

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE

**THESE**

Pour l'obtention du grade de

**Docteur de l'Université de Lille 1**

Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Ecole doctorale Biologie-Santé

Présentée par

**Yannick ROSSEZ**

**Implications biologiques et pathologiques de la mucine  
MUC5AC dans le tractus gastro-intestinal**

Soutenue publiquement le 30 novembre 2011

Composition du jury :

Monsieur le Pr Fabrice ALLAIN	Président
Monsieur le Dr Jean-Claude MICHALSKI	Directeur de thèse
Madame le Dr Catherine ROBBE-MASSELOT	Encadrant de thèse
Monsieur le Dr Ivo BONECA	Rapporteur
Monsieur le Dr Anthony CORFIELD	Rapporteur
Monsieur le Dr Jean-Luc DESSEYN	Examineur
Monsieur le Dr Walter GONZALEZ	Examineur
Monsieur le Pr Robert MULLER	Examineur

*A ma femme*

*Pour son amour, son soutien et sa patience*



Ce travail a été réalisé au sein de l'Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, URM 8576 CNRS/USTL, dirigée par le Dr Jean-Claude Michalski. Il a bénéficié d'une allocation de recherche financée à 50% par la région Nord-Pas de Calais et à 50% par l'entreprise Guerbet.



## Remerciements

J'ai, durant ma thèse, été amené à être partagé entre deux laboratoires et une entreprise. Dans ce contexte, j'ai pu appréhender les exigences de toutes ces parties, d'une part le fonctionnement d'un laboratoire composé de nombreuses équipes, le C9, où j'ai passé le plus clair de mon temps, d'autre part mon laboratoire d'adoption belge, le laboratoire de RMN et d'Imagerie Moléculaire de Mons et enfin le laboratoire de l'entreprise Guerbet.

Je remercie tout d'abord le Docteur Jean-Claude Michalski pour m'avoir accueilli au sein de l'Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle et plus particulièrement au sein de son équipe.

Je remercie tout particulièrement le Docteur Catherine Robbe-Masselot qui m'a encadré et guidé durant ces travaux, pour sa patience, sa gentillesse, sa disponibilité ainsi que d'avoir cru en moi, ce qui m'a permis d'être là où j'en suis.

Je tiens à remercier le Professeur Robert Muller de m'avoir accueilli dans son laboratoire, de ses nombreux conseils, de son soutien et de m'avoir fait l'honneur d'examiner ma thèse.

Un grand merci aux différents membres et anciens membres du laboratoire de RMN et d'Imagerie Moléculaire. Au Docteur Carmen Burtea de m'avoir initié à la technique du phage display, à l'imagerie sur petits animaux et à la manipulation des souris (après imagerie). Au Professeur Luce Vander Elst et au Docteur Sophie Laurent pour leur expertise en chimie. Au Docteur Sébastien Boutry pour ses bonnes idées. A Coralie S, Isabelle M, Lionel, Morgane, Corrine P, Corine S, Céline, Coralie T, Mathieu, Carole, Eugénia et Isabelle G pour leurs bonne humeur et sympathie.

Je remercie également les personnes de l'entreprise Guerbet avec qui j'ai eu le plaisir de travailler et qui ont suivi le projet de très près. Le Docteur Sébastien Ballet qui a ensuite passé le relais durant ma thèse au Docteur Walter Gonzalez. Merci à ce dernier d'avoir accepté d'examiner ma thèse. Le Docteur Isabelle Raynal, le Docteur Olivier Rousseaux et Caroline Robic pour leurs conseils avisés et discussions constructives.

Je tiens également à remercier le Professeur Pierre Gosset et son service, pour leur aide matérielle et technique et de m'avoir initié à l'étude histologique du tractus gastro-intestinal.

Je transmets également ma plus sincère gratitude au Docteur Jean-Luc Desseyn d'avoir accepté d'examiner ma thèse mais aussi pour les conversations constructives que nous avons eues.

Un grand merci au Professeur Philippe Sansonetti et au Docteur Brice Sperandio de nous avoir aiguillé dans nos travaux d'interactions hôte/pathogènes. C'est grâce à leurs précieux conseils que j'ai pu faire la connaissance du Docteur Ivo Boneca, sans qui, les travaux concernant *Helicobacter pylori*, n'auraient pas vu le jour. Merci également de m'avoir fait confiance et d'avoir accepté d'être rapporteur de ma thèse.

Merci au Docteur Anthony Corfield d'avoir accepté de rapporter ma thèse et au Professeur Fabrice Allain de la présider.

Merci au Docteur Christian Slomianny et à Elodie Richard pour leur savoir et leur aide concernant la microscopie. Mais aussi au Docteur Caroline Cieniewski-Bernard pour son expertise en protéomique.

Egalement un grand merci à toutes les personnes que j'ai pu côtoyer au sein du C9 qui m'ont écouté et supporté durant toutes ces années : Coralie B, Stéphanie, Fannette (la crevette), Héla, Karine, Esthelle, Adeline, Marie J, Adriana, les Tony, Anne-Marie, Marlène, Anne D, Anne H, Dominique, Olivier, Nadège, Yvon, Martine, Gaëlle... et toutes les autres personnes que je n'ai pas citées.

Un merci tout particulier aux différents membres de l'équipe du Docteur Yann Guerardel qui sont devenus mes voisins de laboratoire durant ma thèse et qui se sont toujours montrés d'une grande sympathie à mon égard : Manu, à qui je dois toutes les analyses RMN, Christophe B, Elisabeth, Bernadette, Faustine, Jorick, Florence, Fred, Emeline, Xavier T... Et bien sûr Yann avec qui j'ai pu allier mes passions personnelles et professionnelles. Merci pour tous tes conseils.

## Résumé

Les mucines sont impliquées dans de nombreux mécanismes biologiques comme la cancérogenèse et les interactions hôte/pathogènes, faisant de ces glycoprotéines de potentielles cibles thérapeutiques ou diagnostiques.

Il a, par exemple, été démontré une néoexpression de MUC5AC dans les tumeurs coliques et dans les foyers de cryptes aberrantes qui apparaissent dès les premières étapes de développement du cancer du côlon. MUC5AC constitue ainsi un biomarqueur de choix pour le diagnostic et le pronostic du cancer du côlon. La première partie de notre travail de thèse a consisté à développer un produit de contraste adapté à l'imagerie du cancer du côlon. Pour cela, nous avons tout d'abord sélectionné, par la technique du phage display, un peptide affiné vis-à-vis de MUC5AC qui a été préalablement purifiée à partir d'adénomes coliques humains. Ce peptide a ensuite été conjugué à la biotine et greffé à un produit de contraste pour l'imagerie par résonance magnétique (IRM) (Ultrasmall Particles of Iron Oxide). Cela nous a permis d'apporter la preuve de l'efficacité de détection par IRM des polypes pré-cancéreux dans des modèles animaux et cellulaires qui surexpriment MUC5AC et dans des tissus coliques humains.

Dans l'estomac, MUC5AC est exprimée de façon physiologique et est impliquée dans l'adhésion d'*Helicobacter pylori* à la muqueuse gastrique. Cette adhésion est un prérequis aux pathologies induites par *H. pylori*. Dans la deuxième partie de notre travail de thèse, nous avons démontré que parmi les différents oligosaccharides portés par les mucines gastriques humaines, un nouveau type de *O*-glycane portant un motif LacdiNAc (LDN) était impliqué dans l'adhésion de la bactérie à la muqueuse gastrique. Le LDN est exclusivement porté par la mucine MUC5AC gastrique et son expression est corrélée à la localisation de *H. pylori*. Toutes les souches de *H. pylori* testées adhèrent fortement au LDN. L'analyse protéomique et la construction de mutants ont permis d'identifier une nouvelle adhésine bactérienne, LabA (LacdiNAc antigen binding adhesin) qui reconnaît spécifiquement le LDN. Cette découverte permet de mieux comprendre les mécanismes d'adhésion d'*H. pylori* et son tropisme d'organe. Ces résultats sont le point de départ d'études visant à étudier l'implication du LDN dans la physiologie gastrique et l'homéostasie, mais aussi pour le développement de stratégies alternatives pour le traitement de l'infection à *H. pylori*.

# Abstract

Mucins are implicated in different biological phenomena such as cancer development and host/pathogen interactions. Mucins have thus been identified as promising therapeutic targets and have been proposed as potential prognostic or diagnostic markers.

Improved detection sensitivity of early colorectal cancer would have important clinical applications. In this PhD thesis work, we report the development of new peptides against MUC5AC, a good marker of aberrant crypt foci, for the early diagnostic of colorectal cancer. Peptides have been identified by screening phage display peptide libraries against MUC5AC purified from fresh human colonic adenomas. One heptapeptide has been selected and further conjugated with biotin for immunohistochemistry studies and ultrasmall superparamagnetic iron oxides for nuclear magnetic resonance imagery (MRI). Its efficiency to detect MUC5AC has been evaluated on cellular and animal models which overexpressed this mucin, as well as on human colonic tissues.

