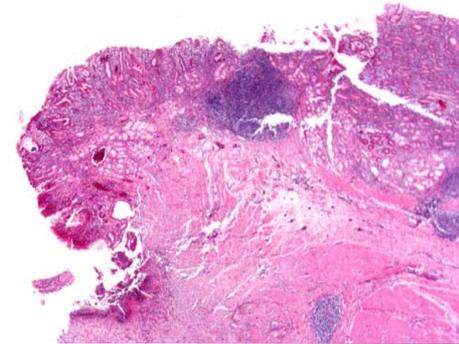


La réponse inflammatoire gastrique à l'infection par *Helicobacter pylori*



Christophe BURUCOA

EA 4331 Laboratoire Inflammation Tissus
Épithéliaux Cytokines

Université de Poitiers

Laboratoire de Bactériologie

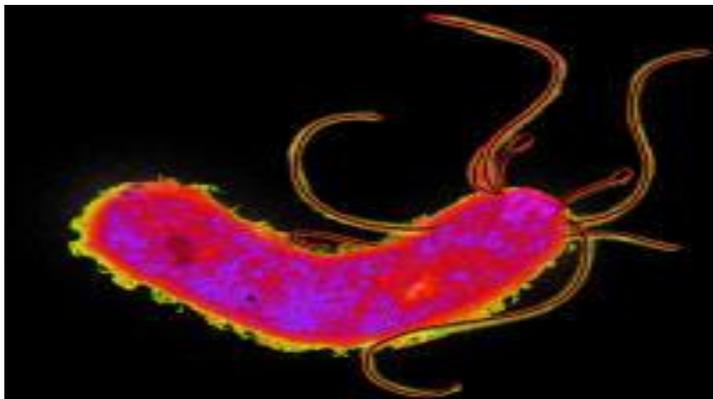
CHU de Poitiers

christophe.burucoa@chu-poitiers.fr



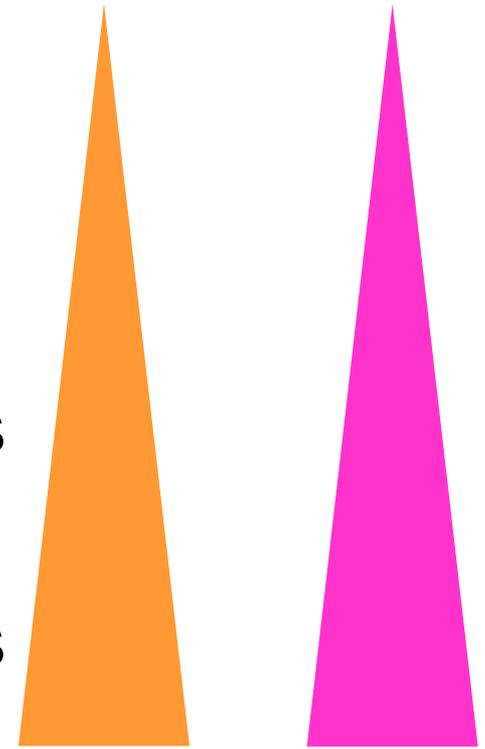
Helicobacter pylori

- Bactérie spiralée et mobile
- Colonise la muqueuse gastrique humaine
- Infecte 50% de la population mondiale
- Transmission interhumaine, familiale
- Gastrite, ulcère, cancer gastrique
- Tri-thérapie orale
- Seule bactérie responsable d'un cancer chez l'homme

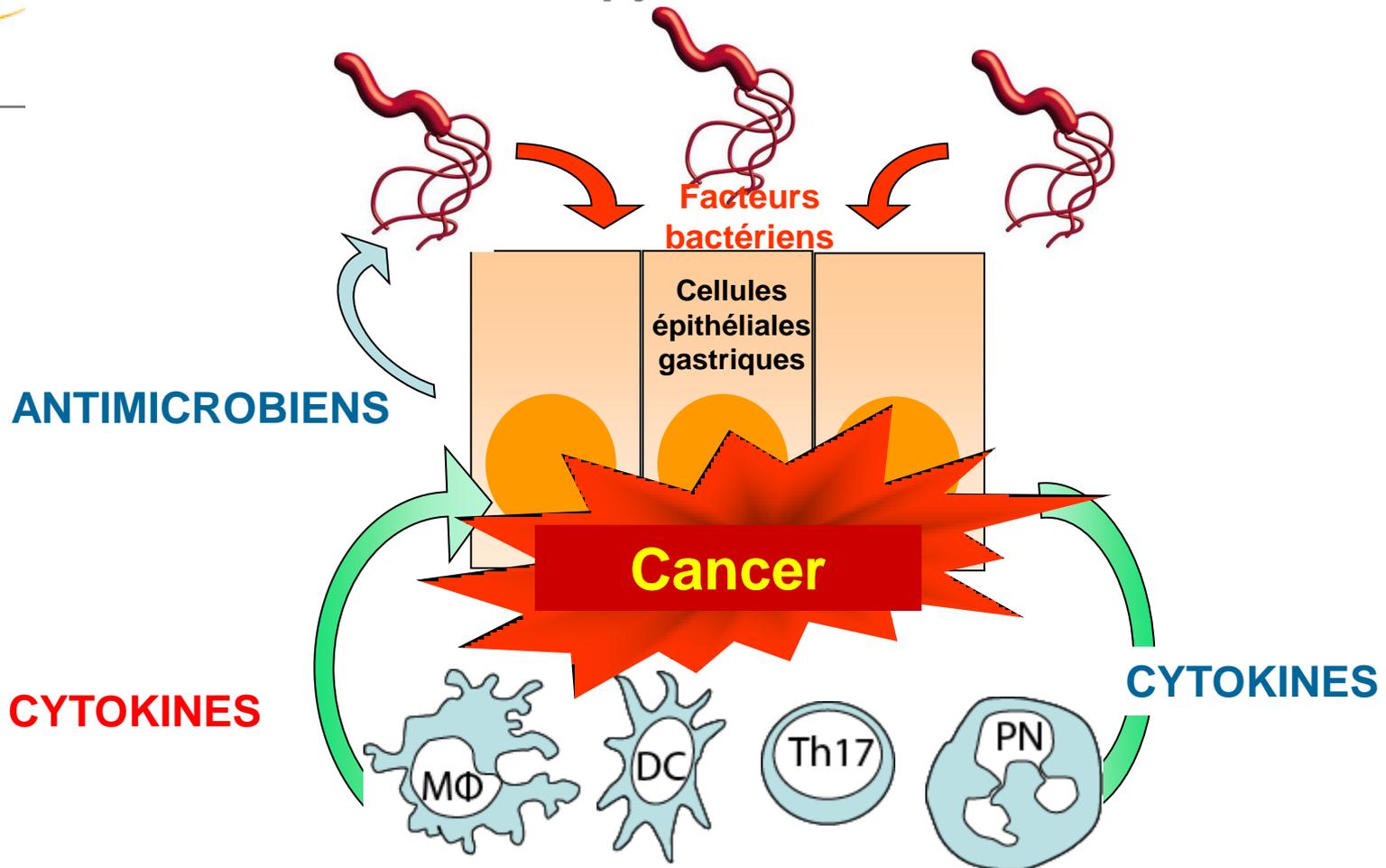


- ☀ 1983 la découverte
- ☀ 1987 l'ulcère : maladie infectieuse
- ☀ 1994 agent carcinogène de type I
- ☀ 1995 1^{ère} conférence de consensus
- ☀ 1997 séquençage de 26695
- ☀ 1999 séquençage de J99
- ☀ 2000 2^{ème} conférence de consensus
- ☀ 2005 prix Nobel
- ☀ 2005 3^{ème} conférence de consensus
- ☀ 2011 4^{ème} conférence de consensus

