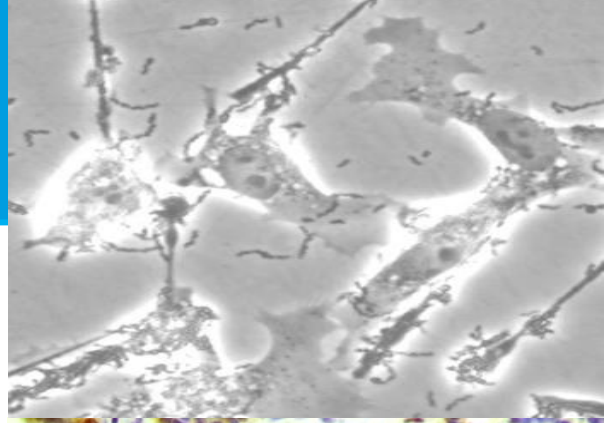
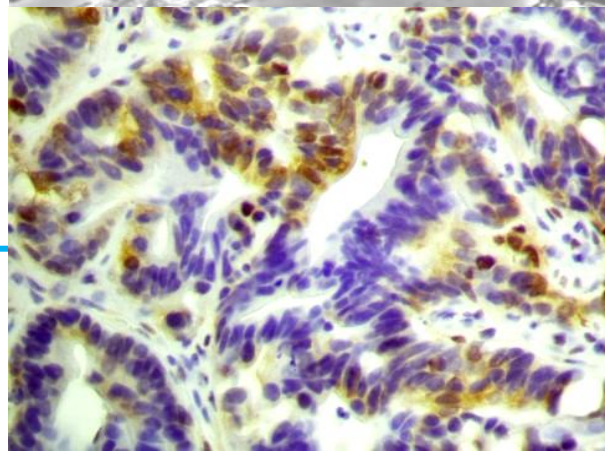
Cellules souches et cancer: le modèle Helicobacter





Prof. Christine Varon,
INSERM U1312 BoRdeaux Institute in Oncology,
Team 4 "Helicobacter-associated digestive cancers, cancer stem cells and therapeutic strategies"
Université de Bordeaux

christine.varon@u-bordeaux.fr

BaRITOn
Bordeaux Research In Translational Oncology

Inserm
Institut national de la santé et de la recherche médicale

université de BORDEAUX

Infection, Infammation & Cancer

?



Agence Internationale pour la Recherche sur le Cancer (2020):

- 18% des cancers attribuables à des infections
- >2 millions de nouveaux cas / an

Infection, Infammation & Cancer

Condition	Malignancy
Inflammatory bowel disease	Colorectal cancer
H. pylori infection	Gastric cancer
Chronic viral hepatitis	Hepatocellular carcinoma
Liver fluke infection	Cholangiocarcinoma
Schistosomiasis	Bladder cancer
Hashimoto's thyroiditis	Lymphoma/papillary cancer of the thyroid
Human papilloma virus	Cervical cancer
Pelvic inflammatory disease	Ovarian cancer
Esophagitis	Esophageal adenocarcinoma
Asbestosis	Mesothelioma
Cigarette smoking	Bronchial lung cancer



Agence Internationale pour la Recherche sur le Cancer (2020):

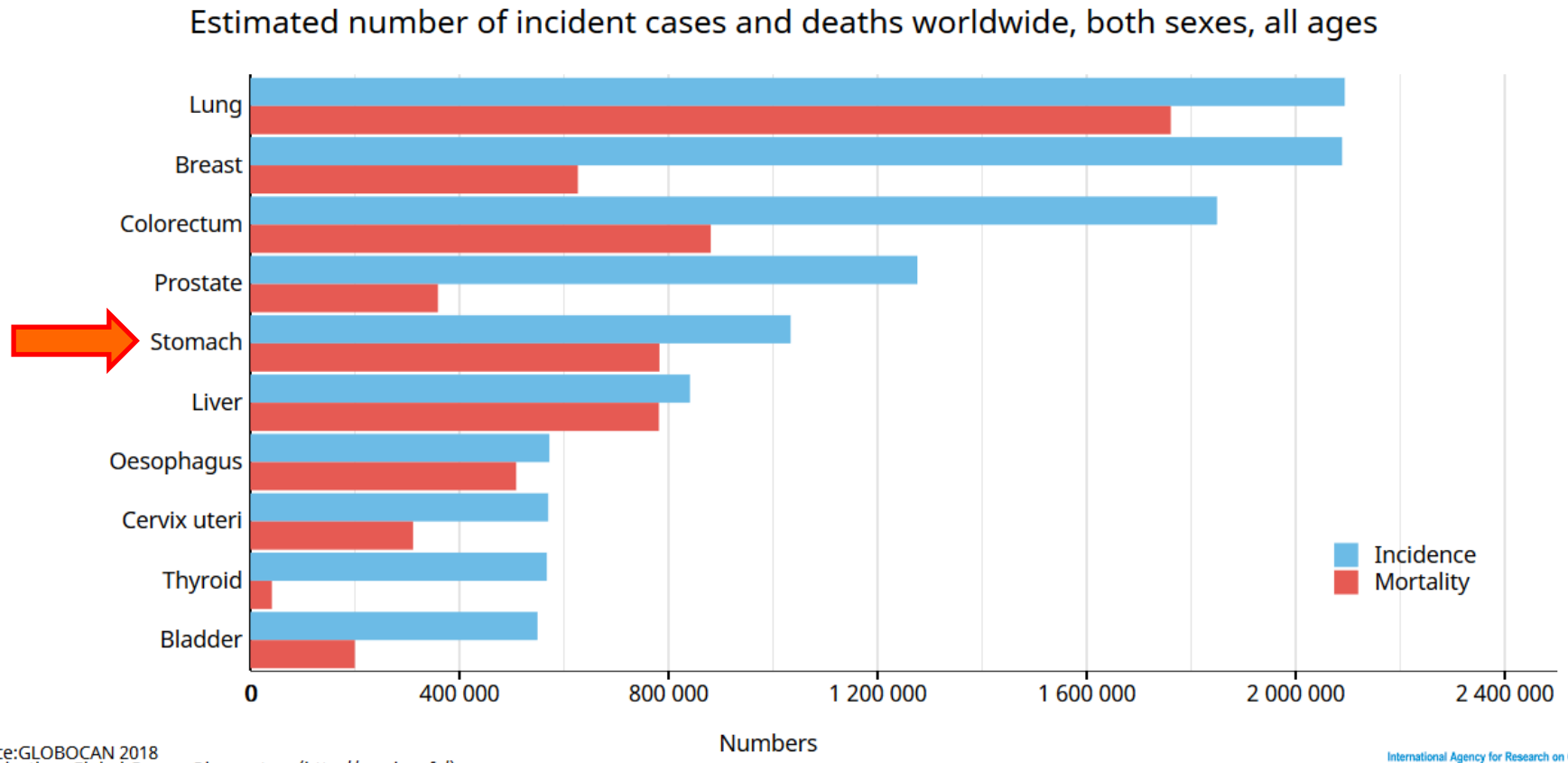
- 18% des cancers attribuables à des infections
- >2 millions de nouveaux cas / an
- en 1ère position: *H. pylori* et cancer gastrique = 5,5% des cas (devant HPV 5,2%, HBV et HCV 4,9%, EBV 1% etc…)

Cancer gastrique

International Agency for Research on Cancer
World Health Organization

Données épidémiologiques :

- 5e cause de mortalité par cancer dans le monde: > 600 000 morts / an



Data source:GLOBOCAN 2018
Graph production: Global Cancer Observatory (http://gco.iarc.fr/)
© International Agency for Research on Cancer 2018

International Agency for Research on Cancer
World Health Organization

Cancer gastrique

International Agency for Research on Cancer

World Health Organization

Données épidémiologiques :

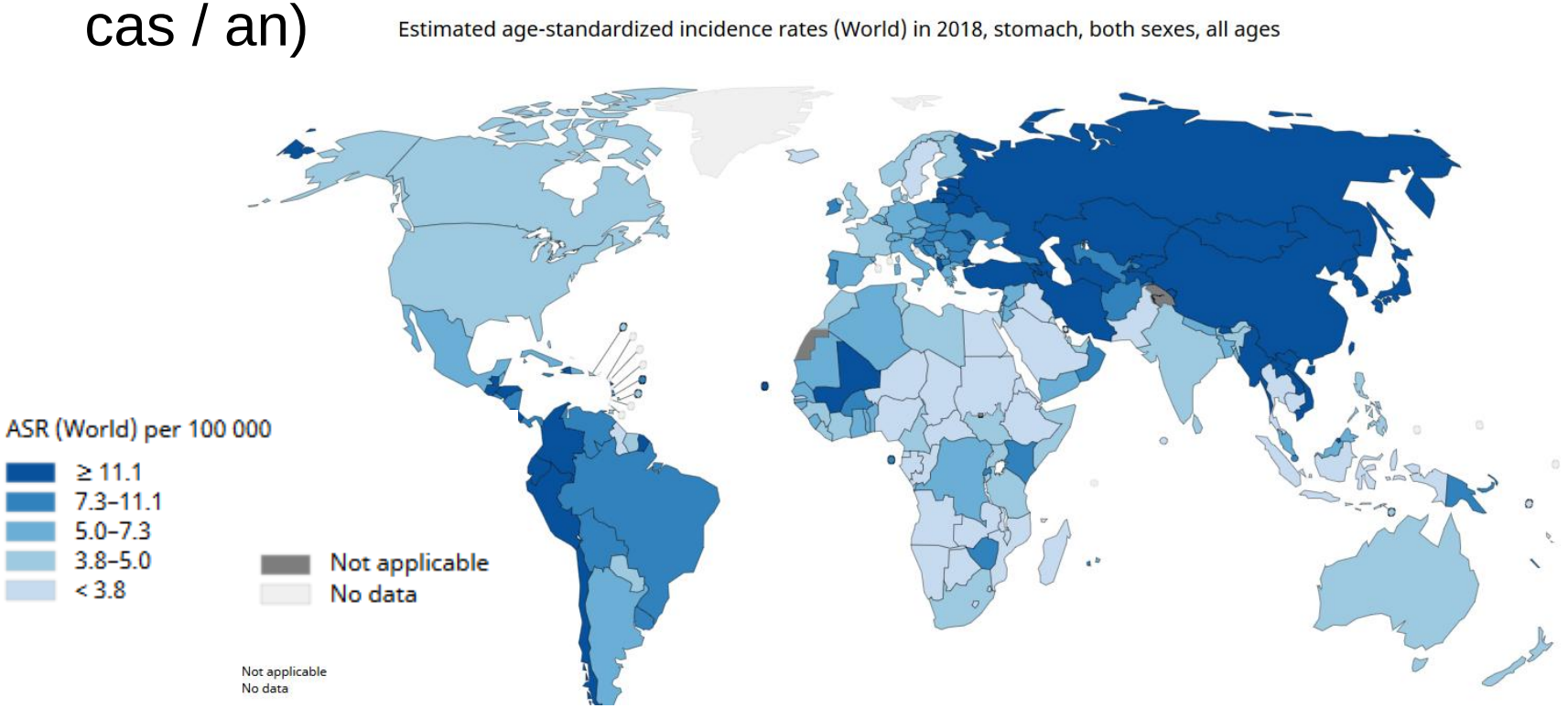
- 5e cause de mortalité par cancer dans le monde
- > 600 000 morts par an
- âge moyen : 70 ans

Gastric cancer

International Agency for Research on Cancer
World Health Organization

Données épidemiologiques :

- Rang / mortalité : 11e en France
- Rang / incidence en 2022: 16e en France (6000 nouveaux cas / an)



- **Principalement des adénocarcinomes gastriques, plus rarement des sarcomes (GIST) et des lymphomes B (MALT)**

Traitements

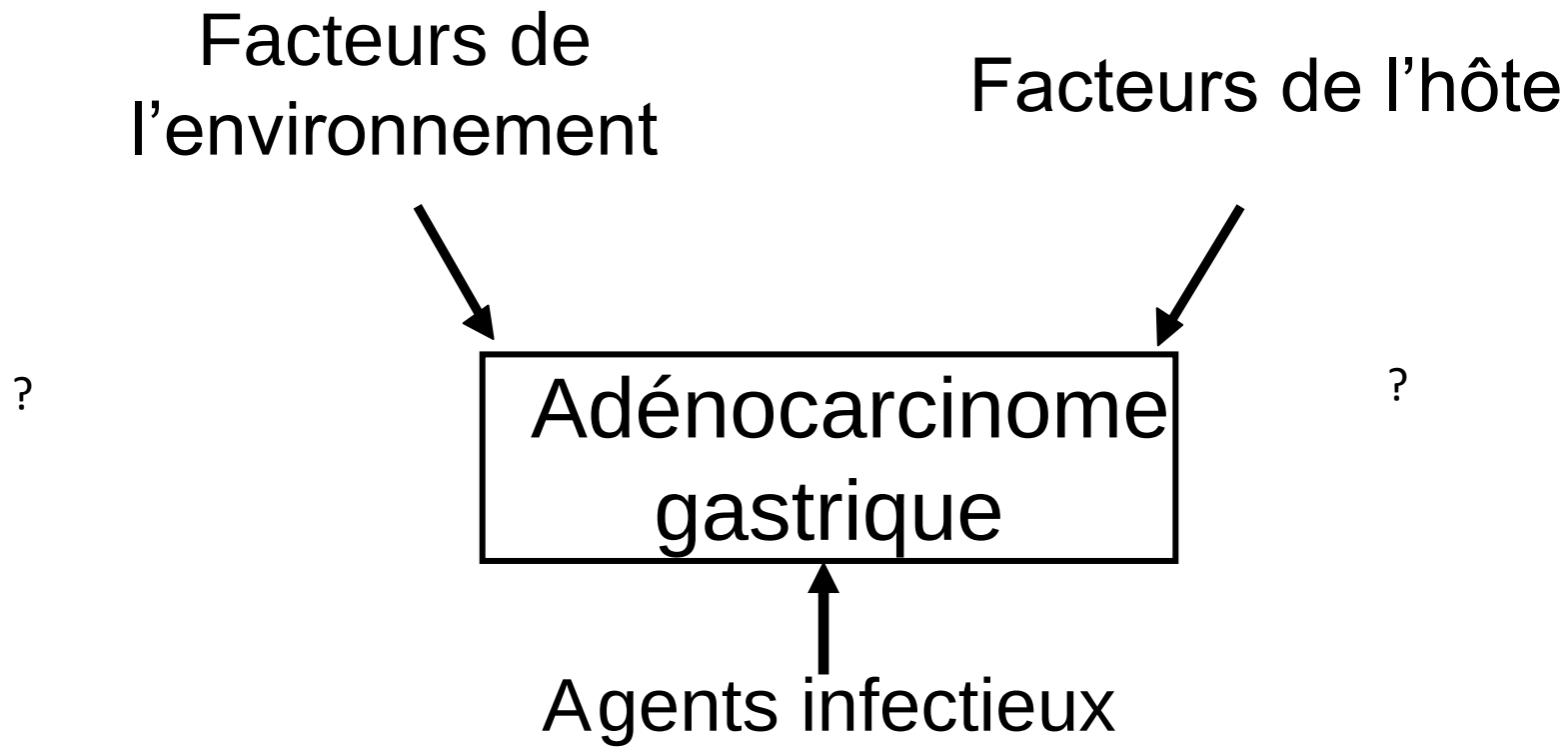
Un cancer de mauvais pronostic : taux de survie à 5 ans < 20%

Traitements:

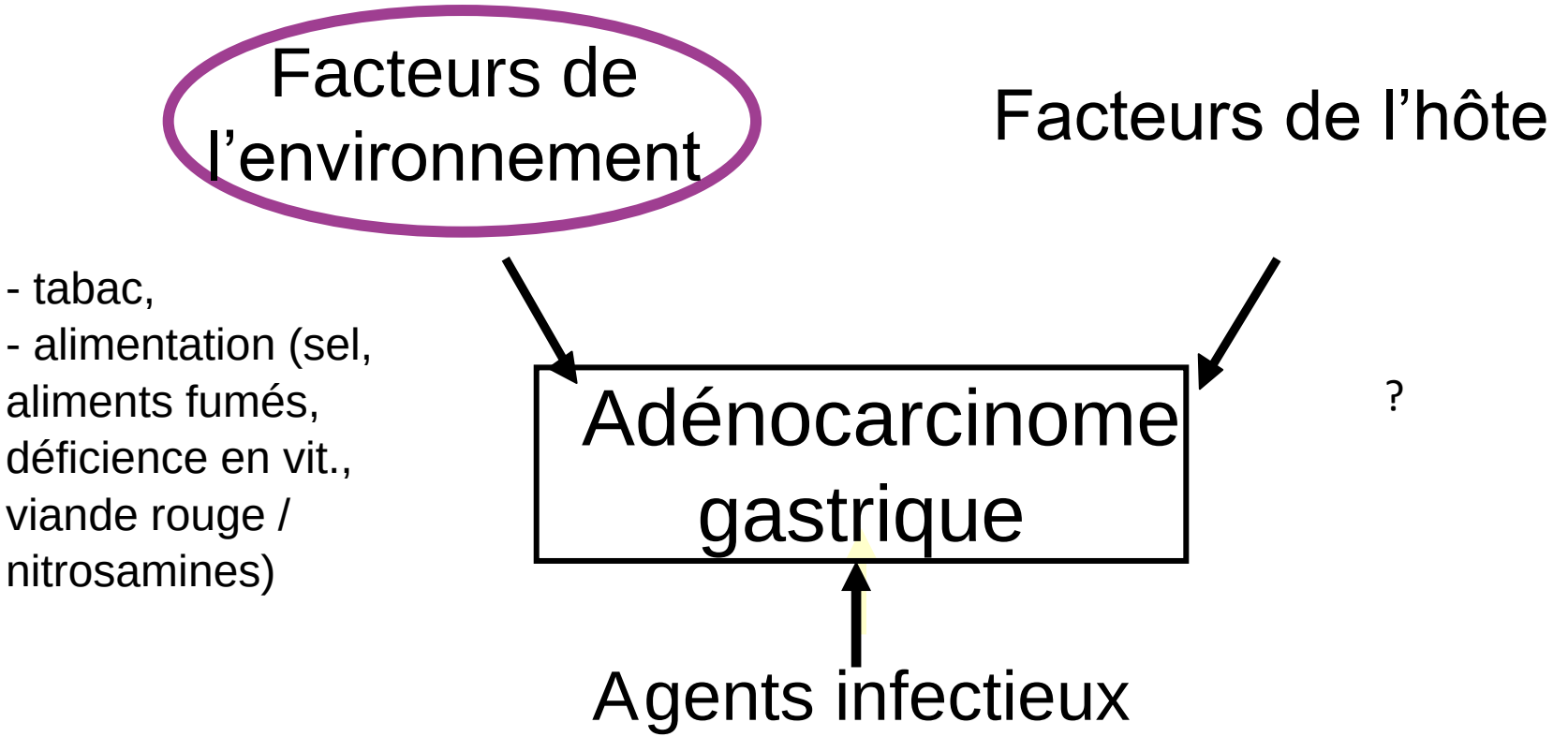
- ➔ Chirurgie (si pas de métastases)
- ➔ Chimiothérapies conventionnelle
- ➔ Radiothérapie
- ➔ Nouvelles immunothérapies (anti-PD1/PDL1)

- ➔ Pas de signature moléculaire spécifique: très peu de thérapies ciblées (pour les <10% des cas Her2+ : anti-Her2 mAb)

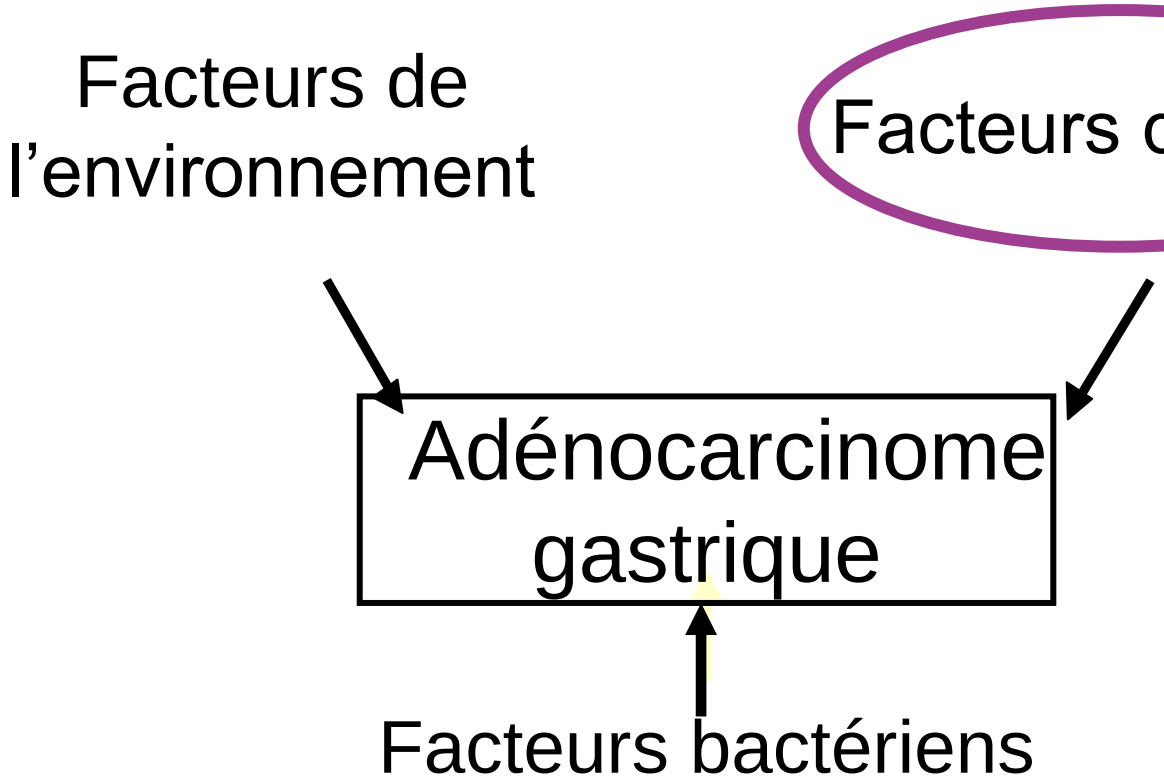
Facteurs associés à l'adénocarcinome gastrique