In stomach, MUC5AC is physiologically expressed and is implicated in adhesion of *Helicobacter pylori* to the gastric mucosa. This adhesion is a necessary prerequisite for the pathogenesis of *H. pylori* related diseases. Here we demonstrated that, among all the oligosaccharides expressed on human gastric mucins, a new type of *O*-glycan carrying a LacdiNAc motif is implicated in the binding of the bacteria to the gastric mucosa. LacdiNAc was exclusively carried by gastric MUC5AC mucin and its expression correlated with *H. pylori* localization. All strains tested adhere strongly to LacdiNAc. Proteomic analysis and construction of mutants allowed us to identify a novel bacterial adhesin, LabA (LacdiNAc antigen binding adhesin), which specifically recognizes LacdiNAc. These findings give new insights into the mechanisms of adhesion of *H. pylori* and its specific tissue tropism. We anticipate our results to be a starting point to study implication of LDN in gastric physiology and homeostasis and for development of alternative strategies for treatment of *H. pylori* infection.

## **Publications et communications incluses dans la thèse**

### Publications

Dépôt de brevet français en décembre 2010 : Rossez, Y., Burtea, C., Laurent, S., Ballet, S., Gonzalez, W., Raynal, I., Muller, RN., Michalski, JC et Robbe-Masselot C. COMPOSES POUR LE DIAGNOSTIC DE MALADIES LIEES A L'EXPRESSION DE MUC5AC (FR 10 60497).

Rossez, Y., Gosset, P., Boneca, I.G., Magalhaes, A., Ecobichon, C., Reis, C.A., Cieniewski-Bernard, C., Maes, E., Sperandio, B., Joncquel-Chevalier-Curt, M., Slomianny, C., Sansonetti, P.J., Michalski, JC and Robbe-Masselot, C. The restricted gastric tropism of *Helicobacter pylori* is mediated by the bacteria LabA adhesin. Soumis à publication (2011).

Rossez, Y., Maes, E., Lefebvre, T., Gosset, P., Michalski, J.C. and Robbe-Masselot, C. Almost all human gastric mucin O-glycans harbor blood group A, B or H antigens. Soumis à publication dans glycobiologie (2011).

### Communications orales et écrites

Rossez, Y., Michalski, J.C. and Robbe-Masselot C. A different pattern of glycosylation for MUC5AC and MUC6 in human gastric mucosa. 10th International Workshop on Carcinoma-associated Mucins, July 2009, Cambridge, UK. (Communication orale).

Rossez, Y., Burtea, C., Laurent, S., Gosset, P., Dugué, T., Rousseaux, O., Ballet, S., Gonzalez, W., Robert, N, Muller., Michalski, J.C. and Robbe-Masselot C. Identification of peptidic ligands targeting MUC5AC for the development of contrast products adapted to the magnetic resonance imaging of human colon cancer. 11th International Workshop on Carcinoma-associated Mucins, July 2011, Cambridge, UK. (Poster).

Rossez, Y., Gosset, P., Mercier-Bonin, M., Michalski, J.C. and Robbe-Masselot, C. Glycobiology of human gastrointestinal mucins in pathophysiological conditions. Glyco 21 in Vienna, Austria, August 2011. (Poster).

## **Publications et communications non incluses dans la thèse**

### Publications

Rossez, Y., Coddeville, B., Ellass, E., Quinchon, J.F., Vidal, O., Corfield, A.P., Gosset, P., Lacroix, J.M., Michalski, J.C., Robbe-Masselot, C. Interaction between DMBT1 and galectin 3 is modulated by the structure of the oligosaccharides carried by DMBT1. Biochimie. (2010) 16, 593-603.

### Communications orales et écrites

Rossez, Y., Michalski, J.C. and Robbe-Masselot, C. *Mucin O-glycans as potential prognosis and recurrence markers of colorectal cancer.* 20<sup>th</sup> Joint Meeting, November 2009 Cologne, Germany. (Communication orale).

Rossez, Y., Gosset, P., Michalski, J.C. and Robbe-Masselot, C. *Mucin O-glycans as potential prognosis and recurrence markers of colorectal cancer.* Annual Conference of the Society for Glycobiology, November 2010 Florida, USA. (Poster).