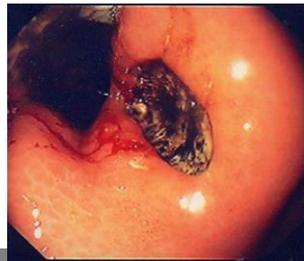
Cancer Résistance



Infection à *Helicobacter pylori* : Modèle d'inflammation

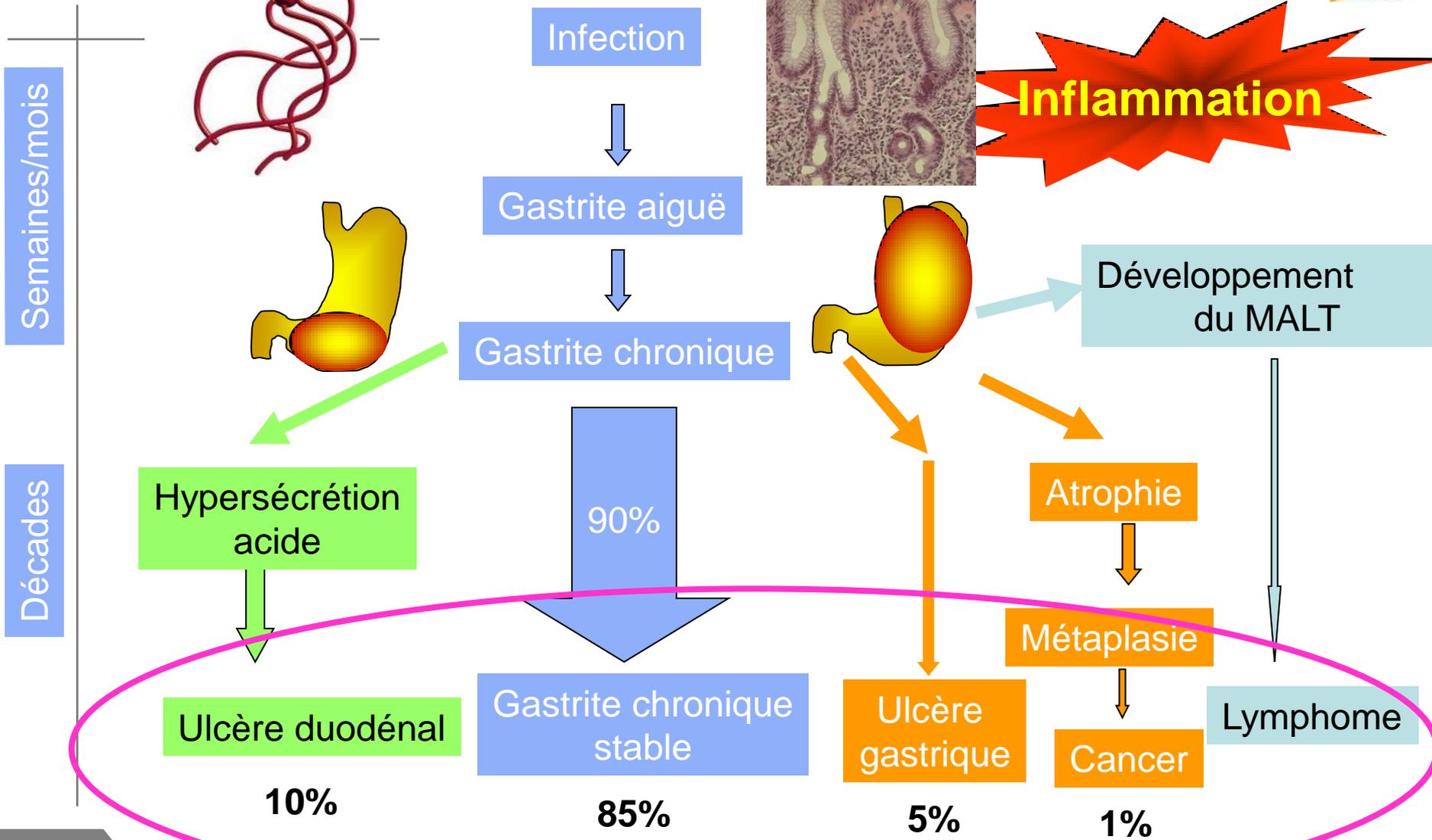


MALADIES



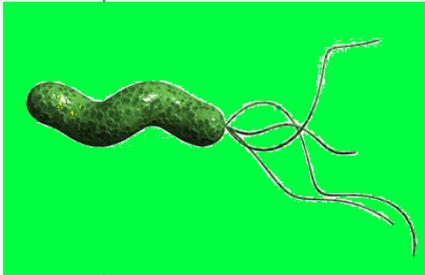
MALADES

Helicobacter pylori

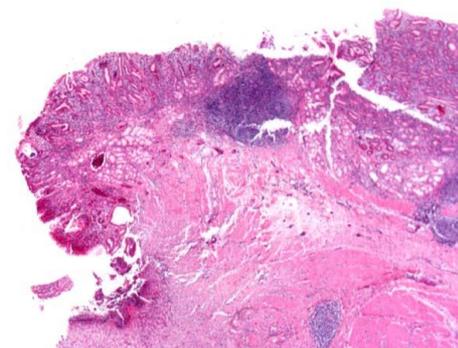


Projet Hospitalier de Recherche Clinique Interrégional 2009

Expression des médiateurs de l'inflammation dans l'infection gastrique à *Helicobacter pylori*



PYLORIKINE



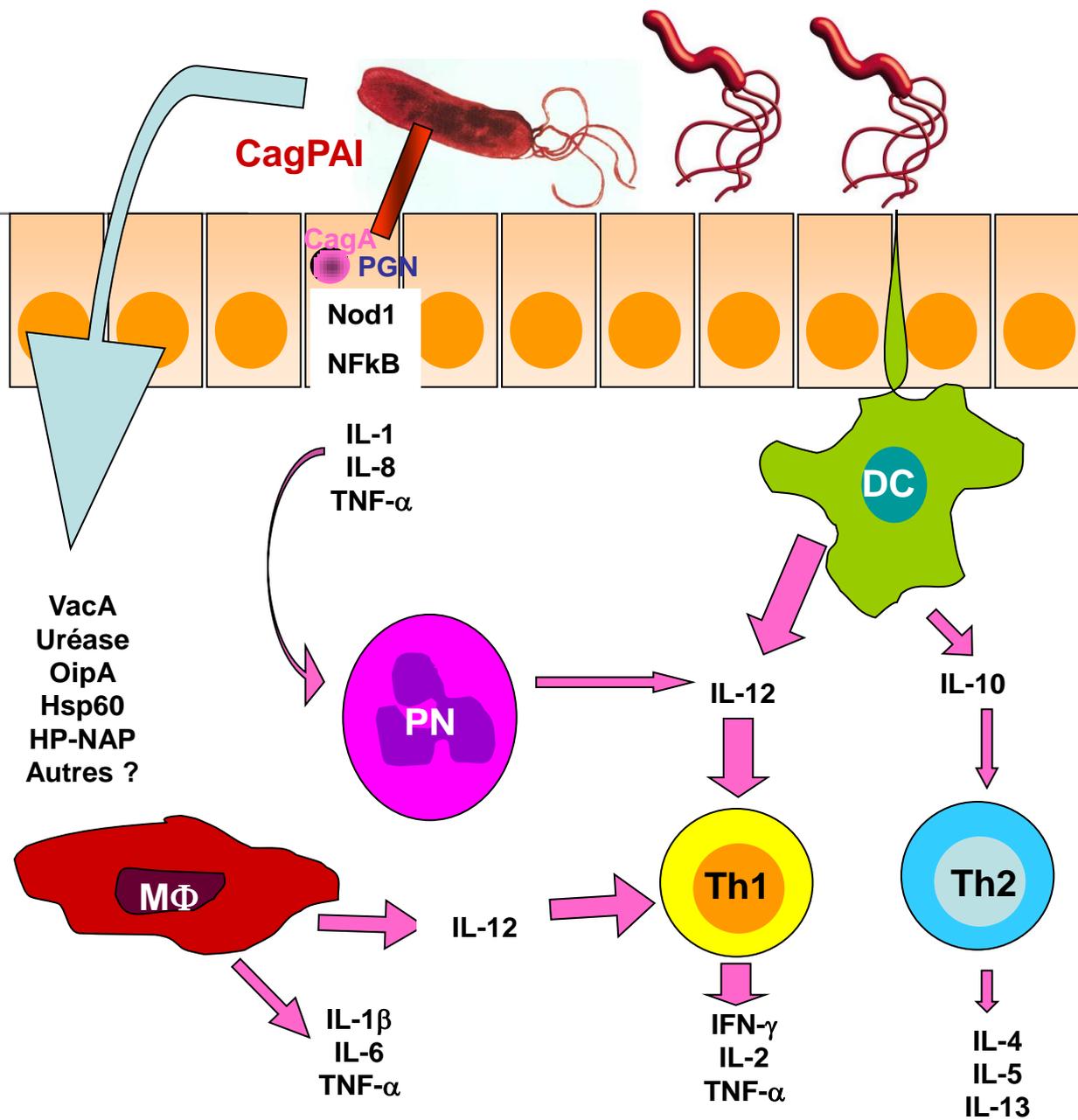
Christophe BURUCOA, Christine SILVAIN, Julie CREMNITER

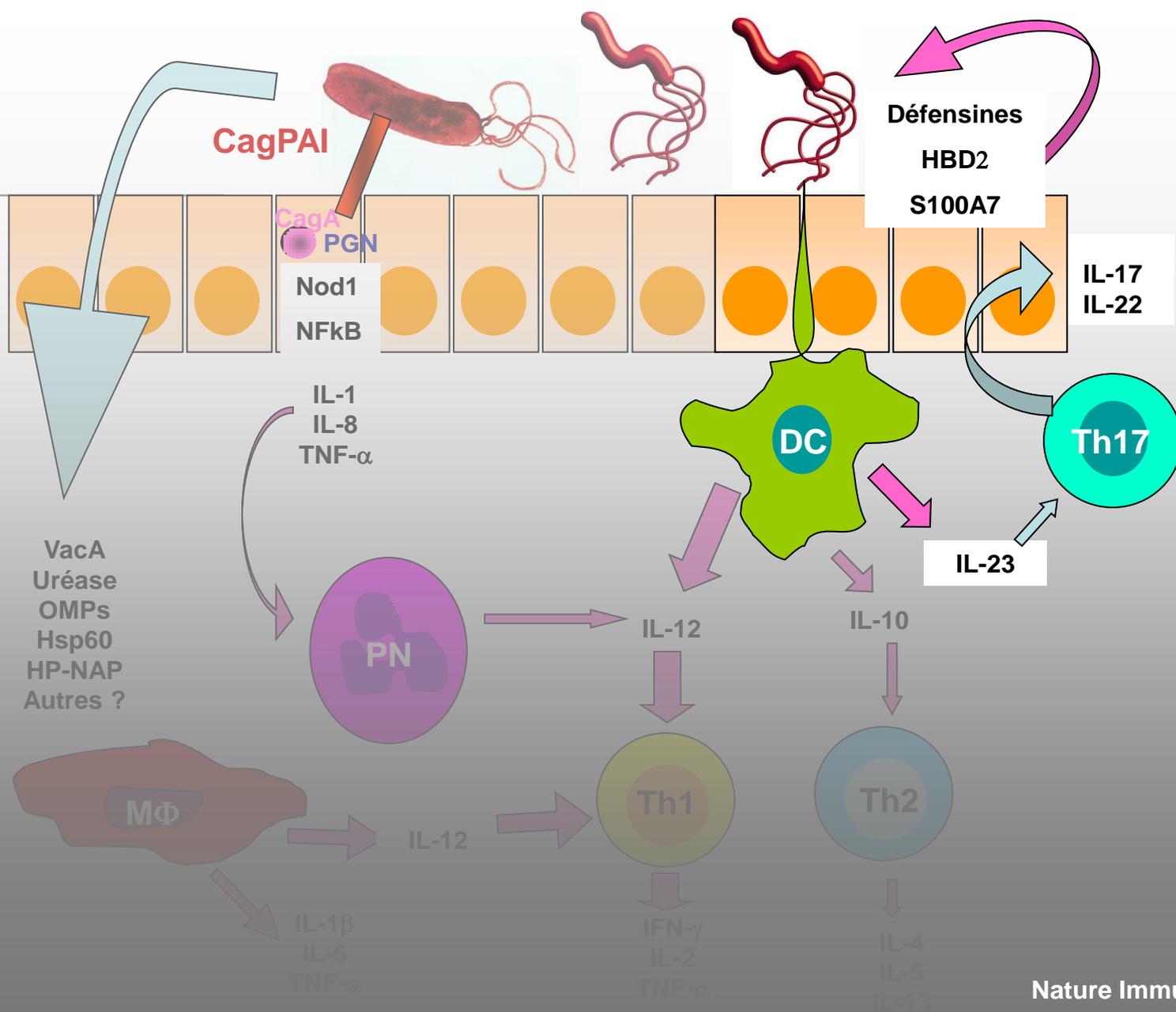
ARC : Audrey MERON, Laetitia ROULEAU Tech. : Emilie PEYROT

Laboratoire de Bactériologie, Service d'Hépatogastroentérologie, CHU de Poitiers

EA4331 Laboratoire Inflammation Tissus Épithéliaux Cytokines, Université de Poitiers

Méthodologie : Joëlle GUILHOT, CIC-P 802 Poitiers Ana-Path : Gaëlle FROMONT

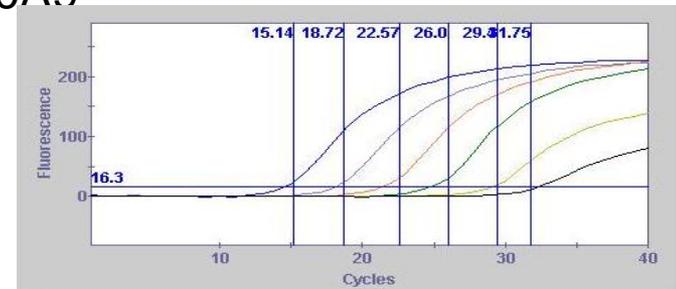




Nature Immunol 2007
 J Immunol 2005, 2007

1. Étude transcriptomique des médiateurs de la réponse inflammatoire de la muqueuse gastrique : RT-PCR quantitative