Facteurs associés à l'adénocarcinome gastrique



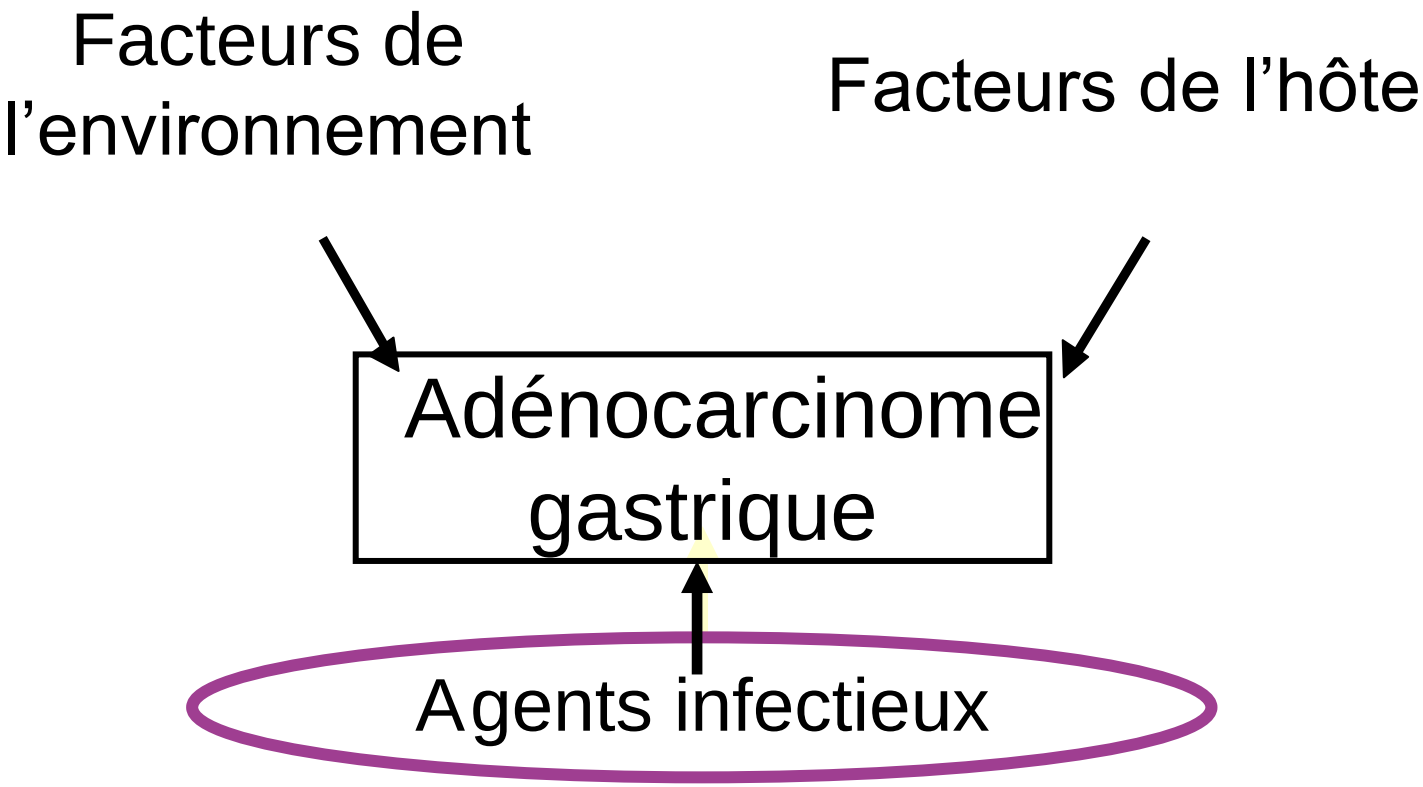
Facteurs associés à l'adénocarcinome gastrique



Susceptibilité génétique :

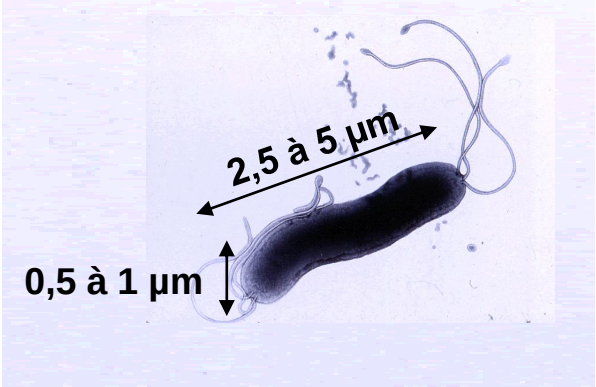
- Polymorphisme IL-1β, IL-1RN, TNFα-R, IL-8, IL-10
- Mutations *cdh*1

Facteurs associés à l'adénocarcinome gastrique



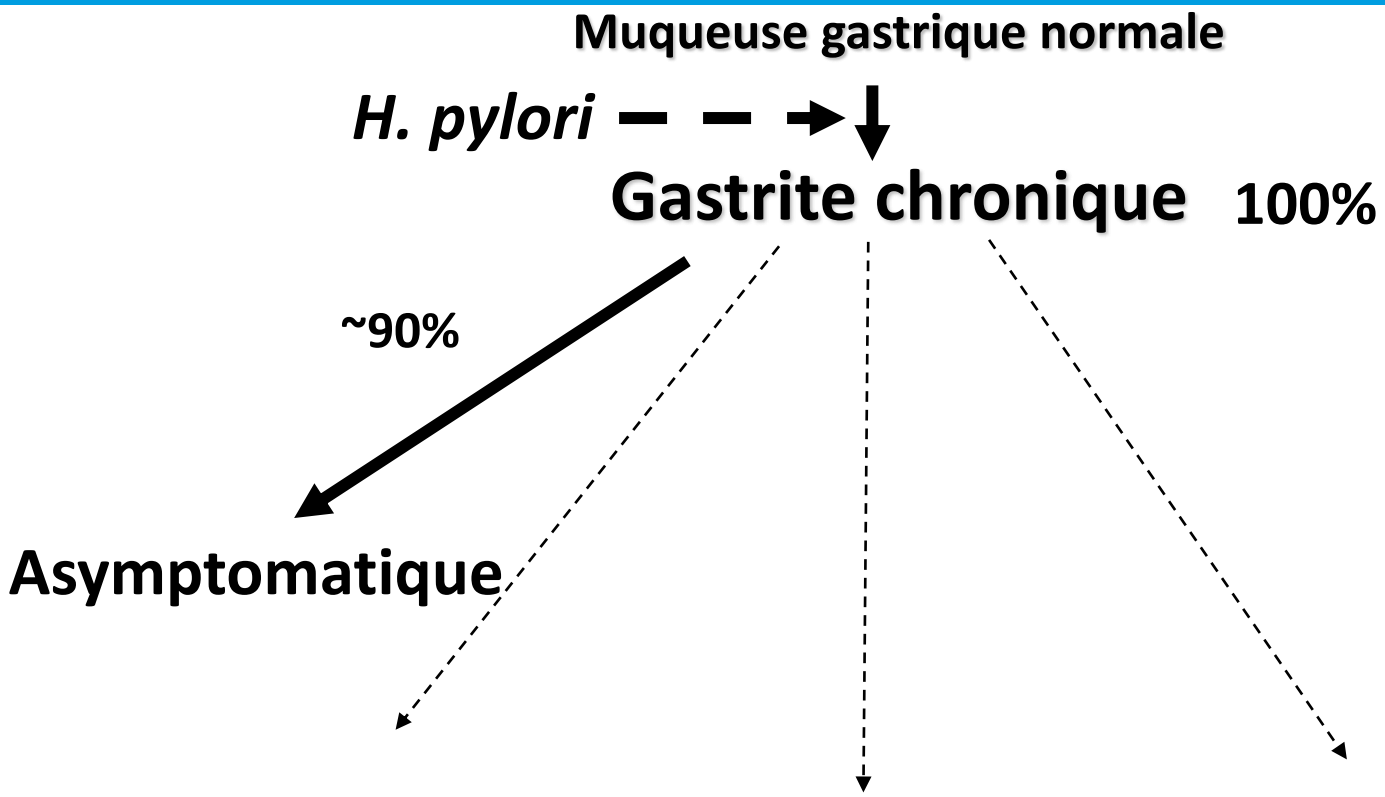
- Infection à *H. pylori* associée à >93% des adénocarcinomes gastriques hors-cardia (Gonzalez, Mégraud *et al.* Ann. Oncol. 2012)
- EBV <10% des cas

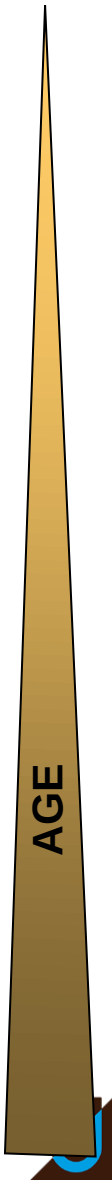
Helicobacter pylori



- **Isolée en 1982**
- **Bacille à Gram négatif de forme hélicoïdale et mobile**
- **Microaérophile**
- **Habitat : muqueuse gastrique de l'homme**
- **Uréase : survie au milieu acide de l'estomac**

Pathologies liées à l'infection par *H. pylori*





Pathologies liées à l'infection par *H. pylori*

Muqueuse gastrique normale

H. pylori → Gastrite chronique 100%

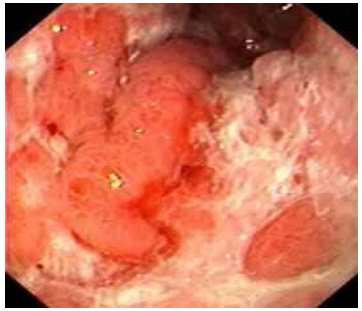
~90% → Asymptomatique

Ulcère duodénal



5 - 10%

Adénocarcinome gastrique



1%

Lymphome de type MALT



< 0.1%

AGE

1994 : Infection à *H. pylori* classée carcinogène de type I (niveau maximal) par le CIRC (agence de l'OMS)

2005:



The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2005

"for their discovery of the bacterium *Helicobacter pylori* and its role in gastritis and peptic ulcer disease"

Robin Warren



Barry J. Marshall

Adenocarcinomes gastriques distaux liés à *H. pylori*

Gonzalez *et al*. Ann. Oncol. 2012 : > 93% associated to *H. pylori* infection

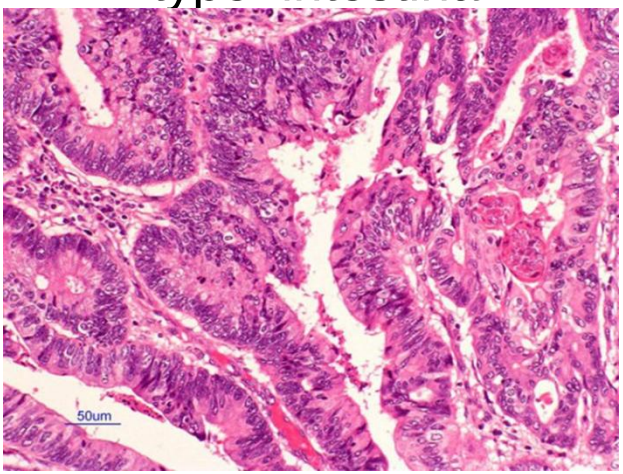
Inflammation chronique

Atrophie

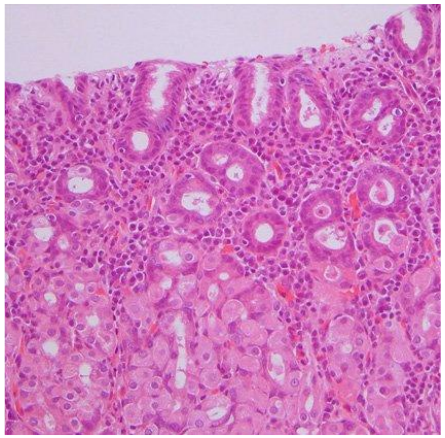
Métaplasie intestinale

Dysplasie

Adénocarcinome de type intestinal

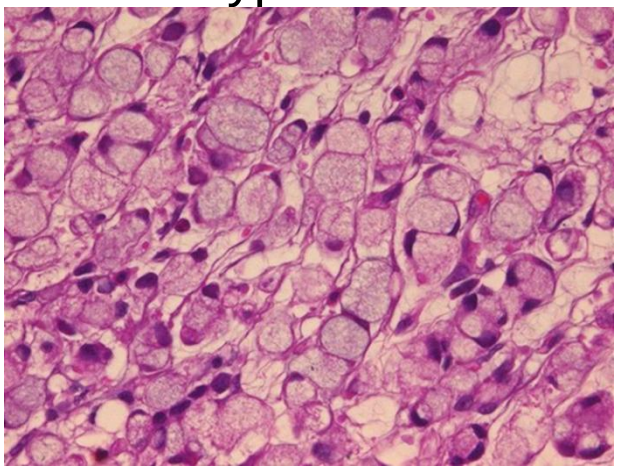


- **Structures glandulaires anormales**
- **Atypies cellulaires, +/- bien différencié**



Photos: Japanese Society of Pathology

Adenocarcinome de type diffus



- **Peu cohésif**
- **Cellules en bague à chaton**
- **Mutations de la E-cadhérine**

Les critères de Bradford Hill

- ➔**Force et consistance de l'association**
- ➔**Relation temporelle**
- ➔**Mécanismes physiopathologiques**
- ➔**Effet d'une intervention**

Association et relation temporelle

- **Études épidémiologiques et cas-témoins :**

  6 X plus de risque de développer un adénocarcinome distal si infection par *H. pylori*

- **Suivi de cohorte : détection d'anticorps avant le développement d'un cancer**
  → l'infection précède le cancer

Mécanisme physiopathologique

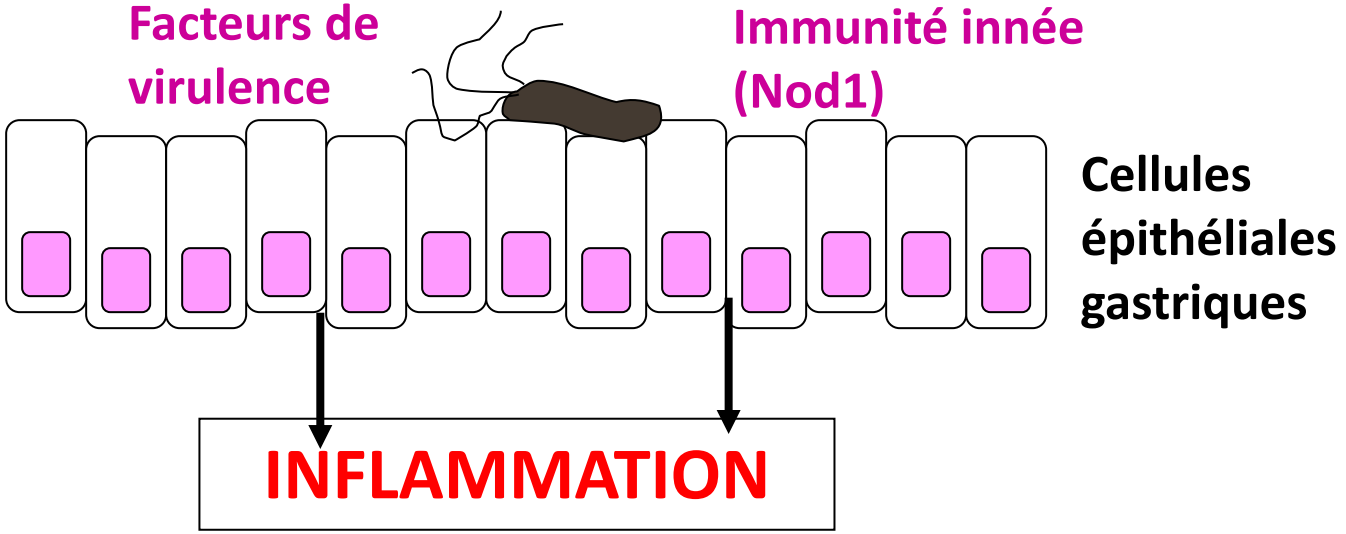
Muqueuse gastrique normale

↓

Gastrite superficielle

↓

Gastrite chronique 100%



- **Cytokines pro-inflammatoires : IL-8 ; IL-6 et TNF-α (Th1 +)**

- **Attraction et activation des PNN et MΦ : ↑radicaux libres → lésions**

Effet d'une éradication thérapeutique

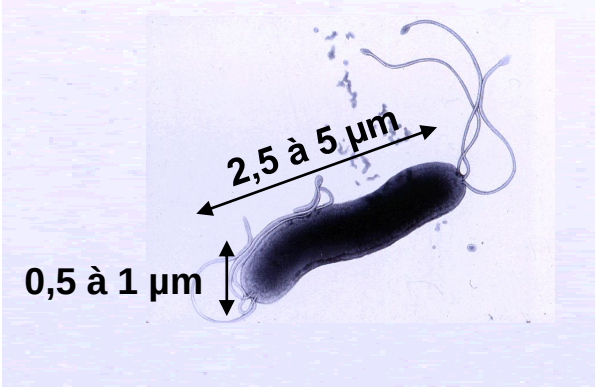
→ Adénocarcinome gastrique :

- **Étude taiwanaise : ↓métaplasie intestinale** (Lee *et al.*, Gut, 2013;62:676-682)
- **Étude chinoise :**
  - **Éradication de *H. pylori* ↓le nombre de cancers chez des patients présentant des lésions pré-cancéreuses (Wong *et al.*, JAMA, 2004;291(2):187-94)**
  - **Etude en cours de suivi sur 20 ans sur 120 000 personnes en Chine**

→ Lymphome de type MALT

- **Régression du lymphome chez 70 à 80% des patients traités pour *H. pylori***
- **1er cancer traité par antibiothérapie !**

Facteurs de pathogénicité de *H. pylori* associés à l'adénocarcinome gastrique



- îlot de pathogénicité cag (cagPAI): SST4
- oncoprotéine CagA : cytotoxine codée par le SST4
- Adhésines et protéines de membrane externe
- Toxines: VacA
- Origine ancestrale (géographique) de la bactérie

Les adhésines

- **Adhérence de *H. pylori* aux cellules épithéliales**
- **Principales adhésines : BabA, SabA,**
  - **Liaison aux antigènes de Lewis présents à la surface des cellules épithéliales**
  - **2 allèles pour *bab*A**

    → *bab*A2 associée à l'adénocarcinome gastrique

- **Autres protéines de membrane externe associées à l'adénoK gastrique: HomB, OipA**

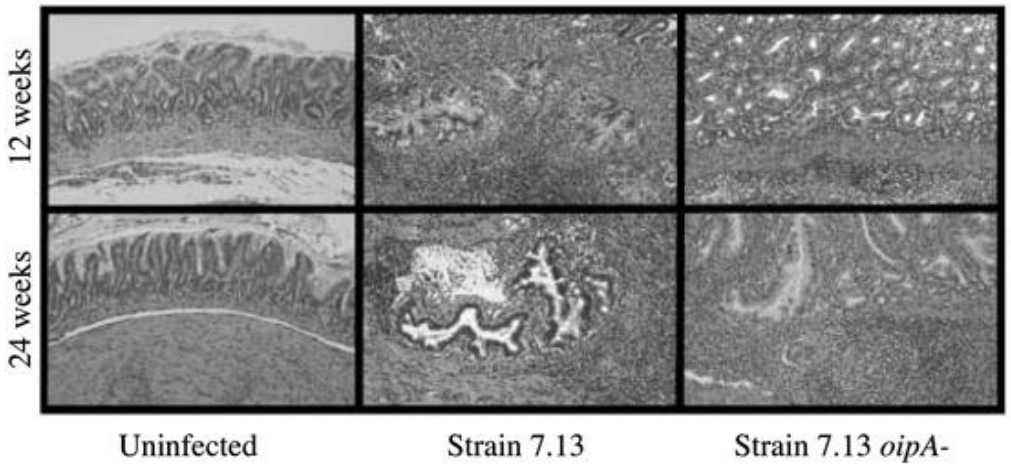
Implication de la protéine de membrane externe OipA dans la carcinogénèse gastrique

➔ **Mutants déficients pour OipA :**

➔ **Décrire les résultats observés**

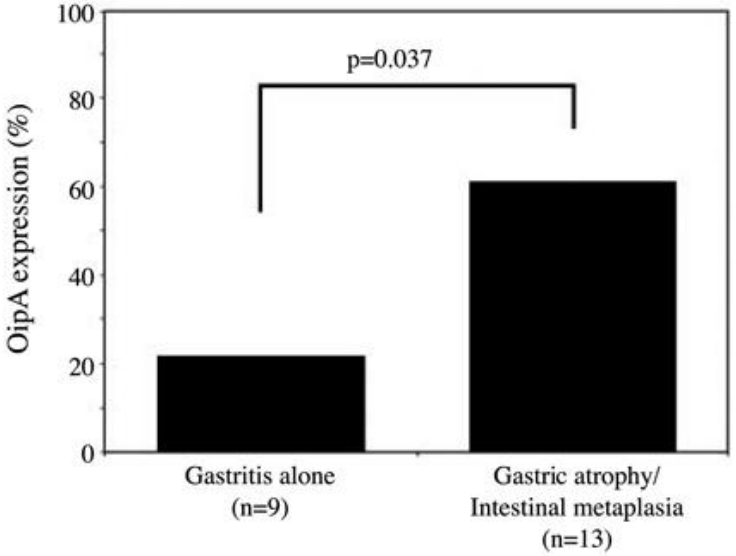
➔ **En déduire l'effet de OipA sur la carcinogenèse gastrique**