# Abréviations

**ABTS** : sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azino-bis (3-éthylbenzotiazoline-6-sulfonique)

**ACN** : Acétonitrile

**ALP A ou B** : "adherence-associated lipoproteins A ou B"

**Nt** : Amino terminale

**AMOP** : "Adhesion-associated domain in MUC4 and Other Proteins"

**AOM** : azoxymethane

**APC** : adenomatous polyposis coli

**ATCA** : acide trichloroacétique

**BabA** : "blood group antigen binding adhesin"

**BHI** : brain heart infusion

**BMP** : "bone morphogenetic protein"

**BSA** : "bovin serum albumin"

**CagA** : "cytotoxin-associated gene A"

**Ct** : Carboxy terminales

**CCR** : cancer colorectal

**CEA** : antigène carcino-embryonnaire

**CK** : "Cystine-Knot"

**COSY** : "CORrelation SpectroscopY"

**Cosmc** : Core 1  $\beta$ 3Gal-T-specific molecular chaperon

**CPMG** : Carr-PurcellMeigboom-Gill

**CPP** : comité de protection des personnes

**CT** : "computed tomography"

**DAB** : 3,3'-diaminobenzidine

**DAPI** : 4',6'-diamidino-2-phénylindole

**DMAB** : 3,2'-diméthyl-4-aminobiphényl

**DMSO** : diméthyl sulfoxyde

**DMBT1** : “deleted in malignant brain tumor 1“

**DSS** : Dextran sodium sulfate

**DTT** : dithiothréitol

**EDTA** : éthylènediaminetétracétate

**EGF** : “epidermal growth factor-like“

**ELISA** : “enzyme-linked immunosorbent assay“

**RE** : réticulum endoplasmique

**ESI-MS-MS** : spectrométrie de masse en tandem par ionisation en mode electrospray

**FAP ou PAF** : polypose adénomateuse familiale

**FCA ou ACF** : “Aberrant Crypt Foci“ ou foyer de cryptes aberrantes

**Fcgbp** : IgG Fc binding protein

**FITC** : fluorescéine isothiocyanate

**FPLC** : “fast protein liquid chromatography“

**Fuc** : fucose

**DBA** : *Dolichos biflorus* agglutinin

**GalNAc et GlcNAc** : *N*-acétylgalactosamine et *N*-acétylglucosamine

**Gal** : galactose

**GalNAcol** : *N*-acétylgalactosaminitol

**GAPDH** : glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase

**Gd** : gadolinium

**Gd-DTPA** : “gadolinium-diethylenetriaminepentaacetic acid“

**GRE** : “breath-hold 3D gradient-echo“

**HES** : hémalun éosine safran

**HexNAc** : *N*-acétyl hexosamine

**HMG** : “Human Gastric Mucin“

**Hop** : “*H. pylori* outer membrane protein“

**Hor** : Hop related

**HPLC** : “high performance liquid chromatography“

**HP-NAP** : *H. pylori* neutrophil activating protein

**HNPCC** : “hereditary non polyposis colorectal cancer“

**HSQC** : “Heteronuclear Single Quantum Coherence“

**IL-6 et 8**: interleukine 6 et 8

**IPTG** : isopropyl-beta-D-thiogalactoside

**IRM** : Imagerie par résonance magnétique

**LabA** : “LacdiNAc antigen binding adhesin“

**Le<sup>a</sup>** : antigène Lewis<sup>a</sup>

**Le<sup>b</sup>** : antigène Lewis<sup>b</sup>

**Le<sup>x</sup>** : antigène Lewis<sup>x</sup>

**Le<sup>y</sup>** : antigène Lewis<sup>y</sup>

**LDN** : N,N'-diacetyllactosediamine ou LacdiNAc

**LH** : lutropine

**LPS** : lipopolysaccharide

**K<sub>D</sub>** : constante de dissociation à l'équilibre

**MALDI** : “Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation“

**MALT** : “mucosa-associated lymphoide tissue“

**Man** : mannose

**MI** : métaplasie intestinale

**MICI** : maladies inflammatoires chroniques de l'intestin

**MMP** : métalloprotéase matricielle

**MNNG** : Methyl-N'-Nitro-N-Nitroso-Guanidine

**MSI** : microsatellite instability

**NBI** : “Narrow Band Imaging“

**NeuAc** : acide N-acétylneuraminique

**NIDO** : nidogène

**NIH** : “National Institutes of Health“

**OipA** : “outer inflammatory protein A“

**OMP** : “outer membrane protein“

**PAA** : polyacrylamide

**PAI** : “pathogenicity island“

**PAGE** : électrophorèse en gel de polyacrylamide

**PAS** : acide périodique et réactif de Schiff

**PCR** : “polymerase chain reaction“

**PCS** : “photon correlation spectroscopy“

**PEG** : polyéthylène glycol

**TEP** : positron emission tomography

**PFBB** : protein free blocking buffer

**PMA** : phorbol myristate acetate

**PMSF** : phénylméthylsulfonylfluorure

**PPI** : pour préparations injectables

**PTS** : proline, thréonine et sérine

**Qsp** : quantité suffisante pour

**RARE** : “rapid acquisition with relaxation enhancement“

**RCH** : recto-colite hémorragique

**REL** : réticulum endoplasmique lisse

**RELM $\beta$**  : Resistin-like molecule  $\beta$

**RER** : réticulum endoplasmique rugueux

**RMN** : résonance magnétique nucléaire

**ROESY** : Rotating Overhauser Effect Spectroscopy

**RT-PCR** : Reverse transcriptase-PCR

**RU** : unité de résonance

**R.P.M.** : “rotation per minute“

**SabA** : “sialic acid binding adhesin“

**SDS** : sodium dodecyl sulfate

**SEA** : “Sea urchin sperm protein Enterokinase and Agrin”

**SI** : “Signal Intensity“

**SOACS** : “Sum Of Anomeric Chemical Shifts“

**SPIO** : “Small Particles of Iron Oxide“

**SRCR** : “scavenger receptor cystein-rich“

**TFA** : “Trifluoroacetic acid“

**TFF-1** : “trefoil factor 1“ ou peptide en trèfle 1

**TFP1** : “tissue factor pathway inhibitor“

**TFSS** : système de sécrétion de type IV

**TNM** : Tumor Node Metastasis

**TOCSY** : T<sup>O</sup>tal Correlation Spectroscop<sup>Y</sup>

**TOF** : “time of flight“

**TR** : “tandem repeat“

**TSH** : thyrotropine

**UEA** : *Ulex europaeus* agglutinin

**USPIO** : “Ultrasmall Particles of Iron Oxide”

**VacA** : vacuolating cytotoxin A

**VNTR** : répétitions en tandem en nombre variable

**VWF** : von Willebrand factor

**WFA** : *Wisteria floribunda* agglutinin

**Xgal** : 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside

# Sommaire

## Implications biologiques et pathologiques de la mucine MUC5AC dans le tractus gastro-intestinal

Introduction	1
<u>Exposé bibliographique</u>	3
I Le tractus gastro-intestinal	4
1. Anatomie	4
1.1. L'estomac	4
1.2. L'intestin grêle	6
1.3. Le gros intestin	6
2. Structure générale du tractus gastro-intestinal	7
3. Histologie du tractus gastro-intestinal	10
II Le mucus gastro-intestinal	15
1. Caractéristiques générales	15
2. Les mucines	18
2.1. Les mucines-like	20
2.2. Les mucines membranaires	21
2.3. Les mucines sécrétées	22
2.3.1 MUC2	24
2.3.2 MUC5AC	24
2.3.3 MUC6	25
3. Glycosylation des mucines	25
3.1. La O-glycosylation	25
3.1.1 Noyaux glycaniques	26
3.1.2 Squelettes glycaniques	29
3.1.3 Périphéries glycaniques	30
3.2. La N-glycosylation	32
3.3. La C-glycosylation	34
III Implication de MUC2, MUC5AC et MUC6 dans les pathologies du tractus gastro-intestinal	35
Le cancer colorectal	37

1. Epidémiologie	37
2. Histoire naturelle du cancer du côlon	37
2.1 Les foyers de cryptes aberrantes	41
2.2 Polypes	42
3. Classification du cancer colorectal	43
4. Dépistage et diagnostic	45
4.1 La recherche d'hémoglobine dans les selles	46
4.2 L'imagerie du côlon	47
4.2.1 L'IRM	49
4.2.2 La microendoscopie	53
5. Les modèles animaux du cancer colorectal et MUC5AC	54
5.1 Les xénogreffes murines	54
5.2 La chimio-induction chez les rongeurs	54
5.3 Autres modèles décrits	56
<i>Helicobacter pylori</i>	57
1. Historique	57
2. Microbiologie	58
3. Infections et maladies associées	59
4. Facteurs de virulence	61
5. Mécanismes d'adhésion utilisés par <i>Helicobacter pylori</i>	66
6. <i>Helicobacter pylori</i> et les mucines sécrétées	69
<u>Matériels et méthodes</u>	71
<u>Résultats</u>	88
MUC5AC et le cancer colorectal	89
Discussion	131
MUC5AC et <i>Helicobacter pylori</i>	135
Discussion	161
<u>Annexes</u>	168
<u>Bibliographie</u>	179

# Introduction

L'épithélium gastro-intestinal est recouvert d'une couche de mucus lui conférant une protection contre des agressions de nature chimique, mécanique mais aussi bactérienne. Les constituants organiques majeurs de ce gel sont des glycoprotéines appelées mucines. Ces molécules ont des caractéristiques biochimiques qui leur sont propres, avec un taux de glycosylation allant jusqu'à 80% du poids total, la propriété de s'oligomériser, d'être peu soluble et d'avoir une masse moléculaire dépassant le million de dalton. L'ensemble de ces caractéristiques sont responsable de la viscosité du mucus.

Dans l'estomac, les mucines majeures, MUC5AC et MUC6 sont le premier rempart contre les enzymes et acides sécrétés de cet organe. Très peu de bactéries sont capables de survivre dans ces conditions hostiles ; *Helicobacter pylori* est la seule à être capable de persister à long terme. L'étape indispensable pour sa survie est son adhésion à l'épithélium gastrique ; ce qui est possible par les différentes structures glycaniques portées par les mucines. Une fois durablement installée dans l'estomac, *H. pylori* peut induire une inflammation chronique pouvant évoluer jusqu'au cancer. L'objectif de ce travail a donc été de caractériser de façon exhaustive sur de nombreux individus le profil de *O*-glycosylation des mucines gastriques afin d'identifier les glycanes intervenant dans l'adhésion de *H. pylori*. Ceci dans le but d'identifier de nouvelles stratégies d'éradication de *H. pylori*. Au cours de ce travail un nouveau motif *O*-glycanique, le LacdiNAc (LDN), a été identifié pour la première fois et porté uniquement par MUC5AC gastrique. Par différentes analyses, nous avons démontré que toutes les souches bactériennes testées d' *H. pylori* étaient capables de se fixer au LDN. Des analyses protéomiques nous ont permis, ensuite, d'identifier l'adhésine bactérienne capable de reconnaître le LDN, ce qui, par la suite, nous a conduits à générer le mutant correspondant. La propension à exprimer le LDN de différents modèles animaux pour l'infection à *H. pylori* a également été testée ce qui permettra de tester les futures applications de cette découverte pour éradiquer *H. pylori*.

La seconde partie de ce travail concerne le diagnostic du cancer colorectal par imagerie IRM. Pour cela un marqueur exprimé très précocement lors de la carcinogénèse colique, MUC5AC, s'est avéré être une bonne cible. En effet, les différentes propriétés des mucines et leur localisation en surface de l'épithélium peuvent en faire des cibles pour le développement de techniques d'imagerie de dépistage et de suivi du cancer colorectal. Le développement de tels outils est souvent freiné par la localisation intracellulaire des molécules

pouvant servir de biomarqueur, ce qui les rend difficiles à observer en imagerie. Le travail a donc débuté par la purification de MUC5AC à partir de pièces tumorales coliques, puis la sélection d'un heptapeptide par la technique du phage display, la synthèse et de conjuguer à un produit de contraste ce peptide. Pour ensuite évaluer sur modèles animaux, préalablement développés, la spécificité du produit par analyse IRM. Ce travail a permis la mise au point d'un nouvel outil d'imagerie moléculaire pour cibler le cancer colorectal.

# *Exposé bibliographique*

# I Le tractus gastro-intestinal

Le tractus gastro-intestinal est une voie de passage des aliments qui débute à la cavité buccale et se termine à l'anus (Figure 1). Il permet l'acheminement, la digestion chimique et enzymatique des aliments (enzymes et des variations de pH) et leur brassage par péristaltisme.

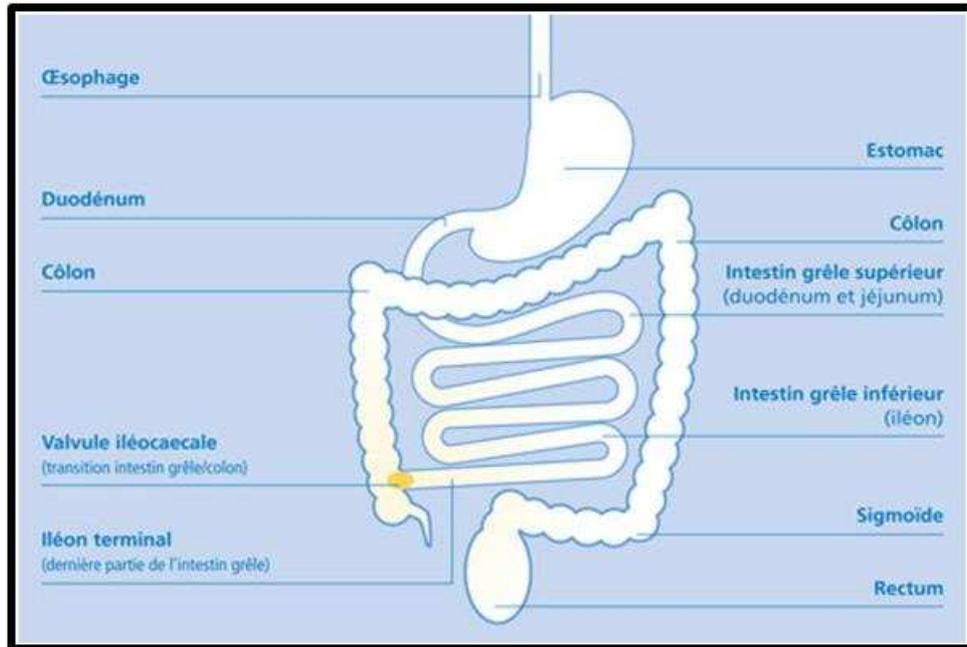


Figure 1 : Organisation générale du tractus gastro-intestinal d'après <http://www.autoimmun.ch>.