- Réponse Th17 : IL-17, IL-23, IL-22
- Peptides antimicrobiens : BD2, BD3, S100A9
- Réponse Th1 : IFN γ , TNF α , IL-2, IL-12
- Réponse Th2 : IL-4, IL-13, IL-10
- IL-8, IL-1
- Marqueurs d'infiltration : PNN, CD, LT, MP



2. Quantification de *H. pylori* et recherche des facteurs de virulence

- Présence et quantification par PCR quantitative temps réel
- Facteurs de virulence : îlot Cag, *cagA*, géotypage *vacA*, *iceA*, *babA*, *sabA*, *OipA*, *dupA* : PCR temps réel
- Culture

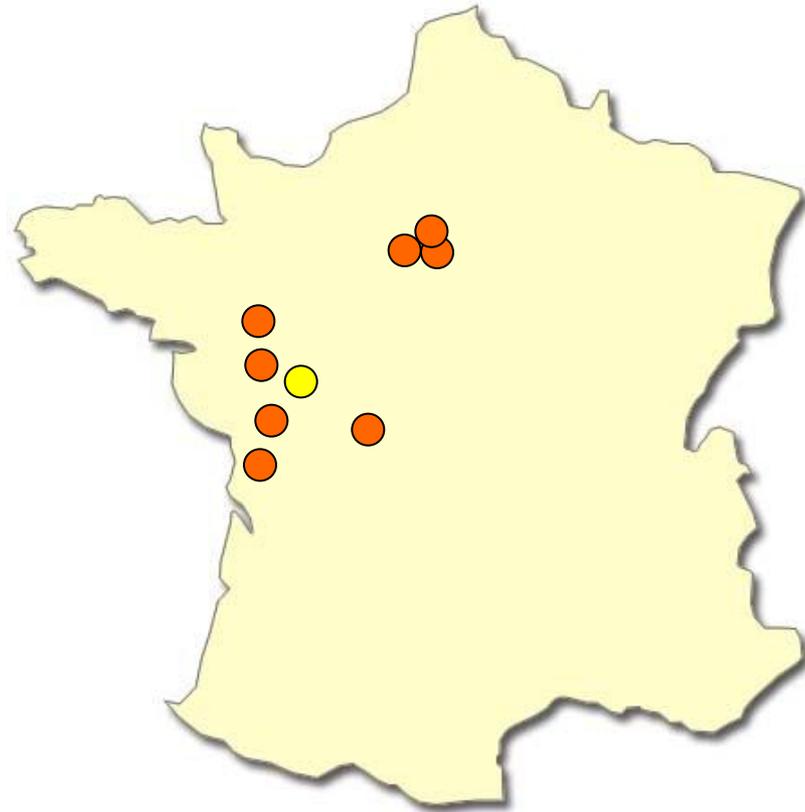
Etude cognitive, prospective, multicentrique, nationale, interventionnelle (deux biopsies supplémentaires propres à l'étude).

Objectif principal : caractériser la réponse anti-infectieuse Th17 dans les biopsies gastriques de patients lors des pathologies sévères liées à *H. pylori*

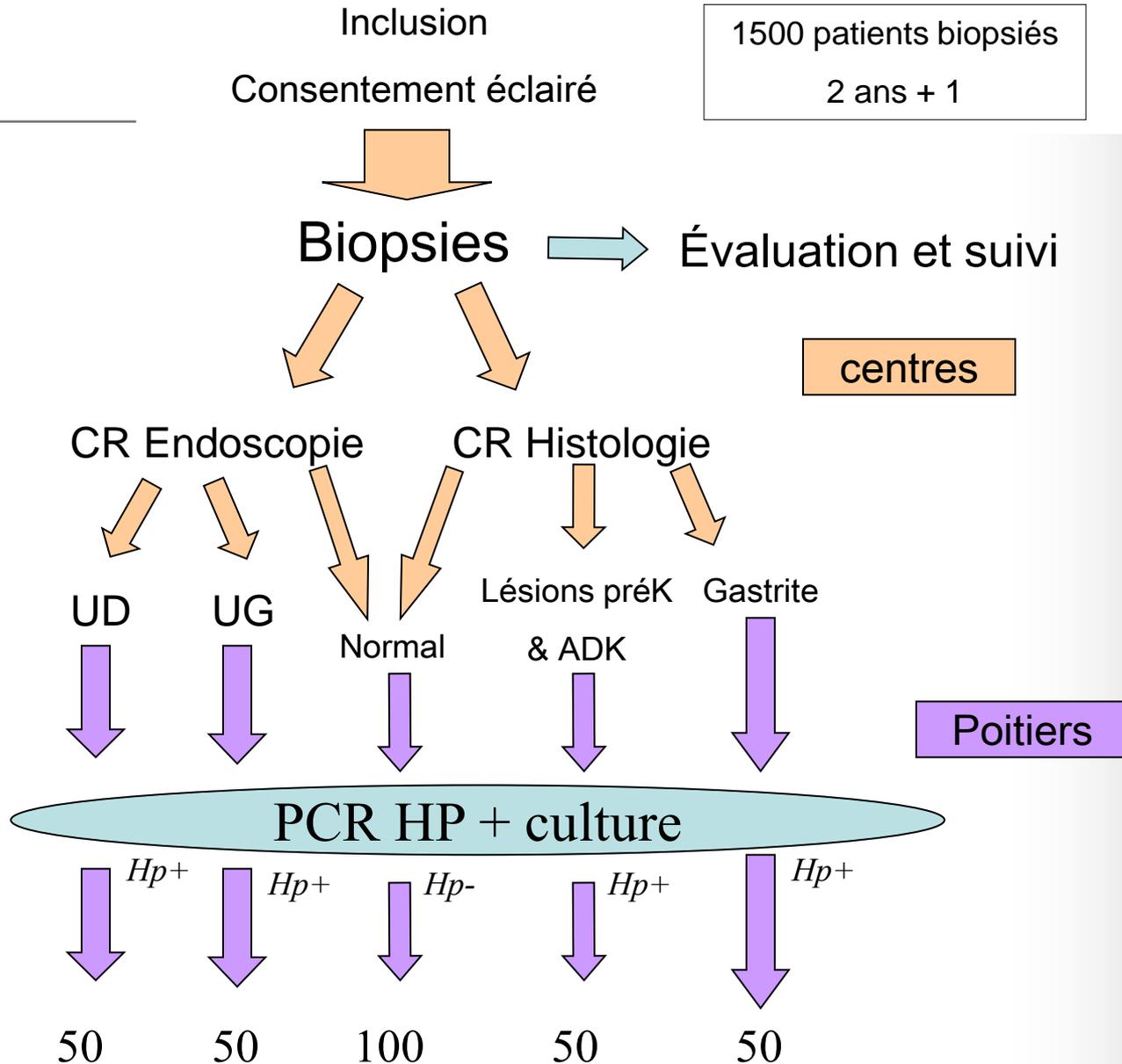
• non infectés		100
• infectés		
- gastrite chronique	(90% des infectés)	50
- ulcère duodéal	(6% des infectés)	50
- ulcère gastrique	(4% des infectés)	50
- cancer gastrique	(1% des infectés)	50
et lésions précancéreuses	(3%)	

Etude multicentrique : 9 centres

- Poitiers
- Angers
- Limoges
- La Rochelle
- Niort
- Poitiers Polyclinique
- Henri Mondor
- Ambroise Paré
- Lariboisière



DEROULEMENT PRATIQUE



Résultats préliminaires au 25 janvier

700 patients inclus

110 analysables :

58 non infectés, muqueuse normale

52 infectés

32 gastrites

4 ulcères duodénaux

3 ulcères gastriques

13 lésions précancéreuses et cancers

1 atrophie

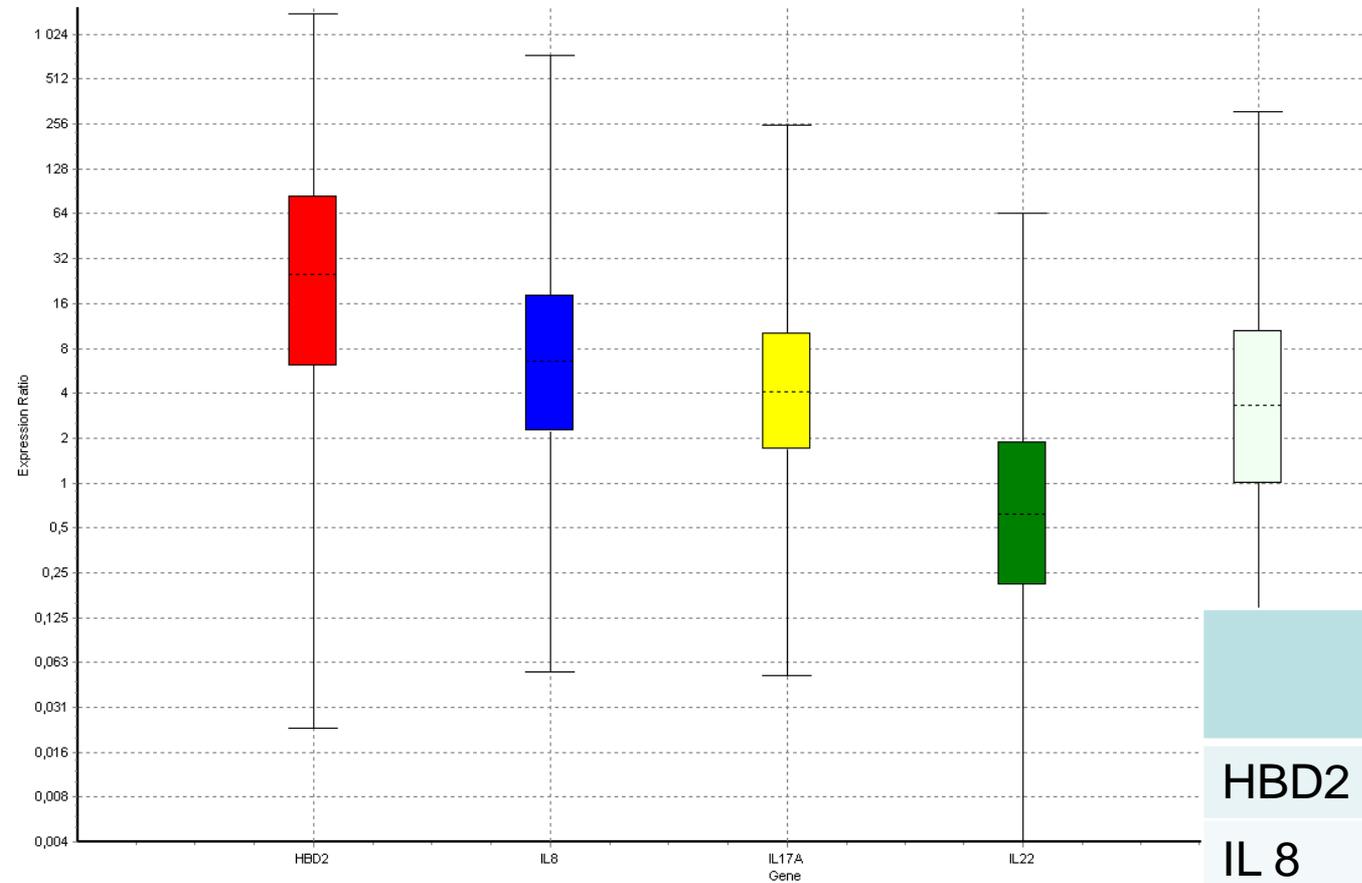
10 métaplasies

1 dysplasie

1 adénocarcinome

Expression relative des différentes interleukines et défensines Infectés/non infectés

