remercions également l'ensemble des personnels de votre service pour leur disponibilité et leur gentillesse.*

**Professeur T. SAHRAOUI**

Professeur Enseignant de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université d'Oran 1

*Je vous remercie d'avoir accepté de participer à ce jury. Je vous remercie pour votre lecture attentive et vos remarques. Votre participation à ce jury de doctorat est un honneur pour moi.*

**Professeur M. SLIMANI**

Professeur Enseignant de la Faculté des Sciences de l'Université Université Dr. Moulay Tahar de Saida

*Je vous remercie d'avoir accepté de participer à ce jury. Je vous remercie pour votre lecture attentive et vos remarques. Nous vous remercions de votre implication durant notre cursus universitaire. Votre participation à ce jury de doctorat est un honneur pour moi.*

**Professeur N. HARIR**

Professeur Enseignante à la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université Djillali Liabes de Sidi Bel-Abbès

*Je vous remercie d'avoir accepté de participer à ce jury. Je vous remercie pour votre lecture attentive et vos remarques. Votre participation à ce jury de doctorat est un honneur pour moi.*

**Professeur R. Allam**

Professeur Enseignante à la Faculté des Sciences de l'Université Hassiba Benbouali de Chlef

*Je vous remercie d'avoir accepté de participer à ce jury. Je vous remercie pour votre lecture attentive et vos remarques. Votre participation à ce jury de doctorat est un honneur pour moi.*

**Professeur D. KARA TOURKI**

Chef de service de Gastroentérologie de C.H-U AEK HASSANI de Sidi Bel-Abbès

*Je vous remercie d'avoir mis à mon entière disposition avec grande générosité les données et matériels en m'ouvrant grand les portes de votre service en mettant à ma disposition la totalité des moyens à l'origine de ce travail de thèse. Vous m'avais accueillie chaleureusement dès le premier jour de mon arrivée au service*

*Nous remercions également l'ensemble des personnels de votre service pour leur disponibilité et leur gentillesse.*

**Professeur B. LARBAOUI**

Chef de service d'oncologie médicale, C.A-C Mesreghine, Oran

*Je vous remercie d'avoir mis à mon entière disposition avec grande générosité les données et matériels en m'ouvrant grand les portes de votre service en mettant à ma disposition la totalité des moyens à l'origine de ce travail de thèse. Qu'il trouve ici l'assurance de ma profonde gratitude.*

*Nous remercions également l'ensemble des personnels de votre service pour leur disponibilité et leur gentillesse.*

**Docteur M. KERKOU**

Chef d'entreprise DIAG-GENE, Angers, France

*Je vous remercie d'avoir mis à mon entière disposition avec grande générosité les données, matériels et services en mettant à ma disposition votre savoir et expérience pour réaliser ce travail de thèse. Qu'il trouve ici l'assurance de ma profonde gratitude pour sa présence remarquable durant la réalisation de ce travail et son engagement dans toutes les étapes de mon encadrement.*

**Docteur M. Sbaihia**

Maître de conférences à la Faculté des Sciences de l'Université Hasiba Benbouali de Chlef

*Je vous remercie d'avoir mis à mon entière disposition avec grande générosité les données et matériels en m'ouvrant grand les portes de votre laboratoire en mettant à ma disposition la totalité des moyens à l'origine de ce travail de thèse.*

*Nous remercions également l'ensemble des personnels du laboratoire pour leur disponibilité et leur gentillesse. Qu'il trouve ici l'assurance de ma profonde gratitude.*

*Je remercie mes amis Diaf Mustapha et Tifrit Karim pour leur aide pour ce travail, pour leur soutien, « statistique et traduction ». Grâce à vous, au quotidien, le travail se fait dans de bonnes conditions.*

*Je remercie le chef de département de biologie pour son aide et son soutien et d'avoir mis à mon entière disposition les laboratoires et matériels*

*Que toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de cette thèse soient remerciées pour leur aide et trouvent ici l'expression de ma profonde considération.*

*J'aimerais aussi remercier mes parents, à qui je dois tout ce que je suis, que Dieu vous préserve et vous accorde longue vie maman et mon père que Dieu ait son âme.*

*Enfin, je remercie de tout mon cœur mon épouse qui n'a cessé de m'encourager tout au long de ces années, d'être à côté de moi dans les moments les plus difficiles.*

*Je dédie particulièrement ce travail à mes petits anges Mohamed et Alaa, les rayons de soleil de ma vie.*

# Résumé

**Contexte :** Le cancer gastrique trace un nombre considérable de morbidité et de mortalité dans le monde entier. L'infection par l'*Helicobacter pylori* est considérée comme un risque potentiel de développer un cancer gastrique en contribution du facteur génétique de l'hôte. Les polymorphismes de l'IL-1 $\beta$  et l'IL-1RN semblent des facteurs pour maintenir et promouvoir l'infection à l'*Helicobacter pylori* et éventuellement, stimulent la croissance néoplasique de la muqueuse gastrique.

**Objectif et méthodes :** Afin d'élucider l'effet de ces polymorphismes en association avec le cancer gastrique en mettant l'accent sur le rôle des facteurs de virulence de l'*Helicobacter pylori* dans une population du nord-ouest de l'Algérie, une étude cas-témoins a été réalisée. L'analyse a été portée sur 79 patients infectés par l'*Helicobacter pylori* atteints d'une gastrite chronique atrophique et de carcinome gastrique, et 32 sujets ont été recrutés en tant que cas-témoins. Les polymorphismes de l'IL-1 $\beta$ -31 bi-allélique et IL-1 $\beta$ -511 bi-allélique et le polymorphisme de l'IL-1RN penta-allélique ont été génotypés. Ainsi qu'une prospection des gènes de l'*Helicobacter pylori* : *vac A* (*s1/s2*, *m1/m2*), *cag-PAI* (*cag A*, *cag E*, *vir B11*) et *fla A* a été réalisés.

**Résultats :** Le génotype homozygote IL-1 $\beta$ -31\*C (OR : 4,6 [95 % CI 1,43 – 14,81] ; *p* : 0,01) et l'IL-1RN\*2 de type hétérozygote (OR : 4,2 [95 % IC 1,23 – 14,337] ; *p* : 0,02) ont été associées à un risque accru de développer un carcinome gastrique. Cependant, l'IL-1 $\beta$ -511\*T a été associée à un risque accru de développement de la gastrite chronique atrophique (OR : 4,3 [1,54 – 11,89] ; *p* : 0,005). Les allèles *vac A* de type *s1/m1* et l'intégrité de *cag-PAI* de l'*H. pylori* ont été associés au développement du cancer gastrique à 93,7 %.

**Conclusion :** les polymorphismes de l'IL-1 $\beta$  et IL-1RN associés à une infection à l'*H. pylori* contribuent au développement des gastrites chroniques atrophiques et des carcinomes gastriques dans une population algérienne. Les allèles IL-1 $\beta$ -31\*C et IL-1RN\*2 ont été associés à un risque accru de développer un carcinome gastrique. Cependant, l'IL-1 $\beta$ -511\*T a été associé à un risque accru de développer une gastrite chronique atrophique sans aucune association significative pour développer un carcinome gastrique. L'étude des facteurs de virulence a révélé que les gènes et des régions spécifiques telles que *cag A*, *vac A s1/m1*, et l'intégrité de l'îlot de pathogénicité *cag-PAI* ont été liés à l'évolution du cancer gastrique. Ainsi que l'extrémité gauche de l'îlot (*vir B11*) a été liée au développement de gastrite chronique atrophique.

**Mots clé :** Cancer gastrique, polymorphisme, *Helicobacter pylori*, *vac A*, *cag-PAI*, IL-1, PCR.



## ملخص

**الخلفية :** يسبب سرطان المعدة قدرا كبيرا من المراضة والوفيات في جميع أنحاء العالم. وتعتبر الإصابة بالهيليكوباكتر بيلوري من المخاطر المحتملة للإصابة بسرطان المعدة بمساهمة العامل الوراثي للمضيف. ويبدو أن تعدد الأشكال IL-1 $\beta$  و IL-1RN من عوامل إبقاء وتعزيز عدوى الهيليكوباكتر بيلوري ويساعد على تحفيز نمو الأورام في الغشاء المخاطي للمعدة.

**الهدف والوسائل :** لتوضيح تأثير هذه الأشكال المتعددة في توليد سرطان المعدة من خلال التركيز على دور عوامل الفوعة لهيليكوباكتر بيلوري عند عدد من سكان شمال غرب الجزائر، أجريت دراسة الحالات مع الشواهد. التحاليل أجريت على 79 مصابا بالبكتيريا الحلزونية مع التهاب المعدة الضموري المزمن و أو سرطان المعدة، كما تم توظيف 32 متطوعا كشواهد. تم تصنيف النمط الجيني متعدد الأشكال ل IL-1 $\beta$ -31 ثنائية الأليلية و IL-1 $\beta$ -511 ثنائي الأليلية و IL-1RN خماسي الأليلية و استكشاف جينات هيليكوباكتر بيلوري *vac A* (*m1/m2*، *s1/s2*)، *cag-PAI* (*cag A*، *cag E*، *cag A*) و *vir B11* و *fla A*

**النتائج :** وجد ارتباط كل من المتماثل الوراثي IL-1 $\beta$ -31\*C (الخطر النسبي: 4.6 [مؤشر ثقة 95٪ 43,1 حتى 14,81]، احتمال: 0,01) والمتغاير الوراثي IL-1RN\*2 (الخطر النسبي: 4,2 [مؤشر ثقة 95٪ 23,1 حتى 14,34] ، احتمال: 0,02) مع زيادة خطر الإصابة بسرطان المعدة. الأليل IL-1 $\beta$ -511\*T كان مرتبط مع زيادة خطر تطور التهاب المعدة الضموري المزمن (الخطر النسبي: 4,3 [مؤشر ثقة 95٪ 54,1 حتى 11,89]، احتمال: 0,005). الصفة الجينية *vac A* (*m1/s1*) وسلامة *cag-PAI* مرتبطان مع تطور سرطان المعدة ب 93,7٪.

**الخاتمة:** الأشكال المتعددة ل IL-1 $\beta$  و IL-1RN المرتبطون بالإصابة بهيليكوباكتر بيلوري تساهمون في تطوير التهاب المعدة الضموري المزمن الى سرطان المعدة عند السكان الجزائريين. ارتبطت الأليلات IL-1 $\beta$ -31\*C و IL-1RN\*2 بزيادة خطر الإصابة بسرطان المعدة. لكن IL-1 $\beta$ -511\*T ارتبط مع زيادة خطر الإصابة بالتهاب المعدة الضموري المزمن دون أي تأثير في تطوير سرطان المعدة. وكشفت دراسة عوامل الفوعة على إرتباط الجينات ومناطق محددة مثل *vac A* *m1/s1* وسلامة الجزيرة المسببة للأمراض *cag-PAI* بتطور سرطان المعدة. فضلا عن ان الطرف الأيسر من الجزيرة (*vir B11*) مرتبط بتطور التهاب المعدة الضموري المزمن.

**كلمات البحث:** سرطان المعدة، الأشكال المتعددة، هيليكوباكتر بيلوري، IL-1، *vac A*، PCR، *cag-PAI*

# Summary

**Background:** The Gastric cancer causes a significant amount of morbidity and mortality worldwide. Infection with *Helicobacter pylori* is considered a potential risk of developing gastric cancer in association with contributing host genetic factor. IL-1 $\beta$  and IL-1RN polymorphisms appear to maintain and promote *Helicobacter pylori* infection and to stimulate neoplastic growth of the gastric mucosa.

**Objective and methods:** To elucidate the effect of these polymorphisms in combination with gastric cancer by focusing on the role of *Helicobacter pylori* virulence factors in a population from northwestern Algeria, a case-control study was carried out on 79 patients infected with H. pylori with chronic atrophic gastritis and/or gastric carcinoma, and 32 subjects were recruited as case-control. IL-1 $\beta$ -31 bi-allelic and IL-1 $\beta$ -511 bi-allelic polymorphisms and IL-1RN penta-allelic were genotyped. As well as a prospection of the *Helicobacter pylori*: *vac A* (*s1/s2*, *m1/m2*), *cag-PAI* (*cag A*, *cag E*, *vir B11*) and *fla A* genes were carried out.

**Results:** IL-1 $\beta$ -31\*C homozygous genotype (OR: 4.6 [95% CI 1.43 - 14.81]; p: 0.01) and IL-1RN\*2 heterozygous (OR=4.2 [95% CI 1.23 - 14.34], p: 0.022) were associated with an increased risk of developing gastric carcinoma. However, IL-1 $\beta$ -511\*T was associated with an increased risk of development of chronic atrophic gastritis (OR: 4.286 [1.54-11.89], p: 0.005). *Vac A s1/m1* and the *cag-PAI* integrity of *Helicobacter pylori* were associated with the development of gastric cancer at 93.7%.

**Conclusion:** IL-1 $\beta$  and IL-1RN polymorphisms associated with *Helicobacter pylori* infection contribute to the development of chronic atrophic gastritis and gastric carcinomas in an Algerian population. The alleles IL-1 $\beta$ -31\*C and IL-1RN\*2 were associated with an increased risk of developing gastric carcinoma. However, IL-1 $\beta$ -511\*T was associated with an increased risk of developing chronic atrophic gastritis with no significant association of developing gastric carcinoma. The study of virulence factors revealed that genes and specific regions such as *cag A*, *vac A s1/m1*, and the integrity of the pathogenicity island *cag-PAI* have been linked to the evolution of gastric cancer. As well as the left end of the islet (*vir B11*) has been linked to the development of chronic atrophic gastritis.

**Keywords:** gastric mucosa, Polymorphism, *Helicobacter pylori*, IL-1, *vac A*, *cag-PAI*, PCR

# Sommaire

<b>Introduction</b> .....	3
<b>Partie bibliographique</b> .....	5
<b>Chapitre I. Anatomie et histologie de l'estomac</b> .....	7
I.1. Anatomie de l'estomac .....	7
I.1.1. La muqueuse gastrique .....	8
I.1.2. La glande fundique de la muqueuse gastrique .....	9
I.2. Histologie de l'épithélium gastrique .....	11
I.3. Renouvellement tissulaire épithélial .....	16
<b>Chapitre II. Carcinogénèse de la muqueuse gastrique</b> .....	20
II.1. Facteurs génétiques héréditaires .....	21
II.2. Facteurs génétiques acquis .....	23
II.2.1. L'instabilité chromosomique .....	24
II.2.2. L'instabilité des microsatellites .....	26
II.2.3. SNPs dans les gènes candidats .....	27
II.3. Étude HuGE .....	27
<b>Chapitre III. Helicobacter pylori et la réponse immunitaire</b> .....	30
III.1. Helicobacter pylori .....	30
III.2. La pathogénèse de l'H. pylori dans la carcinogénèse de la muqueuse gastrique .....	33
III.2.1. Les facteurs de virulence bactérienne .....	34
III.2.1.1. cag-PAI et CagA .....	34
III.2.1.2. cag A et des motifs de (Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala (EPIYA)) .....	36
III.2.1.3. Vac A .....	36
III.2.1.4. OipA (Outer inflammatory protein) .....	37
III.2.1.5. DupA (Duodenal ulcer promoting gene) .....	38
III.2.2. Facteurs génétiques de l'Hôte .....	38
III.2.2.1. Les polymorphismes du gène IL-1 .....	38
III.2.2.2. Autres polymorphismes des gènes des cytokines .....	38
III.2.3. Sécrétion d'acide .....	39
III.2.4. Cyclooxygénase .....	40
III.2.5. Facteurs environnementaux .....	41

III.2.6. Infection à l'helminthe .....	42
III.2.7. Les insectes .....	42
III.2.8. Autre facteur : origine ancestrale .....	42
III.3. La colonisation de la muqueuse gastrique par l'H. pylori.....	43
III.3.1. Uréase-métabolisme de l'urée.....	44
III.3.2. Les Flagelles.....	45
III.3.3. Colonisation de la muqueuse gastrique et échappement de l'acidité de la lumière. ....	46
III.3.4. Colonisation persistante de la muqueuse gastrique. ....	48
III.3.5. Toxines sécrétées par l'H. pylori.....	49
III.3.6. Évasion de la reconnaissance immunitaire innée .....	53
III.3.7. Modulation de l'effecteur de la réponse cellulaire T.....	61
III.3.8. Conséquences systémiques de l'immunosuppression .....	63
<b>Partie expérimentale</b> .....	<b>65</b>
<b>I. Matériels et Méthodes</b> .....	<b>66</b>
I.1. Les sujets d'étude.....	67
I.1.1. Critère d'inclusion .....	68
I.1.2. Critère d'exclusion.....	68
I.2. Identification de l'infection à l'H. pylori.....	68
I.2.1. Identification histopathologie de l'H. pylori.....	68
I.2.2. Identification de l'H. pylori par sérologie.....	68
I.2.3. Identification par la Biologie moléculaire .....	69
I.2.3Les facteurs de virulence de l'H. pylori.....	70
I.3. Analyse des polymorphismes de l'interleukine-1 .....	71
I.3.1. Extraction de l'ADN d'un tissu frais ou congelé, frottis buccal ou du sang total.....	72
I.3.2. La technique d'amplification de l'ADN par la réaction de polymérisation en chaîne.....	76
I.3.2.1. Préparation du Mix PCR.....	77
I.3.2.2. Digestion.....	78
I.3.3. L'électrophorèse .....	79
I.3.3.1. Révélation des bandes d'ADN.....	80
I.4. Méthodes statistiques .....	81
I.5. Le Déséquilibre de liaison .....	82
<b>II. Résultats</b> .....	<b>86</b>
II.1. Âge et sexe .....	86
II. 2. Le génotypage de l'IL-1 .....	86

II.2.1. Le déséquilibre de liaison du gène l'IL-1 .....	90
II.2.2. Les tests de significations .....	93
II.2.3. Le génotypage de l'IL-11 $\beta$ -511 .....	94
II.2.4. Le génotypage de l'IL-1 $\beta$ -31 .....	94
II.2.5. Régression logistique génotypique et allélique de l'IL-1 .....	94
II.2.6. Études comparatives de l'IL-1 entre groupes .....	97
II.3. Le génotypage de l'H. pylori .....	98
II.4. L'interaction du génotype de l'IL-1 et les gènes de l'H. pylori .....	103
<b>III. Discussion</b> .....	107
<b>Conclusion</b> .....	119
<b>Références bibliographique</b> .....	
<b>Annexes</b> .....	

## Liste des tableaux

Tableau 1 : Les amorces et condition PCR de l'analyse des polymorphismes de l'IL-1 $\beta$ et IL-1RN ...	80
Tableau 2 : les jeux d'amorces utilisés pour le génotypage H. pylori.....	81
Tableau 3 : Répartition des populations d'étude selon le sexe.....	86
Tableau 4 : Distribution des fréquences génotypiques des polymorphismes au niveau de l'IL-1 $\beta$ -511 (C/T SNP), IL-1 $\beta$ -31 (T/C SNP) et l'IL-1-RN (VNTR) chez les groupes patients (GA et CG) et le groupe témoins .....	90
Tableau 5 : Analyse de régression logistique des fréquences génotypiques et alléliques des polymorphismes (IL1 $\beta$ -511, IL1 $\beta$ -31, l'IL1-RN VNTR) chez les groupes patients (GA et CG) et le groupe témoins (TS).....	96
Tableau 6 : Répartition du génotype chez les groupes de patients. Analyse de régression combinée (IL1RN contre IL-1 $\beta$ -31) test de Chi-square.....	97
Tableau 7 : Répartition du génotype chez les groupes de patients. Analyse de régression combinée (IL-1RN contre IL-1 $\beta$ -511) test du Chi-square .....	98

# Liste des figures

Figure 1 : Anatomie de l'estomac .....	11
Figure 2 : Paroi de l'estomac : le plissement .....	13
Figure 3 : Glandes gastriques.....	14
Figure 4 : Estomac : glande gastrique .....	15
Figure 5 : Représentation schématique des deux mécanismes majeurs de régénération et restitution épithéliales.....	17
Figure 6 : Représentation schématique de la génération des différents types cellulaires à partir des cellules souches dans les glandes gastriques antrale et fundique.....	18
Figure 7 : les différentes voies de la carcinogenèse de la muqueuse gastrique.....	21
Figure 8 : Microphotographie MEB de de l'H. pylori. ....	33
Figure 9 : Microphotographie MET de l'H. pylori (Fleming, et al., 2007).....	33
Figure 10 : L'îlot de pathogénicité cag contient des gènes qui indiquent une variation de séquence marquée.....	35
Figure 11 : Les régions de vac A dans différentes souches de H. pylori. ....	37
Figure 12 : Déterminisme pathologique lié à H. pylori.....	43
Figure 13 : facteurs de colonisation et de persistance de H. pylori.....	47
Figure 14 : La subversion par l'H. pylori de la reconnaissance immunitaire innée .....	56
Figure 15 : Activation du NLR, la signalisation NF- $\kappa$ B et de la caspase 1 par l'H. pylori.....	60
Figure 16 : l'H. pylori, altère l'immunité à médiation cellulaire T par des mécanismes directs et indirects.....	64
Figure 17 : Illustration schématique des polymorphismes dans les gènes IL-1 $\beta$ et IL-1RN.....	71
Figure 18 : Protocole simplifier du Kit MagaZorb®.....	75
Figure 19 : Exemple de calcul du déséquilibre de liaison pour deux locus bi-alléliques.....	83
Figure 20 : Représentation graphique de la répartition des effectifs des pathologies gastriques et le groupe témoin sain réparti par sexe.....	87
Figure 21 : Gel des produits de PCR de l'IL-1RN.....	88
Figure 22 : Gel des produits amplifiés par PCR-RFLP (enzyme AluI). ....	89
Figure 23 : Distribution des fréquences génotypiques des polymorphismes (IL-1B-511, IL-1B-31 et l'IL-1-RN VNTR) chez les groupes patients (GA+CG) et le groupe témoins.....	91
Figure 24 : Distribution des fréquences génotypiques de polymorphisme de l'IL-1RN (VNTR) chez les groupes patients (GA+CG) et le groupe témoins. ....	92
Figure 25 : Distribution des fréquences génotypiques de polymorphisme de l'IL-1 $\beta$ -511chez les groupes patients (GA+CG) et le groupe témoins. ....	92
Figure 26 : Distribution des fréquences génotypiques de polymorphisme IL-1 $\beta$ -31 chez les groupes patients (GA+CG) et le groupe témoin. ....	93
Figure 27 : Coupe histologique d'une biopsie gastrique qui représente d'une Gastrite chronique atrophique infecté par l'H. pylori.....	100
Figure 28 : Gel des produits amplifiés par PCR des facteurs de virulence de l'H. pylori.....	101
Figure 29 : Histogramme des fréquences des facteurs de virulence de l'H. pylori des deux groupes pathologique (GA et CG). ....	101
Figure 30 : Comparaison des effectifs des facteurs de virulence de l'H. pylori des deux groupes pathologiques (GA et CG) par sexe. ....	102
Figure 31 : Barres groupées des pourcentages des facteurs de virulence d'H. pylori des populations pathologique (GA et CG). ....	102

Figure 32 : Histogramme des interactions des génotypes de l'IL-1 $\beta$ -31 avec les facteurs de virulence de H. pylori chez les patients atteints d'une gastrite atrophique. ....104

Figure 33 : Histogramme des interactions des génotypes de l'IL-1 $\beta$ -511 avec les facteurs de virulence de H. pylori chez les patients atteints d'une gastrite atrophique. ....104

Figure 34 : Histogramme des interactions des génotypes de l'IL-1RN avec les facteurs de virulence de H. pylori chez les patients atteints d'une gastrite atrophique. ....105



# Liste des abréviations

ABL : Abelson leucémie murine  
GA : gastrite atrophique ;  
AINS : anti-inflammatoires non stéroïdiens  
APC : Gène *Adenomatous Polyposis Coli*  
APUD : absorption de précurseur aminé et décarboxylation  
ASC : *apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase activation and recruitment domain (CARD)*  
*babA* : *Lewis B binding adhesin*  
C.A-C : Centre Anti-Cancer  
cag : cytotoxine gène associé  
CARD : domaine d'activation et de recrutement de la caspase  
CDH1 : le gène codant pour la Cadhérine 1 (E-Cadhérine)  
CLR : récepteurs lectine de type C  
COX : cyclooxygénase  
CRK : Adaptateur molécule CRK, proto-oncogène c-Crk ou p38  
CSK kinase : C-terminale de la kinase Src  
CTNNA1 : le gène qui code pour la caténine  $\alpha$ -1 ( $\alpha$ -E-caténine)  
dATP (désoxy-adénine triphosphate), dCTP (désoxy-cytosine triphosphate), dGTP (désoxy-guanine triphosphate), dTTP (désoxy-thymine triphosphate)  
DC-SIGN : spécifique des cellules dendritiques molécule d'adhésion intercellulaire-3 grabbing non-intégrine  
DD : domaine de mort  
DHA : Acide Docosa Hexaénoïque  
DU : l'ulcère duodéal  
DupA : *Duodenal ulcer promoting gene*  
EPIYA : Glutamate-proline-isoleucine-tyrosine-alanine  
ERK : *Extracellular signal-regulated kinases*  
FAK : *Focal Adhesion Kinase*  
FDA : *Food and Drug Administration*  
FlaA : co-polymère de flagellines (sous-unité majeure)  
FlaB : (sous-unité mineure)  
FOXP3 : *forkhead box P3*  
GAPPS : *gastric adenocarcinoma and proximal polyposis of the stomach*  
CG : cancer gastrique ;  
GGT : *Gamma-glutamyl transpeptidase*  
GRB2 : facteur de croissance lié au récepteur de protéine 2  
GSH : Glutathion  
GWAS : *genome-wide association studies*, étude d'association pangénomique  
H. pylori : *Helicobacter pylori*  
H.E. : Hématoxyline et éosine  
HDGC : *Hereditary diffuse gastric cancer*  
HER 2 : *Human Epidermal Growth Factor Receptor-2* (récepteur pour les facteurs de croissance épidermiques humains) (CD340)  
HGF : *Hepatocyte Growth Factor*  
HNPCC : *Hereditary nonpolyposis colon cancer*  
HOP : *Homeodomain-only protein*  
HuGE : *Human Genome Epidemiology*

i : régions intermédiaires du gène *vac A*  
 IARC : *International Agency for Research on Cancer*  
 IC : intervalle de confiance  
 IFN : interféron  
 IL-1RN : gène qui code pour antagoniste anti-inflammatoire (Interleukin-1ra) ;  
 IL-1 $\beta$ -31 : cluster du gène qui code pour l'Interleukin-1 $\beta$  dans la région du promoteur TATA-box à la position -31 ;  
 IL-1 $\beta$ -511 : cluster du gène qui code pour l'Interleukin-1 $\beta$  dans la région du promoteur TATA-box à la position -511 ;  
 IRF : *Interferon regulatory factor*  
 KSR1 : *Kinase suppressor of Ras 1*  
 LD : déséquilibre de liaison  
 LFA1 : *lymphocyte function-associated antigen 1*  
 LKB1 : *Liver kinase B1*, ou kinase hépatique B1  
 LPS : lipopolysaccharide  
 LRP1 : Récepteur à Lipoprotéines de basse densité lié à la protéine 1  
 LSP1 : *Lymphocyte-specific protein 1*  
 M : marqueur de taille d'ADN  
 m : région médiane du gène *vac A*  
 MALToma : lymphome du tissu lymphoïde associé aux muqueuses gastriques  
 MAPK : *Mitogen-activated protein kinases*  
 miARN : *microARN*  
 MLH1 : *MutL homolog 1*  
 MMPs : métalloprotéinases matricielles  
 MSH2 : *MutS protein homolog 2, DNA mismatch repair protein*  
 mTOR : mammalian target of rapamycin, cible de la rapamycine chez les mammifères  
 MYD88 : *myeloid differentiation primary response gene 88*, gène de la réponse primaire de différenciation myéloïde 88  
 NF- $\kappa$ B : le facteur nucléaire- $\kappa$ B, *nuclear factor-kappa B*  
 NLRs : récepteurs NOD-like  
 NME1 : *Nucleoside diphosphate kinase A*  
 NOD : *Nucleotide-binding oligomerization domain*  
 NOTCH1 : *Notch homolog 1, translocation-associated*  
 OipA : *Outer inflammatory protein*  
 OMVs : *Outer-membrane vesicles*  
 OR : Risque relatif ;  
 PAI : îlot de pathogénicité  
 PAMPs : *pathogen-associated molecular patterns*  
 PAR1 : *Prader-Willi/Angelman region-1*  
 PCR : *polymerase chain reaction*  
 PDX1 : *pancreatic and duodenal homeobox 1*  
 PGE : prostaglandines  
 PRR : *pattern recognition receptors*  
 PSCA : cellules souches de la prostate  
 RAF1 : *proto-oncogene serine/threonine-protein kinase*  
 RecA : une protéine d'*Escherichia coli* de 38 kDa essentielle pour la réparation et la maintenance de l'ADN  
 rER : réticulums endoplasmiques rugueux  
 RFLP : *Restriction Fragment Length Polymorphism*

RGD : Le tripeptide Arg-Gly-Asp  
RIG-I : *retinoic acid-inducible gene 1*  
RLR : récepteurs de l'hélicase RIG-like  
ROS : *reactive oxygen species*  
ROS1 : *Proto-oncogene tyrosine-protein kinase*  
s : région de signal du gène *vac A*  
*sabA* : adhésine de liaison sialyl-Lewis<sup>x</sup>  
SHH : morphogène Sonic Hedgehog  
SHP-2 : la protéine tyrosine phosphatase-2  
siRNA : *small interfering RNA*  
SLC1A2 : *solute carrier family 1 member 2 (Excitatory amino-acid transporter 2 (EAAT2))*  
SNP : polymorphisme d'un simple nucléotide  
SRC : protéine tyrosine kinase proto-oncogène (*src, sarcoma*)  
STK11 : Sérine-Thréonine Kinase 11  
T4SS : le système de sécrétion de type IV  
TAE : Tris, Acide acétique et EDTA  
Taq polymérase : la polymérase de la bactérie thermophile *Thermus aquaticus*  
TFF1 : *Trefoil factor 1*  
TGF $\alpha$  : *Transforming growth factor alpha*  
TGF- $\beta$ 1 : transforming growth factor  $\beta$ 1  
TIMPs : inhibiteurs de métalloprotéinases  
TIR : domaine de récepteur Toll /interleukine-1.  
TLR : récepteurs Toll-like, Toll-like receptor  
Tm : Température d'hybridation  
TNF- $\alpha$  : tumor necrosis factor alpha  
TS : témoin sain  
ure : gène qui code pour l'uréase  
*vac A* : vacuolante cytotoxine A

# **Introduction**

## Introduction

Le cancer gastrique (CG) est la troisième principale cause de décès par cancer dans le monde entier (Ahn & Lee, 2015). Cette constatation classe le cancer gastrique comme le cinquième cancer le plus fréquent dans le monde, derrière les cancers du poumon, du sein, colorectal et de la prostate et la troisième principale cause de morbidité liée au cancer à l'échelle mondiale chez les deux sexes, ce qui constitue 9,7% de la mortalité liée au cancer (723.000 décès en 2012, 8,8% du total) (Ahn & Lee, 2015; Khatoon, et al., 2016). En Algérie ont été estimés à 952,000 nouveaux cas de cancer gastrique en 2012 (6,8% de la charge totale du cancer) (IARC, 2012).

L'infection de la muqueuse gastrique par *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) est une pandémie dans le monde entier associée à des pathologies gastriques diverses, de gastrite asymptomatique et d'ulcère gastroduodéal à des tumeurs malignes (Lydia, et al., 2010). La forte association entre l'*H. pylori* et le cancer gastrique aboutit à la classification de ce germe comme carcinogène (classe I) par l'Organisation Mondiale de Santé en 1994 (IARC, 1995). Actuellement, dans le monde entier le cancer gastrique se développe de 1 à 3 % chez toutes les personnes infectées par l'*H. pylori*. Les résultats cliniques de l'infection dépendent largement de la distribution et de la gravité induite par l'infection (McLean & El-Omar, 2014). La justification de ces résultats cliniques différents est progressivement dévoilée dans le paradigme de l'interaction entre deux voies, la sécrétion d'acide gastrique et une gastrite induite par l'*H. pylori* (Zeng, et al., 2003). La capacité et la localisation de la sécrétion élevée de l'acide gastrique déterminent des pathologies divergentes : une sécrétion élevée en acide en réponse à une gastrite antrale prédominante tend à développer des ulcères peptiques alors qu'une faible sécrétion avec pangastrite tend à développer un cancer gastrique (Zeng, et al., 2003).

L'Interleukine-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) est l'une des puissantes cytokines pro-inflammatoires, régulée à la hausse en présence de l'*H. pylori* sur la muqueuse gastrique, ainsi qu'un inhibiteur puissant de la sécrétion d'acide gastrique (Hwang, et al., 2002). Le cluster IL-1 du gène IL-1 $\beta$  codant pour IL-1 $\beta$  et le gène IL-1RN codant pour l'antagoniste anti-inflammatoire (IL-1ra) du récepteur de l'IL-1, sont situés sur le chromosome 2q14 (Bidwell, et al., 1999). Ils présentent un certain nombre de polymorphismes fonctionnellement pertinents qui pourraient être corrélées avec la production élevée ou faible d'IL-1 $\beta$  (El-Omar, et al., 2000; El-Omar, et al., 2001; Hwang, et al., 2002). Une substitution dans la région promotrice de la TATA-box dans des positions -511 (CT ; dbSNP : rs16944) et la position -31 (TC ; dbSNP : rs1143627)

constituants deux polymorphismes nucléotidiques simples (SNP) en déséquilibre de liaison (Xu, et al., 2013), en biaisant cette interaction, provoquant un rapport IL-1 $\beta$ /IL-1RN très défavorable (Ruzzo, et al., 2005). L'IL-1 $\beta$  est non seulement un déterminant d'un phénotype pro-inflammatoire, mais il semble également être un cofacteur majeur de maintenir et de promouvoir l'infection à l'*H. pylori* (Take, et al., 2003). Les individus avec des génotypes pro-inflammatoires gastriques surexpriment de l'IL-1 $\beta$  en réponse à l'infection à l'*H. pylori*, qui conduit par conséquent à la surexpression de la gastrine, subissant une inflammation gastrique accrue, une atrophie gastrique, et hypochlorhydrie, et éventuellement peut stimuler la croissance néoplasique (Enrique & John, 2001; Ruzzo, et al., 2005).

Cette étude visait à évaluer les associations de ces polymorphismes en concomitance avec l'infection à l'*H. pylori* sur la muqueuse gastrique des patients atteints de carcinome gastrique (CG) et de gastrite chronique atrophique (GA) dans une population de l'ouest Algérien, en mettant l'accent sur le rôle des facteurs de virulence de cette bactérie.

# **Partie**

# **Bibliographique**

# **Chapitre I. Anatomie et histologie de l'estomac**



## Chapitre I. Anatomie et histologie de l'estomac

### I.1. Anatomie de l'estomac

L'estomac est un organe d'une dilatation en forme de sac musculaire creux mobile du tube digestif située directement en dessous du diaphragme, dans les régions épigastrique, ombilicale et de l'hypocondre gauche de l'abdomen entre l'œsophage et le duodénum. Il stocke temporairement et mélange les aliments ; il sécrète aussi le suc gastrique dans la lumière (le creux intérieur de l'estomac) et une hormone appelée gastrine dans le sang. Divisé en une partie verticale et une horizontale limitée en haut en avant par un prolongement de l'œsophage, le sphincter œsophagien situé au niveau du cardia permettant la jonction avec l'œsophage où il reçoit le bol alimentaire macéré. La partie distale, appelée sphincter pylorique, faisant la jonction avec le duodénum, la partie initiale de l'intestin grêle (Tortora & Grabowski, 1994; Martini, et al., 2009; McFarlane-Parrott, et al., 2013; Ross & Pawlina, 2015). La partie verticale comprend la grosse tubérosité (fundus) et le corps gastrique, la portion horizontale représente l'antrum (Figure 1) (Martini, et al., 2009).

Chez l'adulte, l'estomac mesure 20 cm de long et se trouve en rapport avec le foie, la rate, le pancréas, le diaphragme et les intestins. L'estomac permet d'assurer une partie de la digestion par des fonctions mécaniques (brassage) et chimiques, et par mélange fluide pulpeux des aliments au suc gastrique appelé chyme (Ross & Pawlina, 2015). Le pH de l'estomac varie de 1,5 à 5. Il présente deux courbures. La petite courbure est courte, siège sur la face postérieure de l'estomac, et elle est la continuation vers le bas de la paroi postérieure de l'œsophage. Juste avant le sphincter pylorique, elle s'incurve vers la droite et le haut pour réaliser la forme de « J » où l'œsophage rejoint l'estomac, la région antérieure forme un angle aigu vers le haut puis s'incurve vers le bas, formant la grande courbure, qui se dirige ensuite vers le sphincter pylorique. Grâce à sa musculature, l'estomac malaxe les aliments et les transforme en substance semi-fluide constituée d'aliments partiellement digérés, d'eau, de diverses enzymes de digestion et d'acide chlorhydrique (HCl), le chyme. Celui-ci est éjecté dans le duodénum par relâchement du pylore. Ce dernier a pour fonction essentielle la formation d'un réservoir assurant la continence gastrique.

Les anatomistes brutes subdivisent l'estomac en quatre régions. Le cardia entoure l'orifice œsophagien ; le fundus se situe au-dessus du niveau d'une ligne horizontale tracée à travers l'œsophage (orifice cardiaque) ; le corps se trouve en dessous de cette ligne ; et la partie

pylorique est la région en forme d'entonnoir qui débouche dans le pylore, la région du sphincter distal étroit entre l'estomac et le duodénum (Ross & Pawlina, 2015). Les histologistes subdivisent également l'estomac, mais dans seulement trois régions qui se distinguent par une composition cellulaire et fonctionnelle différente (Helander, 1981) (Figure 1). Ces subdivisions sont basées non pas sur l'emplacement, mais sur les types de glandes qui se produisent dans la muqueuse gastrique. Les régions histologiques sont les suivantes :

- région cardiaque (cardia), la partie près de l'orifice œsophagien, qui contient les glandes cardiaques.
- région du pylore (pylore), la partie proximale du sphincter du pylore, qui contient les glandes pyloriques.
- région fundique (fundus), la plus grande partie de l'estomac, qui est situé entre le cardia et le pylore et contient le fundus et les glandes gastriques (Figure 1).

### I.1.1. La muqueuse gastrique

L'estomac a le même plan de structure générale tout au long, constitué d'une muqueuse, une sous-muqueuse, une musculuse externe et une séreuse (Figure 2). L'examen de la surface interne de l'estomac vide révèle un certain nombre de plis longitudinaux ou des crêtes appelées plissement (rugae) de la muqueuse permettant d'offrir une plus grande surface de contact avec les aliments. Ces replis agissent mécaniquement sur la dégradation des aliments au cours du processus de brassage assuré par les contractions musculaires. Ils sont importants dans les régions les plus étroites de l'estomac, mais peu développées dans la partie supérieure (Figure 2). Lorsque l'estomac est complètement détendu, les rugae composées de la muqueuse et la sous-muqueuse sous-jacente, sont pratiquement disparaître. Les rugae ne modifient pas la surface totale ; au contraire, ils servent à absorber la dilatation et le remplissage de l'estomac (Kierszenbaum & Ters, 2016).

La muqueuse est formée par des sillons ou des tranchées peu profondes qui divisent la surface de l'estomac en renflement des zones irrégulières appelées zones mamelonnées. Ces sillons fournissent une zone légèrement augmentée de surface pour la sécrétion.

À plus fort grossissement, de nombreuses ouvertures peuvent être observées sur la surface de la muqueuse. Ce sont les cryptes gastriques ou fovéoles. Ils peuvent être aisément démontrés au microscope électronique à balayage (Figure 2). Les glandes gastriques débouchent dans le fond des cryptes gastriques.

L'épithélium qui tapisse la surface et les cryptes gastriques est cylindrique simple. Les cellules cylindriques sont désignées cellules muqueuses de surface. Chaque cellule possède une grande tasse, apical de granules de mucinogen, créant une feuille glandulaire de cellules (Figure 4). La coupelle de mucus occupe la majeure partie du volume de la cellule. L'appareil de Golgi et le noyau des cellules de surface de muqueuse sont situés au-dessous de la muqueuse du collet. La partie basale de la cellule contient de petites quantités de réticulum endoplasmique rugueux (rER) qui peuvent influencer sur une lumière basophile vers le cytoplasme quand on l'observe dans les échantillons bien conservés.

La sécrétion de mucus par les cellules muqueuses de surface est décrite comme mucus visible en raison de son aspect trouble. Il forme une couche épaisse, visqueuse, analogue à un gel qui adhère à la surface de l'épithélium ; ainsi, il protège contre l'abrasion des composants rugueux du chyme. En outre, la concentration élevée en bicarbonate et de potassium protège l'épithélium de la teneur en acide du suc gastrique. Le bicarbonate qui rend le mucus alcalin est sécrété par les cellules de la surface, il empêche le mélange rapide avec le contenu de la lumière gastrique par son confinement à l'intérieur de la tunique de la muqueuse. Ainsi que, les prostaglandines (PGE2) semblent jouer un rôle important dans la protection de la muqueuse gastrique. Elles stimulent la sécrétion de bicarbonates et augmenter l'épaisseur de la couche de mucus avec une vasodilatation accompagnée dans la lamina propria. Cette action améliore l'approvisionnement d'éléments nutritifs pour toute la zone endommagée de la muqueuse gastrique, optimisant ainsi les conditions pour la réparation des tissus.

### I.1.2. La glande fundique de la muqueuse gastrique

Sur le plan histologique, la paroi interne de l'estomac est constituée de différentes couches :

**La muqueuse :** c'est la première couche en contact avec le bol alimentaire. Elle est constituée par l'épithélium (composé de cellules épithéliales) et la lamina propria (composée de tissu conjonctif lâche) ainsi que d'une fine couche de muscle lisse la séparant de la sous-muqueuse. Elle est recouverte de mucus. La muqueuse est densément munie de glandes gastriques composées de cellules produisant les enzymes digestives, de l'acide chlorhydrique et du mucus.

**La sous-muqueuse :** constituée d'une couche de tissu conjonctif fibreux et vascularisé assurant l'irrigation des cellules gastriques.

**La couche musculaire :** constituée de 3 couches musculaires : une couche longitudinale externe, une couche intermédiaire circulaire et une couche interne oblique (Figure 1).

*La couche musculaire oblique interne :* elle est responsable du mouvement de brassage mécanique des aliments. Cette couche est spécifique à l'estomac et n'est présente dans aucun autre organe du système digestif. La paroi musculaire interne de l'antrum est plus épaisse que celle du fundus assurant des contractions plus forcées.

*La couche musculaire circulaire :* qui est également plus forte au niveau de l'antrum. Cette couche est concentrique à l'axe longitudinal de l'estomac.

*La couche musculaire longitudinale externe* (Figure 1).

**La séreuse :** elle est composée de plusieurs couches de tissu conjonctif en continuité avec le péritoine qui recouvre la totalité de la paroi externe l'estomac (Figure 1).

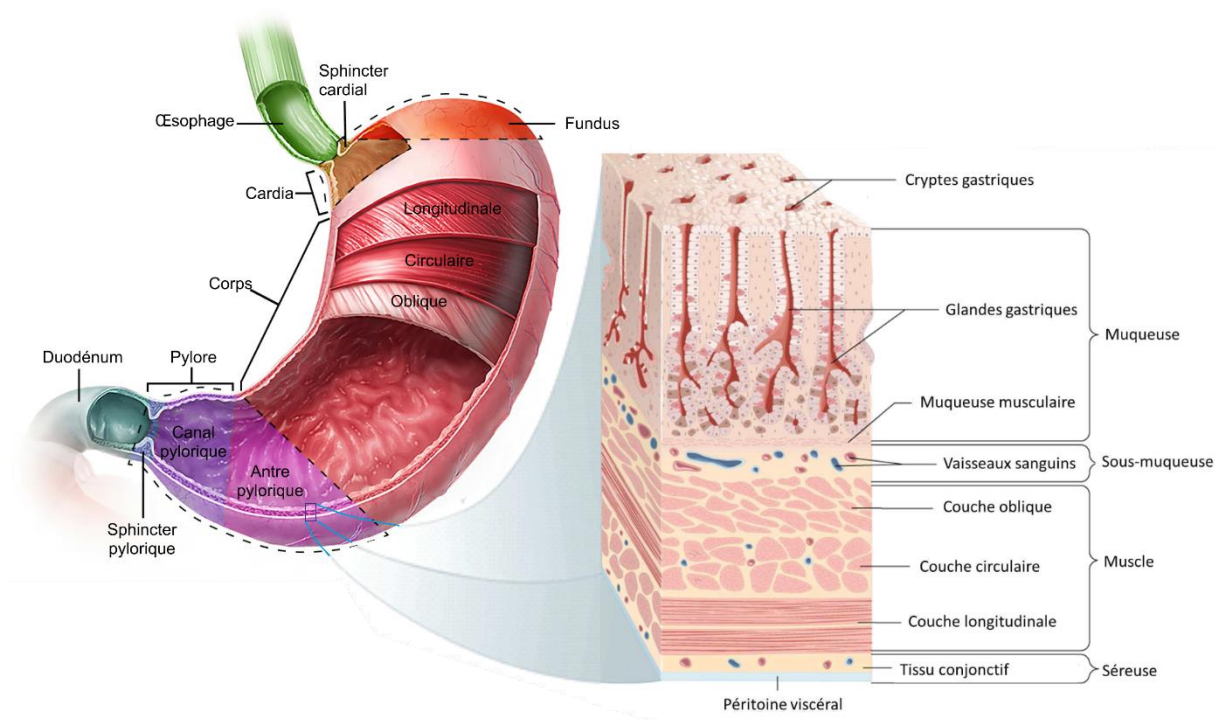


Figure 1 : Anatomie de l'estomac, modifiée d'après (Kierszenbaum & Ters, 2016)

## I.2. Histologie de l'épithélium gastrique

Les glandes gastriques sont identifiées en fonction de leur localisation et sont enchâssées dans l'épithélium cylindrique sous forme d'invaginations tubulaires ou cryptes gastriques. Les unités antrales et fundiques sont très différentes sur le plan histologique. Les glandes fundiques constituent entre 70 % et 80 % du total des glandes présentes dans l'estomac et sont les plus complexes. Elles comprennent 5 types majeurs de cellules épithéliales matures (Figure 3) : les cellules à mucus (ou mucocytes), les cellules pariétales, les cellules principales, les cellules endocrines et les cellules régénératrices. Les glandes pyloriques, situées au niveau du pylore, ne présentent que 15 % des glandes gastriques et sont essentiellement constituées de cellules endocrines, de cellules à mucus et de cellules régénératrices.

**Les cellules à mucus (ou mucocytes) :** Leur cytoplasme contient une gouttelette unique de sécrétion à haute teneur en mucine dont le contenu est expulsé par exocytose (les cellules caliciformes) (Lüllmann-Rauch, 2008). Le mucus joue un rôle dans la lubrification et la protection de la muqueuse contre l'autodigestion en formant un film protecteur neutralisant l'acidité et empêchant la pepsine d'entrer en contact direct avec la paroi gastrique (Allen & Flemström, 2005; Mustapha, 2011). Les mucines joueraient également un rôle dans la défense

antimicrobienne contre le pathogène gastrique tel que l'*H. pylori* (Kawakubo, et al., 2004; Fukuda, et al., 2006; Mustapha, 2011).

**Les cellules pariétales** ou oxyntiques sécrètent de l'acide chlorhydrique (HCl) et du facteur intrinsèque nécessaire à la conversion du pepsinogène en pepsine, à l'absorption du fer et à maintenir l'environnement gastrique suffisamment acide pour assurer la dénaturation et la digestion des protéines issues de l'alimentation. Le cytoplasme contient de nombreuses tubulovésicules et un réseau canaliculaire intracellulaire en continuité avec la lumière de la glande gastrique (Mustapha, 2011; Kierszenbaum & Ters, 2016). Après stimulation les tubulovésicules fusionnent avec la membrane plasmique du canalicule intracellulaire. On trouve de l'anhydride carbonique et de l' $H^+$ ,  $K^+$ -ATPase dans les microvillosités se projetant dans la lumière de canaliculaire intracellulaire (Kierszenbaum & Ters, 2016). Le HCl limite également le développement de microorganismes au niveau gastrique et joue un rôle dans l'équilibre des populations cellulaires. Les cellules pariétales produisent également une protéine particulière : le facteur intrinsèque, qui se lie sous forme de complexe à la vitamine B12 et qui est indispensable à l'absorption intestinale de cette vitamine.

**Les cellules principales** ou cellule a pepsine produisent et sécrètent deux molécules nécessaires à la digestion gastrique, le pepsinogène (42,5 kDa), précurseur d'une enzyme protéolytique, la pepsine (35 kDa) du suc gastrique lorsque le pH est inférieur à 5,0. et une lipase gastrique. La pepsine est une protéase digestive assurant la dégradation des protéines en acides aminés (Dunn, 2001; Mustapha, 2011; Kierszenbaum & Ters, 2016). La lipase est impliquée dans la dégradation des lipides en acides gras (Canaan, et al., 1999; Mustapha, 2011).

**Les cellules endocrines** principalement situées au niveau de l'antra, responsables de la sécrétion de gastrine, d'histamine, de somatostatine ainsi que d'autres hormones qui régulent les différents processus associés à la digestion (Mustapha, 2011).

**Les cellules régénératrices (ou cellules souches)** présentent au niveau des glandes antrales et fundiques, sont impliquées dans les processus de réparation tissulaire, de régénération et autorenewement de l'épithélium gastrique (Mustapha, 2011).

Certains peptides et neuropeptides gastriques, en plus de leur rôle de régulateurs des fonctions gastriques, possèdent des propriétés de facteurs de croissance et interviennent à ce titre dans le processus de renouvellement des cellules épithéliales. C'est notamment le cas



de la gastrine qui possède un effet prolifératif et de la somatostatine qui possède un effet antiprolifératif (Mustapha, 2011).

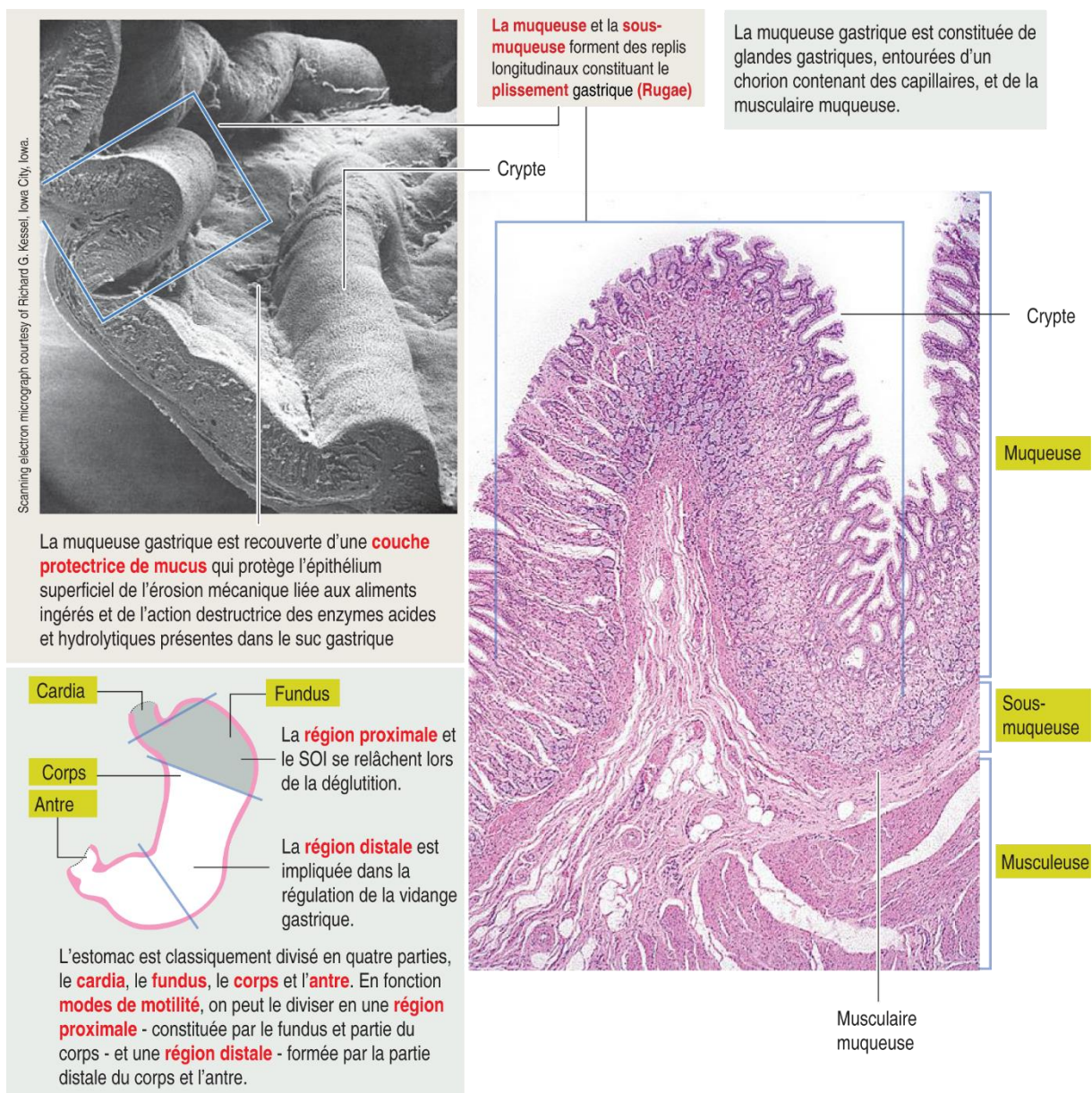


Figure 2 : Paroi de l'estomac : le plissement, modifiée d'après (Kierszenbaum & Ters, 2016).

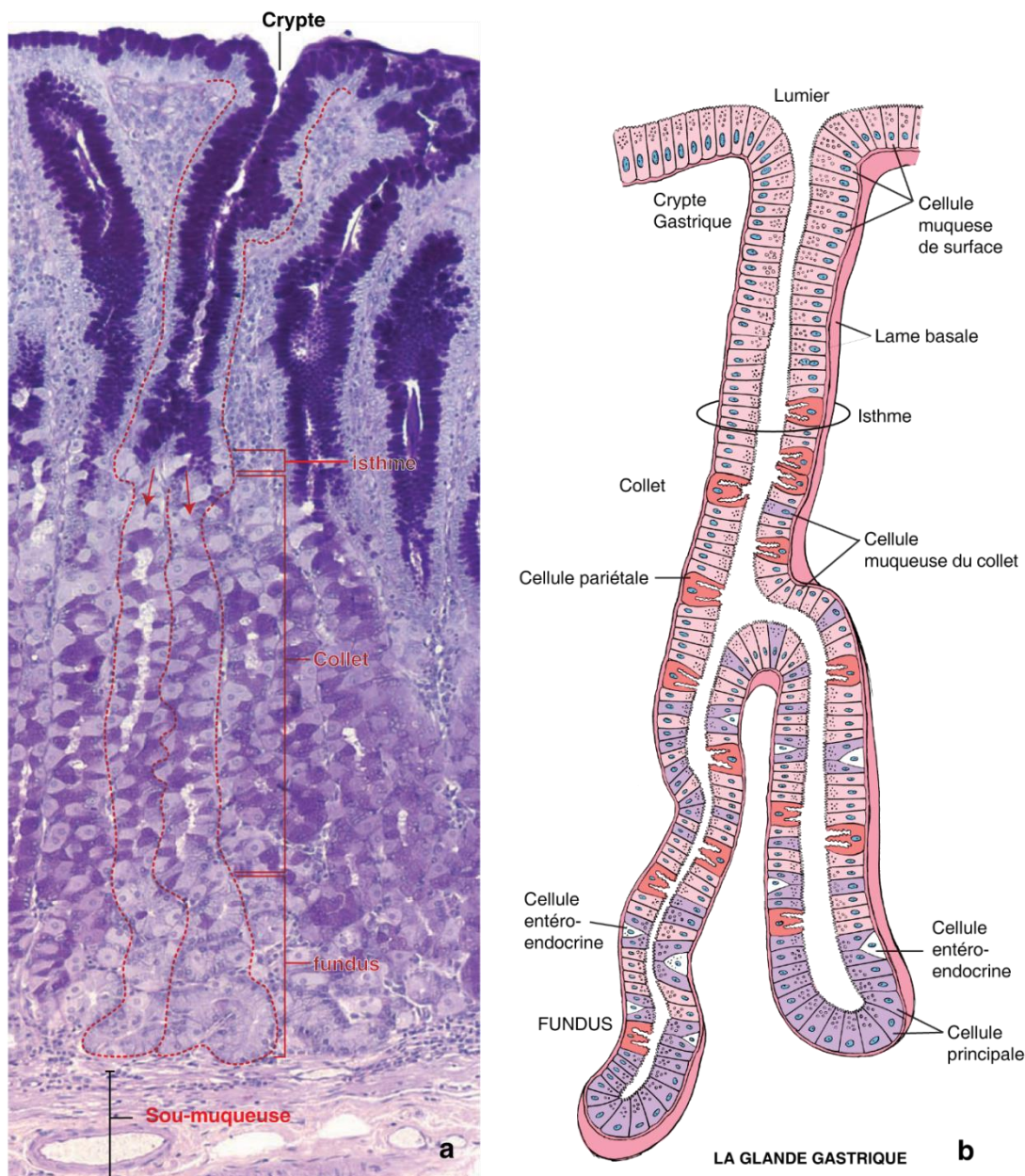


Figure 3 : Glandes gastriques.

a. Cette microphotographie montre la muqueuse fundique d'une préparation Bleu Alcian/PAS pour visualiser le mucus. Les invaginations de l'épithélium de surface pour former des cryptes gastriques. Les cellules muqueuses de surface et les cellules qui tapissent les cryptes gastriques sont facilement identifiées dans cette préparation, car le mucus neutre au sein de ces cellules est coloré intensément. Une des cryptes gastriques et sa glande fundique associée sont représentées par les lignes en pointillés rouges. Cette glande représente une glande tubulaire ramifiée simple (les flèches indiquent le motif de ramification). Il étend à partir du fond de la crypte gastrique vers la musculaire muqueuse. Les segments de la glande : court isthme, le site de divisions cellulaires ; relativement long collet ; et un fond plus court et plus large. La sécrétion de mucus des cellules muqueuses du collet est différente de celle produite par les cellules muqueuses de surface comme le montre la coloration magenta légère dans cette région de la glande (x 320). b. schéma simplifié d'une glande gastrique, illustrant la relation entre la glande dans la crypte gastrique. La zone de l'isthme comprend des cellules en division et les cellules non différenciées ; la région du collet contient des cellules muqueuses du collet, des cellules pariétales et les cellules entéro-endocrines, y compris l'absorption de précurseur aminé et décarboxylation (APUD) des cellules. Les cellules pariétales sont de grandes cellules acidophiles, en forme de poire trouvée dans toute la glande. Le fond



de la glande contient principalement des cellules principales, certaines cellules pariétales, et plusieurs types de cellules entéro-endocrines modifiée d'après : (Ross & Pawlina, 2015).

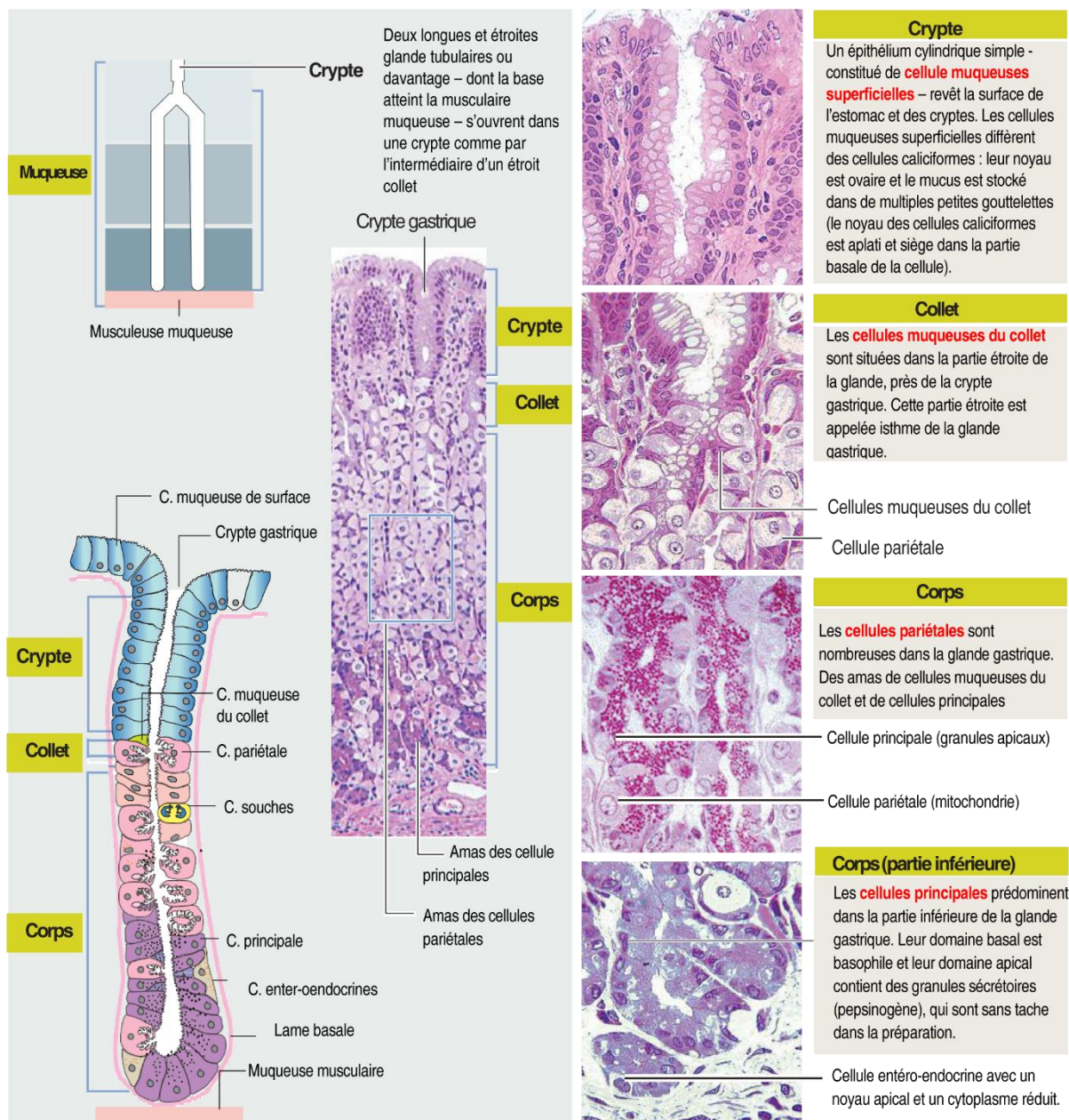


Figure 4 : Estomac : glande gastrique, modifiée d'après (Kierszenbaum & Ters, 2016)

### I.3. Renouvellement tissulaire épithélial

L'épithélium gastrique assure plusieurs fonctions physiologiques lui permettant de maintenir son intégrité fonctionnelle : la production de mucus et de peptides antimicrobiens, la régulation des réponses immunitaires et inflammatoires, la régénération (autorenouveaulement) et la réparation tissulaire.

Le maintien de l'intégrité tissulaire épithéliale est assuré par deux processus complémentaires (Figure 5) :

**La régénération continue** qui se fait via la prolifération et la différenciation des cellules souches progénitrices. Ce processus est responsable de l'autorenouveaulement de la muqueuse épithéliale et dure tout au long de la vie adulte. La régénération tissulaire à partir des cellules souches somatiques multipotentes est un mécanisme préminent au niveau des muqueuses épithéliales (Alison, et al., 2006; Blanpain, et al., 2007). La différenciation des cellules souches progénitrices peut être dérégulée suite à certaines infections chroniques entraînant éventuellement des transformations néoplasiques malignes et des tumeurs (Mustapha, 2011).

**La réparation tissulaire (restitution)** qui permet la restitution rapide des lésions superficielles de la muqueuse. La ré-épithélialisation se fait par migration des cellules avoisinantes vers le site de la lésion. Ce processus commence quelques minutes après la lésion (Silen & Ito, 1985; Hoffmann, 2005; Mustapha, 2011).

L'autorenouveaulement tissulaire de l'épithélium gastrique (antre et fundus) se fait par la prolifération et la différenciation de cellules souches somatiques multipotentes adultes présentes dans une zone germinative (isthme) à l'intérieur de chaque glande gastrique (Gordon & Hermiston, 1994; Karam, 1999). Cette zone se présente sous forme de niche (ou microenvironnement protégé) le long de la membrane basale (Watt & Hogan, 2000; Fuchs, et al., 2004; Moore & Lemischka, 2006). Les cellules souches somatiques multipotentes sont entourées par les fibroblastes subépithéliaux auxquels elles adhèrent fortement (Powell, et al., 1999; Powell, et al., 2005; Andoh, et al., 2007) (Figure 5). Les fibroblastes subépithéliaux secrètent une multitude de facteurs de croissance en particulier l'Hepatocyte Growth Factor (HGF), le Transforming Growth Factor  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) ainsi que des protéines morphogénétiques osseuses, des Métalloprotéinases Matricielles (MMPs), des inhibiteurs de métalloprotéinases

(TIMPs) et du collagène de types I, III et IV ( (Wagner, 2007; Hoffmann, 2008; Mustapha, 2011).

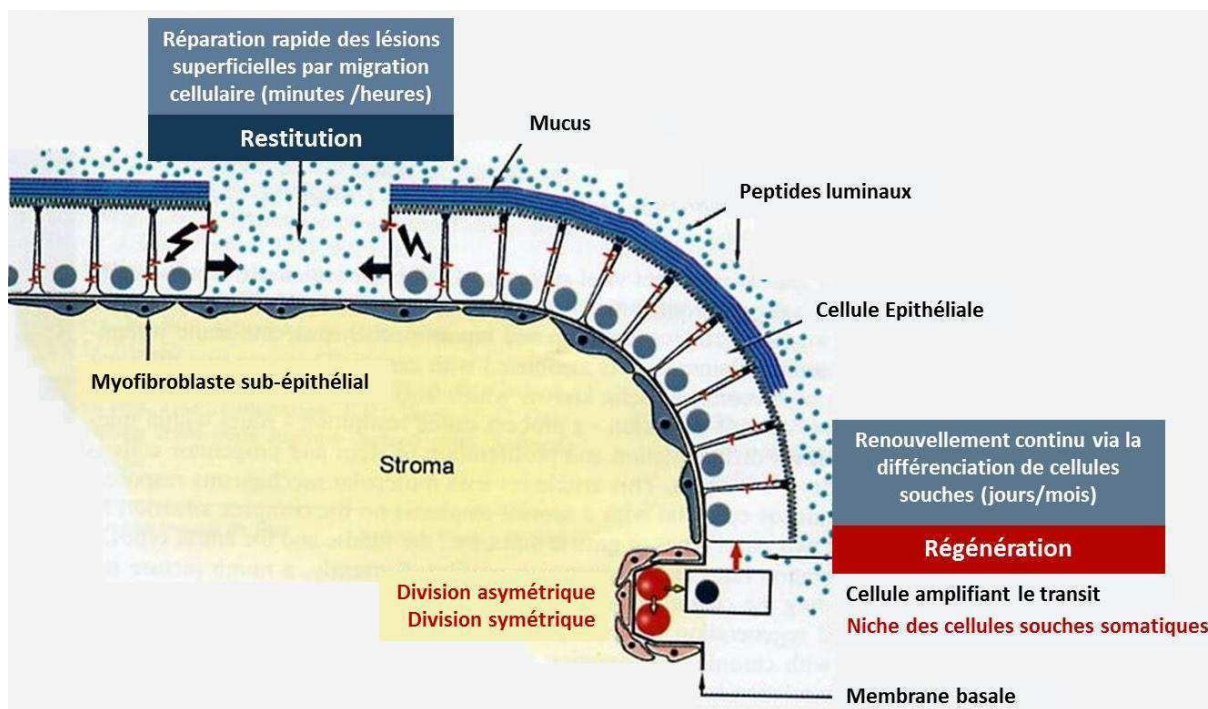


Figure 5 : Représentation schématique des deux mécanismes majeurs de régénération et restitution épithéliales

La régénération se fait à partir des cellules souches et la réparation est réalisée par migration de cellules épithéliales avoisinantes (modifiée d'après Hoffmann, 2008).