Modèle murin d'infection par *H. pylori*:



D'après Franco *et al*, Gastroenterology 2005

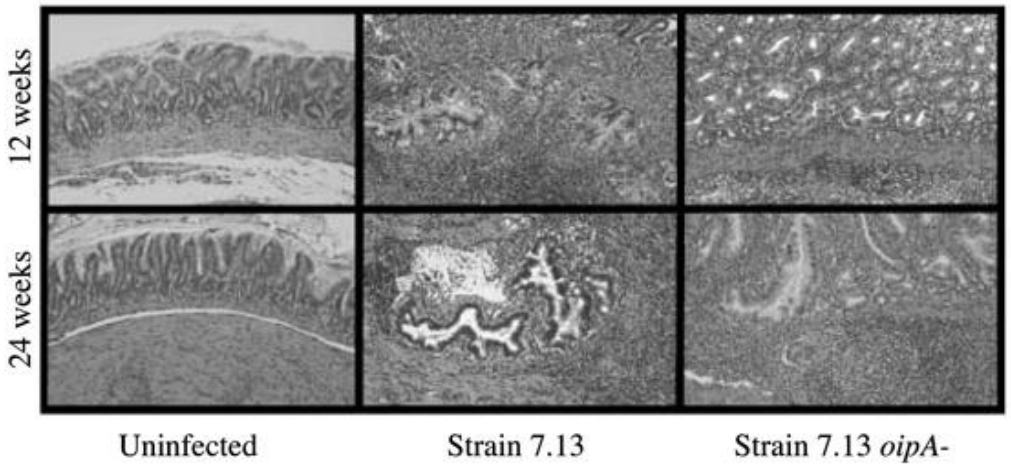
% de patients positifs pour OipA classés par type de lésions gastriques:



Implication de la protéine de membrane externe OipA dans la carcinogénèse gastrique

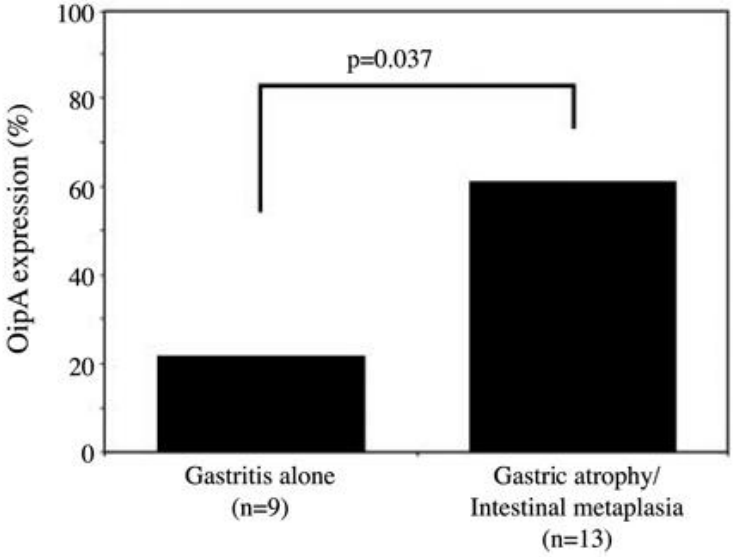
- **Mutants déficients pour OipA :**
  - **Atténuation de l'évolution vers l'adénocarcinome**
  - **Développement de lésions moins sévères**
  - **Expression de OipA plus élevée chez les patients présentant des lésions prénoplasiques que les patients avec gastrite seule**
  - **OipA contribue à la carcinogenèse gastrique**

Modèle murin d'infection par *H. pylori*:



D'après Franco *et al*, Gastroenterology 2005

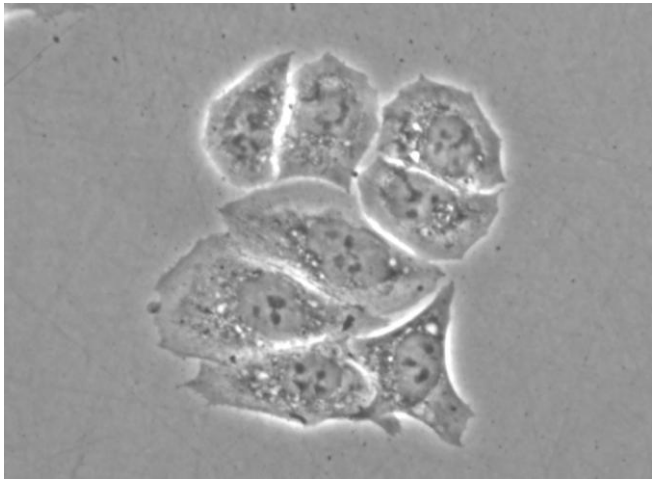
% de patients positifs pour OipA classés par type de lésions gastriques:



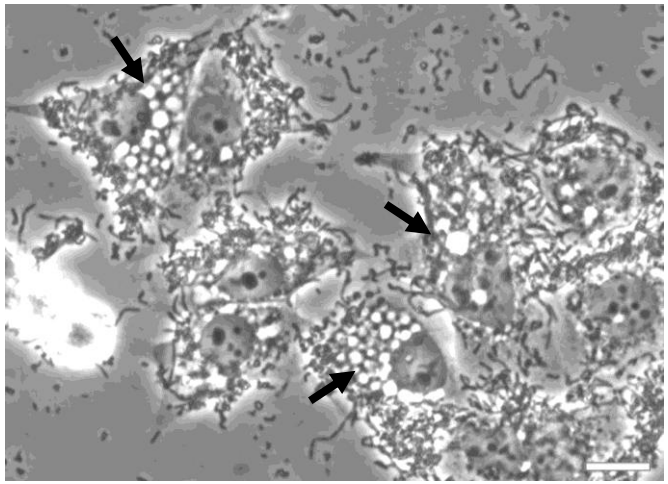
La cytotoxine vacuolisante VacA

- → **Protéine de 88kDa**
- → **Gène présent chez toutes les souches**
- → **Coculture de 24h de cellules épithéliales gastriques avec différentes souches de *H. pylori:***

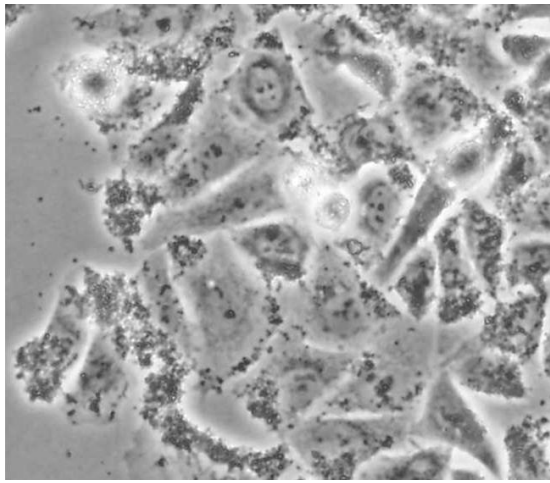
Témoin



***+ H. pylori* x?**



***+ H. pylori* y?**



→ **Décrire les résultats observés**

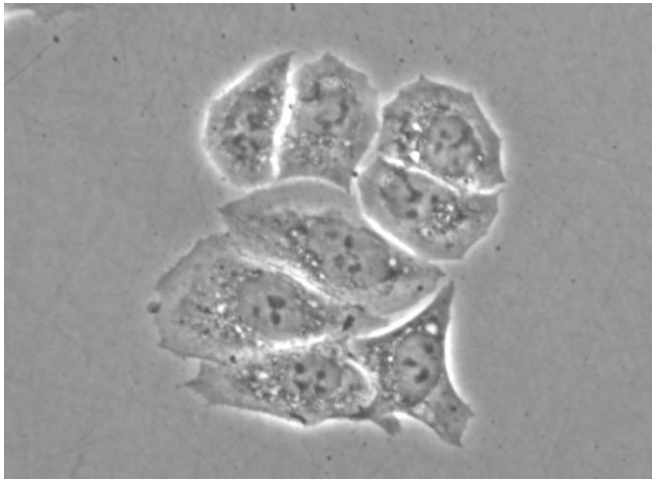
→ **En déduire le genotype des souches pour l'ilot de pathogénicité *cag*PAI, CagA,**

D'après Varon *et al*, Methods in Molecular Biology 2009

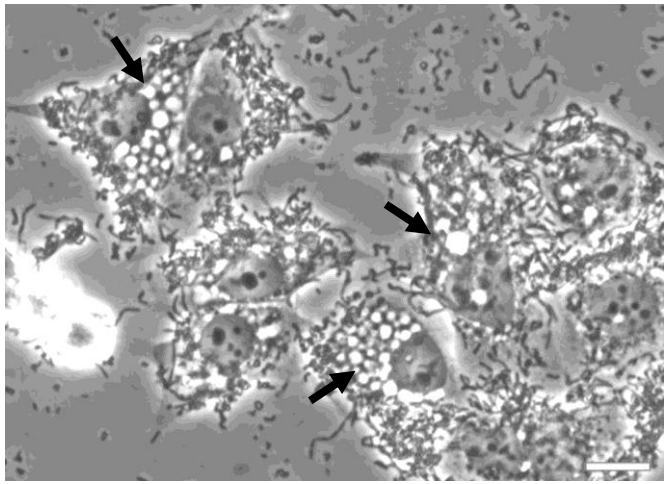
La cytotoxine vacuolisante VacA

- Protéine de 88kDa
- Gène présent chez toutes les souches
- Coculture de 24h de cellules épithéliales gastriques avec différentes souches de *H. pylori:*

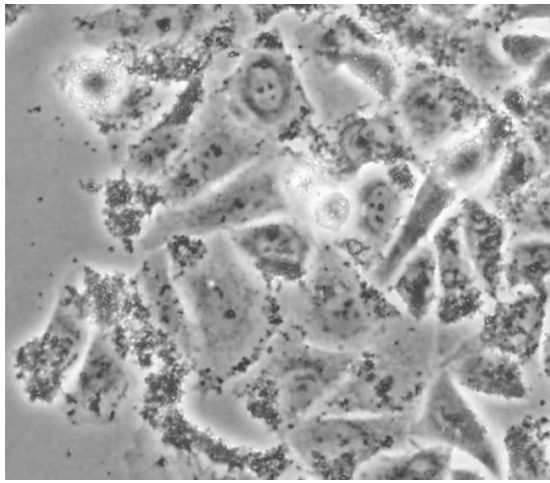
Témoin



+ *H. pylori* VacA s1m1 (activité forte)



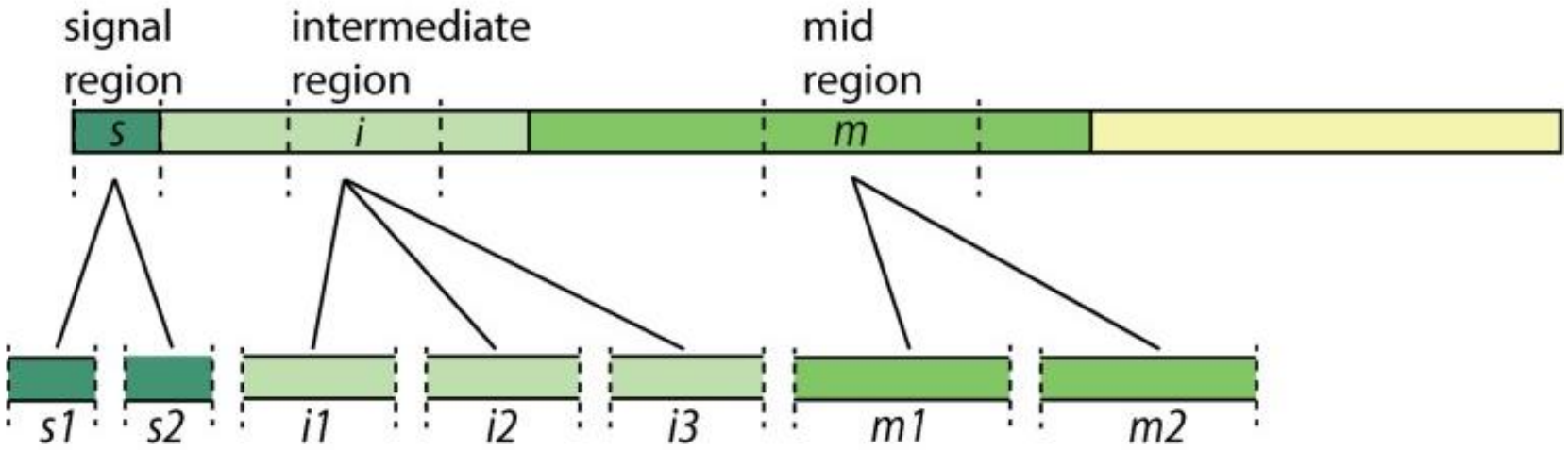
+ *H. pylori* VacA s1m2 (activité faible)



- Activité vacuolisante chez ~40% des souches
- Action sur la mitochondrie, autophagie

D'après Varon *et al*, Methods in Molecular Biology 2009

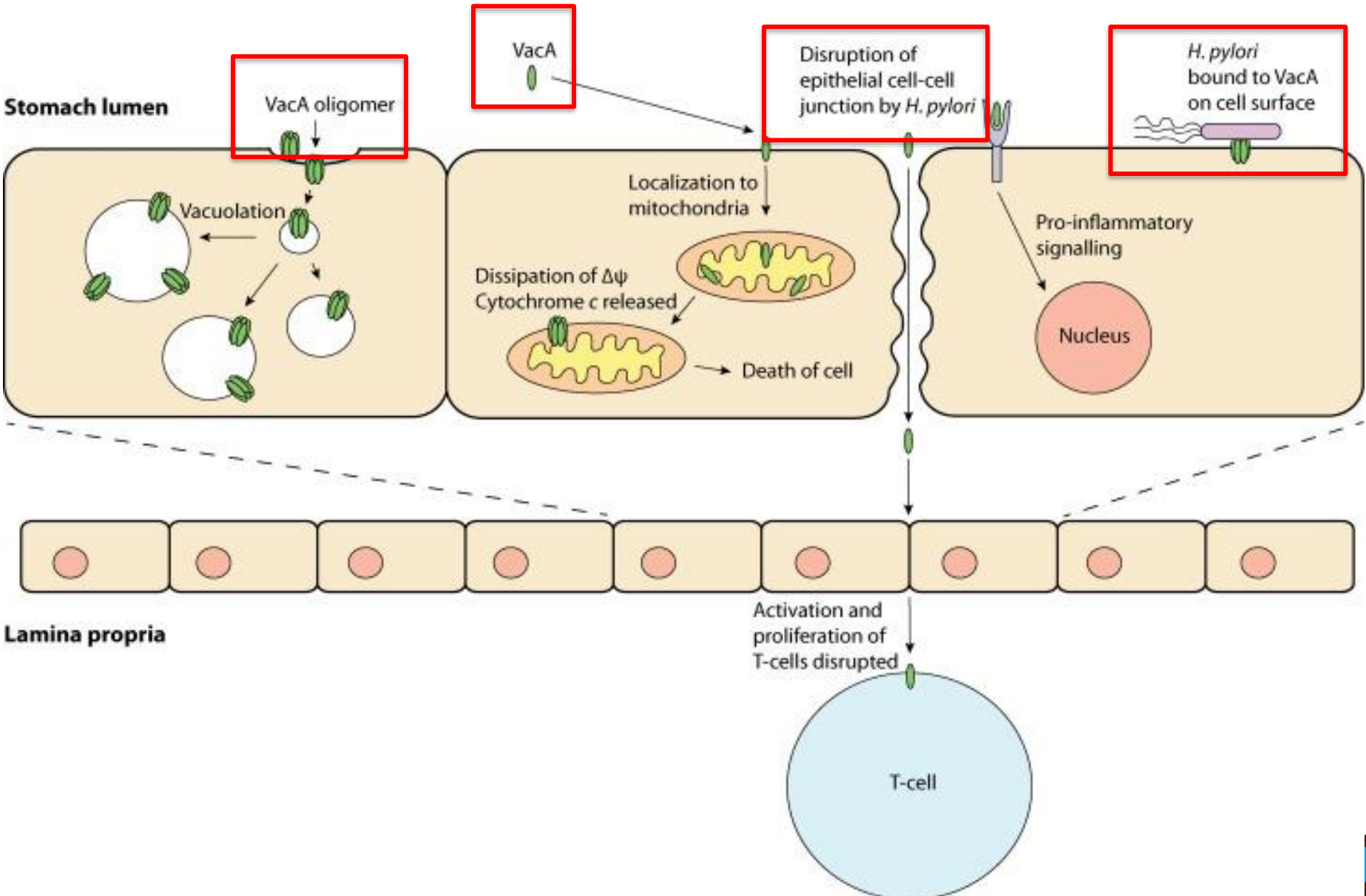
Structure du gène *vacA*



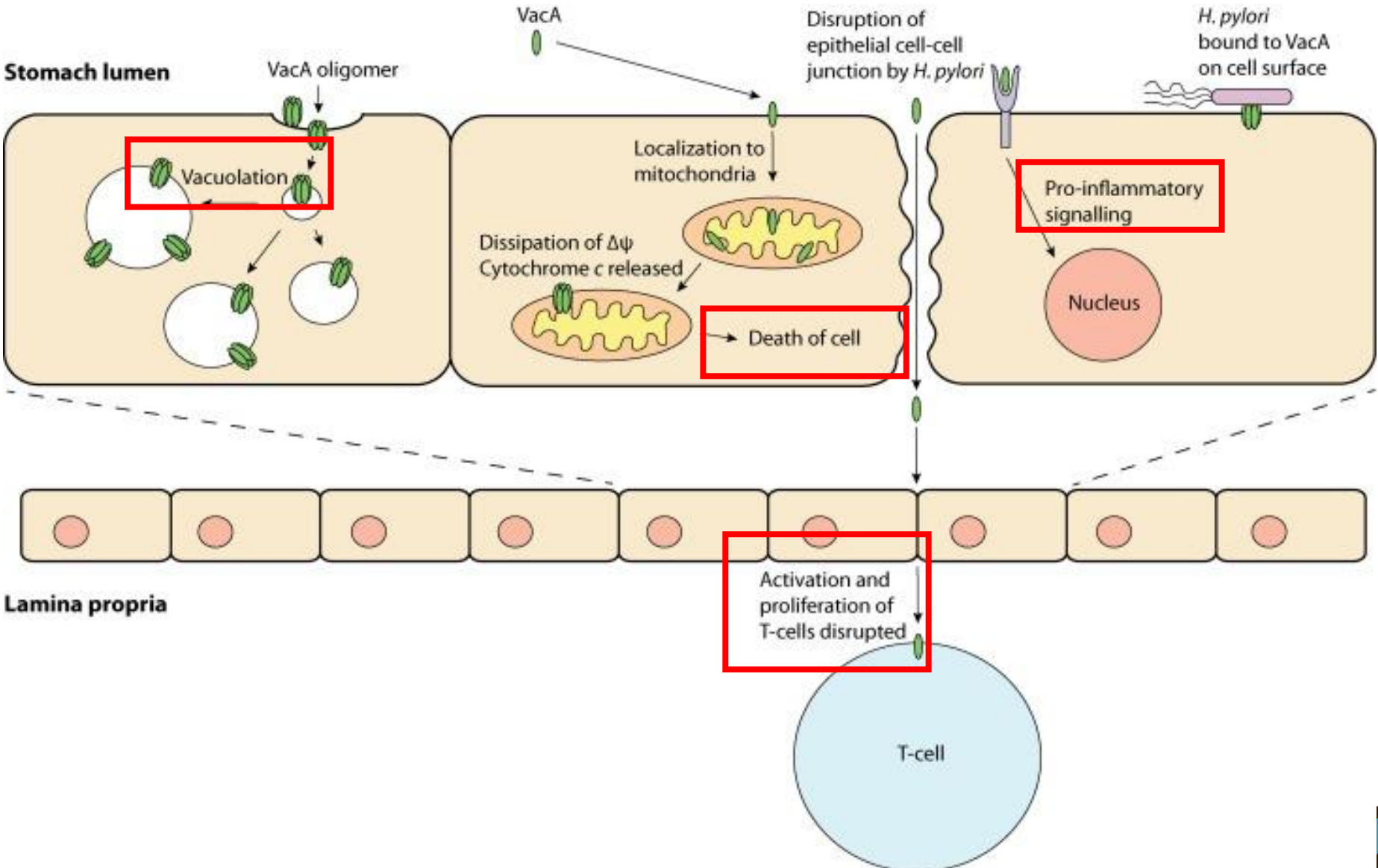
(D'après Palframan, 2012)

- ***s1*** **: séquence signal pour la sécrétion de la toxine (pas de sécrétion avec s2)**
- ***m1*** **: toxicité élevée de la toxine**
- ***i1*** **associée à *s1m1*, *i2* à *s2m2***