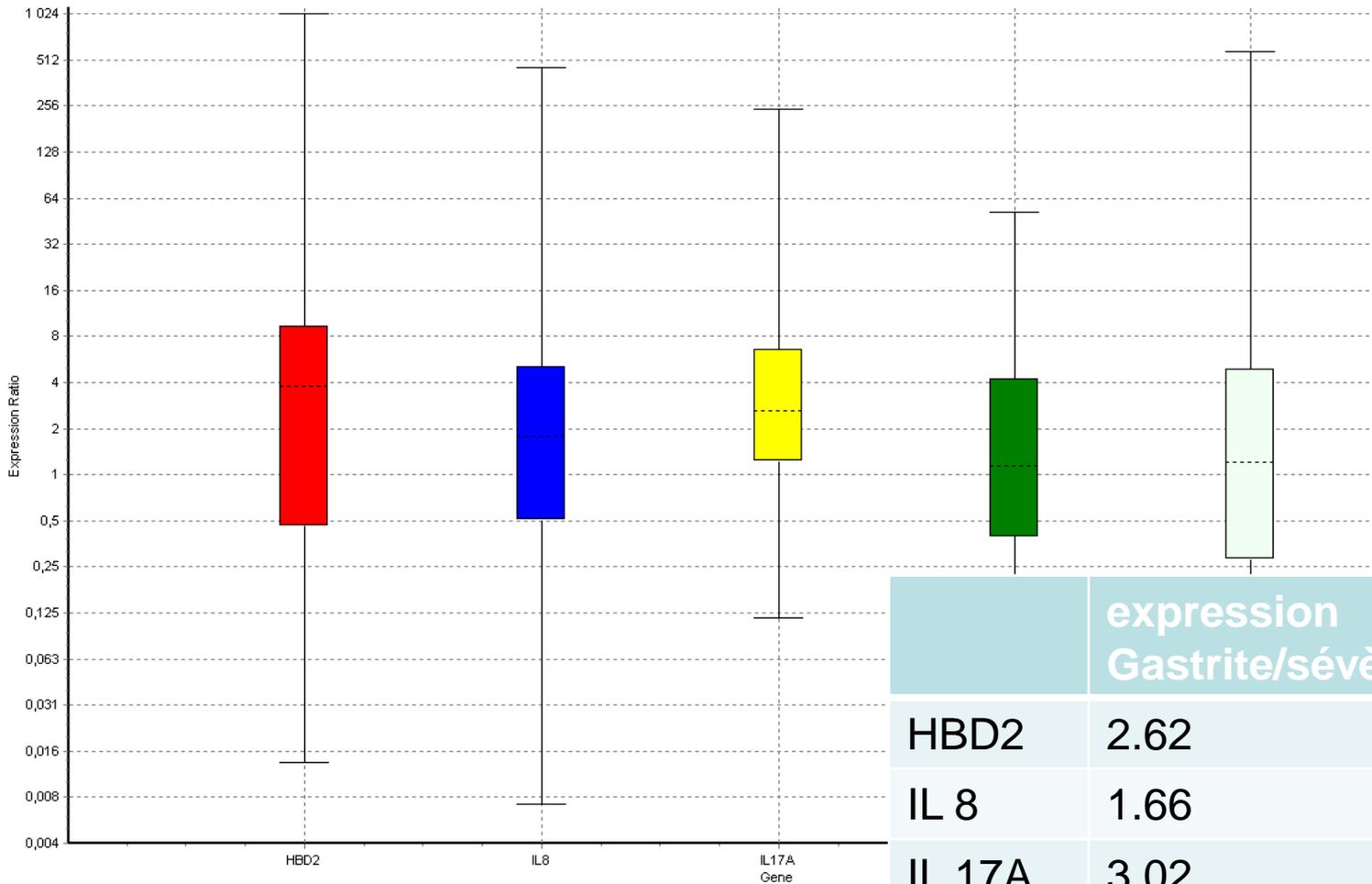
Relative Expression



	expression Hp+/Hp-	p
HBD2	20.44	0.000
IL 8	5.64	0.000
IL 17A	3.88	0.000
IL 22	0.46	0.068
S100A9	3.30	0.000

Expression relative des différentes interleukines et défensines Gastrites/pathologies sévères (UD, UG, préK et K)

Relative Expression



	expression Gastrite/sévère	p
HBD2	2.62	0.038
IL 8	1.66	0.187
IL 17A	3.02	0.000
IL 22	1.18	0.63
S100A9	1.01	0.820

	<i>cagA</i> +	<i>cagA</i> -
Gastrite	16	14
Sévères	18	2
U. duodéal	4	0
U. gastrique	2	1
préK et K	12	1
	34	16

p 0.006

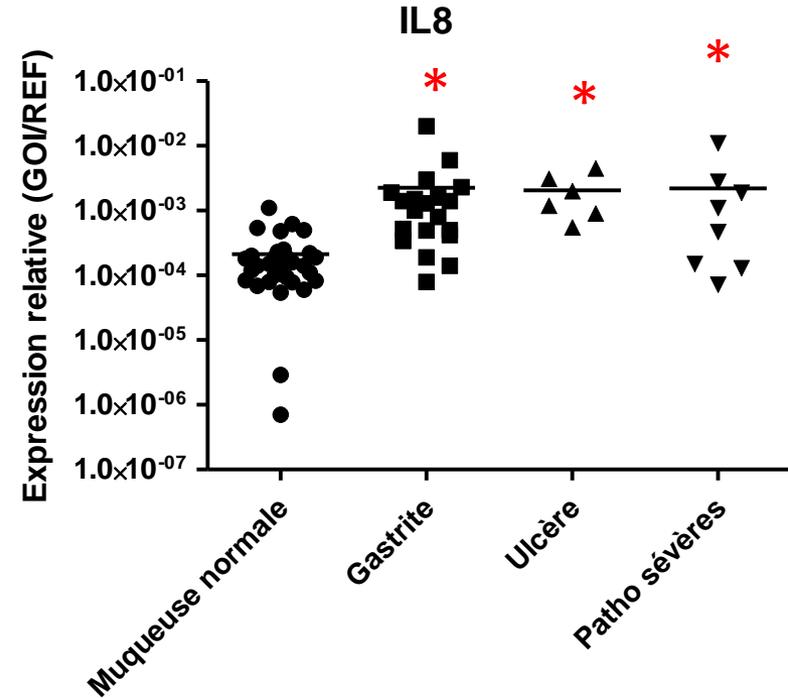
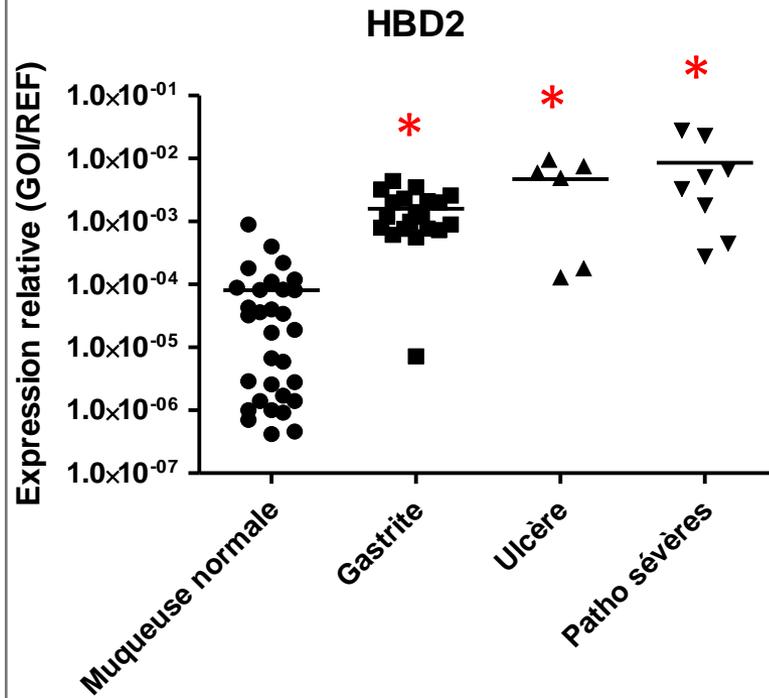
Densité bactérienne UFC/mg de biopsie

CagA+ 8351

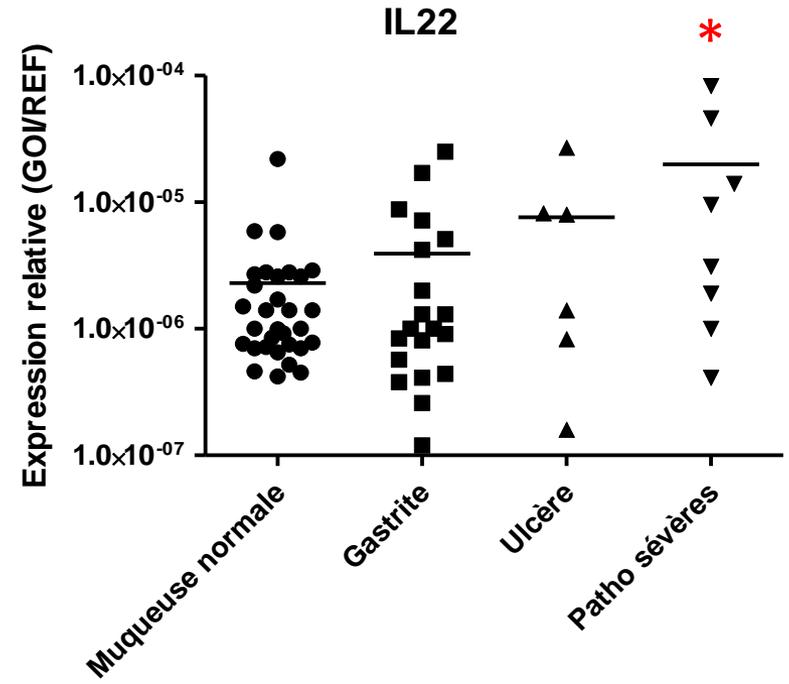
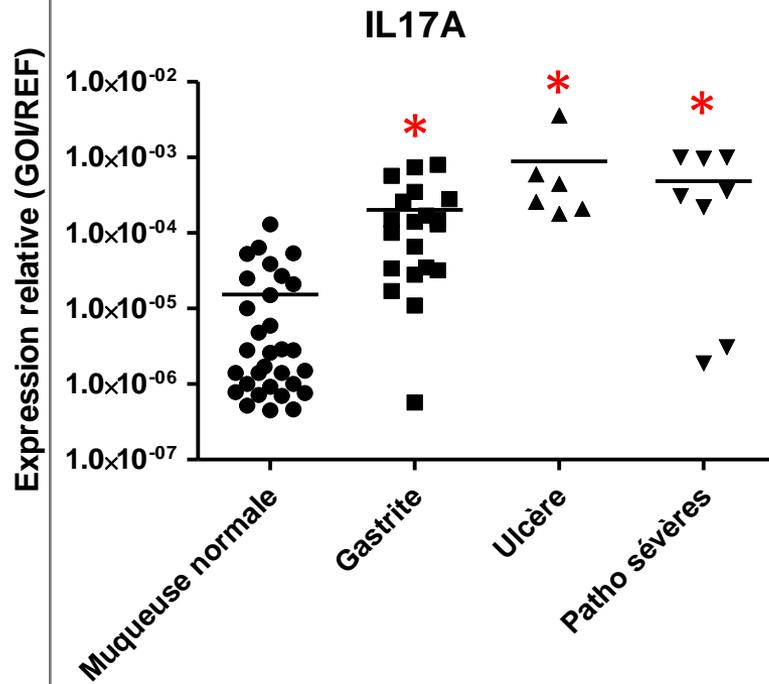
CagA- 17636