La division des cellules souches peut être symétrique permettant la génération de deux cellules-filles souches (du même type) ou asymétrique permettant de générer une cellule souche et une cellule plus différenciée ( Morrison & Kimble, 2006) (Figure 6). À partir de l'isthme, les cellules souches somatiques migrent d'une manière bidirectionnelle pour se différencier via des mécanismes de maturation assez complexes en mucocytes (de surface ou du collet), en cellules pariétales, principales ou endocrines (Quante & Wang, 2009; Mustapha, 2011) (Figure 6).

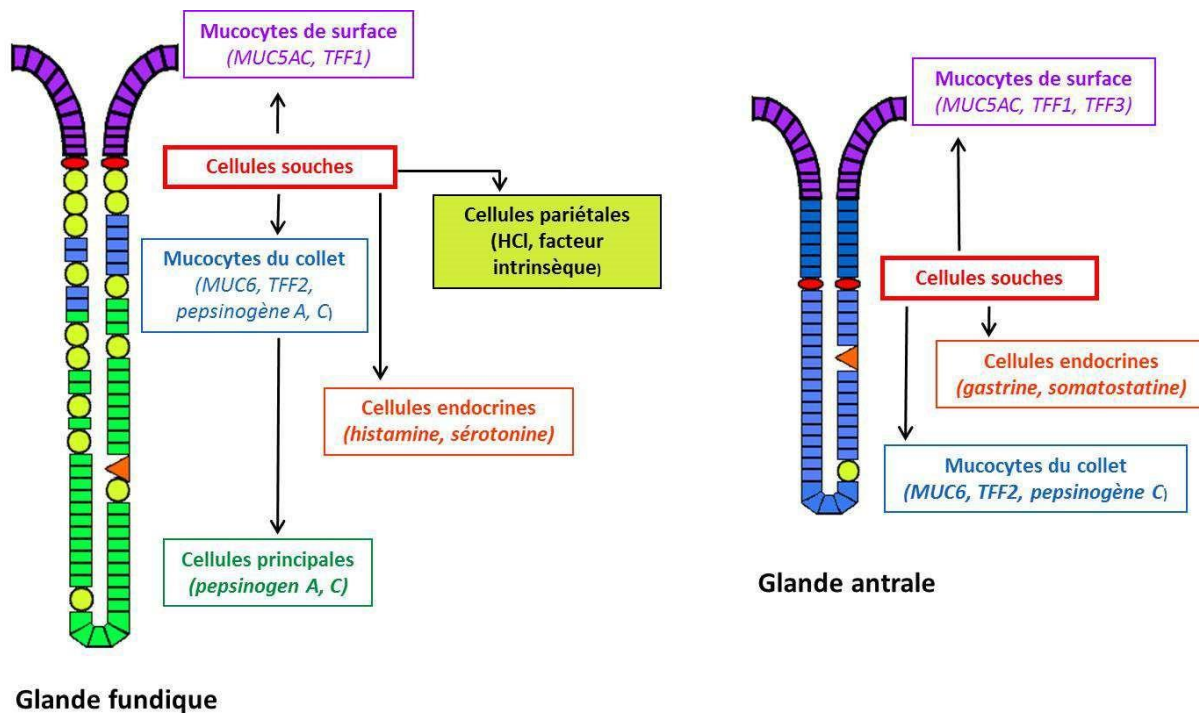


Figure 6 : Représentation schématique de la génération des différents types cellulaires à partir des cellules souches dans les glandes gastriques antrale et fundique, modifiée d'après (Hoffmann, 2008).

**Chapitre II.**  
**Carcinogenèse de la**  
**muqueuse gastrique**



## Chapitre II. Carcinogénèse de la muqueuse gastrique

Le cancer gastrique est une tumeur solide multifactorielle avec des interactions génétiques et environnementales complexes qui contribuent à son initiation et la progression (Figure 7), à partir de gastrite chronique active, la gastrite atrophique, la métaplasie intestinale, la dysplasie et conduit finalement au cancer gastrique (McLean & El-Omar, 2014; Khatoon, et al., 2016). La plupart des cancers gastriques sont des adénocarcinomes. Traditionnellement, le cancer gastrique est divisé en deux sous-types principaux sur la base de la classification de Lauren : intestinale et diffuse. Ces sous-types ont des profils moléculaires différents, et leurs voies de développement sont distinctes. Par exemple, le cancer gastrique de type intestinal résulte généralement d'un changement gastrique précancéreuse telles que la gastrite atrophique suivie d'une métaplasie intestinale et la dysplasie, qui à son tour se développe sur un fond inflammatoire chronique qui est habituellement provoqué par une infection à l'*H. pylori*. Le cancer gastrique diffuse ne semble pas résulter de cette progression néoplasique progressive, il résultant plutôt de la muqueuse gastrique normale sans stade précancéreux définitif ; le cancer gastrique diffuse est associé à des caractéristiques pathologiques telles que la perte de la cohésion cellulaire et les cellules en bague à chaton, et est souvent associée à un statut négatif de *H. pylori* (McLean & El-Omar, 2014). L'adénocarcinome de type intestinal est plus fréquent dans le monde en développement, fréquent chez les hommes, et associée à l'incidence de l'âge, alors que le type diffus survient plus souvent chez les patients plus jeunes ayant des antécédents familiaux de cancers, plus fréquents chez les femmes (McLean & El-Omar, 2014; Khatoon, et al., 2016). Au cours des dernières décennies, les progrès de la technologie et de l'analyse à haut débit ont permis de mieux apprécier les aspects moléculaires de la pathogénèse du cancer gastrique. Cet examen porte sur ces aspects multiples et hétérogènes, qui représentent un large éventail de plusieurs influences génétiques clés sur la pathogénèse du cancer gastrique (McLean & El-Omar, 2014).

Le site anatomique d'origine est une autre façon de la différenciation de l'adénocarcinome gastrique. Les tumeurs qui se posent dans la région du cardia de l'estomac sont dites proximale et ceux du corps et de l'antra (région non-cardia) dites distale. Le sou type histologique représente des différences étiologiques et épidémiologiques entre les deux sous sites de la tumeur. L'incidence de CG est globalement en baisse. Cependant, les études montrent une augmentation de l'incidence des cancers du cardia qui peut être en partie due à des rapports plus précis ainsi que la chute de l'incidence des cancers distale (Khatoon, et al., 2016).

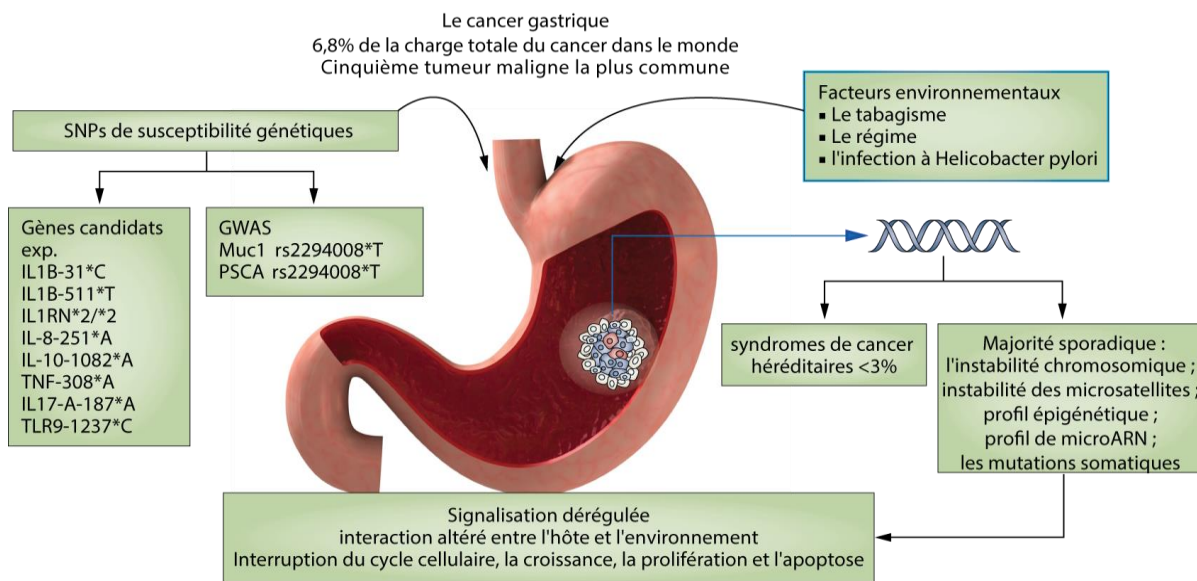


Figure 7 : les différentes voies de la carcinogénèse de la muqueuse gastrique

Le cancer gastrique est le cinquième cancer le plus fréquent dans le monde entier, et représente une proportion notable de la mortalité par cancer. La pathogénèse du cancer gastrique implique à la fois des facteurs environnementaux, tels que l'infection à *Helicobacter pylori*, et la susceptibilité génétique. Une composante héréditaire contribue à <3% des cancers gastriques. La majorité des changements génétiques associés au cancer de l'estomac sont acquis. Cette pathogénèse moléculaire est multifactorielle et hétérogène et représente un large spectre de plusieurs influences génétiques clés. Ceux-ci comprennent l'instabilité chromosomique, l'instabilité des microsatellites, des changements dans le profil épigénétique, dont le profil microRNA, mutations génétiques somatiques ou fonctionnelles des polymorphismes nucléotidiques simples. Abréviations : GWAS, étude d'association pangénomique ; SNP polymorphisme nucléotidique simple. Modifiée d'après (McLean & El-Omar, 2014)

## II.1. Facteurs génétiques héréditaires

La grande majorité des cancers gastriques surviennent de façon sporadique sans aucune manifestation d'une composante héréditaire. Moins de 15 % des cas sont supposé avoir le regroupement familial et la plupart de ceux-ci ne sont pas associés à une mutation germinale définitive. Les syndromes de cancer héréditaire sont liés à <3 % des cas du cancer gastrique (McLean & El-Omar, 2014). Le syndrome du le cancer gastrique héréditaire la plus fréquente est le cancer gastrique héréditaire diffuse (HDGC, *hereditary diffuse gastric cancer*). Cette condition autosomique dominante est associée le plus souvent à une mutation de lignée germinale dans l'hétérozygote CDH1, le gène codant pour la Cadhérine 1 (également connu sous le nom de *E-Cadhérine*). Cadhérine 1 a un rôle essentiel dans l'adhésion cellulaire. En effet, une mutation somatique acquise de ce gène qui se traduit par la fonction des protéines altérée est largement associée à des cancers à grand nombre de sites. Dans l'HDGC, la mutation

dans le CDH1 peut prendre plusieurs formes (par exemple, une délétion, une mutation du cadre de lecture, la mutation de site d'épissage ou mutation faux-sens) qui peut impliquer une variété de sites dans le gène et qui est non seulement limitée aux régions codantes, mais pourrait inclure les régions non traduites. Une mutation de perte de fonction dans l'allèle restant peut-être causée par un certain nombre de mécanismes, tels que la perte d'hétérozygotie ou l'hyperméthylation du promoteur, et peut conduire à un cancer gastrique (McLean & El-Omar, 2014).

Intéressant de noter que dans un modèle de souris transgénique *cre-loxP*-contrôlée spécifique à la réduction de *Cdh1* dans les cellules épithéliales gastriques n'a pas progressé à un cancer gastrique, bien que les souris eussent une réduction ou une absence de la protéine Cadherine 1 et des modifications morphologiques dans les cellules précancéreuses, telles que l'émergence de cellules en bague à chaton (qui est similaire à ce qui est observé chez les patients avec HDGC) (Mimata, et al., 2011). Cette découverte suggère que les mécanismes moléculaires supplémentaires pourraient être impliqués dans la pathogenèse de ce syndrome qui n'est pas entièrement comprise actuellement. En effet, Majewski et coll. (2013) ont identifié un allèle tronquant de *CTNNA1* (qui code pour la caténine  $\alpha$ -1, également connu sous le  $\alpha$ -E-caténine) par le séquençage de l'exome dans une famille avec plusieurs cas de cancer de l'estomac depuis quatre générations, ainsi que les patients qui avaient des changements gastriques précancéreux visibles sur l'histologie, mais n'ont pas eu de mutation germinale de *CDH1*. Cependant, une étude qui a impliqué le dépistage d'une grande cohorte de patients atteints de HDGC sans aucune mutation dans *CDH1* n'a pas révélé un rôle important des mutations dans la famille des gènes de caténine. La première étude a été réalisée dans une famille élargie des Pays-Bas, et la seconde chez des patients des États-Unis, au Canada et au Royaume-Uni, il saurait peut-être que les influences géographiques sont impliquées dans les différents résultats. Des efforts continus pour délimiter les mutations germinales associées à ce syndrome dont il est important pour permettre les tests génétiques, le conseil, la surveillance et l'examen approprié de traitement prophylactique des patients et de leurs familles (McLean & El-Omar, 2014).

Au cours des 4 dernières années, un syndrome supplémentaire de cancer gastrique héréditaire a été rapporté : l'adénocarcinome gastrique et polypose proximale de l'estomac (GAPPS, *gastric adenocarcinoma and proximal polyposis of the stomach*). Ce syndrome décrit la progression maligne des polypes des glandes fundiques regroupés dans plusieurs familles, mais l'anomalie génétique sous-jacente associée à GAPPS n'est pas encore claire. Les patients atteints du cancer du côlon héréditaire sans polypose (HNPCC, *hereditary nonpolyposis colon*



*cancer*) présentent un risque accru de cancer de l'estomac de type intestinal, suite à des défaillances de réparation de l'ADN médiée par une mutation dans les gènes de réparation des mésappariements d'ADN, tels que le MLH1 ou le MSH2. Cette mutation augmente le taux de mutation dans les gènes suppresseurs de tumeurs et oncogènes, ce qui conduit à l'initiation et la progression du cancer. L'instabilité de la répétition des séquences ou des microsatellites nucléotidiques est une caractéristique clé de ce phénotype et est appelée instabilité des microsatellites. Le cancer gastrique semble être une manifestation extracolique commune de HNPCC, avec une augmentation de 2 à 19 fois le risque de cancer gastrique chez les patients atteints de ce syndrome par rapport à la population générale ; le niveau de risque accru dépend de la fréquence de base du cancer gastrique à chaque emplacement. Une étude des registres du cancer en Europe du Nord et aux États-Unis a conclu que le risque à vie de cancer gastrique dans les familles avec HNPCC est d'environ 7 %, survenant principalement chez les personnes âgées de plus de 50 ans (McLean & El-Omar, 2014).

D'autres rares syndromes héréditaires (qui sont associés à des tumeurs malignes dans une vaste gamme d'organes) comportent un risque accru de cancer de l'estomac, comme le syndrome de Li-Fraumeni (causée par une mutation germinale dans le TP53) et le syndrome de Peutz-Jeghers (une mutation dans STK11 (LKB1) provoque la dérégulation de la transduction du signal et l'inhibition de la voie mTOR). La polypose adénomateuse familiale, une condition autosomique dominante associée à une mutation de l'APC, se manifeste principalement avec des lésions adénomateux du côlon qui présentent un risque élevé de transformation maligne. Cette condition est associée à des lésions polype à travers le tractus gastro-intestinal, y compris l'estomac proximal. Histologiquement, ces lésions gastriques sont principalement glandulaires ou parfois adénomateuse, mais ils évoluent rarement à un phénotype ouvertement malin. Cependant, plusieurs cas de cancer gastrique ont été rapportés chez des patients atteints de polypose adénomateuse familiale. Toutefois, les lignes directrices de surveillance actuelles suggèrent des endoscopies régulières pour évaluer le cancer gastrique et de détecter le phénotype adénome duodénal qui comporte un risque élevé de transformation maligne (et est plus fréquent que le cancer gastrique chez ces patients) (McLean & El-Omar, 2014).

## II.2. Facteurs génétiques acquis

La plupart des cas de cancer de l'estomac sont sporadiques et ont lieu à la suite d'une interaction complexe entre des facteurs génétiques et des facteurs de risque

environnementaux. Des anomalies génétiques acquises peuvent être le résultat d'une insuffisance chromosomique, instabilité des microsatellites, des changements dans le paysage épigénétique ou le profil microARN (miRNA) qui affectent profondément l'expression des gènes en aval, mutations génétiques somatiques ou polymorphismes nucléotidiques simples (SNP) dans les gènes candidats clés (Figure 7). Tous ces mécanismes peuvent conduire à des voies de signalisation dérégulées, les interactions modifiées entre l'hôte et l'environnement (par exemple dans la réponse aux agents pathogènes intraluminaux ou des composants alimentaires), l'interruption du cycle cellulaire, la prolifération de la croissance ou les caractéristiques de la mort des cellules qui favorisent le développement de cancer. Ces aberrations moléculaires ne se produisent pas dans l'isolement et une tumeur individuelle pourrait présenter de nombreux changements simultanés dans son profil moléculaire par rapport à celle d'une cellule non maligne, conduisant à l'investigation intra-patient et l'hétérogénéité entre patients (McLean & El-Omar, 2014).

### II.2.1. L'instabilité chromosomique

L'instabilité chromosomique a longtemps été reconnue comme une caractéristique de la malignité, et peut se produire tôt ou tard comme un événement dans la progression de la maladie. L'instabilité chromosomique est un processus dynamique et les changements causés peuvent être transitoires. L'instabilité peut se produire en un changement dans le contenu de l'ADN avec perte ou gain de chromosomes entiers conduisant à l'altération du nombre de copies d'ADN (aneuploïdie). Alternativement, l'instabilité pourrait seulement impliquer une partie d'un chromosome, ce qui pourrait conduire à la perte ou le gain de fonction des familles de gènes importants, telle que des oncogènes, des gènes suppresseurs de tumeurs ou des gènes impliqués dans la réparation de l'ADN ou des points de contrôle de cycle cellulaire, et peut être une conséquence de la translocation, l'amplification, la suppression ou la perte allélique (perte d'hétérozygotie). Des aberrations chromosomiques sont nombreuses dans le cancer gastrique. Ces changements ont été associés au type histologique, par exemple le cancer gastrique de type intestinal est associé à des gains en nombre de copies au 8q, 17q et 20q, alors que le cancer gastrique diffus est associé au nombre de copies acquis au 12q et 13q. Analogues modèles uniques de perte de matériel chromosomique dans chaque type histologique, avec des motifs particuliers de l'instabilité chromosomique, sont liés à la survie du patient et d'autres paramètres clinicopathologiques. L'instabilité génomique diffère aussi selon la situation

géographique, mettant en évidence l'importance des interactions gènes-environnement dans la pathogenèse de la maladie (McLean & El-Omar, 2014).

La création de gènes de fusion via des translocations est commune dans les cancers hématologiques, mais moins dans les tumeurs solides. Dans le cancer gastrique, Tao et coll. (2011) ont identifié une mutation de point de rupture dans SLC1A2 qui a provoqué une inversion chromosomique et a abouti à des niveaux détectables d'une protéine de fusion SLC1A2-CD44. Cette protéine de fusion, physiologiquement a modifié les propriétés de la croissance des cellules, probablement en provoquant des anomalies dans les voies métaboliques. De même, une nouvelle protéine de fusion impliquant le gène ROS1 (qui code pour un récepteur transmembranaire tyrosine kinase) a été identifiée dans le cancer gastrique ; cette protéine de fusion est la conséquence d'un réarrangement génétique et se produit à une faible fréquence. Notamment, les réarrangements génétiques qui conduisent à une expression constitutive de ROS1 au sein de protéine de fusion convenir de potentiel de transformation. L'identification de ce réarrangement génétique particulier est important étant donné qu'une option thérapeutique potentielle est disponible pour ce groupe de patients, sous forme de petites molécules inhibitrices de kinases peuvent être utilisées. Ces études mettent en évidence un nouveau mécanisme d'instabilité chromosomique dans le cancer gastrique et ont découvert une nouvelle cible thérapeutique potentielle, mais il convient de noter que ces fusions se produisent à une fréquence basse (<1 % des patients) (McLean & El-Omar, 2014).

La littérature sur les aberrations chromosomiques, telles que l'amplification, la suppression où la perte d'hétérozygotie dans le cancer gastrique est vaste et implique une multitude de gènes. La perte d'hétérozygotie affecte de nombreux sites chromosomiques dans le cancer gastrique, avec 18 loci sur 17 chromosomes impliqués. Le degré de perte d'hétérozygotie (haute ou basse) semble être important dans la progression de la maladie et les gènes les plus courants impliqués sont APC (*Adenomatous polyposis coli*), TP53 et NME1 (*Nucleoside diphosphate kinase A*), qui se produisent à une fréquence de plus de 30 %. L'amplification du gène HER2 (également connue sous le nom de tyrosine-protéine kinase de récepteur erbB-2) est un exemple d'une autre aberration chromosomique dans le cancer gastrique. Cette amplification conduit à la surexpression de la protéine HER2 dans un sous-ensemble de patients atteints d'un cancer gastrique (fréquence d'environ 20 %). Des récepteurs pour des protéines de la famille HER appartiennent à la famille de la tyrosine kinase, avec la signalisation produisent par l'intermédiaire de voies de MAPK ; des mutations activatrices

confèrent des caractéristiques favorables à la transformation cellulaire en cellules cancéreuses. Malgré de nombreuses études au cours de la décennie précédente, il est encore difficile de savoir comment la surexpression de HER2 affecte le pronostic. Les patients qui sont positifs pour la surexpression de HER2 pourraient bénéficier d'un traitement avec des anticorps monoclonaux qui bloquent le récepteur de la protéine, qui est un exemple de succès de profilage moléculaire traductionnelle dans cette malignité (McLean & El-Omar, 2014).

L'anticorps monoclonal humanisé vers HER2 (trastuzumab) a été approuvé par la FDA depuis plusieurs années pour le traitement des patients atteints d'un adénocarcinome gastrique métastatique qui surexprime le HER2. Cependant, cette stratégie de traitement ne convient que pour une minorité de patients, car les avantages sont assez courts avant que la maladie progresse à nouveau et la résistance peut se développer (McLean & El-Omar, 2014).

### II.2.2. L'instabilité des microsatellites

En plus d'exercer un rôle central dans le développement d'un phénotype clinique HNPCC, l'instabilité des microsatellites se trouve également à hauteur de 50 % des cancers gastriques sporadiques, et est en grande partie causée par des changements épigénétiques des gènes de réparation des mésappariements, en particulier MSH1. Le changement épigénétique le plus commun dans ce cadre est l'hyperméthylation de la région du promoteur, ce qui nuit à la réparation et les résultats de l'ADN non concordants dans plusieurs mutations au sein de répétitions nucléotidiques simples. Ces mutations affectent les niveaux de nombreux gènes en aval d'expression et exercent des conséquences fonctionnelles profondes sur un certain nombre de fonctions cellulaires, telles que le cycle cellulaire, la signalisation cellulaire et la suppression des tumeurs. Les tumeurs gastriques peuvent être classées en ceux ayant des niveaux élevés ou faibles de l'instabilité des microsatellites ou ceux qui sont stables, en fonction de la fréquence des mutations au sein des marqueurs des microsatellites. Que ce soit le statut d'instabilité de microsatellite qui affecte les paramètres clinicopathologiques et le pronostic qui a été discuté. Le consensus à partir de plusieurs populations est que les cancers gastriques avec des niveaux élevés d'instabilité des microsatellites sont plus susceptibles de présenter un emplacement antral, sous-type intestinal et une meilleure survie que les tumeurs avec stables ou à faible instabilité des microsatellites. L'association entre l'instabilité microsatellite élevée et l'amélioration de la survie a été confirmée dans une méta-analyse comprenant plus de 20 études et plus de 5 000 patients (OR 0,72 (IC à 95 % 0,59 à 0,88, P = 0,001) (McLean & El-Omar, 2014).

### II.2.3. SNPs dans les gènes candidats

Les SNPs se produisent naturellement par des variations génétiques qui surviennent avec une fréquence variable au sein de différentes populations ethniques. Des SNPs particuliers peuvent modifier le profil d'expression génique et affecter la fonction des gènes, ce qui conduit à un risque accru de sensibilité à une gamme des maladies, dont le cancer. Il existe de nombreux exemples de gènes polymorphes qui augmentent la susceptibilité au cancer de l'estomac. Cette relation a été initialement étudiée sur des gènes candidats choisis d'une manière a conduit une hypothèse basée sur la physiopathologie de la maladie. Maintenant, avec l'avènement des technologies nouvelles, les études d'association pangénomiques (GWAS, *genome-wide association studies*) et l'analyse génétique à haut débit, l'information est disponible sur plusieurs SNPs non identifiés auparavant dans un grand nombre de gènes. La fréquence de certains polymorphismes génétiques, ainsi que des polymorphismes qui sont les plus courants, varie en fonction de l'appartenance ethnique, et en collaboration avec l'exposition aux facteurs de risque environnementaux qui peuvent favoriser le développement d'une maladie maligne (McLean & El-Omar, 2014).

### II.3. Étude HuGE

L'association entre la sensibilité au cancer gastrique et SNP dans les gènes liés à l'inflammation a été récemment examinée dans l'épidémiologie du génome humain (HuGE, *Human Genome Epidemiology*) revu systématique et méta-analyse. Persson et coll. (2011) ont mené une série de méta-analyses en utilisant un protocole prédéfini et ont examiné les SNPs les plus étudiés dans les gènes inflammatoires, y compris IL-1 $\beta$ , IL-1RN, IL-8, IL-10 et TNF. Ils ont stratifié les cancers gastriques sur la base du sous-type histologique et subsite anatomique, le statut de l'*H. pylori*, la situation géographique (population d'étude asiatique ou non asiatique), et par un indice quantitatif de la qualité de l'étude, inclus des informations sur *IL-1*  $\beta$ +3954T, *IL-8*-251A, *IL-10*-819T, et les transporteurs *TNF- $\alpha$* -238A. L'analyse est étendue sur la période de 1990-2006. Une association positive cohérente a été trouvée entre les porteurs de l'IL-1RN\*2 et un risque accru de cancer de l'estomac (McLean & El-Omar, 2014). La prise en compte simultanée des méta-analyses pour les polymorphismes multiples au sein des gènes avec des fonctions connexes selon des critères de qualité prédéfinis aboutit à un aperçu général et permet des comparaisons plus détaillées de la base de données convaincantes.

Il y a des difficultés dans l'interprétation des résultats. Cet examen systématique et cette méta-analyse ont été établis à partir des données recueillies dans la littérature actuelle et

par le contact personnel avec les auteurs lorsque les résultats pertinents n'étaient pas disponibles dans la publication. Tous les auteurs contactés n'avaient pas accès aux données ou pouvaient fournir des informations pour tous les polymorphismes, les sites anatomiques ou les types histologiques. En conséquence, certaines études ont seulement contribué à l'analyse globale du cancer gastrique, tandis que d'autres ont contribué en plus aux sous-analyses (par exemple, des résultats anatomiques spécifiques au site). Par conséquent, les résultats globaux ne peuvent pas toujours être considérés comme reflétant un résultat moyen pondéré pour les emplacements anatomiques des composants. Peu d'études de haute qualité ont été menées dans des populations asiatiques, et lorsque les auteurs ont stratifié par l'*H. Pylori*, certaines études devaient être exclues en raison du manque d'informations pertinentes sur les témoins. Une mauvaise classification différentielle de l'infection à l'*H. pylori* aurait pu se produire si, par exemple, la présence de cancer gastrique entraîne une atrophie, ce qui peut rendre la détection moins probable. Un autre problème réside dans le fait que les définitions (principalement concernant le type histologique et la localisation du site) peuvent varier dans différentes parties du monde (Persson, et al., 2011).

L'importance de la stratification par le type de cancer gastrique, le site, l'infection à l'*H. pylori*, l'emplacement géographique et la qualité de l'étude doivent être pris en compte dans les études futures, en tenant compte des associations avec de multiples gènes ayant des fonctions similaires. Le contexte génétique sous-jacent de la population doit également être compris (Persson, et al., 2011). Les considérations de qualité d'étude, à la fois laboratoire et épidémiologique, peuvent également influencer sur les résultats et peuvent aider à expliquer la variabilité des résultats qui ont été publiés à ce jour.

**Chapitre III.**  
**Helicobacter pylori et**  
**la réponse**  
**immunitaire**

## Chapitre III. *Helicobacter pylori* et la réponse immunitaire

### III.1. *Helicobacter pylori*

L'*H. pylori* est une bactérie bacille spiralé avec une tige courbée microaérophile Gram-négatif, uréase, catalase et oxydase positive (Figure 8 et Figure 9). Elle mesurant 2 à 4 µm de longs et 0,5 à 1 µm de large. Elle peut également exister sous une forme ronde dite coccoïde viable, mais non cultivable moins virulente et est moins susceptible de coloniser et de provoquer de l'inflammation et une autre forme de cocciforme dégénérative enviable est pycnotique, non cultivable (Enroth, et al., 1999; Andersen & Rasmussen, 2009). L'*H. pylori* est considérée comme un agent pathogène humain très réussi qui infecte environ 50 % de la population mondiale (Ahn & Lee, 2015) ayant pour niche écologique la muqueuse gastrique humaine avec une répartition hétérogène (Chaput & Boneca, 2006). Le plus ancien génome de souche d'*H. pylori* découverte jusqu'aujourd'hui date de 5 300 ans dans une momie glacier européenne (*Ötzi*) qui a été découvert fortuitement momifié naturellement (congelé et déshydraté) à la frontière italo-autrichienne en 1991. Il était porteur de l'*H. pylori* asiatique, alors que la souche aujourd'hui présente en Europe est un hybride entre des lignées africaine et asiatique (Maixner, et al., 2016). Bien qu'étaient déjà présents dans l'estomac des Homo-sapiens il y a environ 58 000 ans, avant les grandes migrations de l'homme moderne. Ces migrations partant de l'Afrique de l'Est vers l'Asie et l'Europe d'après une étude de simulation (Linz, et al., 2007). Il a été prémédité dans chaque population, bien que l'incidence varie avec l'âge, l'enfance, statut socio-économique, le niveau d'éducation, l'environnement, la profession et les régions géographiques vivantes, fait que l'incidence est plus élevée dans les pays en développement et une grande partie de l'Asie orientale (Ahn & Lee, 2015).

La voie de transmission possible de l'*H. pylori* est généralement oro-orale ou féco-orale, mais la nourriture ou l'eau contaminée sont également mentionnés. Les sources les plus probables sont le contact entre personnes dans les familles pendant la petite enfance, avant l'âge de cinq ans et peut persister pendant des décennies dans sa niche préférée, la muqueuse gastrique, et/ou l'exposition à une source commune d'infection telle que l'eau ou les aliments contaminés (Nurgalieva, et al., 2002; Ahn & Lee, 2015). Cette notion est soutenue par des études des enfants dans les soins de garde où la prévalence de l'infection est plus élevée que prévu et sur des études de familles surpeuplées où il y a au moins un enfant infecté (Malaty, 2007).



La forte association entre le cancer gastrique et l'*H. pylori* à aboutir à la classification de ce germe comme carcinogène (classe I) par l'organisation mondiale de santé en 1994 (IARC, 1995). Par la suite, est estimé que l'*H. pylori* est l'agent étiologique principal des cancers liés aux infections bactériennes basées sur des études animales, ainsi que l'observation clinique et les études interventionnelles humaines (Ahn & Lee, 2015).

Les manifestations cliniques de l'infection par *H. pylori* sont les suivantes (Figure 12):

(1) gastrite chronique, développée presque par l'ensemble des patients, dont la plupart, restent asymptomatiques ;

(2) un phénotype de l'ulcère duodéal (DU), produit dans 10 % à 15 % des individus infectés ;

(3) un phénotype de l'ulcère/adénocarcinomes gastrique, qui se développe vers le cancer gastrique chez 1 % à 3 % des individus infectés ;

et (4) le lymphome du tissu lymphoïde associé aux muqueuses gastriques (MALToma), qui se développe chez 0,1 % des sujets infectés (Ahn & Lee, 2015).

Le phénotype DU avec une colonisation antrale est associé à une gastrine élevée et une surproduction d'acide gastrique, qui réduit le risque de survenue de cancer gastrique (Ahn & Lee, 2015). Toutefois, le phénotype d'adénocarcinome gastrique, qui apparaît plus fréquemment lorsqu'il y a colonisation de l'estomac proximale (pangastrite), cause des dommages aux glandes gastriques, en provoquant une gastrite atrophique et hydrochlorhydrie ou achlorhydrie associée. Il se caractérise par un niveau faible de pepsinogène I, un niveau élevé de gastrine et un faible rapport pepsinogène I/II. Ce phénotype progresse éventuellement à un processus en plusieurs étapes, y compris la métaplasie intestinale, la dysplasie, et l'adénocarcinome (Ahn & Lee, 2015). Cette série de modifications histologiques peut nécessiter jusqu'à 7 ou 8 ans, et est une caractéristique bien connue d'adénocarcinomes de type intestinal, qui est l'une des deux variantes histologiques distinctes. Il été également estimé que l'*H. pylori* est associée à l'adénocarcinome de type diffus, ce qui justifie la rareté de la structure glandulaire et comprend des cellules mal cohésives qui infiltrent la paroi gastrique. Cependant, les scénarios pathologiques du type diffus sont moins caractérisés.

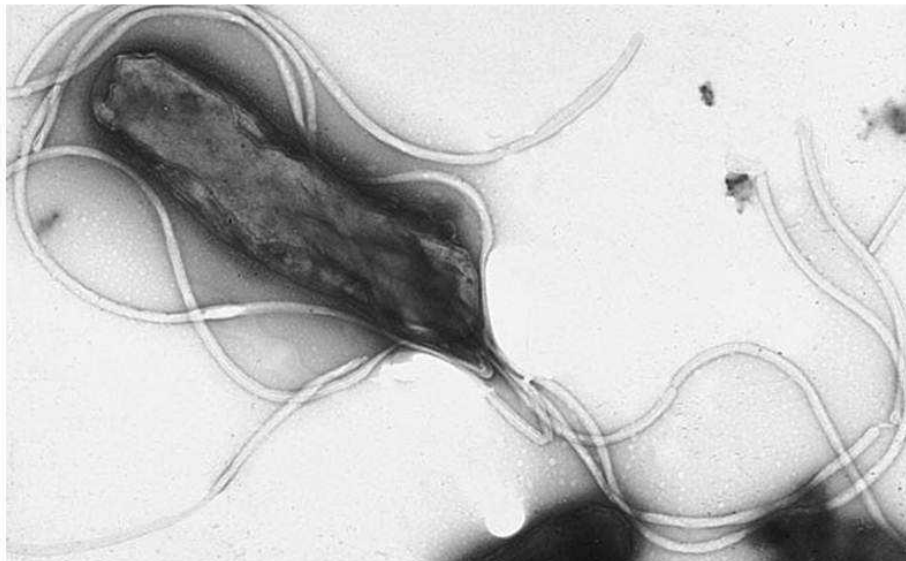
L'adénocarcinome gastrique été également classé par les tumeurs proximales (la jonction œsophago-gastrique et cardia) et les tumeurs distales (antre, corps et fundus gastrique). Les cancers gastriques proximaux présentent des caractéristiques épidémiologiques et physiopathologiques différentes comparées avec celle du cancer distal, soutenu par de nombreuses études que ce type de cancer est inversement associé à l'infection à l'*H. pylori*. Bien que l'incidence du cancer de l'estomac proximal ait augmenté, la majorité des cancers gastriques surviennent dans le monde entier de l'estomac distal, et la signification de l'*H. pylori* dans la carcinogenèse gastrique reste écrasante (Ahn & Lee, 2015).

Malgré le déclenchement puissant des réponses immunitaires innées et adaptatives. L'infection à l'*H. pylori* provoque une gastrite chronique, qui est asymptomatique dans la majorité des porteurs. Cependant, elle était considérée comme un facteur de risque majeur pour le développement des ulcères gastriques, duodénaux et des tumeurs malignes tel que le lymphome du MALT et de l'adénocarcinome gastrique. En plus de son association avec le cancer, l'*H. pylori* se distingue des autres bactéries pathogènes Gram négatifs dans sa capacité à persister et à établir une infection chronique (Salama, et al., 2013).

Contrairement au dogme de longue date, l'estomac n'est pas un organe stérile et est estimé de supporter une communauté de 200 espèces bactériennes différentes. Cependant, lorsque l'*H. pylori* est présente, il est en général numériquement dominant et est facilement visible dans les coupes histologiques des biopsies gastriques recouvrant les cellules épithéliales gastriques et le mucus environnant.



*Figure 8 : Microphotographie MEB de l'H. pylori (en bleu).  
Ces bactéries, Gram-négatif en forme de tige sont généralement trouvés dans la muqueuse de l'estomac des personnes souffrant d'ulcères. (©David McCarthy/Photo Researchers, Inc.) (Fleming, et al., 2007).*



*Figure 9 : Microphotographie MET de l'H. pylori (Fleming, et al., 2007).*

### III.2. La pathogenèse de l'*H. pylori* dans la carcinogenèse de la muqueuse gastrique

La carcinogenèse gastrique de l'*H. pylori* chez l'homme se produit rarement chez les individus infectés. De nombreuses études au cours des trois dernières décennies suggèrent que la combinaison d'une souche bactérienne virulente, un hôte génétiquement sensible, et un environnement gastrique prédisposé peut être nécessaire pour le développement du cancer (Ahn & Lee, 2015).

### III.2.1. Les facteurs de virulence bactérienne

L'*H. pylori* possède un génome génétiquement hétérogène avec divers facteurs de virulence qui peuvent déréguler les voies de signalisation intracellulaires de l'hôte et d'augmenter le seuil de transformation néoplasique. Un certain nombre de facteurs de virulence de l'*H. pylori* sont censés jouer un rôle essentiel dans la diversité des résultats cliniques de l'infection par l'*H. pylori*. Parmi les facteurs de virulence, la CagA (cytotoxine gène associé A) dans son îlot de pathogénicité (*cag-PAI*) (Figure 10) et VacA (vacuolante cytotoxine A) sont les principaux facteurs pathogènes (Ahn & Lee, 2015; Khatoon, et al., 2016).

#### III.2.1.1. *cag-PAI* et CagA

Le facteur de virulence de l'*H. pylori* le mieux présenté est le *cag-PAI*, ce qui représente environ 40 kb et contient 27-31 gènes (Ahn & Lee, 2015) flanqués de répétitions directes de 31 pb. Le *cag-PAI* code pour un système de sécrétion de type IV (T4SS ; un moteur moléculaire) acquis par transfert horizontal (Khatoon, et al., 2016) qui consiste à injecter au moins 18 protéines comprenant la CagA dans des cellules hôtes (Tegtmeyer, et al., 2011). La CagA est une protéine fortement immunogène souvent utilisée comme un indicateur pour l'ensemble de locus *cag-PAI*. Il était considéré que les souches CagA-positives (c.-à-d., *cag-PAI*-positif) sont liées à une inflammation plus sévère, des étapes plus avancées d'atrophie, et une plus grande possibilité d'évoluer vers un adénocarcinome gastrique par rapport à des souches *cag A*-négatives (c.-à-d., *cag-PAI*-négatif). Le risque relatif (OR) compris entre les deux est estimé à 28,4. Cependant, les mêmes maladies cliniques à l'origine des infections avec des souches *cag A*-négatives, compatibles avec l'hypothèse que tout autre facteur bactérien ou hôte peut contribuer à un risque accru avec un résultat clinique significatif (Ahn & Lee, 2015).

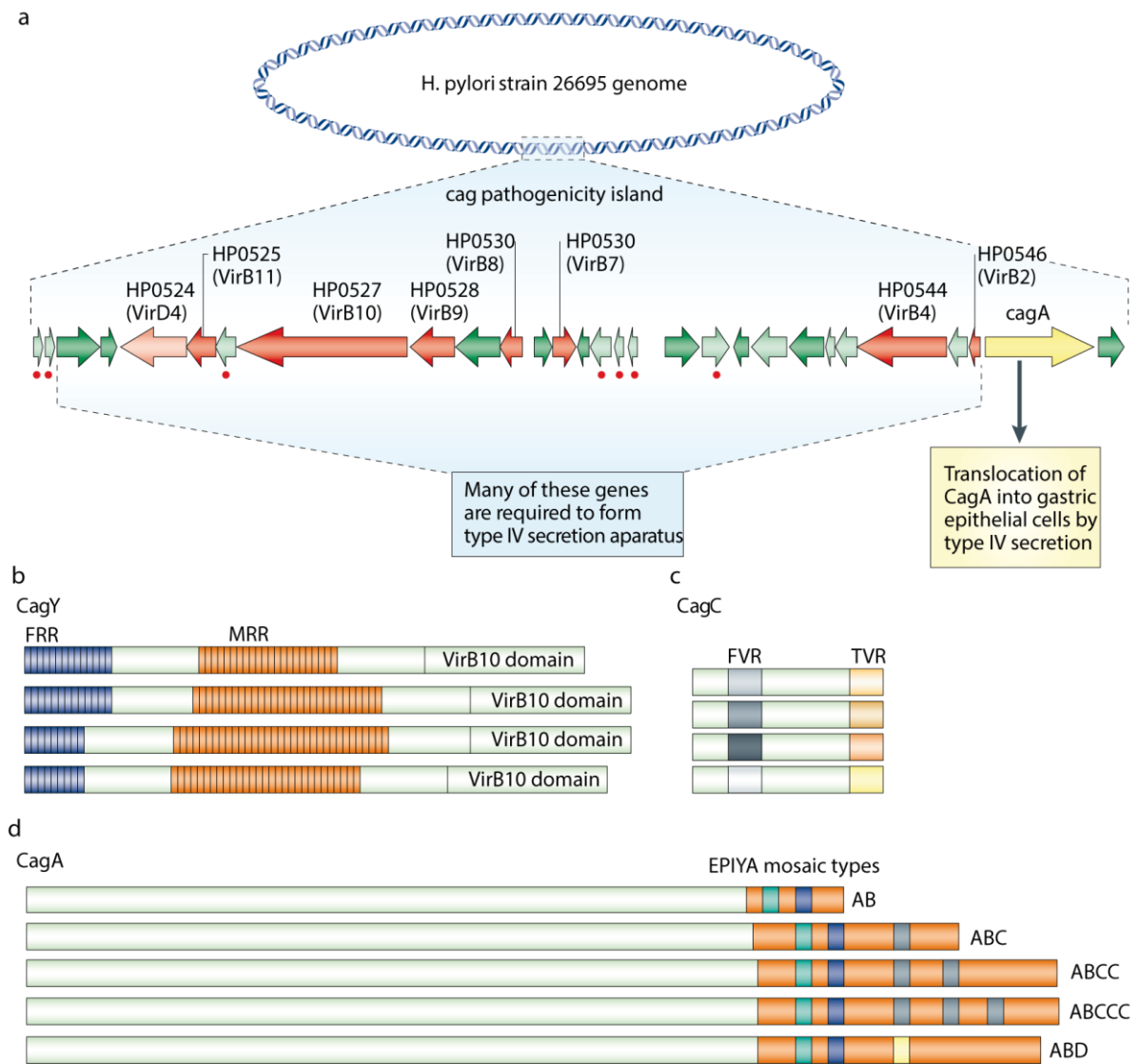


Figure 10 : L'îlot de pathogénicité cag contient des gènes qui indiquent une variation de séquence marquée.

L'île de pathogénicité cag contient des gènes qui montrent une variation de séquence marquée. La plupart des souches d'*Helicobacter pylori* qui causent la maladie contiennent l'île de pathogénicité cag (PAI), une région chromosomique comprenant environ 37.000 paires de bases et 29 gènes. a | Arrangement de gènes cag-PAI dans la souche *H. pylori* 26695. La plupart des gènes cag sont probablement impliqués dans l'ensemble du système de sécrétion de type IV pour la translocation de la protéine CagA dans le cytoplasme des cellules épithéliales gastriques. Sept gènes (en rouge) montrent la similitude avec les composants du système de sécrétion de type IV de l'agent pathogène de la plante *Agrobacterium tumefaciens*. Les flèches marquées d'un point rouge indiquent des gènes qui ne sont pas nécessaires pour la translocation de cag A, les gènes non marqués sont essentiels pour la translocation. b-d | L'exposition des protéines cag à l'hôte les place vraisemblablement sous une forte sélection positive in vivo. La variation de séquence étendue, peut-être liée à accueillir l'adaptation, jusqu'à présent été documentée pour trois protéines cag PAI-encodés, réticent (HP0527, b), une protéine qui forme probablement une gaine recouvrant les pili de type IV, cag C (HP0546, c), la piline cag putatif, et l'effecteur CagA transloqué (HP0547, d). CagA montre une impressionnante variation ethnique et individuelle dans sa phosphorylation répétitive motifs (EPIYA) de C-terminales ; les quatre combinaisons supérieures de types EPIYA représentés sont caractéristiques des souches occidentales, et la combinaison inférieure (ABD), y compris l'unique, de type D asiatique EPIYA motif, est associée à des souches asiatiques est. Voir le texte et les références pour plus de détails. TRF, région 5'-répétition ; FVR, région 5'-variable ; MRR, région de répétition moyenne ; TVR, région 3' variable (Suerbaum & Josenhans, 2007).



### III.2.1.2. *cag A* et des motifs de glutamate-proline-isoleucine-tyrosine-alanine (Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala (EPIYA))

La protéine CagA de l'*H. pylori* est de 120 à 140 kDa transloquée dans les cellules de l'hôte par le T4SS après la fixation bactérienne. Lorsque la CagA pénètre dans la cellule hôte, elle peut se lier à la surface interne de la membrane cellulaire et de subir une phosphorylation de la tyrosine. Cela entraîne des changements morphologiques de la cellule, et les influences à diverses voies de transduction du signal intracellulaire. En outre, la CagA exerce des effets pathogènes sans phosphorylation. À la fois la phosphorylation dépendante et indépendante des signaux de la CagA qui interagissent avec plusieurs protéines de l'hôte pour déclencher les voies en aval, tels que la voie kinase régulée par le signal extracellulaire de la protéine kinase activée par le mitogène RAS (Ahn & Lee, 2015), le facteur nucléaire  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) et la voie  $\beta$ -caténine (Wang, et al., 2014).

Les motifs Glutamate-proline-isoleucine-tyrosine-alanine (EPIYA) sont les sites de phosphorylation de CagA. Selon les variations de la séquence d'acides aminés identifiés au sein de l'extrémité carboxy-terminale qui l'englobe, quatre motifs EPIYA distincts sont signalés jusqu'à présent (-A, -B, -C et -D) (Ahn & Lee, 2015; Khatoun, et al., 2016). La première région répétée comprend des segments EPIYA-A/EPIYA-B et est présente dans des souches à travers le monde. Cependant, la prévalence de la seconde région de répétition varie selon la zone géographique. Les noms respectifs des seconds segments des souches occidentales et d'Asie orientale de la région répétée sont EPIYA-C et EPIYA-D (Hatakeyama, 2011). Dans les souches occidentales, le nombre élevé des sites *cag A* EPIYA-C est un baromètre significatif du risque de progression vers un adénocarcinome gastrique. Les souches asiatiques sont presque les seules souches qui portent le motif EPIYA-D. De nombreuses études ont conclu que lorsque les infections qui se produisent dans la même zone sont comparées, les infections par des souches EPIYA-D ont un risque plus élevé de cancer gastrique ou l'ulcère gastroduodéal par rapport à l'infection par des souches EPIYA-C (Jones, et al., 2011; Ahn & Lee, 2015). Toutefois, le rôle de CagA reste obscur. Dans certains rapports, la CagA peut micro-évoluer au sein d'un individu ou le motif EPIYA-B peut être polymorphe. Ainsi, d'autres études sont nécessaires pour explorer l'association entre les motifs CagA EPIYA et la carcinogenèse gastrique (Ahn & Lee, 2015).

### III.2.1.3. *Vac A*

Toutes les souches de l'*H. pylori* le possèdent et plus de la moitié expriment le gène *vac A*, qui code pour une protéine de formation de pores qui se lie à l'épithélium par interaction

avec des protéines phosphatases-tyrosine. La protéine VacA est un inhibiteur très puissant de l'activation des lymphocytes T *in vitro*, et cela par plusieurs activités, telles que la formation des pores dans les membranes, le cytochrome C libéré par des mitochondries qui progressent à l'apoptose, et le rattachement aux récepteurs cellulaires membranaires entraînant des réponses pro-inflammatoires.

Il existe de nombreuses études qui montrent que les différences dans la structure des gènes *vac A* sont associés à des sévérités de la maladie clinique. En fonction des variations *in vitro* de capacités vacuolante, *vac A* comporte des différences dans la région de signal (*s1* et *s2*), les régions médianes (*m1* et *m2*) et récemment, les régions intermédiaires (*i1* et *i2*) (Figure 11) (Ahn & Lee, 2015). Plus récemment, les souches *i1* ont été suggérées pour être corrélée non seulement au développement de l'inflammatoire et les dysplasies, mais aussi la formation de tissu néoplasique maligne. En résumé, malgré les nombreux rapports que les génotypes *vac A s1 / i1* sont hautement pathogène, aucune association claire n'a encore été observé (Ahn & Lee, 2015).

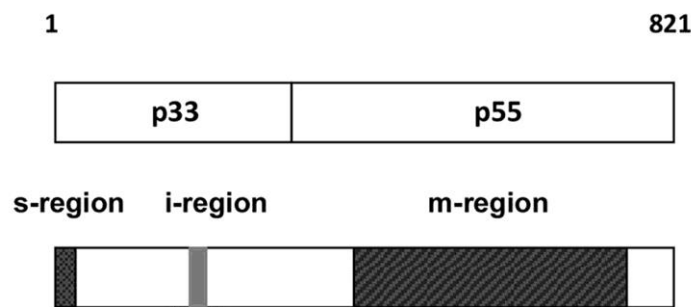


Figure 11 : Les régions de *vac A* dans différentes souches de *H. pylori*.

La protéine sécrétée VacA p88 (comprenant 821 acides aminés dans la souche 60190H. *pylori*) contient deux domaines, p33 et p55 désignés. La variation de la séquence d'acides Aminé dans les protéines de *vac A* différent des souches de l'*H. pylori* est particulièrement importante dans trois régions, qui sont désignées s-, i-, et m-régions. I-région et une partie de la région s sont localisés dans le domaine p33 et la m-région est localisée au sein du domaine p55. Modifiée d'après (González-Rivera, et al., 2012).

#### III.2.1.4. OipA (Outer inflammatory protein)

OipA est une protéine membranaire inflammatoire de la famille OMP (Yamaoka, et al., 2002). La présence du gène *oipA* fonctionnel chez l'*H. pylori* est fortement associée aux ulcères duodénaux, au cancer gastrique et à des infiltrations accrues de polynucléaires neutrophiles. L'expression de OipA est associée à une production élevée d'IL-8 *in vitro*. OipA joue un rôle dans l'induction de l'inflammation gastrique et la production des cytokines inflammatoires tel que l'IL-1, IL-17 et TNF- $\alpha$  chez les gerbilles de Mongolie. Elle contribue

également à l'induction de la métalloprotéase matricielle MMP-1 (*matrix metalloproteinase 1*) fortement associée au cancer gastrique (Mustapha, 2011).

#### III.2.1.5. DupA (Duodenal ulcer promoting gene)

Le gène *dupA* est situé dans la zone de plasticité du génome de l'*H. pylori* et semble être un marqueur de virulence. In vitro, DupA augmente la production de l'IL-8. L'association entre la présence de *dupA* et le risque élevé de développement d'ulcère duodéal et/ou cancer gastrique est très variable d'une population à l'autre (Mustapha, 2011).

### III.2.2. Facteurs génétiques de l'Hôte

Il existe plusieurs preuves que la nature de la réponse inflammatoire à l'*H. pylori* est en grande partie déterminée par des polymorphismes dans plusieurs gènes de l'hôte codant pour des cytokines et des récepteurs de cytokines.

#### III.2.2.1. Les polymorphismes du gène IL-1

Les polymorphismes du cluster gène pro-inflammatoires IL-1 (IL-1 $\beta$  du gène codant pour la cytokine IL-1 $\beta$  et le gène IL-1RN codant pour son antagoniste du récepteur d'origine naturelle, IL-1ra) ont été clairement liées à une réponse inflammatoire intense entraînant l'hypochlorhydrie et un risque élevé de cancer gastrique. Les sujets avec des génotypes IL-1 $\beta$ -31\*C ou IL-1 $\beta$ -511\*T et IL-1RN\*2/2 ont un plus grand risque d'atrophie gastrique, le cancer gastrique, ou hypochlorhydrie à la suite de l'infection à *H. pylori* (El-Omar, et al., 2000; El-Omar, et al., 2001; Machado, et al., 2001).

#### III.2.2.2. Autres polymorphismes des gènes des cytokines

Les relations supplémentaires avec le risque de cancer de l'estomac pour les polymorphismes génétiques dans facteur de nécrose tumorale  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), l'interféron- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) et IL-10 ont été rapportés (El-Omar, et al., 2003). La TNF- $\alpha$  est une cytokine pro-inflammatoire inhibant la sécrétion acide et surexprimée au cours de l'infection par l'*H. pylori* (Mustapha, 2011). Des polymorphismes génétiques de cette cytokine sont associés au risque élever de développement un cancer gastrique (El-Omar, et al., 2003). La contribution du TNF- $\alpha$  au développement du cancer gastrique se fait probablement par des mécanismes de signalisation impliquant la voie de la  $\beta$ -caténine (Mustapha, 2011). En outre, la régulation négative des cytokines anti-inflammatoires IL-10 supprime le niveau de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  et IFN- $\gamma$  (El-Omar, 2006). Les génotypes des pro-inflammatoires TNF- $\alpha$  et de l'IL-10 ont été chacun liés à environ deux fois plus de possibilités à développer un cancer gastrique non-cardial (El-Omar, et al., 2003; Machado, et al., 2003).



D'autres rapports ont suggéré que les polymorphismes de Toll-like receptor-4 (gène TLR-4 (CD 284) situé sur le chromosome 9) augmentent également le risque de cancer de l'estomac. Une augmentation de risque relatif (OR) de 11 fois d'hypochlorhydrie chez les porteurs de polymorphisme TLR4+896G. En outre, chez les populations caucasiennes, ces porteurs ont des gastrites atrophiées et de l'inflammation beaucoup plus sévère (Hold, et al., 2007). Le risque associé au développement de cancer gastrique des individus infectés par l'*H. pylori* est augmenté 27 fois chez les individus avec trois ou quatre polymorphismes (El-Omar, et al., 2003).

La surexpression du chimiokine, IL-8 et le polymorphisme (région du promoteur) sont liés à un risque accru de cancer gastrique (Gewirtz, et al., 2004). L'étude sur les populations caucasiennes a prouvé que la relation entre le polymorphisme fonctionnel au sein de Toll-like récepteur 4 (TLR4), augmente le risque de CG et diminue la production de cytokine anti-inflammatoire IL-10. Les polymorphismes génétiques sont capables de moduler la réponse immunitaire innée qui en résulte, une inflammation sévère et des lésions précancéreuses chez les individus infectés par l'*H. pylori*. Les risques relatifs pour les cancers gastriques non-cardia étaient les plus élevés pour les personnes ayant l'expression de l'IL-1 $\beta$  élevée, colonisée par des souches de type *vac A s1* (Khatoon, et al., 2016).

En 2008, Sakamoto et coll. (2008) ont été les premiers qui ont rapporté qu'un polymorphisme nucléotidique simple intronique (SNP ; rs2976392) dans l'antigène, des cellules souches de la prostate (PSCA) étaient significativement associées au cancer gastrique de type diffus au Japon. Deux méta-analyses récentes ont également suggéré que PSCA -rs2294008C> T et -rs2976392G> A, ont été des facteurs potentiels de développement du cancer gastrique dans l'Est Asiatiques (Ahn & Lee, 2015). En outre, il a été considéré que le polymorphisme PSCA -rs2294008 augmente le risque du cancer gastrique non cardia, mais protège contre le cancer proximal chez les populations caucasiennes (Ahn & Lee, 2015).

### III.2.3. Sécrétion d'acide

La pompe H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase est la pompe à proton gastrique primaire localisée dans des tubulo-vésicules dans le cytoplasme des cellules pariétales non stimulées. Après stimulation, la pompe H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase est recrutée vers la membrane apicale pour médier la sécrétion acide. L'*H. pylori* peut inhiber ou stimuler la sécrétion d'acide en fonction du contexte de l'infection. L'infection aiguë est souvent associée à une hypochlorhydrie résultant d'une surproduction de la cytokine pro-inflammatoire IL-1 $\beta$  et de l'inhibition du promoteur de la

sous-unité  $\alpha$  de la pompe  $H^+/K^+$  ATPase, VacA induit aussi une hypochlorhydrie via la protéolyse de l'ezrine (cytovillin ou la villine-2 : cette protéine sert d'intermédiaire entre la membrane plasmique et l'actine du cytosquelette) ce qui perturbe les interactions entre le cytosquelette et la membrane apicale, celles-ci étant nécessaires pour la translocation de la pompe  $H^+/K^+$  ATPase afin d'assurer la sécrétion acide (Wang, et al., 2008). L'*H. pylori* peut également diminuer la sécrétion acide en réprimant l'expression de la sous-unité  $\alpha$  du gène codant pour l' $H^+/K^+$  ATPase via l'activation et la translocation médiée par ERK1 et 2 de NF- $\kappa$ B dans le noyau. L'infection chronique par l'*H. pylori* peut induire une hypochlorhydrie ou une hyperchlorhydrie selon la distribution et la sévérité de la gastrite. Cette dernière touchant l'ensemble de l'estomac est généralement associée à une hypochlorhydrie pouvant évoluer vers un cancer gastrique. À l'inverse, la gastrite à prédominance antrale provoque une hyperchlorhydrie qui peut conduire au développement d'un ulcère duodéal (Atherton, 2006).

#### III.2.4. Cyclooxygénase

L'*H. pylori* active de nombreuses formes des enzymes pro-inflammatoires de la famille cyclooxygénase (COX). La production d'endoperoxyde ( $PGH_2$ ) catalysé en étapes clés par conversion de l'acide arachidonique par des enzymes COX. Les enzymes prostaglandines synthases produisent des prostaglandines et des divers eicosanoïdes d'endoperoxyde. Les prostaglandines jouent un rôle important dans la régulation des processus physiologiques, en occurrence l'immunité et le développement (Gupta & Dubois, 2001). Deux isoformes de COX (COX-1 et COX-2) ont été classées sur la base des variations dans les caractéristiques d'expression et les profils d'inhibition pour les médicaments anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS). L'expression de COX-2 est inductible tandis que la COX-1 est constitutivement exprimée dans les cellules et les tissus. L'expression de COX-2 peut être stimulée par des cytokines pro-inflammatoires et des facteurs de croissance tels que le TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  et l'IL-1 (Williams, et al., 1997). L'expression de COX-2 est élevée dans la muqueuse gastrique humaine infectée par l'*H. pylori* (Sawaoka, et al., 1998; Fu, et al., 1999), prémaligues gastriques et les lésions malignes (Ristimäki, et al., 1997; Sung, et al., 2000). L'inhibiteur de COX (aspirine et les AINS) sont associés à un risque réduit de cancer gastrique non-cardia. De nombreuses études ont démontré le rôle important des produits générés par COX-2 impliqués dans le processus néoplasique. Des mécanismes tels que l'inhibition de l'apoptose, régulation de l'expression de l'adhérence de la surface cellulaire et la production de facteurs de promouvoir les néoplasies maligne (Khatoun, et al., 2016).

### III.2.5. Facteurs environnementaux

Les facteurs environnementaux peuvent également jouer un rôle dans la carcinogenèse de la muqueuse gastrique induite par l'*H. pylori*. Le sel est un facteur alimentaire bien connu. Dans une étude prospective japonaise en 2006 (Shikata, et al., 2006), une corrélation significative entre la consommation de sel et de l'adénocarcinome gastrique a été rapportée chez des individus infectés par l'*H. pylori* et la gastrite atrophique. En outre, selon une étude récente chez l'animal, la consommation élevée de sel alimentaire potentialise les effets cancérigènes de la souche *H. pylori* CagA-positif (Gaddy, et al., 2013). Des travaux effectués chez les gerbilles de Mongolie montrent un effet synergique entre un régime alimentaire riche en sel et le développement de lésions malignes et du cancer gastrique d'une part et l'augmentation de l'expression des cytokines pro-inflammatoires IL-1, IL-6 et TNF- $\alpha$  d'autre part (Kato, et al., 2006; Sun, et al., 2006; Gamboa-Dominguez, et al., 2007; Mustapha, 2011). Il y a quelques suggestions sur les mécanismes par lesquels le sel potentialise la carcinogenèse gastrique induite par l'*H. pylori* ; néanmoins, le processus n'est pas encore clair. Préliminairement, le sel peut altérer la muqueuse gastrique, ce qui conduit à une inflammation et des dommages ou de permettre la pénétration des agents cancérigènes dans l'estomac (Liu & Russell, 2008; Wroblewski, et al., 2010). En second lieu, une régulation positive de la production des enzymes et des cytokines pro-inflammatoires telles que l'oxyde nitrique synthase et de la cyclooxygénase-2 (COX-2) peut contribuer en réponse à une consommation élevée en sel (Toyoda, et al., 2008). Enfin, des rapports récents suggèrent que des concentrations élevées de sel modulent les facteurs de virulence, y compris CagA chez l'*H. pylori* (Loh, et al., 2007; Gancz, et al., 2008; Ahn & Lee, 2015).

Le tabac est considéré comme le plus important facteur de risque lié au mode de vie. Dans une étude systémique récente et une méta-analyse des études de cohorte, il a été montré que le tabagisme est corrélé avec un risque relatif élevé pour les deux types de cancers gastrique, cardiaque et le non-cardiaque de manière significative (Ahn & Lee, 2015). Il ressort de diverses études que le tabagisme est associé à un risque de développer un cancer gastrique aux sujets infectés par l'*H. pylori*. Au Japon, la cigarette et l'infection par l'*H. pylori* ensemble ont été considérées comme une menace potentielle pour le développement de cancer gastrique. Des études cas-témoins basées sur la population suédoise et allemande ont également démontré que la combinaison du tabagisme et de l'infection par des souches *H. pylori* CagA-positif augmente le risque de développer un cancer gastrique (Khatoon, et al., 2016). Aujourd'hui il est clairement établi que les effets combinatoires de plusieurs facteurs environnementaux

augmentent les risques de développement du cancer gastrique chez les sujets infectés par l'*H. pylori* (Mustapha, 2011).

### III.2.6. Infection à l'helminthe

La co-infection par l'*H. pylori* et les helminthes peut avoir un certain impact dans la pathogenèse de la maladie. La réponse Th1 réduite associée à des niveaux plus élevés de cytokines Th2 a été rapportée dans une étude (Fox, et al., 2000). Une autre étude sur les enfants colombiens d'une région côtière ayant l'infection des helminthes et l'*H. pylori* a montré une réponse plus élevée de Th2 associée au IgG1 (Whary, et al., 2005). D'autres études sont nécessaires pour évaluer l'impact de la co-infection de l'*H. pylori* et les helminthes dans la pathogenèse de la maladie (Khatoun, et al., 2016).

### III.2.7. Les insectes

Les insectes peuvent être une autre source de contamination des aliments. Les mouches ont été à plusieurs reprises mises en cause en tant qu'un agent de propagation de l'*H. pylori*. La bactérie peut vivre jusqu'à 12 heures sur le corps d'une mouche, et pendant plus de 24 heures dans son intestin. Les mouches se déplacent dans les aliments ou dans d'autres surfaces, laissant des sécrétions et des excréments qui contiennent des bactéries, potentiellement ingérées et qui peuvent alors conduire à une infection. Sur le long de la même veine, les matières fécales des cafards qui ont été nourris avec des cultures de l'*H. pylori* peuvent contenir la bactérie jusqu'à 24 heures, ce qui suggère que les aliments contaminés par des matières fécales de ces insectes peuvent transmettre la bactérie à l'homme, en particulier si les aliments ne sont pas bien cuits ou laver avec de l'eau propre (Fleming, et al., 2007).

### III.2.8. Autre facteur : origine ancestrale

L'*H. pylori* peut être divisée en sept populations mondiales et sous-populations avec des distributions géographiques distinctes, génétiquement dérivées de populations ancestrales telles que celles en Afrique (Afrique Ancestral 1 ou 2 ; AA1 ou 2), Europe (Europe Ancestral 1 ou 2 ; AE1 ou 2), et Asie de l'Est (Asie de l'Est Ancestral ; AEA). Alors que les taux de cancer de l'estomac sont en corrélation avec la prévalence de l'*H. pylori* dans certaines régions, dans d'autres régions, il n'y a aucune corrélation avec la prévalence de l'*H. pylori*, comme certaines régions d'Afrique ou d'Amérique du Sud. En Colombie, le taux de cancer gastrique rapporté dans les montagnes des Andes (environ 150 pour 100 000) est 25 fois plus élevé que dans les régions côtières (environ 6 pour 100 000), malgré que la prévalence de l'*H. pylori* est similaire dans les deux régions (environ 90 %) (Ahn & Lee, 2015).

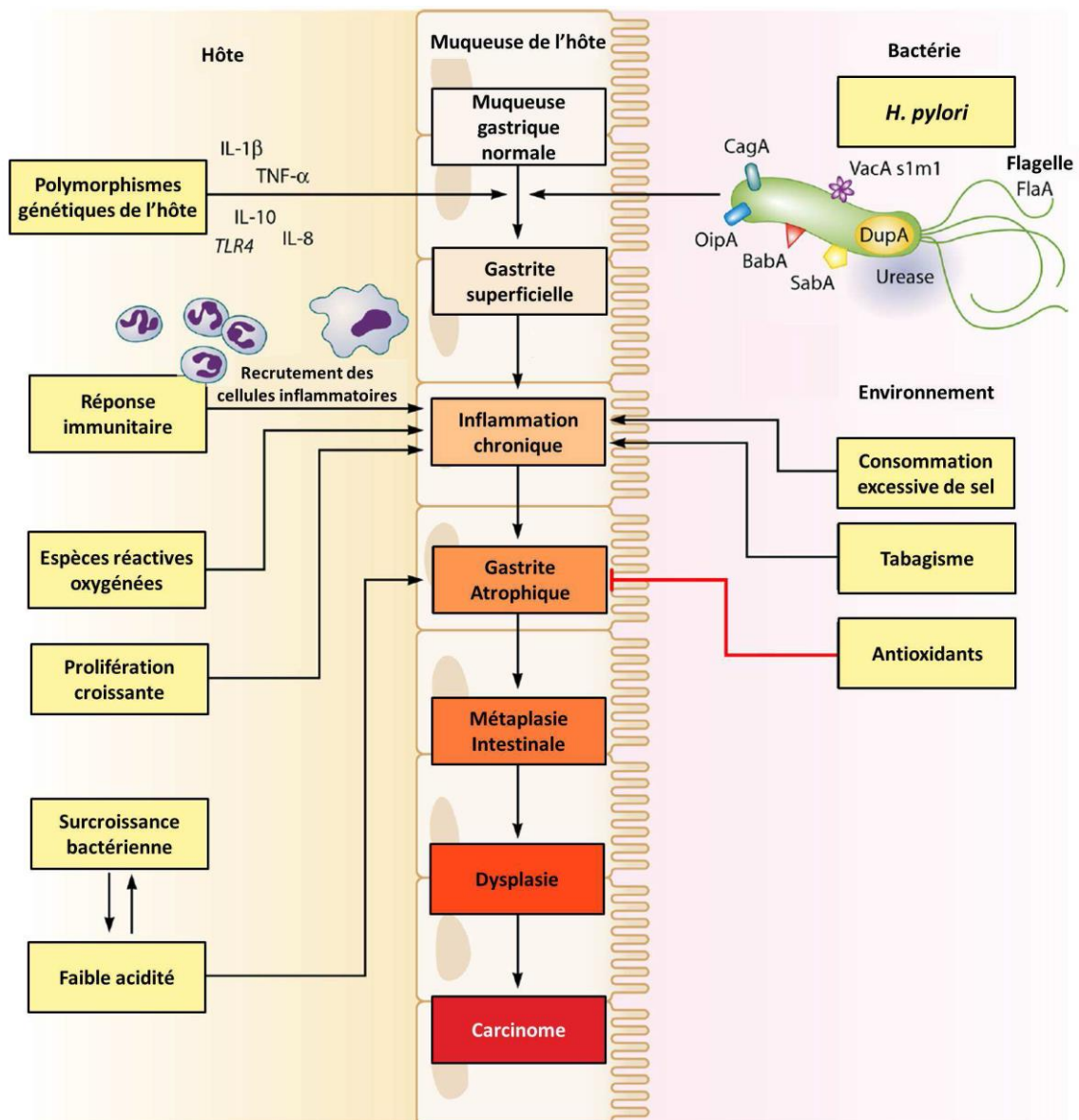


Figure 12 : Déterminisme pathologique lié à *H. pylori*

L'évolution vers le cancer gastrique est la conséquence d'une interaction complexe entre les facteurs bactériens, de l'hôte et environnementaux, modifiée d'après (Wroblewski, et al., 2010).