## 1. Anatomie

### 1.1 L'estomac

L'estomac est composé d'une première zone appelée cardia qui est directement reliée à l'œsophage dans sa partie supérieure et fait jonction avec le fundus qui est suivi du corps et de l'antrum. L'extrémité inférieure de l'estomac, le pylore, s'abouche au duodénum qui est la partie supérieure de l'intestin grêle. L'estomac peut être plus simplement divisé en deux parties, la partie proximale et la partie distale. La première comprend le cardia, le fundus et la moitié du corps tandis que la seconde comprend l'autre moitié du corps, l'antrum et le pylore (Figure 2).

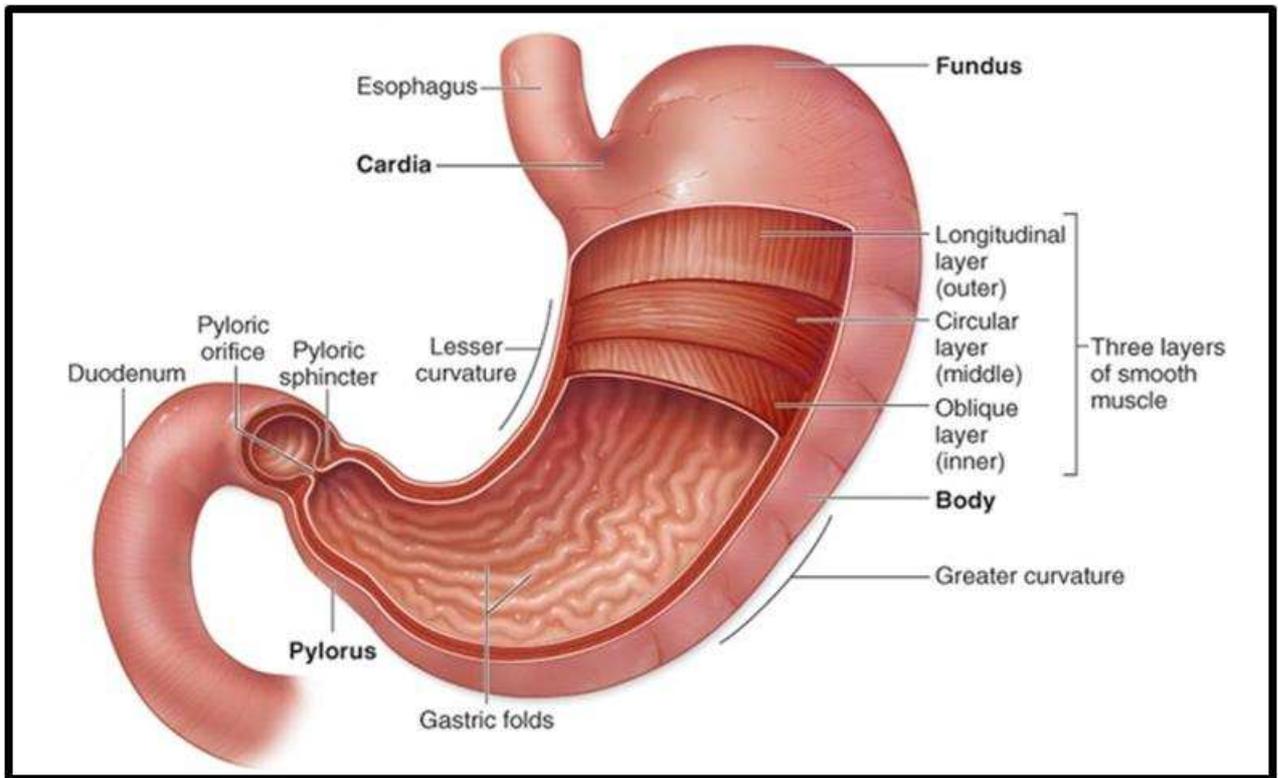


Figure 2 : Anatomie de l'estomac d'après <http://academic.kellogg.edu/herbrandsonc>.

Cette distinction tient compte de la propriété de l'estomac à faire varier sa taille en fonction de son remplissage puisque c'est surtout la partie proximale de l'estomac qui est capable d'augmenter de volume grâce à une puissante musculature circulaire, une couche interne de fibres musculaires s'étendant obliquement et une couche musculaire longitudinale externe au niveau des courbures. Sa longueur moyenne est d'environ 25 centimètres et a une capacité maximale d'1,6 litres. L'estomac sécrète 3 à 4 litres par jour de suc gastrique, composé d'eau, d'enzymes hydrolytiques (pepsines et lipases), d'HCl, du facteur intrinsèque, d' $\text{HCO}_3^-$  et de mucines. Le suc gastrique est sécrété à un pH d'environ 0,8 mais est tamponné à 2-4 par le chyme, ce qui est proche des valeurs optimales d'action de ses enzymes hydrolytiques. Cette acidité permet, d'une part, de dénaturer les protéines alimentaires et d'autres part, de tuer la plupart des bactéries, faisant de cet organe un environnement pauvre en espèces bactériennes.

## 1.2 L'intestin grêle

L'intestin grêle ou petit intestin débute au pylore, limite distale de l'estomac, et se termine à la valvule iléo-caecale, limite proximale du gros intestin. Il se divise en trois parties: le duodénum, le jéjunum et l'iléon (Figure 3).

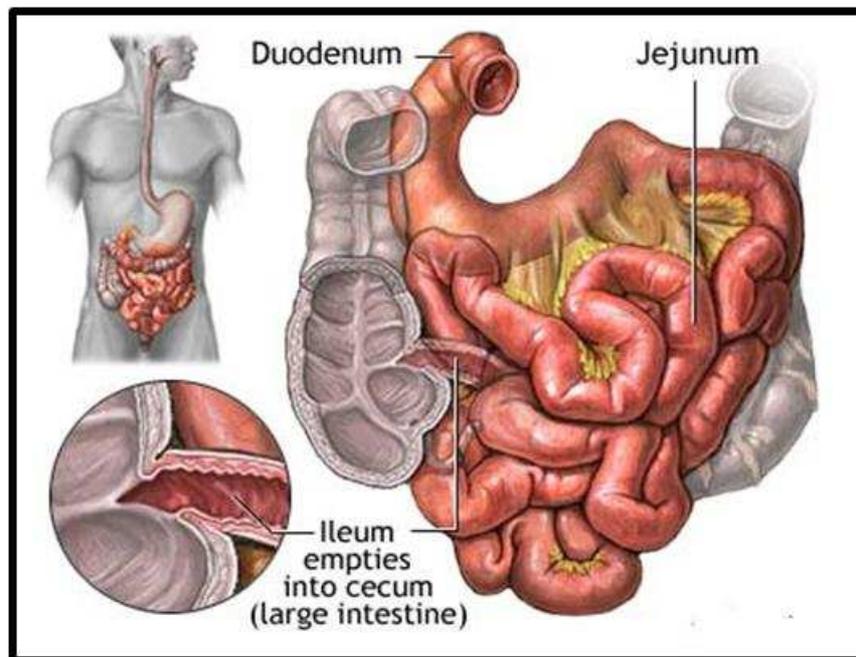


Figure 3 : Anatomie de l'intestin grêle d'après <http://www.daviddarling.info/encyclopedia>.

Sa taille peut varier de 4 à 7 mètres pour un diamètre d'environ 5 centimètres. Le duodénum intervient dans la neutralisation de l'acidité gastrique, d'une part par sa sécrétion de mucus riche en  $\text{HCO}_3^-$  et d'autre part, il est relié au cholédoque (régulé par le sphincter d'Oddi) qui y déverse la bile. La bile, outre sa fonction dans la digestion des lipides, est également riche en ions  $\text{HCO}_3^-$ . Le jéjunum et l'iléon sont principalement impliqués dans l'absorption des produits de dégradation des aliments, de l'eau, des électrolytes et des vitamines. Pour parfaire à ses fonctions, l'intestin grêle possède des caractéristiques anatomiques destinées à en accroître la surface. En effet, ces tissus épithéliaux forment un nombre considérable de replis. Ceux-ci sont plus marqués dans le jéjunum et s'atténuent à la partie distale du grêle, ce qui s'accroît par la présence de villosités et de microvillosités.

## 1.3 Le gros intestin

La dernière partie du tube digestif est constituée du gros intestin qui se situe dans le prolongement de l'intestin grêle. Il mesure 1,50 mètres de longueur en moyenne et est divisé

en trois parties : le caecum, auquel se rattache l'appendice, le côlon puis le rectum. Le côlon est lui-même subdivisé en quatre segments : ascendant, transverse, descendant et sigmoïde (Figure 4).