Actions de VacA sur la cellule

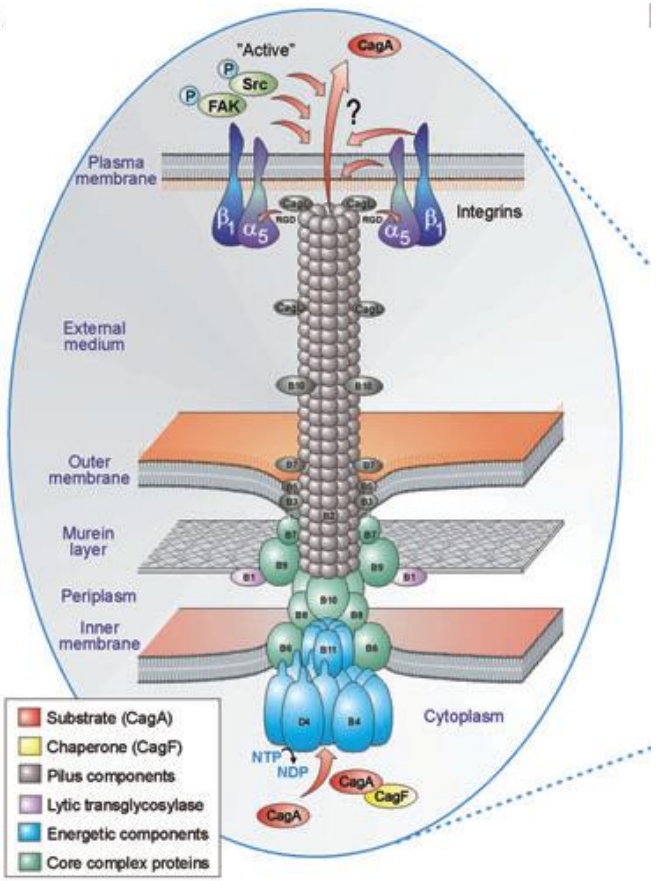


Actions de VacA sur la cellule



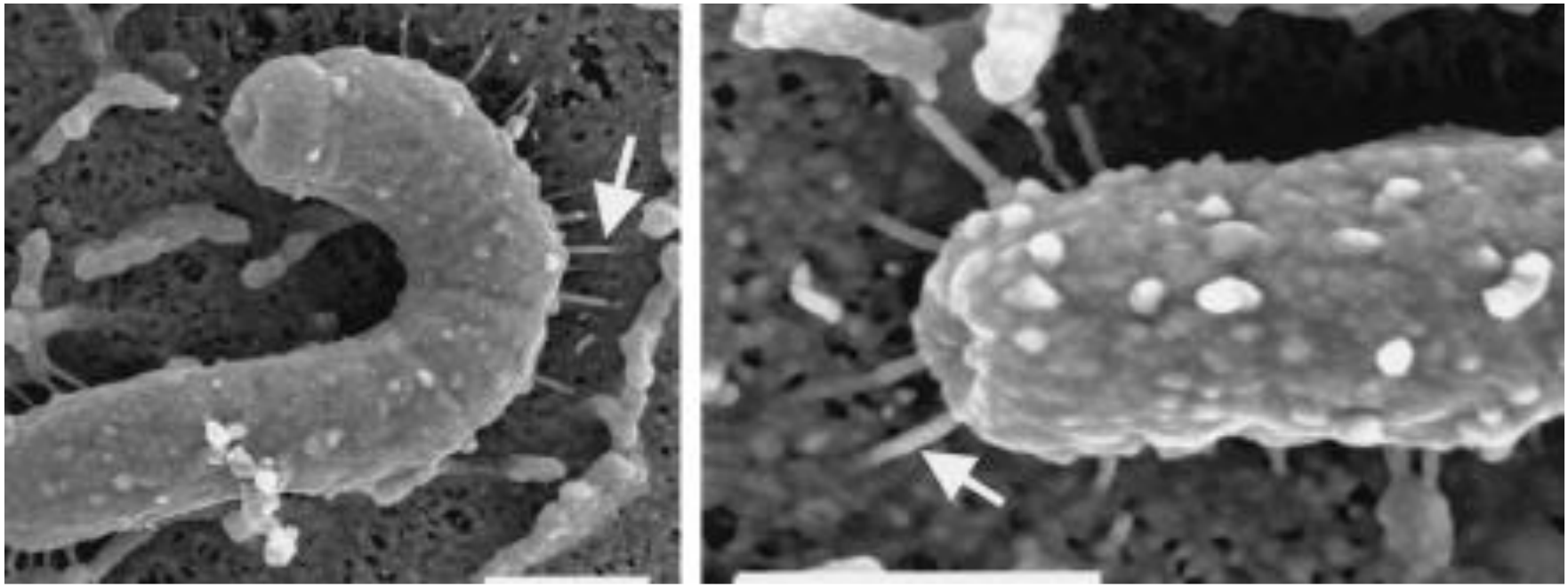
L'îlot de pathogénicité *cag* : *cag*PAI

- 30 gènes (~40 kb, %GC différent: transfert, source inconnue)
  - Système de sécrétion de type 4
  - *cag*A
- 90% des souches d'Extrême-Orient sont *cag*PAI+



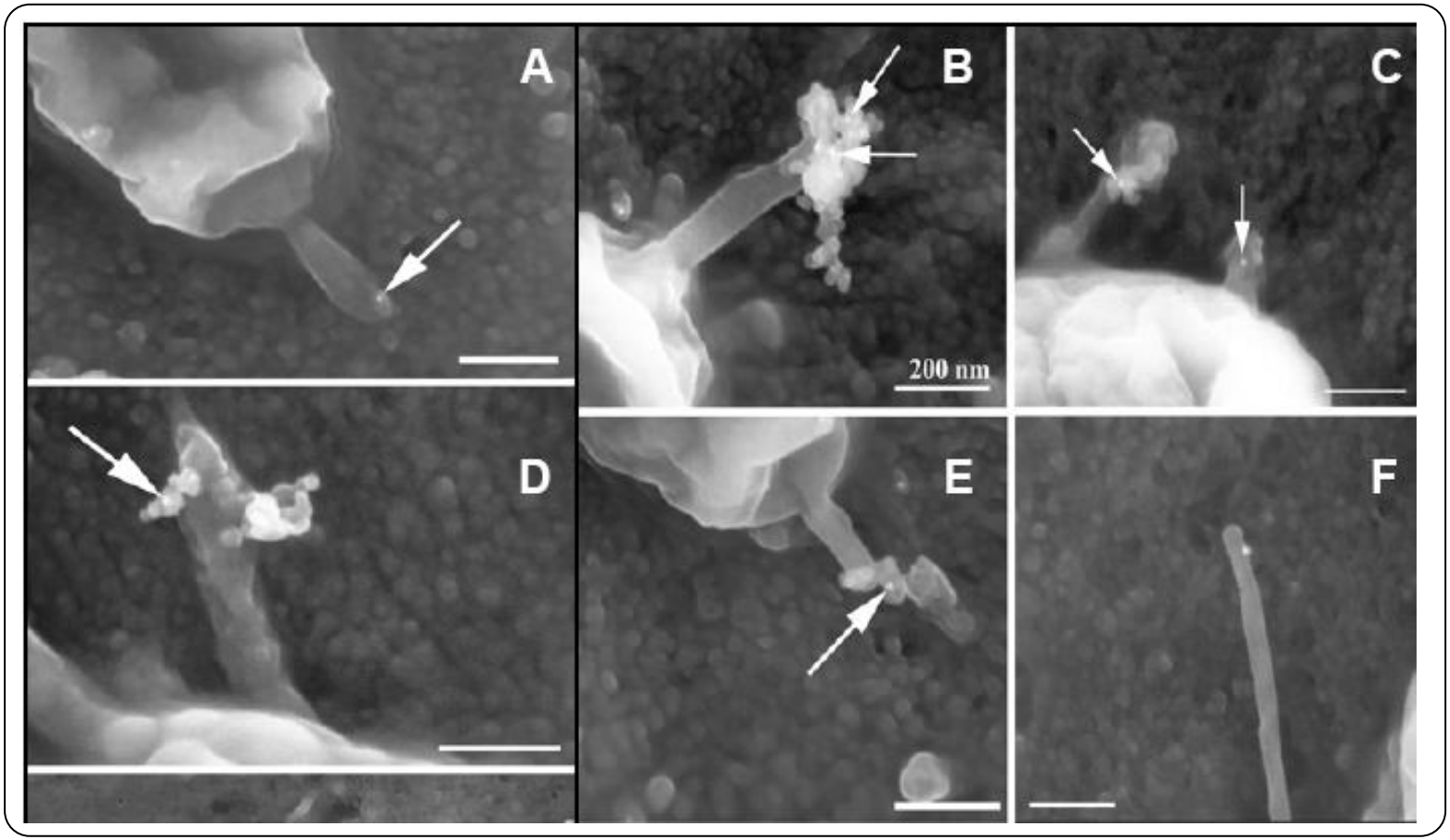
Backert *et al*. Cell. Microbiol. 2008

Visualisation du pilus formé par *cag*PAI



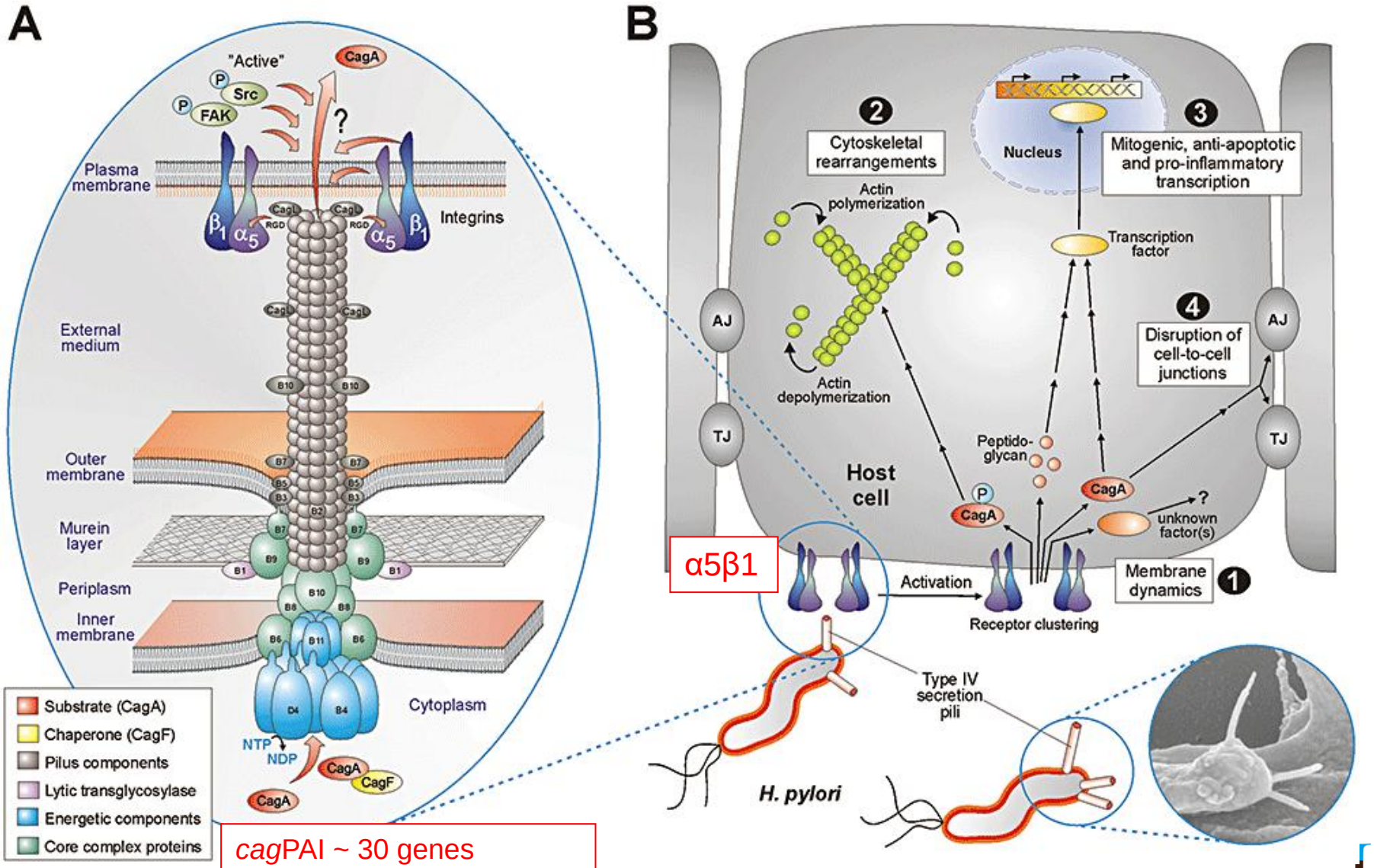
Rhode *et al*., 2003 *Mol. Microbiol*

CagA est délivré à l'extrémité du pilus



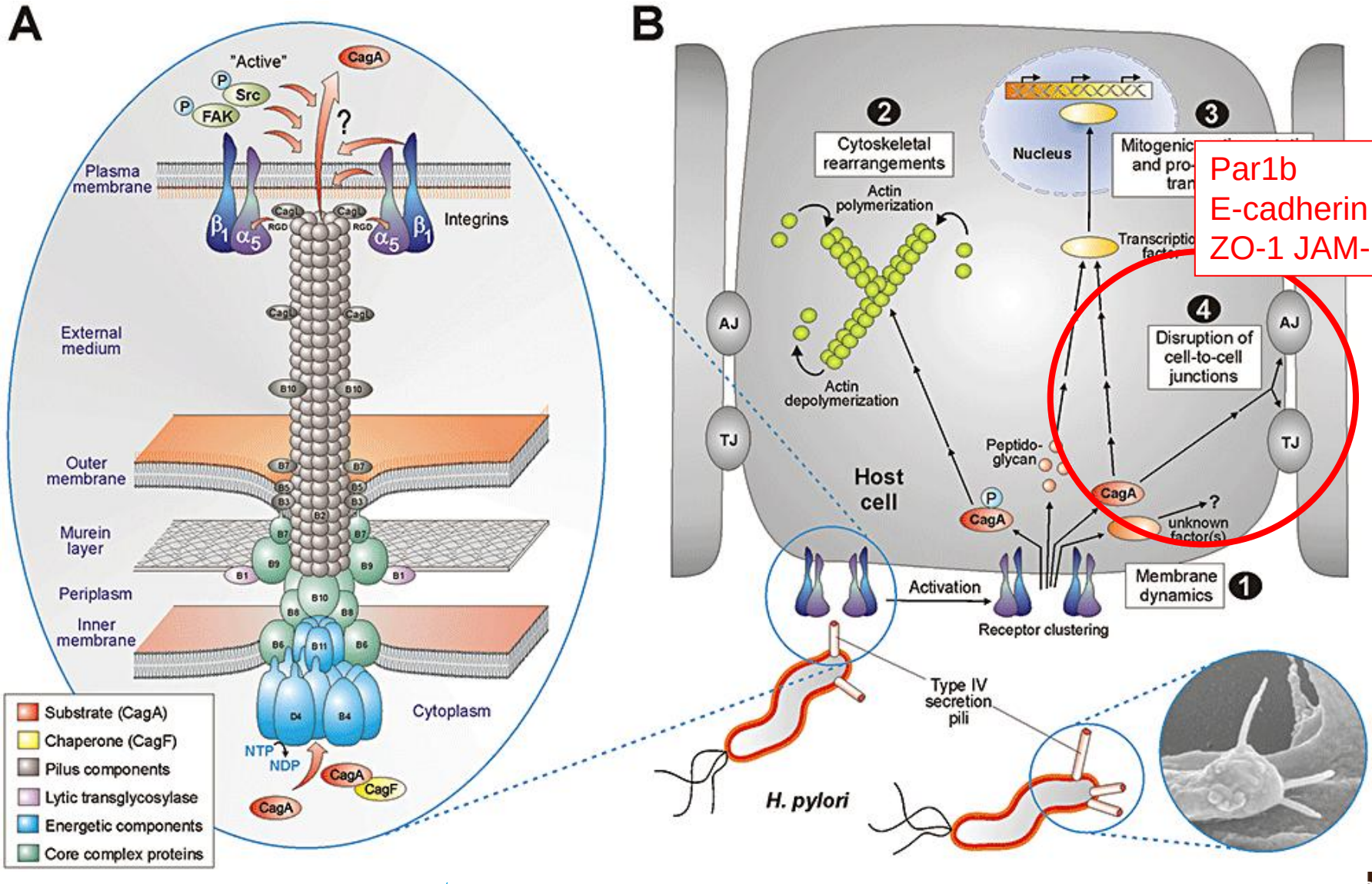
Prof. Rainer Haas (Max Von Pettenkofer Institute, Munich) Luisa Jimenez-Soto

Récepteur du SST4: intégrine α5β1



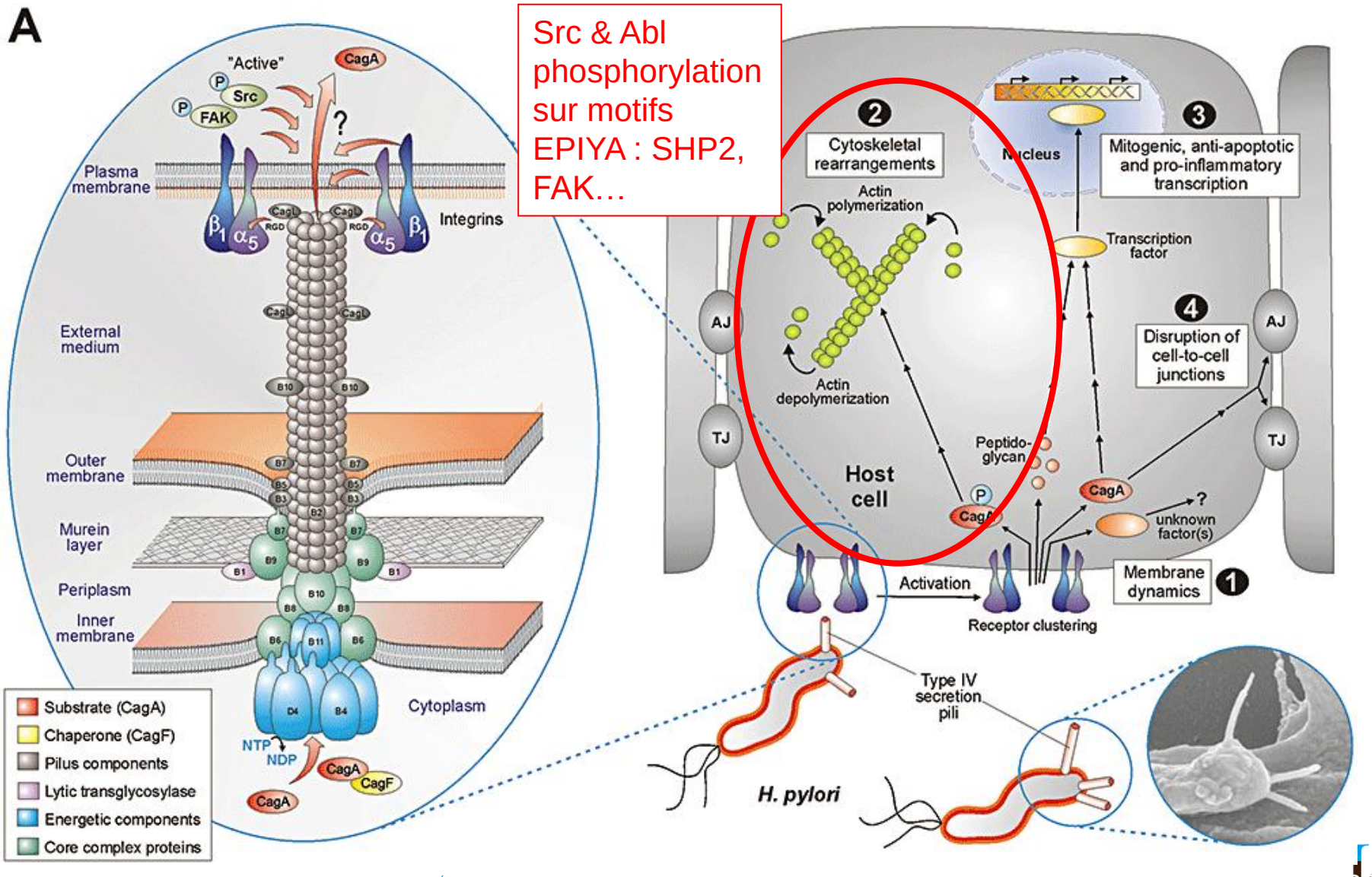
*cag*PAI ~ 30 genes
encoding a T4SS & CagA