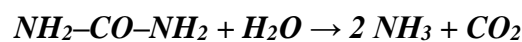
### III.3. La colonisation de la muqueuse gastrique par l'*H. pylori*

Avant la fixation de l'*H. pylori* à l'épithélium gastrique, il doit d'abord traverser la couche épaisse de mucus en adhérant à la surface de la muqueuse. Ceci est facilité par l'activité de l'uréase bactérienne, la modulation de la forme cellulaire hélicoïdale pour enfoncer le mucus gastrique et par la présence de flagelles gainés monopolaires, ce qui permet à l'*H. pylori* de se déplacer rapidement dans un pH bas inhospitalier de la lumière gastrique vers la surface de l'épithélium où le pH est élevé et favorable pour une colonisation réussie, malgré les efforts déployés par l'hôte pour se débarrasser de cette bactérie (Ahn & Lee, 2015).

### III.3.1. Uréase-métabolisme de l'urée

L'uréase est présente chez toutes les souches de l'*H. pylori* et elle est un élément important dans la biologie de la bactérie. L'uréase, majoritairement cytoplasmique, représente de 6 à 10 % des protéines totales de l'*H. pylori*. Bien qu'une partie soit retrouvée dans les surnageant de cultures, aucune séquence signal n'a été observée qui pourrait permettre sa sécrétion.

L'activité uréase catalyse, en présence d'eau, la dégradation de l'urée en deux molécules d'ammoniaque et une molécule de dioxyde de carbone :



L'organisation génétique d'une grande région d'ADN de *H. pylori* comprenant les gènes structurels de l'enzyme (*ureAB*) et le gène accessoire code pour les protéines accessoires qui activent l'enzyme par l'incorporation des ions de nickels (*ureIEFGH*) de l'uréase (De Reuse, et al., 1997). La présence d'une région d'ADN de 2,2 kb de longue immédiatement en amont des gènes *ureAB* est nécessaire pour conférer une activité uréase, région contenant deux cadres de lecture ouverts (ORF), désignés *ureC* et *ureD*, pour la production de l'uréase dans l'*H. pylori*. Le produit du gène *ureC* est une phosphatase de phosphoglucosamine, une enzyme qui catalyse l'interconversion des isomères GlcN-6-phosphate (GlcN-6-P) et GlcN-1-P (De Reuse, et al., 1997). L'activité enzymatique de l'uréase dépend indirectement du gène *ureI* codant pour une porine membranaire qui forme un canal dont l'ouverture est contrôlée par le pH externe. Un pH acide induit l'ouverture du canal permettant le passage de l'urée hydrolysée par l'uréase dans le cytoplasme bactérien. L'augmentation du pH provoque la fermeture du pore et empêche le passage de l'urée (Mustapha, 2011). L'inhibition de UreI pourrait être une cible pour l'éradication de l'*H. pylori*

Cette uréase permet à l'*H. pylori* de :

- Survivre à l'acidité extrême rencontrée dans l'estomac : l'uréase n'est pas essentielle à l'*H. pylori* dans les conditions de laboratoire, mais elle est essentielle in vivo à sa survie dans l'estomac, car elle permet de neutraliser le pH dans son micro-environnement ;
- Coloniser la muqueuse gastrique : un mutant dépourvu d'uréase n'est plus capable de coloniser l'estomac murin ou même porcin, et ce de façon surprenante, si l'estomac est artificiellement tamponné ;



- Lésion de la barrière stomacale : l'uréase semble être un des facteurs de pathogénicité de l'*H. pylori*. Elle est capable d'induire une réponse inflammatoire locale et de générer des lésions. Ceci est peut-être dû à l'activité même de l'uréase. Effectivement, une production massive d'ammoniaque est capable d'endommager les jonctions intercellulaires et d'accélérer l'apoptose induite par les cytokines, ces deux phénomènes aboutissant à une altération de la muqueuse (Chaput & Boneca, 2006).

### III.3.2. Les Flagelles

L'*H. pylori* est mobile grâce à la présence de flagelles unipolaires, à raison de 2 à 6 flagelles par bactérie selon les souches (Chaput & Boneca, 2006). La rotation des flagelles assure la propulsion de la bactérie à travers le mucus gastrique très visqueux qui lui confère ainsi la capacité de se déplacer facilement dans la muqueuse. La rotation flagellaire est assurée par la protéine flagellaire motrice MotB codée par le gène *motB*. Les filaments flagellaires sont constitués d'un co-polymère de flagellines FlaA (sous-unité majeure) et FlaB (sous-unité mineure). La présence d'une forme tronquée de FlaA due à une mutation du gène *fla A* diminue in vitro la mobilité de l'*H. pylori* (Mustapha, 2011).

La mobilité de l'*H. pylori* (FlaA) a été corrélée à la capacité de la bactérie à coloniser la muqueuse gastrique chez les rongeurs porcelet gnotobiotique : moins la souche est mobile, moins elle a la capacité de coloniser ou de survivre in vivo. De plus, les souches présentent une mobilité accrue à la sortie de l'animal, probablement par la sélection des bactéries les plus mobiles. Plus de 40 gènes sont impliqués dans la biogenèse des flagelles de l'*H. pylori*. Un réseau complexe de régulations transcriptionnelles et post-transcriptionnelles permet d'aboutir à des flagelles correctement structurés et fonctionnels. Un seul gène muté parmi les 40 gènes nécessaires aux flagelles et à leur mobilité entraîne la diminution ou la perte de la mobilité de la bactérie in vivo qui est essentielle pour l'*H. pylori* (Chaput & Boneca, 2006).

Pour la survie de l'*H. pylori* dans l'estomac, il est nécessaire que la bactérie atteigne rapidement le mucus et y pénètre. Des travaux expérimentaux récents ont montré que l'*H. pylori* perd rapidement sa mobilité lors d'une infection de l'estomac de la gerbille dû à l'action de pepsines ; la flagelline pourrait être la cible de la pepsine, malgré la présence d'une gaine membranaire qui doit la protéger de l'environnement stomacal, et/ou une des protéines permettant la force motrice des flagelles. La pénétration de la bactérie dans le mucus est possible grâce aux flagelles, mais également grâce à la sécrétion de protéases et de



phospholipases qui dégradent la mucine environnant la bactérie. L'action de ces protéines sécrétées pourrait expliquer la diminution de l'épaisseur du mucus lors d'infection à l'*H. pylori* in vivo chez l'Homme (Chaput & Boneca, 2006).

Outre son arsenal de facteurs de virulence, la persistance de l'*H. pylori* est fortement influencée par la capacité de la bactérie à échapper, détourner et de manipuler le système immunitaire de l'hôte. Cette bactérie peut échapper à la détection de plusieurs récepteurs de l'immunité innée par une modification de la cible et il peut détourner les autres voies de reconnaissance innée par la suppression de la transduction du signal en aval, alors que l'évasion de l'immunité adaptative est réalisée par la modulation des fonctions des cellules T effectrices (Salama, et al., 2013).

### III.3.3. Colonisation de la muqueuse gastrique et échappement de l'acidité de la lumière.

Chez les individus infectés, la majorité procède à un développement de l'inflammation et des réponses immunitaires contre l'*H. pylori*, mais chez certains sujets infectés par l'*H. pylori* devient chroniques et conduit à l'induction de l'inflammation gastrique qui peut éventuellement conduire à la destruction des glandes gastriques normales et leur remplacement par l'épithélium de type intestinal entraînant une atrophie de la muqueuse gastrique (Khatoun, et al., 2016). L'estomac est une niche particulièrement difficile pour l'occupation bactérienne. Dans l'intestin distal, qui a un pH neutre ou légèrement alcalin, la densité bactérienne est la plus élevée dans la lumière ; en revanche, la production d'acide gastrique dans l'estomac, qui conduit à un pH de 1-2, limite sévèrement la colonisation luminale. En effet, l'*H. pylori* ne peut survivre pendant plusieurs minutes dans la lumière de l'estomac et doit rapidement migrer vers la surface de l'épithélium gastrique. Comparablement à l'intestin, la couche de mucus de l'estomac forme une barrière physique contre la pénétration bactérienne et agit comme un échafaudage probable pour la liaison de composés antimicrobiens de l'hôte. La production de l'uréase bactérienne est requise pour la résistance à l'acide à travers la production localisée d'ions d'ammonium, et la motilité flagellaire permet une pénétration à la muqueuse (Figure 13). En outre, l'activité uréasique facilite la mobilité flagellaire à travers la couche de mucus en modifiant les propriétés viscoélastiques des mucines gastriques. À un pH faible, les mucines gastriques forment un gel qui piège efficacement les bactéries, mais la production des ions d'ammonium catalysé par l'uréase augmente le pH à proximité vers le neutre et le gel de mucus se transforme en une solution viscoélastique à travers laquelle l'*H. pylori* peut nager. Le régulateur de la motilité, y compris le chimiotactisme et la forme des

cellules, ont été examinés pour découvrir les facteurs de colonisation supplémentaire et de mieux définir la niche optimale pour l'*H. pylori*. La forme des cellules hélicoïdales est pensée pour améliorer la motilité à travers les milieux visqueux par un mécanisme de tire-bouchon, et les mutants de forme de cellules qui ont perdu la torsion hélicoïdale et/ou la courbure exposée à une atténuation de la colonisation. En plus de favoriser la clairance, la localisation altérée de mutants de chimiotactisme est en corrélation avec une faible inflammation, une altération de recrutement de lymphocytes T CD4+ et l'absence d'une réponse T auxiliaire (T<sub>H</sub>17). Ainsi, l'association intime avec l'épithélium gastrique favorise une stabilité de l'infection en provoquant simultanément plus d'inflammation. Une inflammation élevée est en corrélation avec les charges bactériennes faibles, ce qui suggère que l'*H. pylori* doit gérer activement son interaction avec l'épithélium de l'hôte pour éviter la clairance et de persister sur ce site (Salama, et al., 2013).

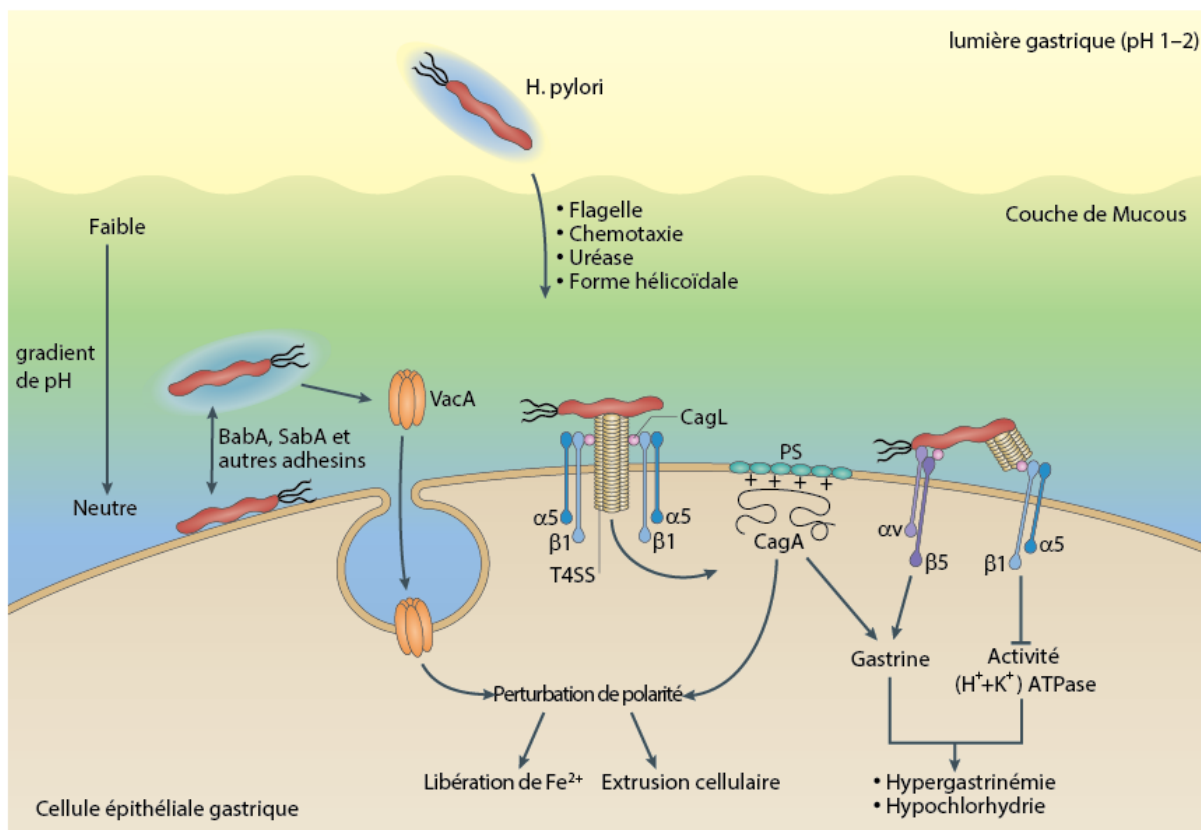


Figure 13 : facteurs de colonisation et de persistance de *H. pylori*

Au cours de l'infection initiale dans la lumière de l'estomac, la production d'ammoniac qui dépend de l'uréase, augmente le pH localement, ce qui favorise la survie des bactéries et solubilise le gel de mucus pour faciliter la mobilité des bactéries. Le chimiotactisme (entraîné par le pH et éventuellement d'autres gradients) et la forme de la tige hélicoïdale favorisent la motilité flagellaire loin de la lumière acide vers la niche préférée de *Helicobacter pylori*, qui se trouve sur et au voisinage des cellules épithéliales gastriques. SabA, BabA et d'autres adhésines

associé variablement exprimées pourraient modifier l'équilibre du mucus vers des bactéries associées aux cellules. Les bactéries associées aux cellules altèrent le comportement des cellules épithéliales gastrique par cytotoxine vacuolante (VacA), cytotoxine associée au gène A (CagA) et CagL, qui ont toutes des cibles cellulaires multiples. CagL interagit avec le récepteur de surface cellulaire  $\alpha 5\beta 1$  médié par le motif de la protéine RGD, tandis que les interactions avec d'autres récepteurs de surface cellulaires ( $\alpha \beta 5$  de l'intégrine) sont indépendantes du RGD. L'action combinée de ces trois effecteurs conduit à un certain nombre de changements dans la cellule épithéliale gastrique, y compris des perturbations de la polarité cellulaire qui dépend de CagA et VacA, ce qui peut favoriser l'acquisition du fer et l'extrusion de la cellule ; l'induction de chimiokines et/ou l'hormone gastrine gastrique qui dépend aux CagA et CagL ; l'inhibition de la sécrétion acide par ( $H^+ + K^+$ ) ATPase qui dépend de CagL, et de la prolifération cellulaire, l'apoptose et la différenciation, médiées par les trois effecteurs. En plus de CagL, CagA et CagY (non représenté) ont été démontrés pour se lier aux intégrines  $\alpha 5\beta 1$ , bien que la surface d'interaction précise soit inconnue. PS, phosphatidylsérine ; T4SS, système de sécrétion de type IV.

Modifiée d'après (Salama, et al., 2013)

### III.3.4. Colonisation persistante de la muqueuse gastrique.

L'*H. pylori* utilise diverses stratégies pour promouvoir sa survie malgré des puissantes réponses immunitaires. Toutes les souches de l'*H. pylori* codent pour des protéines qui sont importantes pour la détoxification des dérivés réactifs de l'oxygène (ROS, *reactive oxygen species*) par exemple, la catalase et le superoxyde dismutase et l'arginase de l'*H. pylori* limite la production d'oxyde nitrique par les macrophages, les neutrophiles et dérivée de l'oxyde nitrique synthétase de l'épithélium cellulaire. En outre, de multiples voies de réparation de l'ADN contribuent à la colonisation efficace alors même que le tissu hôte environnant accumule des lésions de l'ADN. Après des altérations de l'ADN, l'*H. pylori* régule positivement à la place une compétence naturelle, ce qui favorise la persistance chronique, probablement grâce à la diversification génétique améliorée.

Le génome de l'*H. pylori* contient plusieurs séquences répétées intragéniques et extragéniques. La CagY, exprimé sur la surface cellulaire et est nécessaire pour le système de sécrétion de type IV (T4SS) médiée par la translocation de l'effecteur CagA, peut subir une recombinaison entre les motifs répétitifs internes qui conservent généralement le cadre de lecture. Au cours de l'infection expérimentale des souris et des macaques rhésus, on observe une accumulation de variantes de CagY de l'*H. pylori* qui ont gagné ou perdu l'activité T4SS. Ces résultats suggèrent que la translocation de CagA et les réponses biologiques associées, y compris l'inflammation, peuvent avoir des effets bénéfiques et néfastes sur la persistance bactérienne, ce qui conduit à la sélection à la fois, de la rétention et de la perte de l'activité T4SS.

Parmi les 60 protéines estimées de la membrane externe, la famille HOP partage une forte similitude ou des séquences identiques à leur amino et carboxyle terminale et comprend plusieurs adhésines de l'*H. pylori* connu ou devinées qui favorisent la liaison à

l'épithélium gastrique. Ces séquences partagées pourraient favoriser la recombinaison intra-génomique ou inter-génomiques. Le séquençage du loci HOP de l'*H. pylori* des collections cliniques de souches humaines a révélé la conversion génique probable du gène de l'adhésine de liaison de Lewis B (*babA*, *Lewis B binding adhesin*, une adhésine codée par le gène *babA2* qui se lie à l'antigène de groupe sanguin Lewis<sup>b</sup> fucosylé situé à la surface des cellules épithéliales) avec *babB* ou *babC* et du gène *sabB* avec l'adhésine sialyl-Lewis de liaison *sabA* ou *omp27* (*Sialic acid binding adhesion*, adhésine qui se lie à la structure sialylée de l'antigène Lewis<sup>x</sup> exprimé à la surface des cellules épithéliales). Au cours de l'infection expérimentale des macaques rhésus ou des souris avec l'*H. pylori*, le remplacement de *babA* avec *babB* produit des souches immobilisés qui ont perdu la capacité de se lier à des antigènes Lewis<sup>b</sup>. En outre, le remplacement de *sabB* avec *sabA* conduit à des souches exprimant deux copies de *sabA*, qui se traduit par une augmentation de la liaison aux antigènes sialyl-Lewis<sup>x</sup> sur les tissus gastriques murins. Certains allèles de *babA* et *sabA* peuvent subir une variation de phase par des mésappariement de brin glissé à des séquences dinucléotidiques dans les séquences codantes ou les extensions homopolymériques dans leurs promoteurs, ce qui conduit à nouveau à la perte ou à la surexpression du gène. Les antigènes carbohydate liés par ces adhésines sont exprimés sur la surface cellulaire et/ou sur des glycoprotéines sécrétées telles que la mucine. Par ailleurs, certains de ces antigènes tels que des antigènes de sialyle-Lewis<sup>x</sup>, sont induits au cours de l'inflammation. La variation de phase par conversion génique et le mésappariement de brin glissé conduisent au développement des sous-populations ayant des propriétés d'adhérence variables qui pourraient permettre à l'agent pathogène d'échapper à la réponse immunitaire ou à résister à l'excrétion. Cette capacité à générer diverses sous-populations pourrait également affecter la transmission vers de nouveaux hôtes.

### III.3.5. Toxines sécrétées par l'*H. pylori*

**Les effecteurs VacA et CagA.** Les souches de l'*H. pylori* manipulent activement les tissus hôtes et promouvoir leur propre persistance à travers l'activité de plusieurs toxines sécrétées. VacA est une toxine de formation de pores qui perturbe la polarité cellulaire, favorise l'apoptose des cellules épithéliales et inhibe la prolifération des cellules T et les fonctions effectrices. Le gène *vac A* est porté par toutes les souches de l'*H. pylori*, et une variation de séquence dans plusieurs domaines qui code pour la protéine est liée à divers niveaux d'expression et de la toxicité du type cellulaire spécifique, ainsi que la gravité de la maladie. Une autre toxine importante est la CagA. Caractérisé initialement comme un antigène immunodominant des patients infectés qui porte des allèles *vac A* très virulents. La CagA est

transloqué dans les cellules hôtes par le Cag T4SS, codé sur l'îlot de pathogénicité *cag-PAI*. Les souches qui expriment le *cag A* sont associées à un risque accru de cancer, et l'expression transgénique de *cag A* chez la souris induit un carcinome gastrique et d'autres tumeurs malignes, considérées comme oncoprotéine bactérienne (Salama, et al., 2013).

**Interactions CagA-VacA.** Pour fonctionner comme une oncoprotéine, CagA doit persister dans les cellules ou d'agir d'une manière « attaques et fuir ». CagA n'a pas été facilement détecté dans les tissus du cancer de l'estomac et a donc été suggéré d'avoir un rôle causal qu'au début de la progression du cancer. Il a été démontré à présent que le CagA transloqué est dégradé par l'autophagie lorsque la souche infectante a l'allèle m1 de VacA, en raison de la capacité de cette isoforme VacA de se lier au récepteur à Lipoprotéines de basse densité lié à la protéine 1 (LRP1). VacA lié à LRP1 conduit à une perte du glutathion réduit (GSH) dans la cellule et la production accrue de ROS. Ceci à son tour, active la AKT kinase dépendante de la dégradation du suppresseur de la tumeur le p53 et aboutit à l'induction de l'autophagie, ce qui conduit à une dégradation de type CagA. Fait intéressant, l'autophagie n'est pas activée dans les cellules qui expriment une forme variante de la molécule d'adhésion CD44. Ces cellules ont augmenté les niveaux intracellulaires de GSH en raison de l'activation de xCT, un transporteur de glutamate-cystéine, et donc n'induit pas ROS ou l'autophagie sur la liaison VacA. Le CD44 est un marqueur de surface cellulaire associé à des cellules souches cancéreuses épithéliales et le CagA peut être détectée dans des cellules exprimant un variant CD44 chez des patients atteints d'un cancer gastrique. Paradoxalement, les changements des tissus qui sont associés à la carcinogenèse gastrique induite par l'*H. pylori*, y compris le développement de la métaplasie intestinale, ont été considérés pour rendre l'estomac moins accueillant pour la colonisation de l'*H. pylori*, entraînant une baisse des charges de colonisation. Cependant, l'*H. pylori* a été montrée pour interagir intimement avec des cellules gastriques progénitrices dans un modèle de souris infectées. Cette capacité de l'*H. pylori* à coloniser les cellules qui ont des propriétés des cellules souches, et la persistance de la protéine CagA dans ces cellules en raison de l'activation de xCT, pourrait fournir un mécanisme pour expliquer un rôle soutenu de la colonisation de l'*H. pylori* et CagA dans l'oncogenèse (Salama, et al., 2013).

Le produit du gène *cag A*, est transloqué dans les cellules épithéliales gastriques et se localise sur la surface interne de la membrane plasmique, dans laquelle il subit une phosphorylation de la tyrosine dans le motif Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala (EPIYA) par SRC et les kinases de la famille ABL (Abelson leucémie murine oncogène viral homologue 1 également

connu sous le nom ABL1). La tyrosine phosphorylée se lie spécifiquement à la CagA et active d'homologie SRC contenant la protéine tyrosine phosphatase-2 (SHP-2) au niveau de la membrane, provoquant ainsi une forme de cellule allongée appelée le phénotype de Colibri (Higashi, et al., 2005). Ces deux types de kinases sont activées séquentiellement et d'une manière étroitement régulée, avec des kinases SRC médiatrices du départ, la phosphorylation préférentielle des motifs de EPIYA-C (et EPIYA -D) et des kinases ABL phosphorylant tout le motif EPIYA plus tard au cours de l'infection. CagA phosphorylé interagit avec la tyrosine phosphatase-2 SHP-2 et CSK kinase (C-terminale de la kinase Src), tandis que CagA non phosphorylé est connue pour interagir avec les adaptateurs CRK, MET, facteur de croissance lié au récepteur de protéine 2 (GRB2), PAR1 (également connu sous le nom MARK) et la E-Cadhérine. Collectivement, ces interactions conduisent à l'altération de la signalisation cellulaire et les modifications de la polarité cellulaire, l'extrusion, la motilité, la prolifération et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoire. Beaucoup de ces phénotypes sont maintenant liés à l'acquisition de nutriments par la bactérie pour promouvoir la persistance et/ou la pathologie de l'hôte (Salama, et al., 2013).

Dans des conditions standard, l'expression de CagA n'est pas requise pour la colonisation de l'estomac, mais il ne favorise pas l'inflammation dans le modèle de gerbille de Mongolie. L'activité de Cag T4SS est souvent perdue lors de l'infection murine, ce qui complique les efforts visant à élucider les rôles physiopathologiques de CagA lors de l'infection chronique à l'*H. pylori*. Cependant, dans un modèle de culture cellulaire polarisée, CagA favorise une absorption accrue basolateral et la transcytose de la transferrine, et VacA entraîne une mauvaise localisation du récepteur de transferrine à des sites d'attachement bactérien pour faciliter l'acquisition du fer par la bactérie. Chez les mutants CagA, la formation de microcolonies sur la surface apicale de la cellule nécessite une supplémentation en fer, alors qu'il n'est pas obligatoire pour les bactéries de type sauvage, suggérant que CagA- et VacA-dépendantes à des perturbations de polarité cellulaire confèrent un avantage nutritionnel. En accord avec cette hypothèse, CagA est exigé à la colonisation efficace des gerbilles de Mongolie, dans des conditions en fer réduit. Ainsi, CagA et VacA collaborent pour favoriser la colonisation efficace dans un environnement en fer réduit dans l'estomac et de modérer les effets pathologiques de CagA.

**Les perspectives ultrastructurales dans la sécrétion de CagA.** En raison de l'importance de CagA dans la persistance et de la pathologie, il y a beaucoup d'intérêt dans l'exécution de



mécanismes d'administration de CagA dans les cellules hôtes. La translocation du CagA de la bactérie vers le cytosol de la cellule hôte est médiée par le Cag T4SS. Ceci est un système de sécrétion contact-dépendant très complexe, franchissant les membranes interne et externe, qui contient un pili et plusieurs ATPases qui favorisent l'assemblage T4SS, la formation des pili et le transfert de CagA. Le *cag-PAI* de l'*H. pylori* qui code pour des homologues ou des paralogues du prototype Vir T4SS de l'*Agrobacterium tumefaciens*, y compris le VirB7 putatif (CagT), VirB9 (CagX) et VirB10 (CagY) ; sous-unités du canal transmembranaire interne et externe ; le principal, VirB2 (CagC), et le mineur, VirB5 (CagL), sous unités de pili ; et plusieurs protéines Cag de l'*H. pylori* supplémentaires spécifiques qui sont nécessaires pour la translocation de CagA (par exemple, CagH et CagI). De nombreux composants de Cag T4SS ont des structures de domaine qui sont distinctes de leurs homologues Vir. Par exemple, l'homologue VirB10 de CagY est considérablement plus grande (~ 220 kDa) et contient des domaines supplémentaires qui sont composés de régions répétées. En outre, des observations en microscopie électronique à transmission montrent que les trois conducteurs homologues de la sous-unité du canal transmembranaire de l'enveloppe cellulaire (CagY, CagT et CagX) se localisent à la surface ou à la base de pili. Une étude plus récente localise CagL et CagA à la pointe des pili. CagL a été suggéré de fonctionner comme une adhésine de pointe qui se lie à une intégrine  $\alpha 5\beta 1$  (un récepteur de la cellule hôte pour CagL) et des séquences avoisinantes à travers un motif RGD (Figure 13). La liaison CagL avec la signalisation de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  a été jugé nécessaire à la fois à l'extension des pili et à la translocation de CagA. Le peptide soluble RGD pourrait partiellement sauver le défaut CagA de la translocation d'un mutant CagL<sup>RGA</sup>, mais pas sur une souche de délétion  $\Delta cagL$ , ce qui suggère un modèle à deux étapes dans lequel la surface exposée CagL se lie et active l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ , stimulant partiellement la kinase d'adhésion focale (FAK, *Focal Adhesion Kinase*) et SRC kinase, favorisant l'extension des pili (Salama, et al., 2013). Dans une deuxième étape, CagL associé aux pili stimule l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ , en plus de stimuler l'activité des FAK et SRC, induisant ainsi la translocation de CagA et assurer sa phosphorylation rapide de la tyrosine par la SRC.

La relation entre la formation de pili et la sécrétion de CagA a été étudiée par microscopie électronique à balayage à émission de champ qui détecte facilement la dépendance du Cag T4SS aux pili. Cette technique a confirmé l'exigence de CagL pour la formation de pili et a également révélé un phénotype d'hyper-pilier pour les mutants CagH, qui comme les mutants CagL, ne parviennent pas à la translocation de CagA. Une étude a montré qu'un mutant



$\Delta$ CagY produit des pili, ce qui est surprenant, car une autre étude a révélé que CagL est instable dans un mutant  $\Delta$ CagY. À l'heure actuelle, le mécanisme par lequel CagL (ou CagA, CagT, CagX et CagY) devient la surface exposée ou incorporée dans des pili n'a pas été exploré. Conjointement, ces données suggèrent que la formation de pili ne suffit pas pour la translocation de CagA, car la formation de pili peut se dérouler en l'absence au moins d'un noyau du composant T4SS. Et qu'il pourrait y avoir des mécanismes CagL indépendants de l'activation de l'intégrine, de l'assemblage des pili et de la translocation de CagA dans certaines souches. En fait, CagA, CagI et CagY se sont avérées fixées à l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  in vitro et dans deux études hybrides chez la levure. La CagA, en particulier, présente une affinité beaucoup plus élevée de liaison à l'intégrine in vitro que CagL ; la liaison de CagA n'est pas inhibée par l'invasion de *Yersinia enterocolitica* contenant le RGD, ce qui indiquerait que le CagA et la CagL utilisent différentes surfaces d'interaction avec l'intégrine. Les anticorps qui empêchent la commutation de l'intégrine entre une coudée et le bloc de la configuration ouverte la translocation CagA et le domaine d'interaction de CagA avec l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ , inhibe la translocation CagA lorsqu'elle est fournie comme un peptide soluble. L'ensemble complexe d'interactions moléculaires est requis pour l'activation de l'intégrine et la sécrétion de CagA. D'autres indications sur la nature précise des interactions entre CagA, CagL et les partenaires d'interaction de l'hôte commencent à être révélées par des études d'évolution structurales et moléculaires (Salama, et al., 2013).

### III.3.6. Évasion de la reconnaissance immunitaire innée

En plus des multiples facteurs de virulence que l'*H. pylori* utilisée pour manipuler l'hôte et d'assurer sa persistance, la bactérie a développé des stratégies élaborées pour échapper et de subvertir les défenses immunitaires de l'hôte. Ces stratégies sont la clé du succès de ce pathogène. La première barrière de défense contre l'*H. pylori* est le mucus produit par les cellules épithéliales qui tapissent la muqueuse gastrique et les cellules immunitaires innées qui résident dans la lamina propria gastrique à l'état stationnaire ou ils sont recrutés au cours de l'infection. La détection des structures moléculaires conservées dérivées d'agents pathogènes (motifs moléculaires associés à des pathogènes (PAMPs, *pathogen-associated molecular patterns*)) par les cellules épithéliales et les cellules immunitaires innées se fait par quatre classes distinctes de récepteurs de l'immunité innée (récepteurs de reconnaissance des formes (PRR, *pattern recognition receptors*)), qui diffèrent par leur localisation intracellulaire, leur conjonction à des voies de signalisation en aval et leur spécificité. L'*H. pylori* évite la détection

par différents types de PRR qui sont essentiels pour la reconnaissance d'autres entéropathogènes Gram négatifs (Salama, et al., 2013).

**L'évasion et la manipulation de TLR et de reconnaissance RLR.** Les mieux élaborés parmi les quatre classes de PRR sont les récepteurs Toll-like (TLR). Les TLR sont soit exposées à la surface de la membrane plasmique ou localisées au niveau des endosomes, et ils fixent diverses classes de PAMPs. Parmi ces derniers sont les ligands pour TLR4 (lipopolysaccharide (LPS)), TLR2 (acide lipotéichoïque et lipoprotéines), TLR3 (ARN double brin et acide polyinosinique : acide polycytidylique), TLR5 (flagelline) et TLR9 (CpG non méthylés). L'*H. pylori* évite en grande partie la reconnaissance par TLR, le meilleur exemple pour comprendre l'évasion de la détection de LPS par TLR4. LPS de l'*H. pylori* est principalement tétra-acylés qui contient des antigènes oligosaccharidiques fucosylés structurellement similaires aux antigènes du groupe sanguin humain (Mustapha, 2011; Salama, et al., 2013) et 1000 fois moins actif biologiquement que le LPS hexa-acylé d'*Escherichia coli* (Moran, et al., 1997). En outre, l'activité biologique réduite du LPS de l'*H. pylori* par l'élimination des groupes phosphate des positions 1'- et 4'- du squelette du lipide A, ce qui génère une LPS qui a la charge la moins négative, résiste à la liaison avec des peptides antimicrobiens (tels que la polymyxine B) et échappe à la détection par TLR (Cullen, et al., 2011). Les phosphatases responsables de la modification de lipide A chez l'*H. pylori* ont été identifiées et les mutants par délétion du gène spécifique, ne parviennent pas à coloniser des souris infectées expérimentalement (Cullen, et al., 2011). Le TLR (ou TLRs) impliqué dans la détection résiduelle des LPS de l'*H. pylori* reste un sujet de débat ; TLR2 est le capteur principal du LPS de l'*H. pylori* dont l'activation induit, via une cascade des voies de signalisation, l'activation de NF- $\kappa$ B et l'induction de chimiokines (Figure 14) (Mustapha, 2011; Salama, et al., 2013). Une interprétation claire des études publiées se complique du fait qu'ils reposent sur des modèles dans lesquels le TLR correspondant est exprimé ectopiquement, souvent en l'absence de son co-récepteur, et le fait que les TLR4 et TLR2 participe à la détection à d'autres PAMPs non-LPS liée à l'*H. pylori* (Rad, et al., 2009; Sayi, et al., 2011), qui peut contaminer les préparations de LPS.

Un autre PAMP putatif de l'*H. pylori*, la flagelline, échappe à la reconnaissance par TLR5 en raison de modifications dans le domaine de reconnaissance TLR5 N-terminale (Figure 14). La mutation des résidus 89-96 de la flagelline de *Salmonella enterica* ssp. *enterica* sérotype *Typhimurium* pour correspondre à la séquence *fla A* de l'*H. pylori* abolit sa reconnaissance par TLR5 (Chaput & Boneca, 2006; Salama, et al., 2013). Des expériences utilisant des cellules

dendritiques dépourvues de TLR2, TLR4, TLR7 et TLR9, ou des combinaisons de ceux-ci ont montré que le système immunitaire inné reconnaît l'acide nucléique de l'*H. pylori*. La délivrance intracellulaire de l'ADN de l'*H. pylori* à des cellules dendritiques par lipofection (ou liposomes transfection) active efficacement les TLR9 endosomal ; cependant, l'effet net de cette activation est anti-inflammatoire plutôt que pro-inflammatoire (Figure 14). La signalisation de TLR9 a des effets anti-inflammatoires dans les premiers stades de l'infection chez un modèle de souris, l'ADN de l'*H. pylori* peut même être utilisé sur le plan thérapeutique pour traiter expérimentalement la maladie intestinale induite par l'inflammation chez la souris (Luther, et al., 2011; Owyang, et al., 2012). L'activité biologique de l'ADN de l'*H. pylori* peut représenter la corrélation inverse entre la colonisation par l'*H. pylori* et le risque de développer des maladies inflammatoires intestinales attribuée à une séquence de régulation immunologique spécifique (TTTAGGG) qui semble être unique au génome de l'*H. pylori*. L'ARN de l'*H. pylori* détecté par des cellules dendritiques a été suggéré d'être médié par des TLR8 endosomal, ainsi que par un capteur cytoplasmique d'acide nucléique, RIG-I (appartient à la famille des récepteurs de l'hélicase RIG-like (RLR)). RIG-I semble être nécessaire pour la détection de l'ARN 5'triphosphorylé de l'*H. pylori* et qui a suivi l'IRF3- et IRF7- dépendant de l'induction de l'interféron de type I (IFNs) par les cellules dendritiques (Figure 14). Il est actuellement impossible de savoir si l'activation de RIG-I et la production des interférons de type I induit par l'*H. pylori* ont des effets principalement pro-inflammatoires ou anti-inflammatoires (Salama, et al., 2013).

La détection des ligands non-LPS de l'*H. pylori* par des TLR2 est un autre exemple pour l'*H. pylori* dont il exploite le système immunitaire pour l'induction d'une réponse anti-inflammatoire. L'activation de TLR2 déclenche le gène de la réponse primaire de différenciation myéloïde 88 (MYD88, *myeloid differentiation primary response gene 88*) l'expression dépendante de plusieurs gènes anti-inflammatoires, notamment l'IL-10 (Figure 14). En outre, *Tlr2*<sup>-/-</sup> de souris infectées par l'*Helicobacter felis* (un proche parent de l'*H. pylori*) est mieux placé pour le contrôler des infections expérimentales des souris de type sauvage et de développer de fortes réponses des lymphocytes T ainsi que des immunopathologie entraînées par des lymphocytes T.

Les effets de délétion du gène TLR2 sont phénotopies (Copie d'un phénotype déterminé par un génotype spécifique par l'action de certains facteurs d'environnement sur une autre partie du génotype) par MYD88<sup>-/-</sup> des souris, indique que l'absence de signaux anti-

inflammatoires induits par *Helicobacter spp.* est phénotypiquement dominante par rapport à l'absence simultanée de signaux pro-inflammatoires MYD88-dépendante induits par d'autres TLR.

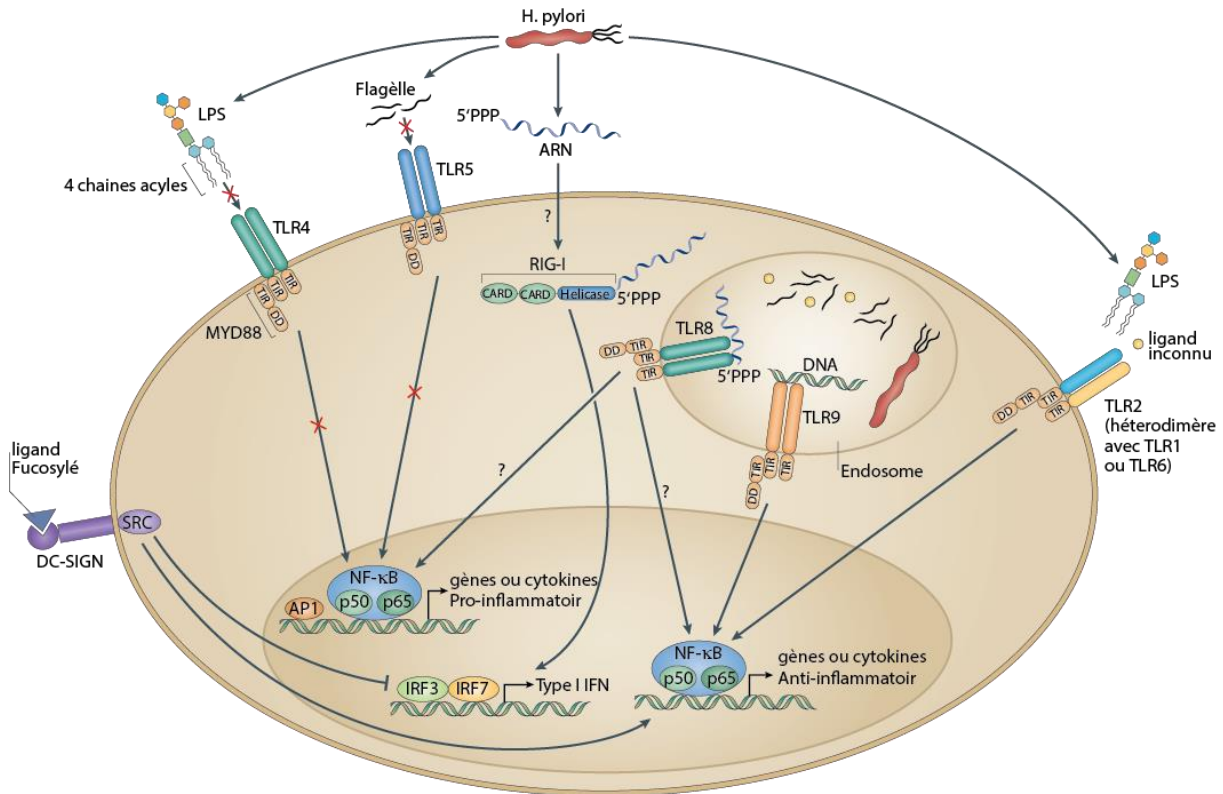


Figure 14 : La subversion par l'*H. pylori* de la reconnaissance immunitaire innée

L'*H. pylori* héberge des motifs moléculaires associés à des pathogènes (PAMP) qui ont évolué pour échapper à la détection par les récepteurs Toll-like pro-inflammatoires (TLR). *H. pylori* exprime le lipopolysaccharide (LPS) tétra-acylé, qui est biologiquement moins actif que la forme hexa-acylé qui est typique à d'autres agents pathogènes Gram négatifs dus à des modifications spécifiques du lipide A qui empêchent la détection par le TLR4. Les flagelles de l'*H. pylori* ne sont pas détectés par TLR5 en raison de mutations dans le site de liaison au TLR5 de la flagelline. L'ADN de la bactérie, aussi bien non caractérisée qu'un PAMP actuellement (et éventuellement LPS de *H. pylori*) est détecté par TLR9 et TLR2, respectivement ; ces TLR activent principalement des voies de signalisation anti-inflammatoires et l'expression de l'interleukine-10 (IL-10) anti-inflammatoire. L'ARN 5'triphosphorylé est détecté par le RIG-like, famille des récepteurs hélicase (RLR) RIG-I, qui active les facteurs de transcription IRF3 et IRF7 pour induire l'expression de l'interféron de type I (IFN ; IFN $\alpha$  et IFN $\beta$ ). L'ARN bactérien est également potentiellement détecté par TLR8 dans les endosomes. Les ligands DC-SIGN fucosylés de l'*H. pylori* suppriment l'activation des voies de signalisation en aval de ce récepteur de lectine de type C (CLR) et activent des gènes anti-inflammatoires. (TLR, SRRL et CLRs sont nécessairement exprimés par le même type de cellule ; un seul type générique de cellule est représenté ici par souci de simplicité). CARD, domaine d'activation de la caspase et de recrutement ; DC-SIGN, molécule d'adhésion intercellulaire-3 grabbing non-intégrine spécifique des cellules dendritiques ; DD, domaine de mort ; MYD88, gène de la réponse primaire de différenciation myéloïde 88 ; NF- $\kappa$ B, le facteur nucléaire- $\kappa$ B ; TIR, domaine de récepteur Toll /interleukine-1. Modifiée d'après (Salama, et al., 2013).

**Suppression de la signalisation médiée CLR.** En plus de son TLR et des ligands RLR, l'*H. pylori* héberge également des ligands pour une troisième classe de PRR, les récepteurs lectine

de type C (CLR). Le mieux caractérisé des ligands fucosylés est ce qui se lie aux membres de la famille CLR DC-SIGN. Contrairement aux agents pathogènes tels que *Mycobacterium tuberculosis* et le VIH, qui expriment des ligands DC-SIGN mannosylés et qui activent les voies de signalisation pro-inflammatoires en aval, les résidus fucose des ligands DC-SIGN de l'*H. pylori* dissocient activement le complexe de signalisation en aval de DC-SIGN (constitué par les protéines d'échafaudage LSP1, KSR1 et CNK et la kinase RAF1) et supprimer la signalisation pro-inflammatoire (Figure 14). Les effets biologiques différentiels des ligands DC-SIGN mannosylés et fucosylés sont compatibles avec le rôle proposé de ce PRR dans l'adaptation et le réglage fin de l'immunité adaptative à des agents pathogènes spécifiques par le DC-SIGN et l'acétylation RAF1 médiée par TLR- activé par NF- $\kappa$ B. L'acétylation de la sous-unité p65 de NF- $\kappa$ B, les deux prolongent et augmentent la transcription de l'IL-10 pour améliorer la réponse des cytokines anti-inflammatoires (Gringhuis, et al., 2007).

En résumé, la plupart des données disponibles soutiennent la conclusion que l'*H. pylori* évite l'induction d'une réponse pro-inflammatoire forte, ainsi que l'immunité adaptative subséquente et la clairance, par le biais de deux mécanismes principaux : l'évasion de la détection immunitaire innée par les TLR pro-inflammatoires et l'activation préférentielle et la manipulation anti-inflammatoire de TLR et CLR. Ensemble, ces stratégies favorisent la persistance de l'organisme (Salama, et al., 2013).

**L'activation de NLRs et l'inflammasome**, la famille de récepteurs cytoplasmique hétérogène NOD-like (NLRs) comprennent la quatrième et la dernière famille de PRRs. Les NLRs détectent une large gamme de PAMPs et sont essentiels pour détecter les motifs moléculaires associés aux dégâts cellulaires de l'hôte qui sont libérés suite à des perturbations de l'homéostasie tissulaire. D'une manière générale, les NLRs se divisent en deux catégories : NOD1 et NOD2 reconnaissent les métabolites et activent le facteur de transcription NF- $\kappa$ B pour induire des gènes de réponse immunitaire innée et adaptative. Alors que la plupart des autres NLR promouvoir l'ensemble des complexes de protéines multiples appelé inflammasomes, qui activent la protéase cystéine caspase1 (Broz & Monack, 2011).

**La détection de peptidoglycane de l'*H. pylori* par NOD1.** La détection de peptidoglycane de l'*H. pylori* médiée par NOD1 a été l'une des premières voies immunitaires innées trouvées de type PRR pour être activé par l'infection à l'*H. pylori*. Bien que le travail initial ait indiqué que seulement les souches *H. pylori* T4SS-compétents (qui hébergeant un Cag T4SS fonctionnel) pourraient offrir de peptidoglycane et son métabolite actif (méso-diaminopimélate contenant de



l'acide N-acétylglucosamine-N-acétylmuramique) dans le cytoplasme des cellules épithéliales de l'hôte, il est maintenant clair que les vésicules de la membrane externe (OMVs, *outer-membrane vesicles*) de souches de l'*H. pylori* *cag-PAI*-négatives peuvent également cibler de peptidoglycane à NOD1 (Figure 15). La libération intragastrique des OMVs chez la souris induite des réponses immunitaires innées et adaptatives par le biais d'un mécanisme de NOD1-dépendant ainsi que TLR-indépendant. La délivrance de peptidoglycane par les deux voies OMV et T4SS se produit par des radeaux lipidiques riches en cholestérol et en sphingolipides, mais pauvres en DHA (Acide DocosaHexaénoïque) (Figure 15). En plus de la voie de signalisation rapportée initialement de NOD1 obtenu dans la translocation de NF- $\kappa$ B vers le noyau, NOD1 active aussi le facteur de transcription AP1 par des voies qui dépendent de ERK et de p38. Une conséquence directe de la signalisation NOD1 est mise à la mort efficace de l'*H. pylori* par  $\beta$ -défensines 2, un peptide antimicrobien produit par les cellules épithéliales gastriques dont NOD1 est activé. L'idée que l'activation NF- $\kappa$ B dépend de NOD1 induite par l'*H. pylori* a été récemment remise en cause par un rapport montrant que l'introduction d'un petit ARN interférent (siRNA, *small interfering RNA*) spécifique pour NOD1 ne modifie pas la translocation nucléaire de la sous-unité p65 de NF- $\kappa$ B (Watanabe, et al., 2010). Cette nouvelle étude fournit des preuves alternatives pour une voie de signalisation NOD1-dépendant, ce qui active les facteurs de transcription IRF3 et IRF7 pour induire la production d'IFN de type I qui sont nécessaires pour les réponses des cytokines et des chimiokines spécifiques à l'*H. pylori* et le contrôle de l'infection (Figure 15) (Salama, et al., 2013).

**L'activation de l'inflammasome par l'*H. pylori*.** L'*H. pylori* héberge un ou plusieurs ligands qui déclenchent l'activation de l'inflammasome et de la caspase 1, une protéase cystéine qui commande la transformation et la sécrétion de deux précurseurs des cytokines, la pro-IL-1 $\beta$  et la pro-IL-18. Comme d'autres caspases, caspase 1 est synthétisée sous forme d'un précurseur inactif, qui devient auto-protéolytique activé seulement après l'assemblage inflammasome. L'assemblage inflammasome à son tour est régulée par la liaison du ligand suivant une hétéro-oligomérisation de capteurs inflammasome conjointement avec une molécule d'adaptation, ASC (protéine *speck-like* associée à l'apoptose contenant le domaine de l'activation et le recrutement de la caspase (CARD), *apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase activation and recruitment domain* (CARD)) et procaspase 1. Tandis que les ligands inflammasome et des capteurs NLR qui sont impliqués dans la détection de l'*H. pylori* restent obscurs, *in vitro* et *in vivo* ont démontré que la caspase 1 est activée dans les cellules

dendritiques après co-culture avec l'*H. pylori*, et que l'IL-18 et IL-1 $\beta$  sont produites et libérées dans la muqueuse gastrique infectée (Salama, et al., 2013).

Il n'y a aucune preuve suggérant que l'*H. pylori* évite activement l'inflammasome ou l'activation caspase 1. En fait, les souris dépourvues de caspase 1 peuvent désactiver une infection expérimentale à l'*H. felis* ou l'*H. pylori* plus efficacement que les animaux de type sauvage et avoir des réponses des lymphocytes T spécifiques et les lymphocytes T qui entraînent de l'immunopathologie aux pathogènes plus prononcés. L'explication de cette observation inattendue a été fournie par des souches de souris dépourvues soit de l'IL-18 ou de son récepteur, l'IL-18R : ces souris phénotypent les effets de la délétion du gène caspase 1 ; autrement dit, ils désactivent l'infection mieux que les souris de type sauvage en raison de l'amélioration des réponses des lymphocytes T, et en conséquence, ils développent une immunopathologie plus sévère. L'IL-18 est essentielle pour induire des cellules T régulatrices FOXP3 CD4 + CD25 + (cellules T<sub>reg</sub>) en réponse à l'*H. pylori* (Figure 15), qui à son tour limite l'activation excessive des cellules T effectrices et de promouvoir la persévérance. Il est intéressant de noter que, l'IL-1 $\beta$  (l'autre substrat de cytokines de la caspase 1) oppose apparemment à la fonction IL-18. IL-1R<sup>-/-</sup> chez les animaux dépourvus du récepteur de l'IL-1 $\beta$  ne parviennent pas à lancer des réponses spécifiques à l'*H. pylori* de type T<sub>H</sub>1 et T<sub>H</sub>17, et ne peuvent pas contrôler une infection expérimentale (même lorsqu'ils sont pré-vaccinés contre l'*H. pylori*) et en conséquence, sont protégés contre les formes les plus douces de l'immunopathologie associée à l'infection. Ces données corroborent un précédent rapport montrant que l'expression spécifique de l'IL-1 $\beta$  de l'estomac humaine est suffisante pour induire une inflammation gastrique et le cancer gastrique chez des souris transgéniques et ils expliquent aussi pourquoi les porteurs prédisposés des polymorphismes des promoteurs sont associés à des niveaux accrus à l'état de l'équilibre de l'IL-1 $\beta$  à un risque élevé de cancer de l'estomac. En outre, les effets de la délétion du gène IL-1R semblent être phénotypés par les souris infectées par l'*H. pylori* qui ne disposent pas des adaptateurs inflammasome ASC. En conclusion, la détection de l'*H. pylori* par NLR et l'activation subséquente des inflammasomes et en aval des voies de signalisation est essentielle pour le contrôle efficace de l'infection (dans le cas de signalisation de NOD1 et l'inflammasome médiée par la sécrétion de l'IL-1 $\beta$ ), et en même temps assure la restriction des réponses excessives des lymphocytes T et des dommages immunopathologiques aux tissus (par inflammasome médiée par la sécrétion de l'IL-18).



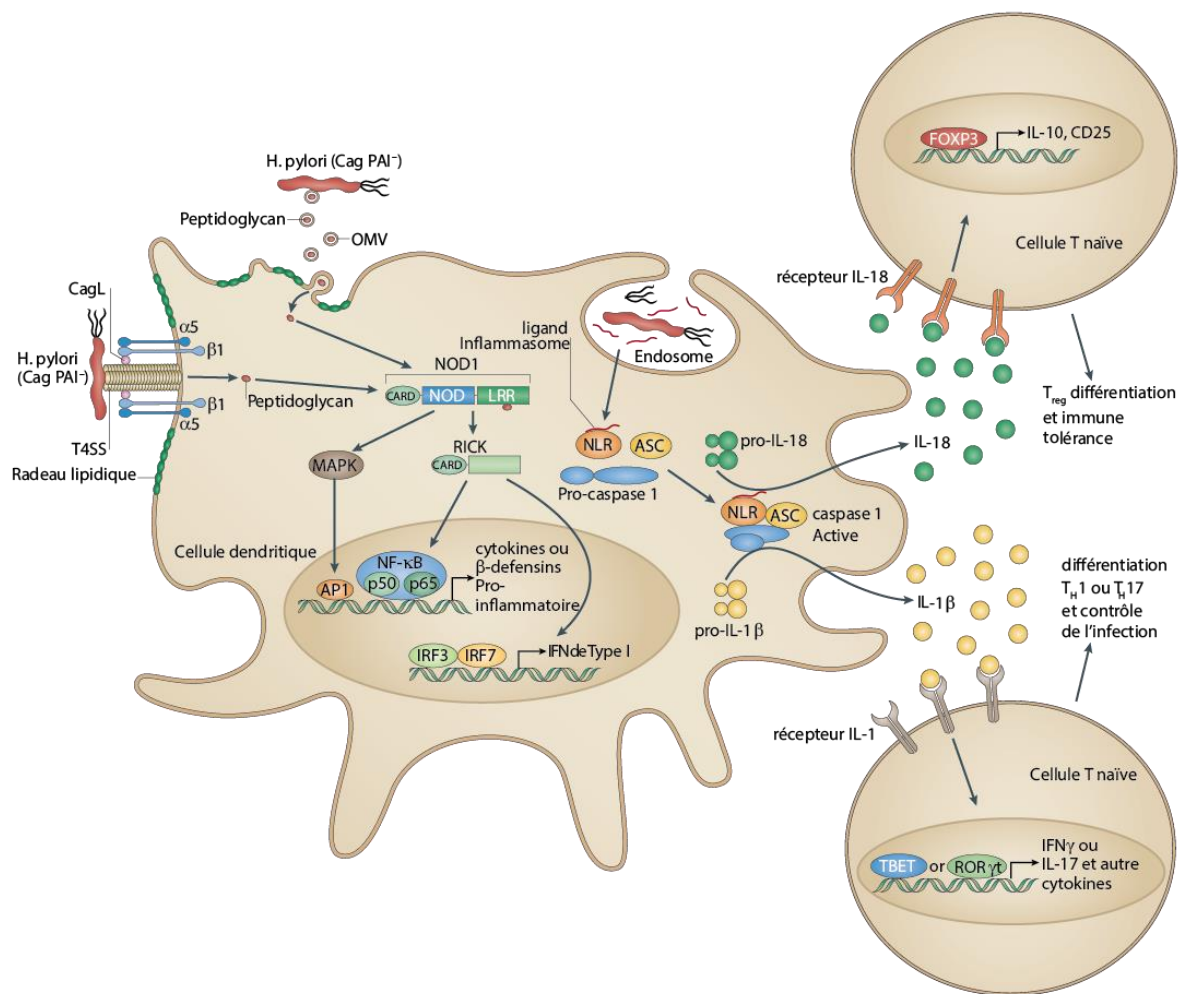


Figure 15 : Activation du NLR, la signalisation NF- $\kappa$ B et de la caspase 1 par l'*H. pylori*

Le peptidoglycane de *H. pylori* est délivré au récepteur NOD-like cytoplasmique (NLR) NOD1 (récepteur de reconnaissance de motifs moléculaires : nucleotide-binding oligomerization domain-containing 1) soit par le système de type IV de sécrétion (T4SS, par l'intermédiaire de son interaction avec l'intégrine  $\alpha 5 \beta 1$  par des radeaux lipidiques riches en cholestérol) ou grâce à des vésicules de membrane externe (OMVs). NOD1 induit l'activation qui dépend de AP1 et le facteur nucléaire- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) l'expression des cytokines pro-inflammatoires et des défensines et des interférons de type I (les interférons, l'IFN $\alpha$  et IFN $\beta$ ) qui dépend de l'expression de la IRF3 et IRF7. Un ligand NLR non identifié supplémentaire de l'*H. pylori* active l'inflammasome pour induire le clivage de pro-caspase 1 autoprotéolytique et la transformation ultérieure et la libération de l'interleukine-1 $\beta$  mature (IL-1 $\beta$ ) et l'IL-18. IL-18 se lie à son récepteur sur les cellules T naïves FOXP3 dépendant CD4 + CD25 + (Treg) et favorise la différenciation des cellules T régulatrices et de la tolérance immunitaire, qui à son tour empêche la clairance et assure la colonisation persistante de l'*H. pylori*. En revanche, la liaison de l'IL-1 $\beta$  à son récepteur induit le facteur de transcription T-box (Tbet)-liée ou rétinolide lié au récepteur orphelin  $\gamma$ t (ROR $\gamma$ t) dépendant des lymphocytes T auxiliaires 1 (TH1) et la différenciation TH17 et l'expression des cytokines de signatures respectives IFN- $\gamma$  et IL-17. À noter que la cellule immunitaire innée représentée est une cellule dendritique, alors que la signalisation NOD1 induite par du peptidoglycane a été démontrée dans des cellules épithéliales gastriques. ASC, protéine associée à l'apoptose contenant CARD de type speck (apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD) ; CARD, domaine d'activation et de recrutement de caspase (caspase activation and recruitment domain) ; LRR, domaine répété riche en leucine (leucine-rich repeat domain) ; MAPK, kinases actives par mitogène(mitogen-activated protein kinase) ; PAI, île de pathogénicité (pathogenicity island) ; RICK, récepteur interagissant sérine/thréonine kinase (receptor-interacting serine/threonine kinase). Modifiée d'après (Salama, et al., 2013).

### III.3.7. Modulation de l'effecteur de la réponse cellulaire T.

**La suppression de l'immunité médiée par T<sub>H</sub>1 et T<sub>H</sub>17.** Des études expérimentales d'infection ont mis en évidence les éléments des systèmes immunitaires innés et adaptatifs qui sont nécessaires pour le contrôle des infections à l'*H. pylori*, en particulier pour la génération d'une immunité protectrice induite par le vaccin. Alors que les lymphocytes B et les anticorps sont dispensable pour le contrôle de l'*H. pylori* (au moins pour la diminution de la non-stérilisation dans la colonisation par ordre de 1-2 de grandeur qui est considérée comme la norme de référence dans le champ de vaccinologie de l'*H. pylori*), il est maintenant clair que les cellules T effectrices CD4<sup>+</sup> (à ne pas confondre avec les cellules T<sub>reg</sub> CD4<sup>+</sup> mentionnées ci-dessus), et en particulier des sous-ensembles cellulaires effecteurs T, T<sub>H</sub>1 et T<sub>H</sub>17-polarisés et leurs cytokines de signature, sont cruciales pour le contrôle de cette infection. Les mêmes sous-types de cellules T ont été impliqués dans la promotion des changements immunopathologiques de la muqueuse gastrique chronique infectée, qui se manifestent histologiquement par des gastrites atrophiques, hyperplasie épithéliale compensatoire et métaplasie intestinale chez les animaux infectés expérimentalement et des porteurs humains symptomatiques (Salama, et al., 2013).

Deux facteurs de virulence ont été spécifiquement impliqués dans la manipulation et l'inhibition des cellules T humaines (Figure 16). VacA inhibe la prolifération des cellules T en interférant avec la voie de signalisation du récepteur de l'IL-2 des cellules T au niveau de phosphatase calcineurine Ca<sup>2+</sup>/calmoduline-dépendante. VacA empêche la translocation nucléaire du facteur de transcription des lymphocytes T NFAT et sa transactivation ultérieure des gènes de réponse T spécifiques des cellules immunitaires (Figure 16). D'autres études depuis l'identification de l'intégrine β2 (CD18) en tant que récepteur de VacA sur les lymphocytes T humains ; l'intégrine β2 associés à CD11a sur les lymphocytes T pour former le récepteur transmembranaire hétérodimérique LFA1 (l'antigène 1 associé à la fonction de lymphocytes, *lymphocyte function-associated antigen 1*). L'*H. pylori* exploite le recyclage des LFA1 pour faciliter l'absorption de VacA d'une manière qui dépend de la phosphorylation sérine / thréonine médiée par la protéine kinase C de la queue cytoplasmique de l'intégrine β2. D'autre facteurs de virulence de l'*H. pylori* impliquée dans l'inhibition des lymphocytes T sont le GGT. Semblable à VacA, GGT est un facteur sécrété qui bloque la prolifération des lymphocytes T par un mécanisme qui implique l'inhibition de l'activité de la kinase cycline-dépendante de la phase G1 du cycle cellulaire par la perturbation de voie de signalisation RAS (Figure 16).

**Biaisant des réponses des lymphocytes T.** À la fois VacA et GGT affectent également l'activité des cellules T d'une manière indirecte par la promotion de la différenciation préférentielle des cellules T naïves en cellules T<sub>reg</sub>. La différenciation des cellules T<sub>reg</sub> en réponse à une infection à l'*H. pylori* nécessite l'interaction directe des cellules T naïves avec des cellules dendritiques « tolérogènes » qui ont été exposées à l'*H. pylori*, que ce soit dans la muqueuse gastrique ou dans les ganglions lymphatiques drainant l'estomac (gastrique ou mésentériques). Les cellules dendritiques qui ont été exposées à l'*H. pylori* ne parviennent pas à induire des réponses de lymphocytes T effecteurs de type T<sub>H1</sub> et T<sub>H17</sub> in vitro et in vivo ; à la place, de telles cellules dendritiques induisent préférentiellement l'expression chez les cellules T<sub>reg</sub> spécifique, le facteur de transcription FOXP3, le marqueur de surface CD25 et la cytokine anti-inflammatoire IL-10 dans des cellules T naïves (Figure 16). De telles cellules T<sub>reg</sub> induites périphériquement, affectent profondément le contrôle de l'*H. pylori*, comme indiqué chez les patients chroniquement infectés et par des expériences animales dans lesquelles les cellules T<sub>reg</sub> sont systématiquement épuisées dans des hôtes infectés. Les cellules T<sub>reg</sub> accumulent dans la muqueuse gastrique humaine infectée par l'*H. pylori*, en particulier chez les enfants et chez les porteurs asymptomatiques, et suppriment efficacement la réponse des lymphocytes T mémoire spécifiques à l'*H. pylori* (Salama, et al., 2013).

La déplétion expérimentale de cellules T<sub>reg</sub> facilite la clairance chez les animaux infectés par l'*H. pylori* et améliore l'immunité protectrice chez les souris vaccinées induite par le vaccin. La persistance T<sub>reg</sub> facilitée par l'*H. pylori* nécessite une expression de l'IL-10 spécifique des cellules T ; en effet, les souris IL-10<sup>-/-</sup> et les souches dépourvues de l'expression de l'IL-10 dans le compartiment des cellules T CD4<sup>+</sup> sont capables de contrôler les infections expérimentales spontanément. Le contrôle efficace ou même la clairance à l'*H. pylori* chez les animaux vient toujours au prix de l'immunopathologie gastrique améliorée (gastrite et les changements épithéliaux tels que l'atrophie et la métaplasie intestinale). Fait intéressant, une observation analogue a été rapportée pour les porteurs humains, qui soit accumulent un grand nombre de productions d'IL-10 par les cellules T<sub>reg</sub> spécifiques à l'*H. pylori* et qui sont colonisées massivement (porteurs asymptomatiques), soit le développent des ulcères gastriques vu que leur réponse cellulaire T<sub>reg</sub> est inadéquate. L'induction de la tolérance des cellules dendritiques spécifiques à l'*H. pylori*, ce qui semble être une condition préalable au désalignement des réponses des lymphocytes T (au moins dans les modèles expérimentaux), nécessite à la fois l'activité de VacA et GGT (Figure 16). Bien que le mécanisme exact de la

tolérance des cellules dendritiques spécifiques VacA et GGT reste incertain, la fonction assignée des deux facteurs dans l'induction de cellules T<sub>reg</sub> et de la persistance est compatible avec les rapports précédents montrant que les mutants de délétion de gène manquant *vac A* ou GGT ont des défauts de colonisation par rapport à leur parentale des isolats de type sauvage VacA- ou GGT-compétent.

### III.3.8. Conséquences systémiques de l'immunosuppression

L'inhibition active et la manipulation de la réponse immunitaire des cellules T adaptatives conduites par l'*H. pylori* ont diverses conséquences pour l'hôte. Les mécanismes de persistance de l'*H. pylori* sont assez dominants pour remplacer les effets protecteurs conférés par la vaccination spécifique à l'*H. pylori* ; une infection d'épreuve ne peut être effacée (ou au moins fortement réduite) par des souris vaccinées si les cellules T<sub>reg</sub> ou les cellules dendritiques sont épuisées. Ces observations expliquent en partie les difficultés et les obstacles rencontrés dans le développement de vaccins contre l'*H. pylori*. Un effet secondaire intéressant de l'immunomodulation spécifique à l'*H. pylori* et la manipulation est évident dans les sociétés occidentales à partir de laquelle l'*H. pylori* disparaît progressivement en raison de taux de transmission réduits. L'utilisation fréquente d'antibiotiques dans l'enfance et l'amélioration générale des conditions d'assainissement. Dans ces populations, l'incidence de l'asthme allergique, d'autres manifestations de la maladie allergique et des maladies inflammatoires chroniques est en constante augmentation. Une association inverse avec la colonisation de l'*H. pylori* a été démontrée pour l'asthme allergique et des maladies inflammatoires de l'intestin. Bien que les mécanismes exacts qui sous-tendent cette association inverse restent à élucider, l'idée que la régulation immunitaire induite par l'*H. pylori* et la manipulation sont causalement liées à la protection de ces troubles immunitaires est convaincante. Le fait que les cellules T<sub>reg</sub> qui ont été isolées à partir de souris infectées par l'*H. pylori* sont suffisantes pour protéger les receveurs naïfs contre l'asthme induit par l'allergène dans les modèles de transfert adoptif argumente en faveur d'une protection croisée T<sub>reg</sub> médiée contre les réponses immunitaires spécifiques de l'allergène (Salama, et al., 2013).