	expression <i>cagA</i> +/ <i>cagA</i> -	p
HBD2	3.568	0.003
IL 8	1.974	0.098
IL 17A	1.7	0.132
IL 22	0.897	0.755
S100A9	1.377	0.5

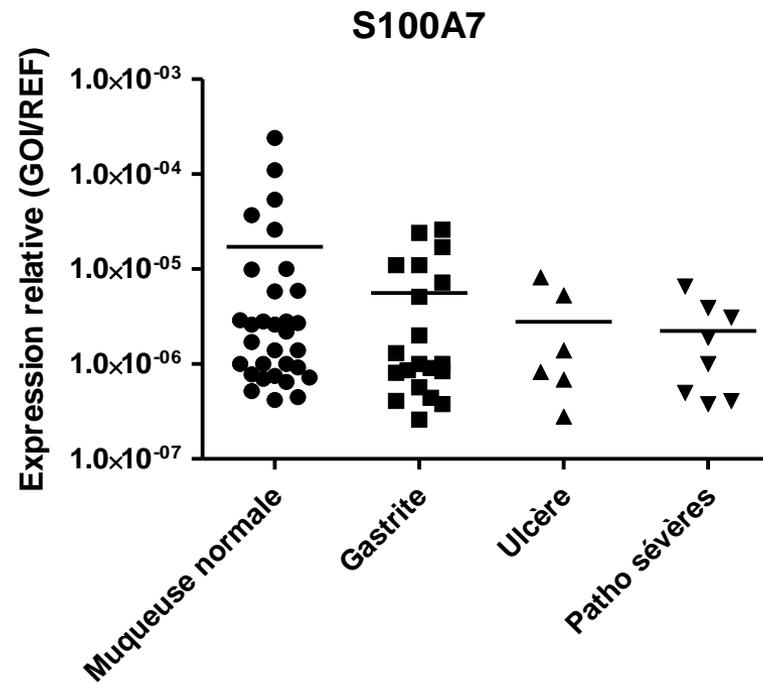
Résultats



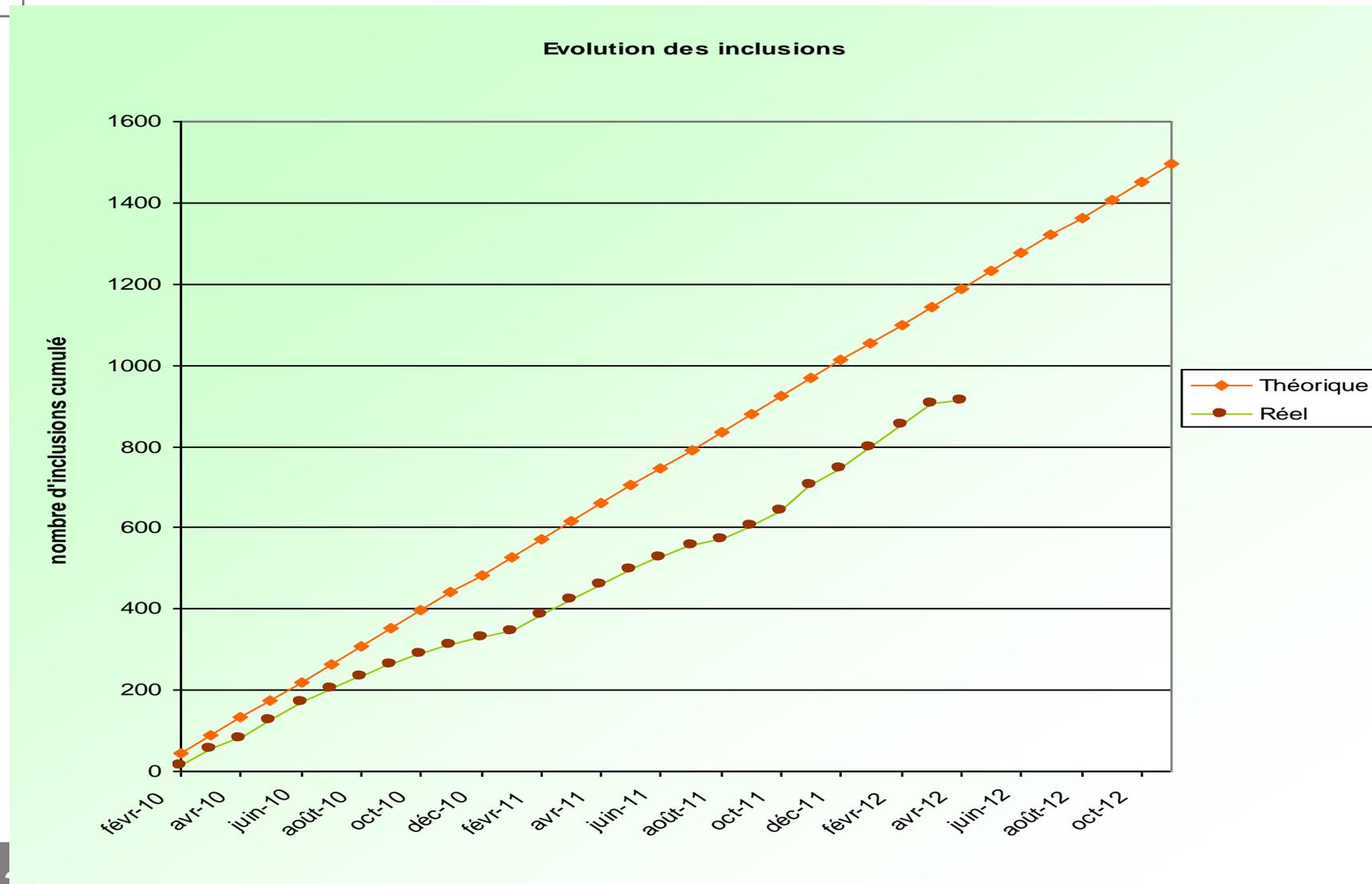
Résultats



Résultats



Progression des inclusions

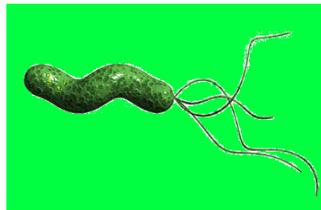


Perspectives

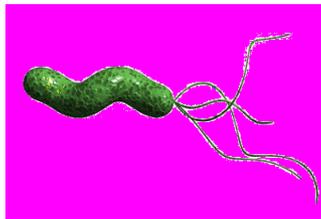
- mettre en évidence des profils inflammatoires spécifiques de chaque pathologie (ulcères, cancers, gastrites)
- mettre en évidence le rôle de la voie Th17 et des défensines
- mettre en évidence l'impact des facteurs de virulence (cagPAI, cagA, oipA, vacA...)
- pistes pour des expérimentations contrôlées : nécessité de modèles d'étude

Intérêt des modèles

Mutants des facteurs de virulence

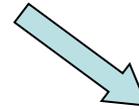


sauvage

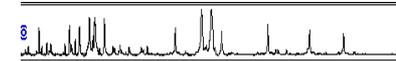
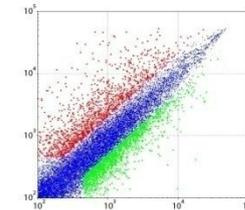
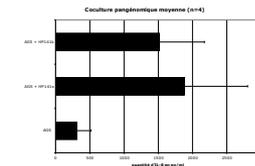
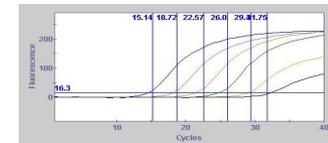
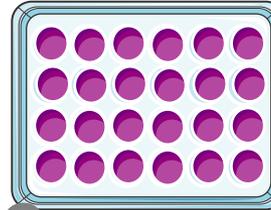