Effet de CagA sur la cellule hote

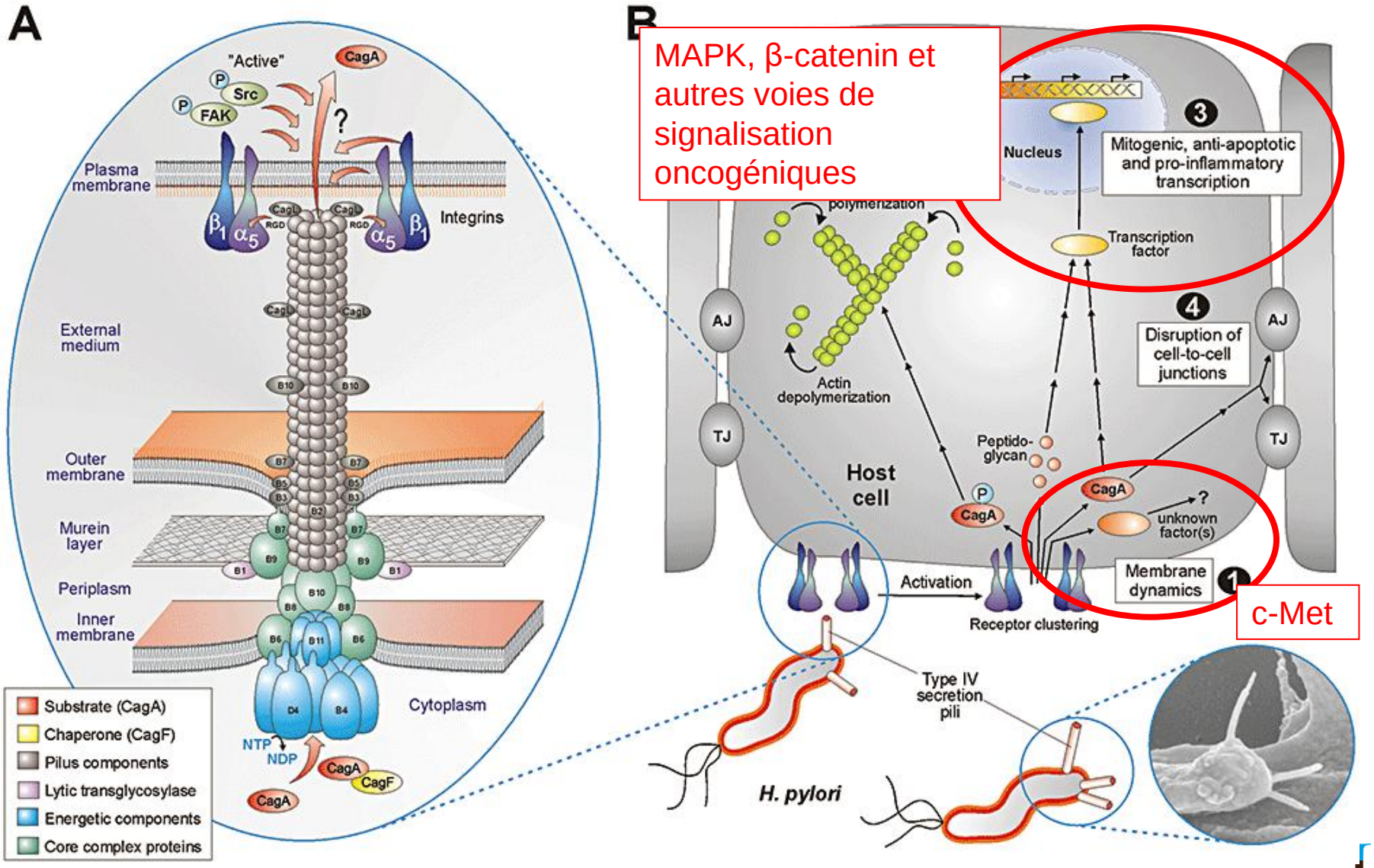


Effet de CagA sur la cellule hote

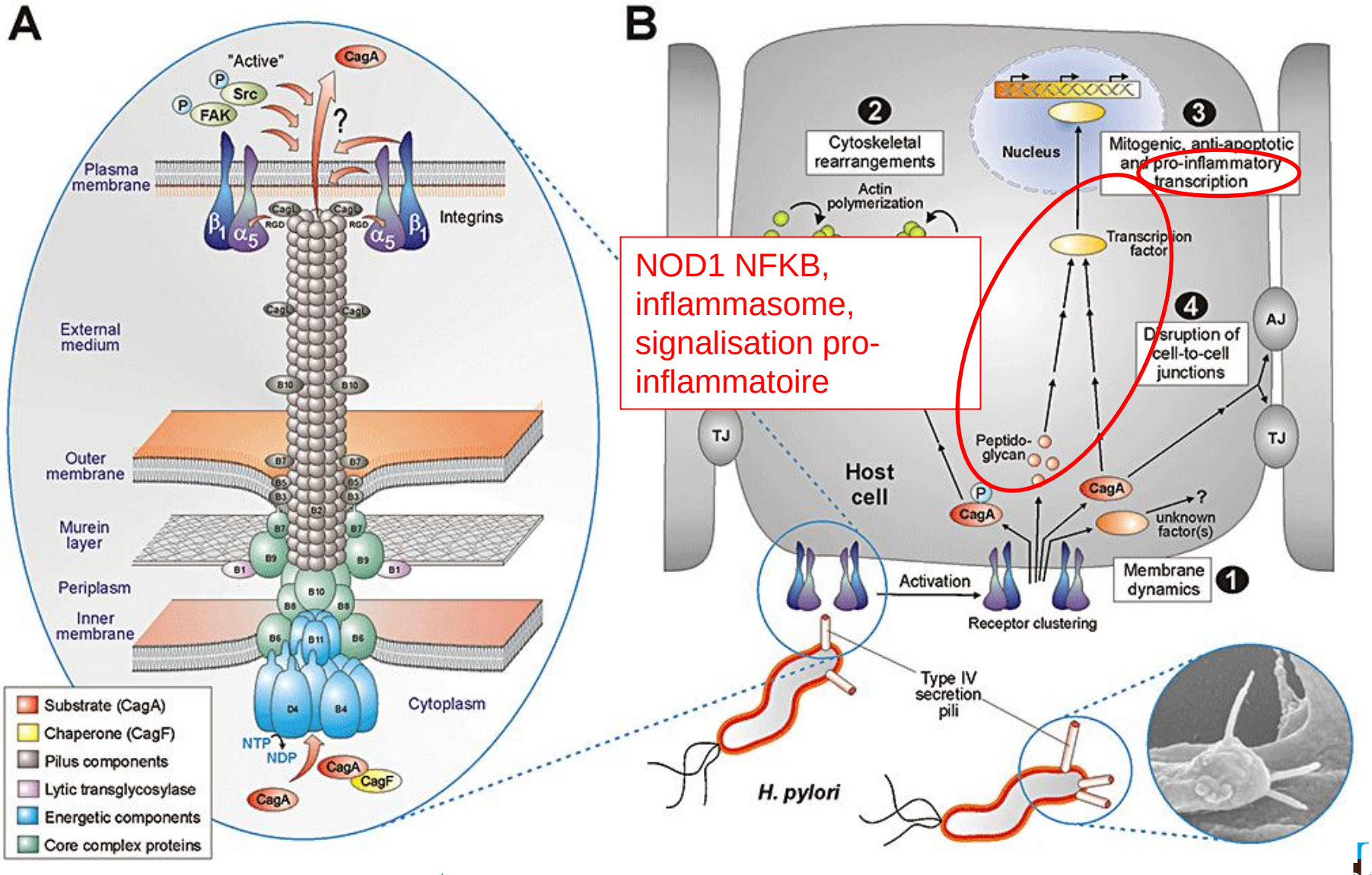
Src & Abl phosphorylation sur motifs EPIYA : SHP2, FAK…



Effet de CagA sur la cellule hote

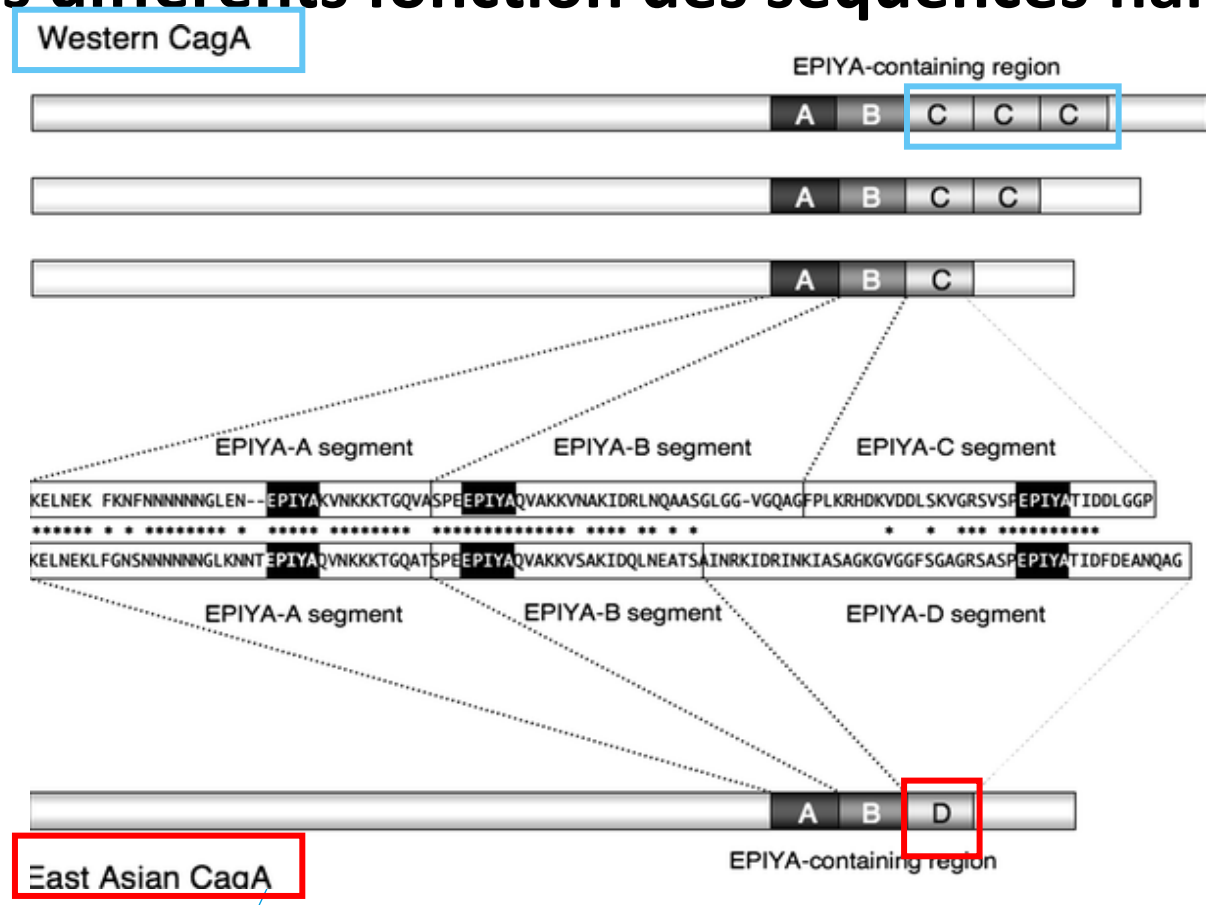


Effet du peptidoglycane bactérien injecté dans la cellule hote



Différents sites de phosphorylation de CagA

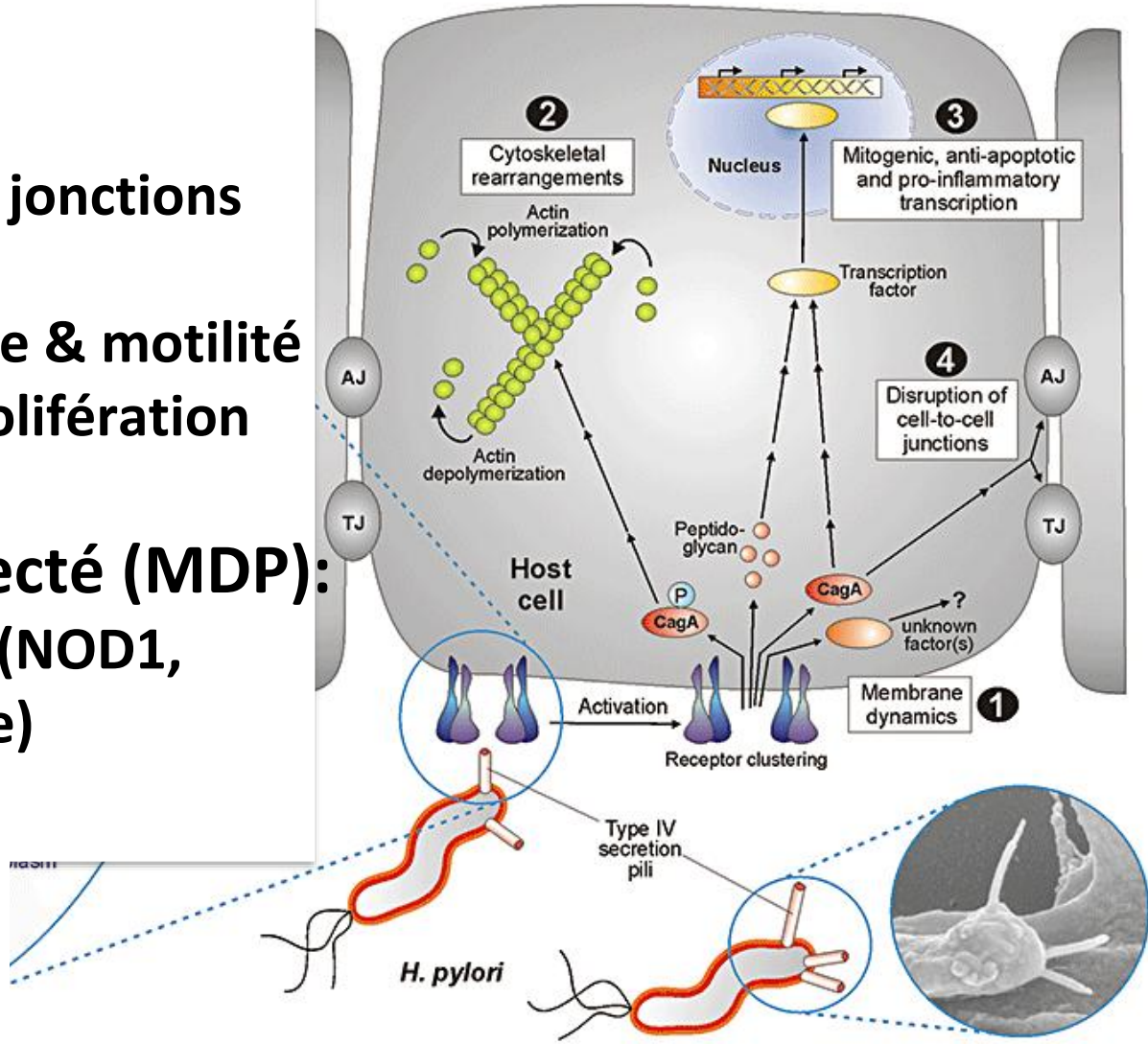
- Phosphorylation au niveau d'une tyrosine présente dans un motif EPIYA (Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala)
- 4 motifs différents fonction des séquences flanquantes



Effet du TSS4 et de CagA sur la cellule hôte

- **CagA et CagA-P**
  - **Déstabilisation des jonctions**
  - **Perte de polarité**
  - **Élongation cellulaire & motilité**
  - **Inflammation & prolifération**

- **Peptidoglycane injecté (MDP):**
  - **Pro-inflammatoire (NOD1, NF-kB, inflammasome)**



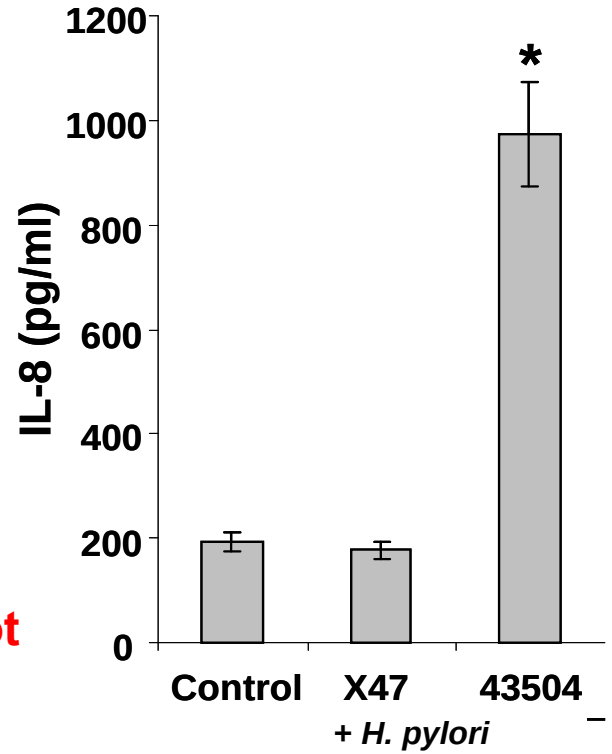
Pathogénicité liée au TSS4 de *H. pylori in vitro*

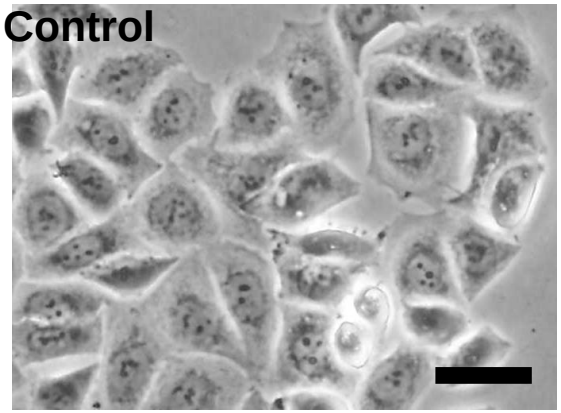
Ex. de coculture de cellules épithéliales gastriques in vitro avec 2 souches de *H. pylori*:

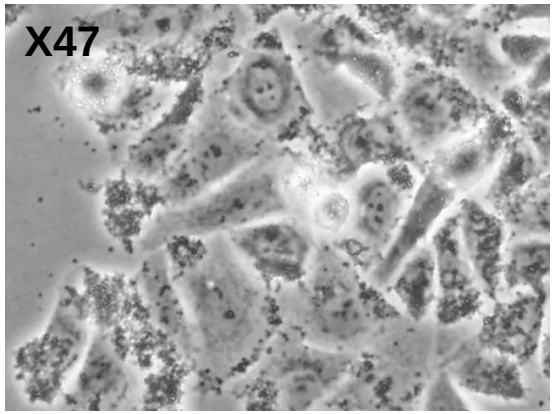
- **X47 :**
  - **?**
- **43504**
  - **?**

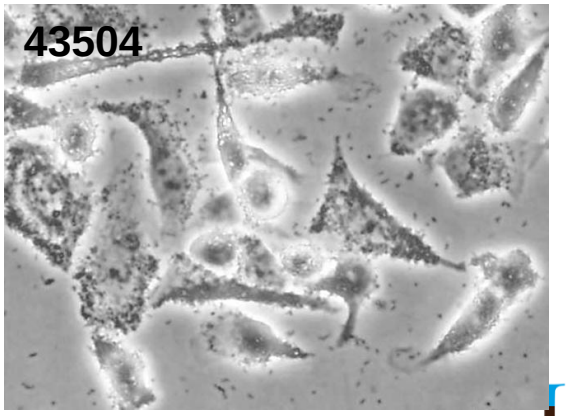
→ **Décrire les résultats observes**

→ **En déduire le genotype des souches pour l'ilot de pathogénicité *cag*PAI, CagA**







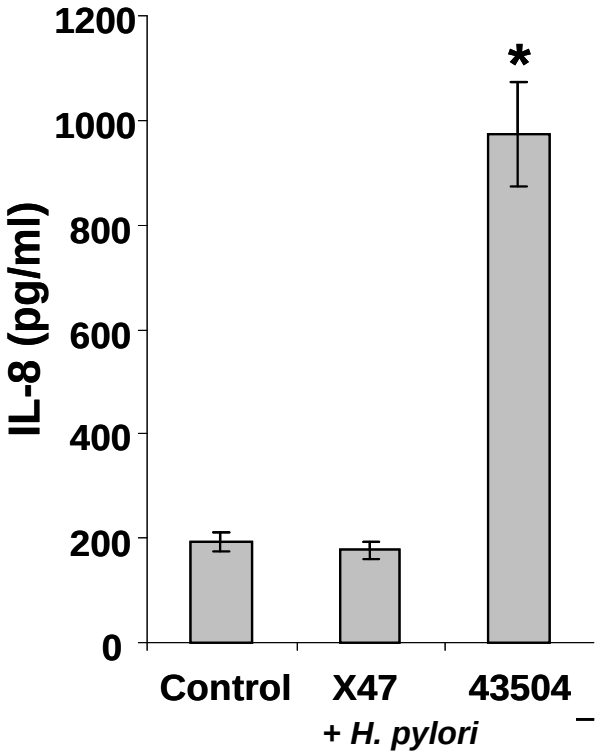


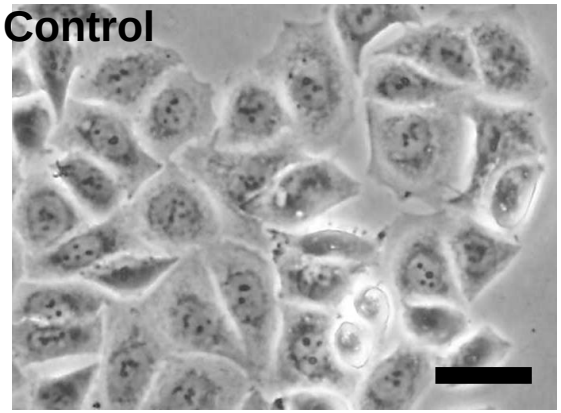
Varon *et al*, Gastroenterology 2012

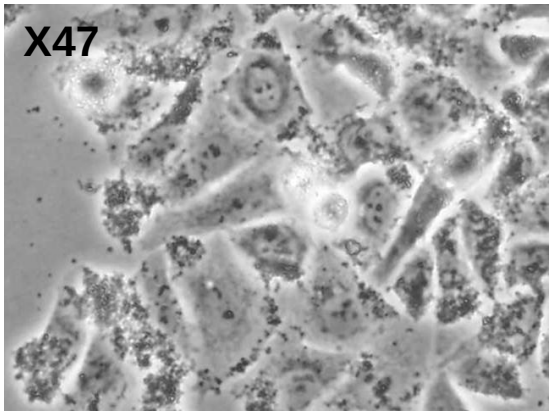
Pathogénicité liée au TSS4 de *H. pylori in vitro*

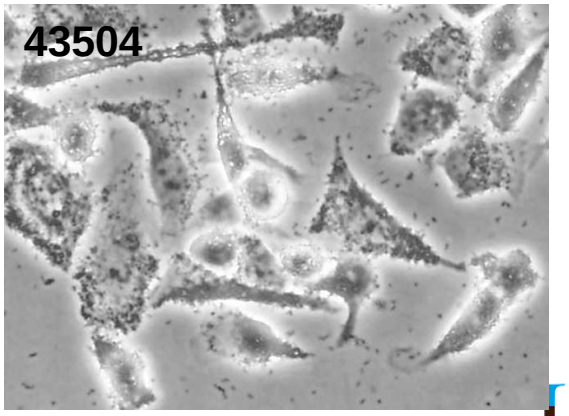
Ex. de coculture de cellules épithéliales gastriques in vitro avec 2 souches de *H. pylori*:

- **X47 *cag*PAI-:**
  - **Pas de changement de phénotype**
  - **Pas de production d'IL8**
- **43504 *cag*PAI+, *cag*A+:**
  - **Phénotype colibri, lié à CagA**
  - **Pro-inflammatoire (IL8+++), lié au MDP**