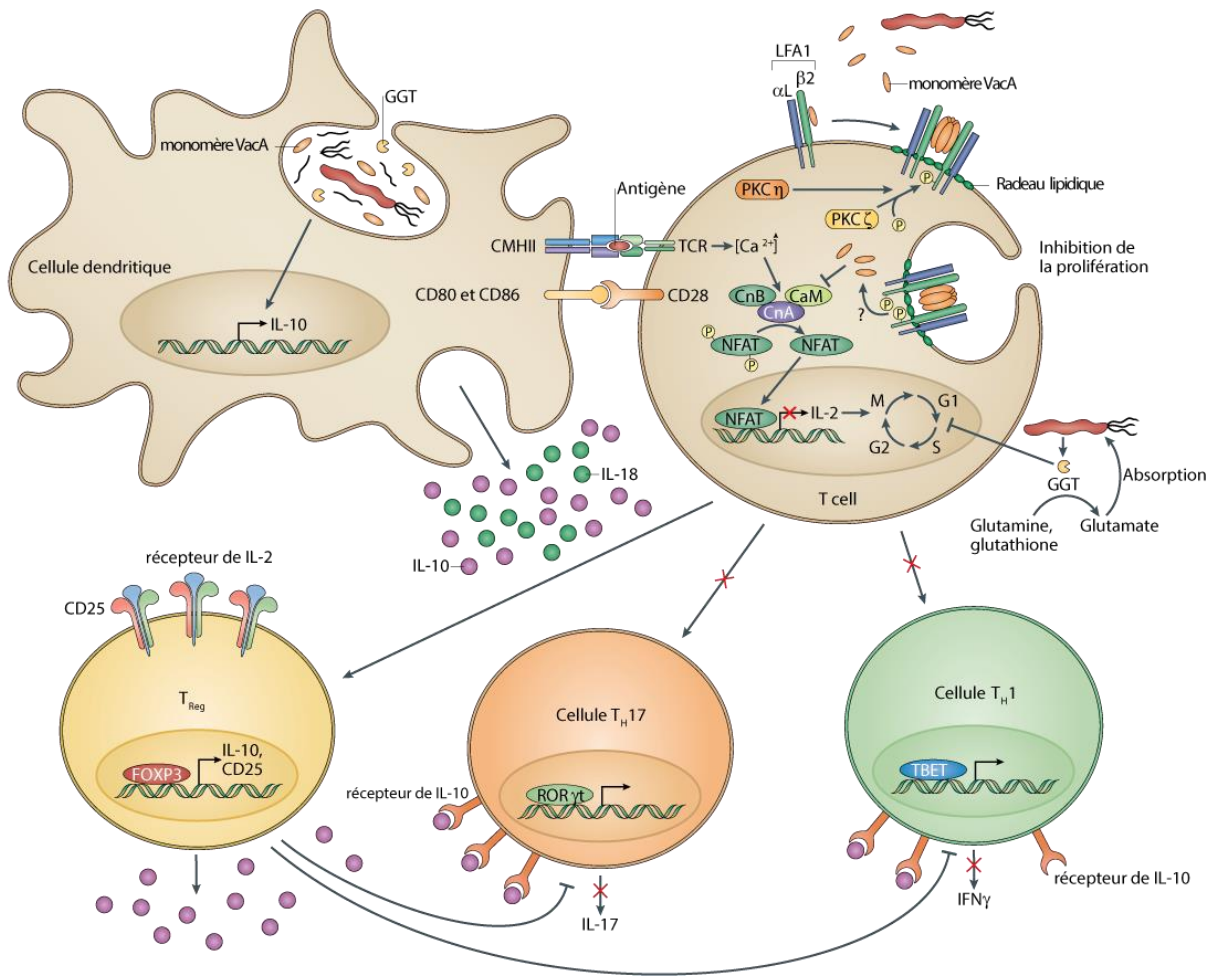


Figure 16 : l'H. pylori, altère l'immunité à médiation cellulaire T par des mécanismes directs et indirects

Toutes les souches de l'H. pylori expriment les facteurs de virulence sécrétés cytotoxine vacuolisante (VacA) et GGT pour inhiber directement l'activation des cellules T effectrices et les fonctions la prolifération. VacA Hexamérique se lie à la sous-unité de l'intégrine  $\beta 2$  de l'antigène I associée la fonction hétérodimère du récepteur transmembranaire des lymphocytes (LFA1) ; le complexe récepteur est internalisé suivant la médiation de la protéine kinase C (PKC) à la phosphorylation serine/thréonine (P) de la queue cytoplasmique de l'intégrine  $\beta 2$ . VacA cytoplasmique empêche la translocation nucléaire de NFAT en inhibant sa déphosphorylation par le  $Ca^{2+}$ /calmoduline-dépendante phosphatase calcineurine et bloque ainsi la production de l'interleukine-2 (IL-2) et l'activation et la prolifération subséquente des lymphocytes T. GGT arrête les cellules T dans la phase G1 du cycle cellulaire, ce qui empêche leur prolifération. Les deux VacA et également GGT empêcher indirectement l'immunité des cellules T en reprogrammant des cellules dendritiques (CD); les cellules dendritiques exposées à VacA et GGT produisent de l'IL-10 et induisent de la différenciation des lymphocytes T FOXP3- dépendant et contacts-dépendant synaptiques des cellules dendritiques comprennent le complexe majeur d'histocompatibilité classe II (CMH II) se liant au récepteur des lymphocytes T (TCR) et la liaison des molécules co-stimulatrices CD80 et CD86 à CD28. IL-10 dérivée des cellules dendritiques et/ou des lymphocytes  $T_{reg}$  supprime en outre les fonctions effectrices de  $T_H1$  et  $T_H17$ . Notez que les effets directs de VacA sur les lymphocytes T semblent être spécifiques à l'homme, alors que les effets indirects de VacA et GGT sur les cellules T par les cellules dendritiques ont seulement été démontrés chez le système murin. CaM, calmodulin M ; CnB, calcineurine B ; GGT,  $\gamma$ -glutamyl-transpeptidase ; ROR $\gamma t$ , retinoid-related orphan receptor  $\gamma t$  ; TBET, T-box transcription factors. Modifiée d'après (Salama, et al., 2013).

# Partie Expérimentale

# **I. Matériels et** **Méthodes**



## I.1. Les sujets d'étude

Cette étude a été réalisée en collaboration entre le département de biologie de la faculté des sciences de la nature et de la vie de l'université Djillali Liabes de Sidi Bel-Abbes, Service de gastro-entérologie du C.H-U de Sidi Bel-Abbes, Service d'oncologie d'E.P.H de Sidi Bel-Abbes, Service d'anatomopathologie de C.H-U de Sidi Bel-Abbes et le Centre anti-Cancer d'Oran. L'étude cas-témoins a été évaluée dans la période entre octobre 2014 et novembre 2015. L'étude a été menée pour l'évaluation de la carcinogenèse de la muqueuse gastrique infectée par l'*Helicobacter pylori*, chez une population atteinte de :

- Gastrite chronique atrophique (GA) (n = 39),
- Carcinome gastrique distal de type intestinal (CG) (n = 40).

Des volontaires sains ont été recrutés en tant que cas-témoins (TS) (n = 32).

Les deux groupes d'échantillons ont été recueillis dans l'Ouest Algérien à partir de deux unités d'oncologie médicale et une unité de gastro-entérologie. :

- Service de gastro-entérologie du C.H-U. de Sidi Bel-Abbes,
- Service d'oncologie à l'E.P.H de Sidi Bel-Abbes,
- Centre Anti-Cancer (C.A-C) de Mesreghine à Oran.

Le groupe des témoins sains a été inscrit dans notre étude randomisée, en double aveugle (sexe et âge) par des volontaires sains.

Les échantillons des patients dans notre étude ont été confirmés au niveau du service d'anatomopathologie de C.H-U. de Sidi Bel-Abbes. Les patients admissibles et les contrôles sains ont été interrogés sur l'instruction, le groupe sanguin, rhésus, habitude alimentaire, le tabagisme et la consommation d'alcool selon une fiche conçue pour cette étude (voir annexe 1), après consentement éclairé. Les trois groupes ont été inclus par leur résidence dans l'ouest de l'Algérie.

Les données concernant l'âge des patientes, la date de naissance, le sexe, l'anamnèse, la taille de la tumeur, le stade d'évolution tumorale, l'extension de la tumeur et la localisation secondaire, ont été recueillies après consultation des rapports anatomopathologiques, des dossiers des Registres du Cancer du Centre et après la relecture des dossiers cliniques des patients. Ces dossiers cliniques et ces rapports anatomo-pathologiques ont été également revus afin de recueillir les données concernant la survie des patientes à savoir la date

du diagnostic, la durée de survie globale et survie sans rechute. La survie globale étant définie par l'intervalle de temps entre le diagnostic initial et la date de la dernière consultation ou la date du décès. La survie sans rechute est définie par l'intervalle de temps entre le diagnostic initial et la date de l'apparition d'une récurrence locorégionale ou d'une métastase à distance. Ces données n'ont été accessibles que pour les 40 patients CG de notre série.

### I.1.1. Critère d'inclusion

Avant l'abordée notre l'étude, la vérification de la présence de l'*H. pylori* chez les deux groupes des patients (CG et GA) a été effectuée comme critère d'inclusion.

Un seul critère a été exigé dans notre étude pour le groupe des patients CG, en occurrence, la constatation d'un carcinome gastrique distal de type intestinal.

### I.1.2. Critère d'exclusion

L'absence de l'histoire de l'infection à l'*H. pylori* et l'absence d'antécédent personnel et familial du cancer dans le groupe des témoins ont été vérifiées.

Les données ont été vérifiées au cours des entrevues et reportées sur des fiches conçues pour chaque établissement ainsi que la présence de l'*H. pylori* a été identifiée en histopathologie, par la sérologie et/ou la biologie moléculaire.

## I.2. Identification de l'infection à l'*H. pylori*

L'infection à *H. pylori* a été vérifiée par trois examens.

### I.2.1. Identification histopathologie de l'*H. pylori*

Les biopsies prises au cours de l'endoscopie de diagnostique (au moins quatre biopsies de la muqueuse gastrique corps et antre devaient être disponibles pour chaque cas) au service de gastro-entérologie ont été examinées histopathologiquement au service d'anatomopathologie. Les coupes de tissus correspondants ont été colorées en hématoxyline et éosine (H.E.) pour procéder à la lecture des lames (voir annexe 2). La présence de l'*H. pylori* a été détectée morphologiquement sur les coupes histologiques.

### I.2.2. Identification de l'*H. pylori* par sérologie

La détection des anticorps anti-*H. pylori* de type IgG dans le sérum humain a été réalisée par *H. pylori* Test Kit (CYPRESS DIAGNOSTICS) par la méthode d'immunochromatographique permettant un dépistage quasi immédiat (voir annexe 3). Cependant, elle reste toutefois positive de nombreux mois après l'éradication de l'*H. pylori*.

Utiliser le sérum ou le plasma à partir du sang total prélevé de façon aseptique par ponction veineuse dans un tube propre. La récolte du sang se fait, soit dans un tube sec (sans anticoagulant), en laissant le sang, se coagule à une température ambiante en environ 30 minutes et séparer le sérum par centrifugation. Soit dans un tube avec des anticoagulants (l'héparine, l'EDTA ou le citrate de sodium) et en sépare le plasma par centrifugation.

Retirer soigneusement le sérum pour le test, ou conserver à 4-8 °C au maximum deux semaines. Le sérum peut également être congelé à -20 °C jusqu'à 1 an.

- a. Mettre le dispositif d'analyse, le tampon révélateur et les échantillons (le sérum ou le plasma) à la température ambiante avant d'ouvrir la pochette pour éviter la condensation de l'humidité sur la membrane. Retirer le dispositif de test de sa pochette en aluminium lorsqu'il est prêt à effectuer le test.
- b. Marquer l'unité de test avec le numéro d'identification.
- c. Ajouter l'échantillon (le sérum ou le plasma) sur le puits d'échantillon avec la pipette de transfert fourni : 1 goutte (environ 20 µl). Maintenir la pipette de transfert dans une position verticale lors de l'ajout de l'échantillon au puits.
- d. Immédiatement, ajouter 2 ou 3 gouttes de tampon révélateur.
- e. Après l'addition du tampon révélateur, attendre que les lignes rouges apparaissent. En fonction de la concentration en anticorps de type IgG présents, les résultats positifs peuvent apparaître dès la première minute. Cependant, pour confirmer un résultat négatif, la durée totale de la réaction est de 5 minutes. Ne pas interpréter des résultats après 8 minutes.

### I.2.3. Identification par la Biologie moléculaire

L'ADN total de l'*H. pylori* a été extrait à partir de 5-10 mg de biopsie gastrique fraîche ou frottis buccal dans un milieu de transport pour l'*H. pylori* à l'aide d'un kit d'extraction MagaZorbe® genomic DNA (Promega) conservé à -20 °C.

La présence de l'ADN de l'*H. pylori* dans les biopsies gastriques ainsi que les frottis buccaux ont été mesurés selon la même méthode décrite dans l'analyse des polymorphismes de l'ADN de l'hôte. L'ADN bactérien a été analysé par PCR par la détection et l'amplification du gène *ureC* en utilisant des amorces, comme décrite par Lage et coll. (Lage, et al., 1995)

Sens : 5' — AAGCTTTTAGGGGTGTTAGGGGTTT-3' et

Anti-sens : 5' — AAGCTTACTTTCTAACACTAACGC-3'

À une température d'hybridation de 55 ° C. l'ADN a été utilisé dans un volume de 25 µl avec les mêmes critères du mix PCR décrit ci-dessus. Les fragments amplifiés ont été visualisés par du Gerdt Nucleic Acid Gel Stain, 10 000 X (Biotium) à 2 % de gels d'agarose sous un transilluminateur UV à 300 nm. L'échantillon a été considéré comme *H. pylori*-positive quand un fragment *ureC* de 294 pb est visualisé.

### I.2.3 Les facteurs de virulence de l'*H. pylori*

- Pour les échantillons *H. pylori*-positif, détecté après amplification de l'*ureC*, nous avons procédé à la détection des allèles *vac A*, *cag A*, *cag E*, *vir B11* et les gènes *fla A* en utilisant les jeux d'amorces indiquées dans le Tableau 1

Tableau 1. Les Mix PCR pour l'amplification des gènes *cag E*, *fla A* et *vir B11*, ont été réalisés dans un volume de 25 µl selon les instructions du fabricant (Promega, Madison, Wisconsin., États-Unis), 0,3 µM (*vir B11*), 0,3 µM (*cag E*) et 0,3 µM (*fla A*) de chaque amorce et 50 ng d'échantillon d'ADN.

Les gènes de l'*ureC*, *cag A*, *vac A s1/s2*, *vac A m1* ont été amplifiés dans un volume de 25 µl contenant :

- 50 ng d'ADN,
- 200 mM de chaque dNTP (Promega),
- 0,4 µM de chaque amorce (*ureC*, *cag A s1/s2*, *vac A m1* de *vac A*) (Eurogentec),
- 0,3 µM de chaque amorce (*vac A m2*) (Eurogentec).
- 1 U d'ADN polymérase GoTaq® G2 Hot Start Polymerase (Promega),
- 5 % de DMSO (diméthyle sulfoxyde, 472301 SIGMA-ALDRICH®),
- 4 mM de MgCl<sub>2</sub> (Promega),
- 5 µl de 5x du tampon de PCR GoTaq (Promega).

Les gènes *vac A*, *cag A*, *cag E*, *vir B11* et *fla A* ont été considérés comme positifs quand un fragment spécifique a été détecté (Tableau 2). Une eau déionisée dépourvue de DNase a été utilisée comme contrôle négatif. La préservation de l'ADN a également été confirmée par amplification de différents gènes dans d'autres approches à l'étude dans notre laboratoire. Des échantillons aléatoires ont été réanalysés pour confirmer les résultats.

### I.3. Analyse des polymorphismes de l'interleukine-1

La famille du gène IL-1 sur le chromosome 2q comprend les 3 gènes liés IL-1A, IL-1B, et IL-1RN, qui codent pour l'IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , et leur antagoniste du récepteur endogène (IL-1RA), respectivement (El-Omar, et al., 2000). Les échanges de bases nucléotidique aux positions -31 et -511 du promoteur de l'IL-1B, ont été associés à une augmentation de la liaison des facteurs nucléaires et la sécrétion élevée de l'IL-1 $\beta$  (El-Omar, et al., 2000; Rad, et al., 2003). Le gène IL-1RN contenant des répétitions penta-alléliques de 86 pb en tandem dans l'intron 2, dont l'allèle 2 (IL-1RN \* 2) a été aussi associé avec une production accrue d'IL-1 $\beta$  in vivo et in vitro (El-Omar, et al., 2000).

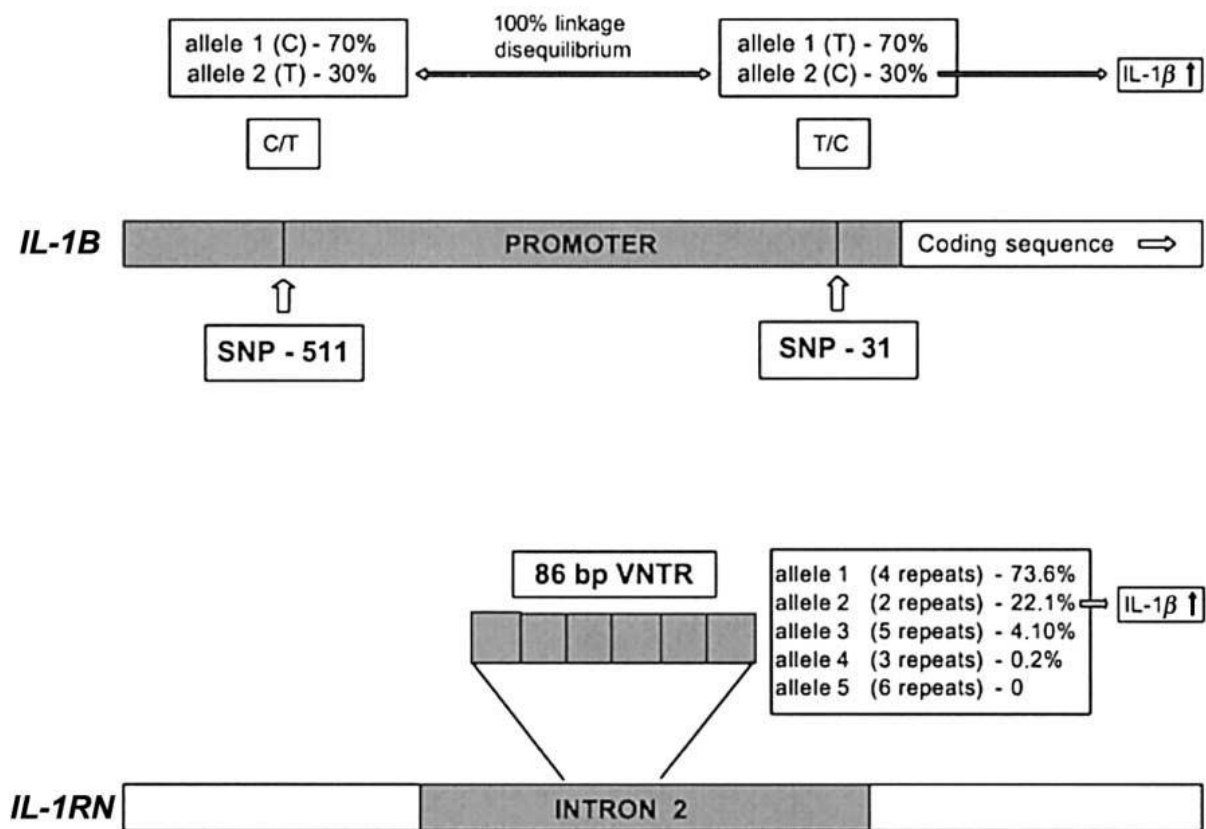


Figure 17 : Illustration schématique des polymorphismes dans les gènes IL-1 $\beta$  et IL-1RN. Les fréquences alléliques des polymorphismes de nucléotides simples (SNP) dans la région de promoteur du gène IL-1 $\beta$  au niveau des positions -511 et -31 sont représentées. SNP 511 T (associé à une sécrétion élevée de l'interleukine IL-1 $\beta$ ) était en déséquilibre de liaison complet avec -31 C. Le gène IL-1RN est une répétition penta-allélique en tandem dans l'intron 2 de 86 pb, dont l'allèle 2 (IL-1RA \* 2) a été précédemment associé à une production accrue d'IL-1 $\beta$  (El-Omar, et al., 2000).

L'ADN a été extrait à partir de 200  $\mu$ l du sang total, 5-10 mg de biopsie gastrique fraîche ou frottis buccal à l'aide d'un kit d'extraction MagaZorbe® genomic DNA (Promega) conservé à -20 °C selon les étapes suivantes :

### I.3.1. Extraction de l'ADN d'un tissu frais ou congelé, frottis buccal ou du sang total

Le choix de Kit MagaZorb® DNA Mini-Prep fournit une méthode simple, rapide et rentable pour isoler l'ADN d'une qualité PCR. L'utilisation d'un protocole simple, un rendement élevé d'ADN purifié et qui peut être isolé à partir d'une variété de sources, y compris de nos échantillons le sang total (frais ou congelé, sans traitement ou traitée au citrate de sodium, l'héparine ou EDTA), des tissus (frais, congelés ou fixés au formol et inclus en paraffine), salives, et frottis buccaux.

L'extraction est basée sur l'interaction spécifique entre les acides nucléiques et des particules de propriété magnétisables en présence de réactifs tampons spécialement formulés. Cette technologie simple est conçue de telle sorte que la liaison des acides nucléiques ne dépend pas des agents chaotropiques.

L'ADN dans l'échantillon est libéré à l'aide de la protéinase K (PK) et un tampon de lyse. L'ADN libéré a été lié exclusivement et spécifiquement au réactif MagaZorb® en présence d'un tampon de liaison. L'ADN lié à des particules MagaZorb® a été capturé par un aimant, et les contaminants sont éliminés par lavage avec un tampon de lavage unique. L'ADN est ensuite élué à partir des particules avec un tampon d'éluion ou de l'eau de qualité moléculaire (Figure 18).

#### I.3.1.1. Lyse

Avant de commencer l'étape de lyse :

- Vérifier que tous les tampons ne contiennent pas des précipités.
  - Immédiatement avant d'ajouter la solution PK, mélanger délicatement en pivotant à la main.
  - Immédiatement avant d'ajouter le tampon de lyse, mélanger délicatement en pivotant à la main. Éviter de générer des bulles ou de la mousse. Si un précipité est présent, réchauffer le tampon à 56 °C pendant 5 à 10 minutes ou jusqu'à ce qu'une solution claire soit obtenue.
  - Gardez l'échantillon de tissu sur la glace en tout temps durant les étapes 1 et 2.
1. Ajouter 5-10 mg de tissu (biopsie) ou frottis buccal ou 200 µl de sang total à un tube à centrifuger propre de 2 ml

2. Homogénéiser le tissu dans 200 µl de tampon TE (10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA [pH 8.0]) en utilisant un broyeur de tissus. Une suspension uniforme doit être obtenue dans les 5-10 minutes.
3. Ajouter 20 µl de la solution PK et bien mélanger dans le tube, au centre très bas. Éviter de toucher les côtés du tube pendant le pipetage.
4. Mélanger doucement par rotations manuelles. Prenez soin de ne pas permettre à la solution de l'échantillon/PK d'être pris dans le bouchon du tube.
5. Ajouter 20 µl de 20 mg/ml du RNase A de la solution mère au tube pour dégradé l'ARN. Fermer le bouchon du tube et mélangé doucement par impulsion au vortex pendant 15 secondes. Incubé à température ambiante pendant 5 minutes.
6. Ajouter 200 µl de tampon de lyse clair parfaitement agités, au tube.
7. Bien mélanger par agitation au vortex par impulsions jusqu'à ce qu'un mélange homogène soit obtenu, généralement de 15 secondes.
8. Incubé dans un bain-marie d'eau à 56 C ° pendant 10 minutes.
9. Enlever le tube du bain-marie et sécher l'extérieur du tube avec un papier serviette.

### I.3.1.2. Fixation

Avant de commencer les étapes de la fixation :

- Immédiatement, avant d'ajouter le tampon de fixation, mélanger le tampon par inversion ou par impulsion vortex.
- Immédiatement, avant d'ajouter le MagaZorb® réactif, mélanger le réactif au vortex ou tourbillon de main vigoureuse jusqu'à ce que les particules soient en suspension. Le MagaZorb® réactif doit être mélangé entre chaque addition.

10. Ajouter 500 µl du tampon de fixation bien mélangé à l'échantillon.
11. Bien mélanger par agitation au vortex par impulsions jusqu'à ce qu'un mélange homogène soit obtenu, généralement de 15 secondes. Appuyez doucement le tube pour libérer toute solution prise dans le bouchon.
12. Ajouter 20 µl de réactif MagaZorb® parfaitement agité directement dans la solution.
13. Mélanger par impulsion douce-vortex, généralement 15 secondes.
14. Incuber à température ambiante pendant 10 minutes tout en mélangeant manuellement toutes les 2 minutes.



15. Sédimenter les particules MagaZorb®, en utilisant un support magnétique. Les particules sédimentent habituellement dans les 60 à 90 secondes. Tout en maintenant les tubes sur l'aimant, inverser 2-3 fois pour rincer le bouchon, avec le surnageant.
16. Éliminez-le surnageant par aspiration. Le tube doit être étroitement appliqué contre l'aimant lors de l'aspiration pour que les particules magnétiques dans le tube soient fortement attachées à l'aimant. Retirez autant de liquide que possible, y compris tout liquide emprisonné dans le bouchon du tube, en prenant soin de ne pas retirer toutes les particules.

#### I.3.1.3. Lavage

Avant de commencer l'étape de lavage, mélanger le tampon de lavage par inversion ou tourbillonnement.

17. Ajouter 1 ml de tampon de lavage parfaitement agité au tube.
18. Retirer le tube de l'aimant et bien mélanger en inversant le tube plusieurs fois pour assurer que les particules sont complètement dispersées.
19. Sédimenter les particules sur la grille magnétique.
20. Éliminez-le surnageant par aspiration.
21. Répétez les étapes de lavage. Le surnageant doit être très clair après le second lavage. Veillez à retirer tout le liquide par aspiration après le second lavage, y compris tout liquide emprisonné dans le bouchon du tube. Prenez soin de ne pas enlever toutes les particules. Le tube doit être sec, avec seulement les particules sédimentées MagaZorb® fermement au fond du tube.

#### I.3.1.4. L'élution

Avant de commencer l'étape d'élution :

- Juste avant d'ajouter le tampon d'élution, mélanger le tampon en inversant ou impulsion vortex.

22. Ajouter 200 µl, du tampon d'élution bien mélangé sur le tube.
23. Mélanger doucement par retournement et tourbillonnant, après le retrait de l'aimant.
24. Incuber le tube pendant 10 minutes à température ambiante avec agitation manuelle toutes les 2 minutes.

25. Sédimenter les particules sur la grille magnétique.
26. Soigneusement, transférez-le surnageant dans un tube propre. Éviter de recueillir des particules pendant le transfert. Le surnageant transféré contient de l'ADN purifié.

L'ADN isolé est prêt pour une analyse ultérieure. Si l'échantillon ne va pas être testé le même jour, le stocker à -20 °C jusqu'au moment de l'analyse.

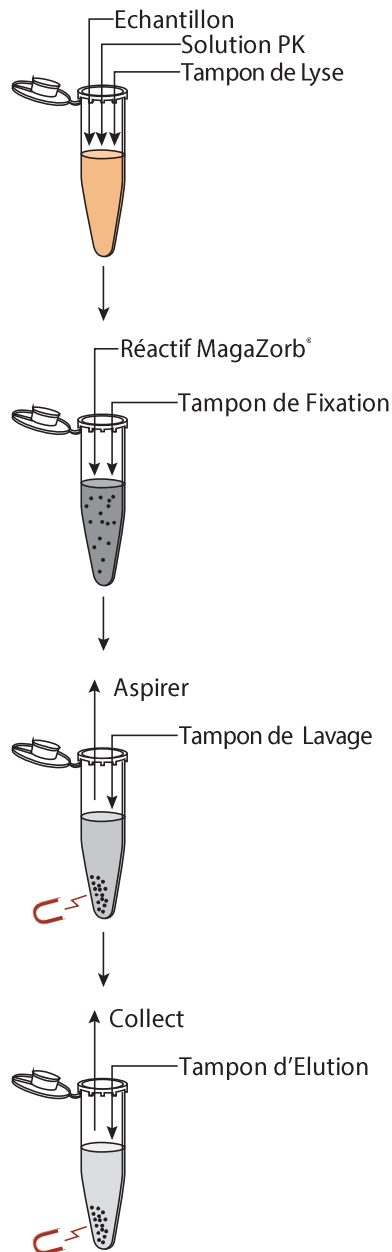


Figure 18 : Protocole simplifier du Kit MagaZorb® selon le fournisseur (Promega)

Le génotypage pour les trois polymorphismes par PCR de longueur des fragments de restriction (PCR-RFLP) a été décrit précédemment (El-Omar, et al., 2000) (Ruzzo, et al., 2005) et est présenté dans le Tableau 1.

### I.3.2. La technique d'amplification de l'ADN par la réaction de polymérisation en chaîne

PCR pour (*polymerase chain reaction*) permet d'amplifier, selon un mode exponentiel, un fragment d'ADN double brin. L'ADN est synthétisé par la polymérase de la bactérie thermophile *Thermus aquaticus* (Taq polymérase) par extension à partir de deux amorces oligonucléotidiques, capables de s'hybrider de part et d'autre de la séquence cible à amplifier, l'une avec le brin sens et l'autre avec le brin anti-sens. La taille des oligonucléotides utilisés comme amorces est généralement comprise entre 18 et 25 bases. La température utilisée pour l'hybridation des amorces sur la matrice de l'ADN est égale à la température de dissociation des brins complémentaires diminuée de 5 °C. La température de dissociation est la température à laquelle 50 % des molécules d'ADN sont dénaturées par rupture des liaisons hydrogène entre les deux brins.

La réaction commence par une étape de dénaturation à température élevée (95 °C) pendant 3 minutes de l'ADN double-brin en simples brins qui serviront de matrice pour la procédure d'amplification. Après cette première étape de dénaturation de la matrice d'ADN, 40 cycles d'amplifications ont été effectués, comportant chacun une étape de dénaturation à 95 °C pendant 30 secondes, une étape d'hybridation des amorces (des oligonucléotides enjambant la séquence à amplifier, chacune complémentaire d'un des deux brins d'ADN). Les amorces s'hybrident avec l'ADN matrice à une température qui dépend de la séquence de ces oligonucléotides à une température  $T_m$  (voir Tableau 1 et Tableau 2) pendant environ 30 secondes. Synthétisées artificiellement, ces amorces confèrent à la réaction sa spécificité. La troisième étape est une étape d'élongation de l'ADN à 72 °C pendant environ 30 secondes selon la taille du fragment à amplifier. Après les 40 cycles d'amplification, la réaction se termine par une étape d'élongation finale à 72 °C pendant 5 minutes permettant d'achever l'élongation de tous les brins d'ADN néo-synthétisés. Il en résulte à la fin de l'amplification un dédoublement par un facteur de  $2^n$  de la quantité de l'ADN cible.

Ces cycles thermiques ont été réalisés à l'aide d'un thermocycleur iCycler™ Thermal cycler (BIO-RAD, USA) qui permet de programmer les différentes températures, la durée de chaque étape et le nombre de cycles (n) selon les conditions décrites pour chaque

analyse (Tableau 1 et Tableau 2). Pour chaque série de cas testé, il est nécessaire de réaliser en parallèle un témoin négatif ne contenant pas d'ADN matrice, afin de vérifier l'absence de contamination éventuelle des réactifs utilisés. Un témoin positif est également testé parallèlement avec chaque série de cas.

À la fin de la série des cycles thermiques, un aliquote du produit amplifié est chargé sur un gel d'agarose et soumis à une électrophorèse. Une réaction positive se traduit par la présence d'une bande colorée de l'ADN par le GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain, 10 000 X (Biotium) dont la taille est estimée grâce à un marqueur de poids moléculaire ayant migré simultanément.

#### I.3.2.1. Préparation du Mix PCR

Le milieu réactionnel de la PCR (Mix PCR) contient pour chaque tube de réaction de chaque échantillon dans un volume final de 25 µl :

- 25-50 ng d'ADN,
- 150 mM de chaque dNTP (dATP, dCTP, dTTP et dGTP) (Promega),
- 6,25 pmol chaque amorce oligonucléotidique (Eurogentec),
- 1 Unité de Taq d'ADN polymérase GoTaq® G2 Hot Start Polymerase (Promega), (annexe 4)
- 5 % de DMSO (SIGMA),
- 4 mM de MgCl<sub>2</sub> (Promega),
- 5 µl de 5x du tampon de PCR GoTaq (Promega).

Chaque réaction est réalisée dans un microtube à PCR de 200 µl.

Pour l'étude des polymorphismes au niveau de l'IL-1β-31 et IL-1β-511 nous avons réalisé deux protocoles de PCR-RFLP (en : *Restriction Fragment Length Polymorphism*) analogue avec une différence de la température d'hybridation (T<sub>m</sub>) pour chaque jeu d'amorces suivi par une digestion par enzyme de restriction correspondant au polymorphisme recherché (Tableau 1). Alors que, le polymorphisme de l'IL-1RN c'est des répétitions de 86bp VNTR dans le second intron. L'analyse des nombres variables de répétitions en tandem dans l'intron 2 du gène IL-1RN a été réalisée par PCR classique. Les différents allèles ont été identifiés par la taille des fragments de PCR et codés de façon classique (El-Omar, et al., 2000; Machado, et al., 2001) de la manière suivante : allèle 1, quatre répétitions ; l'allèle 2, deux répétitions ; l'allèle 3, cinq répétitions ; l'allèle 4, trois répétitions ; et l'allèle 5, six répétitions. Selon des études

antérieures (El-Omar, et al., 2000; Machado, et al., 2001) (Tableau 1), les allèles de l'IL-1RN ont été dichotomisés en deux catégories : long génotype (L ; > trois répétitions ; allèles 1, 3, 4, 5) et à court génotype (2 ; deux répétitions ; allèle 2).

### I.3.2.2. Digestion

Après l'amplification, une digestion enzymatique était réalisée par une enzyme de restriction ou endonucléase de restriction de type II.

Nous avons ajouté 1 unité (0,2 µl) de l'enzyme de restriction adéquat pour chaque type de l'analyse de polymorphisme selon les recommandations du fournisseur (promega, comme mentionné dans Tableau 1 et annexe 4) dans le tube de l'amplifia puis nous incubant le mélange (amplifia et enzyme) pendant 2 heures à 37 °C selon les recommandations du fournisseur.

La technique de base pour la détection des sites de restriction consiste à fragmenter un échantillon d'ADN par une enzyme de restriction, qui reconnaît et coupe le fragment de l'ADN chaque fois qu'une séquence courte palindromique spécifique se produit, dans un processus connu sous le nom d'une digestion de restriction. Les fragments de l'ADN résultants sont ensuite séparés selon leur longueur par l'électrophorèse sur gel d'agarose.

L'*AluI* (Promega). Cette enzyme coupe l'ADN double brin par clivage de deux fonctions phospho-diester au niveau de séquences nucléotidiques spécifiques (site de restriction de 4 pb)  $\text{-AGCT-}$  pour avoir des extrémités franches. Dans la position -31 (TC ; dbSNP : rs1143627) de la région du promoteur de l'IL-1β-31, une substitution d'un seul nucléotide un dTTP ou un dCTP. Deux possibilités polymorphiques dans cette région étaient probables, soit un allèle C qui n'aboutit pas à un clivage au niveau de site de restriction, donc un seul fragment de 234 pb. Soit un allèle T qui aboutit à un clivage au niveau de site de restriction en 2 fragments (Tableau 1).

Le *DdeI* (Promega). Une enzyme de clivage de deux fonctions phospho-diester au niveau de séquences nucléotidiques spécifiques (site de restriction de 5 pb)  $\text{-CTNAG-}$  pour résulter des extrémités cohésives. Dans la position -511 (CT ; dbSNP : rs16944) de la région du promoteur de l'IL-1β-511, une substitution d'un seul nucléotide un dTTP ou un dCTP. Deux possibilités polymorphiques dans cette région étaient probables, soit un allèle C qui aboutit pas à un seul clivage de fragment d'ADN avec 140 pb et 49 pb. Soit un allèle T qui aboutit à deux

clivages du fragment d'ADN pour obtenir un fragment de 109, 49 et 31 pb suite à la détection de deux sites de restriction (Tableau 1).

### I.3.3. L'électrophorèse

L'électrophorèse sur gel d'agarose est une méthode utilisée pour séparer l'ADN, l'ARN ou des protéines en fonction de leur poids moléculaire basée sur la séparation des acides nucléiques chargés négativement sous l'effet d'un champ électrique. Cette séparation s'effectue à travers la matrice du gel d'agarose : les molécules de plus petite taille se déplacent plus rapidement et migreront plus loin que les molécules de tailles supérieures.

Préparation du gel d'agarose à 2,5 % pour avoir un gel discriminant.

- Préparer 50 ml de tampon TAE (40mM Tris, 20 mM Acide acétique et 1mM EDTA) à pH 8 dans un flacon.
- Ajouter 1,25 gr d'agarose dans 50 ml de TAE au flacon,
- Mélanger dans un agitateur magnétique.
- Fermer le flacon avec du papier aluminium pour éviter l'évaporation pendant le chauffage.
- Faire fondre l'agarose au four à micro-ondes en surveillant pour éviter les projections. Agiter de temps à autre pour homogénéiser le mélange.
- Laisser refroidir jusqu'à ce qu'il devienne possible de saisir le flacon à main nue (environ 60 °C).
- Avant la gélification de la préparation, ajouter 5 µl de l'intercalaire de l'acide nucléique GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain, 10 000 X (Biotium) à la solution (annexe 4).
- Placer les joints de coulage fournis avec la cuve pour fermer le support de gel et positionner le peigne à 1 mm du fond et à environ 0,5 cm de l'extrémité du support. Régler le niveau pour que le support de gel soit horizontal.
- Couler lentement le gel sur 3 à 5 mm d'épaisseur en veillant à ce qu'il entoure bien les dents du peigne, et laisser refroidir,
- Enlever le peigne et les joints après refroidissement du gel. Le gel est prêt pour le dépôt des échantillons.
- Remplir les puits avec environ 7 µl de chaque échantillon d'amplification en faisant attention de ne pas déchirer le fond du gel avec la pointe de la pipette,

- Un marqueur de poids moléculaire (100 – 1 500 pb, Promega) a été utilisé pour permettre la détermination de la taille des fragments d'ADN amplifiés.

Préparation de la cuve électrophorèse.

- Placer le support avec le gel chargé dans la cuve d'électrophorèse en positionnant les puits du côté de la cathode.
- Remplir la cuve avec du tampon TAE (réutilisable plusieurs fois) en versant délicatement et très lentement lorsque le gel commence à être recouvert pour éviter les fuites d'ADN vers le tampon.
- L'électrophorèse été réalisée dans une minicuve à électrophorèse raccordée à un générateur électrique (ALLSHENG, Mini-ES2, Chine)
- Fermer la cuve, brancher les fils et mettre sous tension,
- Laisser migrer jusqu'à ce que le colorant de charge arrive à proximité du bord du gel (environ 37 min à 100 V pour un gel de 60 mm dans une minicuve),

#### I.3.3.1. Révélation des bandes d'ADN

- Couper l'alimentation, débrancher les connexions et récupérer le gel dans son support,
- Les bandes de l'ADN sont visualisé en plaçant le gel sur un Trans-illuminateur UV (300 nm).

Tableau 1 : Les amorces et condition PCR de l'analyse des polymorphismes de l'IL-1 $\beta$  et IL-1RN

Polymorphismes	Amorces	Tm ; méthode PCR (enzyme de restriction) ; la taille des allèles
<b>IL-1<math>\beta</math>-31</b>	F : 5'-TCTTTTCCCCTTTCCTTAACT-3' R : 5'-GAGAGACTCCCTTAGCACCTAGT-3'	52 ° C. PCR-RFLP ( <i>AluI</i> ) ; C allèle : 234 pb ; T allèle : 150 pb et 84 pb
<b>IL-1<math>\beta</math>-511</b>	F : 5'-CTGCATACCGTATGTTCTCTGCC-3' R : 5'-GGAATCTTCCCACTTACAGATGG-3'	59 ° C. PCR-RFLP ( <i>DdeI</i> ) ; C allèle : 140 pb et 49 pb ; T allèle : 109 pb, 49 pb et 31 pb
<b>IL-1RN</b>	F : 5'-FCTCAGCAACACTCCTAT-3' R : 5'-TCCTGGTCTGCAGGTAA-3'	60 ° C ; PCR ; 2 répétition allèle : 240 pb, 3 répétition allèle : 326 pb ; 4 répétition allèle : 412 pb ; 5 répétition allèle : 498 pb

Tm : Température d'hybridation ; F : Sens (*Forward*) ; R : Anti-sens (*Reverse*) (Ruzzo, et al., 2005)



Tableau 2 : les jeux d'amorces utilisés pour le génotypage *H. pylori*

Gène	Amorces	Température d'hybridation °C	La taille des produits PCR pb
<i>ureC</i>	F : 5-AAGCTTTTAGGGGTGTTAGGGGTTT-3 R : 5-AAGCTTACTTTCTAACACTAACGC-3	55	294
<i>vac A</i> <i>s1/s2</i>	F : 5-ATGGAAATACAACAAACACAC-3 R : 5-CTGCTTGAATGCGCCAAAC-3	55	259/286
<i>m1</i>	F : 5-GGTCAAATGCGGTCATGG-3 R : 5-CCATTGGTACCTGTAGAAAC-3	55	290
<i>m2</i>	F : 5-GGAGCCCCAGGAAACATTG-3 R : 5-CATAACTAGCGCCTTGCAC-3	52	192
<i>cag A</i>	F: 5-ATAATGCTAAATTAGACAACCTTGAGCGA-3 R : 5-TTAGAATAATCAACAAACATAACGCCAT-3	56	297
<i>cag E</i>	F : 5-TTGAAAACCTTCAAGGATAGGATAGAGC-3 R : 5-GCCTAGCGTAATATCACCATTACCC-3	50	509
<i>vir B11</i>	F : 5-TTAAATCCTCTAAGGCATGCTAC-3 R : 5-GATATAAGTCGTTTTACCGCTTC-3	49	491
<i>fla A</i>	F : 5-TTCTATCGGCTCTACCAC-3 R : 5-CTGACCGCCATTGACCAT-3	55	508

F : Sens (*Forward*) ; R : Anti-sens (*Reverse*)

(Atherton, et al., 1995; Lage, et al., 1995; Domingo, et al., 1999; Göttke, et al., 2000; Sozzi, et al., 2005).

#### I.4. Méthodes statistiques

L'importance de la différence dans la distribution des polymorphismes entre différents groupes a été calculée en utilisant le test de  $\chi^2$  (Chi-square). Nous avons évalué l'équilibre de Hardy-Weinberg pour les contrôles dans chaque étude par le test de qualité de  $\chi^2$  pour comparer les fréquences de génotypes observées et attendues. Toutes les distributions alléliques ont été examinées pour les écarts correspondants de leur équilibre de Hardy-Weinberg. Le risque relatif a été évalué par régression logistique multivariée basée sur des modèles de prédiction de référence catégorique, l'ajustement pour le sexe et l'âge (l'âge au premier diagnostic pour les cas des patients et l'âge à la sélection des sujets de contrôle) avec un intervalle de confiance (IC) de 95 % et la signification statistique fixée à  $p < 0,05$  en utilisant le logiciel SPSS 22 (Statistical Package for the Social Sciences, IBM Corporation ; Chicago, IL, August 2013). Des modèles de combinaisons alléliques des trois variantes étroitement liées aux polymorphismes de l'IL-1 $\beta$  et IL-1RN ont été analysés. L'étude de l'haplotype et le déséquilibre de liaison entre les loci (estimé par  $r^2$  et  $D'$ ) ont été réalisés par l'intermédiaire de l'interface LinkDos dans le web (<http://genepop.curtin.edu.au/linkC.html>).

## I.5. Le Déséquilibre de liaison

Les allèles particuliers des loci voisins ont tendance à être co-héritaires. Pour les loci étroitement liés, cela pourrait conduire à des associations entre les allèles de la population - une propriété connue sous le nom de déséquilibre de liaison (LD). LD pourrait faciliter la cartographie de complexes loci de la maladie grâce à l'ensemble des études d'association du génome. Cette approche dépend cruciallement des modèles de LD dans le génome humain (Ardlie, et al., 2002).

Plus récemment, les généticiens humains ont tourné leurs efforts vers des maladies plus courantes qui affectent de vastes portions de la population et ont une base génétique complexe. Pour cela, les études de liens familiaux ont été beaucoup moins réussies. LD, en grande partie en raison de la conviction que les études d'association offrent une puissance nettement plus grande pour la cartographie des gènes pathogènes communs que les études traditionnelles de liaison et que LD peut offrir un raccourci aux études d'association du génome. Cet intérêt a été renforcé par les progrès réalisés dans le séquençage du génome humain et l'établissement de grandes collections de polymorphismes à un seul nucléotide (SNP), tels que ceux identifiés par le SNP Consortium (Sachidanandam, et al., 2001).

LD est l'association non aléatoire d'allèles aux loci adjacents. Quand un allèle particulier à un locus est trouvé ensemble sur le même chromosome avec un allèle spécifique à un second locus - plus souvent que prévu si les loci étaient ségrégation indépendamment dans une population - les loci sont en déséquilibre. Ce concept de LD est formalisé par l'une des premières mesures de déséquilibre à proposer (symbolisée par  $D$ ).  $D$ , en commun avec la plupart des autres mesures de LD, quantifie le déséquilibre en tant que différence entre la fréquence observée d'un HAPLOTYPE à deux locus et la fréquence qu'il devrait montrer si les allèles étaient ségrégés au hasard (Ardlie, et al., 2002).

Dans le cas de locus bi-alléliques ayant respectivement pour allèles  $A/a$  et  $B/b$ , il se calcule comme  $D_{AB} = x_{AB} - p_A q_B$ , où  $x_{AB}$  est la fréquence de l'haplotype porteur des allèles  $A$  et  $B$ , et  $p_A$  ( $q_B$ ) la fréquence de l'allèle  $A$  ( $B$ ) dans la population. Ce calcul est illustré par la Figure 19, avec le cas 1 en équilibre de liaison ( $D = 0$ ) et le cas 2 en déséquilibre de liaison ( $D > 0$ ). Dans le cas de deux locus bialléliques, le LD est, en valeur absolue, le même pour toutes les combinaisons alléliques. La formule précédente se généralise pour les allèles de locus multi-alléliques de la manière suivante :  $D_{ij} = x_{ij} - p_i q_j$  avec  $x_{ij}$  la fréquence de l'haplotype

porteur de l'allèle  $i$  au premier locus et de l'allèle  $j$  au second loci, et  $p_i$  ( $q_j$ ) les fréquences de ces allèles dans la population.





		Nombre d'haplotypes	
		Cas 1	Cas 2
	A B	30	45
	A b	30	15
	a B	20	5
	a b	20	35
Fréquences alléliques	A	0.6	0.6
	a	0.4	0.4
	B	0.5	0.5
	b	0.5	0.5
Valeur de D		0	0.15

Figure 19 : Exemple de calcul du déséquilibre de liaison pour deux locus bi-alléliques.

# **Résultats et** **Discussion**

## **II. Résultats**

## II. Résultats

L'étude a été menée pour les deux sexes sur 79 patients (40 cancers gastriques [CG] et 39 gastrites chroniques atrophiques [GA]) et 32 individus recrutés autant que des cas témoins sains (TS), voir Tableau 3 et Figure 20.

### II.1. Âge et sexe

L'âge moyen des trois populations été de  $45,03 \pm 17,67$  années (extrémités, 16-86 ans). Chez le groupe des témoins sains (TS), l'âge moyen été de  $35,84 \pm 12,72$  années (extrémités, 21-62 ans) et le ratio hommes : femmes été de 1 : 1. Chez le groupe GA, l'âge moyen été de  $49,33 \pm 19,35$  années (extrémités, 16-86 ans) et le ratio hommes : femmes été de 0,56 : 1. concernant le groupe CG, l'âge moyen enregistré a été de  $59,28 \pm 14,00$  années (extrémités, 25-85 ans) et le ratio hommes : femmes était de 2,27 : 1.

D'après le Tableau 3 et le sex-ratio de chaque groupe séparément, une prédominance masculine a été enregistrée dans le groupe des patients atteints d'un carcinome gastrique infecté par l'*H. pylori*. Par contre, une prédominance féminine a été enregistrée dans cette étude chez le groupe de patients atteints d'une gastrite atrophique infecté par l'*H. pylori*.

Tableau 3 : Répartition des populations d'étude selon le sexe

	TS n (%)	GA n (%)	CG n (%)	GA+CG n (%)	$\chi^2$	Valeur de p*
<b>Femme</b>	16 (29,1 %)	25 (45,5 %)	14 (25,5 %)	39 (70 %)	6,694	< 0,05
<b>Homme</b>	16 (28,6 %)	14 (25 %)	26 (46,4 %)	40 (71 %)		
<b>Total</b>	32 (28,8 %)	39 (35,1 %)	40 (36 %)	79 (71,1 %)		

GA : gastrite atrophique ; CG : cancer gastrique ; TS : témoin sain. (\*) comparaison entre les trois groups (GA, CG et TS) par le test de Chi-square.

### II. 2. Le génotypage de l'IL-1

La première partie de notre travail consiste à analyser les génotypes du gène IL-1 ainsi que le déséquilibre de liaison entre les deux positions -31 et -511 de l'IL-1 $\beta$ . L'objectif de cette partie de notre travail a été de mettre en évidence l'association des polymorphismes du gène IL-1 dans la carcinogenèse de la muqueuse gastrique. Nous avons effectué le génotypage par l'utilisation de 3 marqueurs biologiques de l'IL-1 $\beta$  de la réponse immunitaire à l'infection à l'*H. pylori*, en occurrence IL-1 $\beta$ -511, IL-1 $\beta$ - 31 et IL-1RN l'antagoniste de l'IL-1 $\beta$  pour son récepteur. Dans cette étude, nous avons utilisé deux groupes de patients, un premier groupe qui représente la phase finale de la carcinogenèse de la muqueuse gastrique (40 patients atteints de



cancer gastrique infecté par *H. pylori*). Un autre groupe des patients a été exigé dans notre étude dans l'espoir de mettre au point un concept de prévention dans les populations à risque pour mieux comprendre la carcinogénèse de ce dernier, en occurrence des patients atteints de la gastrite chronique atrophique. Ce dernier représente une phase intermédiaire dans la carcinogénèse de la muqueuse gastrique à la suite d'une hypochlorhydrie en réponse à une sécrétion élevée de l'IL-1 $\beta$  à la suite d'une infection à l'*H. pylori* (39 patients atteints d'une gastrite atrophique). Les deux groupes de patients ont été comparés avec un groupe des témoins (32 TS).

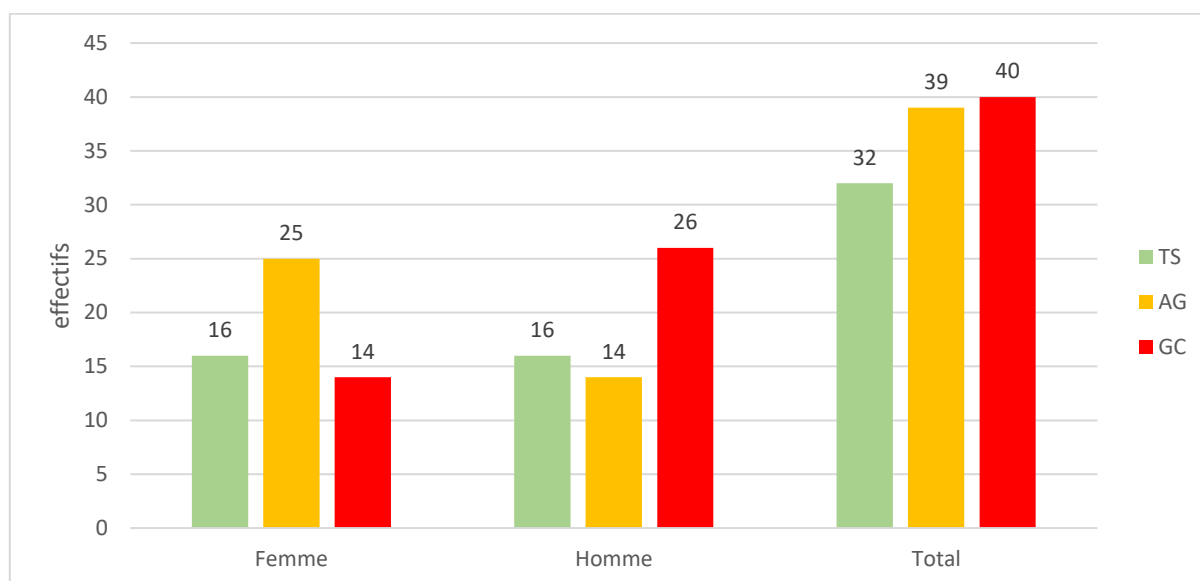
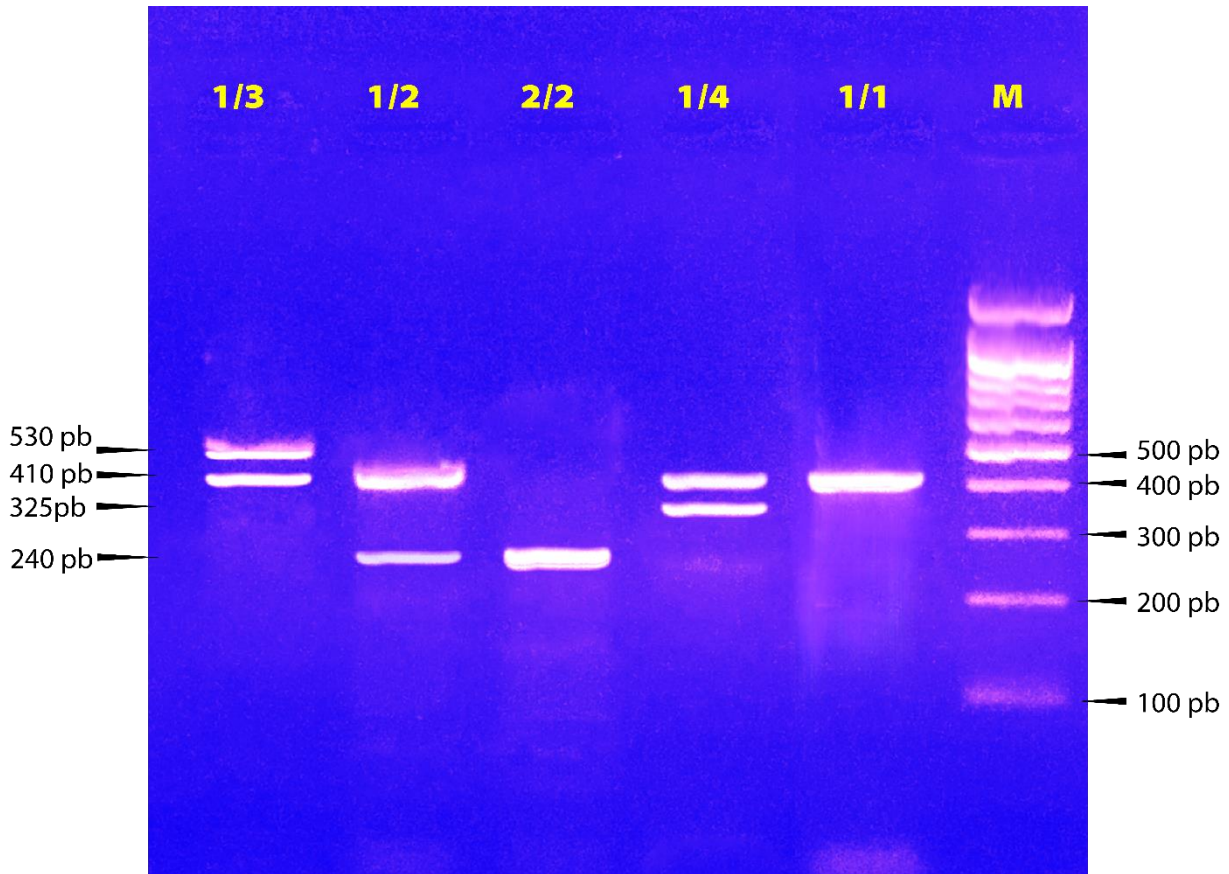


Figure 20 : Représentation graphique de la répartition des effectifs des pathologies gastriques et le groupe témoin sain réparti par sexe.

GA : gastrite atrophique ; CG : cancer gastrique ; TS : témoin sain.

Après une étape de l'extraction de l'ADN des 111 échantillons biologiques ont été sélectionnées selon les critères d'inclusion et d'exclusion entre les groupes pathologiques et des cas témoins sains. Nous avons procédé à un génotypage pour donner suite à l'électrophorèse sur le gel d'agarose en utilisant la technique PCR RFLP (IL-1 $\beta$ -511 et IL-1 $\beta$ -31) et PCR VNTR (IL-1RN) à fin d'amplifier des fragments d'ADN comme l'indique le Tableau 4. Ainsi que la visualisation du gel d'agarose sous un trans-illuminateur UV pour être photographié comme illustré dans la Figure 21 et Figure 22.



*Figure 21 : Gel des produits de PCR de l'IL-1RN.*

*Illustrant les génotypes les plus couramment étudiés. Le gène IL-1RN un 86 pb de répétition penta-allélique en tandem dans l'intron 2, dont l'allèle 2 (IL-1RA\*2) a été précédemment associé à une production accrue d'IL-1 $\beta$  (El-Omar, et al., 2000). 1/1 : allèle 1/allèle 1 du gène IL-1RN ; 1/2 : allèle 1/allèle 2 du gène IL-1RN ; 1/3 : allèle 1/allèle 3 du gène IL-1RN ; 2/2 : allèle 2/allèle 2 du gène IL-1RN ; 1/2 : allèle 1/allèle 2 du gène IL-1RN ; M : marqueur de taille.*

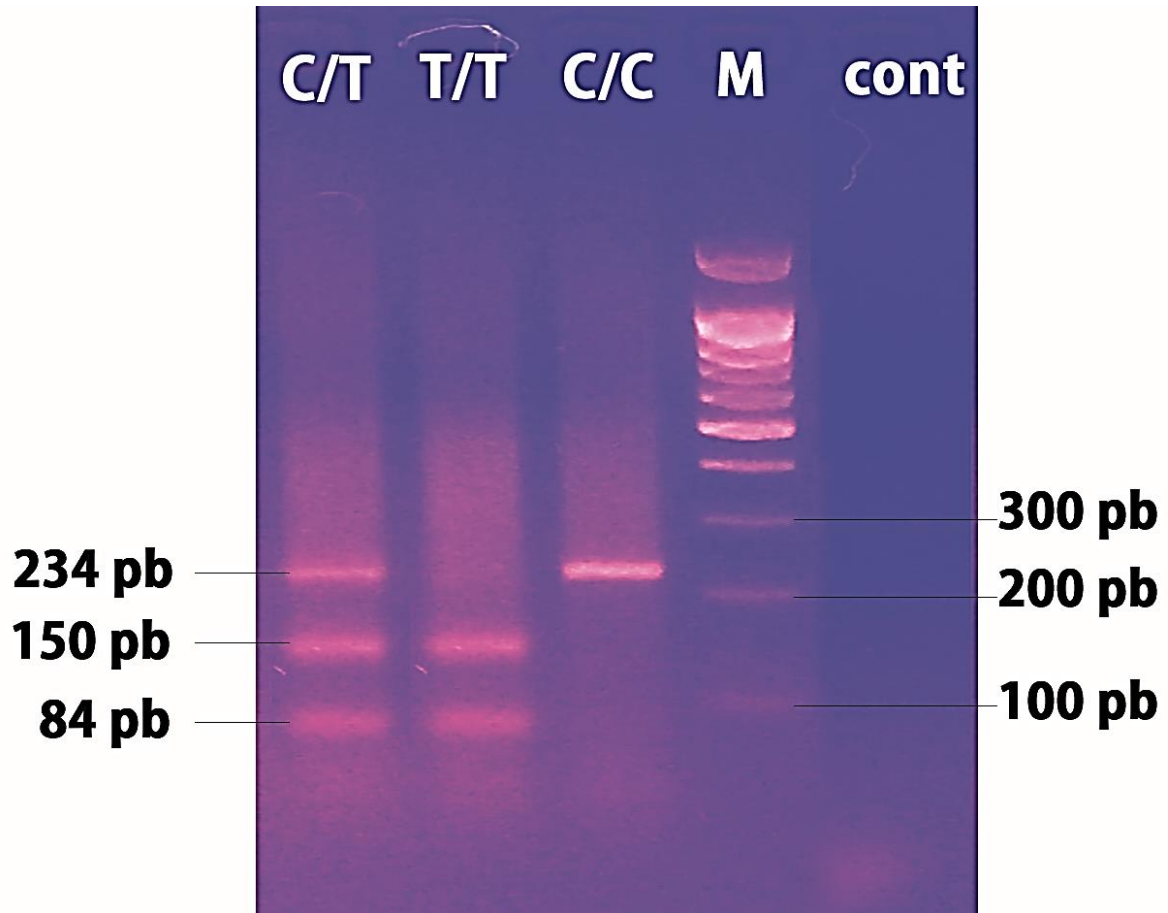


Figure 22 : Gel des produits amplifiés par PCR-RFLP (enzyme *AluI*).

*C/C* : génotype homozygote de l'*IL-1β-31*\**C/C* ; *T/T* : génotype homozygote de l'*IL-1β-31*\**T/T* ; *C/T* : génotype hétérozygote de l'*IL-1β-31*\**C/T* ; *M* : marqueur de taille ; *cont* : contrôle négatif.

Tableau 4 : Distribution des fréquences génotypiques des polymorphismes au niveau de l'IL-1 $\beta$ -511 (C/T SNP), IL-1 $\beta$ -31 (T/C SNP) et l'IL-1-RN (VNTR) chez les groupes patients (GA et CG) et le groupe témoins

Genotype	TS (n = 32) %	Cas pathologies (n = 79) %	Cas GA (n = 39) %	Cas CG (n = 40) %
<b>IL-1RN</b>				
L/L	28 (87,50 %)	57 (72,15 %)	32 (82,05 %)	25 (62,50 %)
2/L	04 (12,50 %)	19 (24,05 %)	04 (10,25 %)	15 (37,50 %)
2/2	00 (00,00 %)	03 (03,79 %)	03 (07,69 %)	00 (00,00 %)
2/L+2/2	04 (12,50 %)	22 (27,84 %)	07 (17,94 %)	15 (37,50 %)
<b>IL-1<math>\beta</math>-511</b>				
C/C	18 (56,25 %)	28 (35,44 %)	09 (23,07 %)	19 (47,50 %)
T/C	14 (43,75 %)	22 (27,84 %)	09 (23,07 %)	13 (32,50 %)
T/T	00 (00,00 %)	29 (36,70 %)	21 (53,84 %)	08 (20,00 %)
T/C+T/T	14 (43,75 %)	51 (64,55 %)	30 (76,92 %)	21 (52,50 %)
<b>IL-1<math>\beta</math>-31</b>				
T/T	17 (53,12 %)	24 (30,37 %)	14 (35,89 %)	10 (25,00 %)
C/T	07 (21,87 %)	33 (41,77 %)	14 (35,89 %)	19 (47,50 %)
C/C	08 (25,00 %)	22 (27,84 %)	11 (28,20 %)	11 (27,50 %)
C/T+C/C	15 (46,87 %)	55 (69,62 %)	25 (64,10 %)	30 (75,00 %)

GA : gastrite atrophique ; CG : cancer gastrique ; TS : témoin sain ; cas pathologique : CG+GA ; IL-1 $\beta$ -31 : cluster du gène qui code pour l'Interleukin-1 $\beta$  dans la région du promoteur TATA-box à la position -31 ; IL-1 $\beta$ -511 : cluster du gène qui code pour l'Interleukin-1 $\beta$  dans la région du promoteur TATA-box à la position -511 ; IL-1RN : gène qui code pour antagoniste anti-inflammatoire (Interleukin-1ra) ; L : long génotype (> 3 répétitions ; allèles 1, 3, 4 et 5) ; 2 : court génotype (2 répétitions ; allèle 2) ; C : allèle porteur de polymorphisme d'un simple nucléotide (SNP) C dans la région d'étude ; T : allèle porteur de polymorphisme d'un simple nucléotide (SNP) T dans la région d'étude.

### II.2.1. Le déséquilibre de liaison du gène l'IL-1

D'après l'analyse haplotypique des fréquences des génotypes en testons l'équilibre Hardy-Weinberg par l'intermédiaire de l'interface *LinkDos*, nous avons trouvé les résultats suivants :

- $r^2 = 0,6804$ ,  $D' = 0,46294$  pour l'analyse de déséquilibre de liaison entre IL-1 $\beta$ -31 et IL-1 $\beta$ -511 de l'GA, ( $\chi^2 = 34,38$ ,  $p = 0,0001$ ).
- $r^2 = 0,14323$ ,  $D' = 0,10609$  pour l'analyse de déséquilibre de liaison entre IL-1 $\beta$ -31 et IL-1 $\beta$ -511 de CG, ( $\chi^2 = 7,8$ ,  $p = 0,0052$ ).
- $r^2 = 0,69357$ ,  $D' = 0,48$  pour l'analyse de déséquilibre de liaison entre IL-1 $\beta$ -31 et IL-1 $\beta$ -511 de TS, ( $\chi^2 = 10,90$ ,  $p = 0,0001$ ).

$r^2$  : la variance,  $D'$  : le déséquilibre de liaison,  $\chi^2$  : Chi-square

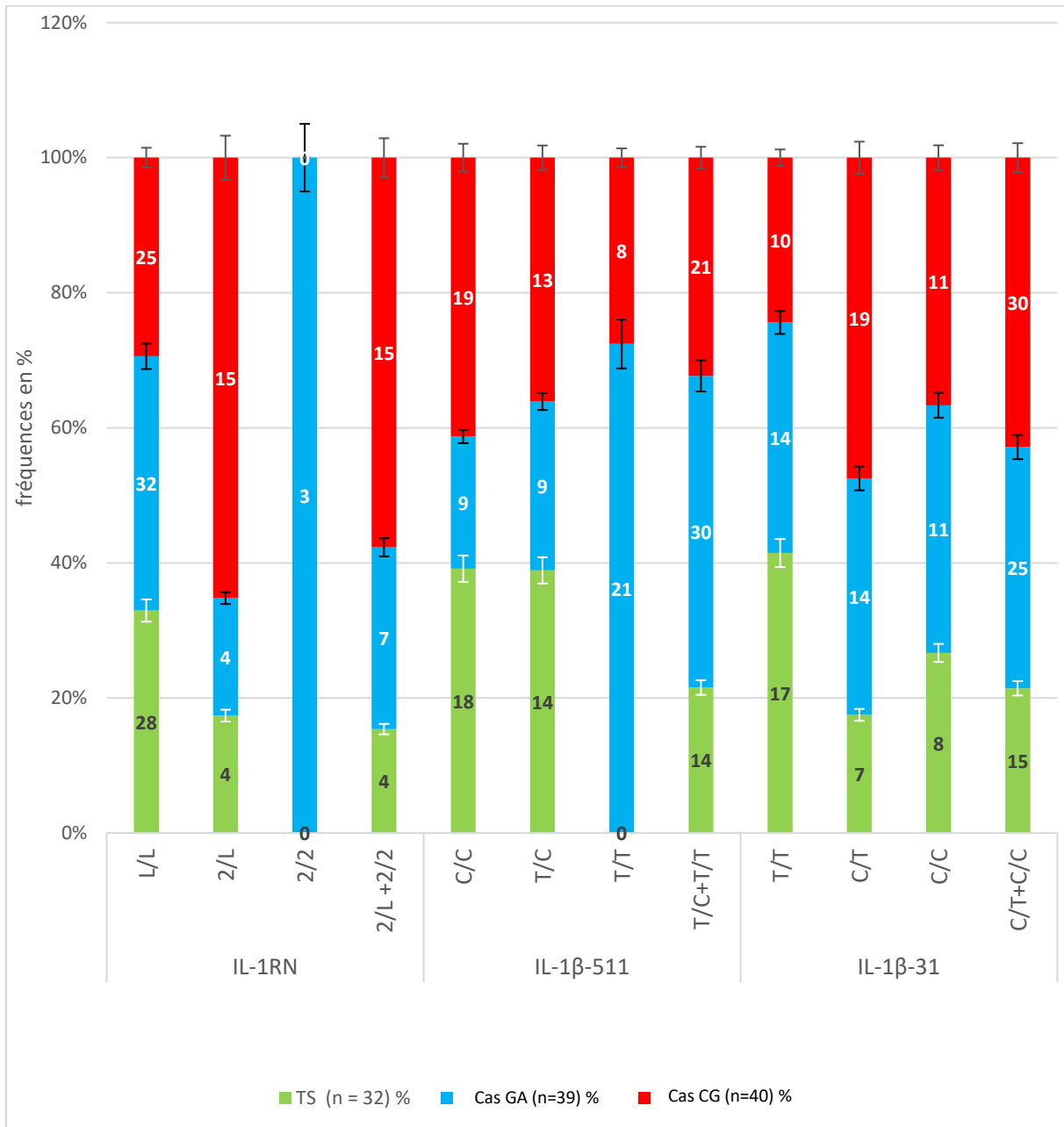


Figure 23 : Distribution des fréquences génotypiques des polymorphismes (IL-1B-511, IL-1B-31 et l'IL-1-RN VNTR) chez les groupes patients (GA+CG) et le groupe témoins.