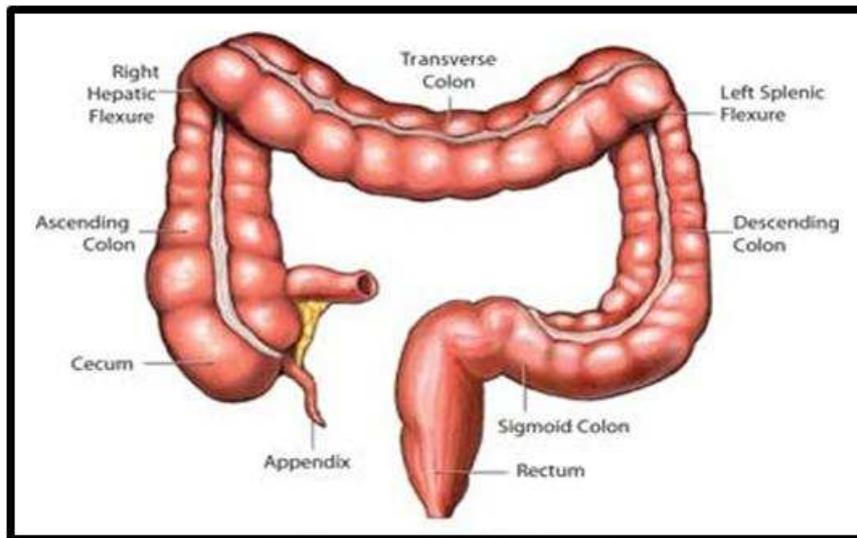


Figure 4 : Anatomie du gros intestin d'après <http://www.crcftlauderdale.com/education>.

Le côlon est ensuite relié au rectum, lui-même se terminant par le canal anal. Le gros intestin a deux fonctions principales. Il sert de lieu de stockage pour le contenu intestinal et permet de poursuivre la réabsorption de l'eau et des électrolytes débutée dans l'intestin grêle. Le gros intestin peut réduire à 100-200 mL environ les 500 à 1500 mL de bol alimentaire quotidiennement en transit.

## 2. Structure générale du tractus gastro-intestinal

Sur toute sa longueur, le tractus gastro-intestinal possède une paroi faite de cinq tuniques concentriques représentées à partir de la lumière : la **muqueuse** (comprenant un chorion de tissu conjonctif et un épithélium de revêtement bordant la lumière), la **musculaire-muqueuse** (faite de cellules musculaires lisses), la **sous-muqueuse** (faite de tissu conjonctif), la **musculeuse** (faite de cellules musculaires lisses) et la **séreuse** encore appelée adventice (faite de tissu conjonctif). En fonction de la localisation dans le tractus, on constatera des différences histologiques propres à chaque étage du tube digestif en relation avec la fonction physiologique (Figure 5).

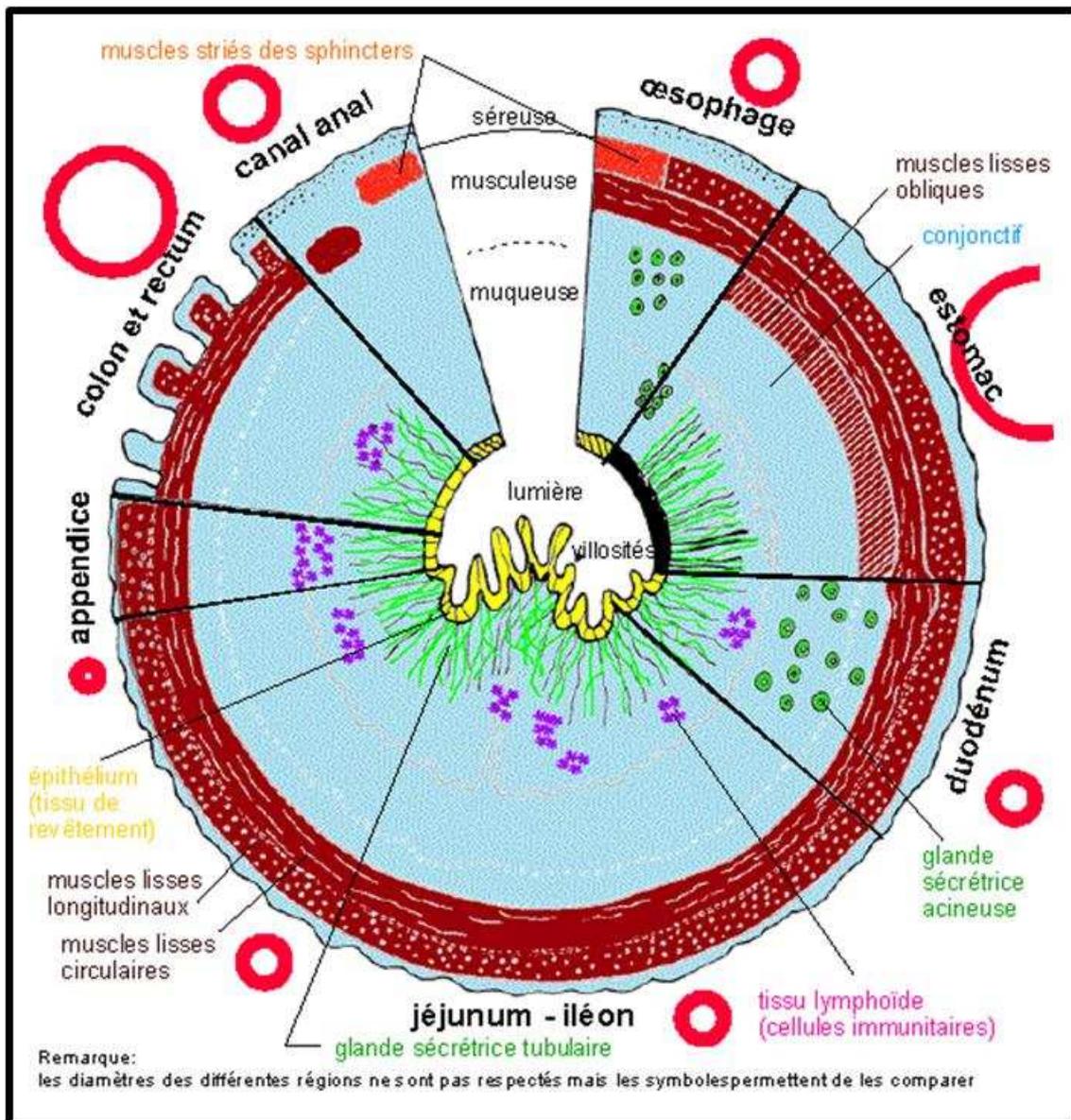


Figure 5 : Schéma général des tissus du tractus gastro-intestinal d'après Précis de Physiologie, Doin, 1997.

Le tube digestif participe principalement à la digestion des aliments par trois caractéristiques anatomiques : l'épithélium de revêtement, ses glandes et sa musculature lisse. L'ensemble de ces particularités permettent l'absorption des aliments, la protection, la lubrification et la dégradation des aliments ainsi que leur brassage mécanique. De plus, le tube digestif joue un rôle certain dans la défense immunitaire par la présence de tissus lymphoïdes peu denses dans la sous-muqueuse et des plaques de Peyer siégeant dans le chorion de la muqueuse de la partie terminale de l'iléon, l'ensemble de ces tissus forme les MALT (Mucosa-associated lymphoid tissue). Le tractus gastro-intestinal participe aussi à la sécrétion d'hormones par les cellules endocrines qui le composent, disséminées le long de l'épithélium intestinal et représentant 1% des cellules épithéliales.

Trois types d'épithélium se partagent le revêtement interne du tractus gastro-intestinal.

**Un épithélium de protection mécanique**, présent d'une part dans l'œsophage et d'autre part dans le canal anal. Il s'agit d'un épithélium pavimenteux stratifié non kératinisé excepté dans les deux derniers tiers du canal anal.

**Un épithélium de protection chimique**, afin de prévenir des attaques du suc gastrique tout en lubrifiant le tissu stomacal. Il est donc exclusivement situé dans l'estomac et constitué d'un épithélium simple. A son extrémité au contact de la lumière, il forme des glandes qui s'invaginent et forment des cryptes.

**Un épithélium d'absorption** retrouvé essentiellement dans l'intestin, du duodénum au rectum, constitué d'un épithélium prismatique simple. La surface d'échange entre ce tissu et la lumière est amplifiée directement par les replis de l'organe, formant des anses intestinales, par l'existence de replis macroscopiques appelés valvules conniventes ou de kerckring de la muqueuse à la sous-muqueuse. Mais aussi, de multiples villosités formées par la muqueuse qui sont des projections digitiformes de cette dernière et de microvillosités visibles en microscopie électronique portées par certaines cellules épithéliales (entérocytes). Ces villosités sont toutes de même longueur, de même calibre et parallèles, leur donnant un aspect strié d'où le nom de cette structure, plateau strié ou bordure en brosse. L'ensemble de ces caractéristiques anatomiques et histologiques visant à amplifier la surface d'échange sont toutes présentes dans le jéjunum et l'iléon, comme le démontrent les surfaces d'absorption présentées dans le tableau 1. En effet, au niveau du gros intestin, il n'y a plus d'anse, de valvule connivente et de villosité, seuls subsistent quelques rares entérocytes.