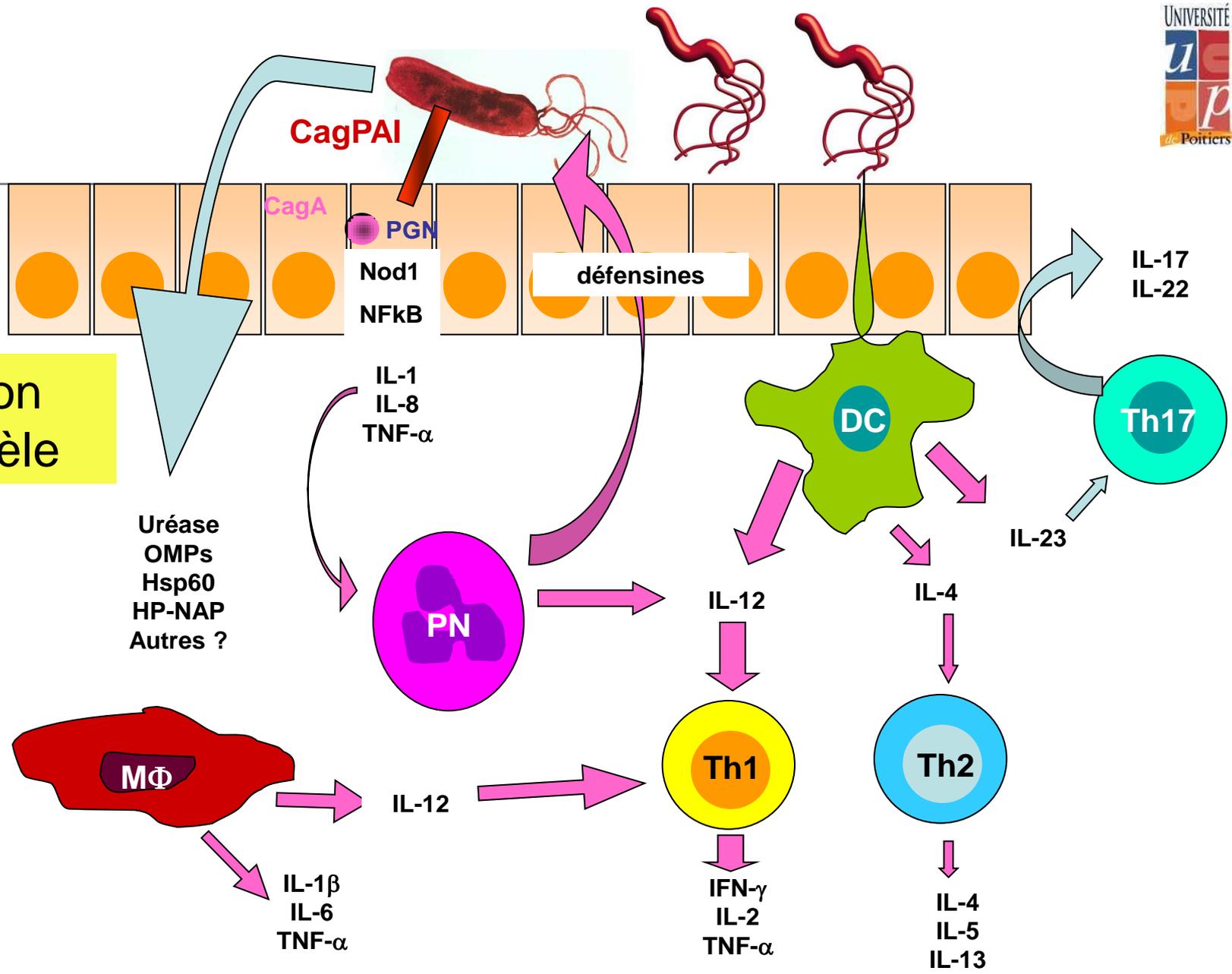
mutant

In vitro
AGS



In vivo
souris





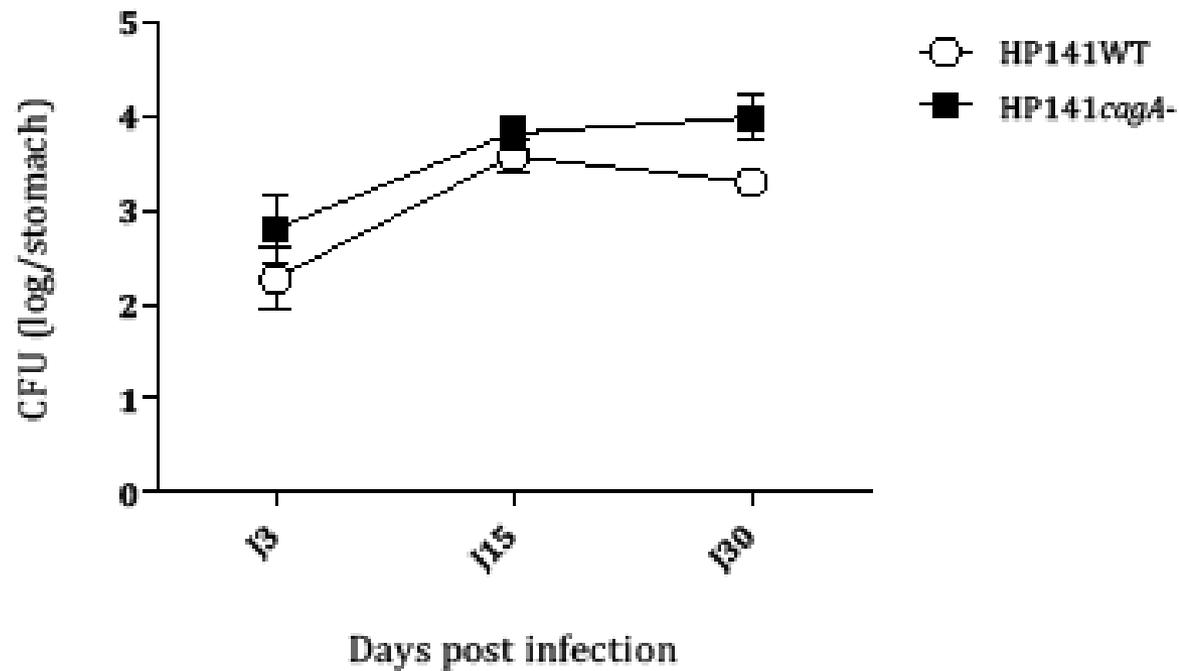
Validation du modèle



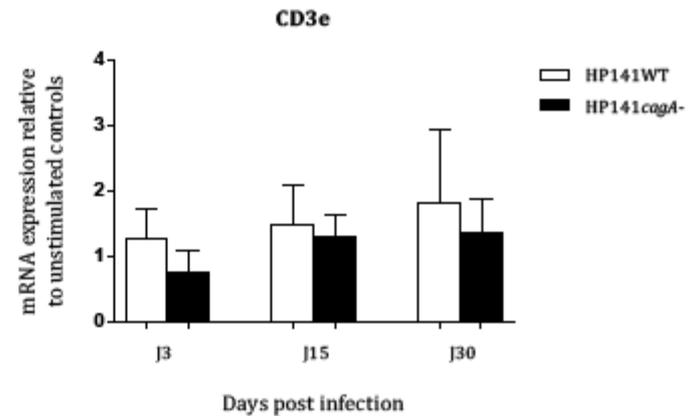
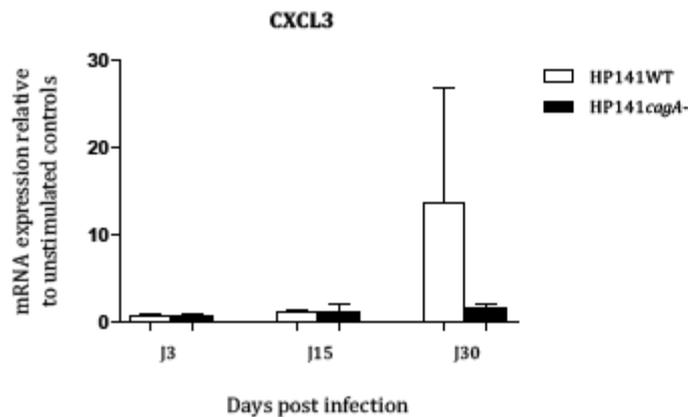
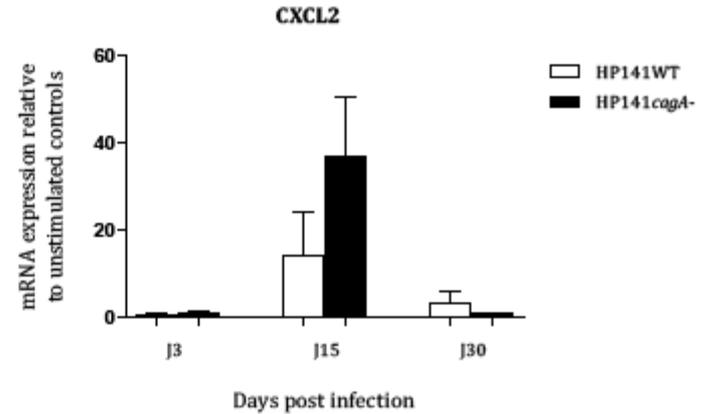
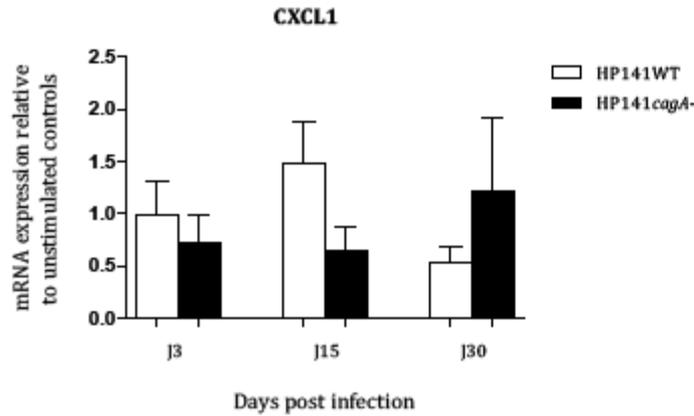
- Gavage C57/Bl6
- *H. pylori* 141 CagA+/CagA-
- sacrifices : étude cinétique (J3-J30)
- cinétique de la réponse inflammatoire
 - RT-PCR Q cytokines
 - Infectiosité UFC/estomac



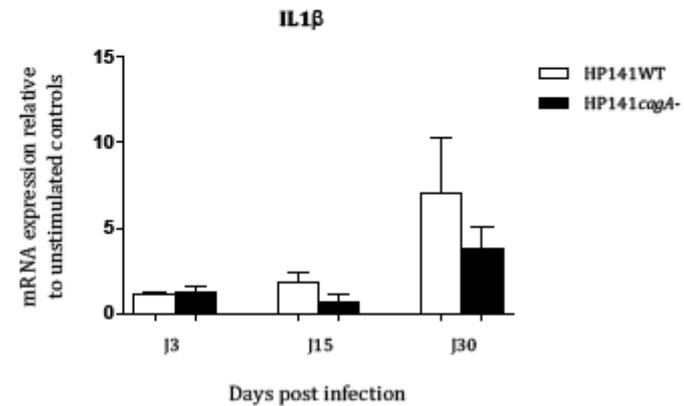
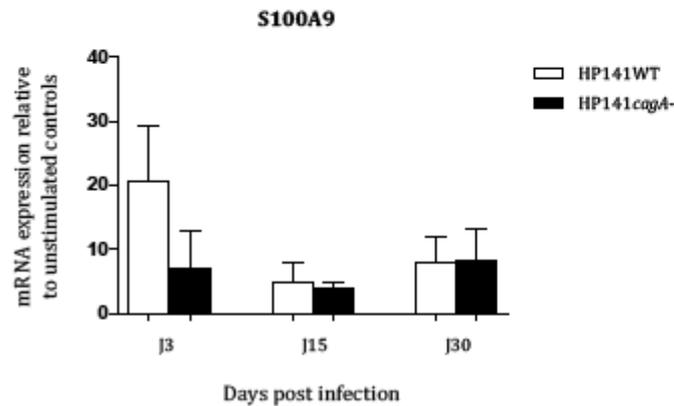
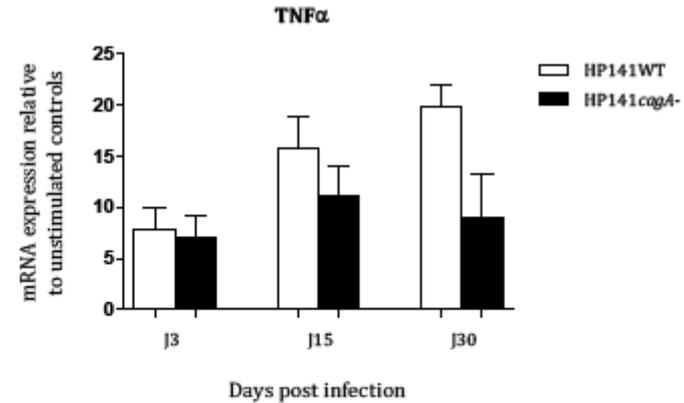
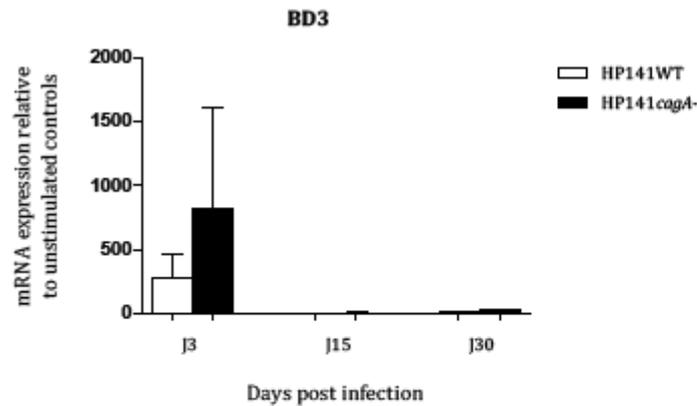
Densité d'infection