GA : gastrite atrophique ; CG : cancer gastrique ; TS : témoin sain ; IL-1β-31 : cluster du gène qui code pour l'Interleukin-1β dans la région du promoteur TATA-box à la position -31 ; IL-1β-511 : cluster du gène qui code pour l'Interleukin-1β dans la région du promoteur TATA-box à la position -511 ; IL-1RN : gène qui code pour antagoniste anti-inflammatoire (Interleukin-1ra) ; L : long génotype (> 3 répétitions ; allèles 1, 3, 4 et 5) ; 2 : court génotype (2 répétitions ; allèle 2) ; C : allèle porteur de polymorphisme d'un simple nucléotide (SNP) C dans la région d'étude ; T : allèle porteur de polymorphisme d'un simple nucléotide (SNP) T dans la région d'étude.

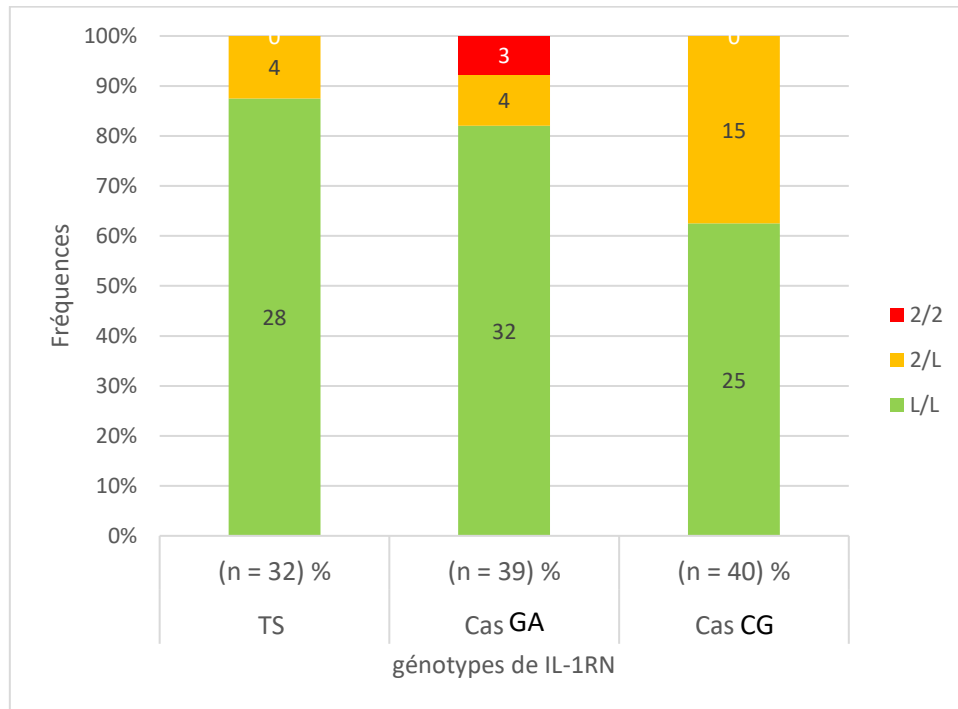


Figure 24 : Distribution des fréquences génotypiques de polymorphisme de l'IL-1RN (VNTR) chez les groupes patients (GA+CG) et le groupe témoins.

GA : gastrite atrophique ; CG : cancer gastrique ; TS : témoin sain ; IL-1RN : gène qui code pour antagoniste anti-inflammatoire (Interleukin-1ra) ; L : long génotype (> 3 répétitions ; allèles 1, 3, 4 et 5) ; 2 : court génotype (2 répétitions ; allèle 2).

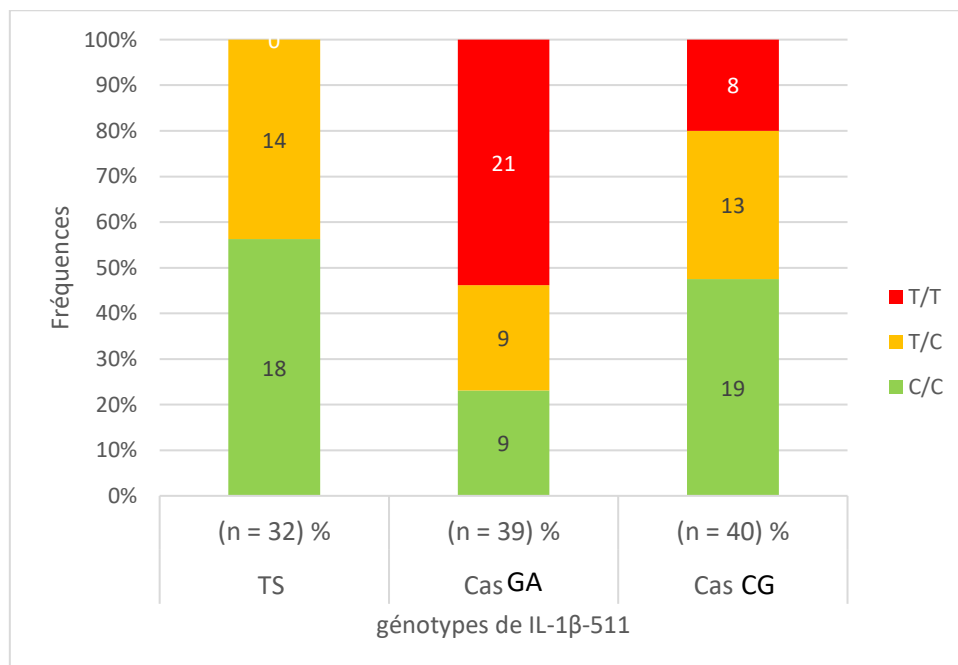


Figure 25 : Distribution des fréquences génotypiques de polymorphisme de l'IL-1β-511 chez les groupes patients (GA+CG) et le groupe témoins.

GA : gastrite atrophique ; CG : cancer gastrique ; TS : témoin sain ; IL-1β-511 : cluster du gène qui code pour l'Interleukin-1β dans la région du promoteur TATA-box à la position -511 ; C : allèle porteur de polymorphisme d'un simple nucléotide (SNP) C dans la région d'étude ; T : allèle porteur de polymorphisme d'un simple nucléotide (SNP) T dans la région d'étude.



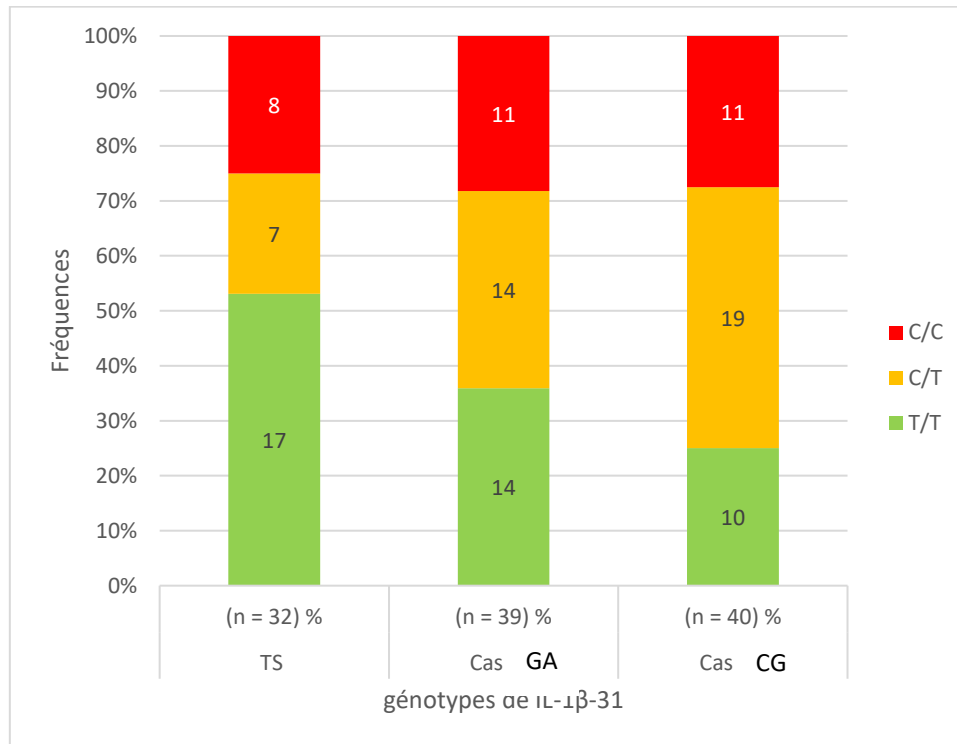


Figure 26 : Distribution des fréquences génotypiques de polymorphisme IL-1β-31 chez les groupes patients (GA+CG) et le groupe témoin.

GA : gastrite atrophique ; CG : cancer gastrique ; TS : témoin sain ; IL-1β-31 : cluster du gène qui code pour l'Interleukin-1β dans la région du promoteur TATA-box à la position -31.

### II.2.2. Les tests de significations

- L'analyse des corrélations linéaires de Pearson entre les allèles pour les trois populations (TS, GA et CG) a été significativement positive ( $r = 0,424$  ;  $r^2 = 0,180$  ; le Test de Fischer = 11 822 ;  $p < 0,05$ ),
- Le groupe GA a été significativement positif ( $r = 0,454$  ;  $r^2 = 0,206$  ; le Test de Fischer = 4,666 ;  $p < 0,05$ ).
- Le groupe des témoins sains (TS) a été significativement positif ( $r = 0,496$  ;  $r^2 = 0,246$  ; le Test de Fischer = 4,721 ;  $p < 0,05$ ),
- L'analyse des corrélations linéaires de Pearson entre les allèles pour le groupe Carcinome gastrique (CG) a été positive non significative ( $r = 0,142$  ;  $r^2 = 0,096$  ; le Test de Fischer = 3,072 ;  $p > 0,05$ ).
- Le Test de  $\chi^2$  sur l'ensemble des catégories de chaque haplotype. IL-1β-31 :  $\chi^2 = 6,065$ ,  $p = 0,048$ , IL-1β-511 :  $\chi^2 = 8,917$ ,  $p = 0,012$  et IL-1RN :  $\chi^2 = 7,199$ ,  $P = 0,027$ .

Les analyses des fréquences génotypiques et des différentes combinaisons haplotypiques chez les patients atteints de cancer gastrique et gastrite chronique atrophique, en comparaison avec des témoins sains, ont été représenté dans le Tableau 4. La Figure 23

représente la répartition des génotypes dans les groupes d'étude. La distribution des allèles du polymorphisme IL-1RN (VNTR), montre une fréquence élevée du génotype IL-1RN\*L/L porteur de l'allèle du motif sauvage IL-1RN\*L de 87,50 % chez TS à côté de 62,50 % des CG et 82,05 % des GA. Les individus porteurs de l'allèle IL-1RN\*2 hétérozygote et/ou homozygote ont été retrouvés chez 37,50 % des CG et 17,94 % des GA à l'encontre de 12,50 % des TS (Figure 24). L'allèle IL-1RN\*2 était curieusement très rare dans l'ensemble des échantillons d'étude, en particulier, le génotype IL-1RN\*2/2 a été absent dans les groupes CG et TS. De plus, l'analyse des fréquences alléliques, génotypiques et des combinaisons haplotypiques des trois polymorphismes étudiés dans les groupes CG et GA en fonction du sexe n'a montré aucune différence significative.

### II.2.3. Le génotypage de l'IL-1 $\beta$ -511

La distribution allélique et génotypique du polymorphisme de l'IL-1 $\beta$ -511 montre une fréquence génotypique de 56,25 % du motif sauvage homozygote de l'IL-1 $\beta$ -511\*C/C chez TS à côté de 47,50 % enregistrés chez les CG. En revanche, une faible fréquence de 23,07 % a été repérée chez les GA. La fréquence allélique de l'IL-1 $\beta$ -511\*T chez les patients d'un génotype hétérozygote (IL-1 $\beta$ -511\*T/C) et/ou homozygote (IL-1 $\beta$ -511\*T/T) est très élevée chez GA et CG avec des fréquences de 76,92 % et 52,50 % respectivement, à côté de 43,75 % des TS (Figure 25).

### II.2.4. Le génotypage de l'IL-1 $\beta$ -31

D'après l'analyse allélique et génotypique du polymorphisme de l'IL-1 $\beta$ -31, nous avons observé que la fréquence du génotype homozygote IL-1 $\beta$ -31\*T/T porteur du motif allélique sauvage IL-1 $\beta$ -31\*T est significativement diminuée dans les groupes pathologiques par rapport au groupe de comparaison. Nous avons trouvé une fréquence de 53,12 % chez les TS à côté de celle enregistré chez GA et CG de 35,89 % et 25 % respectivement de génotype IL-1 $\beta$ -31\*T/T. Cependant, la fréquence de l'allèle IL-1 $\beta$ -31\*C est significativement augmentée dans les groupes pathologiques du génotype hétérozygote (IL-1 $\beta$ -31\*C/T) et/ou homozygote (IL-1 $\beta$ -31\*C/C), nous l'avons retrouvé chez 75 % des CG et 64,10 % des GA à côté de 46,87 % des TS (Figure 26).

### II.2.5. Régression logistique génotypique et allélique de l'IL-1

Comme illustré dans le Tableau 5, nous avons étudié les génotypes majeurs impliqués comme des facteurs de risque au développement de la gastrite atrophique et du cancer gastrique par rapport aux témoins. Pendant que les analyses de régression des données allélique

et génotypique ont été réalisées, nous avons constaté que le génotype homozygote IL-1 $\beta$ -31\*C/C : 4,614 (95 % CI, 1,437-14,817), le génotype hétérozygote IL-1 $\beta$ -31\*C/T : 1,974 (95 % CI, 0,562 – 6,939) et les génotypes IL-1 $\beta$ -31\*C/T+C/C : 3,4 (95 % CI, 1,254 – 9,216) chacun ont une forte contribution au carcinome gastrique. Analogiquement, les mêmes génotypes ont montré un risque non significatif d'acquérir une gastrite atrophique (IL-1 $\beta$ -31\*C/C : 2,429 [IC à 95 %, 0,769 – 7,673] et IL-1 $\beta$ -31\*C/T : 1,455 [IC à 95 %, 0,402 – 5,260]). Cependant, les deux génotypes homozygotes (T/T) et hétérozygotes (C/T) de l'IL-1 $\beta$  -511 ont été 4,286 (95 % CI, 1,544 – 11,898) fois plus associées au risque d'acquérir une gastrite atrophique. Malgré cela, aucun risque significatif n'a été associé entre CG et GA. Nous avons constaté d'après cette analyse, une association significative de l'allèle IL-1 $\beta$ -31\*C à développer un CG.

En ce qui concerne le génotype hétérozygote IL-1RN\*L/2, nos résultats nous montrent que le risque d'acquérir un carcinome gastrique était de 4,2 (IC à 95 %, 1,230 à 14 337) fois. Malgré cela, aucune corrélation avec GA n'a été observée du même génotype dans notre étude allélique. En réponse à l'absence du génotype homozygote IL-1RN\*2/2 dans les deux groupes (CG et TS), l'analyse entre GA et ces groupes concernant le même génotype n'a pas eu lieu. Nos résultats, nous ne montrent aucune association allélique ou génotypique (hétérozygote ou homozygote) de l'allèle IL-1 $\beta$ -31\*C d'après l'analyse logistique entre les groupes pathologiques (CG et GA).

Tableau 5 : Analyse de régression logistique des fréquences génotypiques et alléliques des polymorphismes (IL1 $\beta$ -511, IL1 $\beta$ -31, l'IL1-RN VNTR) chez les groupes patients (GA et CG) et le groupe témoins (TS).

Analyse de régression logistique multivariante		p-value	OR (95 % CI)	
CG * TS	IL-1 $\beta$ (-31)	T/T	0,035	Référence
		C/C	0,010	4,614 (1,437 - 14,817)
		C/T	0,289	1,974 (0,562 - 6,939)
		C/T+C/C	0,016	3,400 (1,254 - 9,216)
	IL-1 $\beta$ (-511)	C/C	0,968	Référence
		T/T	0,800	0,880 (0,326 - 2,374)
		C/T	0,999	0,000 (-)
		C/T+T/T	0,461	1,421 (0,558 - 3,617)
	IL1RN	L/L	-	Référence
		L/2	0,022	4,200 (1,230 - 14,337)
		L/2+2/2	0,022	4,200 (1,230 - 14,337)
	GA * TS	IL-1 $\beta$ (-31)	T/T	0,303
C/C			0,131	2,429 (0,769 - 7,673)
C/T			0,568	1,455 (0,402 - 5,260)
C/T+C/C			0,148	0,494 (0,190 - 1,283)
IL-1 $\beta$ (-511)		C/C	0,914	Référence
		T/T	0,671	1,286 (0,404 - 4,094)
		C/T	0,998	0,000 (-)
		C/T+T/T	0,005	4,286 (1,544 - 11,898)
IL1RN		L/L	0,984	Référence
		L/2	0,999	0,000 (-)
		2/2	0,859	0,875 (0,200 - 3,828)
GA * CG		IL-1 $\beta$ (-31)	T/T	0,497
	C/C		0,238	0,526 (0,181 - 1,527)
	C/T		0,581	0,737 (0,249 - 2,178)
	C/T+C/C		0,294	0,595 (0,226 - 1,570)
	IL-1 $\beta$ (-511)	C/C	0,009	Référence
		T/T	0,522	1,462 (0,457 - 4,674)
		C/T	0,026	0,264 (0,081 - 0,856)
		C/T+T/T	0,026	3,016 (1,144 - 7,952)
	IL1RN	L/L	0,042	Référence
		L/2	0,999	0,000 (-)
		2/2	0,012	0,208 (0,061 - 0,706)
		L/2+2/2	0,057	0,365 (0,129 - 1,030)

GA : gastrite atrophique ; CG : cancer gastrique ; TS : témoin sain ; cas pathologique : CG+GA ; OR : risque relatif ; CG \* TS : Analyse de régression logistique combinée entre cancers gastriques et témoins sains ; GA \* TS : Analyse de régression logistique combinée entre gastrites atrophiques et témoins sains ; GA \* CG : Analyse de régression logistique combinée entre gastrites atrophiques et cancers gastriques. IL-1 $\beta$ -31 : cluster du gène qui code pour l'Interleukin-1 $\beta$  dans la région du promoteur TATA-box à la position -31 ; IL-1 $\beta$ -511 : cluster du gène qui code pour l'Interleukin-1 $\beta$  dans la région du promoteur TATA-box à la position -511 ; IL-1RN : gène qui code pour antagoniste anti-inflammatoire (Interleukin-1ra) ; L : long génotype (> 3 répétitions ; allèles 1, 3, 4 et 5) ; 2 : court génotype (2 répétitions ; allèle 2) ; C : allèle porteur de polymorphisme d'un simple nucléotide (SNP) C dans la région d'étude ; T : allèle porteur de polymorphisme d'un simple nucléotide (SNP) T dans la région d'étude.

## II.2.6. Études comparatives de l'IL-1 entre groupes

Sur la base de ces données, des analyses plus poussées du génotype de la combinaison entre l'IL-1RN et l'IL-1 $\beta$ -31 (Tableau 6) et IL-1RN et l'IL-1 $\beta$ -511 (Figure 7) ont été réalisées à l'aide du test de  $\chi^2$ . Nous avons observé que l'association entre l'IL-1 $\beta$ -31 et IL-1RN était significativement positive chez les patients CG et le groupe TS ( $p > 0,05$ ). En outre, la relation entre l'IL-1RN et l'IL-1 $\beta$ -511 a été significative pour les mêmes groupes ( $p > 0,05$ ). D'autre part, nos résultats ont montré une association significative des porteurs des allèles IL-1 $\beta$ -511\*T et IL-1RN\*2 de développer une gastrite atrophique ( $p > 0,05$ ).

Tableau 6 : Répartition du génotype chez les groupes de patients. Analyse de régression combinée (IL1RN contre IL-1 $\beta$ -31) test de Chi-square

Types d'échantillons		IL-1 $\beta$ -31 n (%)			Total	Chi square test (valeur de p)
		T/T	C/C	C/T		
GA	IL-1RN	L/L	14 (43,8 %)	8 (25,0 %)	10 (31,2 %)	0,028
		L/2	0 (0,0 %)	3 (75,0 %)	1 (25,0 %)	
		2/2	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)	3 (100,0 %)	
	<b>Total</b>	14 (35,9 %)	11 (28,2 %)	14 (35,9 %)	39 (100,0 %)	
CG	IL-1RN	L/L	7 (28,0 %)	9 (36,0 %)	9 (36,0 %)	0,146
		L/2	3 (20,0 %)	2 (13,3 %)	10 (66,7 %)	
	<b>Total</b>	10 (25,0 %)	11 (27,5 %)	19 (47,5 %)	40 (100,0 %)	
TS	IL-1RN	L/L	16 (57,1 %)	8 (28,6 %)	4 (14,3 %)	0,021
		L/2	1 (25,0 %)	0 (0,0 %)	3 (75,0 %)	
	<b>Total</b>	17 (53,1 %)	8 (25,0 %)	7 (21,9 %)	32 (100,0 %)	
Total	IL-1RN	L/L	37 (43,5 %)	25 (29,4 %)	23 (27,1 %)	0,005
		L/2	4 (17,4 %)	5 (21,7 %)	14 (60,9 %)	
		2/2	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)	3 (100,0 %)	
	<b>Total</b>	41 (36,9 %)	30 (27,0 %)	40 (36,0 %)	111 (100,0 %)	

GA : gastrite atrophique ; CG : cancer gastrique ; TS : témoin sain ; cas pathologique : CG+GA. IL-1 $\beta$ -31 : cluster du gène qui code pour l'Interleukin-1 $\beta$  dans la région du promoteur TATA-box à la position -31 ; IL-1 $\beta$ -511 : cluster du gène qui code pour l'Interleukin-1 $\beta$  dans la région du promoteur TATA-box à la position -511 ; IL-1RN : gène qui code pour antagoniste anti-inflammatoire (Interleukin-1ra) ; L : long génotype (> 3 répétitions ; allèles 1, 3, 4 et 5) ; 2 : court génotype (2 répétitions ; allèle 2) ; C : allèle porteur de polymorphisme d'un simple nucléotide (SNP) C dans la région d'étude ; T : allèle porteur de polymorphisme d'un simple nucléotide (SNP) T dans la région d'étude.

Tableau 7 : Répartition du génotype chez les groupes de patients. Analyse de régression combinée (IL-1RN contre IL-1β-511) test du Chi-square

Types d'échantillons			IL-1β (-511) n (%)			Total	Chi square test (valeur de p)
			C/C	T/T	C/T		
GA	IL-1RN	L/L	9 (28,1 %)	18 (56,2 %)	5 (15,6 %)	32 (100,0 %)	0,014
		L/2	0 (0,0 %)	3 (75,0 %)	1 (25,0 %)	4 (100,0 %)	
		2/2	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)	3 (100,0 %)	3 (100,0 %)	
	<b>Total</b>	9 (23,1 %)	21 (53,8 %)	9 (23,1 %)	39 (100,0 %)		
CG	IL-1RN	L/L	15 (60,0 %)	5 (20,0 %)	5 (20,0 %)	25 (100,0 %)	0,067
		L/2	4 (26,7 %)	3 (20,0 %)	8 (53,3 %)	15 (100,0 %)	
	<b>Total</b>	19 (47,5 %)	8 (20,0 %)	13 (32,5 %)	40 (100,0 %)		
TS	IL-1RN	L/L	18 (64,3 %)	-	10 (35,7 %)	28 (100,0 %)	0,015
		L/2	0 (0,0 %)	-	4 (100,0 %)	4 (100,0 %)	
	<b>Total</b>	18 (56,2 %)	-	14 (43,8 %)	32 (100,0 %)		
Total	IL-1RN	L/L	42 (49,4 %)	23 (27,1 %)	20 (23,5 %)	85 (100,0 %)	0,002
		L/2	4 (17,4 %)	6 (26,1 %)	13 (56,5 %)	23 (100,0 %)	
		2/2	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)	3 (100,0 %)	3 (100,0 %)	
	<b>Total</b>	46 (41,4 %)	29 (26,1 %)	36 (32,4 %)	111 (100,0 %)		

GA : gastrite atrophique ; CG : cancer gastrique ; TS : témoin sain ; cas pathologique : CG+GA. IL-1β-31 : cluster du gène qui code pour l'Interleukin-1β dans la région du promoteur TATA-box à la position -31 ; IL-1β-511 : cluster du gène qui code pour l'Interleukin-1β dans la région du promoteur TATA-box à la position -511 ; IL-1RN : gène qui code pour antagoniste anti-inflammatoire (Interleukin-1ra) ; L : long génotype (> 3 répétitions ; allèles 1, 3, 4 et 5) ; 2 : court génotype (2 répétitions ; allèle 2) ; C : allèle porteur de polymorphisme d'un simple nucléotide (SNP) C dans la région d'étude ; T : allèle porteur de polymorphisme d'un simple nucléotide (SNP) T dans la région d'étude.

### II.3. Le génotypage de l'*H. pylori*

La deuxième partie de notre étude consiste à prospector les facteurs de virulence de l'*H. pylori* qui colonise la muqueuse gastrique des patients atteints du CG et GA. Après un tri des échantillons, nous avons récolté 43 échantillons exploitables pour génotyper les facteurs de virulence de *H. pylori* (27 GA et 16 CG). Le rétrécissement du nombre des échantillons a été imposé par la quantité insuffisante d'ADN dans certains échantillons des biopsies gastriques d'une part, d'autre part une grande partie des échantillons ont été prélevés du sang total et non pas des muqueuses gastriques, la niche sélective des *H. pylori*, dont l'inexistence de l'ADN de ce dernier.

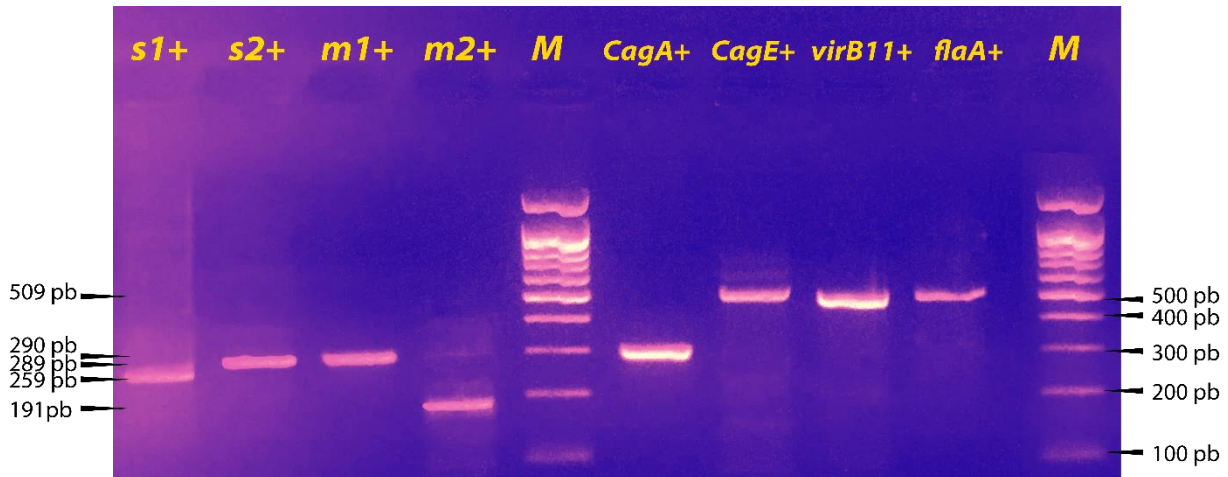
Nous avons succédé par une amplification des fragments des gènes de virulence en utilisant des amorces spécifiques pour chaque gène. L'exemple des résultats est présenté dans la photographie (Figure 28) des produits amplifiés par PCR des facteurs de virulence de l'*H. pylori* visualisés à 2,5 % de gels d'agarose analysés par électrophorèse dont les gènes étudiés étaient *vac A* (*s1/s2*, *m1/m2*), l'îlot *cag-PAI* (*cag A*, *cag E*, *vir B11*) et le gène des flagellines les plus virulents *fla A*. L'histogramme des fréquences des facteurs de virulence de l'*H. pylori* des deux groupes des populations pathologiques (GA et CG) représentés dans la Figure 29.

Nous avons réalisé un histogramme selon les résultats des fréquences des facteurs de virulence de l'*H. pylori* et leur répartition selon le sexe dans les deux populations (CG et GA) (Figure 30). Dans l'ensemble des figures ci-dessous nous pouvons constater en dehors d'un seul cas que toutes les tumeurs gastriques étaient significativement associées aux souches de l'*H. pylori vac A (s1, m1)*, *cag-PAI (cag A, cag E et vir B11)* et *fla A* et qui représente plus de 93 % des cas pour tous les gènes décrits ci-dessus. Nous avons enregistré dans la même population l'absence de l'allèle *vac A s2* et la présence d'un seul cas de souche *vac A m2*. Dans la population GA, les fréquences des gènes d'étude ont été variables. Les fréquences atteignent plus de 70 % pour le *fla A*, plus de 55 % pour *vac A s1*, plus de 44 % de *vac A s2*, 37 % de *cag A* et de 29,6 % pour *cag E* et 26 % de *vac A m1* et une valeur faible de *vac A m2* enregistré avec près de 11 %. Nos résultats nous montrent que dans le même échantillon l'existence de plusieurs populations d'*H. pylori* qui peut cohabiter dans la même niche gastrique chez le même patient et peut être présente dans nos résultats qui expliquent les valeurs des fréquences des gènes d'étude. Dans les histogrammes des fréquences des facteurs de virulence selon le sexe dans les deux populations (Figure 30), la population CG reste inchangée pour les deux sexes. Tandis que, pour la population GA, nos résultats nous montrent que les valeurs des fréquences des facteurs de virulence sont divergentes. Les fréquences de *vac A s1*, *m1* et *m2* ont été diminuées chez la population masculine. Cependant, cette diminution a été enregistrée que dans la fréquence du sous-type du gène *vac A m2* dans la population GA féminine, tandis qu'une augmentation des fréquences des gènes *fla A* et *vir B11* ont été enregistrées. Toutefois, nous réalisons que les fréquences des autres facteurs de virulences restent très divergentes dans la même population.

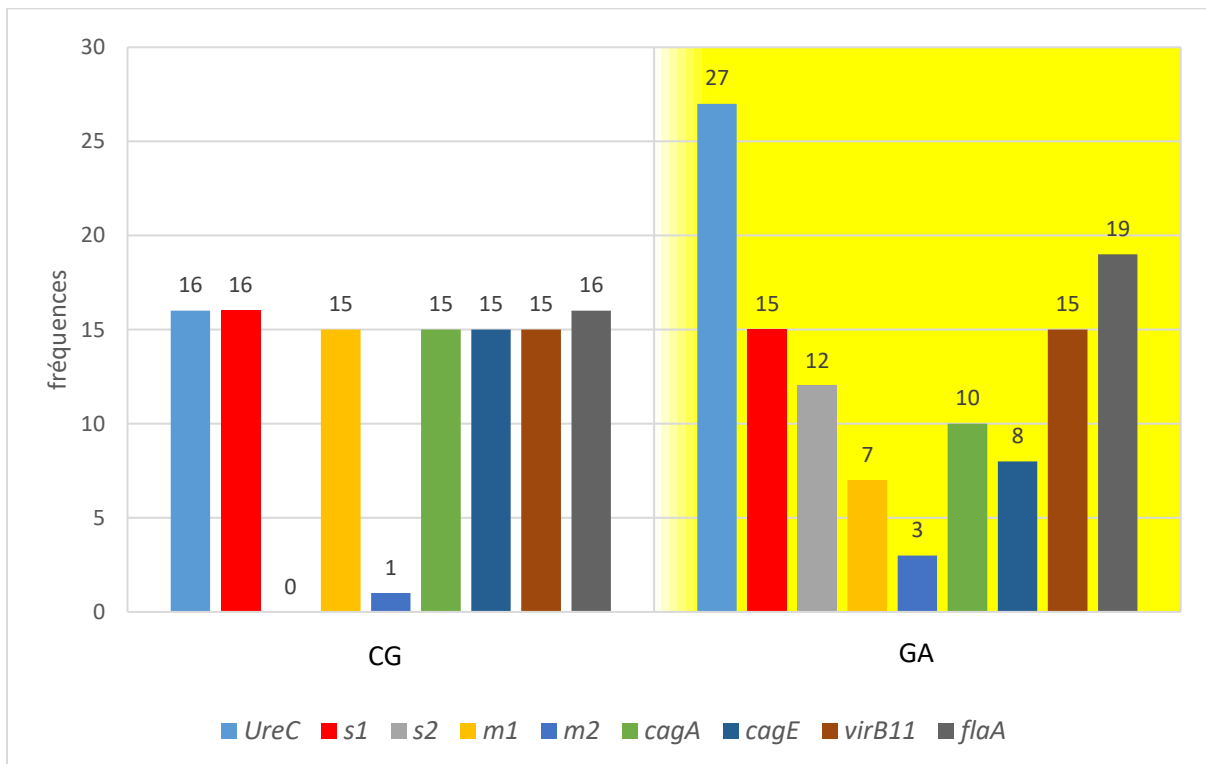




Figure 27 : Coupe histologique d'une biopsie gastrique qui représente d'une Gastrite chronique atrophique infecté par l'*H. pylori* (coloration H.E ; Gr. X40); (service d'Anatomopathologie, C.H-U de Sidi Bel-Abbès).



**Figure 28 :** Gel des produits amplifiés par PCR des facteurs de virulence de l'*H. pylori*  
*s1+* : échantillon dont la région de signal 1 de *vac A* est positive (259 pb) ; *s2+* : échantillon dont la région de signal 2 de *vac A* est positive (289 pb) ; *m1* : échantillon dont la région médiane 1 de *vac A* est positive (290 pb) ; *m2* : échantillon dont la région médiane 2 de *vac A* est positive (191 pb) ; *cag A+* : échantillon, dont le gène, *cag A* est positif (297 pb) ; *cag E+* : échantillon, dont le gène, *cag E* est présent (509 pb) ; *vir B11+* : échantillon, dont le gène *vir B11* est présent (491 pb) ; *fla A* : échantillon, dont le gène *fla A* est présent (508 pb) ; *M* : marqueure de taille (100-1500 pb).



**Figure 29 :** Histogramme des fréquences des facteurs de virulence de l'*H. pylori* des deux groupes pathologique (GA et CG).

*GA* : gastrite atrophique ; *CG* : cancer gastrique ; *s1* : région de signal 1 du facteur *vac A* ; *s2* : région de signal 2 du facteur *vac A* ; *m1* : région médiane 1 du facteur *vac A* ; *m2* : région médiane 2 du facteur *vac A* ; *cag A* : gène *cag A* ; *cag E* : gène *cag E* ; *vir B11* : gène *vir B11* ; *fla A* : gène *fla A*.

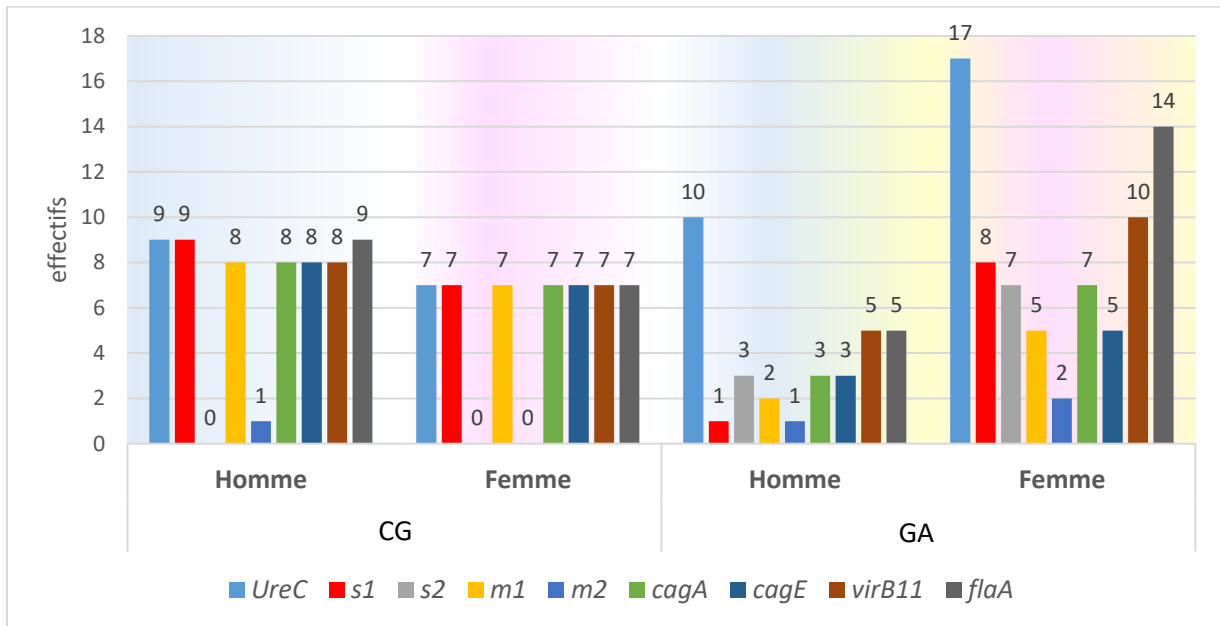


Figure 30 : Comparaison des effectifs des facteurs de virulence de l'H. pylori des deux groupes pathologiques (GA et CG) par sexe.

GA : gastrite atrophique ; CG : cancer gastrique ; s1 : région de signal 1 du facteur vac A ; s2 : région de signal 2 du facteur vac A ; m1 : région médiane 1 du facteur vac A ; m2 : région médiane 2 du facteur vac A ; cag A : gène cag A ; cag E : gène cag E ; vir B11 : gène vir B11 ; fla A : gène fla A.

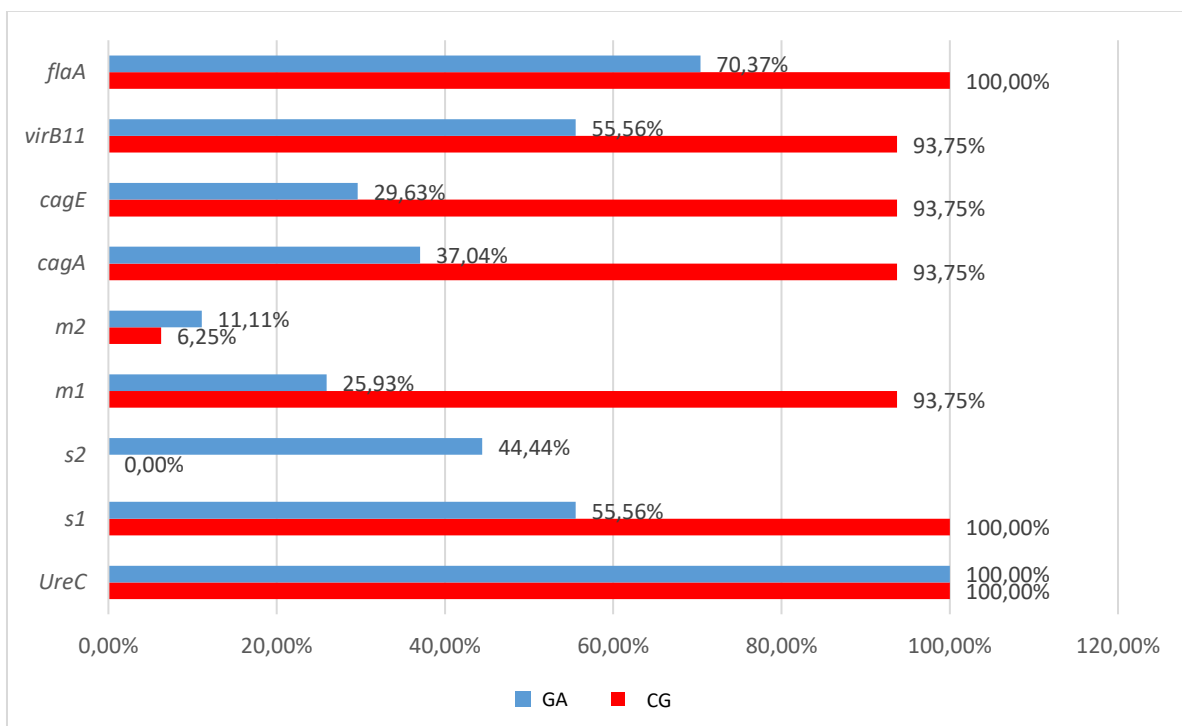


Figure 31 : Barres groupées des pourcentages des facteurs de virulence d'H. pylori des populations pathologique (GA et CG).

GA : gastrite atrophique ; CG : cancer gastrique ; s1 : région de signal 1 du facteur vac A ; s2 : région de signal 2 du facteur vac A ; m1 : région médiane 1 du facteur vac A ; m2 : région médiane 2 du facteur vac A ; cag A : gène cag A ; cag E : gène cag E ; vir B11 : gène vir B11 ; fla A : gène fla A.

## II.4. L'interaction du génotype de l'IL-1 et les gènes de l'*H. pylori*

Le génotypage des patients infectés par l'*H. pylori* pour chaque type de polymorphisme de l'IL-1 $\beta$  et l'IL-1RN en corrélation avec celle des génotypes des facteurs de virulences ont été démontrés. Nous avons exploité les corrélations des génotypes de l'hôte seulement dans le groupe GA, pour la seule raison que les valeurs de CG étaient optimales pour les gènes *vac A s1*, *m1*, *cag A*, *cag E*, *vir B11* et *fla A* en dehors d'un seul cas, qui ne permirent pas une analyse dans ce sens. Tandis que dans le groupe GA, nous avons trouvé des valeurs divergentes. Ces fréquences en étaient analysées pour détecter les groupes à risque qui représentent l'interaction des caractéristiques de l'hôte et la bactérie. Les Figure 32, Figure 33 et Figure 34 représentent les interactions des fréquences génotypiques de l'IL-1 $\beta$ -31, IL-1 $\beta$ -511 et IL-1RN respectivement avec les facteurs de virulence de *H. pylori*.

Dans la Figure 32 nous observons une fréquence allélique élevée de l'IL-1 $\beta$ -31\*C dans toutes les interactions avec les génotypes de l'*H. pylori*. *vac A s1* : la fréquence du génotype homozygote IL-1 $\beta$ -31\*C/C était deux fois supérieures à celle observée chez le génotype *vac A s2*. Le génotype hétérozygote IL-1 $\beta$ -31\*C/T chez le génotype *vac A s2* était trois fois supérieures par rapport au génotype *vac A s1* de l'*H. pylori*. La fréquence de génotype *vac A m1* était quatre fois supérieures par rapport au génotype *vac A m2* chez les patients porteurs de l'allèle IL-1 $\beta$ -31\*C. Le génotype homozygote IL-1 $\beta$ -31\*C/C est plus présent en *cag A* que *cag E* de l'îlot *cag-PAI*.

La Figure 33 montre des fréquences légèrement supérieures des génotypes *vac A s2* et *m1* à côté de *vac A s1* et *m2*. Dans La Figure 34, nous avons observé des fréquences élevées de tous les gènes de *H. pylori* du génotype homozygote IL-1RN\*L/L de l'hôte par rapport au génotype hétérozygote IL-1RN\*2/L.

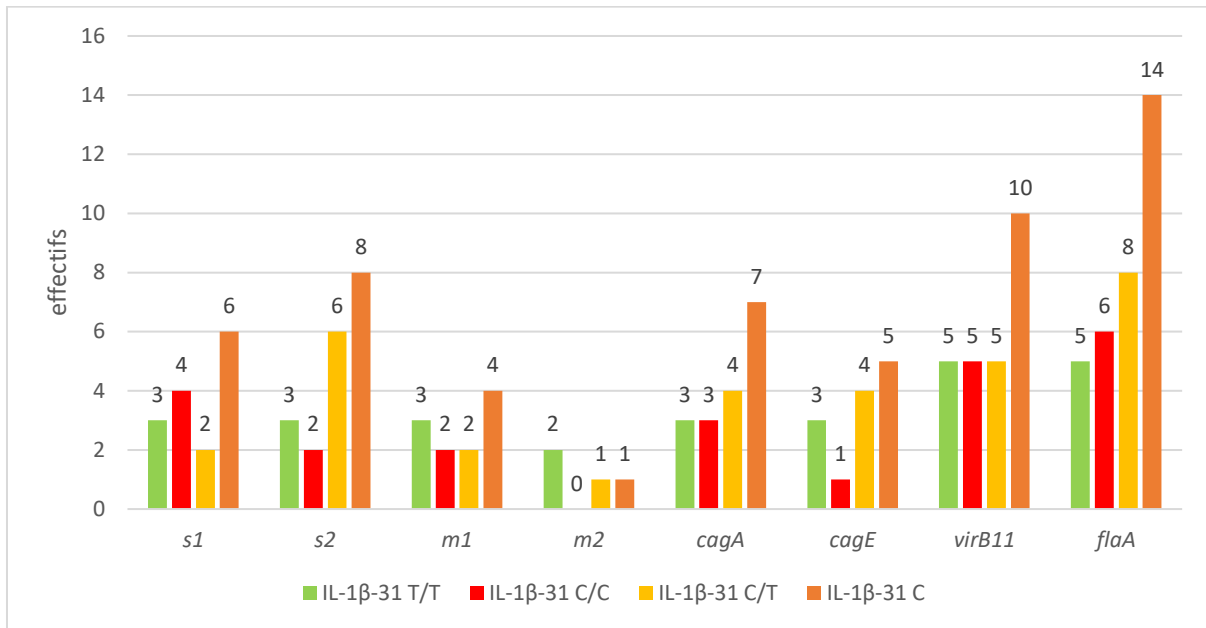


Figure 32 : Histogramme des interactions des génotypes de l'IL-1β-31 avec les facteurs de virulence de *H. pylori* chez les patients atteints d'une gastrite atrophique.  
s1 : région de signal 1 du facteur vac A ; s2 : région de signal 2 du facteur vac A ; m1 : région médiane 1 du facteur vac A ; m2 : région médiane 2 du facteur vac A ; cag A : gène cag A ; cag E : gène cag E ; vir B11 : gène vir B11 ; fla A : gène fla A ; IL-1β-31 : cluster du gène qui code pour l'Interleukin-1β dans la région du promoteur TATA-box à la position -31 ; C : allèle porteur de polymorphisme d'un simple nucléotide (SNP) C dans la région d'étude ; T : allèle porteur de polymorphisme d'un simple nucléotide (SNP) T dans la région d'étude.

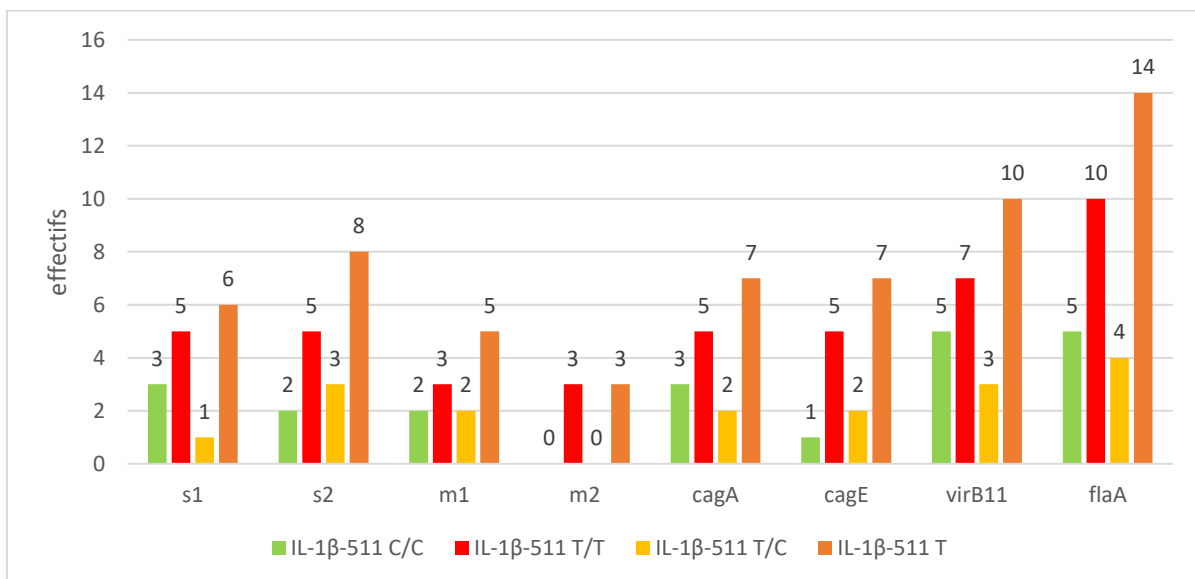
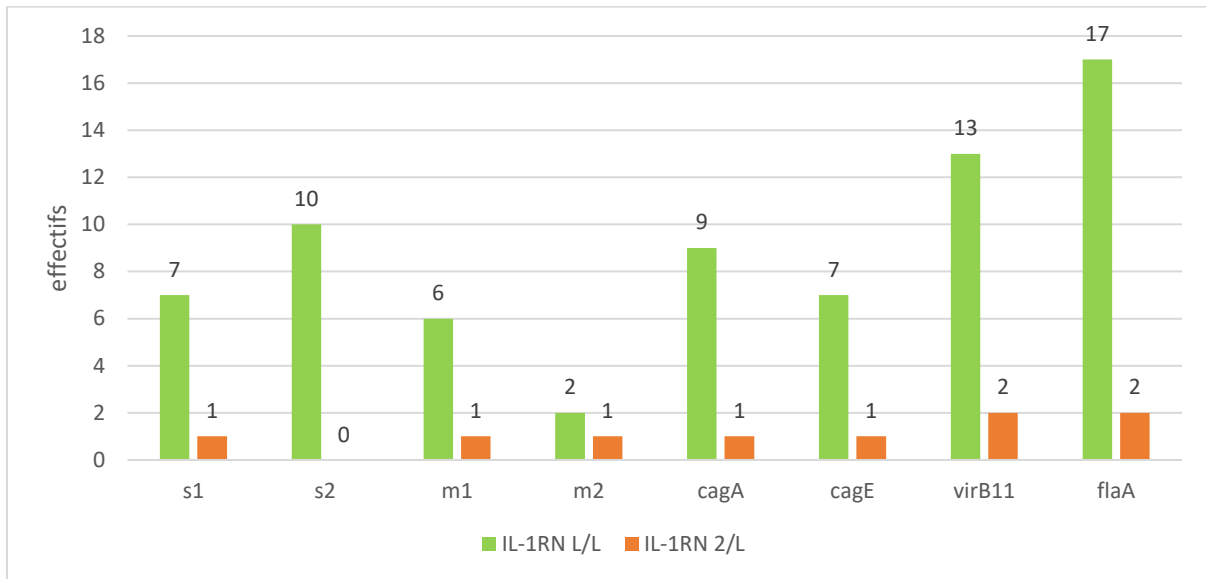


Figure 33 : Histogramme des interactions des génotypes de l'IL-1β-511 avec les facteurs de virulence de *H. pylori* chez les patients atteints d'une gastrite atrophique.  
s1 : région de signal 1 du facteur vac A ; s2 : région de signal 2 du facteur vac A ; m1 : région médiane 1 du facteur vac A ; m2 : région médiane 2 du facteur vac A ; cag A : gène cag A ; cag E : gène cag E ; vir B11 : gène vir B11 ; fla A : gène fla A ; IL-1β-511 : cluster du gène qui code pour l'Interleukin-1β dans la région du promoteur TATA-box à la position -511 ; C : allèle porteur de polymorphisme d'un simple nucléotide (SNP) C dans la région d'étude ; T : allèle porteur de polymorphisme d'un simple nucléotide (SNP) T dans la région d'étude.



*Figure 34 : Histogramme des interactions des génotypes de l'IL-1RN avec les facteurs de virulence de H. pylori chez les patients atteints d'une gastrite atrophique.*  
*s1 : région de signal 1 du facteur vac A ; s2 : région de signal 2 du facteur vac A ; m1 : région médiane 1 du facteur vac A ; m2 : région médiane 2 du facteur vac A ; cag A : gène cag A ; cag E : gène cag E ; vir B11 : gène vir B11 ; fla A : gène fla A ; IL-1RN : gène qui code pour antagoniste anti-inflammatoire (Interleukin-1ra) ; L : long génotype (> 3 répétitions ; allèles 1, 3, 4 et 5) ; 2 : court génotype (2 répétitions ; allèle 2) ; C : allèle porteur de polymorphisme d'un simple nucléotide (SNP) C dans la région d'étude ; T : allèle porteur de polymorphisme d'un simple nucléotide (SNP) T dans la région d'étude.*

# **III. Discussion**



### III. Discussion

Le cancer gastrique se développe à partir de la concomitance de trois facteurs : l'agent étiologique, l'hôte et l'environnement (Wang, et al., 2014). En ce qui concerne l'agent étiologique, plusieurs études ont mentionné l'existence de beaucoup d'indications que toutes les souches *H. pylori* ne sont pas équivalentes dans leur potentiel cancérigène et que ceux exprimant un déterminant de peptide immunodominant CagA ont un potentiel cancérigène élevé suite à une intensification de l'inflammation (Figura, et al., 2016). L'infection à l'*H. pylori* est la cause principale dans le développement du cancer gastrique (Parsonnet, et al., 1991; Rad, et al., 2003), mais seul un faible pourcentage des patients infectés (seulement 1 % - 3 %) développe une tumeur maligne (Rad, et al., 2003), il est d'un intérêt majeur d'identifier les bactéries et les marqueurs génétiques de l'hôte associés au développement du cancer.

Le rôle de l'hôte dans le développement de CG peut être important étant donné que la réponse inflammatoire à des infections varie d'un patient à l'autre en raison du polymorphisme des gènes de cytokines pro-inflammatoires et anti-inflammatoires. Plusieurs cytokines pro-inflammatoires sont produites par le système immunitaire en réponse à une infection à l'*H. pylori* ; parmi eux, l'IL-1 $\beta$  est d'une importance capitale ; un second facteur est le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- $\alpha$ ) ; les deux sont étroitement liés aux lésions épithéliales et l'hypochlorhydrie gastrique (Figura, et al., 2016). Il a été reconnu que les patients avec une sécrétion faible d'acide gastrique ont un risque accru de développer un cancer gastrique distale (Rad, et al., 2003). L'IL-1 $\beta$  augmente l'expression des molécules de surface sur les cellules endothéliales, ce qui provoque l'adhérence des leucocytes ; l'IL-1 $\beta$  induit également la production de chimiokines de type macrophage conduisant à l'activation des neutrophiles. Des recherches récentes ont révélé l'existence d'une régulation génétique de la réponse de la cytokine de l'hôte à des stimuli inflammatoires. Les variantes génomiques de l'IL-1 $\beta$  et TNF- $\alpha$  ont été montrées en corrélation avec les résultats cliniques de tumeurs, y compris CG (El-Omar, et al., 2000). L'IL-1 $\beta$ , qui est régulée à la hausse au cours de l'infection chronique de l'*H. pylori*, est un inhibiteur puissant de la sécrétion d'acide gastrique (Parsonnet, et al., 1991).

De nombreuses études ont été réalisées au cours des 15 dernières années, avec le champ d'application de l'identification d'un marqueur génétique qui peut déterminer si oui ou non les personnes portant l'infection à l'*H. pylori* pourraient être à risque de développer un CG (Figura, et al., 2016). Le paradigme de toutes les études ultérieures concernant CG à l'égard de

différents haplotypes de l'IL-1RN et l'IL-1 $\beta$  et la susceptibilité au CG chez les patients infectés par l'*H. pylori* a fait l'objet d'un article en 2000 par El-Omar et coll., sur 429 cas de cancer gastrique et 366 contrôles qui étaient inscrits en Écosse et en Pologne, les auteurs ont rapporté que les porteurs du génotype homozygote IL-1 $\beta$ -31\*C (65 % chez les patients et 49 % chez les témoins) et les porteurs de l'allèle IL-1RN\*2 de génotype homozygote (25 % dans les cas et 9 % chez les témoins) ont un risque accru de développer un cancer gastrique. Ces résultats ont été similaires dans les sous-groupes définis par l'âge, le sexe et le type histologique (El-Omar, et al., 2000; El-Omar, et al., 2001). Dans la même étude, ces génotypes ont été repérés pour augmenter la probabilité d'une réponse hypochlorhydrique chronique par l'infection à l'*H. pylori*. Ces résultats ont été considérés comme une interaction gène-environnement nécessaire à la contribution de l'IL-1 $\beta$ -31\*C et IL-1RN\*2 au développement de carcinomes gastriques à un stade précoce. Machado et coll. (2001) ont rapporté des résultats sur une population portugaise dans une étude cas-témoin de 152 cas de cancer gastrique et 220 contrôles. Cette étude a été réalisée sans prendre en compte de l'infection à l'*H. pylori* sur le rôle étiologique des allèles IL-1 $\beta$ -511\*T et IL-1RN\*2 et son association à un risque accru de développer un CG de type intestinal. L'étude a mentionné que, 67 % des patients contre 53 % des cas témoins étaient porteurs de l'allèle IL-1 $\beta$ -511\*T. Cependant, 15 % des patients, contre 9 % des contrôles étaient porteurs du génotype homozygote de l'allèle IL-1RN\*2. L'allèle IL-1 $\beta$ -511\*T et le génotype homozygote IL-1RN\*2/2 sont corrélés avec un risque important de développer un carcinome gastrique de type intestinal. Figueiredo et coll. (2002) ont confirmé l'influence de l'interaction bactérie/génotype de l'hôte sur le risque de développer un cancer de l'estomac en analysant les allèles IL-1 $\beta$ -511\*T et l'IL-1RN\*2 dans 221 sujets atteints de gastrites chroniques et 222 patients atteints de carcinomes gastriques et concomitants l'infection à l'*H. pylori*. Dans les pays occidentaux, le rôle de polymorphismes de l'IL-1 $\beta$  et IL-1RN dans le développement du cancer gastrique dans différents sites anatomiques et en combinaison avec d'autres variantes génétiques qui améliorent l'état pro-inflammatoire a été étudié (El-Omar, et al., 2003; Machado, et al., 2003). Le risque accru de développer un adénocarcinome gastrique non-cardia a été considéré comme un effet concevable de la susceptibilité génétique de l'hôte avec une hypochlorhydrie et la réponse atrophique de l'estomac par l'infection à l'*H. pylori* (El-Omar, et al., 2000; El-Omar, et al., 2001; Machado, et al., 2001).

Les premières informations sur la fréquence des génotypes de l'IL-1 $\beta$  dans la population asiatique remontent en 2001 (Hamajima, et al., 2001; Takashima, et al., 2001). Dans

d'autres études cas-témoins dans la population chinoise, l'allèle IL-1 $\beta$ -511\*T a donné la preuve d'une association significative du risque de cancer gastrique. Une seule de ces études a révélé un rôle étiologique potentiel pour l'allèle IL-1RN\*2 (Zeng, et al., 2003; Ruzzo, et al., 2005; Li, et al., 2007).

Jusqu'aujourd'hui, les études de polymorphisme des gènes IL-1 $\beta$  et TNF- $\alpha$  ont mentionné que ce sont les seules cytokines pro-inflammatoires qui ont le pouvoir d'accentuer éventuellement le risque de CG sur de différents sites anatomiques gastriques (El-Omar, et al., 2003; Figura, et al., 2016). Par conséquent, l'IL-1 $\beta$  était considérée comme un effet concevable de susceptibilité génétique de l'hôte avec une hypochlorhydrie gastrique et la réponse atrophique à l'infection à l'*H. pylori* (Machado, et al., 2003), mais seulement si l'origine ethnique des patients n'est pas considérée (Figura, et al., 2016). Plusieurs études sur l'association des génotypes de l'IL-1 $\beta$  et IL-1RN sur des populations asiatiques et caucasiennes montrent que l'IL-1 $\beta$ -511\*T porte une association significative avec le risque de CG (Wang, et al., 2007). Les allèles IL-1 $\beta$ -511\*T et IL1RN\*2 ont été associés à un risque accru de développer un CG chez les Caucasiens et avec un risque très élevé en présence de l'*H. pylori*. Cependant, une propagation modérée chez les Hispaniques et absente chez les Asiatiques des deux allèles (Camargo, et al., 2006; Persson, et al., 2011; Xue, et al., 2010; Bonequi, et al., 2013).

Une seule étude sur les polymorphismes de l'IL-1 $\beta$  et IL-1RN et leur association avec le cancer gastrique a été réalisée dans le monde arabe sur une population d'Arabe d'Oman portée sur 118 cas de CG et 245 cas témoins. Cette étude a montré que le porteur de l'allèle l'IL-1RN\*2 intensifie le risque de CG. En revanche, l'allèle IL-1 $\beta$ -31\*C n'a pas été associé à un risque de développer un CG (Mansour, et al., 2006). Dans une étude en Afrique sur l'association de ces polymorphismes sur différentes pathologies gastriques (sans prendre en compte du CG) chez des patients infectés par l'*H. pylori* a témoigné en faveur de l'association de l'allèle IL-1 $\beta$ -511\*T sur les gastrites, les reflux gastro-intestinaux et l'ulcère gastrique (Andrew, 2012).

À notre connaissance, aucune étude n'a été réalisée dans le Nord-Africain ou encore si en prend en charge la présence de CG dans l'étude dans tout le continent Africain sur l'association des polymorphismes de l'IL-1 $\beta$  et IL-1RN de façon concomitante à l'infection à l'*H. pylori* sur le développement CG. Dans le présent travail, nous avons évalué l'association entre les polymorphismes SNP de l'IL-1 $\beta$  et IL-1RN (VNTR) et le risque de GA et le CG dans une population de l'Ouest Algérien.

Nous avons constaté que l'allèle IL-1 $\beta$ -31\*C dans notre étude a été associée à un risque accru de développer un CG (OR : 4,614 ; p : 0,01). Nos résultats sont en conformité avec les études précédentes sur les populations caucasiennes. Toutefois, ces résultats diffèrent avec ceux enregistrés chez les populations asiatiques et d'Arabe d'Oman (El-Omar, et al., 2000; Machado, et al., 2001; El-Omar, et al., 2003; Shunji, et al., 2001; Mansour, et al., 2006). Un faible risque de CG chez les Asiatiques porteurs du génotype l'IL-1 $\beta$  -31\*C/C a été confirmée (Figura, et al., 2016).

Dans notre population, le génotype hétérozygote de l'allèle IL-1RN\*2 est associé à un risque accru de développer un CG (OR : 4,2 ; p : 0,022) en comparaison avec le génotype homozygote pour la seule raison que la fréquence du même génotype homozygote été très faible, voir même nulle pour être analysé statistiquement chez les patients CG. En outre, l'analyse des patients CG, sans stratification histologique, site anatomique ou pays d'origine dans les populations caucasiennes, asiatique et hispanique, a montré que les patients porteurs de l'allèle homozygote IL-1RN\*2 avaient un risque significatif de développer un cancer. Le risque a été trouvé à la fois dans la néoplasie type cardia et non-cardia.

Nos résultats de l'analyse de l'allèle IL-1 $\beta$ -511\*T ne rapporte aucune association avec CG, cela est en discordance avec les résultats des études précédentes dans les populations caucasiennes (El-Omar, et al., 2000; El-Omar, et al., 2001; Machado, et al., 2001; Rad, et al., 2003), cependant, nous avons mentionné une association significative avec GA pour le même allèle dans notre étude. Le polymorphisme de l'IL-1 $\beta$ -511 (SNP C/T) dans les populations d'une ethnicité différente : Sous-analyse des différentes populations a révélé une association significative du CG avec ce polymorphisme dans les études cas-témoins (OR = 1,20, IC à 95 % : 1,00 à 1,43) (Xu, et al., 2013). L'association est plus cohérente si seules les populations caucasiennes sont analysées. Néanmoins, si elles étaient prises ensemble, les études ont échoué à montrer l'association après stratification par groupes ethniques. Le polymorphisme IL-1 $\beta$ -511\*C/T selon le site de la tumeur à montrer une association significative pour les CG lorsque le site de la tumeur (cardia vs non-cardia) a été pris en compte, ainsi que pour les sous-types histologiques (intestinales ou diffuses/mixte). L'association a été présente dans le CG non-cardia (OR = 1,57, IC à 95 % : 1,06 à 2,31), ainsi que dans le CG de type intestinal (respectivement OR = 1,57, IC à 95 % : 1,06 à 2,31 et OR = 1,24, 95 % CI : 1,04 à 1,49) (Xu, et al., 2013). Une autre étude menée en 2010 sur une population au Mexique a révélée que les allèles IL-1 $\beta$ -511\*C et IL-1 $\beta$ -31\*T jouent un rôle dans le développement des GA et des ulcères

gastriques (Martínez-Carrillo, et al., 2010). Les auteurs ont soulevé des résultats divergents par rapport à toutes les études menées sur les deux SNP de l'IL-1 $\beta$  dans les populations caucasiennes et hispaniques (Camargo, et al., 2006; Persson, et al., 2011; Xue, et al., 2010; Bonequi, et al., 2013).

Malgré la forte incidence de l'infection à l'*H. pylori* dans la population mondiale, seule une petite partie de ce groupe a développé un cancer gastrique (Konturek, et al., 2003; Vieth & Stolte, 2006). L'interaction des bactéries avec l'hôte qui détermine l'apparition de la maladie est encore l'objet de nombreuses études. La capacité de ces bactéries pour déclencher un néoplasme ne se limite pas à la réponse inflammatoire et immunitaire à l'infection qu'ils provoquent, mais elle réside aussi dans une série de facteurs de bactéries capables d'inciter et de moduler le processus cancérigène (Odenbreit, et al., 2000). L'association de facteurs génétiques de l'hôte, l'environnement et la présence de gènes associés à la virulence de la bactérie déterminent probablement les conditions pour le développement des pathologies graves, dont le cancer de l'estomac.

L'*H. pylori* est l'une des bactéries qui ont un génome génétiquement hétérogène. Parmi les facteurs de virulence qui peuvent jouer un rôle essentiel dans la diversité des résultats cliniques, nous pouvons mettre en évidence la présence de CagA et son îlot de pathogénicité (*cag-PAI*) et VacA, ainsi que le gène *fla A* (Ahn & Lee, 2015; Khatoun, et al., 2016).