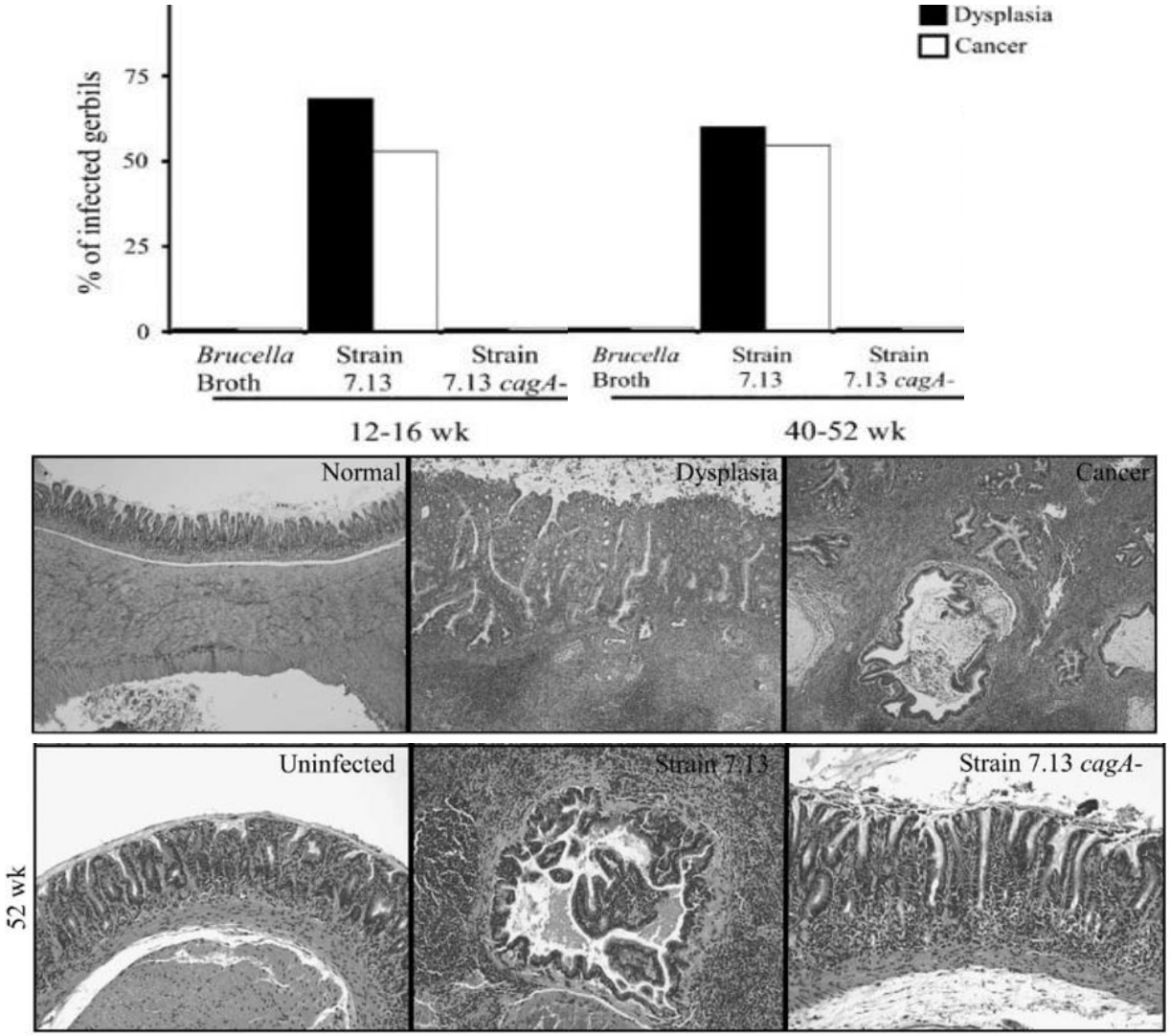


Varon *et al*, Gastroenterology 2012

Pathogénicité liée à CagA *in vivo* : infection chez la gerbille de Mongolie

→ **Décrire les résultats observés**

→ **En déduire l'effet de CagA sur la carcinogenèse gastrique**



Franco *et al.*, Cancer Res. 2008

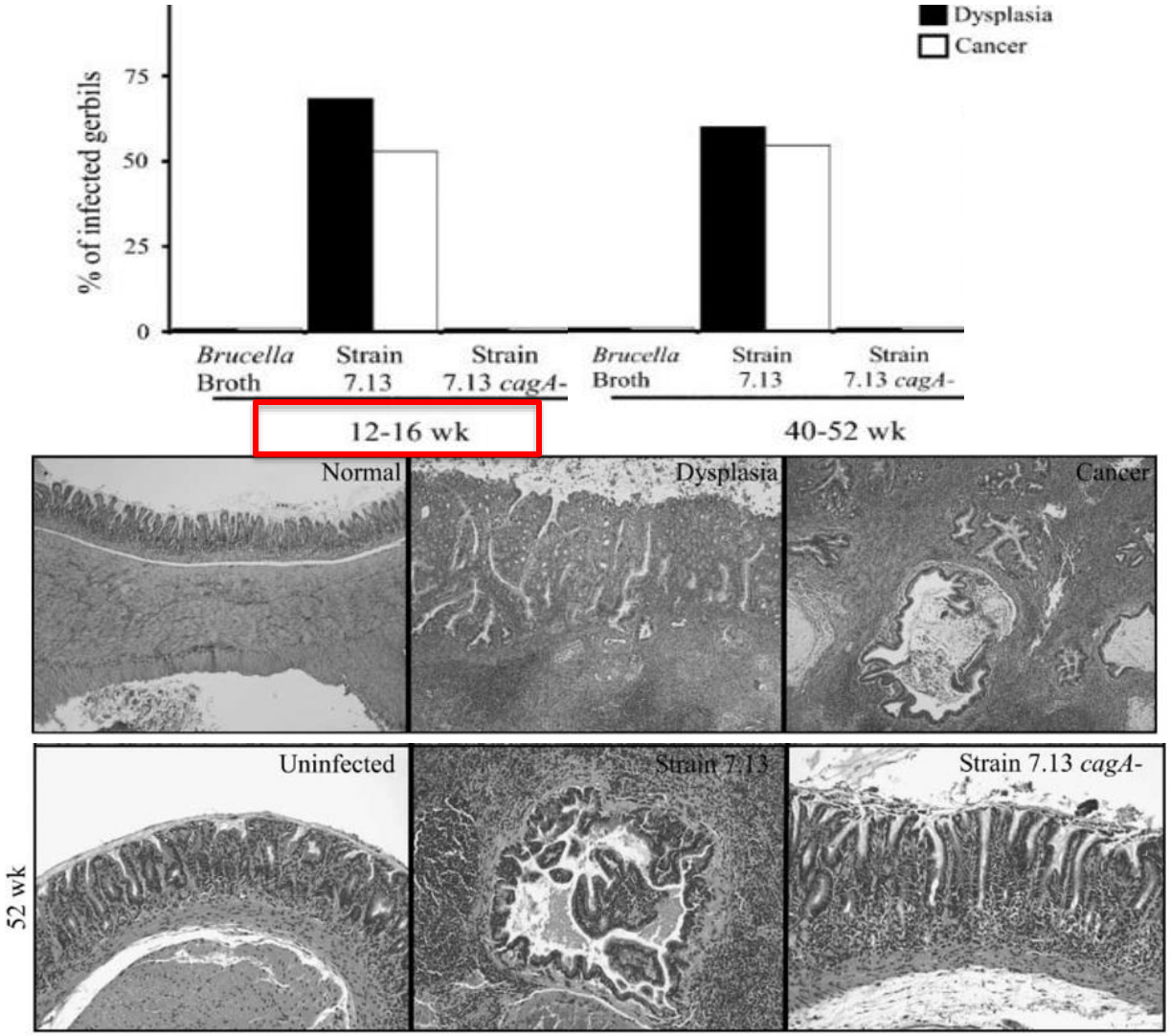
Pathogénicité liée à CagA *in vivo* : infection chez la gerbille de Mongolie

CagA

➔ Dysplasies

➔ Cancers

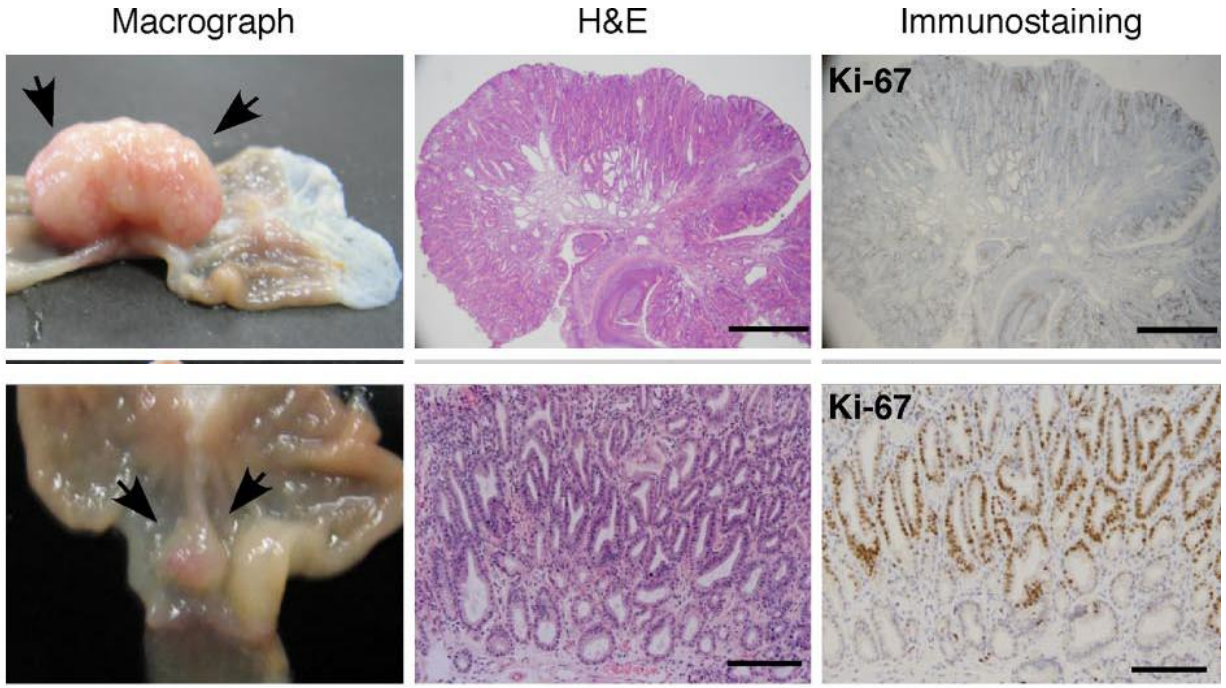
→ Démonstration indirecte ?

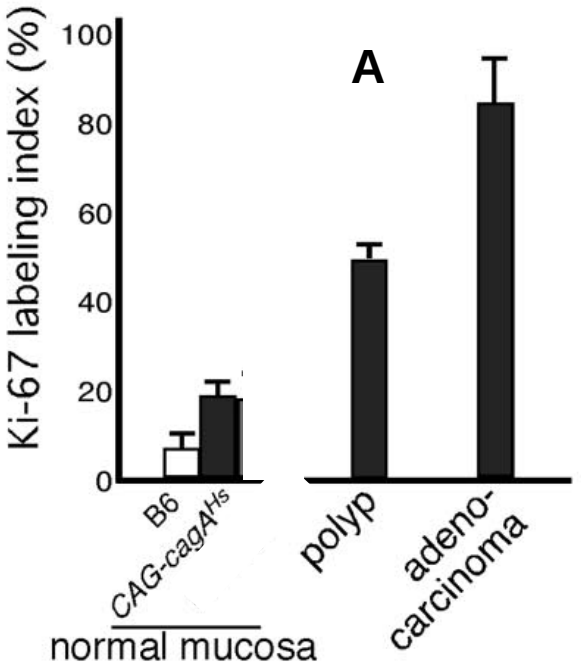


Franco *et al.*, Cancer Res. 2008

Modèles de souris transgéniques exprimant CagA

- **Expression constitutive et ubiquitaire de CagA**
- **Pathologies observées :**
  - **Estomac : hyperplasie, polypes, adénocarcinomes**
  - **+ rarement : leucémie myéloide, lymphome B**

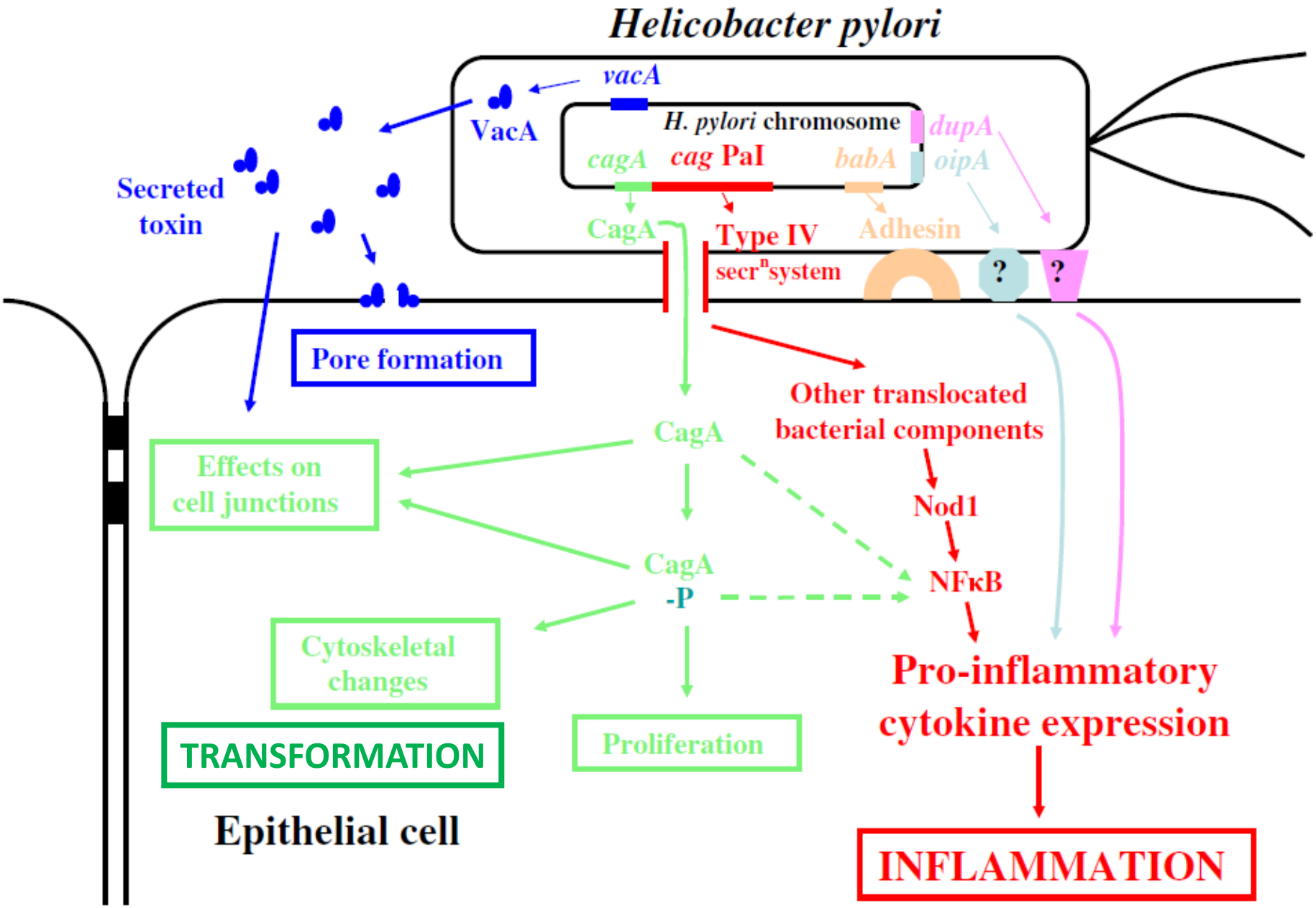




Ohnishi *et al*, PNAS 2007

CagA: première oncoprotéine bactérienne!

Facteurs bactériens associés au cancer gastrique



Résumé

- ***H. pylori*** **est associé au cancer gastrique**
- **Rôle de l'inflammation**
- **Facteurs bactériens impliqués**
  - **VacA : vacuolisante, pro-apoptotique, pro-inflammatoire**
  - **OipA: procarcinogène**
  - **Oncoprotéine CagA : pro-inflammatoire, déstabilisation des jonctions cellulaires, élongation cellulaire**

Résumé

- → ***H. pylori*** **est associé au cancer gastrique**
- → **Rôle de l'inflammation**
- → **Facteurs bactériens impliqués**
  - › **VacA : vacuolisante, pro-apoptotique, pro-inflammatoire**
  - › **OipA: procarcinogène**
  - › **Oncoprotéine CagA : pro-inflammatoire, déstabilisation des jonctions cellulaires, élongation cellulaire**

→ Par quels mécanismes *H. pylori* est-il à l'origine du cancer gastrique ?

Origine cellulaire des cancers: les cellules souches cancéreuses (CSC)

➔**Tumeur = mélange de cellules + ou - différenciées, dont certaines ressemblent aux cellules normales**

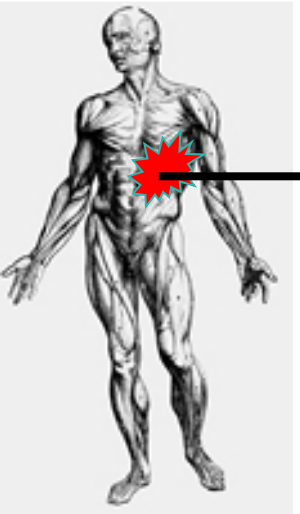
➔**1940-70 : nombre limité de cellules tumorales en cycle, faible pouvoir clonal *in vitro* et une faible fraction capable d'induire une tumeur *in vivo***

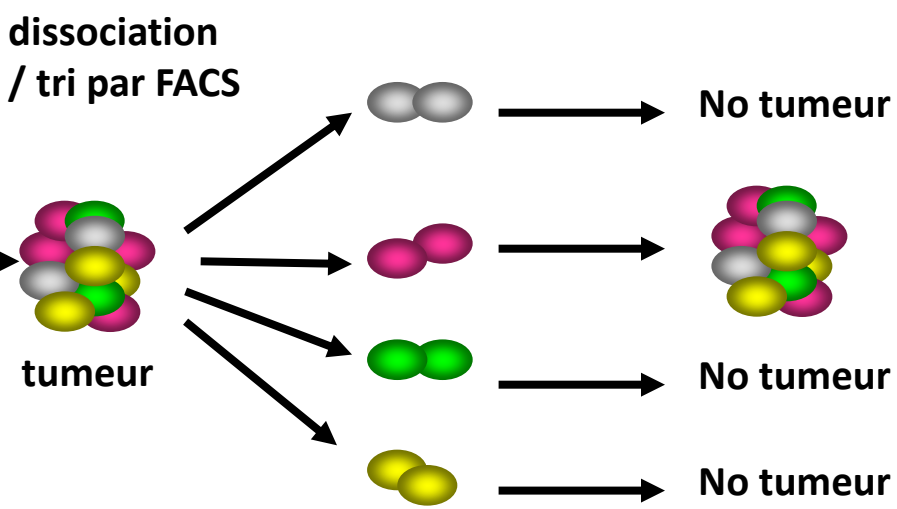
➔**1994 J. Dick (Toronto): introduit la notion de CSC dans la leucémie aiguë (CD34+ CD38-):**

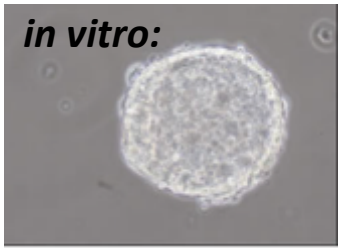
- **Rare sous-population de cellules leucémiques capables de reproduire une leucémie chez la souris immunodéficiente**
- **Capacités d'auto-renouvellement et de différenciation**

Origine cellulaire des cancers: les cellules souches cancéreuses (CSC)

- **CSC = sous-population au sein d'une tumeur définie par:**
  - **Capacités d'auto-renouvellement**
  - **Capacités de division asymétrique et de différenciation**
  - **Expression de marqueurs d'immaturité**
  - **Capacité de former une nouvelle tumeur**







Tumorsphere



Tumeur après xénogreffe

= Cellule Souche Cancéreuse (CSC)

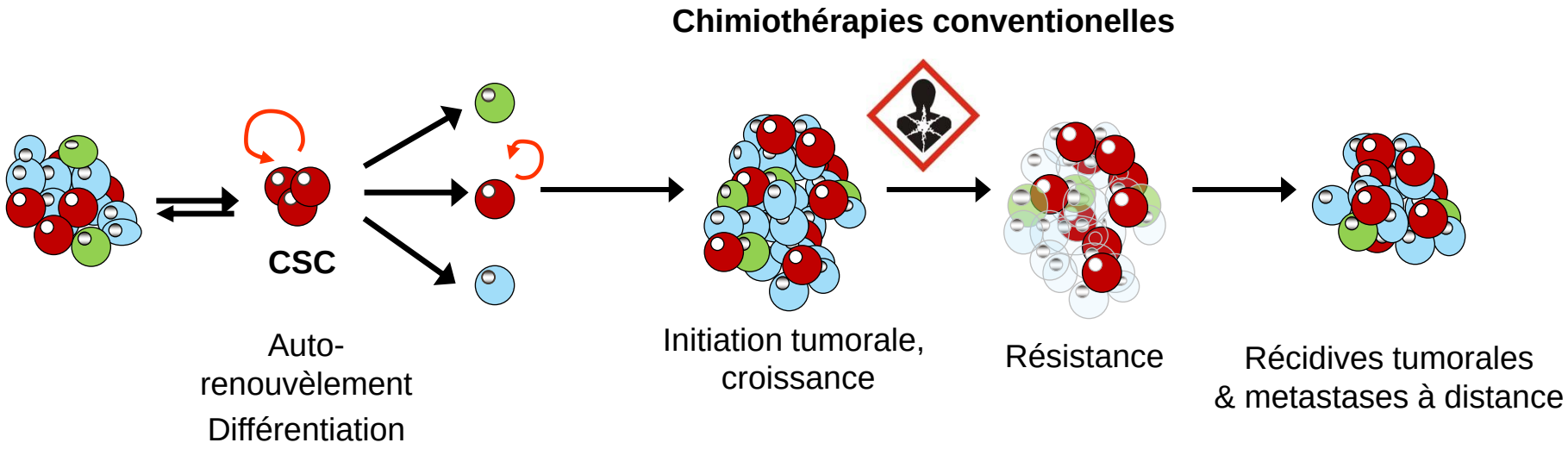
Existance de CSC démontrée dans les cancers