Cinétique des cytokines



Cinétique des défensines

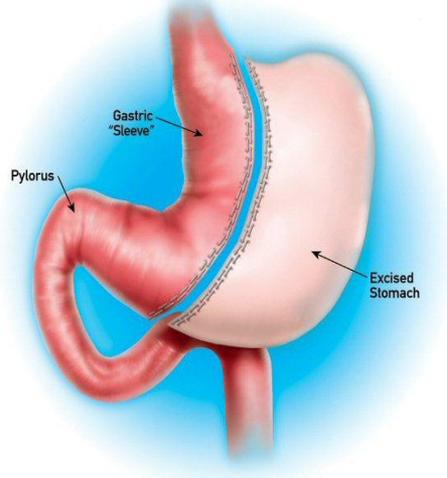


pas d'influence de cagA sur :

- la colonisation
- l'inflammation

On ne retrouve pas dans le modèle murin ce qu'on observe chez les malades

Mise en place d'un nouveau modèle : cellules gastriques ex vivo

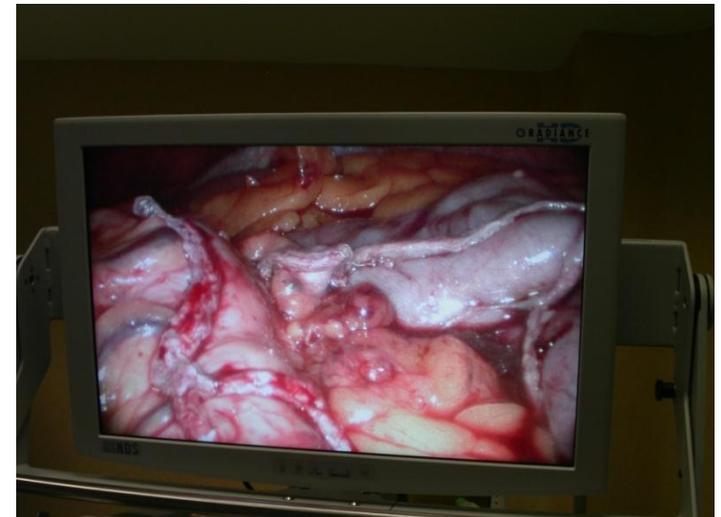


Patients atteints
d'obésité morbide :

Sleeve gastrique

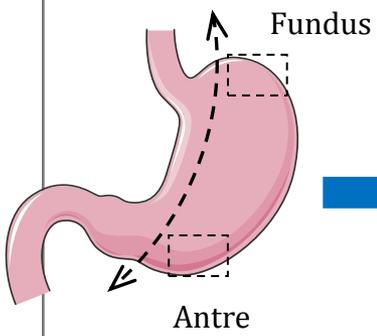
Pr Jean-Pierre Faure

Dr Thierry Barthès

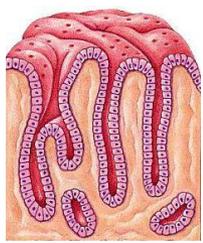


Approche expérimentale

Estomac réséqué



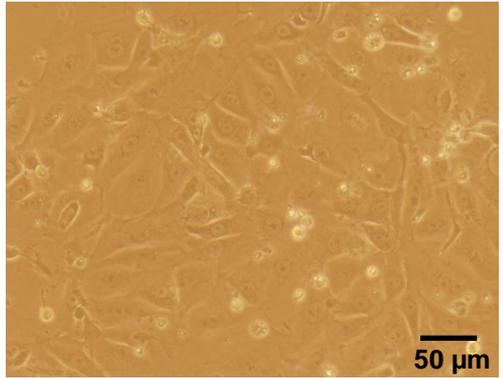
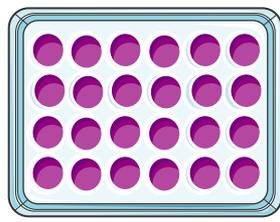
Dissociation mécanique
Récupération de la
muqueuse gastrique



Digestions enzymatiques
Filtrations
Lavages..



Mise en culture



I. Isolation and culture of primary gastric cells : development of the cell culture model

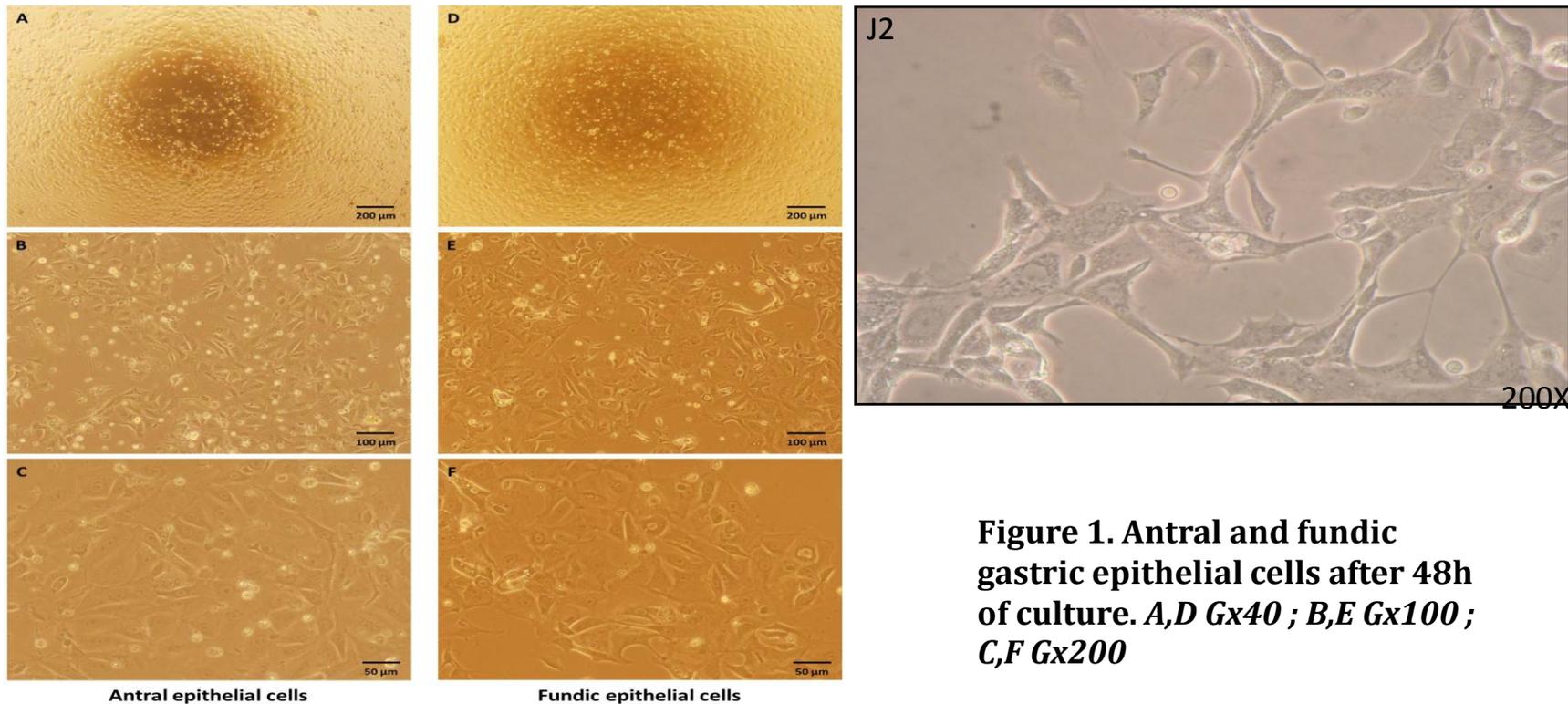
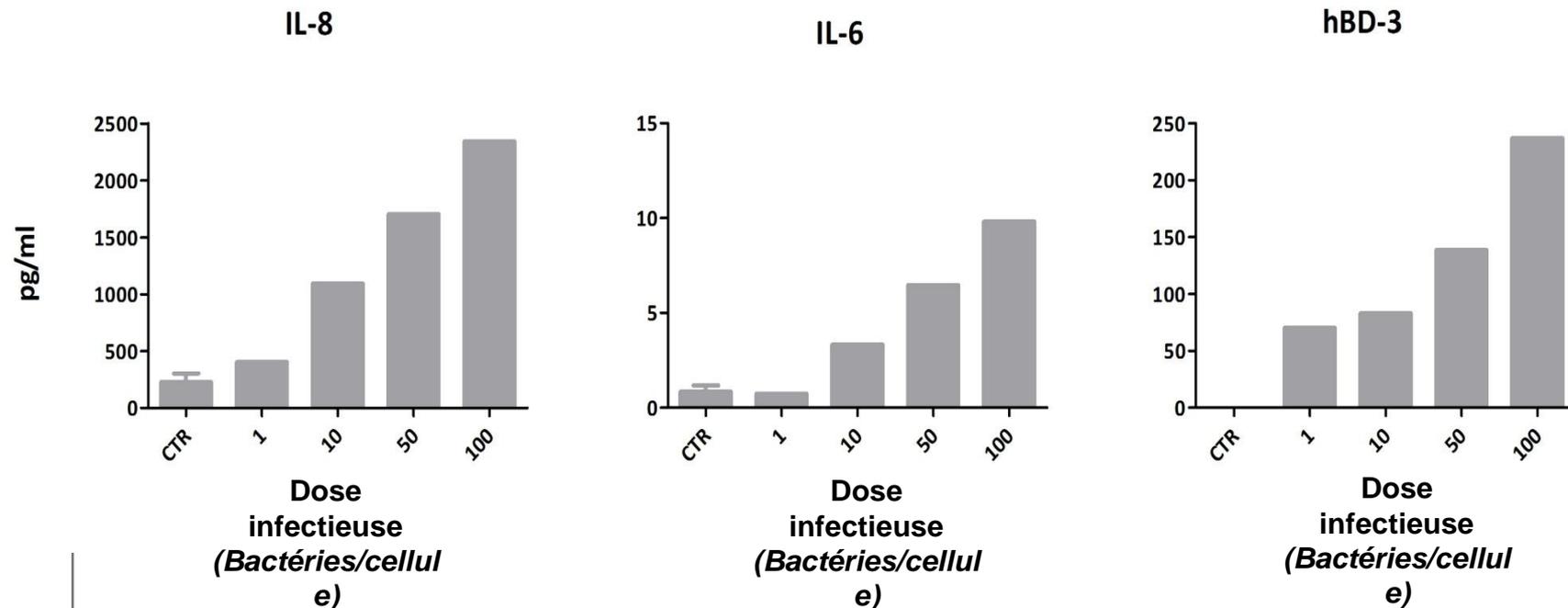