Tableau 1 : Taille et surface des segments du tractus gastro-intestinal.

	Longueur (cm)	Diamètre (cm)	Surface d'absorption (m <sup>2</sup> )
Estomac	25	15	0,11
Duodénum	25	5	0,09
Jéjunum	300	5	60
Iléon	60	5	60
Caecum	10	7	0,05
Côlon	150	5	0,15
Rectum	20	2,5	0,015

Le tractus gastro-intestinal est composé de différents types de glandes exocrines sécrétant toutes du mucus et certaines parmi elles sécrètent également des ions ou des enzymes. Les glandes cardiales et pyloriques sont respectivement situées dans le chorion de la muqueuse cardiale et pylorique. A l'instar des glandes de Brünner, qui sont situées dans la sous-muqueuse du duodénum, ces glandes sécrètent uniquement du mucus. A l'inverse, les glandes fundiques et de Lieberkühn se retrouvent respectivement dans le chorion de la muqueuse gastrique fundique/antrale et de l'intestin grêle. Celles-ci sécrètent, outre du mucus, des ions et des enzymes hydrolytiques (pepsines et lipases) pour les premières et des peptides et enzymes antimicrobiens (lysozymes) pour les secondes.

### **3. Histologie du tractus gastro-intestinal**

L'épithélium gastro-intestinal est composé de différents types cellulaires dont la nature est dépendante de l'organe dans lequel il se trouve. La diversité des types cellulaires nécessite tout d'abord une régulation très fine de la différenciation depuis les **cellules souches** jusqu'au phénotype final. Les cellules souches pluripotentes sont à l'origine des différents types cellulaires et ont une activité intense permettant un remplacement continu des cellules épithéliales. Elles sont localisées au fond des cryptes dans le gros intestin, à quatre cellules du fond des cryptes dans l'intestin grêle et dans le premier tiers supérieur dans l'estomac (appelé spécifiquement dans l'estomac, isthmus). Elles deviennent progénitrices, proliférantes, précurseurs et enfin cellules différenciées, tout en se déplaçant dans l'axe glandulaire en fonction du type cellulaire en devenir. Le contrôle s'effectue via des signaux envoyés entre cellules épithéliales (voie NOTCH) ou entre cellules épithéliales et mésenchymateuses (voies Wnt, Hedgehog, BMP) (Figure 6).

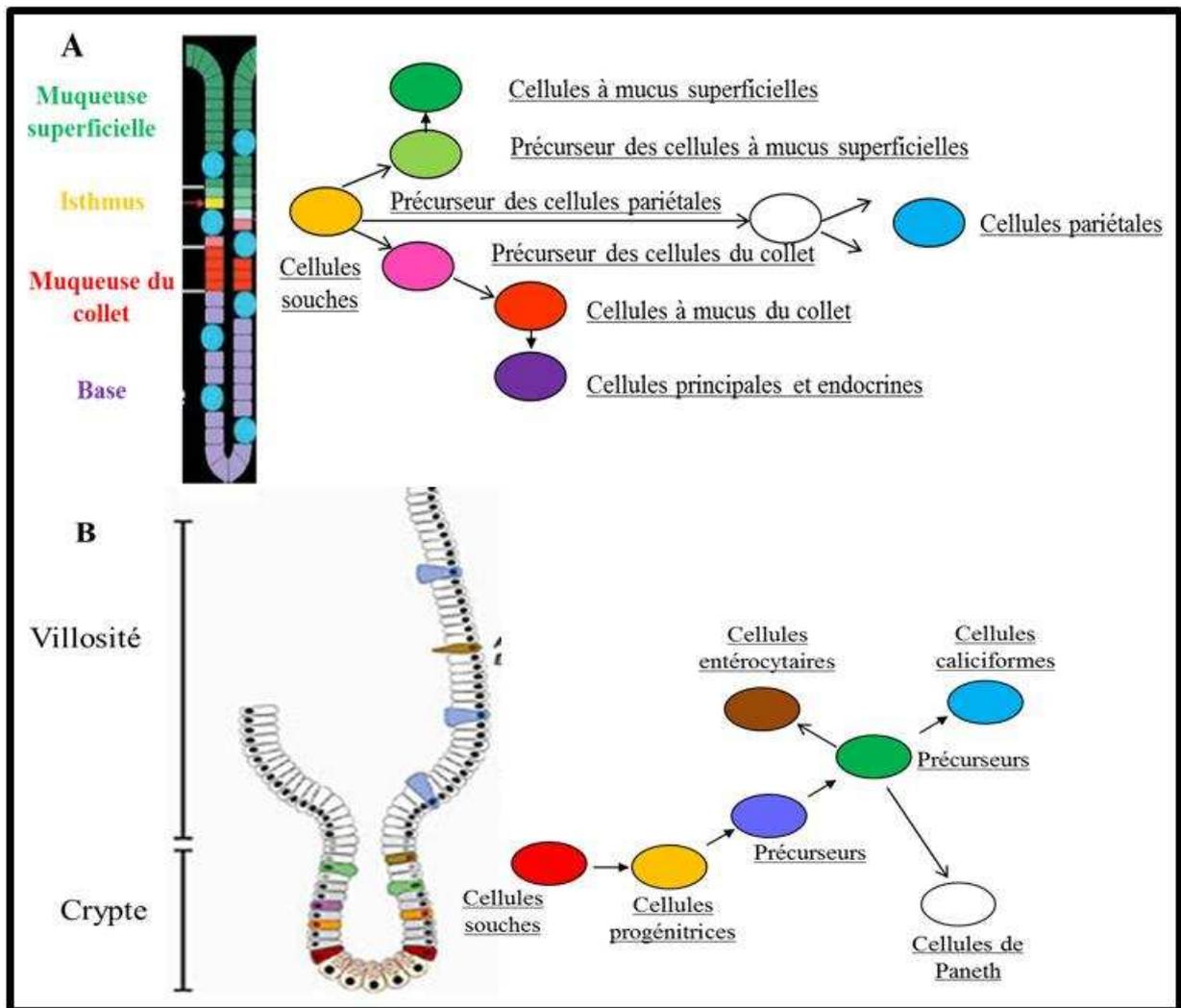


Figure 6 : Régulation de la prolifération et de la différenciation épithéliale dans l'estomac et l'intestin grêle adapté de Karam *et al.*, 2004 et de Gregorieff *et al.*, 2005.

Parmi les cellules épithéliales différenciées, certaines sont spécifiques d'organes ou de zones anatomiques très délimitées leur conférant des propriétés physiologiques propres.

Dans l'estomac, trois types de glandes sont retrouvées, les glandes cardiales, fundiques et pyloriques. Les propriétés qu'ont les glandes fundiques à produire de l'HCl et différentes enzymes, sont respectivement dues à la présence de deux types cellulaires distincts, les cellules pariétales (encore appelées bordantes ou oxyntiques) et les cellules principales. Les **cellules pariétales**, très volumineuses, arrondies et riches en mitochondries, ne sont pas retrouvées en périphérie de la glande mais dans la portion médiane (Figure 7).

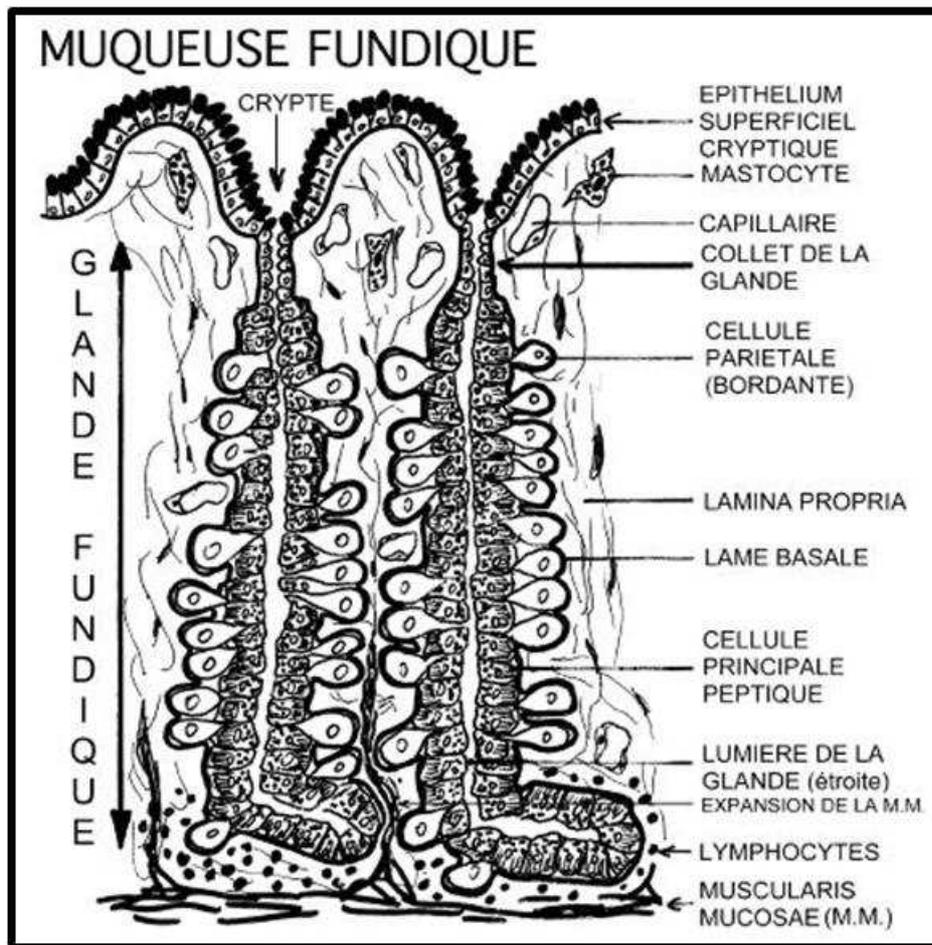


Figure 7 : Organisation histologique des glandes fundiques d'après <http://homepage.mac.com/danielbalas/HISTOLOGIE/EPITHDIG/estomac/estomac.htm>.