1994: Acute Myeloid Leukemia (Lapidot *et al*. 1994; Bonnet and Dick 1997)

Depuis 2003, tumeurs solides:

• Breast	(Al-Hajj *et al*. 2003)
• Brain	(Hemmati *et al*. 2003, Singh *et al*. 2003)
• Colon	(O'Brien *et al*. 2007, Ricci-Vitiani *et al*. 2007)
• Pancreas	(Hermann *et al*. 2007, Li *et al*. 2007)
• Prostate	(Collins *et al*. 2005)
• Ovary	(Bapat *et al*. 2005, Alvero *et al*. 2009)
• Liver	(Ma *et al*. 2007, Yang *et al.* 2008)
• Lung	(Ho *et al*. 2007, Eramo *et al*. 2008)
• Renal carcinoma	(Bussolati *et al.* 2008)
• Melanoma	(Fang *et al*. 2005, Quintana *et al*. 2008)
• Gastric carcinoma	(Fukuda *et al*. 2009, Takaishi *et al*. 2009)
•. ……	

CSC et cancer : implications thérapeutiques



1- l'élimination de la masse tumorale n'implique pas forcément l'éradication totale des CSC

2- les CSC serait plus résistantes aux traitements, et pourraient rester en dormance

3- les CSC utiliseraient des voies de signalisation cancéreuses particulières

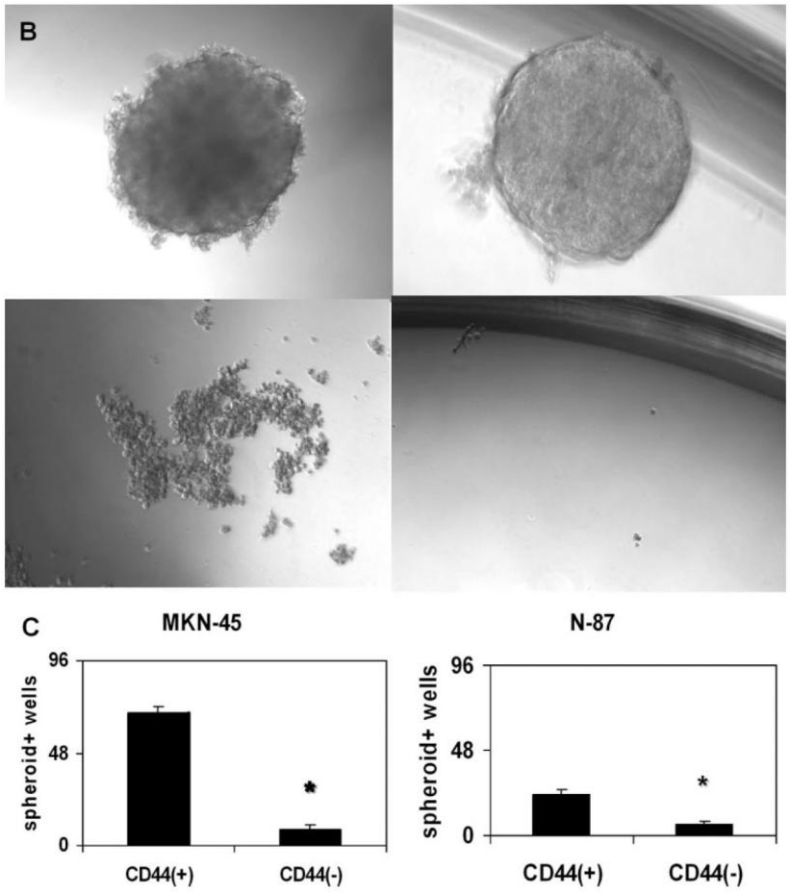
4 – CSC: propriétés migratoires et invasives, échappement de la niche, métastases

Enjeu majeur dans la recherche contre le cancer :

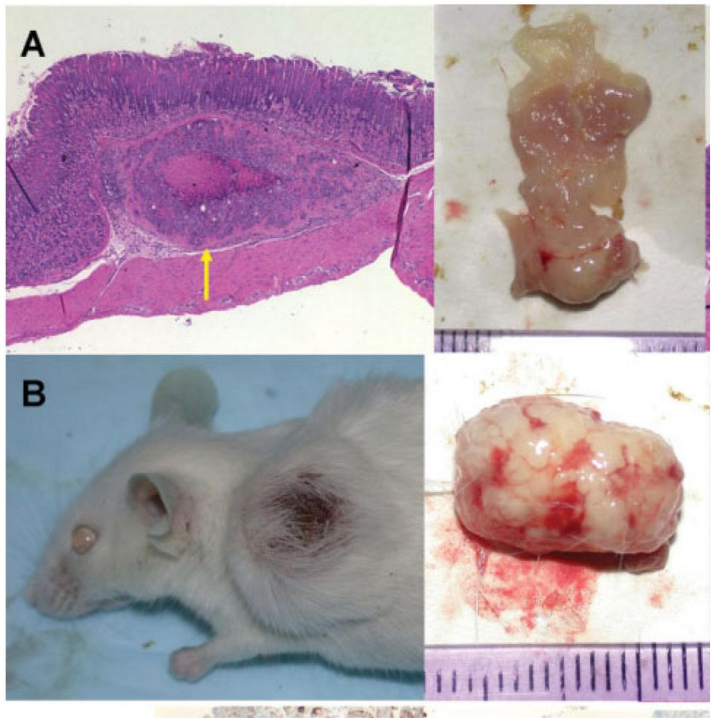
Identifier pour pouvoir Eradiquer les CSC

CD44, biomarqueur des CSC gastriques

- Takaishi et al., Stem Cell 2009;27:1006-1020: première démonstration (lignées)



Tumorsphere formation with CD44+ cells



Orthotopic injection

Subcutaneous injection

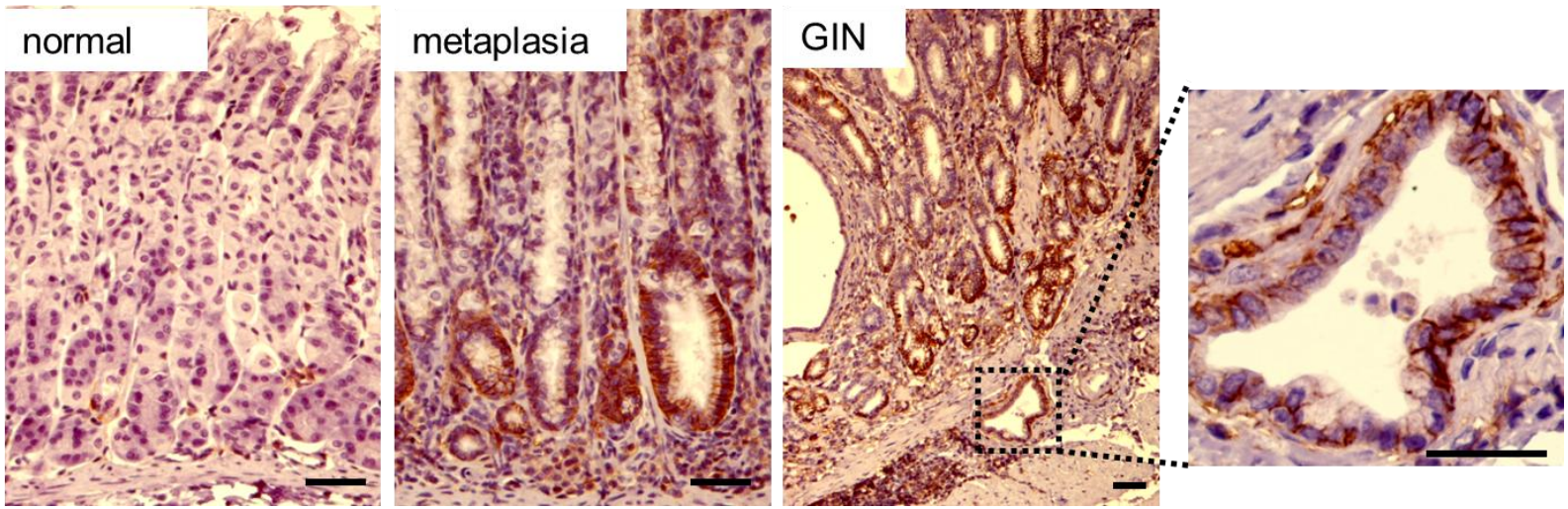
Development of gastric and skin tumors in immunodeficient mice xenografted with CD44+ cells

- **Nguyen *et al*, Clin Cancer Res 2017 : confirmation dans tumeurs de patients**

Fréquence des CSC CD44+ dans le cancer gastrique : 0.1 – 3,5%

Infection chronique à *H. pylori* : à l'origine de l'émergence de CSC ?

IHC CD44 sur estomac de souris infectées par *H. pylori*:

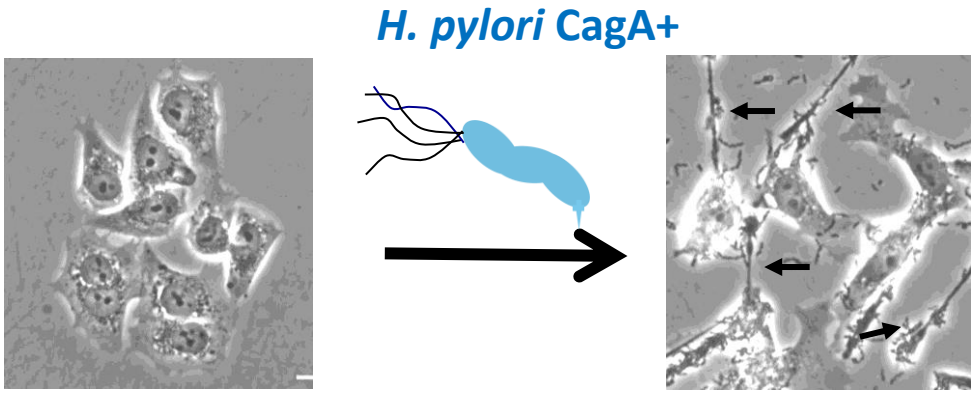


Varon *et al.*, Gastroenterology 2012

- **Les lésions pré-néoplasiques gastriques induites en réponse à l'infection par *H. pylori* sont composées de cellules CD44+**
- **A l'origine des cellules souches cancéreuses?**
- **Mécanismes moléculaire impliqué dans leur émergence?**

In vitro, H. pylori induit une transition epithélio-mésenchymateuse (EMT)

- **Perte de la polarité apicobasale des cellules et de l'adhérence cellulaire**
- **Elongation cellulaire et migration**

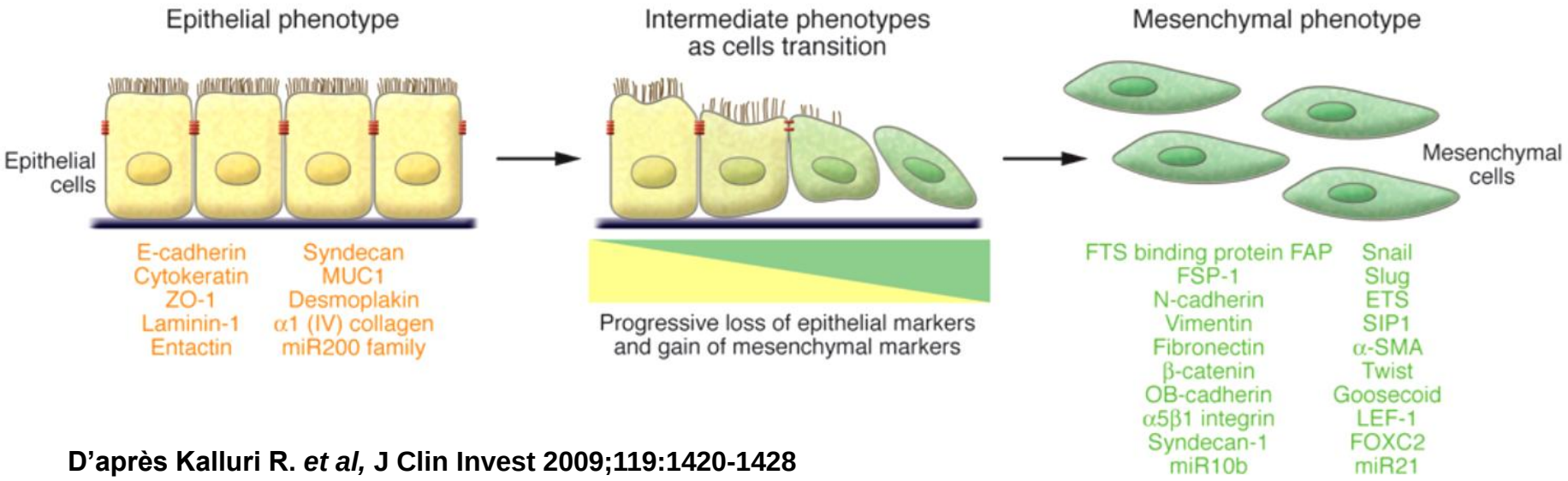


D'après Varon *et al.*, Methods Mol Biol. 2009;511:237-65

- **Dégradation de la matrice extracellulaire**

Acquisition d'un phénotype invasif mésenchymateux

Concept général de la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT)



D'après Kalluri R. *et al,* J Clin Invest 2009;119:1420-1428

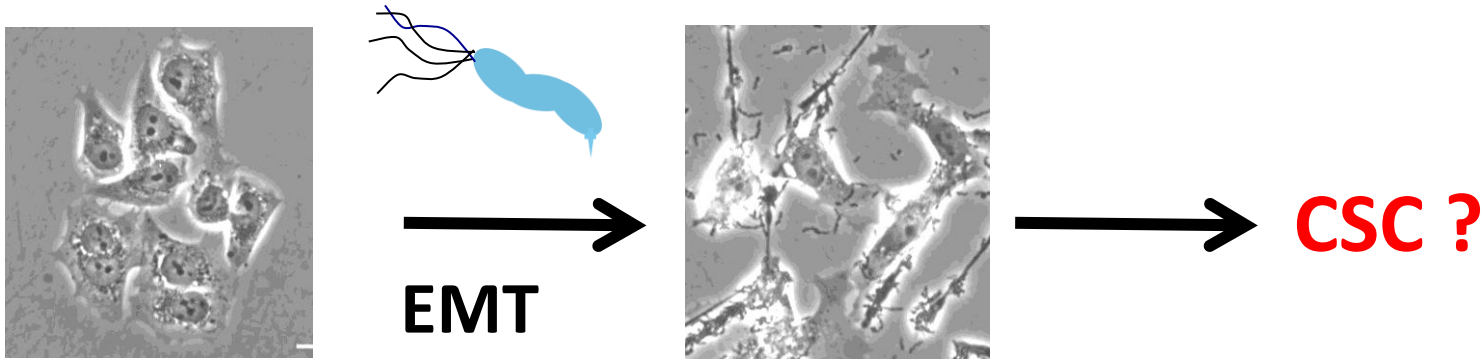
3 types différents d'EMT associée à :

- au développement embryonnaire (gastrulation)

- l'inflammation et la fibrose

- la progression tumorale

Est-ce que *H. pylori* induit des cellules aux propriétés de CSC, *via* une EMT ?

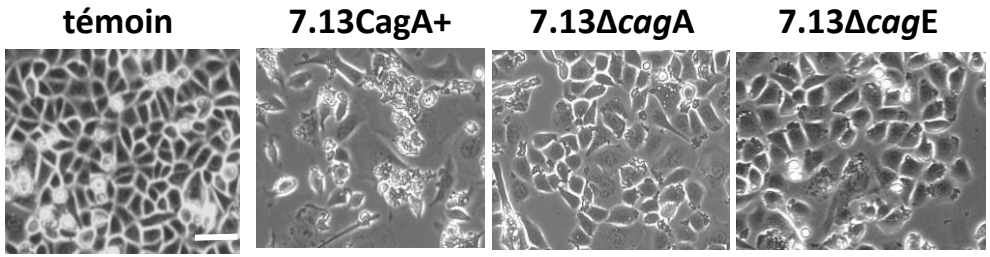


Dédifférenciation ?

Reprogrammation ?

H. pylori CagA+ induit-il une EMT ?

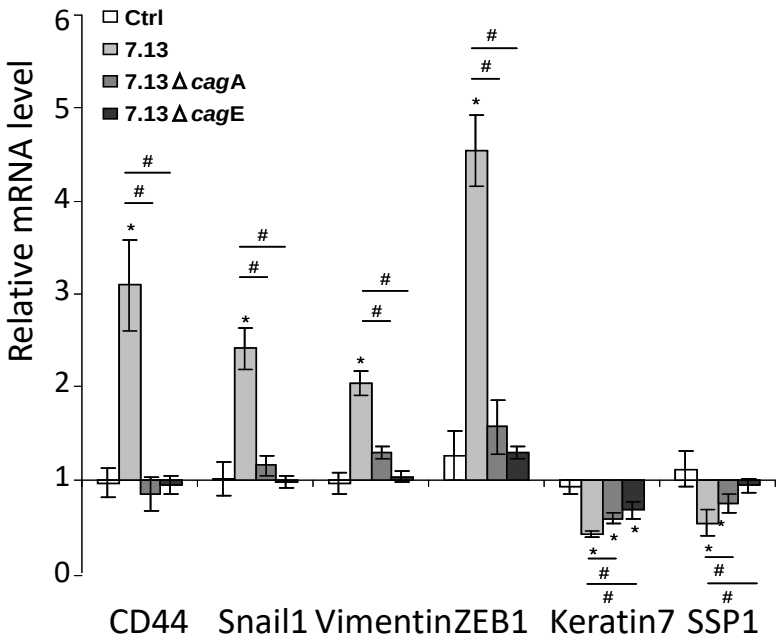
Cocultures : Cellules AGS + *H. pylori* CagA+ et délétées pour CagA ou CagE

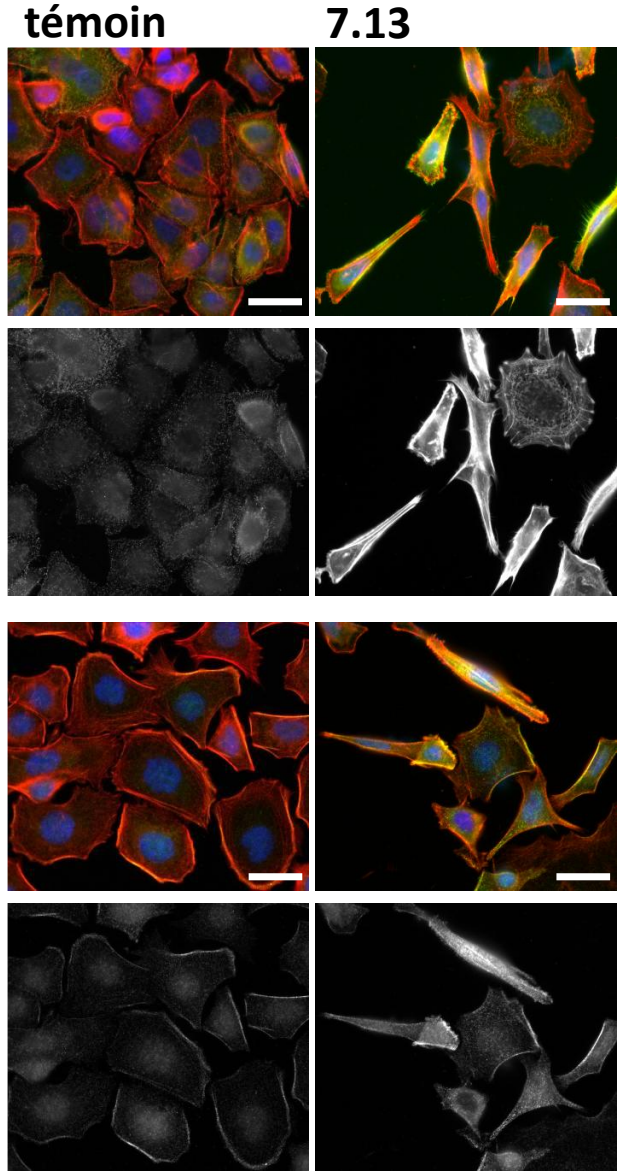


L'infection à *H. pylori* CagA+ induit des changements phénotypiques évoquant une EMT

Bessède *et al.*, Oncogene 2014

Phénotype et propriétés souches des cellules mésenchymateuses induites par CagA?