Le gène *vac A* est un important facteur de virulence présent dans toutes les souches de l'*H. pylori* et plus de la moitié exprime ce gène (Ahn & Lee, 2015). En fonction des variations in vitro de capacités vacuolante, des études ont rapporté des différences dans la région de signal (*s1* et *s2*), les régions médianes (*m1* et *m2*) (Ahn & Lee, 2015). Dans la présente étude, nous avons constaté que les allèles *vac A s1* (100 %) et de *vac A m1* (93,7 %), étant associé *vac A s1/m1* (93,7 %) sont entièrement associés au cancer gastrique. Nos résultats sont en concordance avec les études précédentes où *vac A s1/m1* a été lié aux maladies gastro-intestinales les plus graves, y compris le carcinome gastrique (Basso, et al., 1998; van Doorn, et al., 1998; Ashour, et al., 2002). Plusieurs études ont indiqué que par rapport aux souches *s2* ou *m2*, les personnes qui ont été infectées par des souches *vac A s1* ou *m1* peuvent avoir un risque accru de CG et/ou des ulcères gastroduodénaux dans différentes régions en Afrique, en Amérique latine, en Europe occidentale, en Iran et au Moyen-Orient (Sugimoto, et al., 2009; Sugimoto & Yamaoka, 2009; Ahn & Lee, 2015).

Un autre important facteur de virulence chez l'*H. pylori* liée à l'apparition de troubles gastriques est l'îlot de pathogénicité *cag-PAI* (Khatoun, et al., 2016). En raison de son association avec plusieurs pathologies gastroduodénales, au départ *cag A* a été considéré comme marqueur d'intégrité de l'îlot de pathogénicité *cag-PAI*. Néanmoins, des études récentes ont démontré que, malgré sa présence, l'intégrité de *cag-PAI* donne des résultats cliniques variés. (van Doorn, et al., 1998; Audibert, et al., 2001; Ikenoue, et al., 2001; Sozzi, et al., 2005).

Il y a beaucoup d'indications que les souches exprimant le *cag A* étaient dotées à augmenter l'inflammation et le potentiel cancérigène. Des études épidémiologiques et génomiques suggèrent que le développement de CG est une conséquence possible de l'infection par des souches qui expriment le CagA. En effet, en utilisant les gerbilles de Mongolie infectées expérimentalement, seulement les souches *H. pylori CagA* positives (+ *cag A*) étaient capables d'induire des tumeurs gastriques (Crabtree, et al., 1993; Figura, et al., 1996; Parsonnet, et al., 1997; Enroth, et al., 2000; Peek & Blaser, 2002; Figura, et al., 2016). En outre, pratiquement tous les patients atteints du CG de type diffus (avec un OR de 9,0) avaient des souches *H. pylori cag A*-positif (Parsonnet, et al., 1997).

La prévalence de *cag A* a varié de façon spectaculaire, elle atteint près de 100 % en Asie de l'Est, moins de 50 % dans certains pays de l'ouest et 70 % dans le monde occidental. Dans les pays occidentaux, les personnes infectées par des souches *cag A*-positif ont été plus susceptibles à développer de l'ulcère gastroduodéal ou adénocarcinome gastrique par rapport aux souches *cag A*-négatif (Khatoun, et al., 2016). Sans tenir compte de la maladie, en Asie de l'Est, la plupart des souches *H. pylori* possèdent un gène *cag A* ; par conséquent, la différence pathogénique en Asie de l'Est est difficile à expliquer en se basant sur l'existence du gène *cag A* seul (Yamaoka, et al., 1999; Ahn & Lee, 2015). Ainsi, les circonstances combinées qui permettent à *cag A* à instaurer la cancérogenèse restent floues (Ahn & Lee, 2015). D'autres auteurs ont trouvé des fréquences de *cag A* suivantes : 66,8 % chez les patients Espagnols, 88,9 % des Hong-kongais, 31,8 % des Portugais, 26,4 % des Colombiens, 75,3 % des Brésiliens, 61,8 % des Saoudiens et 26,4 % des Jordaniens avec diverses maladies gastro-intestinales (Alarcón, et al., 1999; Nogueira, et al., 2001; Yu, et al., 2001; Mattar, et al., 2005; Nimri, et al., 2006; Marie, 2012; Almeida, et al., 2015). Dans des études cas-témoins le gène *cag A* a été identifié chez 88,2 % des CG contre 60 % chez les témoins infectés par *H. pylori* en Allemagne et 77,9 % des CG contre 69,2 % chez les témoins en Colombie (Miehlke, et al., 2000; Trujillo, et al., 2014). Le risque de gastrite chronique, gastrite atrophique, métaplasie et



cancer gastrique non-cardia avec *cag-PAI* intact est beaucoup plus élevé par rapport à ceux qui ne disposaient pas (Khatoon, et al., 2016). Chomvarin et coll. (2008) ont fait l'étude sur des patients thaïlandais atteints de diverses pathologies gastro-intestinales, ont soulevé une fréquence de 88,4 % de *H. pylori cag A (+)*.

En ce qui concerne la fréquence des *cag A* dans la GA, été présent chez 60 % au Brésil (Brito, et al., 2003) et 75,3 % au Costa-Rica (Con, et al., 2007). Dans notre étude, nous avons détecté une fréquence de 93,7 % du gène *cag A* des cas de CG et de 37 % des cas de GA. Cette fréquence concernant CG reste parmi les plus élevées dans le monde, elles se rapprochent de ceux de l'Asie de l'Est sans tenir compte de la maladie dans cette région (Yamaoka, et al., 1999). Cependant la fréquence de *cag A* dans notre population GA est inférieure aux résultats mondiaux, mais elle se rapproche aux résultats des patients jordaniens, portugais et Hong-Kongais, mais sans tenir compte de GA seul (Nogueira, et al., 2001; Yu, et al., 2001; Nimri, et al., 2006; Almeida, et al., 2015).

Ces dernières années, la combinaison de gènes *vac A* et *cag A* a été étudiée et liée à la diversité des maladies gastro-intestinales, où la combinaison de *cag A* et *vac A/s1/m1* était associée aux maladies les plus graves. Dans notre étude, une relation plausible entre la présence du gène *cag A* et le sous-type *vac A/s1/m1* et le cancer gastrique. Nous avons observé une fréquence très élevée de ces gènes dans notre étude, ces fréquences corroborent avec celle rapportée dans les études précédentes. Figueiredo et coll. (2002) ont constaté que les souches avec allèles *s1, m1* de *vac A* et *cag A* étaient plus fréquents chez les patients atteints d'un CG. Une autre étude sur des patients Turcs qui souffre de dyspepsie a démontré que les souches de l'*H. pylori* de génotypes *vac A s1a, cag A, et cag E* ont des associations significatives avec la présence de l'ulcère duodéal et de CG. Les génotypes *H. pylori vac A s1a* et *cag A* ont une relation significative avec la présence de l'ulcère gastroduodéal et CG chez les patients Iraniens qui souffre de dyspepsie (Alikhani, et al., 2014). Alors que dans certaines études les génotypes de *cag E* et *vac A* sont des prédicteurs indépendants de l'ulcère duodéal, le génotype de *cag E* est un des prédicteurs indépendants de CG dans d'autres études (Erzin, et al., 2006).

La réponse individuelle à ces gènes est très variable au sein de différentes populations, bien que la vraie raison ne soit pas encore clarifiée. Nous croyons que les facteurs de l'hôte associés à la virulence de la souche infectante sont les principaux facteurs impliqués dans diverses maladies provoquées par l'*H. pylori*. Malgré la plus grande pathogénicité des souches avec *cag A* génotype (+) et *vac A/s1/m1*, la relation entre ces génotypes est encore



inconnue. Il était prouvé qu'il n'y a aucun lien physique entre les deux gènes de l'*H. pylori* (Ashour, et al., 2001).

Concernant la présence de *cag E* seul, nous l'avons trouvé chez 93,75 % des cas de CG et chez 37 % des cas de GA. Erzin et coll. (2006) en Turquie ont révélé un taux de 59,3 % de *cag E* dans divers troubles gastriques et une fréquence de 81,8 % des cas de CG. Lehours et coll. (2004) ont constaté que le gène *cag E* été présent dans 48,8 % des cas de lymphome de MALT et 56,4 % des cas de gastrite. Chomvarin et coll. (2008) ont enregistré chez des patients atteints de dyspepsie une fréquence de 88,4 % de *cag E*. Audibert et coll. (2001) ont constaté chez des patients atteints de diverses maladies du tractus gastro-intestinal une fréquence de 53,8 % de *cag E* dans les cas où *cag-PAI* était intact. Malgré son existence dans plusieurs études, le gène *cag E* dans CG n'a été pas inclus dans la grande majorité des études où il est regroupé en un petit nombre avec d'autres troubles gastriques.

Les études concernant l'intégrité de *cag-PAI* montrent l'importance de *cag E* dans le développement des pathologies gastriques. Kauser et coll. (2004) ont analysé des souches de patients provenant de huit pays afin de vérifier l'intégrité de *cag-PAI*. Les auteurs ont observé les fréquences de *cag E* suivantes : 100 % des souches japonaises et espagnoles, 95,3 % des souches péruviennes, 94,7 % de souches en Afrique, 80,9 % dans les souches indiennes, 80 % dans les souches du Costa-Rica, 71,2 % dans les souches de l'Angleterre et de 68,4 % dans les souches irlandaises. Comme nous pouvons le constater, il y a peu d'études qui incluent le cancer gastrique, cependant, de différentes fréquences de *cag E* caractérisent la diversité trouvée dans différentes souches circulantes de l'*H. pylori* dans le monde. Nos souches chez la population CG se rapprochent des souches africaines, péruviennes, espagnoles et japonaises (Kauser, et al., 2004). Toutefois, la fréquence des souches de l'*H. pylori cag E-positif* dans notre population GA reste inférieur par rapport aux autres souches étudiées dans différentes populations.

Les travaux sur la relation de l'intégrité de *cag-PAI* associés à la maladie sont encore controversés. Il existe plusieurs gènes qui sont utilisés comme marqueurs d'intégrité de *cag-PAI*, néanmoins les études varient quant au choix de ces gènes (Owen, et al., 2001; Kauser, et al., 2004; Sozzi, et al., 2005). Le gène *cag A* décrit comme le meilleur marqueur de l'îlot *cag-PAI* (Jenksa, et al., 1998; Maeda, et al., 1999). Cependant, dans des études plus récentes, le gène *cag E* a été cité comme meilleur marqueur de l'intégrité du *cag-PAI* que le gène *cag A* (Audibert, et al., 2001; Ikenoue, et al., 2001; Kauser, et al., 2004; Sozzi, et al., 2005). Parmi les gènes utilisés dans plusieurs études, nous avons mis en évidence les gènes *cag A* et *cag E*.

L'importance de l'intégrité est due, probablement au fonctionnement du système de sécrétion de type IV, du fait que si l'une des protéines qui le composent est absente, il devient incapable de transloquer des bactéries pour héberger les protéines cellulaires (Owen, et al., 2001; Sozzi, et al., 2005).

Considérant la fonction des gènes et leur utilisation comme marqueurs d'intégrité dans cette étude, nous avons utilisé les gènes *cag A* et *cag E*, sur le côté droit (extrémité 5') des marqueurs de l'îlot *cag-PAI* et le gène *vir B11* comme un marqueur sur le côté gauche de *cag-PAI* (extrémité 3'). Nous avons constaté dans notre étude une fréquence de 93,75 % des cas CG et 29,63 % des cas de GA infectés par la *H. pylori* de type *cag-PAI* intact (*cag A*, *cag E* et *vir B11*). Toutefois, si en considérant la présence d'au moins un côté droit de marqueur et un autre du côté gauche, la fréquence reste à 29,63 % qui correspond à la fréquence de *cag E* chez les GA.

Dans la présente étude, nous avons constaté qu'en général, le *cag A* était plus souvent détecté que le *cag E* dans les deux groupes ensemble (CG et GA). Néanmoins, dans certains cas, la détection de ces gènes n'a pas été en chevauchement, mais complémentaires, ce qui suggère que les deux gènes utilisés ensemble sont des meilleurs marqueurs du côté droit de l'îlot *cag-PAI*. En ce qui concerne le bord gauche (extrémité-3') de l'îlot *cag-PAI*, qui nécessiterait un autre gène pour permettre une bonne comparaison, le *vir B11* à une fréquence supérieure à celle retrouvée chez *cag E* et *cag A* dans les deux populations d'études.

Bien qu'il soit un élément important du système de sécrétion de type IV de *H. pylori*, le gène *vir B11* a été peu étudié, en particulier en ce qui concerne le CG. Au meilleur de notre connaissance, dans notre étude, la première faite avec ce gène en Algérie, la fréquence des *vir B11* a été de 93,75 % des CG et 55,56 % des GA. Sur deux études italiennes, le *vir B11* a été trouvé chez 90 % des cas des patients souffrant de dyspepsie (Tomasini, et al., 2003), tandis que Sozzi et coll. (2005) ont trouvé 94,7 % des cas des patients atteints de diverses maladies gastro-intestinales.

Des études sur l'intégrité de l'îlot *cag-PAI* indiquent l'existence d'une variation dans l'association de la gravité de la maladie. Ikenoue et coll. (2001) ont étudié chez des patients Japonais (où l'incidence du cancer de l'estomac est l'un des plus élevés au monde) qui souffrent d'ulcères gastroduodénaux, le cancer gastrique et la gastrite chronique, les fréquences de *cag-PAI* intact étaient de 100 %, 100 % et 92,7 %, respectivement. En outre, Kauser et coll. (2004)

ont analysé l'intégrité de *cag-PAI* sur des patients de différents pays, et ont trouvé une variation significative de l'intégrité de *cag-PAI* au sein des populations. Parmi les souches japonaises, 57,1 % avaient un *cag-PAI* intact, contrairement à l'isolat du Costa-Rica, aucun n'avait l'îlot complet. Les fréquences chez les autres pays étaient les suivantes : 18,6 % dans les isolats du Pérou, 15,8 % dans les souches de l'Irlande, 13,3 % des isolats espagnols, 12 % des échantillons provenant de l'Inde, 11,1 % des isolats africains et 3,03 % des isolats de l'Angleterre. Lorsque ces auteurs ont lié la gravité de la maladie et l'intégrité de *cag-PAI* n'ont trouvé aucune association. Cependant, dans ces études, les souches de différents pays regroupées avec différentes maladies gastro-intestinales et le cancer gastrique n'ont pas été traitées séparément. Audibert et coll. (2001) ont analysé la structure de *cag-PAI* chez les patients atteints de diverses maladies gastro-intestinales (sans prendre en compte le cancer gastrique) ils ont trouvé l'intégrité de l'îlot dans 54,3 % des échantillons. Tomasini et coll. (2003) ont étudié chez des patients italiens avec dyspepsie, ils ont trouvé une fréquence de 75,3 % d'intégrité de *cag-PAI*, tandis que, Sozzi et coll. (2005), ont constaté une fréquence de 57,9 %, également chez les patients Italiens avec des gastrites atrophiques, des gastrites non atrophiques et des ulcères duodénaux. Ces variations peuvent être dues à l'utilisation des marqueurs différents, d'où la nécessité d'une normalisation du choix des marqueurs d'intégrité et également le gène de virulence potentielle et pas seulement sa position dans l'îlot.

Afin de vérifier un génotype prédominant dans le cancer gastrique et l'influence de la gravité du cancer, nous avons regroupé les gènes étudiés par rapport aux sous-types de *vac A* et de l'intégrité de *cag-PAI*. Dans la même distribution, nous avons constaté que le génotype de l'*H. pylori* le plus fréquent était de *cag-PAI* intact (*cag A*, *cag E*, *vir B11*) et *vac A s1/m1* (93,75 %), dont l'*H. pylori* était un génotype le plus virulent à l'égard des motifs considérés dans la présente étude.

La fréquence élevée des génotypes les plus virulents étudiés dans le cancer gastrique soutient l'hypothèse où le développement du cancer gastrique a été associé à des souches les plus virulentes. En considérant les groupes, il y avait plusieurs modèles dépendants de la virulence de la souche. Compte tenu de l'analyse épidémiologique, il semble y avoir une variation de la prévalence des souches selon le sexe, car, malgré que les souches les plus virulentes chez les GA ont été présentes dans les deux sexes, les femmes étaient les plus fréquentes. Ceci peut être lié à la présence de facteurs de risque tels que la consommation d'alcool et de tabac chez les patients infectés par des souches moins virulentes. En effet, nous

avons constaté que 70 % des patients hommes avec des souches moins virulentes ont été des fumeurs et 40 % était alcoolique chez les GA. Au même degré que GA, nous avons trouvé 66,66 % de patients hommes avec des souches virulentes ont été des fumeurs et 44,44 % était alcooliques chez les CG.

Outre la complexité de ce sujet, la perspective créée par l'affirmation selon laquelle les facteurs de l'hôte, tels que la façon dont l'hôte réagit à des stimuli infectieux, peuvent être importants dans le développement de CG nous éclaire dans la façon de prévenir les populations à risque. Éventuellement, les haplotypes de l'IL-1 trouvés ont augmenté le risque de CG. D'après les analyses, il apparaît que les marqueurs utilisés étaient appropriés, car il a permis d'obtenir des déductions sur le génotype de la relation avec les différents aspects de la pathogenèse gastrique. Pour ces analyses, nous avons noté l'importance de l'intégrité des *cag-PAI* et leur association avec la variation allélique *VacA s1/m1*. Concernant les haplotypes du gène IL-1, IL-1 $\beta$ -31\*C et IL-1RN\*2 ont été associés à un risque accru de développer un carcinome gastrique et l'IL-1 $\beta$ -511\*T à un risque accru de développer une gastrite chronique atrophique. Cependant, il y a eu un besoin d'études supplémentaires avec d'autres gènes potentiellement virulents de l'*H. pylori*, qui pourrait expliquer la présence de souches moins pathogènes associées à la pathologie gastrique. En outre, il faut souligner que la complexité de la cancérogenèse gastrique implique l'addition de facteurs d'infection à l'*H. pylori*, l'environnement et le caractère génétique de l'hôte.

# Conclusion

## Conclusion

Le cancer gastrique, troisième cause de mortalité dans le monde reste une maladie hautement destructible avec un très mauvais pronostic. De nombreux facteurs, y compris la virulence bactérienne, le caractère génétique de l'hôte et les facteurs environnementaux interagissent et provoquent des résultats cliniques variables. L'infection à l'*H. pylori*, est l'une des infections bactériennes chroniques les plus répandues dans le monde est considéré comme un facteur majeur pour la carcinogenèse de la muqueuse gastrique; toutefois, le cancer gastrique se développe seulement sur 1 à 3 % des patients infectés par l'*H. pylori*. Ce pourcentage indique que les souches de l'*H. pylori* ne sont pas toutes incriminées dans le développement de CG. Ce développement dépend des facteurs génétiques de l'hôte à la suite d'une réponse à cette infection.

La prédisposition génétique de l'hôte et la bactérie apportent un éclairage considérable sur la pathogenèse de cette maladie et a mettent en évidence le rôle de l'infection et l'inflammation chronique dans le cancer gastrique. De toute évidence, le cancer gastrique est une tumeur maligne axer sur une inflammation induite par l'infection qui se développe après plusieurs décennies chez les personnes ayant une prédisposition génétique.

Les polymorphismes de l'IL-1 $\beta$  et IL-1RN en présence de l'*H. pylori* sur la muqueuse gastrique ont contribué au développement des carcinomes gastriques dans notre population d'étude. Sur cette population, les individus porteurs de l'allèle IL-1 $\beta$ -31\*C et de l'IL-1RN\*2 ont été associés à un risque accru de développer un CG. En revanche, les individus porteurs de l'IL-1 $\beta$ -511\*T n'ont aucune association significative de développer un carcinome gastrique, mais de développer une gastrite chronique atrophique. Ces résultats initiaux dans notre population d'étude ont mis en évidence l'intérêt des études sur l'ethnicité dans l'effet de polymorphisme de l'IL-1 $\beta$  et IL-1RN en présence des facteurs de virulence de l'*H. pylori* sur la carcinogenèse de la muqueuse gastrique qui varie selon la région. D'autres études dans différentes régions dans le nord de l'Afrique sont suggérées pour permettre une bonne compréhension de la carcinogenèse de la muqueuse gastrique.

Comme nous avons pu le voir, de nombreux facteurs de l'*H. pylori* ont été impliqués dans la pathogénicité de cette bactérie. La prospection des facteurs de virulence a révélé que les gènes et des régions spécifiques telles que *cag A*, *vac A s1/m1*, et l'intégrité de l'îlot de pathogénicité de l'*H. pylori cag-PAI* ont été liés à l'évolution du cancer gastrique. Cependant, l'extrémité gauche de l'îlot, en occurrence le *vir B11* seul a été lié au développement de GA.

Il ressort de notre étude que le risque de cancer est la somme de la nature polymorphe de la population bactérienne des phénotypes mesurable dans l'hôte, le génotype de l'hôte (l'ethnicité dans l'effet de polymorphisme de l'IL-1 $\beta$  et IL-1RN), et les expositions environnementales, comme le tabagisme, l'alcool et l'alimentation qui affectant chaque niveau des interactions à long terme et peuvent fortement influencer la sévérité des lésions engendrées par la présence de l'*H. pylori* sur la muqueuse gastrique.

Cette étude a fourni une meilleure compréhension de la pathogenèse du cancer gastrique, et mis en évidence des cibles ou des biomarqueurs thérapeutiques potentiels pour faciliter le diagnostic et le pronostic dans notre population.

La compréhension des interactions entre l'*H. pylori* et les cellules immunitaires, devraient conduire à de nouvelles informations importantes sur les mécanismes de persistance de l'*H. pylori* et peut également aiguiller à l'élaboration de nouvelles approches thérapeutiques pour l'éradication de l'*H. pylori* à un âge précoce, avant que des changements irréversibles sont installés. Être en mesure de cibler les groupes à risque accru de cancer gastrique, défini par un profil génétique robuste, éviterait la nécessité d'un traitement d'éradication de masse avec ses incertaines conséquences négatives à long terme. Quant à l'avenir, la lutte contre le cancer de l'estomac, compte tenu de l'hétérogénéité de ce cancer, en utilisant une stratégie de traitement à tous les patients sera probablement inefficace ; par conséquent, la médecine personnalisée en utilisant la thérapie ciblée est plus adaptée pour cette maladie, et le profil moléculaire sera probablement au cœur de cette stratégie. Avec les progrès technologiques, il sera plus facile, plus rapide et moins coûteux de définir une gamme complète de loci de risque génétique qui sont spécifiques à l'origine ethnique des patients.



# Références Bibliographique

## Références Bibliographie

- Ahn, H. J. & Lee, D. S., 2015. Helicobacter pylori in gastric carcinogenesis. *World J Gastrointest Oncol*, 7(12), p. 455–465.
- Alarcón, T., Domingo, D., Martínez, M. J. & López-Brea, M., 1999. cagA gene and vacA alleles in Spanish Helicobacter pylori clinical isolates from patients of different ages. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 24(2), pp. 215-219.
- Alikhani, M. et al., 2014. Evaluation of Helicobacter pylori vacA and cagA Genotypes and Correlation With Clinical Outcome in Patients With Dyspepsia in Hamadan Province, Iran. *Iran Red Crescent Med J*, 16(11).
- Alison, M. R., Brittan, M., Lovell, M. J. & Wright, N. A., 2006. Markers of Adult Tissue-Based Stem Cells. *Handbook of Experimental Pharmacology*, Volume 174, pp. 185-227.
- Allen, A. & Flemström, G., 2005. Gastroduodenal mucus bicarbonate barrier: protection against acid and pepsin. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 288(1), pp. C1-C19.
- Almeida, N. et al., 2015. Correlation of Helicobacter pylori genotypes with gastric histopathology in the central region of a South-European country. *Dig Dis Sci*, 60(1), pp. 74-85.
- Andersen, L. & Rasmussen, L., 2009. Helicobacter pylori-cocoid forms and biofilm formation. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 56(2), pp. 112-115.
- Andoh, A. et al., 2007. Role of intestinal subepithelial myofibroblasts in inflammation and regenerative response in the gut. *Pharmacology & Therapeutics*, 114(1), p. 94–106.
- Andrew, N. K., 2012. IL-1B-511 Allele T and IL-1RN-L/L Play a Pathological Role in Helicobacter Pylori (H. Pylori) Disease Outcome in the African Population. *Ethiop Journal of Health Sci*, 22(3), pp. 163-9.
- Ardlie, K. G., Kruglyak, L. & Seielstad, M., 2002. Patterns of linkage disequilibrium in the human genome. *Nat Rev Genet*, 3(4), pp. 299-309.
- Ashour, A. A. et al., 2002. Distribution of vacA genotypes in Helicobacter pylori strains isolated from Brazilian adult patients with gastritis, duodenal ulcer or gastric carcinoma. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 33(3), pp. 173-178.
- Ashour, A. A. R. et al., 2001. iceA Genotypes of Helicobacter pylori Strains Isolated from Brazilian Children and Adults. *J. Clin. Microbiol.*, 39(5), pp. 1746-1750.
- Atherton, J. C., 2006. The pathogenesis of Helicobacter pylori-induced gastroduodenal diseases. *Annu Rev Pathol*, Volume 1, pp. 63-96.
- Atherton, J. C. et al., 1995. Mosaicism in Vacuolating Cytotoxin Alleles of Helicobacter pylori, ASSOCIATION OF SPECIFIC vacA TYPES WITH CYTOTOXIN PRODUCTION AND PEPTIC ULCERATION. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(30), pp. 17771-17777.
- Audibert, C., Burucoa, C., Janvier, B. & Fauchère, J. L., 2001. Implication of the Structure of the Helicobacter pylori cag Pathogenicity Island in Induction of Interleukin-8 Secretion. *Infect. Immun.*, 69(3), pp. 1625-1629.
- Bassoa, D. et al., 1998. Analysis of Helicobacter pylori vacA and cagA genotypes and serum antibody profile in benign and malignant gastroduodenal diseases. *gut*, 43(2), pp. 182-186.

- Bidwell, J., Keen, L., Gallagher, G. & al., e., 1999. Cytokine gene polymorphism in human disease: on-balance line databases.. *Genes Immun*, Volume 1, p. 3–19.
- Blanpain, C., Horsley, V. & Fuchs, E., 2007. Epithelial Stem Cells: Turning over New Leaves. *Cell*, 128(3), p. 445–458.
- Bonequi, P. et al., 2013. Risk factors for gastric cancer in Latin America: a meta-analysis. *Cancer Causes & Control*, 24(2), pp. 217-231.
- Brito, C. A. et al., 2003. Prevalence of cagA and vacA genes in isolates from patients with Helicobacter pylori-associated gastroduodenal diseases in Recife, Pernambuco, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 98(6).
- Broz, P. & Monack, D., 2011. Molecular mechanisms of inflammasome activation during microbial infections. *Immunol Rev*, 243(1), pp. 174-90.
- Camargo, M. C. et al., 2006. Interleukin-1 $\beta$  and Interleukin-1 Receptor Antagonist Gene Polymorphisms and Gastric Cancer: A Meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 15(9), pp. 1674-1687.
- Canaan, S., Roussel, A. V. R. & Cambillau, C., 1999. Gastric lipase: crystal structure and activity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1441(2-3), pp. 197 - 204.
- Chaput, C. & Boneca, I. G., 2006. Bases moléculaires de l'interaction de Helicobacter pylori avec les cellules épithéliales gastriques. *Hépatogastro & Oncologie Digestive*, 13(5), pp. 379-388.
- Chomvarin, C. et al., 2008. Prevalence of Helicobacter pylori vacA, cagA, cagE, iceA and babA2 genotypes in Thai dyspeptic patients. *Int J Infect Dis*, 12(1), pp. 30-36.
- Con, S. A. et al., 2007. Diversity of Helicobacter pylori cagA and vacA Genes in Costa Rica: Its Relationship with Atrophic Gastritis and Gastric Cancer. *Helicobacter*, 12(5), p. 547–552.
- Crabtree, J. E. et al., 1993. Systemic and mucosal humoral responses to Helicobacter pylori in gastric cancer. *Gut*, 34(10), p. 1339–1343.
- Cullen, T. et al., 2011. Helicobacter pylori versus the host: remodeling of the bacterial outer membrane is required for survival in the gastric mucosa. *PLoS Pathog*, 7(12), p. e1002454.
- De Reuse, H., Labigne, A. & Mengin-Lecreulx, D., 1997. The Helicobacter pylori ureC Gene Codes for a Phosphoglucosamine Mutase. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*, 179(11), p. 488–3493.
- Domingo, D. et al., 1999. cag A and vac A status of Spanish Helicobacter pylori clinical isolates. *J Clin Microbiol*, Issue 37, p. 2113–2114.
- Dunn, B. M., 2001. Overview of Pepsin-like Aspartic Peptidases. *Current Protocols in Protein Science*.
- El-Omar, E. M., 2006. Role of host genes in sporadic gastric cancer. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 20(4), p. 675–686.
- El-Omar, E. M., Carrington, M., Chow, W. & al, e., 2001. The role of the Interleukin-1 polymorphisms in the pathogenesis of gastric cancer.. *Nature*, Volume 412, p. 99.
- El-Omar, E. M. et al., 2000. Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer. *Nature*, 404(6776), p. 398–402.

- El-Omar, E. M. et al., 2003. Increased risk of noncardia gastric cancer associated with proinflammatory cytokine gene polymorphisms. *Gastroenterology*, 124(5), pp. 1193-1201.
- Enrique, R. & John, H. W., 2001. Gastrin, CCK, Signaling, and Cancer. *Annual Review of Physiology*, Volume 63, pp. 49-76.
- Enroth, H. et al., 2000. Helicobacter pylori Strain Types and Risk of Gastric Cancer: A Case-Control Study. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 9(9), p. 981–985.
- Enroth, H. et al., 1999. In vitro aging of Helicobacter pylori: changes in morphology, intracellular composition and surface properties. *Helicobacter*, 4(1), pp. 7-16.
- Erzin, Y. et al., 2006. Prevalence of Helicobacter pylori vacA, cagA, cagE, iceA, babA2 genotypes and correlation with clinical outcome in Turkish patients with dyspepsia. *Helicobacter*, 11(6), pp. 574-580.
- Figueiredo, C. et al., 2002. Helicobacter pylori and interleukin 1 genotyping: an opportunity to identify high-risk individuals for gastric carcinoma.. *J Natl Cancer Inst*, 94(22), pp. 1680-7.
- Figura, N., Marano, L., Moretti, E. & Ponzetto, A., 2016. Helicobacter pylori infection and gastric carcinoma: Not all the strains and patients are alike. *World Journal of Gastrointestinal Oncology*, 8(1), pp. 40-54.
- Figura, N. et al., 1996. Gastric cancer, H. pylori (HP) infection, serum antibodies to CagA. *Gut*, Volume 39, p. 2; A17.
- Fleming, S. L., Alcamo, E. I. & Heymann, D. L., 2007. *HELICOBACTER PYLORI*. New York: Infobase Publishing.
- Fox, J. et al., 2000. Concurrent enteric helminth infection modulates inflammation and gastric immune responses and reduces helicobacter-induced gastric atrophy. *Nat Med*, 6(5), pp. 536-42.
- Fuchs, E., Tumber, T. & Guasch, G., 2004. Socializing with the neighbors: stem cells and their niche. *cell*, 116(6), pp. 769-778.
- Fukuda, M. et al., 2006. Assay of Human Gastric Mucin as a Natural Antibiotic Against Helicobacter pylori. *Methods in Enzymology*, 415(164), pp. 164-179.
- Furuta, T. et al., 2002. Interleukin 1 $\beta$  polymorphisms increase risk of hypochlorhydria and atrophic gastritis and reduce risk of duodenal ulcer recurrence in Japan. *Gastroenterology*, 123(1), p. 92–105.
- Fu, S. et al., 1999. Increased expression and cellular localization of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase 2 in Helicobacter pylori gastritis. *Gastroenterology*, 116(6), pp. 1319-29.
- Gaddy, J. et al., 2013. High Dietary Salt Intake Exacerbates Helicobacter pylori-Induced Gastric Carcinogenesis. *Infect Immun*, 81(6), pp. 2258-67.
- Gamboa-Dominguez, A. et al., 2007. Salt and stress synergize H. pylori-induced gastric lesions, cell proliferation, and p21 expression in Mongolian gerbils. *Dig Dis Sci*, 52(6), pp. 1517-26.
- Gancz, H., Jones, K. & Merrell, D., 2008. Sodium chloride affects Helicobacter pylori growth and gene expression. *J Bacteriol*, 190(11), pp. 4100-5.
- Gewirtz, A. et al., 2004. Helicobacter pylori flagellin evades toll-like receptor 5-mediated innate immunity. *J Infect Dis*, 198(10), p. 1914–1920.

- González-Rivera, C. et al., 2012. The Intermediate Region of *Helicobacter pylori* VacA Is a Determinant of Toxin Potency in a Jurkat T Cell Assay. *American society of microbiology, Infection and Immunity*, 80(8), pp. 2578-2588.
- Gordon, J. I. & Hermiston, M. L., 1994. Differentiation and self-renewal in the mouse gastrointestinal epithelium. *Curr Opin Cell Biol*, 6(6), pp. 795-803.
- Göttke, M. U. et al., 2000. Genetic Variability Determinants of *Helicobacter pylori*: Influence of Clinical Background and Geographic Origin of Isolates. *The Journal of Infectious Diseases*, 181(5), pp. 1674-1681.
- Gringhuis, S. et al., 2007. C-type lectin DC-SIGN modulates Toll-like receptor signaling via Raf-1 kinase-dependent acetylation of transcription factor NF-kappaB. *Immunity*, 26(5), pp. 605-16.
- Gupta, R. & Dubois, R., 2001. Colorectal cancer prevention and treatment by inhibition of cyclooxygenase-2. *Nat Rev Cancer*, 1(1), pp. 11-21.
- Hamajima, N. et al., 2001. Interleukin 1 Polymorphisms, Lifestyle Factors, and *Helicobacter pylori* Infection. *Cancer Science*, 92(4), p. 383–389.
- Hatakeyama, M., 2011. Anthropological and clinical implications for the structural diversity of the *Helicobacter pylori* CagA oncoprotein. *Cancer Sci*, 102(1), pp. 36-43.
- Helander, H. F., 1981. The Cells of the Gastric Mucosa. *International Review of Cytology*, Volume 70, p. 217–289.
- Higashi, H. et al., 2005. EPIYA motif is a membrane-targeting signal of *Helicobacter pylori* virulence factor CagA in mammalian cells. *J Biol Chem*, 280(24), pp. 23130-23137.
- Hoffmann, W., 2005. Trefoil factors TFF (trefoil factor family) peptide-triggered signals promoting mucosal restitution. *Cell Mol Life Sci*, 62(24), pp. 2932-2938.
- Hoffmann, W., 2008. Regeneration of the gastric mucosa and its glands from stem cells. *Curr Med Chem*, 15(29), pp. 3133-44.
- Hold, G. et al., 2007. A functional polymorphism of toll-like receptor 4 gene increases risk of gastric carcinoma and its precursors. *Gastroenterology*, 132(3), pp. 905-12.
- Hwang, I.-R. et al., 2002. Effect of interleukin 1 polymorphisms on gastric mucosal interleukin 1 $\beta$  production in *Helicobacter pylori* infection. *Gastroenterology*, 123(6), pp. 1793-1803.
- IARC, 1995. *Infection with Helicobacter pylori, in schistosomes, liver flukes and Helicobacter pylori*. International Agency for Research on Cancer : World Health Organization éd. Eval. Carcinog Risks Hum Lyon, France Vol 60: 177-220: IARC Monograph.
- IARC, 2012. *GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide 2012*, Lyon, France: IARC.
- Ikenoue, T. et al., 2001. Determination of *Helicobacter pylori* Virulence by Simple Gene Analysis of the cagPathogenicity Island. *Clin Vaccine Immunol*, 8(1), pp. 181-186.
- Jenksa, P. J., Mégraudb, F. & Labigne, A., 1998. Clinical outcome after infection with *Helicobacter pylori* does not appear to be reliably predicted by the presence of any of the genes of the cag pathogenicity island. *Gut*, 43(6), p. 752–758.

- Jones, K. R. et al., 2011. Polymorphisms in the Intermediate Region of VacA Impact Helicobacter pylori-Induced Disease Development. *J Clin Microbiol*, 49(1), p. 101–110.
- Karam, S. M., 1999. Lineage commitment and maturation of epithelial cells in the gut. *Front Biosci*, Volume 4, pp. D286-298.
- Kato, S. et al., 2006. High salt diets dose-dependently promote gastric chemical carcinogenesis in Helicobacter pylori-infected Mongolian gerbils associated with a shift in mucin production from glandular to surface mucous cells. *Int J Cancer*, 119(7), pp. 1558-66.
- Kausler, F. et al., 2004. The cag Pathogenicity Island of Helicobacter pylori Is Disrupted in the Majority of Patient Isolates from Different Human Populations. *J. Clin. Microbiol.*, 24(11), pp. 5302-5308.
- Kawakubo, M. et al., 2004. Natural Antibiotic Function of a Human Gastric Mucin Against Helicobacter pylori Infection. *Science*, 305(5686), pp. 1003-1006.
- Khatoon, J., Rai, R. P. & Prasad, K. N., 2016. Role of Helicobacter pylori in gastric cancer: Updates. *World J Gastrointest Oncol.*, 8(2), pp. 147-158.
- Kierszenbaum, A. L. & Ters, L., 2016. *Histology and cell biology : An introduction to pathology, 4e.* s.l.:Elsevier/Saunders.
- Konturek, S. et al., 2003. Serum progastrin and its products, gastric acid secretion and serum pepsinogen I in gastric cancer. *Digestion*, Volume 68, pp. 169-177.
- Lage, A. P. et al., 1995. Diagnosis of Helicobacter pylori infection by PCR: comparison with other invasive techniques and detection of cagA gene in gastric biopsy specimens. *journal of Clinical Microbiology*, 33(10), p. 2752–2756.
- Lehours, P. et al., 2004. Evaluation of the Association of Nine Helicobacter pylori Virulence Factors with Strains Involved in Low-Grade Gastric Mucosa-Associated Lymphoid Tissue Lymphoma. *Infect. Immun.*, 72(2), pp. 880-888.
- Li, C. et al., 2007. Association between interleukin-1 gene polymorphisms and Helicobacter pylori infection in gastric carcinogenesis in a Chinese population. *J Gastroenterol Hepatol*, 22(2), pp. 234-9.
- Linz, B. et al., 2007. An African origin for the intimate association between humans and Helicobacter pylori. *nature*, Issue 445, pp. 915-918.
- Liu, C. & Russell, R., 2008. Nutrition and gastric cancer risk: an update. *Nat Rev*, 66(5), pp. 237-49.
- Loh, J., Torres, V. & Cover, T., 2007. Regulation of Helicobacter pylori cagA expression in response to salt. *Cancer Res*, 67(10), pp. 4709-15.
- Lüllmann-Rauch, R., 2008. *Histologie : Premier cycle des études médicales.* Bruxelles: deboeck.
- Luther, J. et al., 2011. Helicobacter pylori DNA decreases pro-inflammatory cytokine production by dendritic cells and attenuates dextran sodium sulphate-induced colitis. *Gut*, 60(11), pp. 1479-86.
- Lydia, E. W., Richard, M. ,. P. J. & Keith, T. W., 2010. Helicobacter pylori and Gastric Cancer: Factors That Modulate Disease Risk. *Clin. Microbiol. Rev*, 23(4), pp. 713-739.
- Machado, J. C. et al., 2001. Interleukin 1B and interleukin 1RN polymorphisms are associated with increased risk of gastric carcinoma. *Gastroenterology*, 121(4), pp. 823-829.

- Machado, J. et al., 2003. A proinflammatory genetic profile increases the risk for chronic atrophic gastritis and gastric carcinoma. *Gastroenterology*, 125(2), pp. 364-71.
- Maeda, S. et al., 1999. Structure of cag pathogenicity island in Japanese *Helicobacter pylori* isolates. *gut*, 44(3), pp. 336-341.
- Maixner, F. et al., 2016. The 5300-year-old *Helicobacter pylori* genome of the Iceman. *Science*, 351(6269), pp. 162-165.
- Majewski, I. J. et al., 2013. An  $\alpha$ -E-catenin (CTNNA1) mutation in hereditary diffuse gastric cancer. *The Journal of Pathology*, 229(4), pp. 621-629.
- Malaty, H. M., 2007. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 21(2), pp. 205-14.
- Mansour, S. A.-M. et al., 2006. Interleukin-1 $\beta$  gene (IL-1B) and interleukin 1 receptor antagonist gene (IL-1RN) polymorphisms and gastric cancer risk in an Omani Arab population. *Gastric Cancer*, 6(4), pp. 284-290.
- Marie, M., 2012. Relation entre *Helicobacter pylori* gènes de virulence et les résultats cliniques en Arabie patients. *J Korean Med Sci*, 27(3), pp. 190-3.
- Martínez-Carrillo, D. N. et al., 2010. Association of IL1B -511C/-31T haplotype and *Helicobacter pylori* vacA genotypes with gastric ulcer and chronic gastritis. *BMC Gastroenterology*, 10(126), pp. 1-8.
- Martini, F. H., Timmons, M. J. & Tallitsch, R. B., 2009. Human Anatomy. *Pearson Benjamin Cummings*.
- Mattar, R. et al., 2005. No correlation of babA2 with vacA and cagA genotypes of *Helicobacter pylori* and grading of gastritis from peptic ulcer disease patients in Brazil. *Helicobacter*, 10(6), pp. 601-8.
- McFarlane-Parrott, S. C., Atkins, W. A. & BB, B. M., 2013. *La Gale Encyclopedia of Nursing and Allied Health, 3e édition*. s.l.:Cengage Learning.
- McLean, M. H. & El-Omar, E. M., 2014. Genetics of gastric cancer. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 11(11), p. 664-674.
- Miehlke, S. et al., 2000. The *Helicobacter pylori* vacA s1, m1 genotype and cagA is associated with gastric carcinoma in Germany. *Int J Cancer*, 87(3), pp. 322-7.
- Mimata, A., Fukamachi, H., Eishi, Y. & Yuasa, Y., 2011. Loss of E-cadherin in mouse gastric epithelial cells induces signet ring-like cells, a possible precursor lesion of diffuse gastric cancer. *Cancer Sci*, Volume 102, p. 942-950.
- Moore, K. A. & Lemischka, I. R., 2006. Stem cells and their niches. *Science*, 311(5769), pp. 1880-1885.
- Moran, A., Lindner, B. & Walsh, E., 1997. Structural characterization of the lipid A component of *Helicobacter pylori* rough- and smooth-form lipopolysaccharides. *J Bacteriol*, 179(20), pp. 6453-63.
- Morrison, S. J. & Kimble, J., 2006. Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. *Nature*, 441(7097), pp. 1068-1074.
- Mustapha, P., 2011. *Etude des interactions entre Helicobacter pylori et les cellules épithéliales gastriques*. Poitiers: Université de Poitiers.



- Nimri, L., Matalka, I., Bani Hani, K. & Ibrahim, M., 2006. Helicobacter pylori genotypes identified in gastric biopsy specimens from Jordanian patients. *BMC Gastroenterol*, 6(27).
- Nogueira, C. et al., 2001. Helicobacter pylori genotypes may determine gastric histopathology. *Am J Pathol*, 158(2), pp. 647-54.
- Nurgalieva, Z. et al., 2002. Helicobacter pylori infection in Kazakhstan: effect of water source and household hygiene. *Am J Trop Med Hyg*, 67(2), p. 201–206.
- Odenbreit, S. et al., 2000. Translocation of Helicobacter pylori CagA into gastric epithelial cells by type IV secretion. *Science*, 287(5457), pp. 1497-500.
- Olivares, D. & Gisbert, J. P., 2006. Factors involved in the pathogenesis of Helicobacter pylori infection. *REV ESP ENFERM DIG*, 98(5), pp. 374-386.
- Owen, R. J. et al., 2001. Molecular epidemiology of Helicobacter pylori in England: prevalence of cag pathogenicity island markers and IS605 presence in relation to patient age and severity of gastric disease. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 30(1), pp. 65-71.
- Owyang, S. Y. et al., 2012. Helicobacter pylori DNA's anti-inflammatory effect on experimental colitis. *Gut Microbes*, 3(2), p. 168–171.
- Parsonnet, J., Friedman, G., Orentreich, N. & Vogelstein, H., 1997. Risk for gastric cancer in people with CagA positive or CagA negative Helicobacter pylori infection. *gut*, 40(3), pp. 297-301.
- Parsonnet, J. et al., 1991. Helicobacter pylori infection and the risk of gastric carcinoma. *N Engl J Med*, Volume 325, p. 1127–1131.
- Peek, R. J. & Blaser, M., 2002. Helicobacter pylori and gastrointestinal tract adenocarcinomas. *Nat Rev Cancer*, 2(1), pp. 28-37.
- Persson, C. et al., 2011. Polymorphisms in Inflammatory Response Genes and Their Association With Gastric Cancer: A HuGE Systematic Review and Meta-Analyses. *American Jnl of Epidemiology*, 173(3), p. 259–270.
- Powell, D. W., Adegboyega, P. A., Di Mari, J. F. & Mifflin, R. C., 2005. Epithelial Cells and Their Neighbors I. Role of intestinal myofibroblasts in development, repair, and cancer. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 289(1), pp. G2-G7.
- Powell, D. W. et al., 1999. Myofibroblasts. II. Intestinal subepithelial myofibroblasts. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 277(2), pp. C183-C201.
- Quante, M. & Wang, T. C., 2009. Stem cells in gastroenterology and hepatology. *nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, Volume 6, pp. 724-737.
- Rad, R. et al., 2009. Extracellular and intracellular pattern recognition receptors cooperate in the recognition of Helicobacter pylori. *Gastroenterology*, 136(7), pp. 2247-57.
- Rad, R. et al., 2003. Synergistic Effect of Helicobacter pylori Virulence Factors and Interleukin-1 Polymorphisms for the Development of Severe Histological Changes in the Gastric Mucosa. *The Journal of Infectious Diseases*, 188(2), pp. 272-281.
- Ristimäki, A. et al., 1997. Expression of cyclooxygenase-2 in human gastric carcinoma. *Cancer Res*, 57(7), pp. 1276-80.

- Ross, M. H. & Pawlina, W., 2015. *Histology: A Text and Atlas: With Correlated Cell and Molecular Biology*. 7e éd. Philadelphia: North American Edition.
- Ruzzo, A. et al., 2005. Interleukin 1B gene (IL-1B) and interleukin 1 receptor antagonist gene (IL-1RN) polymorphisms in Helicobacter pylori-negative gastric cancer of intestinal and diffuse histotype. *Annals of Oncology*, 25 Avril, 16(6), p. 887–892.
- Sachidanandam, R. et al., 2001. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *nature*, Issue 409, pp. 928-933.
- Sakamoto, H. et al., 2008. Genetic variation in PSCA is associated with susceptibility to diffuse-type gastric cancer. *Nat Genet*, 40(6), pp. 730-40.
- Salama, N. R., Hartung, M. L. & Müller, A., 2013. Life in the human stomach: persistence strategies of the bacterial pathogen Helicobacter pylori. *Nature Reviews Microbiology*, 8 mai. Issue 3016.
- Sawaoka, H. et al., 1998. Helicobacter pylori infection induces cyclooxygenase-2 expression in human gastric mucosa. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 59(5), pp. 313-6.
- Sayi, A. et al., 2011. TLR-2-activated B cells suppress Helicobacter-induced preneoplastic gastric immunopathology by inducing T regulatory-1 cells. *J Immunol*, 186(2), pp. 878-90.
- Seong-Gene, L. et al., 2003. Lack of association between pro-inflammatory genotypes of the interleukin-1 (IL-1B -31 C/+ and IL-1RN \*2/\*2) and gastric cancer/duodenal ulcer in Korean population. *Cytokine*, 21(4), pp. 167-171.
- Shikata, K. et al., 2006. A prospective study of dietary salt intake and gastric cancer incidence in a defined Japanese population: the Hisayama study. *Int J Cancer*, 119(1), pp. 196-201.
- Shunji, K. et al., 2001. Association of the interleukin-1  $\beta$  genetic polymorphism and gastric cancer risk in Japanese. *Journal of Gastroenterology*, 36(10), pp. 696-699.
- Silen, W. & Ito, S., 1985. Mechanisms for rapid re-epithelialization of the gastric mucosal surface. *Annu Rev Physiol*, Volume 47, pp. 217-229.
- Sozzi, M. et al., 2005. Heterogeneity of cag genotypes and clinical outcome of Helicobacter pylori infection. *Translational Research*, 146(5), pp. 262-270.
- Suerbaum, S. & Josenhans, C., 2007. Helicobacter pylori evolution and phenotypic diversification in a changing host. *Nature Reviews Microbiology*, Volume 5, p. 441–452.
- Sugimoto, M. & Yamaoka, Y., 2009. The association of vacA genotype and Helicobacter pylori-related disease in Latin American and African populations. *Clin Microbiol Infect.*, 15(9), p. 835–842.
- Sugimoto, M., Zali, M. R. & Yamaoka, Y., 2009. The association of vacA genotypes and Helicobacter pylori-related gastroduodenal diseases in the Middle East. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 28(10), p. 1227–1236.
- Sung, J. et al., 2000. Cyclooxygenase-2 expression in Helicobacter pylori-associated premalignant and malignant gastric lesions. *Am J Pathol*, 157(3), pp. 729-35.
- Sun, J. et al., 2006. Effect of NaCl and Helicobacter pylori vacuolating cytotoxin on cytokine expression and viability. *World J Gastroenterol*, 12(14), p. 2174–2180.

- Takashima, M. et al., 2001. Effects of Helicobacter pylori infection on gastric acid secretion and serum gastrin levels in Mongolian gerbils. *gut*, 48(6), pp. 765-773.
- Take, S. et al., 2003. Interleukin-1beta genetic polymorphism influences the effect of cytochrome P 2C19 genotype on the cure rate of 1-week triple therapy for Helicobacter pylori infection. *American Journal of Gastroenterology*, Issue 98, p. 2403–2408.
- Tao, J. et al., 2011. CD44-SLC1A2 Gene Fusions in Gastric Cancer. *Science Translational Medicine*, 3(77), pp. 77ra30--77ra30.
- Tegtmeyer, N., Wessler, S. & Backert, S., 2011. Role of the cag pathogenicity island encoded type IV secretion system in Helicobacter pylori pathogenesis. *J. Author manuscript*, 278(8), pp. 1190-1202.
- Tomasini, M. L. et al., 2003. Heterogeneity of cag Genotypes in Helicobacter pylori Isolates from Human Biopsy Specimens. *J. Clin. Microbiol.*, 41(3), pp. 976-980.
- Tortora, G. & Grabowski, S., 1994. *Principes d'anatomie et de physiologie*. 2e éd. Québec: DeBoeck.
- Toyoda, T. et al., 2008. Synergistic upregulation of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in gastric mucosa of Mongolian gerbils by a high-salt diet and Helicobacter pylori infection. *Histol Histopathol*, 23(5), pp. 593-9.
- Trujillo, E., Martínez, T. & Bravo, M., 2014. [Genotyping of Helicobacter pylori virulence factors vacA and cagA in individuals from two regions in Colombia with opposing risk for gastric cancer]. *Biomedica*, 34(4), pp. 567-573.
- Tu, S. et al., 2008. Overexpression of interleukin-1beta induces gastric inflammation and cancer and mobilizes myeloid-derived suppressor cells in mice.. *Cancer Cell*, 14(5), pp. 408-19.
- van Doorn, L.-J. et al., 1998. Expanding Allelic Diversity of Helicobacter pylori vacA. *J. Clin. Microbiol.*, 36(9), pp. 2597-2603.
- van Doorn, L. et al., 1998. Clinical relevance of the cagA, vacA, and iceA status of Helicobacter pylori. *Gastroenterology*, 115(1), pp. 58-66.
- Vieth, M. & Stolte, M., 2006. Elevated risk for gastric adenocarcinoma can be predicted from histomorphology. *World J Gastroenterol*, 12(38), pp. 6109-6114.
- Wagner, T. U., 2007. Bone morphogenetic protein signaling in stem cells-one signal, many consequences. *FEBS J*, 274(12), pp. 2968-2976.
- Wang, F., Meng, W., Wang, B. & Qiao, L., 2014. Helicobacter pylori-induced gastric inflammation and gastric cancer. *Cancer Lett*, 345(2), pp. 196-202.
- Wang, F. et al., 2008. Helicobacter pylori VacA Disrupts Apical Membrane-Cytoskeletal Interactions in Gastric Parietal Cells. *J. Biol. Chem*, 283(39), pp. 26714-26725.
- Wang, P. et al., 2007. Association of interleukin-1 gene polymorphisms with gastric cancer : A meta-analysis. *International Journal of Cancer*, 120(3), pp. 552-562.
- Wang, X., Wei, M. & Sun, Z., 2014. An association study of histological types of gastric carcinoma with Helicobacter pylori infection. *Cell Biochem Biophys*, 70(2), pp. 1283-7.

Watanabe, T. et al., 2010. NOD1 contributes to mouse host defense against *Helicobacter pylori* via induction of type I IFN and activation of the ISGF3 signaling pathway. *J Clin Invest*, 120(5), p. 1645–1662.

Watt, F. M. & Hogan, B. L., 2000. Out of Eden: stem cells and their niches. *Science*, 287(5457), pp. 1427-1430.

Whary, M. et al., 2005. Intestinal helminthiasis in Colombian children promotes a Th2 response to *Helicobacter pylori*: possible implications for gastric carcinogenesis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*, 14(6), pp. 1464-9.

Williams, C., Smalley, W. & DuBois, R., 1997. Aspirin use and potential mechanisms for colorectal cancer prevention. *J Clin Invest*, 100(6), pp. 1325-9.

Wroblewski, L., Peek, R. J. & Wilson, K., 2010. *Helicobacter pylori* and gastric cancer: factors that modulate disease risk. *Clin Microbiol Rev*, 23(4), pp. 713-39.

Xue, H. et al., 2010. Interleukin-1B and interleukin-1 RN polymorphisms and gastric carcinoma risk: A meta-analysis. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 25(10), pp. 1604-1617.

Xu, J. et al., 2013. Systematic Review and Meta-Analysis on the Association between IL-1B Polymorphisms and Cancer Risk. *PLoS ONE*, 8(5), p. e63654.

Yamaoka, Y. et al., 2002. Importance of *Helicobacter pylori* oipA in clinical presentation, gastric inflammation, and mucosal interleukin 8 production. *Gastroenterology*, 123(2), pp. 414-24.

Yamaoka, Y. et al., 1999. Relationship between *Helicobacter pylori* iceA, cagA, and vacA status and clinical outcome: studies in four different countries. *J Clin Microbiol*, 37(7), p. 2274–2279.

Yu, F. et al., 2001. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection by stool antigen test in southern Taiwan. *Kaohsiung J Med Sci*, 17(7), pp. 344-350.

Zeng, Z. R. et al., 2003. Association of interleukin 1B gene polymorphism and gastric cancers in high and low prevalence regions in China. *Gut*, 52(12), pp. 1684-1689.

## Effect of IL-1 $\beta$ and IL-1RN polymorphisms in carcinogenesis of the gastric mucosa in patients infected with *Helicobacter pylori* in Algeria

Amine El-Mokhtar Drici, Soraya Moulessehou, Abdelkarim Tifrit, Mustapha Diaf, Doudi Kara Turki, Meryem Bachir & Abdenacer Tou

To cite this article: Amine El-Mokhtar Drici, Soraya Moulessehou, Abdelkarim Tifrit, Mustapha Diaf, Doudi Kara Turki, Meryem Bachir & Abdenacer Tou (2016) Effect of IL-1 $\beta$  and IL-1RN polymorphisms in carcinogenesis of the gastric mucosa in patients infected with *Helicobacter pylori* in Algeria, *Libyan Journal of Medicine*, 11:1, 31576, DOI: [10.3402/ljm.v11.31576](https://doi.org/10.3402/ljm.v11.31576)

To link to this article: <http://dx.doi.org/10.3402/ljm.v11.31576>



© 2016 Amine El-Mokhtar Drici et al.



Published online: 22 Jun 2016.



Submit your article to this journal [↗](#)



Article views: 37



View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)

ORIGINAL ARTICLE

## Effect of IL-1 $\beta$ and IL-1RN polymorphisms in carcinogenesis of the gastric mucosa in patients infected with *Helicobacter pylori* in Algeria

Amine El-Mokhtar Drici<sup>1\*</sup>, Soraya Moulessehou<sup>1</sup>, Abdelkarim Tifrit<sup>1</sup>, Mustapha Diaf<sup>1</sup>, Doudi Kara Turki<sup>2</sup>, Meryem Bachir<sup>3</sup> and Abdenacer Tou<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Department of Biology, Faculty of Natural and Life Sciences, Djillali LIABES University, Sidi-Bel-Abbes, Algeria; <sup>2</sup>Department of Gastroenterology, University Hospital of Sidi-Bel-Abbes, Sidi-Bel-Abbes, Algeria; <sup>3</sup>Department of Biology, Faculty of Sciences, Hassiba Ben Bouali University, Chlef, Algeria; <sup>4</sup>Anatomopathology Department, University Hospital of Sidi-Bel-Abbes, Sidi-Bel-Abbes, Algeria

**Background:** Infection with *Helicobacter pylori* is considered a potential risk of developing gastric cancer in association with contributing host genetic factor. IL-1 $\beta$  and IL-1RN polymorphisms appear to maintain and promote *Helicobacter pylori* infection and to stimulate neoplastic growth of the gastric mucosa.

**Objective and methods:** In order to elucidate the effect of these polymorphisms in combination with gastric cancer in a population from northwestern Algeria, a case-control study was carried out on 79 patients infected with *H. pylori* with chronic atrophic gastritis and/or gastric carcinoma, and 32 subjects were recruited as case-control. IL-1 $\beta$ -31 bi-allelic and IL-1 $\beta$ -511 bi-allelic polymorphisms and IL-1RN penta-allelic were genotyped.

**Results:** IL-1 $\beta$ -31C was associated with an increased risk of developing gastric carcinoma (OR = 4.614 [1.43 – 14.81],  $p = 0.01$ ). However, IL-1RN2 heterozygous allele type was significantly associated with chronic atrophic gastritis (OR = 4.2 [1.23 – 3.61],  $p = 0.022$ ). IL-1 $\beta$ -511T was associated with an increased risk of development of chronic atrophic gastritis (OR = 4.286 [1.54 – 11.89],  $p = 0.005$ ).

**Conclusion:** IL-1 $\beta$  and IL-1RN polymorphisms associated with *H. pylori* infection contribute to the development of chronic atrophic gastritis and gastric carcinomas in an Algerian population. The alleles IL-1 $\beta$ -31C and IL-1RN were associated with an increased risk of developing gastric carcinoma, and IL-1 $\beta$ -511T with an increased risk of developing chronic atrophic gastritis with no significant association of developing gastric carcinoma.

Keywords: *gastric mucosa*; *Helicobacter pylori*; IL-1 $\beta$ ; IL-1RN

Responsible Editor: Amin Bredan, VIB Inflammation Research Center & Ghent University, Belgium.

\*Correspondence to: Amine El-Mokhtar Drici, Department of Biology, Faculty of Natural and Life Sciences, Djillali LIABES University, PO. BOX 89, Sidi-Bel-Abbes 22000, Algeria, Email: drici.amine@gmail.com

Received: 10 March 2016; Accepted in revised form: 27 May 2016; Published: 22 June 2016

**H***elicobacter pylori* (*H. pylori*) infection of the gastric mucosa is a worldwide pandemic increasingly related to various gastric diseases such as asymptomatic gastritis, peptic ulcers, and malignant tumors (1). Based on the strongest association between *H. pylori* and gastric cancer, the World Health Organization has considered this germ as a class I carcinogen since 1994 (2). The global prevalence of gastric cancer has increased from 1 to 3% among people infected with *H. pylori*. Furthermore, the clinical outcomes depend largely on the distribution and the severity of the infection (3). The justification for such divergent clinical outcomes is gradually revealed in the paradigm of interaction between two pathways, gastric acid secretion

and gastritis induced by *H. pylori* (4). The ability and localization of high gastric acid secretion determine divergent diseases: a high acid secretion in response to a predominant antral gastritis tends to result in peptic ulcers, while low secretion with pangastritis tends to lead to cancer gastric (4).

The IL-1 cluster IL-1 $\beta$  gene encoding IL-1 $\beta$  and the IL-1RN gene coding for the anti-inflammatory antagonist (IL-1ra) of IL-1 receptor are located on chromosome 2q14 and have a number of functionally relevant polymorphisms that could be correlated with the high or low production of IL-1 $\beta$  (5–8). Substitution in the promoter region of the TATA box at the –511 position (CT; dbSNP: rs16944) and the –31 position (TC; dbSNP: rs1143627)



has been observed. The two single nucleotide polymorphisms (SNPs) are in linkage disequilibrium (9) by skewing this interaction, causing an unfavorable IL-1 $\beta$  to IL-1RN ratio (10). IL-1 $\beta$  is not only a determinant of a pro-inflammatory phenotype but also appears to be a major cofactor in maintaining and promoting *H. pylori* infection (11). Individuals with gastric pro-inflammatory genotype overexpressed IL-1 $\beta$  in response to *H. pylori* infection, which leads to gastrin overexpression, increased gastric inflammation, gastric atrophy, and hypochlorhydria, and possibly stimulates neoplastic growth (10, 12). El-Omar et al. were the first who reported that genotype IL-1 $\beta$ -511T+, IL-1 $\beta$ -31C+, and IL-1RN 2/2 are associated with an increased risk of developing gastric cancer (6). Their findings among Scottish and Polish patients were then confirmed by studies in other ethnic groups in Portugal (13), USA (7), China (4), Japan (14), and Latin America (15).

Our study aims to evaluate the associations of these polymorphisms in the presence of *H. pylori* infection of the gastric mucosa in patients with gastric carcinoma (GC) and chronic atrophic gastritis (AG) in northwestern Algeria.

## Methods

### Patients

This study was conducted during 14 months (October 2014 to November 2015) on patients with AG ( $n = 39$ ) and GC ( $n = 40$ ) at two medical oncology and gastroenterology facilities in the northwestern region of Algeria. However, 32 other individuals were recruited as controls (HC).

All patients with chronic AG or GC were *H. pylori* positive. The control group was *H. pylori* negative with no family history of cancer. Infection with *H. pylori* was confirmed by histopathology of biopsies sampled during diagnostic endoscopy (at least four biopsies of the antrum and body gastric mucosa should be available for each case) and anti-HP IgG serum antibody tests. The corresponding tissue sections were stained for slide reading in the anatomopathology department of the University Hospital of Sidi-Bel-Abbes, Algeria.

The existence of *H. pylori* DNA in gastric biopsies and buccal swabs were analyzed by PCR amplification of the *ureC* gene using primers as described by Lage et al. (16) (forward: 5'-AAGCTTTTAGGGGTGTTAGGGGTTT-3' and reverse: 5'-AAGCTTACTTTCTAACACTAACG C-3') at a hybridization temperature of 55°C. We employed a DNA volume of 25  $\mu$ l according to PCR criteria, as described below. The amplified fragments were visualized by using the GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain, 10,000 X (Biotium, Hayward, CA, USA), and 2.5% agarose gel. The obtained fragments were of 294 bp.

Information about personal data, sociodemographic characteristics, educational level, blood type, rhesus factor, eating habits, smoking, and alcohol consumption were

evaluated using a predetermined questionnaire. Furthermore, all participants gave their consent after the study protocol had been explained to them.

Considering Decree No. 387 (article 25) dated 31 July 2006 about ethical trials in Algeria, we obtained the required access authorizations to the concerned health facilities in order to accomplish our study protocol. Furthermore, we obtained informed written consent from all participants and their treating physicians after the study protocol had been explained to them.

### Analysis of IL-1 $\beta$ -31, IL-1 $\beta$ -511, and IL-1RN polymorphisms

IL-1 $\beta$ -31 and IL-1 $\beta$ -511 polymorphisms are single nucleotide changes in the promoter region, while the IL-1RN polymorphism is a repetition of 86 bp in the second intron. The DNA was extracted from 200  $\mu$ l whole blood samples, 20 mg of fresh gastric biopsy, or buccal swab in *H. pylori* transport medium using an extraction kit (MagaZorbe® genomic DNA, Promega, Fitchburg, Wisconsin, USA) stored at -20°C. Genotyping of the two polymorphisms (IL-1 $\beta$ -31 and IL-1 $\beta$ -511) was performed using the restriction fragment length polymorphism method (PCR-RFLP) (Table 1) (6, 10). Briefly, 25–50 ng of DNA was used in a volume of 25  $\mu$ l with 150 mM dNTP, 6.25 pmol of each primer, 1 U of DNA polymerase GoTaq® G2 Hot start polymerase (Promega, Fitchburg, Wisconsin, USA), 5% DMSO, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, and 5  $\mu$ l of 5x PCR buffer GoTaq. The amplified/digested fragments were visualized with the GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain, 10,000 X (Biotium, Hayward, CA, USA) in 2.5% agarose gel.

Variable numbers of tandem repeats (VNTR) analysis in the second intron of the IL-1RN gene was carried out by PCR. The different alleles were identified by the size of the PCR fragments and encoded in a conventional manner (6, 13) as follows: allele 1 (four repetitions), allele 2 (two repetitions), allele 3 (five repetitions), allele 4 (three repetitions), and allele 5 (six repetitions). According to previous studies (6, 13), as described in Table 1, the IL-1RN alleles were dichotomized into two categories: long genotype (L: > three repetitions; alleles 1, 3, 4, 5) and short genotype (2: two repetitions; allele 2).

### Statistical analysis

Data were processed and analyzed using SPSS 22.0 (Statistical Package for the Social Sciences, IBM Corporation; Chicago, IL, August 2013). Chi-square test was used to evaluate differences in the distribution of polymorphisms between different groups. All allelic distributions were examined for the corresponding differences of their Hardy-Weinberg equilibrium. The relative risk was evaluated by multivariate logistic regression based on categorical reference predictor models, adjusting for sex and age with a confidence interval (CI) of 95% and statistical significance set at  $p < 0.05$ . Allelic combinations of models of the three variants closely related



**Table 1.** Primers and conditions for analysis of the IL-1 $\beta$  and IL-1RN polymorphisms

Polymorphism	Primers	Tm; PCR method (restriction enzyme); and definition of the allele
IL-1 $\beta$ -31	Forward: 5'-TCTTTTCCCCTTTCCTTAACT-3' Reverse: 5'-GAGAGACTCCCTTAGCACCTAGT-3'	52°C. PCR-RFLP ( <i>AclI</i> ); C allele: 234 bp; T allele: 150 bp and 84 bp
IL-1 $\beta$ -511	Forward: 5'-CTGCATACCGTATGTTCTCTGCC-3' Reverse: 5'-GGAATCTTCCCACCTTACAGATGG-3'	59°C. PCR-RFLP ( <i>DdeI</i> ); C allele: 140 bp and 49 bp; T allele: 109 bp, 49 bp and 31 bp
IL-1RN	Forward: 5'-FCTCAGCAACTCCTAT-3' Reverse: 5'-TCCTGGTCTGCAGGTA-3'	60°C; PCR; 2-repeat allele: 240 bp, 3-repeat allele: 326 bp; 4-repeat allele: 412; 5-repeat allele: 498 bp

Tm: melting temperature; IL-1 $\beta$ -31: cluster of gene encoding interleukin-1 $\beta$  in the promoter region of TATA box at the -31 position; IL-1 $\beta$ -511: cluster of gene encoding interleukin-1 $\beta$  in the promoter region of TATA box at the -511 position; IL-1RN: gene encoding the anti-inflammatory antagonist (interleukin-1ra).

polymorphisms of IL-1 $\beta$  and IL-1RN were analyzed. The study of the haplotypes and linkage disequilibrium between loci (estimated by  $r^2$  and  $D'$ ) was carried out via the web interface in the LinkDos ([www.genepop.curtin.edu.au/linkC.html](http://www.genepop.curtin.edu.au/linkC.html)).