Figure 1. Antral and fundic gastric epithelial cells after 48h of culture. A,D Gx40 ; B,E Gx100 ; C,F Gx200

Etablissement de la dose infectieuse



- ✓ Production dose-dépendante
- ✓ 1 faible dose (10 bactéries/cellule) et 1 forte dose (100 bactéries/cellule)

II. Expression of Cytokeratin 18, Mucin 1, Mucin 5AC and Trefoil Factor 1 in primary gastric human epithelial cells

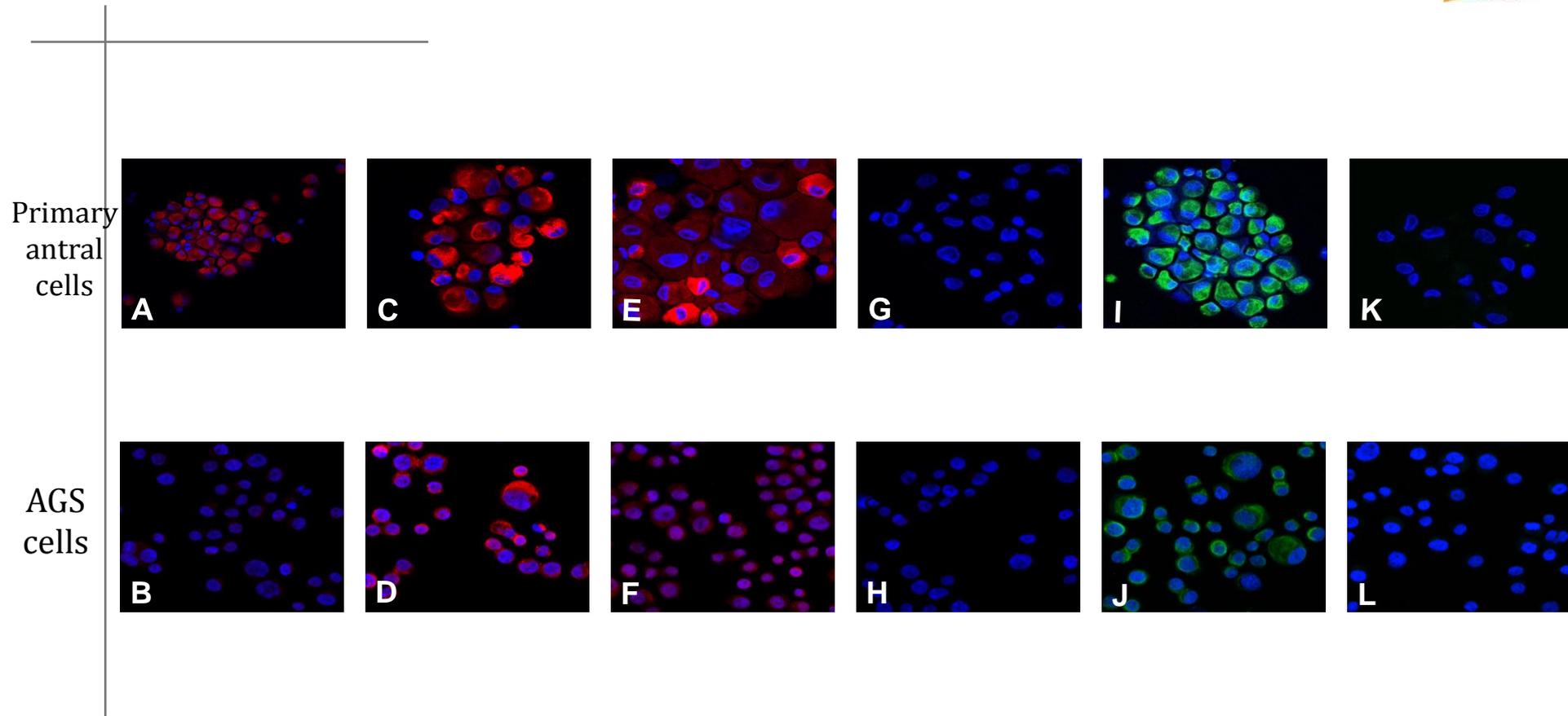


Figure 2. Specific cytoplasmic immunostaining in primary antral cells and AGS cells: Mucin 1 (A) & (B); Mucin 5AC (C) & (D); Trefoil Factor 1 (E) & (F); Rhodamine-RedX[®] negative controls (G) & (H); CK18 (I) & (J); Alexa[®]fluor 488 negative controls (K) & (L).

III. Chemokine, cytokine and antimicrobial peptides expression after stimulation with *H. pylori*

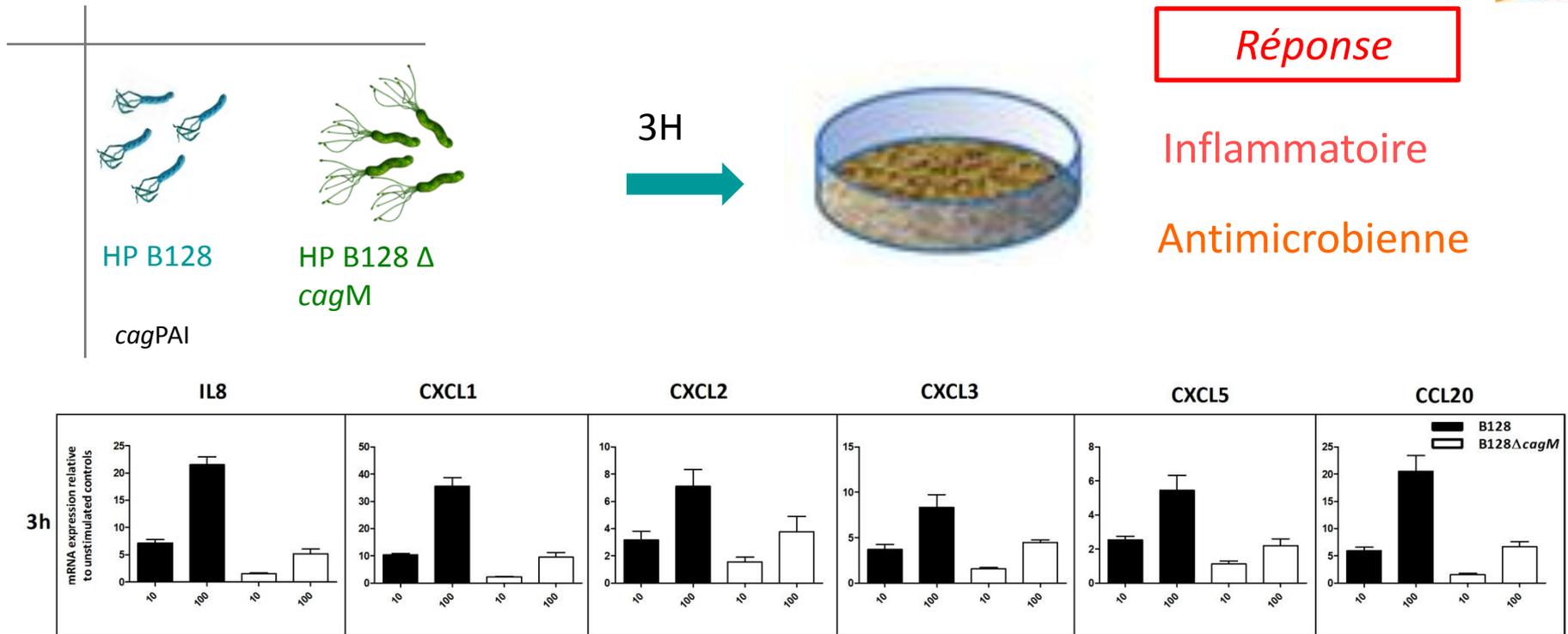


Figure 3. Chemokines gene expression by *H. pylori*-stimulated primary epithelial cells . Antral cells were cultured in the presence of *H. pylori* B128 or B128Δ*cagM* at MOI of 10 or 100 for 3h or 24h. QRT-PCR analysis was carried out on total RNA from 3 independent primary cultures. mRNA expression levels are normalized using housekeeping genes and expressed as the fold increase above unstimulated cultures.

perspectives du modèle

Appliquer le modèle à l'étude d'autres facteurs de virulence

Étudier la variabilité de la réponse inflammatoire selon les donneurs

collaborations



Formes coccoïdes



Transfert d'ADN chromosomique

Systèmes de sécrétion de type IV

Microbial Drug Resistance 2002
Infect Immun 2003
Microbiology 2005

36 *Helicobacter* 2006

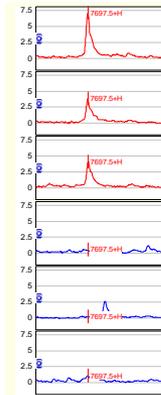
Tunis 16 mai 2012

Inflammation cancer

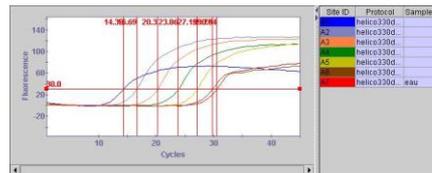


Virulence

FEMS Microbiol Letters 2002
Aliment Pharmacol Ther 2003
FEMS Microbiol Lett 2005
J Clin Microbiol 2008



SELDI



J Clin Microbiol 2002
Antimicrob. Agents Chemother 2005
Crit Care 2006
Proteomics 2009

Vin et Helicobacter



Diagnostic
Résistance

Helicobacter 2010
BMC Genomics 2010
Ann Clin Microbiol 2010
AAC 2011