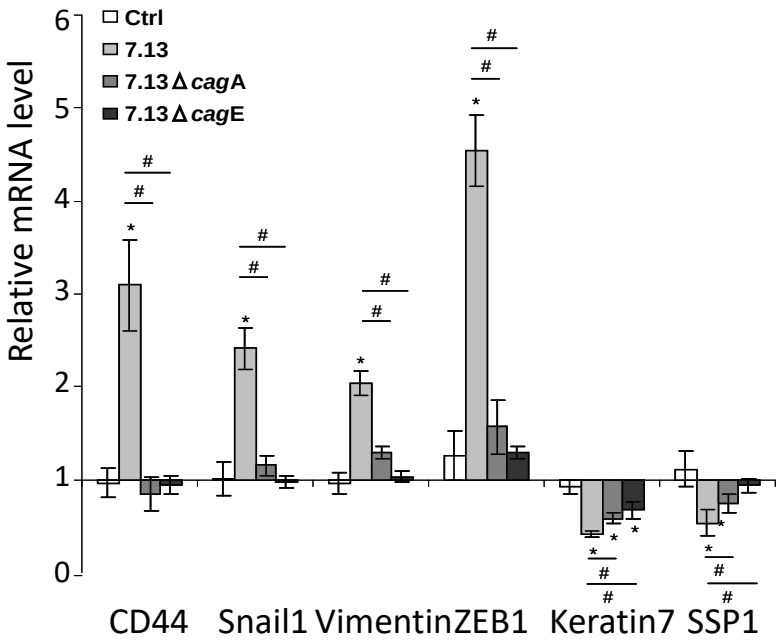


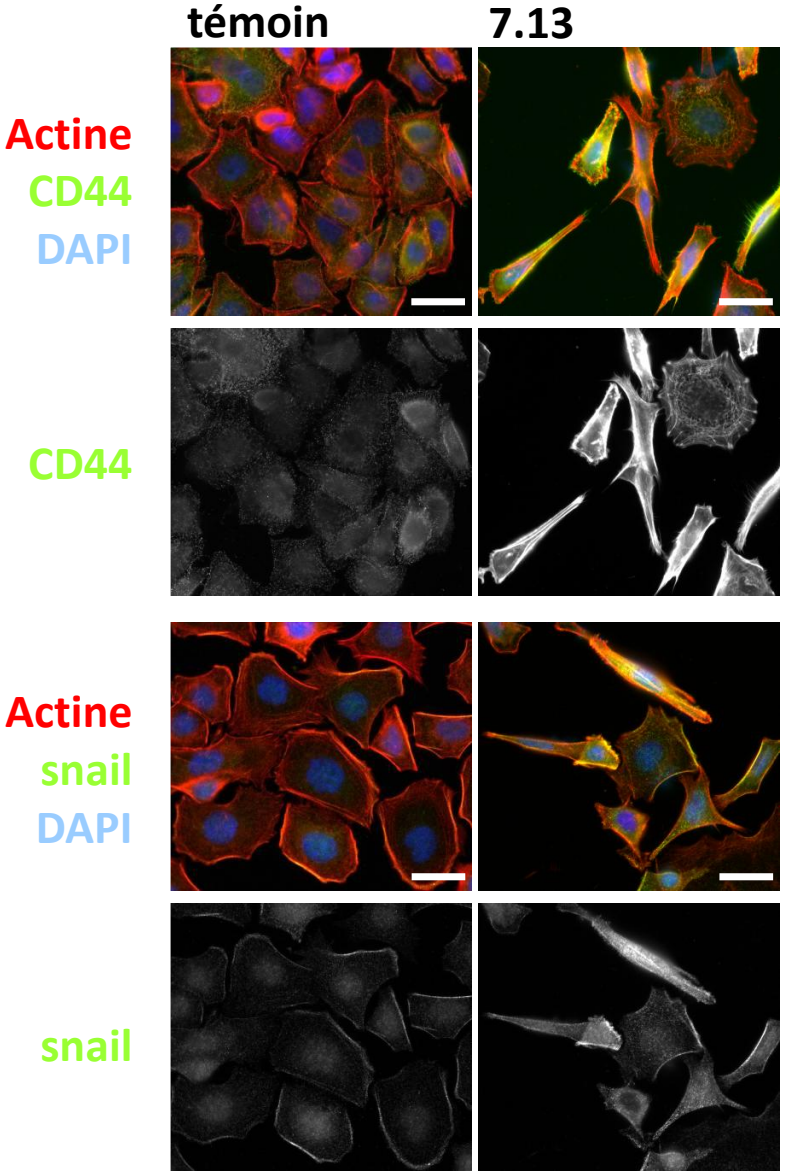
→ **Décrire les résultats observés**

→ **En déduire l'effet de CagA sur l'expression des marqueurs de l'EMT et le phenotype cellulaire**

Bessède *et al.*, Oncogene 2014

Phénotype et propriétés souches des cellules mésenchymateuses induites par CagA?





Les cellules « colibri » induites par CagA expriment :

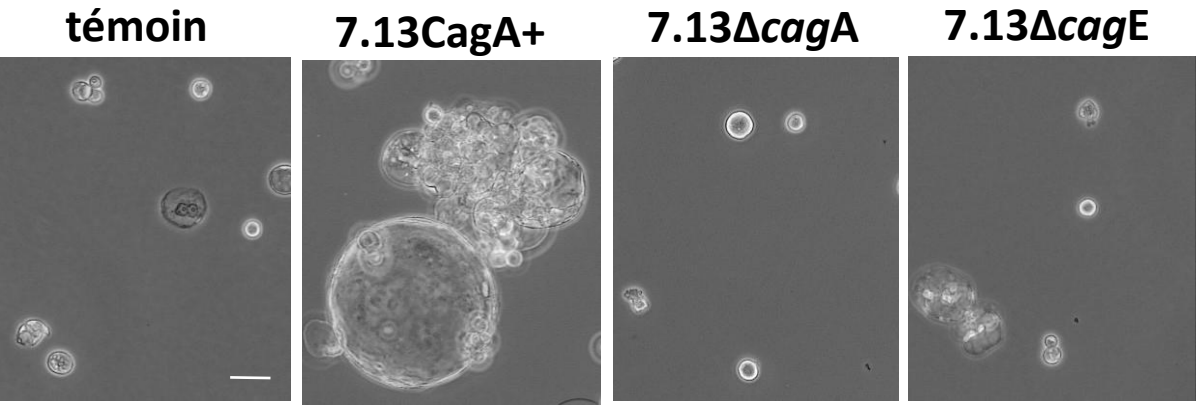
- fortement CD44

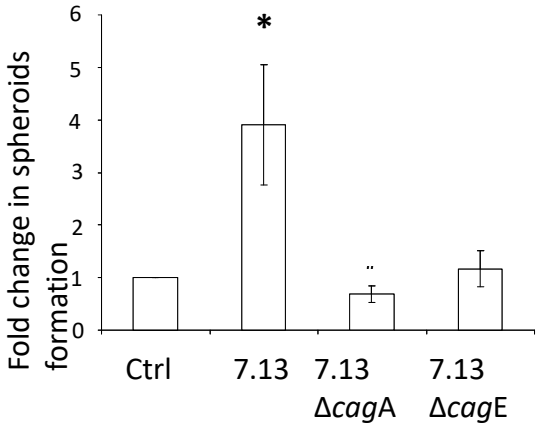
- les marqueurs mésenchymateux

Bessède *et al.*, Oncogene 2014

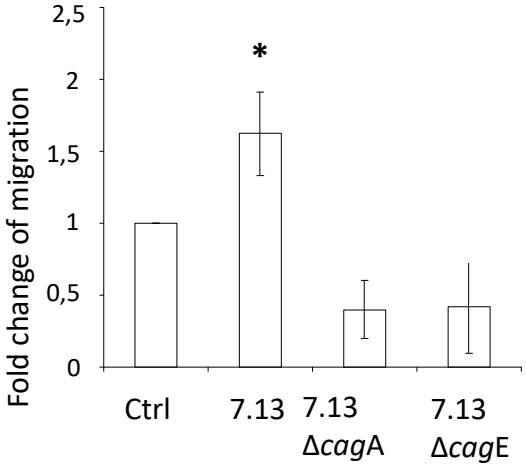
Phénotype et propriétés souches des cellules mésenchymateuses induites par CagA?

- **culture des cellules AGS en condition non-adhérente :**





- **migration des cellules AGS en *transwell* :**



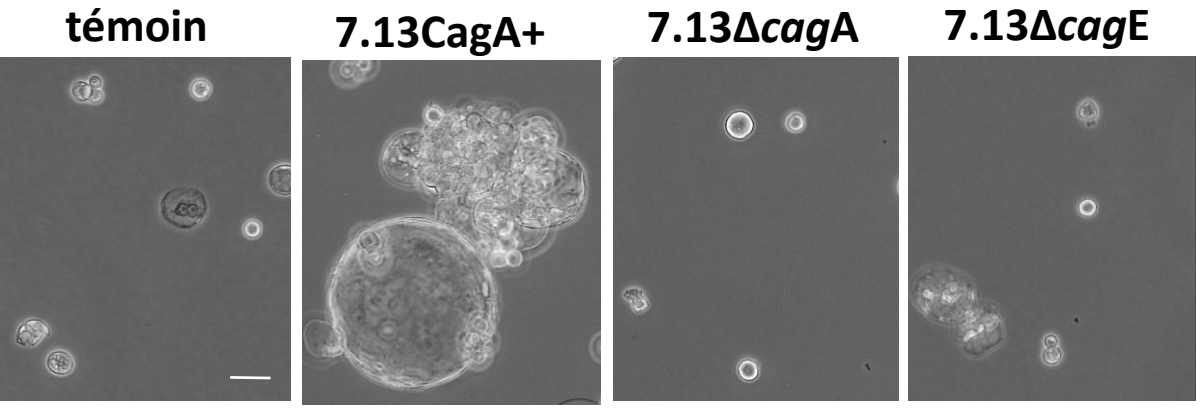
→ **Décrire les résultats observés**

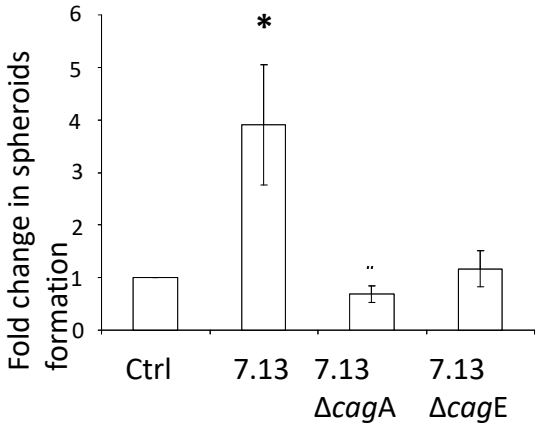
→ **En déduire l'effet de CagA et CagE**

Bessède *et al.*, Oncogene 2014

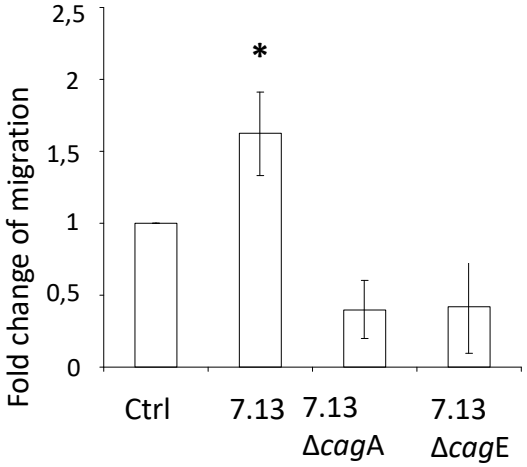
H. pylori via CagA confère-t-il des propriétés de CSC aux cellules infectées ?

- **culture des cellules AGS en condition non-adhérente :**





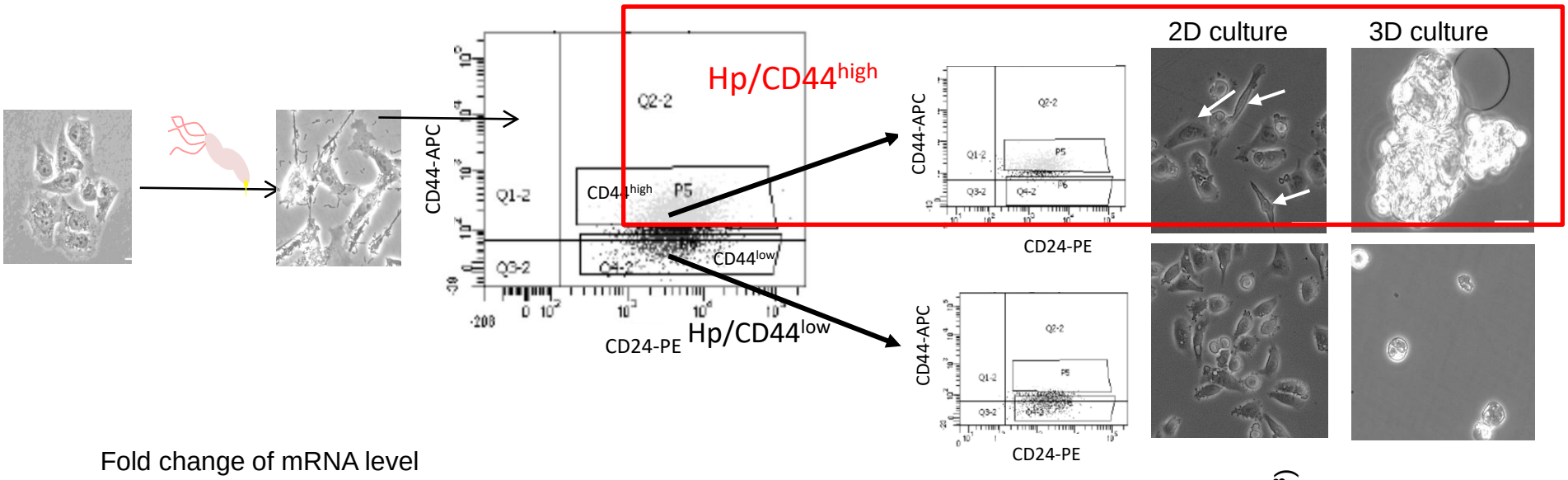
- **migration des cellules AGS en *transwell* :**

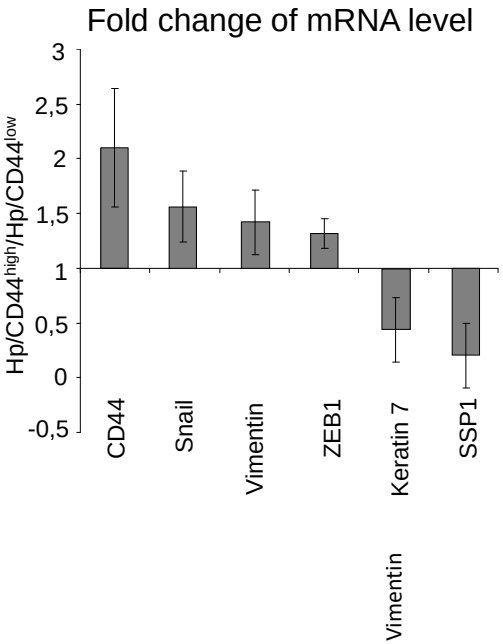


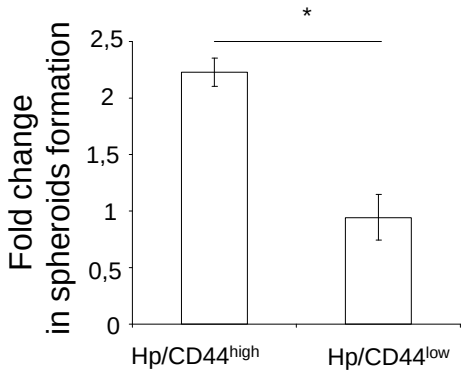
***H. pylori* CagA+, via le TSS4 :**
- Formation de « tumorsphères »
- Stimulation de la migration cellulaire

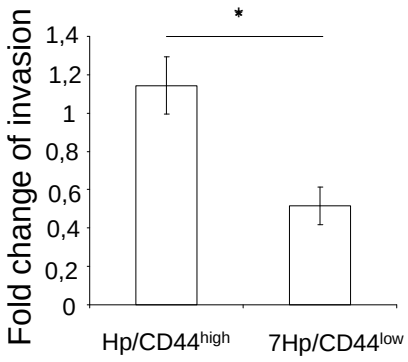
Bessède *et al.*, Oncogene 2014

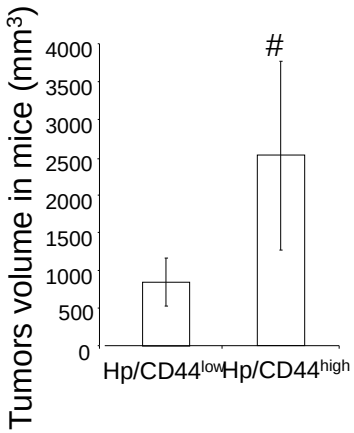
Propriétés des cellules CD44^{high} induites par *H. pylori* /CagA







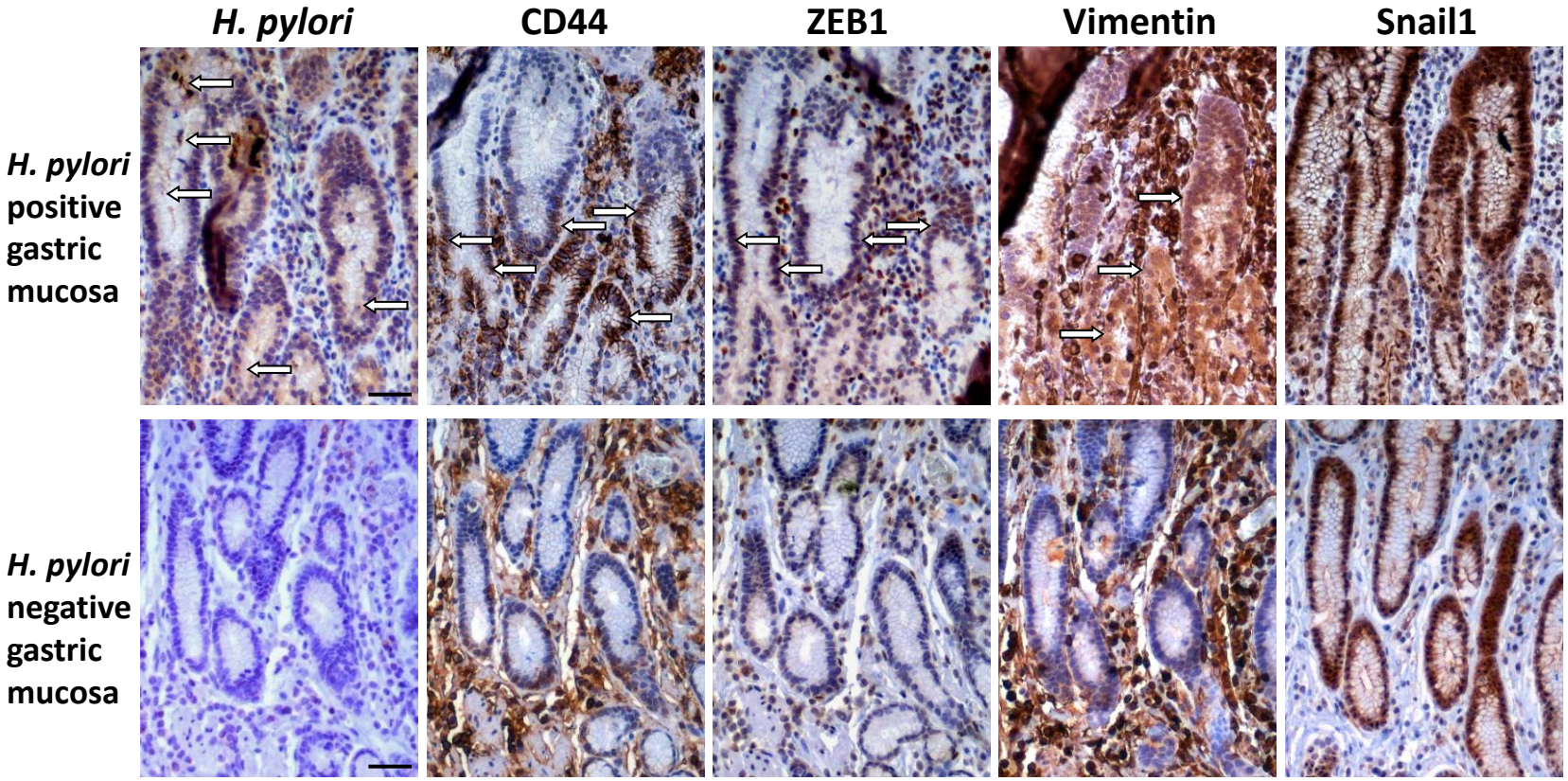




Bessède *et al.*, Oncogene 2014

Bessède *et al.*, Oncogene 2014

Expression des marqueurs de l'EMT et de CD44 dans la muqueuse gastrique chez l'homme

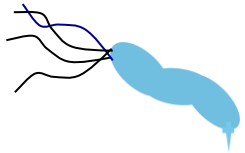


L'infection par *H. pylori* induit une surexpression des marqueurs de l'EMT et de CD44 dans les cellules épithéliales gastriques *in vivo*

Bessède *et al.*, Oncogene 2014

Résumé

***H. pylori* CagA+**



→ **Cellules CD44^{high}**

- **possédant le phénotype « *colibri*»**
- **↗ marqueurs mésenchymateux (Snail, ZEB1, Vimentine)**
- **↘ modérée de marqueurs épithéliaux (CK7, SS1)**
- **↗ propriétés migratoires et invasives**
- **formation de « *tumorspheres* »**

Bessède *et al*., Oncogene 2014

Résumé

- ➔ **Le cancer gastrique:**
  - › **Origine infectieuse: principale cause infection / *H. pylori* (souches *cag*PAI+, facteurs de pathogénicité, variants alléliques….)**
  - › **Rôle de l'inflammation : carcinogenèse**
  - › **Origine cellulaire: cellules souches cancéreuses à l'origine des tumeurs et de la dissémination**
- ➔ **Facteurs impliqués dans la carcinogenèse:**
  - › **Inflammation**
  - › **Toxine bactérienne VacA : vacuolisante, pro-apoptotique, pro-inflammatoire**
  - › **Oncoprotéine bactérienne CagA : pro-inflammatoire, déstabilisation des jonctions cellulaires, élongation cellulaire**
- ➔ **Mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués:**