## Results

The mean age of all participants was  $45.0 \pm 17.67$  years, and ranged from 16 to 86 years. In healthy individuals, the mean age was  $35.8 \pm 12.72$  years with a male-to-female ratio of 1:1 (Table 2). However, in patients with AG and/or GC, mean ages were  $49.3 \pm 19.35$  (male-to-female ratio of 0.56:1) and  $59.3 \pm 14.00$  years (male-to-female ratio of 2.27:1), respectively.

The frequencies of the tested genotypes were in Hardy-Weinberg disequilibrium according to the following results.

Linkage disequilibrium analysis between IL-1 $\beta$ -31 and IL-1 $\beta$ -511 for AG patients gave the following results:  $r^2 = 0.6804$ ,  $D' = 0.46294$ ; moreover, analysis of linkage disequilibrium between IL-1 $\beta$ -31 and IL-1 $\beta$ -511 in GC patients:  $r^2 = 0.69357$ ,  $D' = 0.48$ .

Considering the whole studied population, IL-1RN was positively correlated ( $r = 0.424$ ,  $r^2 = 0.180$ ) with IL-1 $\beta$ -31 ( $p = 0.023$ ) and with IL-1 $\beta$ -511 ( $p = 0.006$ ). In patients with GC, we noticed weak positive correlations ( $r = 0.377$ ,  $r^2 = 0.142$ ) of IL-1RN with IL-1 $\beta$ -31 ( $p = 0.550$ ) and IL-1 $\beta$ -511 ( $p = 0.056$ ), respectively.

Non-significant correlations ( $r = 0.454$ ,  $r^2 = 0.206$ ) between IL-1RN, on the one hand, and IL-1 $\beta$ -31 ( $p = 0.703$ ) and IL-1 $\beta$ -511 ( $p = 0.072$ ), on the other hand, were

**Table 2.** Comparison between groups according to gender

	HC	AG	GC	$\chi^2$	$p^*$
Female	16 (29.1%)	25 (45.5%)	14 (25.5%)		
Male	16 (28.6%)	14 (25.0%)	26 (46.4%)	6.694	<0.05
Total	32 (28.8%)	39 (35.1%)	40 (36.0%)		

AG: atrophic gastritis; GC: gastric carcinoma; HC: healthy controls; (\*) comparison between the three groups using Chi-square test.

observed in patients with AG. Nevertheless, the correlations were non-significant in healthy subjects ( $p = 0.134$  for IL-1 $\beta$ -31 and  $p = 0.058$  for IL-1 $\beta$ -511).

As depicted in Table 3, the frequency of L/L wild-type pattern of IL-1RN was 87.5% in controls compared to 62.5% in GC and 82.1% in AG patients. The IL-1RN2 allele rates, for either heterozygous or homozygous, were 37.5% in GC, 17.9% in AG, and 12.5% in controls.

Regarding the IL-1 $\beta$ -511, the proportions of C/C wild-type pattern were 56.3% in healthy subjects, 47.5% in GC, and 23.1% in AG patients. Individuals carrying the allele IL-1 $\beta$ -511T are represented by 76.9% of AG, 52.5% of GC, and 43.8% of healthy controls.

**Table 3.** Distribution of the genotypes in the study population

Genotype	HC n (%)	All n (%)	AG n (%)	GC n (%)
IL-1RN				
L/L	28 (87.50)	57 (72.15)	32 (82.05)	25 (62.50)
2/L	04 (12.50)	19 (24.05)	04 (10.25)	15 (37.50)
2/2	00 (00.00)	03 (03.79)	03 (07.69)	00 (00.00)
2/L+2/2	04 (12.50)	22 (27.84)	07 (17.94)	15 (37.50)
IL-1 $\beta$ -511				
C/C	18 (56.25)	28 (35.44)	09 (23.07)	19 (47.50)
T/C	14 (43.75)	22 (27.84)	09 (23.07)	13 (32.50)
T/T	00 (00.00)	29 (36.70)	21 (53.84)	08 (20.00)
T/C+T/T	14 (43.75)	51 (64.55)	30 (76.92)	21 (52.50)
IL-1 $\beta$ -31				
T/T	17 (53.12)	24 (30.37)	14 (35.89)	10 (25.00)
C/T	07 (21.87)	33 (41.77)	14 (35.89)	19 (47.50)
C/C	08 (25.00)	22 (27.84)	11 (28.20)	11 (27.50)
C/T+C/C	15 (46.87)	55 (69.62)	25 (64.10)	30 (75.00)

AG: atrophic gastritis; GC: gastric carcinoma; All: atrophic gastritis and gastric carcinoma; HC: healthy controls; IL-1 $\beta$ -31: cluster in gene encoding interleukin-1 $\beta$  in the promoter region of TATA box at the -31 position; IL-1 $\beta$ -511: cluster in gene encoding interleukin-1 $\beta$  in the promoter region of TATA box at the -511 position; IL-1RN: gene encoding for the anti-inflammatory antagonist (interleukin-1ra); L: long genotype (more than three repetitions; alleles 1, 3, 4, 5); 2: short genotype (two repetitions; allele 2); C or T: single nucleotide polymorphisms.

Our results show that 53.1% of healthy subjects, 35.9% of patients with AG, and 25.0% of patients with GC have the T/T wild-type pattern of IL-1β-31.

As illustrated in Table 4, we investigated major genotypes implicated as risk factors for having GC and AG compared to controls. When multivariate logistic regression analysis was performed, our results showed that the C/C homozygous 4.614 (95% CI, 1.437 – 14.817) and the C/T heterozygous 1.974 (95% CI, 0.562 – 6.939) genotypes of the IL-1β-31 each indicated a strong

contribution to GC. Likewise, the same genotypes have non-significant risk of having AG (C/C: 2.429 [95% CI, 0.769–7.673] and C/T: 1.455 [95% CI, 0.402–5.260]). However, the association between the two homozygous and heterozygous genotypes C/T and T/T of IL-1β -511 was 4.286 (95% CI, 1.544 – 11.898) times more at risk of having AG compared to controls.

Concerning the heterozygous genotype L/2 of IL-1RN, our findings show that the odds ratio of having GC was 4.200 (95% CI, 1.230 – 14.337).

Table 4. Regression analysis of the distribution of the genotypes in the study

Multivariate logistic regression analysis			p	OR (95% CI)
GC * HC	IL-1β (-31)	T/T	0.035	Reference
		C/C	0.010	4.614 (1.437–14.817)
		C/T	0.289	1.974 (0.562–6.939)
		C/T+C/C	0.016	3.400 (1.254–9.216)
	IL-1β (-511)	C/C	0.968	Reference
		T/T	0.800	0.880 (0.326–2.374)
		C/T	0.999	0.000 ( - )
		C/T+T/T	0.461	1.421 (0.558–3.617)
	IL-1RN	L/L	-	Reference
		L/2	0.022	4.200 (1.230–14.337)
		L/2+2/2	0.022	4.200 (1.230–14.337)
	AG * HC	IL-1β (-31)	T/T	0.303
C/C			0.131	2.429 (0.769–7.673)
C/T			0.568	1.455 (0.402–5.260)
C/T+C/C			0.148	0.494 (0.190–1.283)
IL-1β (-511)		C/C	0.914	Reference
		T/T	0.671	1.286 (0.404–4.094)
		C/T	0.998	0.000 ( - )
		C/T+T/T	0.005	4.286 (1.544–11.898)
IL-1RN		L/L	0.984	Reference
		L/2	0.999	0.000 ( - )
		2/2	0.859	0.875 (0.200–3.828)
AG * GC		IL-1β (-31)	T/T	0.497
	C/C		0.238	0.526 (0.181–1.527)
	C/T		0.581	0.737 (0.249–2.178)
	C/T+C/C		0.294	0.595 (0.226–1.570)
	IL-1β (-511)	C/C	0.009	Reference
		T/T	0.522	1.462 (0.457–4.674)
		C/T	0.026	0.264 (0.081–0.856)
		C/T+T/T	0.026	3.016 (1.144–7.952)
	IL-1RN	L/L	0.042	Reference
		L/2	0.999	0.000 ( - )
		2/2	0.012	0.208 (0.061–0.706)
		L/2+2/2	0.057	0.365 (0.129–1.030)

AG: atrophic gastritis; GC: gastric carcinoma; HC: healthy controls; OR: odds ratio. GC \* HC: regression analysis of combined gastric carcinoma and healthy controls, AG \* HC: regression analysis of combined atrophic gastritis and healthy controls, AG \* GC: regression analysis of combined atrophic gastritis and gastric carcinoma.

IL-1β-31: cluster in gene encoding interleukin-1β in the promoter region of TATA box at the -31 position; IL-1β-511: cluster in gene encoding interleukin-1β in the promoter region of TATA box at the -511 position; IL-1RN: gene encoding the anti-inflammatory antagonist (interleukin-1ra); L: long genotype (more than three repetitions; alleles 1, 3, 4, 5); 2: short genotype (two repetitions; allele 2); C or T: single nucleotide polymorphisms.

Further analysis of combined genotype between IL-1RN and IL-1 $\beta$ -31 (Table 5) and IL-1RN and IL-1 $\beta$ -511 (Table 6) was performed using  $\chi^2$  test. The association between IL-1 $\beta$ -31 and IL-1RN was significant in AG patients ( $p=0.028$ ) and in controls ( $p=0.021$ ). Furthermore, the relationship between IL-1RN and IL-1 $\beta$ -511 was significant for the same groups (AG:  $p=0.014$ , and HC:  $p=0.015$ ).

## Discussion

The paradigm of previous studies on GC with regard to different haplotypes of IL-1RN and IL-1 $\beta$  has been investigated since 2000 on Scottish and Polish populations (6, 7). The genotype carriers of homozygous IL-1 $\beta$ -31C and IL-1RN2 have a high risk of hypochlorhydria as a result of *H. pylori* infection with evidence for genetic–environmental interaction at an early stage of gastric cancer (6). Machado et al. (13) reported results on a Portuguese population by studying the etiological role of IL-1 $\beta$ -511T allele, IL-1RN2 allele, and their association with an increased risk of developing intestinal GC. Until now, polymorphisms in genes of the pro-inflammatory cytokines IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  constitute an increased risk of developing GC in different gastric anatomical sites when the patients' ethnicity is not considered (17–19).

Several studies on the association between IL-1 $\beta$  and the IL-1RN genotype in Asian and Caucasian populations show that IL-1 $\beta$ -511T is significantly associated

with the risk of GC (20). Other studies showed that IL-1 $\beta$ -511T and IL-1RN2 were associated with an increased risk of developing GC in Caucasians. Similarly, a significantly increased risk was noticed when analyses showed positive associated with *H. pylori* infection with a moderate increase among Hispanics, but not among Asians (15, 21–23).

To the best of our knowledge, only one study on the IL-1 $\beta$  and IL-1RN polymorphisms and their association with gastric cancer was performed in an Arab population, namely in Oman. One hundred eighteen GC cases and 245 controls were compared. The authors found that the IL-1RN2 polymorphism increases the risk of GC, but the IL-1 $\beta$ -31C allele was not associated with the risk of developing GC (24). In Africa, Kimang'a studied the association of these polymorphisms with *H. pylori* infection with different pathologies of the gastric mucosa without considering GC. He reported a significant effect of the IL-1 $\beta$ -511T allele on gastritis, gastrointestinal reflux and gastric ulcers (25).

In this study, we evaluated the association between IL-1 $\beta$  and IL-1RN VNTR polymorphisms and the risk of AG and CG in northwestern Algeria. According to GLOBOCAN 2012, GC is the fourth most common cancer (both genders) in Algeria, with about 686 cases per year (26). Our results show that the IL-1 $\beta$ -31C allele is associated with an increased risk of developing GC (OR = 4.614;  $p=0.01$ ). The IL-1RN2 heterozygous allele

Table 5. Distribution of genotypes among patient groups

Sample type			IL-1 $\beta$ -31 n (%)			Total	Chi-square test ( $p$ )
			T/T	C/C	C/T		
AG	IL-1RN	L/L	14 (43.8)	08 (25.0)	10 (31.2)	32 (100.0)	0.028
		L/2	00 (00.0)	03 (75.0)	01 (25.0)	04 (100.0)	
		2/2	00 (00.0)	00 (00.0)	03 (100.0)	03 (100.0)	
	Total	14 (35.9)	11 (28.2)	14 (35.9)	39 (100.0)		
GC	IL-1RN	L/L	07 (28.0)	09 (36.0)	09 (36.0)	25 (100.0)	0.146
		L/2	03 (20.0)	02 (13.3)	10 (66.7)	15 (100.0)	
	Total	10 (25.0)	11 (27.5)	19 (47.5)	40 (100.0)		
HC	IL-1RN	L/L	16 (57.1)	08 (28.6)	04 (14.3)	28 (100.0)	0.021
		L/2	01 (25.0)	00 (00.0)	03 (75.0)	04 (100.0)	
	Total	17 (53.1)	08 (25.0)	07 (21.9)	32 (100.0)		
Total	IL-1RN	L/L	37 (43.5)	25 (29.4)	23 (27.1)	85 (100.0)	0.005
		L/2	04 (17.4)	05 (21.7)	14 (60.9)	23 (100.0)	
		2/2	00 (00.0)	00 (00.0)	03 (100.0)	03 (100.0)	
	Total	41 (36.9)	30 (27.0)	40 (36.0)	111 (100.0)		

Regression analysis of combined (IL-1RN vs. IL-1 $\beta$ -31) Chi-square test. AG: atrophic gastritis; GC: gastric carcinoma; HC: healthy controls; IL-1 $\beta$ -31: cluster in gene encoding interleukin-1 $\beta$  in the promoter region of TATA box at the –31 position; IL-1 $\beta$ -511: cluster in gene encoding interleukin-1 $\beta$  in the promoter region of TATA box at the –511 position; IL-1RN: gene encoding for the anti-inflammatory antagonist (interleukin-1ra); L: long genotype (more than three repetitions; alleles 1, 3, 4, 5); 2: short genotype (two repetitions; allele 2); C or T: single nucleotide polymorphisms.

Table 6. Distribution of genotype among patient groups

Sample type	IL-1 $\beta$ (-511) n (%)					Total	Chi-square test (p)
	C/C	T/T	C/T				
AG	IL-1RN	L/L	09 (28.1)	18 (56.2)	05 (15.6)	32 (100.0)	0.014
		L/2	00 (00.0)	3 (75.0)	01 (25.0)	04 (100.0)	
		2/2	00 (00.0)	00 (00.0)	03 (100.0)	03 (100.0)	
	Total		09 (23.1)	21 (53.8)	09 (23.1)	39 (100.0)	
GC	IL-1RN	L/L	15 (60.0)	05 (20.0)	05 (20.0)	25 (100.0)	0.067
		L/2	04 (26.7)	03 (20.0)	08 (53.3)	15 (100.0)	
		Total	19 (47.5)	08 (20.0)	13 (32.5)	40 (100.0)	
HC	IL-1RN	L/L	18 (64.3)	–	10 (35.7)	28 (100.0)	0.015
		L/2	00 (00.0)	–	04 (100.0)	04 (100.0)	
		Total	18 (56.2)	–	14 (43.8)	32 (100.0)	
Total	IL-1RN	L/L	42 (49.4)	23 (27.1)	20 (23.5)	85 (100.0)	0.002
		L/2	04 (17.4)	06 (26.1)	13 (56.5)	23 (100.0)	
		2/2	00 (00.0)	00 (00.0)	03 (100.0)	03 (100.0)	
		Total	46 (41.4)	29 (26.1)	36 (32.4)	111 (100.0)	

Regression analysis of combined (IL-1RN and IL-1 $\beta$ -511) Chi-square test. AG: atrophic gastritis; GC: gastric carcinoma; HC: healthy controls; IL-1 $\beta$ -31: cluster in gene encoding interleukin-1 $\beta$  in the promoter region of TATA box at the -31 position; IL-1 $\beta$ -511: cluster in gene encoding interleukin-1 $\beta$  in the promoter region of TATA box at the -511 position; IL-1RN: gene encoding for the anti-inflammatory antagonist (interleukin-1ra); L: long genotype (more than three repetitions; alleles 1, 3, 4, 5); 2: short genotype (two repetitions; allele 2); C or T: single nucleotide polymorphisms.

type is significantly associated with AG (OR = 4.2;  $p = 0.022$ ). These findings are in concordance with results on Caucasians but different from those of Asian and Arab populations in Oman (24, 27).

Considering the IL-1 $\beta$ -511T allele, no significant effect on GC was noticed in the studied patients. This result is in agreement with studies on Japanese and Korean populations (27, 28), but different from results from Caucasian populations (7, 13).

Individuals carrying the IL-1 $\beta$ -511T allele have more risk of developing AG (OR = 4.286;  $p = 0.005$ ) than GC. The same findings were observed in a German population (29). Contrariwise, in a recent study from Mexico, individuals carrying IL-1 $\beta$ -511C and IL-1 $\beta$ -31T alleles separately are more likely to develop AG and gastric ulcers (30).

One limitation of the present study is the small sample size. Moreover, this work investigated the association between *H. pylori* infection and polymorphisms in only two genes, IL-1 $\beta$  and IL-1RN, without invoking other carcinogenic factors; this could be considered as another limitation.

In conclusion, the presence of IL-1 $\beta$  and IL-1RN polymorphisms with *H. pylori* infection of the gastric mucosa contributes to the development of chronic AG and GCs in an Algerian population. Individuals carrying the IL-1 $\beta$ -31C and IL-1RN2 alleles are more likely to have an increased risk of developing GC. On the other hand, there is a positive correlation between chronic AG

and IL-1 $\beta$ -511T. These results highlight the importance of ethnicity studies about the effect of IL-1 $\beta$  and IL-1RN polymorphisms associated with *H. pylori* infection on gastric carcinogenesis. Thus, large investigations needed to gain a proper understanding of gastric mucosa carcinogenesis in our region.

### Conflict of interest and funding

No conflict of interest to disclose. The authors have not received any funding or benefits from industry or elsewhere to conduct this study.

### References

1. Wroblewski LE, Peek RMJ, Wilson KT. *Helicobacter pylori* and gastric cancer: factors that modulate disease risk. Clin Microbiol Rev. 2010; 23: 713–39.
2. IARC Monographs on the Carcinogenic Risks to Humans. Schistosomes, Liver Flukes and *Helicobacter Pylori*, IARC Monograph Vol. 61. Lyon, France: WHO Press;1994.
3. McLean MH, El-Omar EM. Genetics of gastric cancer. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2014; 11: 664–74.
4. Zeng ZR, Hu PJ, Hu S, Pang RP, Chen MH, Ng M, et al. Association of interleukin 1B gene polymorphism and gastric cancers in high and low prevalence regions in China. Gut. 2003; 52: 1684–9.
5. Bidwell J, Keen L, Gallagher G, Kimberly R, Huizinga T, McDermott MF, et al. Cytokine gene polymorphism in human disease: on-balance line databases supplement 1. Genes Immun. 1999; 2: 61–70.

6. El-Omar EM, Carrington M, Chow WH, McColl KE, Bream JH, Young HA, et al. Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer. *Nature*. 2000; 404: 398–402.
7. El-Omar EM, Carrington M, Chow WH, McColl KE, Bream JH, Young HA, et al. The role of the Interleukin-1 polymorphisms in the pathogenesis of gastric cancer. *Nature*. 2001; 412: 99.
8. Hwang IR, Kodama T, Kikuchi S, Sakai K, Peterson LE, Graham DY, et al. Effect of interleukin 1 polymorphisms on gastric mucosal interleukin 1 $\beta$  production in *Helicobacter pylori* infection. *Gastroenterology*. 2002; 123: 1793–803.
9. Xu J, Yin Z, Cao S, Gao W, Liu L, Yin Y, et al. Systematic review and meta-analysis on the association between IL-1B polymorphisms and cancer risk. *PLoS One*. 2013; 8: e63654.
10. Ruzzo A, Graziano F, Pizzagalli F, Santini D, Battistelli V, Panunzi S, et al. Interleukin 1B gene (IL-1B) and interleukin 1 receptor antagonist gene (IL-1RN) polymorphisms in *Helicobacter pylori*-negative gastric cancer of intestinal and diffuse histotype. *Ann Oncol*. 2005; 16: 887–92.
11. Take S, Mizuno M, Ishiki K, Nagahara Y, Yoshida T, Inaba T, et al. Interleukin-1beta genetic polymorphism influences the effect of cytochrome P 2C19 genotype on the cure rate of 1-week triple therapy for *Helicobacter pylori* infection. *Am J Gastroenterol*. 2003; 98: 2403–8.
12. Rozengurt E, Walsh JH. Gastrin, CCK, signaling, and cancer. *Annu Rev Physiol*. 2001; 63: 49–76.
13. Machado JC, Pharoah P, Sousa S, Carvalho R, Oliveira C, Figueiredo C, et al. Interleukin 1B and interleukin 1RN polymorphisms are associated with increased risk of gastric carcinoma. *Gastroenterology*. 2001; 121: 823–9.
14. Furuta T, El-Omar EM, Xiao F, Shirai N, Takashima M, Sugimura H. Interleukin 1 $\beta$  polymorphisms increase risk of hypochlorhydria and atrophic gastritis and reduce risk of duodenal ulcer recurrence in Japan. *Gastroenterology*. 2002; 123: 92–105.
15. Camargo MC, Mera R, Correa P, Richard MP Jr, Fontham ETH, Goodman KJ, et al. Interleukin-1 $\beta$  and interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphisms and gastric cancer: a meta-analysis. *Canc Epidemiol Biomarkers Prev*. 2006; 15: 1674–87.
16. Lage AP, Godfroid E, Fauconnier A, Burette A, Butzler JP, Bollen A, et al. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection by PCR: comparison with other invasive techniques and detection of cagA gene in gastric biopsy specimens. *J Clin Microbiol*. 1995; 33: 2752–6.
17. El-Omar EM, Rabkin CS, Gammon MD, Vaughan TL, Risch HA, Schoenberg JB, et al. Increased risk of noncardia gastric cancer associated with proinflammatory cytokine gene polymorphisms. *Gastroenterology*. 2003; 124: 1193–201.
18. Figura N, Marano L, Moretti E, Ponzetto A. *Helicobacter pylori* infection and gastric carcinoma: not all the strains and patients are alike. *World J Gastrointest Oncol*. 2016; 8: 40–54.
19. Machado JC, Figueiredo C, Canedo P, Pharoah P, Carvalho R, Nabais S, et al. A proinflammatory genetic profile increases the risk for chronic atrophic gastritis and gastric carcinoma. *Gastroenterology*. 2003; 125: 364–71.
20. Wang P, Xia HH, Zhang JY, Dai LP, Xu XQ, Wang KJ. Association of interleukin-1 gene polymorphisms with gastric cancer: a meta-analysis. *Int J Cancer*. 2007; 120: 552–62.
21. Xue H, Lin B, Ni P, Xu H, Huang G. Interleukin-1B and interleukin-1 RN polymorphisms and gastric carcinoma risk: a meta-analysis. *J Gastroenterol Hepatol*. 2010; 25: 1604–17.
22. Persson C, Canedo P, Machado JC, El-Omar EM, Forman D. Polymorphisms in inflammatory response genes and their association with gastric cancer: a HuGE systematic review and meta-analyses. *Am J Epidemiol*. 2011; 173: 259–70.
23. Bonequi P, Meneses-González F, Correa P, Rabkin CS, Camargo MC. Risk factors for gastric cancer in Latin America: a meta-analysis. *Cancer Causes Control*. 2013; 24: 217–31.
24. Al-Moundhri MS, Al-Nabhani M, Al-Bahrani B, Burney IA, Al-Madhani A, Ganguly SS, et al. Interleukin-1beta gene (IL-1B) and interleukin 1 receptor antagonist gene (IL-1RN) polymorphisms and gastric cancer risk in an Omani Arab population. *Gastric Cancer*. 2006; 9: 284–90.
25. Kimang'a AN. IL-1B-511 Allele T and IL-1RN-L/L play a pathological role in *Helicobacter Pylori* (*H. Pylori*) disease outcome in the African population. *Ethiop J Health Sci*. 2012; 22: 163–9.
26. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Forman D, Brayet F, Dikshit R, et al. International Agency for Research on Cancer. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11. Available from: globocan.iarc.fr [cited 6 January 2016].
27. Kato S, Onda M, Yamada S, Matsuda N, Tokunaga A, Matsukura N. Association of the interleukin-1 beta genetic polymorphism and gastric cancer risk in Japanese. *J Gastroenterol*. 2001; 36: 696–9.
28. Seong-Gene L, Byungsik K, Wonyong C, Inchul L, Jaewon C, Kyuyoung S. Lack of association between pro-inflammatory genotypes of the interleukin-1 (IL-1B -31 C/+ and IL-1RN \*2/\*2) and gastric cancer/duodenal ulcer in Korean population. *Cytokine*. 2003; 21: 167–71.
29. Rad R, Prinz C, Neu B, Neuhofer M, Zeitner M, Volland P, et al. Synergistic effect of *Helicobacter pylori* virulence factors and interleukin-1 polymorphisms for the development of severe histological changes in the gastric mucosa. *J Infect Dis*. 2003; 188: 272–81.
30. Martínez-Carrillo DN, Garza-González E, Betancourt-Linares R, Mónico-Manzano T, Antúnez-Rivera C, Román-Román A, et al. Association of IL1B -511C/-31T haplotype and *Helicobacter pylori* vacA genotypes with gastric ulcer and chronic gastritis. *BMC Gastroenterol*. 2010; 10: 1–8.

# **Annexe 1**

## Fiche Patient

N° : ..... Bx N° : ..... BR N° : ..... Entrée le : .....

Nom : ..... Prénom : ..... Sexe :  M  F Âge : .....

Profession : ..... (Bac + .....) Groupe Sanguin :  A  B  O Rhésus :  +  -

Situation Familiale : .....

Adresse : ..... Wilaya : ..... Origine : .....

Niveau Socio-économique :  Bas  Moyen  Elevé

Poids : ....., IMC : .....,  Dénutrition  Maigreux  Normal  Surpoids  Obésité modérée  Obésité sévère

### Antécédents

Personnels Médicale : .....

Chirurgicale : .....

Familiaux .....  Néo 1<sup>e</sup> génération siége : .....

Néo 2<sup>e</sup> génération siége : .....

Tabac :  oui  non  cig  chic tabac Alcool :  oui  non Cons. : ...../jour /semaine /mois

Nombre de cig/jour : ..... Type :  Vin  Bière  Eau de vie  Cidre  Liqueur  Élixirs arrêt : .....

Habitude alimentaire : .....

Carcinogènes :  riche en viande rouge  aliment fumé  riche en sel  boissons gazeuses .....

Antioxydant :  fruit et légumes,  vitamine C,  utilisation régulière d'Aspirine,  anti-inflammatoire AINS  traitement hormonal (TSH)

Motif d'examen : .....

### Complémentaire

Biopsie et anatomopathologie faite par : CHU-SBA

Montre un aspect histologique d'un(e) .....

.....

et présence d' **Hélicobacter pylori**  oui  non la tumeur mesure ..... cm de grand axe  
de pT.....N.....M..... selon la classification TNM

Siège de la néoplasie: ..... et ..... de Dukes

Extension : ..... Localisation secondaire : .....

### Observation



**FORMULAIRE DE RECUEIL DE CONSENTEMENT ECLAIRE**  
**Participation à une recherche biomédicale**

*(Fait en 2 exemplaires : un exemplaire est remis à la personne, l'autre est conservé par l'investigateur)*

*(Une autre copie sera conservée par le centre de ressources biologiques en cas de constitution d'une collection d'échantillons biologiques)*

**De :** Mr, Mme, Mlle

Nom : .....

Prénom : .....

Adresse : .....

Accepte par la présente de participer à l'étude menée par Mr.....  
et autorise les investigateurs de cette étude à accéder à mon dossier.

Ma participation est librement consentie et un refus de participation ou une interruption de ma part se fera sans aucun préjudice.

Je précise que l'objectif, les conditions et la durée de l'étude m'ont été clairement explicités.

Date :

Signature :

# **Annexe 2**

## Dako Modified Eosin Y

Code CS711

ENGLISH																																																																																																																																						
<b>Intended use</b>	For in vitro diagnostic use. Dako Modified Eosin Y is intended for primary staining of cytoplasm (red) in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections, frozen sections, and cell preparations. It is a ready-to-use reagent for use on Dako CoverStainer instrument.																																																																																																																																					
<b>Reagent provided</b>	Aqueous solution of eosin. Each bottle contains 1000 mL ready-to-use reagent. When Dako Modified Eosin Y is loaded onto Dako CoverStainer instrument, it should be used within 5 days or replaced after 3000 slides (depending on what comes first).																																																																																																																																					
<b>Precautions</b>	1. For in vitro diagnostic use 2. For professional users only. 3. Wear appropriate Personal Protective Equipment to avoid contact with eyes and skin. 4. Used and unused solution should be disposed of according to local, State and Federal regulations.																																																																																																																																					
<b>Storage</b>	Store at room temperature. Do not use after expiration date stamped on bottle. If drained back into the bottle on a nightly basis, the onboard stability of the reagent is 5 days. If reagents are stored under any conditions other than those specified, the user must verify the conditions. There are no obvious signs to indicate instability of this product. If unexpected staining is observed which cannot be explained by variations in laboratory procedures and a problem with the reagent is suspected, contact Dako Technical Support.																																																																																																																																					
<b>Specimen preparation</b>	<u>Paraffin sections:</u> Dako Modified Eosin Y can be used for primary staining of paraffin-embedded tissue sections fixed in formalin. <u>Frozen sections and cell preparations:</u> Dako Modified Eosin Y can be used for primary staining of acetone-fixed, frozen sections or fixed cell preparations.																																																																																																																																					
<b>Staining procedure</b>	Dako Modified Eosin Y, Code CS711, is ready-to-use. For use on Dako CoverStainer instrument. Please read the Administration section of the User Guide for the Dako CoverStainer instrument and program the instrument accordingly with the progressive H&E staining protocol provided below. The recommended protocol has been validated by Dako Denmark A/S. <b>Dako Progressive H&amp;E protocol:</b> Pre-heating for 10 minutes at 65 °C <table border="1"> <thead> <tr> <th>Step</th> <th>Dip tank</th> <th>Station</th> <th>Bottle</th> <th>Reagent</th> <th>Time min</th> <th>Time max</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>1</td><td>1</td><td>1-2</td><td>A</td><td>Xylene 1*</td><td>03:00</td><td>03:30</td></tr> <tr><td>2</td><td>2</td><td>3-4</td><td>B</td><td>Xylene 2*</td><td>03:00</td><td>03:30</td></tr> <tr><td>3</td><td>3</td><td>5-6</td><td>C</td><td>96 % EtOH 1</td><td>01:00</td><td>-</td></tr> <tr><td>4</td><td>4</td><td>7-8</td><td>D</td><td>96 % EtOH 2</td><td>02:00</td><td>-</td></tr> <tr><td>5</td><td>5</td><td>9-10</td><td>E</td><td>70 % EtOH 1</td><td>02:00</td><td>-</td></tr> <tr><td>6</td><td>18</td><td>33-36</td><td>-</td><td>Tap water</td><td>01:00</td><td>-</td></tr> <tr><td>7</td><td>8</td><td>16</td><td>I</td><td>Deionized water 2</td><td>01:00</td><td>01:00</td></tr> <tr><td>8</td><td>8</td><td>15</td><td>H</td><td>Dako Harris Hematoxylin</td><td>03:00</td><td>03:00</td></tr> <tr><td>9</td><td>7</td><td>13-14</td><td>G</td><td>Deionized water 1</td><td>01:00</td><td>01:00</td></tr> <tr><td>10</td><td>9</td><td>17</td><td>J</td><td>Dako Bluing Buffer</td><td>01:00</td><td>01:00</td></tr> <tr><td>11</td><td>17</td><td>33-36</td><td>-</td><td>Tap water</td><td>01:00</td><td>01:00</td></tr> <tr><td>12</td><td>6</td><td>11-12</td><td>F</td><td>70 % EtOH 2</td><td>01:00</td><td>01:00</td></tr> <tr><td>13</td><td>10</td><td>19</td><td>L</td><td>Dako Modified Eosin Y</td><td>01:00</td><td>01:00</td></tr> <tr><td>14</td><td>11</td><td>21</td><td>N</td><td>96 % EtOH 3</td><td>01:00</td><td>01:00</td></tr> <tr><td>15</td><td>11</td><td>22</td><td>O</td><td>99.9 % EtOH 1</td><td>01:00</td><td>01:00</td></tr> <tr><td>16</td><td>12</td><td>23-24</td><td>P</td><td>99.9 % EtOH 2</td><td>01:00</td><td>01:00</td></tr> <tr><td>17</td><td>13</td><td>25-26</td><td>Q</td><td>99.9 % EtOH 3</td><td>01:00</td><td>01:00</td></tr> <tr><td>18</td><td>14-16</td><td>27-32</td><td>R, S, T</td><td>Exit solvent*</td><td>01:00</td><td>-</td></tr> </tbody> </table>	Step	Dip tank	Station	Bottle	Reagent	Time min	Time max	1	1	1-2	A	Xylene 1*	03:00	03:30	2	2	3-4	B	Xylene 2*	03:00	03:30	3	3	5-6	C	96 % EtOH 1	01:00	-	4	4	7-8	D	96 % EtOH 2	02:00	-	5	5	9-10	E	70 % EtOH 1	02:00	-	6	18	33-36	-	Tap water	01:00	-	7	8	16	I	Deionized water 2	01:00	01:00	8	8	15	H	Dako Harris Hematoxylin	03:00	03:00	9	7	13-14	G	Deionized water 1	01:00	01:00	10	9	17	J	Dako Bluing Buffer	01:00	01:00	11	17	33-36	-	Tap water	01:00	01:00	12	6	11-12	F	70 % EtOH 2	01:00	01:00	13	10	19	L	Dako Modified Eosin Y	01:00	01:00	14	11	21	N	96 % EtOH 3	01:00	01:00	15	11	22	O	99.9 % EtOH 1	01:00	01:00	16	12	23-24	P	99.9 % EtOH 2	01:00	01:00	17	13	25-26	Q	99.9 % EtOH 3	01:00	01:00	18	14-16	27-32	R, S, T	Exit solvent*	01:00	-
Step	Dip tank	Station	Bottle	Reagent	Time min	Time max																																																																																																																																
1	1	1-2	A	Xylene 1*	03:00	03:30																																																																																																																																
2	2	3-4	B	Xylene 2*	03:00	03:30																																																																																																																																
3	3	5-6	C	96 % EtOH 1	01:00	-																																																																																																																																
4	4	7-8	D	96 % EtOH 2	02:00	-																																																																																																																																
5	5	9-10	E	70 % EtOH 1	02:00	-																																																																																																																																
6	18	33-36	-	Tap water	01:00	-																																																																																																																																
7	8	16	I	Deionized water 2	01:00	01:00																																																																																																																																
8	8	15	H	Dako Harris Hematoxylin	03:00	03:00																																																																																																																																
9	7	13-14	G	Deionized water 1	01:00	01:00																																																																																																																																
10	9	17	J	Dako Bluing Buffer	01:00	01:00																																																																																																																																
11	17	33-36	-	Tap water	01:00	01:00																																																																																																																																
12	6	11-12	F	70 % EtOH 2	01:00	01:00																																																																																																																																
13	10	19	L	Dako Modified Eosin Y	01:00	01:00																																																																																																																																
14	11	21	N	96 % EtOH 3	01:00	01:00																																																																																																																																
15	11	22	O	99.9 % EtOH 1	01:00	01:00																																																																																																																																
16	12	23-24	P	99.9 % EtOH 2	01:00	01:00																																																																																																																																
17	13	25-26	Q	99.9 % EtOH 3	01:00	01:00																																																																																																																																
18	14-16	27-32	R, S, T	Exit solvent*	01:00	-																																																																																																																																
<b>Staining interpretation</b>	Dako Modified Eosin Y stains cytoplasm of certain cells (e.g. muscle), collagen and red blood cells in various shades of pink to orange. It is recommended that protocol settings are verified before first use.																																																																																																																																					
<b>Additional Information</b>	Refer to User Guide for the Dako CoverStainer instrument for further information on the instrument and instructions for use.																																																																																																																																					

\*Xylene or xylene substitute, Dako recommends Histo-Clear II (National Diagnostic, Inc), HS-202.

After the staining procedure has been completed, the sections are mounted onboard Dako CoverStainer instrument using Dako CoverStainer Mounting Medium, Code CS703, or Dako Toluene-Free Mounting Medium, Code CS705. The slides must have a drying period of 10 minutes on the instrument prior to interpretation.

It is recommended that protocol settings are verified before first use.

## FRANÇAIS

<b>Utilisation prévue</b>	Pour utilisation diagnostique <i>in vitro</i> . Le réactif Dako Modified Eosin Y est destiné à la coloration primaire (en rouge) du cytoplasme sur des coupes tissulaires fixées au formol et incluses en paraffine, sur des coupes congelées et sur des préparations cellulaires. Ce réactif prêt à l'emploi est à utiliser sur l'appareil Dako CoverStainer.																																																																																																																																					
<b>Réactifs fournis</b>	Solution aqueuse d'éosine. Chaque flacon contient 1 000 mL de réactif prêt à l'emploi. Une fois chargé dans l'appareil Dako CoverStainer, le réactif Dako Modified Eosin Y doit être utilisé dans les 5 jours ou renouvelé après 3 000 lames (au premier des deux).																																																																																																																																					
<b>Précautions d'emploi</b>	1. Pour utilisation diagnostique <i>in vitro</i> . 2. Pour utilisateurs professionnels uniquement. 3. Porter un équipement de protection individuelle approprié pour éviter tout contact avec les yeux et la peau. 4. Les solutions utilisées et non utilisées doivent être éliminées conformément aux réglementations locales, nationales et européennes.																																																																																																																																					
<b>Conservation</b>	Conserver à température ambiante. Ne pas utiliser après la date de péremption indiquée sur le flacon. S'il est remis dans son flacon chaque soir, la stabilité du réactif sur l'appareil est de 5 jours. Si les réactifs sont conservés dans des conditions autres que celles indiquées, celles-ci doivent être validées par l'utilisateur. Il n'existe pas de signe particulier pour indiquer l'instabilité de ce produit. Si une coloration inattendue est observée, qui ne peut être expliquée par des différences dans les procédures du laboratoire et qu'un problème lié au réactif est suspecté, contacter l'assistance technique de Dako.																																																																																																																																					
<b>Préparation des échantillons</b>	<u>Coupes en paraffine :</u> Le réactif Dako Modified Eosin Y peut être utilisé pour la coloration primaire des coupes tissulaires incluses en paraffine et fixées au formol. <u>Coupes congelées et préparations cellulaires :</u> Le réactif Dako Modified Eosin Y peut être utilisé pour la coloration primaire de coupes congelées et fixées à l'acétone ou de préparations cellulaires fixées.																																																																																																																																					
<b>Procédure de coloration</b>	Le réactif Dako Modified Eosin Y (code CS711) est prêt à l'emploi. Destiné à être utilisé sur l'appareil Dako CoverStainer. Lire la section Administration du guide de l'utilisateur de l'appareil Dako CoverStainer et programmer l'appareil conformément au protocole de coloration H&E progressif fourni ci-dessous. Le protocole recommandé a été validé par Dako Denmark A/S. <b>Protocole H&amp;E progressif de Dako :</b> Préchauffage pendant 10 minutes à 65 °C <table border="1"> <thead> <tr> <th>Étape</th> <th>Réservoir</th> <th>Station</th> <th>Flacon</th> <th>Réactif</th> <th>Temps min.</th> <th>Temps max.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>1</td><td>1</td><td>1-2</td><td>A</td><td>Xylène 1*</td><td>03:00</td><td>03:30</td></tr> <tr><td>2</td><td>2</td><td>3-4</td><td>B</td><td>Xylène 2*</td><td>03:00</td><td>03:30</td></tr> <tr><td>3</td><td>3</td><td>5-6</td><td>C</td><td>EtOH 1 à 96%</td><td>01:00</td><td>-</td></tr> <tr><td>4</td><td>4</td><td>7-8</td><td>D</td><td>EtOH 2 à 96%</td><td>02:00</td><td>-</td></tr> <tr><td>5</td><td>5</td><td>9-10</td><td>E</td><td>EtOH 1 à 70%</td><td>02:00</td><td>-</td></tr> <tr><td>6</td><td>18</td><td>33-36</td><td>-</td><td>Eau du robinet</td><td>01:00</td><td>-</td></tr> <tr><td>7</td><td>8</td><td>16</td><td>I</td><td>Eau déionisée 2</td><td>01:00</td><td>01:00</td></tr> <tr><td>8</td><td>8</td><td>15</td><td>H</td><td>Dako Harris Hematoxylin</td><td>03:00</td><td>03:00</td></tr> <tr><td>9</td><td>7</td><td>13-14</td><td>G</td><td>Eau déionisée 1</td><td>01:00</td><td>01:00</td></tr> <tr><td>10</td><td>9</td><td>17</td><td>J</td><td>Dako Bluing Buffer</td><td>01:00</td><td>01:00</td></tr> <tr><td>11</td><td>17</td><td>33-36</td><td>-</td><td>Eau du robinet</td><td>01:00</td><td>01:00</td></tr> <tr><td>12</td><td>6</td><td>11-12</td><td>V</td><td>EtOH 2 à 70%</td><td>01:00</td><td>01:00</td></tr> <tr><td>13</td><td>10</td><td>19</td><td>L</td><td>Dako Modified Eosin Y</td><td>01:00</td><td>01:00</td></tr> <tr><td>14</td><td>11</td><td>21</td><td>N</td><td>EtOH 3 à 96%</td><td>01:00</td><td>01:00</td></tr> <tr><td>15</td><td>11</td><td>22</td><td>O</td><td>EtOH 1 à 99,9%</td><td>01:00</td><td>01:00</td></tr> <tr><td>16</td><td>12</td><td>23-24</td><td>P</td><td>EtOH 2 à 99,9%</td><td>01:00</td><td>01:00</td></tr> <tr><td>17</td><td>13</td><td>25-26</td><td>Q</td><td>EtOH 3 à 99,9%</td><td>01:00</td><td>01:00</td></tr> <tr><td>18</td><td>14-16</td><td>27-32</td><td>R, S, T</td><td>Solvant de sortie*</td><td>01:00</td><td>-</td></tr> </tbody> </table>	Étape	Réservoir	Station	Flacon	Réactif	Temps min.	Temps max.	1	1	1-2	A	Xylène 1*	03:00	03:30	2	2	3-4	B	Xylène 2*	03:00	03:30	3	3	5-6	C	EtOH 1 à 96%	01:00	-	4	4	7-8	D	EtOH 2 à 96%	02:00	-	5	5	9-10	E	EtOH 1 à 70%	02:00	-	6	18	33-36	-	Eau du robinet	01:00	-	7	8	16	I	Eau déionisée 2	01:00	01:00	8	8	15	H	Dako Harris Hematoxylin	03:00	03:00	9	7	13-14	G	Eau déionisée 1	01:00	01:00	10	9	17	J	Dako Bluing Buffer	01:00	01:00	11	17	33-36	-	Eau du robinet	01:00	01:00	12	6	11-12	V	EtOH 2 à 70%	01:00	01:00	13	10	19	L	Dako Modified Eosin Y	01:00	01:00	14	11	21	N	EtOH 3 à 96%	01:00	01:00	15	11	22	O	EtOH 1 à 99,9%	01:00	01:00	16	12	23-24	P	EtOH 2 à 99,9%	01:00	01:00	17	13	25-26	Q	EtOH 3 à 99,9%	01:00	01:00	18	14-16	27-32	R, S, T	Solvant de sortie*	01:00	-
Étape	Réservoir	Station	Flacon	Réactif	Temps min.	Temps max.																																																																																																																																
1	1	1-2	A	Xylène 1*	03:00	03:30																																																																																																																																
2	2	3-4	B	Xylène 2*	03:00	03:30																																																																																																																																
3	3	5-6	C	EtOH 1 à 96%	01:00	-																																																																																																																																
4	4	7-8	D	EtOH 2 à 96%	02:00	-																																																																																																																																
5	5	9-10	E	EtOH 1 à 70%	02:00	-																																																																																																																																
6	18	33-36	-	Eau du robinet	01:00	-																																																																																																																																
7	8	16	I	Eau déionisée 2	01:00	01:00																																																																																																																																
8	8	15	H	Dako Harris Hematoxylin	03:00	03:00																																																																																																																																
9	7	13-14	G	Eau déionisée 1	01:00	01:00																																																																																																																																
10	9	17	J	Dako Bluing Buffer	01:00	01:00																																																																																																																																
11	17	33-36	-	Eau du robinet	01:00	01:00																																																																																																																																
12	6	11-12	V	EtOH 2 à 70%	01:00	01:00																																																																																																																																
13	10	19	L	Dako Modified Eosin Y	01:00	01:00																																																																																																																																
14	11	21	N	EtOH 3 à 96%	01:00	01:00																																																																																																																																
15	11	22	O	EtOH 1 à 99,9%	01:00	01:00																																																																																																																																
16	12	23-24	P	EtOH 2 à 99,9%	01:00	01:00																																																																																																																																
17	13	25-26	Q	EtOH 3 à 99,9%	01:00	01:00																																																																																																																																
18	14-16	27-32	R, S, T	Solvant de sortie*	01:00	-																																																																																																																																
<b>Interprétation de la coloration</b>	Le réactif Dako Modified Eosin Y colore le cytoplasme de certaines cellules (par ex., du muscle), le collagène et les hématies en des teintes variées allant du rose à l'orangé.																																																																																																																																					
<b>Informations supplémentaires</b>	Consulter le guide de l'utilisateur de l'appareil Dako CoverStainer pour des informations supplémentaires sur l'appareil et le mode d'emploi.																																																																																																																																					

\*Xylène ou substitut de xylène, Dako recommande Histo-Clear II (National Diagnostic, Inc), HS-202.

Une fois la procédure de coloration terminée, les sections sont installées dans l'appareil Dako CoverStainer à l'aide des milieux de montage Dako CoverStainer Mounting Medium (code CS703) ou Dako Toluene-Free Mounting Medium (code CS705). Les lames doivent sécher pendant 10 minutes sur l'instrument avant l'interprétation.

Il est recommandé de vérifier les paramètres de protocole avant la première utilisation.

**DEUTSCH**

- Verwendungszweck** Zur In-vitro-Diagnostik.  
Dako Modified Eosin Y ist zur primären Färbung von Zytoplasma (rot) in formalinfixierten, paraffineingebetteten Gewebeschnitten, Gefriergewebeschnitten und Zellpräparaten bestimmt. Es handelt sich um ein gebrauchsfertiges Reagenz für die Verwendung mit dem Dako CoverStainer.
- Geliefertes Reagenz** Wässrige Eosinlösung. Jede Flasche enthält 1000 mL gebrauchsfertiges Reagenz.  
Dako Modified Eosin Y ist nach dem Beladen in den Dako CoverStainer nach 5 Tagen bzw. nach 3.000 Objektträgern auszutauschen (ja nachdem, was zuerst eintritt).
- Vorsichtsmaßnahmen**
1. Zur In-vitro-Diagnostik.
  2. Nur für Fachpersonal bestimmt.
  3. Entsprechende persönliche Schutzausrüstung (PSA) tragen, um Augen- und Hautkontakt zu vermeiden.
  4. Verwendete und auch nicht verwendete Lösung ist entsprechend örtlichen, staatlichen und EU-rechtlichen Richtlinien zu entsorgen.
- Lagerung** Bei Raumtemperatur aufbewahren. Nach Ablauf des auf der Flasche aufgedruckten Verfallsdatums nicht mehr verwenden. Beim Zurückfüllen des Reagenz in die Flasche zur Aufbewahrung über Nacht beträgt die Stabilität im Gerät 5 Tage. Sollten die Reagenzien unter anderen Bedingungen als den beschriebenen aufbewahrt worden sein, so müssen diese vom Anwender verifiziert werden. Es gibt keine offensichtlichen Anhaltspunkte für die mögliche Instabilität dieses Produkts. Wenn eine unerwartete Anfärbung beobachtet wird, die durch Abweichungen in den Labormethoden nicht erklärt werden kann, und falls Verdacht auf ein Problem mit dem Reagenz besteht, bitte Kontakt mit dem technischen Kundendienst von Dako aufnehmen.
- Gewebevorbereitung**  
Paraffinschnitte:  
Dako Modified Eosin Y kann für die primäre Färbung von formalinfixierten, paraffineingebetteten Gewebeschnitten verwendet werden.  
Gefrierschnitte und Zellpräparate:  
Dako Modified Eosin Y Hematoxylin kann zur primären Färbung von azetonfixierten Gefrierschnitten oder fixierten Zellausstrichen verwendet werden.
- Färbeverfahren** Dako Modified Eosin Y, Code-Nr. CS711, ist gebrauchsfertig. Für die Verwendung mit dem Dako CoverStainer. Bitte im Benutzerhandbuch Dako CoverStainer, Abschnitt „Administration“ nachschlagen, und das Gerät auf das unten aufgeführte progressive H&E-Färbeprotokoll programmieren.  
Das empfohlene Protokoll wurde von Dako Denmark A/S getestet.

**Progressives H&E-Protokoll von Dako**

Vorwärmen für 10 Minuten bei 65 °C

Schritt	Eintauchtank	Station	Flasche	Reagenz	Min.-Zeit	Max.-Zeit
1	1	1-2	A	Xylol 1*	03:00	03:30
2	2	3-4	B	Xylol 2*	03:00	03:30
3	3	5-6	C	96% EtOH 1	01:00	–
4	4	7-8	D	96% EtOH 2	02:00	–
5	5	9-10	E	70% EtOH 1	02:00	–
6	18	33-36	–	Leitungswasser	01:00	–
7	8	16	I	Entionisiertes Wasser 2	01:00	01:00
8	8	15	H	Dako Harris Hematoxylin	03:00	03:00
9	7	13-14	G	Entionisiertes Wasser 1	01:00	01:00
10	9	17	J	Dako Bläueungspuffer	01:00	01:00
11	17	33-36	–	Leitungswasser	01:00	01:00
12	6	11-12	F	70% EtOH 2	01:00	01:00
13	10	19	L	Dako Modified Eosin Y	01:00	01:00
14	11	21	n	96% EtOH 3	01:00	01:00
15	11	22	O	99,9% EtOH 1	01:00	01:00
16	12	23-24	P	99,9% EtOH 2	01:00	01:00
17	13	25-26	Q	99,9% EtOH 3	01:00	01:00
18	14-16	27-32	R, S, T	Ausgabelösungsmittel*	01:00	–

\*Xylol oder Xylolersatzstoff, Dako empfiehlt Histo-Clear II (National Diagnostic, Inc), HS-202.

Nach Abschluss des Färbeverfahrens werden die Schnitte mithilfe von Dako CoverStainer Mounting Medium, Code-Nr. CS703, oder Dako Toluene-Free Mounting Medium, Code-Nr. CS705, in den Dako CoverStainer beladen. Vor einer Auswertung müssen die Objektträger 10 Minuten lang auf dem Instrument trocknen.

Es wird empfohlen, vor der erstmaligen Verwendung die Protokolleinstellungen zu überprüfen.

- Auswertung der Färbung** Dako Modified Eosin Y färbt Zytoplasma bestimmter Zellen (z. B. Muskelzellen), Kollagen und Erythrozyten in verschiedenen Farbtönen von Pink bis Orange.
- Weitere Informationen** Weitere Informationen über das Gerät und die Gebrauchsanweisung finden Sie im Benutzerhandbuch für das Dako CoverStainer-Gerät.








**Companion Products/ Produits d'accompagnement/ Begleitprodukte**

Code CS709, Dako Harris Hematoxylin  
Code CS702, Dako Bluing Buffer

Code CS703, Dako Mounting Medium  
or/ ou/ oder  
Code CS705, Dako Toluene Free Mounting Medium

Code CS704, Dako Cover Glass

**Explanation of symbols/ Explications des symboles/ Erläuterung der Symbole**

 REF	Catalogue number Référence du catalogue Katalognummer	 15°C - 30°C	Temperature limitation Limites de température Zulässiger Temperaturbereich		Manufacturer Fabricant Hersteller
 IVD	In vitro diagnostic medical device Dispositif médical de diagnostic in vitro In-vitro-Diagnostikum	 LOT	Batch code Code du lot Chargenbezeichnung		
	Consult instructions for use Consulter le mode d'emploi Gebrauchsanweisung beachten		Use by Utiliser avant Verwendbar bis		

Manufactured by: / Fabriqué par :/ Hergestellt von:  
American Master Tech Scientific (AMTS). Inc, USA

Manufactured for: / Fabriqué pour : / Hergestellt für:  
Dako Denmark A/S, An Agilent Technologies Company

# **Annexe 3**

## H. pylori

### A Rapid Test for the Detection of IgG Antibodies to *H. pylori* in Human Serum, Plasma or Whole Blood

#### Intended Use

The Cypress Diagnostics *H. pylori* test is a single use immunochromatographic screening test for the detection of IgG antibodies to *Helicobacter pylori* in human serum, plasma or blood. The test is to be used as an aid in the diagnosis of infection due to *H. pylori*, formerly known as *Campylobacter pylori*, in patients with gastrointestinal symptoms.

FOR IN VITRO DIAGNOSTIC USE ONLY.

FOR PROFESSIONAL USE ONLY.

#### Summary and Explanation

*H. pylori* is a spiral, flagellated gram negative bacteria. It colonizes the gastric epithelium of humans and plays a causative role in a variety of gastrointestinal disorders including non-ulcer dyspepsia, duodenal and gastric ulcers, active and chronic gastritis and perhaps the gastric cancer [1-9].

The WHO has designated it as a Class I carcinogen [5]. In patients with signs and symptoms of gastritis, duodenal ulcer or non-ulcer dyspepsia the prevalence rates for *H. Pylori* infection can exceed 90 percent. Among subjects with a parental history of stomach cancer a much higher prevalence of *H. pylori* infection is observed [6].

The detection of the specific IgG antibodies to *H. Pylori* has been shown to be an accurate method for the detection of *H. Pylori* in symptomatic patients. However, *H. Pylori* may colonize some asymptomatic persons.

Several types of immunological tests such as ELISA, Western blots, Recombinant Immunoblot Assays and DNA-based assays are currently used for the detection of *H. pylori* [9]. This Cypress *H. pylori* test is a rapid and userfriendly immunochromatographic test. This information can be used by the physician for ulcer disease management.

#### Principle of the Test

The Cypress *H. pylori* test is a rapid immunochromatographic screening test for the detection of IgG antibodies to *H. pylori*. It can be used with serum, plasma or whole blood. The test device contains a membrane strip which is pre-coated with *H.pylori* antigens on the test region and *H.pylori* specific monoclonal antibody on the control region. The *H.pylori* antigens-colloid gold conjugate pad is placed at the end of the membrane. When the *H.pylori* specific IgG antibodies are present in patient samples, the mixture of colloid gold conjugate, patient sample and developer buffer moves along the membrane chromatographically to the test region (T) and forms a visible red line as the antigen-antibody-antigen gold particle complex forms. Therefore, the formation of a visible line in the test region (T) indicates a positive result for the detection of *H.pylori* specific IgG antibodies. When the *H.pylori* specific IgG antibodies are absent in the sample, no visible red line will form in the test region (T). Therefore, the absence of a visible line in the test region (T) indicates a negative result for the detection of *H.pylori* specific IgG antibodies. A red line will always appear in the control region (C). This control line serves as a procedural indicator that: 1) verification that sufficient volume has been added, 2) verification that proper flow is obtained, and 3) reagent control.

#### Content of the Kit

Each kit contains the items to perform 20 tests:

- 20 individually wrapped test devices with disposable transfer pipet.
- buffer vial.
- 1 Instruction leaflet.

#### Additional Materials Required :

- Timer
- Vacutainer tubes: plain for serum procedure, EDTA, heparin or citrate for plasma or whole blood procedure.
- Sterile single use lancets (for fingerstick whole blood samples only).
- Sterile alcohol swabs (for fingerstick whole blood samples only).

#### Storage and Stability

The *H. Pylori* test kit should be stored at room temperature (10-30 °C) in the original sealed pouch. The test kit is stable until the date imprinted on the box label and/or foil pouch. Do not use expired test kits. Do not freeze test kits

#### Precautions

1. The test is for in vitro diagnostic and for professional use only. Use the test only in accordance with instructions supplied with the kit.
2. The test device should remain in the sealed pouch until use. Do not use after the expiration date.
3. Do not mix reagents from different lots.
4. Do not use whole blood specimens which have been stored for more than three days
5. Heat treated and/or contaminated sera may cause erroneous result
6. Developer buffer contains sodium azide which may react with lead or copper plumbing to form potentially explosive metal azides. When disposing of these solutions always flush with copious amounts of water to prevent azide buildup
7. Standard guidelines for handling infectious agents and chemical reagents should be observed throughout all procedures. All contaminated waste such as patient samples and used devices should be properly disposed of.

#### Specimen Collection

The Cypress *H. pylori* test is performed on whole blood, serum or plasma.

**Fingerstick :** Clean the area to be lanced with a sterile swab. Squeeze the end of the fingertip and prick the finger with a sterile lancet. Wipe away the first drop of blood. Use the provided transfer pipet to collect enough sample (more than 40µl) of blood. Dispense two full drops (about 40µl) of fresh blood into the sample well.

**Whole Blood :** Collect whole blood into tubes containing heparin, EDTA or sodium citrate by venipuncture. The whole blood may be used for testing immediately or may be stored at 4-8°C up to three days.

**Serum :** Serum is used from whole blood collected aseptically by venipuncture into a clean tube without anticoagulant. Allow the blood to clot at room temperature about 30 minutes and separate the serum by centrifugation. Carefully withdraw the serum for testing, or store at 4-8°C for up to 2 weeks. Serum may also be frozen at -20°C for up to 1 year.

**Plasma :** Collect whole blood with anticoagulants (heparin, EDTA or sodium citrate) by venipuncture and separate the plasma by centrifugation. Carefully withdraw the serum for testing, or store at 4-8°C for up to at least 3 months.

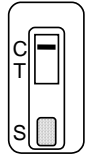
#### Procedure

1. Allow the test devices, developer buffer, patient's samples and controls to come to room temperature.
2. Bring the device to room temperature before opening the pouch to avoid condensation of moisture on the membrane. Remove the test device from its foil pouch when ready to perform the test.
3. Label the test unit with patient name or identification number.
4. Add the sample onto the SAMPLE well with the provided transfer pipet.
  - Serum or plasma: 1 drop (about 20µl)
  - Whole blood: 2 drops (about 40µl)
  - Fingerstick blood: 2 full drops (about 40µl)Hold the transfer pipet in a vertical position when adding the sample to the sample well.
5. Immediately add 2 or 3 drops of developer buffer
6. After the addition of the developer buffer, wait for the red lines to appear. Depending on the concentration of IgG antibodies present,



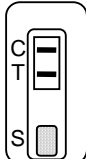
positive result may appear as soon as 1 minute. However, to confirm a negative result, the complete reaction time of 5 minutes is required. Do not interpret results after 8 minutes.

### Interpretation of Results



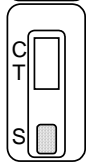
#### Negative

Only one red line in the CONTROL area, with no line in the TEST area indicates a negative result.



#### Positive

Two red lines, one in the Test (T) area and one in the Control (C) area indicate a positive result.  
NOTE : Even a very faint red line in the TEST area of the device within the stated time limit is indicative of a positive result.



#### Inconclusive

A red line should always appear in the CONTROL area within 5 minutes (no matter if the TEST LINE appears or not). If there is no distinct red line visible in the CONTROL area, the test failed, or the test procedure was not followed properly. Verify the test procedure and repeat the test with a new testing device.

### Quality Control

A red line should always appear in the control area if the test has been performed correctly and the device is working properly. It serves as an internal test procedural control. A clear background in the test area is an internal negative procedural control. However, when whole blood samples are tested, the background may appear slightly reddish due to the low level hemolysis of some red blood cells. This is acceptable as long as it does not interfere with the interpretation of test result. The test is invalid if the background fails to clear and obscures the reading of the result. Positive and negative serum or plasma based commercial controls should be used for external quality control. Use controls, as per the procedure instructions of this insert.

### Limitations of the Procedure

- This test kit is to be used for the qualitative detection of IgG antibodies to H.pylori.
- This test kit should be used for symptomatic individuals suspected of having gastrointestinal disorders. Diagnosis of gastritis and/or peptic ulcer should be made by confirmation with other clinical findings.
- A positive result suggests the presence of IgG antibodies to H.pylori. It does not distinguish between active infection and past exposure to H.pylori and does not necessarily indicate the presence of gastrointestinal disease.
- A negative result does not rule out H.pylori infection because the IgG antibodies to H.pylori may be absent or may not be present in sufficient quantity to be detected.

### Performance Characteristics

#### Sensitivity and specificity

##### a. Comparison with biopsy results

- The accuracy of the Cypress H.pylori test was evaluated in comparison to biopsy results of human specimens. Out of 317 samples, 283 test results agreed with the biopsy result. 34 samples gave different results.
- A commercial EIA kit was used to reanalyze the discrepant samples. Out of the 18 positive Cypress H.pylori test results, 15 samples were positive, and 3 were negative. Out of the 16 Cypress H.pylori negative test results, 1 was negative, 4 were indeterminate and 11 were positive when tested in comparison with an EIA kit. The biopsy sample comparison results are summarized in Table 1

Table 1

	Cypress positive	Cypress negative	Total
Biopsy positive	199	16	215
Biopsy negative	18	84	102
Total	217	100	317

- This comparison study results gave a sensitivity of 92.6% (199/215), a specificity of 82.4% (84/102), and a total agreement of 89.3% (283/317).
- The relatively low specificity of the serological test results in comparison to the biopsy results may be partially attributed to a sampling error of the biopsy test.

##### b. Comparison Study with a Commercially Available Rapid One-Step H.pylori test

- The accuracy of the Cypress H.pylori test was also evaluated against a commercially available rapid One-Step H.pylori test (SureStep) using serum/plasma specimens. In a side by side comparison using the Cypress H.pylori test and SureStep One-Step

H.pylori test. The discrepant specimens were tested with a commercial EIA kit.

- When tested with an EIA kit, out of these 12 samples, 3 were positive, 7 were negative, and 2 were indeterminate. The comparison results are summarized in Table 2:

Table 2

	Cypress positive	Cypress negative	Total
SureStep positive	63	12	75
SureStep negative	0	95	95
Total	63	107	170

These results, gave a relative sensitivity of 84.0% (63/75), a relative specificity of 100% (95/95), and a total agreement of 92.9% (158/170).

#### Test Sensitivity:

Since there is no sensitivity standard established for H.pylori IgG antibodies, the following dilution (test sensitivity) studies were performed for comparison purposes.

6 H.pylori positive human specimens (serum/plasma) purchased from suppliers were diluted with an H.pylori negative human serum. The diluted samples were tested with the Cypress H.pylori test and SureStep One-Step H.pylori test. The results of the test sensitivity study are as follows:

- 1:160 all positive
- 1:320 all positive with Cypress, 3 negative with SureStep
- 1:640 1 positive, 5 negative with both tests
- 1:1280 all negative

These results indicated that the sensitivity of Cypress H.pylori test was determined to be comparable to the commercial rapid One-Step H.pylori test.

#### Specificity:

##### Cross Reactivity

No cross reactivity was observed with Cypress H.pylori test when evaluated by an inhibitory assay. Based on these results, it can be concluded that the Cypress H.pylori test is specific for the H.pylori IgG antibodies.

##### Non-Specific Interference

The Cypress H.pylori test was evaluated for possible interference from visibly hemolyzed, lipemic and icteric samples. The results indicate that there is no interference in the performance of Cypress H.pylori test by triglycerides up to 2370 mg/dl, hemoglobin up to 10 mg/ml, bilirubin up to 0.5 mg/ml and albumin up to 100 mg/ml.

#### Specimen Matrix Study

The Cypress H.pylori test can be used with serum/plasma and whole blood specimens. A comparison study was conducted to verify the performance of the Cypress H.pylori test in the three types of specimens.

The results of the specimen matrix study illustrate that an excellent agreement exists between serum/plasma and venous whole blood specimens, and between venous whole blood and capillary whole blood. No significant difference in performance was observed.

#### Reproducibility/Site Study

The precision of the Cypress H.pylori test has been evaluated at 4 independent sites.

Of the 40 positive samples with two levels of H.pylori antibodies, the results were all positive. Test results of 20 negative samples rendered 100% agreement with expected results.

#### Reference

1. Buck, G.E et al.(1986) Relation of Campylobacter Pyloridis to Gastritis and Peptic Ulcers. *J. Infect. Dis.* 153: 664-669.
2. Graham, D.Y. (1989) Campylobacter and Peptic Ulcer Disease. *Gastroenterology* 96: 615-625.
3. Peterson, W.L. (1991) Helicobacter Pylori and Peptic Ulcer Disease. *The New England Journal of Medicine* 324: 1043.
4. Tytgat, G.N.J. et al. (1991) Helicobacter Pylori: A Causal Agent in Peptic Ulcer Disease?. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 6: 103-140.
5. Barthel, JS and Evertt, E.D. (1990) Diagnosis of Campylobacter Pylori Infections: The 'Gold Standard' and the Alternatives. *Rev. Infect. Dis.* 12: 107-114.
6. Lin, S.K. et al. (1992) A Comparison of Diagnostic Tests to Determine Helicobacter Pylori Infection. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 7: 203-209.
7. Newell, D.J. and Stacey, A.R. "The Serology of Campylobacter Pylori Infections" in B.J. Rathbone and R.V. Headly (ed.), *Campylobacter Pylori and Gastrointestinal Disease* (Blackwell Scientific Publications: Oxford, 1989), p. 74-82.
8. Pronovost, A.D. et al. (1994) Evaluation of a New Immunodiagnostic Assay for Helicobacter Pylori Antibody Detection; Correlation with Histopathological and Microbiological Results. *J. Clin. Microbiol.* 32: 46.
9. Goodwin, C.S. et al. Immunosorbent Assay for Campylobacter Pyloridis: Correlation with Presence of C. Pyloridis in Gastric.

Langdorp, 10.2009



# **Annexe 4**

## Certificate of Analysis

### GoTaq® G2 DNA Polymerase:

Supplied With:

Cat. #	GoTaq® G2 DNA Polymerase	5X Green GoTaq® Reaction Buffer	5X Colorless GoTaq® Reaction Buffer
M7841	100 units (M784A)	1ml (M791A)	1ml (M792A)
M7842	100 units (M784A)		
M7845	500 units (M784B)	4 × 1ml (M791A)	4 × 1ml (M792A)
M7848	2,500 units (M784B)	20 × 1ml (M791A)	20 × 1ml (M792A)

**Description:** GoTaq® G2 DNA Polymerase<sup>(a,b)</sup> contains GoTaq® G2 DNA Polymerase, 5X Green GoTaq® Reaction Buffer and 5X Colorless GoTaq® Reaction Buffer. The enzyme is supplied in a proprietary formulation containing 50% glycerol with buffers designed for enhanced amplification. The enzyme is a full-length form of *Taq* DNA polymerase that exhibits 5'→3' exonuclease activity. The 5X Green GoTaq® Reaction Buffer, contains two dyes (blue and yellow) that separate during electro-phoresis to indicate migration progress. The colorless buffer is used when direct fluorescence or absorbance readings are required without prior purification of the amplified DNA from the PCR. Both buffers contain MgCl<sub>2</sub> at a concentration of 7.5mM for a final concentration of 1.5mM in the 1X reaction.

**Biological Source:** The enzyme is derived from bacteria.

**Enzyme Concentration:** 5u/μl.

**5X Green GoTaq® Reaction Buffer (Part# M791A, M791B):** Proprietary formulation supplied at pH 8.5 containing blue and yellow dyes. In a 1% agarose gel, the blue dye migrates at the same rate as 3–5kb DNA fragments, and the yellow dye migrates at a rate faster than primers (<50bp). Green GoTaq® Reaction Buffer also increases the density of the sample, so it will sink into the well of the agarose gel, allowing reactions to be loaded directly onto gels without loading dye. This buffer contains 7.5mM magnesium. Vortex thoroughly after thawing and prior to use.

**5X Colorless GoTaq® Reaction Buffer (Part# M792A, M792B):** Proprietary formulation supplied at pH 8.5. This buffer contains 7.5mM magnesium. Vortex thoroughly after thawing and prior to use.