Un mince prolongement de leur cytoplasme rejoint la lumière puisqu'elles semblent être comme repoussées par les cellules principales. Les cellules pariétales sont capables, sous l'action d'une pompe  $H^+/K^+-ATPase$  présente à leur membrane luminale, de produire des ions  $H^+$ . Les ions  $K^+$  accumulés dans la cellule retournent dans la lumière par un canal  $K^+$  également présent à la membrane luminale. A chaque proton sécrété, sous l'action de l'anhydrase carbonique, un ion  $HCO_3^-$  quitte la cellule du côté basolatéral pour se retrouver dans le sang en échange d'un ion  $Cl^-$  sous l'action d'un transporteur d'anions. Les ions  $Cl^-$  sont accumulés dans la cellule pour être ensuite relargués par un canal  $Cl^-$  dans la lumière. De cette façon, chaque ion  $H^+$  est sécrété accompagné d'un ion  $Cl^-$ . Les cellules pariétales sécrètent, par ailleurs, une glycoprotéine appelée facteur intrinsèque (ou facteur de Castle) et qui lie la vitamine B12, la protégeant ainsi de la dégradation. Les **cellules principales** (chief cells), les plus représentées dans les glandes fundiques, sont retrouvées dans les deux tiers inférieurs de celles-ci. Elles possèdent de nombreuses vésicules de sécrétion contenant divers

proenzymes dont le plus représenté est le pepsinogène. Lorsque ce proenzyme est au contact du milieu gastrique acide, il va alors, par élimination autocatalytique d'un peptide qui le rendait inactif, se transformer en pepsine active. La forme active est une endopeptidase qui hydrolyse préférentiellement les liaisons peptidiques où est engagé le groupement aminé d'un aminoacide aromatique (Phe, Tyr). Différentes autres enzymes comme la chymosine (retrouvé chez les nouveaux-nés) connue pour précipiter la caséine du lait et la triacylglycerol lipase dégradant les graisses sont retrouvées dans le suc gastrique.

Un type cellulaire est spécifique au caecum et au côlon proximal, trouvé au fond des glandes de Lieberkühn, les **cellules de Paneth**. Ces cellules sont capables de sécréter des peptides antimicrobiens et enzymes tels que les cryptidines, les défensines et le lysozyme mais aussi de phagocyter. Ces propriétés confèrent à la cellule de Paneth une fonction dans la défense innée et le contrôle de la flore bactérienne. Par ailleurs, lorsque ces cellules sont retrouvées dans des régions plus distales du côlon, ceci est associé avec un changement métaplasique du tissu, signe d'une infection chronique aux origines souvent incomprises. (Bansal *et al.*, 1984 ; Tanaka *et al.*, 2001). Tout comme les cellules de Paneth, les **entérocytes** sont uniquement retrouvés dans le petit et gros intestin. Leur fonction est, par contre, différente puisque les entérocytes possèdent une faculté d'absorption importante due à la présence de microvillosités à leur pôle apical. Ces cellules sont indispensables à l'absorption des nutriments, d'électrolytes, d'eau et de vitamines pour l'intestin grêle et d'eau pour le côlon dans une moindre mesure. Il existe deux grands types d'absorption, soit par voie paracellulaire soit par voie transcellulaire. La voie paracellulaire, exploite les jonctions serrées présentes au pôle apical des entérocytes en utilisant les ions  $\text{Na}^+$ , absorbés par différents mécanismes (Diffusion, cotransport ou transport actif) pour absorber l'eau, des ions et de petites molécules hydrosolubles. Tandis que la voie transcellulaire utilise des mécanismes comme l'endocytose et des transporteurs (actifs ou passifs) pour absorber les molécules de taille plus importante. L'entérocyte est le type cellulaire le plus représenté dans l'intestin grêle et est en moindre quantité dans le côlon. De plus, ils sont recouverts à leur pôle apical par le glycocalyx (glycoprotéines et glycolipides membranaires) jouant un rôle dans la protection des membranes cellulaires. De très nombreuses enzymes hydrolytiques (peptidases, disaccharidases...) sont présentes au niveau du plateau strié des entérocytes. Ces enzymes sont soit directement synthésées par les entérocytes soit issues du bol alimentaire en cours de digestion. Ces enzymes assurent l'hydrolyse des peptides et des glucides alimentaires avant leur passage vers la circulation sanguine en vue de leur assimilation par l'organisme.

A l'inverse des entérocytes, les **cellules endocrines** (ou entéro-chromaffines) sont retrouvées tout au long du tractus gastro-intestinal. Ce sont des cellules polarisées portant des microvillosités et piriformes, réactives à la composition du contenu luminal. Elles synthétisent et sécrètent des amines (histamine, sérotonine) et des polypeptides (proglucagon). Plusieurs types de cellules endocrines sont répartis tout au long du tube digestif. Chaque type sécrète une hormone donnée et possède une localisation préférentielle (Tableau 2). Par exemple, les cellules D qui sécrètent la somatostatine sont retrouvées de l'estomac au côlon en passant par le pancréas. A l'inverse, les cellules G qui produisent la gastrine ne sont localisées que dans l'antré et le duodénum proximal. Ce système de régulation endocrinien participe à de nombreuses fonctions digestives comme la motricité, les sécrétions d'enzymes, de mucines ou d'ions.

Tableau 2 : Les différentes cellules endocrines du tractus gastro-intestinal d'après Rindi *et al.*, 2000. EC : entérochromaffine, GLI : preproglucagon, pYY : peptide tyrosine tyrosine, PP : pancréatique polypeptide, ECL : enterochromaffin-like, CCK : cholécystokinine, GIP : gastric inhibitory polypeptide.

Cellule	Sécrétion principale	Estomac		Intestin grêle			Gros intestin		
		Fundus	Antré	Duodénum	Jéjunum	Iléon	Appendice	Côlon	Rectum
P/D <sub>1</sub>	Ghréline	+	rare	rare	rare	rare			
EC	Sérotonine	+	+	+	+	+	+	+	+
D	Somatostatine	+	+	+	+	rare	rare	rare	rare
L	GLI/pYY			rare	+	+	+	+	+
A	Glucagon	Fœtus							
PP	PP			Fœtus					
ECL	Histamine	+							
G	Gastrine		+	+					
CCK/I	CCK			+	+	rare			
S	Sécrétine			+	+				
GIP	GIP			+	+		rare		
M	Motiline			+	+		rare		
N	Neurotensine			rare	+		+		

Le dernier type cellulaire retrouvé dans tout le tractus gastro-intestinal est la **cellule caliciforme** (goblet cells ou cellule à mucus), que l'on retrouve cependant en plus grande quantité dans le gros intestin. Il en existe de deux types dans les glandes gastriques, à la surface, les cellules de la muqueuse superficielle (pits cells) et dans la zone intermédiaire, les cellules à mucus du collet (neck cells). Toutes les cellules à mucus contiennent de nombreux et volumineux granules de sécrétion, qui occupent la majeure partie de la cellule lui donnant son aspect de calice. Ces granules contiennent les constituants protéiques et glycoprotéiques du mucus, dont le plus important est la mucine. Les mucines sont des glycoprotéines de haut poids moléculaire et fortement glycosylées. MUC2 est la seule mucine sécrétée présente de

l'intestin grêle au gros intestin en condition physiologique. L'estomac contient, quant à lui chez les individus sains, MUC5AC à sa surface et MUC6 dans le fond de ses glandes. La sécrétion du mucus s'effectue par exocytose, après fusion de la membrane des granules avec la membrane apicale cellulaire. Lorsque les granules sont sécrétés, les mucines qu'ils contiennent s'hydratent, ce qui entraîne le gonflement du granule et son éclatement, permettant la libération du mucus dans la lumière. Cependant, il est possible que certains granules fusionnent à l'intérieur de la cellule avant exocytose entraînant ce que l'on appelle une exocytose composée (Specian & Neutra., 1980 ; Puchelle *et al.*, 1991). Les granules des cellules caliciformes du tractus gastro-intestinal, contiennent de petites protéines et glycoprotéines dont de récents travaux ont augmenté la diversité de façon croissante. Les peptides en trèfles ou TFF (trefoil factor) sont les plus connus. Il en existe de trois types numérotés de 1 à 3, différenciellement exprimés dans le tractus. Ils sont toujours associés aux mucines, participent à la viscosité du mucus et sont impliqués dans la régénération tissulaire (Taupin & Podolovsky, 2003). RELM $\beta$  (Resistin-like molecule  $\beta$ ), fcgbp (IgG Fc binding protein) et DMBT1 (Deleted in malign brain tumor 1) ont été identifiés récemment, comme participant à la réponse immunitaire et dans la stabilité du gel de mucus (Kobayachi *et al.*, 2002 ; Kang & Reid, 2003 ; Artis *et al.*, 2004). Une fois le contenu des vésicules des cellules à mucus dans la lumière, d'autres composés organiques et inorganiques viennent enrichir sa composition, comme des déchets cellulaires. En effet, les cellules gastro-intestinales se renouvellent selon le même mode appelé anoïkis qui consiste au détachement régulier de celles-ci (3 à 5 jours) vers la lumière pour y être ainsi éliminées.