**Storage Conditions:** See the Product Information Label for storage recommendations. Avoid exposure to frequent temperature changes. See the expiration date on the Product Information label.

**Unit Definition:** One unit is defined as the amount of enzyme required to catalyze the incorporation of 10 nanomoles of dNTPs into acid-insoluble material in 30 minutes at 74°C. The reaction conditions are specified below under Standard DNA Polymerase Assay Conditions.

Part# 9PIM784

Revised 10/16



AF9PIM784 1016M784



## Promega

### Promega Corporation

2800 Woods Hollow Road	
Madison, WI 53711-5399 USA	
Telephone	608-274-4330
Toll Free	800-356-9526
Fax	608-277-2516
Internet	www.promega.com

## Quality Control Assays

**Functional Assay:** GoTaq® G2 DNA Polymerase is tested for performance in the polymerase chain reaction (PCR) to amplify a 360bp region of the  $\alpha$ -1-antitrypsin gene and a 2.4kb region of the APC gene from 100 molecules (0.35ng) of human genomic DNA in separate reactions. The resulting PCR products are visualized as single bands on an ethidium bromide-stained agarose gel.

**Nuclease Assays:** No contaminating endonuclease or exonuclease activity detected.

**Standard DNA Polymerase Assay Conditions (Not PCR Conditions):** The polymerase activity is assayed in 50mM Tris-HCl (pH 9.0); 50mM NaCl; 5mM MgCl<sub>2</sub>; 200μM each of dATP, dGTP, dCTP, dTTP (a mix of unlabeled and [<sup>3</sup>H]dTTP); 10μg activated calf thymus DNA; 0.1mg/ml BSA in a final volume of 50μl.

**5X Green GoTaq® Reaction Buffer Migration Pattern:** The 5X Green GoTaq® Reaction Buffer does not interfere with the migration of a 1kb DNA ladder when it is used as a loading dye for agarose gel electrophoresis.



### PCR Satisfaction Guarantee

Promega's PCR Systems, enzymes and reagents are proven in PCR to ensure reliable, high performance results. Your success is important to us. Our products are backed by a worldwide team of Technical Support scientists. Please contact them for applications or technical assistance. If you are not completely satisfied with any Promega PCR product we will send a replacement or refund your account.

*That's Our PCR Guarantee!*

Product must be within expiration date and have been stored and used in accordance with product literature. See Promega Product Insert for specific tests performed.

(a)Use of this product for basic PCR is outside of any valid US or European patents assigned to Hoffman La-Roche or Applera. This product can be used for basic PCR in research, commercial or diagnostic applications without any license or royalty fees.

(b)U.S. Pat. No. 6,242,235, Australian Pat. No. 761757, Canadian Pat. No. 2,335,153, Chinese Pat. No. ZL99808861.7, Hong Kong Pat. No. HK 1040262, Japanese Pat. No. 3673175, European Pat. No. 1088060 and other patents pending.

Signed by:

R. Wheeler, Quality Assurance

### PRODUCT USE LIMITATIONS, WARRANTY DISCLAIMER

Promega manufactures products for a number of intended uses. Please refer to the product label for the intended use statements for specific products. Promega products contain chemicals which may be harmful if misused. Due care should be exercised with all Promega products to prevent direct human contact.

Each Promega product is shipped with documentation stating specifications and other technical information. Promega products are warranted to meet or exceed the stated specifications. Promega's sole obligation and the customer's sole remedy is limited to replacement of products free of charge in the event products fail to perform as warranted. Promega makes no other warranty of any kind whatsoever, and SPECIFICALLY DISCLAIMS AND EXCLUDES ALL OTHER WARRANTIES OF ANY KIND OR NATURE WHATSOEVER, DIRECTLY OR INDIRECTLY, EXPRESS OR IMPLIED, INCLUDING, WITHOUT LIMITATION, AS TO THE SUITABILITY, PRODUCTIVITY, DURABILITY, FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE OR USE, MERCHANTABILITY, CONDITION, OR ANY OTHER MATTER WITH RESPECT TO PROMEGA PRODUCTS. In no event shall Promega be liable for claims for any other damages, whether direct, incidental, foreseeable, consequential, or special (including but not limited to loss of use, revenue or profit), whether based upon warranty, contract, tort (including negligence) or strict liability arising in connection with the sale or the failure of Promega products to perform in accordance with the stated specifications.

© 2013, 2015, 2016 Promega Corporation. All Rights Reserved.

GoTaq and Wizard are registered trademarks of Promega Corporation.

Products may be covered by pending or issued patents or may have certain limitations. Please visit our Web site for more information.

All prices and specifications are subject to change without prior notice.

Product claims are subject to change. Please contact Promega Technical Services or access the Promega online catalog for the most up-to-date information on Promega products.

Part# 9PIM784

Printed in USA. Revised 10/16.

## 1. Standard Application

### Reagents to Be Supplied by the User

- PCR Nucleotide Mix (Cat.# C1141)
- Nuclease-Free Water (Cat.# P1193)
- upstream primer
- downstream primer
- template DNA
- mineral oil (optional)

1. In a sterile, nuclease-free microcentrifuge tube, combine the following components on ice:

Component	Final Volume	Final Concentration
5X Green or Colorless GoTaq <sup>®</sup> Reaction Buffer <sup>1</sup>	10µl	1X (1.5mM MgCl <sub>2</sub> ) <sup>2</sup>
PCR Nucleotide Mix, 10mM each	1µl	0.2mM each dNTP
upstream primer	Xµl	0.1–1.0µM
downstream primer	Yµl	0.1–1.0µM
GoTaq <sup>®</sup> G2 DNA Polymerase (5u/µl)	0.25µl	1.25u
template DNA	Zµl	<0.5µg/50µl
Nuclease-Free Water to	50µl	

<sup>1</sup>Thaw completely, and vortex thoroughly prior to use.

<sup>2</sup>More MgCl<sub>2</sub> can be added to the reaction using 25mM MgCl<sub>2</sub> Solution (Cat.# A3511).

2. If using a thermal cycler **without a heated lid**, overlay the reaction mix with 1–2 drops (approximately 50µl) of mineral oil to prevent evaporation during thermal cycling. Centrifuge the reactions in a microcentrifuge for 5 seconds.
3. Place reactions into a thermal cycler that has been heated to 94–95°C and begin PCR.

## 2. General Guidelines for Amplification by PCR

### 2.A. Denaturation

- Following an initial 2-minute 94–95°C denaturation, denaturation steps should be between 15 seconds and 1 minute per cycle.

### 2.B. Annealing

- Optimize the annealing conditions by performing the reaction with an annealing temperature approximately 5°C below the calculated melting temperature of the primers and increasing the temperature in increments of 1°C.
- The annealing step is typically 15 seconds to 1 minute.

### 2.C. Extension

- The extension reaction is typically performed at the optimal temperature for Taq DNA polymerase, which is 72–74°C.
- Allow approximately 1 minute for every 1kb of DNA to be amplified.
- A final extension of 5 minutes at 72–74°C is recommended.

### 2.D. Soak

- If the thermal cycler has a refrigeration or "soak" cycle, the thermal cycler can be programmed to hold the tubes at 4°C for several hours after amplification.
- This cycle minimizes polymerase activity, which might occur at higher temperatures, although this is not usually a problem.

### 2.E. Cycle Number

- Generally, 25–30 cycles result in optimal amplification of desired products.
- Up to 40 cycles may be performed, especially to detect low-copy targets.

## 3. General Considerations

### 3.A. Buffer Choice

We recommend using the 5X Green GoTaq<sup>®</sup> Reaction Buffer in any amplification reaction that will be visualized by agarose gel electrophoresis followed by ethidium-bromide staining. The 5X Green GoTaq<sup>®</sup> Reaction Buffer is not recommended for any downstream applications using absorbance or fluorescence excitation because the yellow and blue dyes in the reaction buffer may interfere with these applications. The dyes absorb at 225–300nm, making standard A<sub>260</sub> readings to determine DNA concentration unreliable. Also, the dyes have excitation peaks at 488nm and 600–700nm, which correspond to excitation wavelengths commonly used in fluorescence-detection instrumentation. However, for

some instrumentation, such as a fluorescent gel scanner that uses a 488nm excitation wavelength, there will be minimal interference, since it is the yellow dye that absorbs at this wavelength. Gels scanned by this method will have a light gray dye front below the primers that corresponds to the yellow dye front. The Green and Colorless GoTaq<sup>®</sup> Reaction Buffers give approximately equivalent amplification yields. To obtain equal amplification yields with the two buffers, PCR conditions will likely require optimization.

For reactions going directly from thermal cycler to an application using absorbance or fluorescence, we recommend the 5X Colorless GoTaq<sup>®</sup> Reaction Buffer. If both agarose gel analysis and further downstream applications involving absorbance or fluorescence will be used, the two dyes can be removed from the Green GoTaq<sup>®</sup> Reaction reactions using standard PCR clean-up systems like the Wizard<sup>®</sup> SV Gel and PCR Clean-Up System (Cat.# A9281) or Wizard<sup>®</sup> SV 96 PCR Clean-Up System (Cat.# A9341).

### 3.B. Enzyme Concentration

Promega has found that 1.25 units of GoTaq<sup>®</sup> G2 DNA Polymerase per 50µl amplification reaction is adequate for most amplifications. Adding extra enzyme generally does not produce significant increases in yield. However, in some cases, more or less enzyme may be beneficial.

### 3.C. Primer Design

PCR primers generally range in length from 15 to 30 bases and are designed to flank the region of interest. Primers should contain 40–60% (G + C), and care should be taken to avoid sequences that might produce internal secondary structure. The 3'-ends of the primers should not be complementary to avoid production of primer-dimers. Primer-dimers unnecessarily deplete primers from the reaction and result in an unwanted polymerase reaction that competes with the desired reaction. Avoid three G or C nucleotides in a row near the 3'-end of the primer because this may result in nonspecific primer annealing, increasing synthesis of undesirable reaction products. Ideally, both primers should have nearly identical melting temperatures (T<sub>m</sub>) so that the two primers anneal at roughly the same temperature. The annealing temperature of the reaction depends on the T<sub>m</sub> of the primer with the lowest T<sub>m</sub>. For assistance with calculating the T<sub>m</sub> of any primer, a T<sub>m</sub> Calculator is provided on the BioMath page of the Promega web site at:

[www.promega.com/biomath/](http://www.promega.com/biomath/)

### 3.D. Amplification Troubleshooting

To overcome low yield or no yield in amplifications, we recommend the following suggestions:

- Adjust annealing temperature. The reaction buffer composition affects the melting properties of DNA. See BioMath Calculator to calculate the melting temperature for primers in the GoTaq<sup>®</sup> reaction ([www.promega.com/biomath/](http://www.promega.com/biomath/)).
- Minimize the effect of amplification inhibitors. Some DNA isolation procedures, particularly genomic DNA isolation, can result in copurification of amplification inhibitors. Reduce the volume of template DNA in the reaction, or dilute the template DNA prior to addition. Diluting samples up to 1:10,000 can improve results, depending on the initial DNA concentration.
- Increase template DNA purity. Include an ethanol precipitation and wash step prior to amplification to remove inhibitors that copurify with the DNA.
- Add PCR additives. Adding PCR-enhancing agents (e.g., DMSO or betaine) may improve yields. General stabilizing agents such as BSA also may help to overcome amplification failure.

### 3.E. More Information on Amplification

More information on amplification is available online at the Promega web site:

*PCR Amplification:* [www.promega.com/resources/product-guides-and-selectors/protocols-and-applications-paguide/](http://www.promega.com/resources/product-guides-and-selectors/protocols-and-applications-paguide/)

*PCR Core Systems Technical Bulletin:* [www.promega.com/resources/protocols/](http://www.promega.com/resources/protocols/DNA%20Analysis%20Notebook)

*DNA Analysis Notebook:* [www.promega.com/resources/product-guides-and-selectors/dna-analysis-notebook/](http://www.promega.com/resources/product-guides-and-selectors/dna-analysis-notebook/)

TECHNICAL MANUAL

# Assembly of Restriction Enzyme Digestions



# Assembly of Restriction Enzyme Digestions

All technical literature is available at: [www.promega.com/protocols/](http://www.promega.com/protocols/)  
 Visit the web site to verify that you are using the most current version of this Technical Manual.  
 E-mail Promega Technical Services if you have questions on use of this system: [techserv@promega.com](mailto:techserv@promega.com)

1.	Description.....	1
2.	DNA Substrate Considerations .....	2
3.	Enzyme Storage, Handling and Use .....	3
4.	Setting up a Restriction Enzyme Digestion .....	3
5.	Experimental Controls.....	3
6.	Additional Protocols for Selected Restriction Enzymes.....	4
6.A.	Protocol for Rapid Digestion of Plasmid DNA .....	5
6.B.	Protocol for Direct Digestion of PCR or RT-PCR Products in GoTaq® Green Master Mix or PCR Master Mix .....	5
7.	References.....	6

## 1. Description

Restriction enzymes, also referred to as restriction endonucleases, are enzymes that recognize short, specific (often palindromic) DNA sequences. They cleave double-stranded DNA (dsDNA) at specific sites within or adjacent to their recognition sequences. Most restriction enzymes (REs) will not cut DNA that is methylated on one or both strands of their recognition site, although some require substrate methylation.

Each restriction enzyme has specific requirements for optimal activity. Ideal storage and assay conditions favor the highest enzyme activity and fidelity. Conditions such as temperature, pH, enzyme cofactor(s), salt composition and ionic strength affect enzyme activity and stability. Two reaction buffers usually accompany each Promega restriction enzyme: The optimal reaction buffer, which is from the 4-CORE® Buffer System (Reaction Buffers A, B, C and D) or is one of the other optimal buffers (Reaction Buffers E–L), and MULTI-CORE™ Buffer. The optimal buffer yields 100% activity for the enzyme it accompanies and serves as the specific reaction buffer for individual digests with that enzyme. The MULTI-CORE™ Buffer, which is designed for broad compatibility with many REs, is provided with enzymes that have 25% or greater activity in this buffer. The MULTI-CORE™ Buffer is useful for digestions with multiple REs because it generally yields higher activity for more enzyme combinations than any other buffer but sometimes results in a compromise in activity. Digests using multiple REs with significantly different buffer requirements may require sequential reactions, with addition of RE buffer or salt before the second enzyme is used.



More information on restriction enzyme compatibilities and buffers for double-digests is available in the **Restriction Enzyme Resource** at: [www.promega.com/guides/](http://www.promega.com/guides/), and in the Promega **iPhone/iPad App**, available on the App Store.

## 2. DNA Substrate Considerations

Common DNA substrates for restriction enzymes include bacteriophage lambda DNA, bacterial plasmid DNA and genomic DNA. Lambda DNA is a linear DNA that is an industry standard for measuring and expressing unit activity for many restriction enzymes. Intact supercoiled plasmid DNA and DNAs with a large number of the target restriction site require more units of enzyme (two- to tenfold) per microgram than linear DNA if a linear DNA substrate was used in the enzyme activity assay.

**PCR Products and Oligonucleotides** are relatively small compared to the DNA substrate used in the unit definition. Therefore, when using PCR products and oligonucleotides in a restriction digest, it is essential to consider the molar concentration of enzyme recognition sites and not only the DNA mass. Also, some REs require flanking bases surrounding the core recognition site. This can be a problem when cutting an oligonucleotide or DNA fragment where the recognition site is near the end. When PCR cloning strategies include the use of PCR primers containing an RE site, the primer should be designed with adequate DNA surrounding the core recognition sequence. See the Technical References section at: [www.promega.com/resources/](http://www.promega.com/resources/) for information on the ability of specific restriction enzymes to cut PCR products that have restriction sites near the end of the fragment.

**DNA Purity** is another factor that must be considered. Depending on the purification method and the care taken during handling, the DNA may contain varying amounts of contaminants that affect restriction enzyme digestion. Contaminants may include other types of DNA, nucleases, salts and inhibitors of restriction enzymes. The effect of a contaminant on an RE digest is generally dose-dependent (i.e., inhibitory effects increase with increasing volumes of DNA added to the reaction). Relatively pure DNA is required for efficient restriction enzyme digestion. Contaminating nucleases are usually activated only after the addition of salts (e.g., restriction enzyme buffer) to the DNA. Therefore, appropriate control reactions should always be run in parallel with the restriction enzyme digest (see Section 5).

Buffers containing low concentrations of EDTA (1mM) are often used to protect DNA from nuclease degradation during storage, but EDTA can interfere with restriction enzyme digestion if the final concentration in the reaction is too high. This situation usually occurs when the DNA substrate concentration is low, making it necessary to use a large volume of DNA in the digest. In such cases, it is best to concentrate the DNA (e.g., by ethanol precipitation). Organic solvents, salts, detergents and chelating agents that are sometimes used during DNA purification also can interfere with restriction enzyme activity if they carry over into the final DNA solution. Dialysis or ethanol precipitation with 2.5M ammonium acetate (final concentration before adding ethanol) followed by drying and resuspension can remove many of these substances. Relatively pure DNA is required for efficient restriction enzyme digestion; however, addition of acetylated BSA to a final concentration of 0.1mg/ml can improve the efficiency of restriction enzyme digestion of impure DNA. We recommend that BSA be included in all digests.

### 3. Enzyme Storage, Handling and Use

Maintain the sterility of reagents used in the RE digestion as well as any tools (e.g., tubes and pipette tips) used with those reagents. Restriction enzymes should be stored in a nonfrost-free freezer except for a brief period during use, when they should be kept on ice. The restriction enzyme is usually the last component added to a reaction to ensure that it is not exposed to extreme conditions. When many similar digests are being prepared, it may be convenient to create premixes of common reagents.

Before assembling the restriction enzyme digestion, thoroughly mix each component, then centrifuge briefly to collect contents at the bottom of the tube. The assembled reaction should be mixed after enzyme addition. Mix all solutions containing restriction enzymes gently to avoid enzyme inactivation.

### 4. Setting up a Restriction Enzyme Digestion

An analytical-scale restriction enzyme digestion is usually performed in a volume of 20 $\mu$ l with 0.2–1.5 $\mu$ g of substrate DNA and a two- to tenfold excess of enzyme. If an unusually large volume of DNA or enzyme is used, aberrant results may occur. The following protocol is an example of a typical RE digestion.

1. In a sterile tube, assemble the following components in the order listed below.

<b>Component</b>	<b>Volume</b>
Sterile, deionized water	16.3 $\mu$ l
Restriction Enzyme 10X Buffer	2 $\mu$ l
Acetylated BSA, 10 $\mu$ g/ $\mu$ l	0.2 $\mu$ l
DNA, 1 $\mu$ g/ $\mu$ l	1.0 $\mu$ l

Mix by pipetting, then add:

Restriction Enzyme, 10u/ $\mu$ l	0.5 $\mu$ l
Final volume	20 $\mu$ l

2. Mix gently by pipetting, close the tube and centrifuge for a few seconds in a microcentrifuge. Incubate at the enzyme's optimum temperature for 1–4 hours.
3. Add loading buffer to a 1X final concentration and proceed to gel analysis.

**Note:** Overnight digestions are usually unnecessary and may result in DNA degradation.

### 5. Experimental Controls

Experimental controls are necessary to identify, understand and explain problems or inconsistencies in results. The following controls are commonly used in parallel with RE digests: (1) uncut experimental DNA, (2) digestion of a commercially supplied control DNA and (3) no-enzyme “mock” digestion. We also recommend analyzing one or two different size markers in more than one lane per gel (i.e., different locations on the gel).



## 6. Additional Protocols for Selected Restriction Enzymes

Promega scientists have tested a subset of restriction enzymes for compatibility with rapid digestion (digesting DNA in 15 minutes or less) and direct digestion in GoTaq® Green Master Mix or PCR Master Mix (1,2). The results are shown in Table 1.

A protocol for rapid digestion is provided in Section 6.A, and a protocol for direct digestion of a PCR product is provided in Section 6.B.

**Table 1. Compatibility of Restriction Enzymes With Rapid Digestion or Direct Digestion.**

<b>Restriction Enzyme</b>	<b>Rapid-Digest-Capable</b>	<b>GoTaq® Buffer-Compatible</b>	<b>Restriction Enzyme</b>	<b>Rapid-Digest-Capable</b>	<b>GoTaq® Buffer-Compatible</b>
AatII	+	—	KpnI	+	+
Acc65I	nt	+	MluI	nt	+
AccI	nt	+	NcoI	+	+
AgeI	+	+	NdeI	+	+
AluI	+	nt	NheI	+	+
ApaI	nt	+	NotI	+	nt
AvaI	nt	+	NsiI	nt	+
BamHI	+	+	PstI	+	+
BglII	—	+	PvuI	—	+
ClaI	+	+	PvuII	+	+
DdeI	+	nt	RsaI	+	nt
DpnI	+	nt	SacII	—	+
DraI	nt	+	SalI	+	+
Eco47III	nt	+	ScaI	+	—
EcoRI	+	—	SpeI	+	nt
EcoRV	+	+	SphI	+	+
HaeIII	+	nt	StuI	nt	+
HincII	nt	+	XbaI	+	+
HindIII	+	+	XhoI	+	+
HpaI	nt	+	XmaI	+	nt

nt = Not Tested; + indicates successful cutting in 15 minutes or less; — indicates unsuccessful cutting. Data and additional information are available in References 1 and 2.

## 6.A. Protocol for Rapid Digestion of Plasmid DNA

- To perform a rapid digestion, assemble the following components on ice in 0.5ml tubes in the order listed:

Component	Volume
Sterile, deionized, nuclease-free water	15.8µl
Restriction Enzyme 10X Buffer	2µl
Acetylated BSA, 10µg/µl	0.2µl
Plasmid DNA, 1µg/µl	1µl
Mix by pipetting, then add:	
Restriction enzyme <sup>1</sup>	1µl
Final volume	20µl

<sup>1</sup>The number of restriction enzyme units added to the reaction varies at 5–12 units, depending on the concentration of restriction enzyme used.

- Mix gently by pipetting, close the tube and centrifuge for a few seconds at maximum speed in a microcentrifuge. Incubate at the enzyme's optimum temperature for 5–15 minutes.

## 6.B. Protocol for Direct Digestion of PCR or RT-PCR Products in GoTaq® Green Master Mix or PCR Master Mix

The restriction enzymes listed in Table 1 were tested for direct digestion in GoTaq® Green Master Mix or PCR Master Mix using 25µl reactions and a final master mix concentration of 1X.

**Note:** Even after thermal cycling is complete, the thermostable DNA polymerase retains some activity, which could fill in the sticky ends generated during a subsequent RE digestion. These blunt-ended products can result in reduced cloning efficiency. While adding a restriction enzyme directly to the PCR saves time, purifying the DNA product after digestion might be advantageous to remove small restriction fragments that could interfere with downstream ligation.

- To perform restriction enzyme digestion, assemble the following components on ice in 0.5ml tubes in the order listed:

Component	Volume
Unpurified PCR product	25µl
Restriction enzyme <sup>1</sup>	0.5µl
Final volume	25.5µl

<sup>1</sup>The number of restriction enzyme units added to the reaction varies at 1–6 units, depending on the concentration of restriction enzyme used.

- Mix gently by pipetting, close the tube and centrifuge for a few seconds in a microcentrifuge. Incubate at the enzyme's optimum temperature for 2 hours.



## 7. References

1. Schagat, T. (2007) Rapid DNA digestion using Promega restriction enzymes. Promega Corporation Web site: [www.promega.com/resources/articles/pubhub/enotes/rapid-dna-digestion-using-promega-restriction-enzymes/](http://www.promega.com/resources/articles/pubhub/enotes/rapid-dna-digestion-using-promega-restriction-enzymes/)
2. Tritle, D. (2006) Activity of Promega restriction enzymes in GoTaq® Green and PCR Master Mixes. Promega Corporation Web site: [www.promega.com/resources/articles/pubhub/enotes/activity-of-promega-restriction-enzymes-in-gotaq-green-and-pcr-master-mixes/](http://www.promega.com/resources/articles/pubhub/enotes/activity-of-promega-restriction-enzymes-in-gotaq-green-and-pcr-master-mixes/)


© 2011 Promega Corporation. All Rights Reserved.


4-CORE and GoTaq are registered trademarks of Promega Corporation MULTI-CORE is a trademark of Promega Corporation.


Products may be covered by pending or issued patents or may have certain limitations. Please visit our Web site for more information.


All prices and specifications are subject to change without prior notice.

Product claims are subject to change. Please contact Promega Technical Services or access the Promega online catalog for the most up-to-date information on Promega products.


YOUR ORDER		NRU / SON					DATE
806586 - 1							13-Oct-15
194.24 EUR		1000764298					
CUSTOMER			ADDRESS / INSTITUTION				
Amine E DRICI			FRANCE ANGERS 49066				
OLIGO NAME	BATCH	SCALE	CHEMISTRY	BASES			
cagEF	1201843	10 nmol	DNA	27			
SEQUENCE (5' → 3')							
(*: Phosphorothioate linkage)							
1	TTG-AAA-ACT-TCA-AGG-ATA-GGA-TAG-AGC						
BACKBONE (BASES + LINKAGES)							
A	11	GC (%) <sup>1</sup>	37.0	Quantity	(OD@260nm)	13.73	
C	3	MW (g.mol <sup>-1</sup> ) <sup>1</sup>	8380.6		(nmol)	48.7	
G	7	Ext. coeff. (l.mol <sup>-1</sup> .cm <sup>-1</sup> ) <sup>1</sup>	281800		(µg)	408	
U / T	0 / 6	Tm (°C) <sup>1</sup>	50.1				
Others	0						
Wobbles	0	<sup>1</sup> Theoretical values					
MODIFICATION(S)							
(dX = DNA X; rX = RNA X; 2'Ome rX = 2'Ome RNA X; pX = PNA X; LnX = LNA® X)							
Mod 3'		Mod 4				0	
Mod 5'		Mod 5				0	
		Mod 6				0	
Mod 1	0	Mod 7				0	
Mod 2	0	Mod 8				0	
Mod 3	0	Mod 9				0	
PURIFICATION(S)							
SePOP							
ADDITIONAL SERVICE(S)							
FORMAT		Dried	ALIQUOTING				
			Number of Aliquots			0	
			Plastic			Self-Stand Tube 2 ml	
QUALITY CONTROL(S)							
Passed							
DELIVERY CONDITION							
Room Temperature							
RECONSTITUTION							
To Make up to 100 µM concentration add 487 µl of recommended buffer.							
To Make up to 20 µM concentration add 2.44 ml of recommended buffer.							
To Make up to 5 µM concentration add 9.75 ml of recommended buffer.							
LONG-TERM STORAGE							
DNA: -20 °C / RNA: -70 °C							
COMMENTS							
General:							
Specific:							
TECHNICAL SUPPORT			EUROPE		NORTH AMERICA		
If you have any questions feel free to call our Oligo Centre depending on your location: [Belgium, France, Germany, Luxembourg, The Netherlands, United Kingdom, Switzerland, Austria] 00 800 666 00 123 (European toll free number), or send an email to <a href="mailto:oligo@eurogentec.com">oligo@eurogentec.com</a>			If you have questions, please contact our Technical Support Department at +1 (510) 896-1350 or send an email to <a href="mailto:oligo.na@egt-biotech.com">oligo.na@egt-biotech.com</a>				


YOUR ORDER		NRU / SON					DATE
806586 - 1							13-Oct-15
194.24 EUR		1000764298					
CUSTOMER			ADDRESS / INSTITUTION				
Amine E DRICI			FRANCE ANGERS 49066				
OLIGO NAME		BATCH	SCALE	CHEMISTRY	BASES		
ureCF		5872901	10 nmol	DNA	25		
SEQUENCE (5' → 3')						(*: Phosphorothioate linkage)	
1	AAG-CTT-TTA-GGG-GTG-TTA-GGG-GTT-T						
BACKBONE (BASES + LINKAGES)							
A	4	GC (%) <sup>1</sup>	44.0	Quantity	(OD@260nm)	12.06	
C	1	MW (g.mol <sup>-1</sup> ) <sup>1</sup>	7814.2		(nmol)	49.3	
G	10	Ext. coeff. (l.mol <sup>-1</sup> .cm <sup>-1</sup> ) <sup>1</sup>	244500		(µg)	385	
U / T	0 / 10	Tm (°C) <sup>1</sup>	50.9				
Others	0						
Wobbles	0	<sup>1</sup> Theoretical values					
MODIFICATION(S)							
(dX = DNA X; rX = RNA X; 2'Ome rX = 2'Ome RNA X; pX = PNA X; LnX = LNA® X)							
Mod 3'		Mod 4				0	
Mod 5'		Mod 5				0	
		Mod 6				0	
Mod 1	0	Mod 7				0	
Mod 2	0	Mod 8				0	
Mod 3	0	Mod 9				0	
PURIFICATION(S)							
SePOP							
ADDITIONAL SERVICE(S)							
FORMAT		Dried	ALIQUOTING				
			Number of Aliquots			0	
			Plastic			Self-Stand Tube 2 ml	
QUALITY CONTROL(S)							
Passed							
DELIVERY CONDITION							
Room Temperature							
RECONSTITUTION							
To Make up to 100 µM concentration add 493 µl of recommended buffer.							
To Make up to 20 µM concentration add 2.47 ml of recommended buffer.							
To Make up to 5 µM concentration add 9.86 ml of recommended buffer.							
LONG-TERM STORAGE							
DNA: -20 °C / RNA: -70 °C							
COMMENTS							
General:							
Specific:							
TECHNICAL SUPPORT			EUROPE		NORTH AMERICA		
If you have any questions feel free to call our Oligo Centre depending on your location: [Belgium, France, Germany, Luxembourg, The Netherlands, United Kingdom, Switzerland, Austria] 00 800 666 00 123 (European toll free number), or send an email to <a href="mailto:oligo@eurogentec.com">oligo@eurogentec.com</a>			If you have questions, please contact our Technical Support Department at +1 (510) 896-1350 or send an email to <a href="mailto:oligo.na@egt-biotech.com">oligo.na@egt-biotech.com</a>				


YOUR ORDER		NRU / SON				DATE
806586 - 1						13-Oct-15
194.24 EUR		1000764298				
CUSTOMER		ADDRESS / INSTITUTION				
Amine E DRICI		FRANCE ANGERS 49066				
OLIGO NAME	BATCH	SCALE	CHEMISTRY	BASES		
ureCR	5872902	10 nmol	DNA	24		
SEQUENCE (5' → 3')						
(*: Phosphorothioate linkage)						
1	AAG-CTT-ACT-TTC-TAA-CAC-TAA-CGC					
BACKBONE (BASES + LINKAGES)						
A	8	GC (%) <sup>1</sup>	37.5	Quantity (OD@260nm)	6.74	
C	7	MW (g.mol <sup>-1</sup> ) <sup>1</sup>	7255.8	(nmol)	29.6	
G	2	Ext. coeff. (l.mol <sup>-1</sup> .cm <sup>-1</sup> ) <sup>1</sup>	227900	(µg)	215	
U / T	0 / 7	Tm (°C) <sup>1</sup>	47.2			
Others	0					
Wobbles	0	<sup>1</sup> Theoretical values				
MODIFICATION(S)						
(dX = DNA X; rX = RNA X; 2'Ome rX = 2'Ome RNA X; pX = PNA X; LnX = LNA® X)						
Mod 3'		Mod 4			0	
Mod 5'		Mod 5			0	
		Mod 6			0	
Mod 1	0	Mod 7			0	
Mod 2	0	Mod 8			0	
Mod 3	0	Mod 9			0	
PURIFICATION(S)						
SePOP						
ADDITIONAL SERVICE(S)						
FORMAT		Dried	ALIQUOTING			
			Number of Aliquots			
			0			
		Plastic	Self-Stand Tube 2 ml			
QUALITY CONTROL(S)						
Passed						
DELIVERY CONDITION						
Room Temperature						
RECONSTITUTION						
To Make up to 100 µM concentration add 296 µl of recommended buffer.						
To Make up to 20 µM concentration add 1.48 ml of recommended buffer.						
To Make up to 5 µM concentration add 5.91 ml of recommended buffer.						
LONG-TERM STORAGE						
DNA: -20 °C / RNA: -70 °C						
COMMENTS						
General:						
Specific:						
TECHNICAL SUPPORT		EUROPE		NORTH AMERICA		
If you have any questions feel free to call our Oligo Centre depending on your location: [Belgium, France, Germany, Luxembourg, The Netherlands, United Kingdom, Switzerland, Austria] 00 800 666 00 123 (European toll free number), or send an email to <a href="mailto:oligo@eurogentec.com">oligo@eurogentec.com</a>		If you have questions, please contact our Technical Support Department at +1 (510) 896-1350 or send an email to <a href="mailto:oligo.na@egt-biotech.com">oligo.na@egt-biotech.com</a>				


YOUR ORDER		NRU / SON			DATE
806586 - 1					13-Oct-15
194.24 EUR		1000764298			
CUSTOMER			ADDRESS / INSTITUTION		
Amine E DRICI			FRANCE ANGERS 49066		
OLIGO NAME	BATCH	SCALE	CHEMISTRY	BASES	
s1/s2_F	5872903	10 nmol	DNA	21	
SEQUENCE (5' → 3')					(*: Phosphorothioate linkage)
1	ATG-GAA-ATA-CAA-CAA-ACA-CAC				
BACKBONE (BASES + LINKAGES)					
A	12	GC (%) <sup>1</sup>	33.3	Quantity (OD@260nm)	9.26
C	5	MW (g.mol <sup>-1</sup> ) <sup>1</sup>	6409.3	(nmol)	41.5
G	2	Ext. coeff. (l.mol <sup>-1</sup> .cm <sup>-1</sup> ) <sup>1</sup>	223200	(µg)	266
U / T	0 / 2	Tm (°C) <sup>1</sup>	41.4		
Others	0				
Wobbles	0				
<sup>1</sup> Theoretical values					
MODIFICATION(S)					
(dX = DNA X; rX = RNA X; 2'Ome rX = 2'Ome RNA X; pX = PNA X; LnX = LNA® X)					
Mod 3'		Mod 4			0
Mod 5'		Mod 5			0
		Mod 6			0
Mod 1	0	Mod 7			0
Mod 2	0	Mod 8			0
Mod 3	0	Mod 9			0
PURIFICATION(S)					
SePOP					
ADDITIONAL SERVICE(S)					
FORMAT		Dried	ALIQUOTING		
			Number of Aliquots		
			0		
		Plastic	Self-Stand Tube 2 ml		
QUALITY CONTROL(S)					
Passed					
DELIVERY CONDITION					
Room Temperature					
RECONSTITUTION					
To Make up to 100 µM concentration add 415 µl of recommended buffer.					
To Make up to 20 µM concentration add 2.07 ml of recommended buffer.					
To Make up to 5 µM concentration add 8.30 ml of recommended buffer.					
LONG-TERM STORAGE					
DNA: -20 °C / RNA: -70 °C					
COMMENTS					
General:					
Specific:					
TECHNICAL SUPPORT			EUROPE	NORTH AMERICA	
If you have any questions feel free to call our Oligo Centre depending on your location: [Belgium, France, Germany, Luxembourg, The Netherlands, United Kingdom, Switzerland, Austria] 00 800 666 00 123 (European toll free number), or send an email to <a href="mailto:oligo@eurogentec.com">oligo@eurogentec.com</a>			If you have questions, please contact our Technical Support Department at +1 (510) 896-1350 or send an email to <a href="mailto:oligo.na@egt-biotech.com">oligo.na@egt-biotech.com</a>		





YOUR ORDER		NRU / SON			DATE
806586 - 1		194.24 EUR	1000764298		13-Oct-15
CUSTOMER			ADDRESS / INSTITUTION		
Amine E DRICI			FRANCE ANGERS 49066		
OLIGO NAME	BATCH	SCALE	CHEMISTRY	BASES	
s1/s2_R	5872904	10 nmol	DNA	19	
SEQUENCE (5' → 3')					(*: Phosphorothioate linkage)
1	CTG-CTT-GAA-TGC-GCC-AAA-C				
BACKBONE (BASES + LINKAGES)					
A	5	GC (%) <sup>1</sup>	52.6	Quantity (OD@260nm)	7.76
C	6	MW (g.mol <sup>-1</sup> ) <sup>1</sup>	5772.8	(nmol)	44.4
G	4	Ext. coeff. (l.mol <sup>-1</sup> .cm <sup>-1</sup> ) <sup>1</sup>	174800	(µg)	256
U / T	0 / 4	Tm (°C) <sup>1</sup>	58.0		
Others	0				
Wobbles	0				
<sup>1</sup> Theoretical values					
MODIFICATION(S)					
(dX = DNA X; rX = RNA X; 2'Ome rX = 2'Ome RNA X; pX = PNA X; LnX = LNA® X)					
Mod 3'		Mod 4			0
Mod 5'		Mod 5			0
		Mod 6			0
Mod 1	0	Mod 7			0
Mod 2	0	Mod 8			0
Mod 3	0	Mod 9			0
PURIFICATION(S)					
SePOP					
ADDITIONAL SERVICE(S)					
FORMAT		Dried	ALIQUOTING		
			Number of Aliquots		0
			Plastic		Self-Stand Tube 2 ml
QUALITY CONTROL(S)					
Passed					
DELIVERY CONDITION					
Room Temperature					
RECONSTITUTION					
To Make up to 100 µM concentration add 444 µl of recommended buffer.					
To Make up to 20 µM concentration add 2.22 ml of recommended buffer.					
To Make up to 5 µM concentration add 8.87 ml of recommended buffer.					
LONG-TERM STORAGE					
DNA: -20 °C / RNA: -70 °C					
COMMENTS					
General:					
Specific:					
TECHNICAL SUPPORT			EUROPE	NORTH AMERICA	
If you have any questions feel free to call our Oligo Centre depending on your location: [Belgium, France, Germany, Luxembourg, The Netherlands, United Kingdom, Switzerland, Austria] 00 800 666 00 123 (European toll free number), or send an email to <a href="mailto:oligo@eurogentec.com">oligo@eurogentec.com</a>			If you have questions, please contact our Technical Support Department at +1 (510) 896-1350 or send an email to <a href="mailto:oligo.na@egt-biotech.com">oligo.na@egt-biotech.com</a>		


YOUR ORDER		NRU / SON					DATE
806586 - 1		194.24 EUR	1000764298				13-Oct-15
CUSTOMER			ADDRESS / INSTITUTION				
Amine E DRICI			FRANCE ANGERS 49066				
OLIGO NAME		BATCH	SCALE	CHEMISTRY	BASES		
m1_F		5872905	10 nmol	DNA	19		
SEQUENCE (5' → 3')							
1 GGT-CAA-AAT-GCG-GTC-ATG-G <span style="float: right;">(*: Phosphorothioate linkage)</span>							
BACKBONE (BASES + LINKAGES)							
A	5	GC (%) <sup>1</sup>	52.6	Quantity (OD@260nm)	10.20		
C	3	MW (g.mol <sup>-1</sup> ) <sup>1</sup>	5892.9	(nmol)	53.8		
G	7	Ext. coeff. (l.mol <sup>-1</sup> .cm <sup>-1</sup> ) <sup>1</sup>	189500	(µg)	317		
U / T	0 / 4	Tm (°C) <sup>1</sup>	58.0				
Others	0						
Wobbles	0	<sup>1</sup> Theoretical values					
MODIFICATION(S)							
(dX = DNA X; rX = RNA X; 2'Ome rX = 2'Ome RNA X; pX = PNA X; LnX = LNA® X)							
Mod 3'		Mod 4				0	
Mod 5'		Mod 5				0	
		Mod 6				0	
Mod 1	0	Mod 7				0	
Mod 2	0	Mod 8				0	
Mod 3	0	Mod 9				0	
PURIFICATION(S)							
SePOP							
ADDITIONAL SERVICE(S)							
FORMAT		Dried	ALIQUOTING				
			Number of Aliquots		0		
			Plastic		Self-Stand Tube 2 ml		
QUALITY CONTROL(S)							
Passed							
DELIVERY CONDITION							
Room Temperature							
RECONSTITUTION							
To Make up to 100 µM concentration add 538 µl of recommended buffer.							
To Make up to 20 µM concentration add 2.69 ml of recommended buffer.							
To Make up to 5 µM concentration add 10.76 ml of recommended buffer.							
LONG-TERM STORAGE							
DNA: -20 °C / RNA: -70 °C							
COMMENTS							
General:							
Specific:							
TECHNICAL SUPPORT			EUROPE		NORTH AMERICA		
If you have any questions feel free to call our Oligo Centre depending on your location: [Belgium, France, Germany, Luxembourg, The Netherlands, United Kingdom, Switzerland, Austria] 00 800 666 00 123 (European toll free number), or send an email to <a href="mailto:oligo@eurogentec.com">oligo@eurogentec.com</a>			If you have questions, please contact our Technical Support Department at +1 (510) 896-1350 or send an email to <a href="mailto:oligo.na@egt-biotech.com">oligo.na@egt-biotech.com</a>				

YOUR ORDER		NRU / SON			DATE
806586 - 1					13-Oct-15
194.24 EUR		1000764298			
CUSTOMER			ADDRESS / INSTITUTION		
Amine E DRICI			FRANCE ANGERS 49066		
OLIGO NAME	BATCH	SCALE	CHEMISTRY	BASES	
m1_R	5872906	10 nmol	DNA	20	
SEQUENCE (5' → 3')					(*: Phosphorothioate linkage)
1	CCA-TTG-GTA-CCT-GTA-GAA-AC				
BACKBONE (BASES + LINKAGES)					
A	6	GC (%) <sup>1</sup>	45.0	Quantity (OD@260nm)	8.96
C	5	MW (g.mol <sup>-1</sup> ) <sup>1</sup>	6101.0	(nmol)	45.9
G	4	Ext. coeff. (l.mol <sup>-1</sup> .cm <sup>-1</sup> ) <sup>1</sup>	194900	(µg)	280
U / T	0 / 5	Tm (°C) <sup>1</sup>	58.0		
Others	0				
Wobbles	0				
<sup>1</sup> Theoretical values					
MODIFICATION(S)					
(dX = DNA X; rX = RNA X; 2'Ome rX = 2'Ome RNA X; pX = PNA X; LnX = LNA® X)					
Mod 3'		Mod 4			0
Mod 5'		Mod 5			0
		Mod 6			0
Mod 1	0	Mod 7			0
Mod 2	0	Mod 8			0
Mod 3	0	Mod 9			0
PURIFICATION(S)					
SePOP					
ADDITIONAL SERVICE(S)					
FORMAT		Dried	ALIQUOTING		
			Number of Aliquots		0
			Plastic		Self-Stand Tube 2 ml
QUALITY CONTROL(S)					
Passed					
DELIVERY CONDITION					
Room Temperature					
RECONSTITUTION					
To Make up to 100 µM concentration add 459 µl of recommended buffer.					
To Make up to 20 µM concentration add 2.30 ml of recommended buffer.					
To Make up to 5 µM concentration add 9.19 ml of recommended buffer.					
LONG-TERM STORAGE					
DNA: -20 °C / RNA: -70 °C					
COMMENTS					
General:					
Specific:					
TECHNICAL SUPPORT			EUROPE	NORTH AMERICA	
If you have any questions feel free to call our Oligo Centre depending on your location: [Belgium, France, Germany, Luxembourg, The Netherlands, United Kingdom, Switzerland, Austria] 00 800 666 00 123 (European toll free number), or send an email to <a href="mailto:oligo@eurogentec.com">oligo@eurogentec.com</a>			If you have questions, please contact our Technical Support Department at +1 (510) 896-1350 or send an email to <a href="mailto:oligo.na@egt-biotech.com">oligo.na@egt-biotech.com</a>		


YOUR ORDER		NRU / SON					DATE
806586 - 1		194.24 EUR	1000764298				13-Oct-15
CUSTOMER			ADDRESS / INSTITUTION				
Amine E DRICI			FRANCE ANGERS 49066				
OLIGO NAME		BATCH	SCALE	CHEMISTRY	BASES		
m2F		5872907	10 nmol	DNA	19		
SEQUENCE (5' → 3')							(*: Phosphorothioate linkage)
1	GGA-GCC-CCA-GGA-AAC-ATT-G						
BACKBONE (BASES + LINKAGES)							
A	6	GC (%) <sup>1</sup>	57.9	Quantity	(OD@260nm)	7.50	
C	5	MW (g.mol <sup>-1</sup> ) <sup>1</sup>	5846.9		(nmol)	39.7	
G	6	Ext. coeff. (l.mol <sup>-1</sup> .cm <sup>-1</sup> ) <sup>1</sup>	189200		(µg)	232	
U / T	0 / 2	Tm (°C) <sup>1</sup>	60.0				
Others	0						
Wobbles	0	<sup>1</sup> Theoretical values					
MODIFICATION(S)		(dX = DNA X; rX = RNA X; 2'Ome rX = 2'Ome RNA X; pX = PNA X; LnX = LNA® X)					
Mod 3'		Mod 4					0
Mod 5'		Mod 5					0
		Mod 6					0
Mod 1	0	Mod 7					0
Mod 2	0	Mod 8					0
Mod 3	0	Mod 9					0
PURIFICATION(S)							
SePOP							
ADDITIONAL SERVICE(S)							
FORMAT		Dried	ALIQUOTING				
			Number of Aliquots				0
			Plastic				Self-Stand Tube 2 ml
QUALITY CONTROL(S)							
Passed							
DELIVERY CONDITION							
Room Temperature							
RECONSTITUTION							
To Make up to 100 µM concentration add 397 µl of recommended buffer.							
To Make up to 20 µM concentration add 1.98 ml of recommended buffer.							
To Make up to 5 µM concentration add 7.93 ml of recommended buffer.							
LONG-TERM STORAGE							
DNA: -20 °C / RNA: -70 °C							
COMMENTS							
General:							
Specific:							
TECHNICAL SUPPORT			EUROPE			NORTH AMERICA	
If you have any questions feel free to call our Oligo Centre depending on your location: [Belgium, France, Germany, Luxembourg, The Netherlands, United Kingdom, Switzerland, Austria] 00 800 666 00 123 (European toll free number), or send an email to <a href="mailto:oligo@eurogentec.com">oligo@eurogentec.com</a>			If you have questions, please contact our Technical Support Department at +1 (510) 896-1350 or send an email to <a href="mailto:oligo.na@egt-biotech.com">oligo.na@egt-biotech.com</a>				


YOUR ORDER		NRU / SON					DATE
806586 - 1		194.24 EUR	1000764298				13-Oct-15
CUSTOMER			ADDRESS / INSTITUTION				
Amine E DRICI			FRANCE ANGERS 49066				
OLIGO NAME		BATCH	SCALE	CHEMISTRY	BASES		
m1R		5872908	10 nmol	DNA	19		
SEQUENCE (5' → 3')							(*: Phosphorothioate linkage)
1	CAT-AAC-TAG-CGC-CTT-GCA-C						
BACKBONE (BASES + LINKAGES)							
A	5	GC (%) <sup>1</sup>	52.6	Quantity (OD@260nm)	10.37		
C	7	MW (g.mol <sup>-1</sup> ) <sup>1</sup>	5732.8	(nmol)	59.2		
G	3	Ext. coeff. (l.mol <sup>-1</sup> .cm <sup>-1</sup> ) <sup>1</sup>	175100	(µg)	339		
U / T	0 / 4	Tm (°C) <sup>1</sup>	58.0				
Others	0						
Wobbles	0	<sup>1</sup> Theoretical values					
MODIFICATION(S)							(dX = DNA X; rX = RNA X; 2'Ome rX = 2'Ome RNA X; pX = PNA X; LnX = LNA® X)
Mod 3'		Mod 4				0	
Mod 5'		Mod 5				0	
		Mod 6				0	
Mod 1	0	Mod 7				0	
Mod 2	0	Mod 8				0	
Mod 3	0	Mod 9				0	
PURIFICATION(S)							
SePOP							
ADDITIONAL SERVICE(S)							
FORMAT		Dried	ALIQUOTING				
			Number of Aliquots		0		
			Plastic		Self-Stand Tube 2 ml		
QUALITY CONTROL(S)							
Passed							
DELIVERY CONDITION							
Room Temperature							
RECONSTITUTION							
To Make up to 100 µM concentration add 592 µl of recommended buffer.							
To Make up to 20 µM concentration add 2.96 ml of recommended buffer.							
To Make up to 5 µM concentration add 11.84 ml of recommended buffer.							
LONG-TERM STORAGE							
DNA: -20 °C / RNA: -70 °C							
COMMENTS							
General:							
Specific:							
TECHNICAL SUPPORT			EUROPE	NORTH AMERICA			
If you have any questions feel free to call our Oligo Centre depending on your location: [Belgium, France, Germany, Luxembourg, The Netherlands, United Kingdom, Switzerland, Austria] 00 800 666 00 123 (European toll free number), or send an email to <a href="mailto:oligo@eurogentec.com">oligo@eurogentec.com</a>			If you have questions, please contact our Technical Support Department at +1 (510) 896-1350 or send an email to <a href="mailto:oligo.na@egt-biotech.com">oligo.na@egt-biotech.com</a>				


YOUR ORDER		NRU / SON					DATE
806586 - 1							13-Oct-15
194.24 EUR		1000764298					
CUSTOMER			ADDRESS / INSTITUTION				
Amine E DRICI			FRANCE ANGERS 49066				
OLIGO NAME		BATCH	SCALE	CHEMISTRY	BASES		
cagA_F		5872909	10 nmol	DNA	28		
SEQUENCE (5' → 3')						(*: Phosphorothioate linkage)	
1	ATA-ATG-CTA-AAT-TAG-ACA-ACT-TGA-GCG-A						
BACKBONE (BASES + LINKAGES)							
A	12	GC (%) <sup>1</sup>	32.1	Quantity	(OD@260nm)	10.34	
C	4	MW (g.mol <sup>-1</sup> ) <sup>1</sup>	8628.7		(nmol)	35.6	
G	5	Ext. coeff. (l.mol <sup>-1</sup> .cm <sup>-1</sup> ) <sup>1</sup>	290600		(µg)	307	
U / T	0 / 7	Tm (°C) <sup>1</sup>	49.0				
Others	0						
Wobbles	0	<sup>1</sup> Theoretical values					
MODIFICATION(S)							
(dX = DNA X; rX = RNA X; 2'Ome rX = 2'Ome RNA X; pX = PNA X; LnX = LNA® X)							
Mod 3'		Mod 4				0	
Mod 5'		Mod 5				0	
		Mod 6				0	
Mod 1	0	Mod 7				0	
Mod 2	0	Mod 8				0	
Mod 3	0	Mod 9				0	
PURIFICATION(S)							
SePOP							
ADDITIONAL SERVICE(S)							
FORMAT		Dried	ALIQUOTING				
			Number of Aliquots			0	
			Plastic			Self-Stand Tube 2 ml	
QUALITY CONTROL(S)							
Passed							
DELIVERY CONDITION							
Room Temperature							
RECONSTITUTION							
To Make up to 100 µM concentration add 356 µl of recommended buffer.							
To Make up to 20 µM concentration add 1.78 ml of recommended buffer.							
To Make up to 5 µM concentration add 7.12 ml of recommended buffer.							
LONG-TERM STORAGE							
DNA: -20 °C / RNA: -70 °C							
COMMENTS							
General:							
Specific:							
TECHNICAL SUPPORT			EUROPE		NORTH AMERICA		
If you have any questions feel free to call our Oligo Centre depending on your location: [Belgium, France, Germany, Luxembourg, The Netherlands, United Kingdom, Switzerland, Austria] 00 800 666 00 123 (European toll free number), or send an email to <a href="mailto:oligo@eurogentec.com">oligo@eurogentec.com</a>			If you have questions, please contact our Technical Support Department at +1 (510) 896-1350 or send an email to <a href="mailto:oligo.na@egt-biotech.com">oligo.na@egt-biotech.com</a>				


YOUR ORDER		NRU / SON			DATE
806586 - 1					13-Oct-15
194.24 EUR		1000764298			
CUSTOMER			ADDRESS / INSTITUTION		
Amine E DRICI			FRANCE ANGERS 49066		
OLIGO NAME	BATCH	SCALE	CHEMISTRY	BASES	
cagA_R	5872910	10 nmol	DNA	28	
SEQUENCE (5' → 3')					(*: Phosphorothioate linkage)
1	TTA-GAA-TAA-TCA-ACA-AAC-ATA-ACG-CCA-T				
BACKBONE (BASES + LINKAGES)					
A	14	GC (%) <sup>1</sup>	28.6	Quantity (OD@260nm)	13.14
C	6	MW (g.mol <sup>-1</sup> ) <sup>1</sup>	8541.7	(nmol)	45.3
G	2	Ext. coeff. (l.mol <sup>-1</sup> .cm <sup>-1</sup> ) <sup>1</sup>	289800	(µg)	387
U / T	0 / 6	Tm (°C) <sup>1</sup>	47.5		
Others	0				
Wobbles	0				
<sup>1</sup> Theoretical values					
MODIFICATION(S)					
(dX = DNA X; rX = RNA X; 2'Ome rX = 2'Ome RNA X; pX = PNA X; LnX = LNA® X)					
Mod 3'		Mod 4			0
Mod 5'		Mod 5			0
		Mod 6			0
Mod 1	0	Mod 7			0
Mod 2	0	Mod 8			0
Mod 3	0	Mod 9			0
PURIFICATION(S)					
SePOP					
ADDITIONAL SERVICE(S)					
FORMAT		Dried	ALIQUOTING		
			Number of Aliquots		
			0		
		Plastic	Self-Stand Tube 2 ml		
QUALITY CONTROL(S)					
Passed					
DELIVERY CONDITION					
Room Temperature					
RECONSTITUTION					
To Make up to 100 µM concentration add 453 µl of recommended buffer.					
To Make up to 20 µM concentration add 2.27 ml of recommended buffer.					
To Make up to 5 µM concentration add 9.07 ml of recommended buffer.					
LONG-TERM STORAGE					
DNA: -20 °C / RNA: -70 °C					
COMMENTS					
General:					
Specific:					
TECHNICAL SUPPORT			EUROPE	NORTH AMERICA	
If you have any questions feel free to call our Oligo Centre depending on your location: [Belgium, France, Germany, Luxembourg, The Netherlands, United Kingdom, Switzerland, Austria] 00 800 666 00 123 (European toll free number), or send an email to <a href="mailto:oligo@eurogentec.com">oligo@eurogentec.com</a>			If you have questions, please contact our Technical Support Department at +1 (510) 896-1350 or send an email to <a href="mailto:oligo.na@egt-biotech.com">oligo.na@egt-biotech.com</a>		




YOUR ORDER		NRU / SON					DATE
806586 - 1							13-Oct-15
194.24 EUR		1000764298					
CUSTOMER			ADDRESS / INSTITUTION				
Amine E DRICI			FRANCE ANGERS 49066				
OLIGO NAME	BATCH	SCALE	CHEMISTRY	BASES			
cagER	5872912	10 nmol	DNA	25			
SEQUENCE (5' → 3')							
(*: Phosphorothioate linkage)							
1	GCC-TAG-CGT-AAT-ATC-ACC-ATT-ACC-C						
BACKBONE (BASES + LINKAGES)							
A	7	GC (%) <sup>1</sup>	48.0	Quantity	(OD@260nm)	9.13	
C	9	MW (g.mol <sup>-1</sup> ) <sup>1</sup>	7546.0		(nmol)	38.6	
G	3	Ext. coeff. (l.mol <sup>-1</sup> .cm <sup>-1</sup> ) <sup>1</sup>	236800		(µg)	291	
U / T	0 / 6	Tm (°C) <sup>1</sup>	52.6				
Others	0						
Wobbles	0	<sup>1</sup> Theoretical values					
MODIFICATION(S)							
(dX = DNA X; rX = RNA X; 2'Ome rX = 2'Ome RNA X; pX = PNA X; LnX = LNA® X)							
Mod 3'		Mod 4				0	
Mod 5'		Mod 5				0	
		Mod 6				0	
Mod 1	0	Mod 7				0	
Mod 2	0	Mod 8				0	
Mod 3	0	Mod 9				0	
PURIFICATION(S)							
SePOP							
ADDITIONAL SERVICE(S)							
FORMAT		Dried	ALIQUOTING				
			Number of Aliquots			0	
			Plastic			Self-Stand Tube 2 ml	
QUALITY CONTROL(S)							
Passed							
DELIVERY CONDITION							
Room Temperature							
RECONSTITUTION							
To Make up to 100 µM concentration add 386 µl of recommended buffer.							
To Make up to 20 µM concentration add 1.93 ml of recommended buffer.							
To Make up to 5 µM concentration add 7.71 ml of recommended buffer.							
LONG-TERM STORAGE							
DNA: -20 °C / RNA: -70 °C							
COMMENTS							
General:							
Specific:							
TECHNICAL SUPPORT			EUROPE		NORTH AMERICA		
If you have any questions feel free to call our Oligo Centre depending on your location: [Belgium, France, Germany, Luxembourg, The Netherlands, United Kingdom, Switzerland, Austria] 00 800 666 00 123 (European toll free number), or send an email to <a href="mailto:oligo@eurogentec.com">oligo@eurogentec.com</a>			If you have questions, please contact our Technical Support Department at +1 (510) 896-1350 or send an email to <a href="mailto:oligo.na@egt-biotech.com">oligo.na@egt-biotech.com</a>				

YOUR ORDER		NRU / SON					DATE
806586 - 1		194.24 EUR	1000764298				13-Oct-15
CUSTOMER			ADDRESS / INSTITUTION				
Amine E DRICI			FRANCE ANGERS 49066				
OLIGO NAME		BATCH	SCALE	CHEMISTRY	BASES		
virB11_F		5872913	10 nmol	DNA	23		
SEQUENCE (5' → 3')						(*: Phosphorothioate linkage)	
1	TTA-AAT-CCT-CTA-AGG-CAT-GCT-AC						
BACKBONE (BASES + LINKAGES)							
A	7	GC (%) <sup>1</sup>	39.1	Quantity	(OD@260nm)	8.79	
C	6	MW (g.mol <sup>-1</sup> ) <sup>1</sup>	6982.6		(nmol)	40.1	
G	3	Ext. coeff. (l.mol <sup>-1</sup> .cm <sup>-1</sup> ) <sup>1</sup>	219100		(µg)	280	
U / T	0 / 7	Tm (°C) <sup>1</sup>	46.6				
Others	0						
Wobbles	0	<sup>1</sup> Theoretical values					
MODIFICATION(S)		(dX = DNA X; rX = RNA X; 2'Ome rX = 2'Ome RNA X; pX = PNA X; LnX = LNA® X)					
Mod 3'		Mod 4				0	
Mod 5'		Mod 5				0	
		Mod 6				0	
Mod 1	0	Mod 7				0	
Mod 2	0	Mod 8				0	
Mod 3	0	Mod 9				0	
PURIFICATION(S)							
SePOP							
ADDITIONAL SERVICE(S)							
FORMAT		Dried	ALIQUOTING				
			Number of Aliquots		0		
			Plastic		Self-Stand Tube 2 ml		
QUALITY CONTROL(S)							
Passed							
DELIVERY CONDITION							
Room Temperature							
RECONSTITUTION							
To Make up to 100 µM concentration add 401 µl of recommended buffer.							
To Make up to 20 µM concentration add 2.01 ml of recommended buffer.							
To Make up to 5 µM concentration add 8.02 ml of recommended buffer.							
LONG-TERM STORAGE							
DNA: -20 °C / RNA: -70 °C							
COMMENTS							
General:							
Specific:							
TECHNICAL SUPPORT			EUROPE		NORTH AMERICA		
If you have any questions feel free to call our Oligo Centre depending on your location: [Belgium, France, Germany, Luxembourg, The Netherlands, United Kingdom, Switzerland, Austria] 00 800 666 00 123 (European toll free number), or send an email to <a href="mailto:oligo@eurogentec.com">oligo@eurogentec.com</a>			If you have questions, please contact our Technical Support Department at +1 (510) 896-1350 or send an email to <a href="mailto:oligo.na@egt-biotech.com">oligo.na@egt-biotech.com</a>				

YOUR ORDER		NRU / SON					DATE
806586 - 1		194.24 EUR	1000764298				13-Oct-15
CUSTOMER			ADDRESS / INSTITUTION				
Amine E DRICI			FRANCE ANGERS 49066				
OLIGO NAME		BATCH	SCALE	CHEMISTRY	BASES		
virB11R		5872914	10 nmol	DNA	23		
SEQUENCE (5' → 3')							
1 GAT-ATA-AGT-CGT-TTT-ACC-GCT-TC <span style="float: right;">(*: Phosphorothioate linkage)</span>							
BACKBONE (BASES + LINKAGES)							
A	5	GC (%) <sup>1</sup>	39.1	Quantity	(OD@260nm)	7.92	
C	5	MW (g.mol <sup>-1</sup> ) <sup>1</sup>	7004.6		(nmol)	36.3	
G	4	Ext. coeff. (l.mol <sup>-1</sup> .cm <sup>-1</sup> ) <sup>1</sup>	218200		(µg)	254	
U / T	0 / 9	Tm (°C) <sup>1</sup>	46.6				
Others	0						
Wobbles	0	<sup>1</sup> Theoretical values					
MODIFICATION(S)							
(dX = DNA X; rX = RNA X; 2'Ome rX = 2'Ome RNA X; pX = PNA X; LnX = LNA® X)							
Mod 3'		Mod 4				0	
Mod 5'		Mod 5				0	
		Mod 6				0	
Mod 1	0	Mod 7				0	
Mod 2	0	Mod 8				0	
Mod 3	0	Mod 9				0	
PURIFICATION(S)							
SePOP							
ADDITIONAL SERVICE(S)							
FORMAT		Dried	ALIQUOTING				
			Number of Aliquots		0		
			Plastic		Self-Stand Tube 2 ml		
QUALITY CONTROL(S)							
Passed							
DELIVERY CONDITION							
Room Temperature							
RECONSTITUTION							
To Make up to 100 µM concentration add 363 µl of recommended buffer.							
To Make up to 20 µM concentration add 1.81 ml of recommended buffer.							
To Make up to 5 µM concentration add 7.25 ml of recommended buffer.							
LONG-TERM STORAGE							
DNA: -20 °C / RNA: -70 °C							
COMMENTS							
General:							
Specific:							
TECHNICAL SUPPORT			EUROPE		NORTH AMERICA		
If you have any questions feel free to call our Oligo Centre depending on your location: [Belgium, France, Germany, Luxembourg, The Netherlands, United Kingdom, Switzerland, Austria] 00 800 666 00 123 (European toll free number), or send an email to <a href="mailto:oligo@eurogentec.com">oligo@eurogentec.com</a>			If you have questions, please contact our Technical Support Department at +1 (510) 896-1350 or send an email to <a href="mailto:oligo.na@egt-biotech.com">oligo.na@egt-biotech.com</a>				

YOUR ORDER		NRU / SON			DATE
806586 - 1		194.24 EUR	1000764298		13-Oct-15
CUSTOMER			ADDRESS / INSTITUTION		
Amine E DRICI			FRANCE ANGERS 49066		
OLIGO NAME	BATCH	SCALE	CHEMISTRY	BASES	
flaA_F	5872915	10 nmol	DNA	17	
SEQUENCE (5' → 3')					(*: Phosphorothioate linkage)
1	TCT-ATC-GGC-TCT-ACC-AC				
BACKBONE (BASES + LINKAGES)					
A	3	GC (%) <sup>1</sup>	52.9	Quantity (OD@260nm)	6.50
C	7	MW (g.mol <sup>-1</sup> ) <sup>1</sup>	5081.4	(nmol)	43.1
G	2	Ext. coeff. (l.mol <sup>-1</sup> .cm <sup>-1</sup> ) <sup>1</sup>	150800	(µg)	219
U / T	0 / 5	Tm (°C) <sup>1</sup>	52.0		
Others	0				
Wobbles	0				
<sup>1</sup> Theoretical values					
MODIFICATION(S)					
(dX = DNA X; rX = RNA X; 2'Ome rX = 2'Ome RNA X; pX = PNA X; LnX = LNA® X)					
Mod 3'		Mod 4			0
Mod 5'		Mod 5			0
		Mod 6			0
Mod 1	0	Mod 7			0
Mod 2	0	Mod 8			0
Mod 3	0	Mod 9			0
PURIFICATION(S)					
SePOP					
ADDITIONAL SERVICE(S)					
FORMAT		Dried	ALIQUOTING		
			Number of Aliquots		
			0		
			Plastic		
			Self-Stand Tube 2 ml		
QUALITY CONTROL(S)					
Passed					
DELIVERY CONDITION					
Room Temperature					
RECONSTITUTION					
To Make up to 100 µM concentration add 431 µl of recommended buffer.					
To Make up to 20 µM concentration add 2.15 ml of recommended buffer.					
To Make up to 5 µM concentration add 8.62 ml of recommended buffer.					
LONG-TERM STORAGE					
DNA: -20 °C / RNA: -70 °C					
COMMENTS					
General:					
Specific:					
TECHNICAL SUPPORT			EUROPE	NORTH AMERICA	
If you have any questions feel free to call our Oligo Centre depending on your location: [Belgium, France, Germany, Luxembourg, The Netherlands, United Kingdom, Switzerland, Austria] 00 800 666 00 123 (European toll free number), or send an email to <a href="mailto:oligo@eurogentec.com">oligo@eurogentec.com</a>			If you have questions, please contact our Technical Support Department at +1 (510) 896-1350 or send an email to <a href="mailto:oligo.na@egt-biotech.com">oligo.na@egt-biotech.com</a>		

YOUR ORDER		NRU / SON					DATE
806586 - 1		194.24 EUR	1000764298				13-Oct-15
CUSTOMER			ADDRESS / INSTITUTION				
Amine E DRICI			FRANCE ANGERS 49066				
OLIGO NAME	BATCH	SCALE	CHEMISTRY	BASES			
flaA_R	5872916	10 nmol	DNA	18			
SEQUENCE (5' → 3')							
(*: Phosphorothioate linkage)							
1	CTG-ACC-GCC-ATT-GAC-CAT						
BACKBONE (BASES + LINKAGES)							
A	4	GC (%) <sup>1</sup>	55.6	Quantity	(OD@260nm)	8.55	
C	7	MW (g.mol <sup>-1</sup> ) <sup>1</sup>	5419.6		(nmol)	52.3	
G	3	Ext. coeff. (l.mol <sup>-1</sup> .cm <sup>-1</sup> ) <sup>1</sup>	163600		(µg)	283	
U / T	0 / 4	Tm (°C) <sup>1</sup>	56.0				
Others	0						
Wobbles	0	<sup>1</sup> Theoretical values					
MODIFICATION(S)							
(dX = DNA X; rX = RNA X; 2'Ome rX = 2'Ome RNA X; pX = PNA X; LnX = LNA® X)							
Mod 3'		Mod 4				0	
Mod 5'		Mod 5				0	
		Mod 6				0	
Mod 1	0	Mod 7				0	
Mod 2	0	Mod 8				0	
Mod 3	0	Mod 9				0	
PURIFICATION(S)							
SePOP							
ADDITIONAL SERVICE(S)							
FORMAT		Dried	ALIQUOTING				
			Number of Aliquots		0		
			Plastic		Self-Stand Tube 2 ml		
QUALITY CONTROL(S)							
Passed							
DELIVERY CONDITION							
Room Temperature							
RECONSTITUTION							
To Make up to 100 µM concentration add 523 µl of recommended buffer.							
To Make up to 20 µM concentration add 2.61 ml of recommended buffer.							
To Make up to 5 µM concentration add 10.45 ml of recommended buffer.							
LONG-TERM STORAGE							
DNA: -20 °C / RNA: -70 °C							
COMMENTS							
General:							
Specific:							
TECHNICAL SUPPORT			EUROPE		NORTH AMERICA		
If you have any questions feel free to call our Oligo Centre depending on your location: [Belgium, France, Germany, Luxembourg, The Netherlands, United Kingdom, Switzerland, Austria] 00 800 666 00 123 (European toll free number), or send an email to <a href="mailto:oligo@eurogentec.com">oligo@eurogentec.com</a>			If you have questions, please contact our Technical Support Department at +1 (510) 896-1350 or send an email to <a href="mailto:oligo.na@egt-biotech.com">oligo.na@egt-biotech.com</a>				