## **II Le mucus gastro-intestinal**

Les constituants majeurs du contenu des granules de sécrétion des cellules caliciformes sont les mucines, elles ne représentent cependant que 5% du mucus une fois qu'il est sécrété. Plus de 90% est composé par de l'eau et le restant sont des électrolytes (Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, K<sup>+</sup>...), des composés organiques tels que des protéines et débris cellulaires, des immunoglobulines (IgA, IgG et IgM), lipides et acides nucléiques.

### **1. Caractéristiques générales**

La surface de l'épithélium du tractus gastro-intestinal des mammifères est revêtue d'une couche protectrice de mucus. Elle forme un gel entre le tissu sous-jacent et la lumière. Il existe deux formes de mucus (Allen, 1977, 1978) : un gel insoluble dans l'eau, d'épaisseur

variable, adhérent à la muqueuse (firm) et une couche visqueuse hydrosoluble qui recouvre la première couche (loose), directement en contact avec le milieu extérieur (Figure 8). Il n'existe pas de différence de composition entre les deux phases du mucus qui pourrait expliquer les propriétés physicochimiques divergentes. Seul diffère le degré de condensation du mucus, quand il est adhérent, le mucus est compact, dans le second cas, plus hydraté et volumineux. Ceci pourrait s'expliquer par l'action d'enzymes protéolytiques de l'hôte pouvant influencer sur l'organisation du réseau de mucus (Johansson *et al.*, 2008).

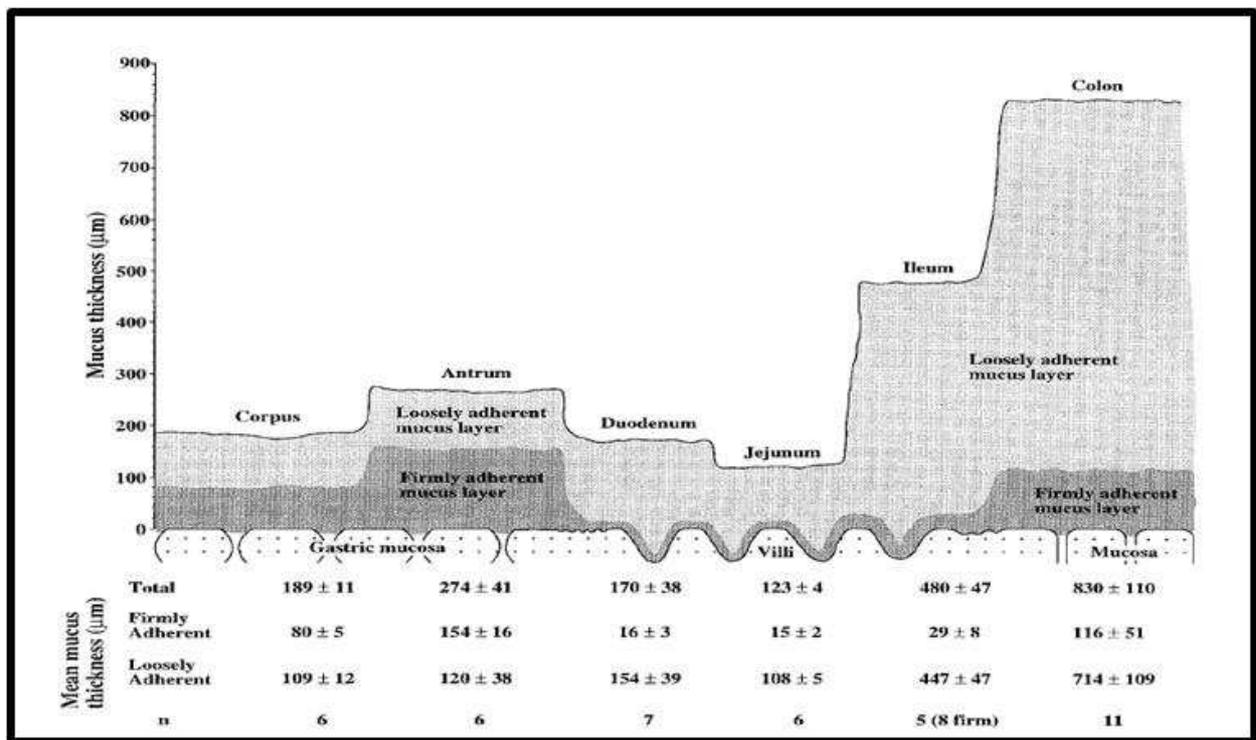


Figure 8 : Organisation du gel de mucus dans le tractus gastro-intestinal d'après Atuma *et al.*, 2001.

Les fonctions du mucus dans le tractus gastro-intestinal sont multiples. Tout d'abord, il joue un rôle dans la **protection mécanique** du tissu qu'il recouvre en favorisant l'avancée du bol alimentaire et de ses intermédiaires par lubrification. Cette propriété est induite par la couche visqueuse directement présente dans la lumière et permet de minimiser les différentes forces exercées au cours du passage de ces derniers dans le tube digestif.

Le mucus forme aussi une **barrière chimique** contre les molécules potentiellement nocives pouvant être au contact des tissus. Les différents constituants du gel font de lui un véritable réseau de mailles glycoprotéiques le rendant partiellement imperméable. La structure des mucines rend notamment l'action des enzymes protéolytiques plus difficile de par leur

richesse en sites de glycosylation, ce qui a pour effet de masquer la partie protéique de la mucine (apomucine). Seule peut s'effectuer une diffusion lente et sélective des nutriments vers les entérocytes. Il en est de même pour les différentes toxines bactériennes, radicaux libres (Cross *et al.*, 1984), composés pouvant faire varier le pH. Ce phénomène est d'autant plus important dans la muqueuse gastroduodénale puisqu'elle est en contact direct avec un milieu au pH acide. Cette muqueuse produit, de surcroît, des ions  $\text{HCO}_3^-$  qui forment un gradient de pH dans la couche de mucus afin de la tamponner et de protéger l'épithélium contre les conditions gastriques extrêmes (Williams & Turnberg, 1980). Nonobstant, ceci n'explique pas comment les ions acides passent à travers le gel muqueux uniquement vers la lumière et pas dans l'autre sens. Une des explications est basée sur la propriété qu'ont deux solutions de viscosité différentes à ne pas se mélanger (viscous fingering). Dans ce cas, c'est lorsque le gel possède un pH supérieur ou égal à 4 que le milieu extérieur ne se mélange pas avec. En dessous de cette valeur l'acide sécrété serait capable de retraverser le mucus jusqu'aux cellules épithéliales (Bhaskar *et al.*, 1992). Une autre explication possible est l'accumulation d'ions  $\text{Ca}^{2+}$  dans les granules de sécrétion permettant d'une part de condenser les mucines et autres glycoprotéines les unes aux autres par la création de liaisons anioniques et d'autre part de tamponner les ions HCl nouvellement sécrétés. Le calcium est ensuite relargué dans la couche supérieure de mucus lors de sa décondensation et est, par ce biais, éliminé (Schreiber & Scheid, 1997).

Le gel de mucus participe également à l'**interaction entre l'hôte et le microbiote** tant pour la mise en place de la flore endogène que dans la lutte contre les pathogènes. La mise en place de la **flore microbienne commensale** débute dans l'estomac, le duodénum et le jéjunum où l'on trouve  $10^2$  à  $10^3$  bactéries par gramme de matière, se poursuit avec  $10^7$  à  $10^8$  dans l'iléon et de  $10^{10}$  à  $10^{12}$  dans le gros intestin (Sartor, 2008). L'estomac peut cependant, quant à lui, être considéré comme stérile à cause des conditions extrêmes de pH qui y règnent. La couche la plus externe de mucus offre une matrice idéale pour l'attachement et le développement du microbiote commensal, et ce, contrairement à la couche fermement attachée aux cellules épithéliales qui est stérile (Johansson *et al.*, 2010). L'implantation microbienne est favorisée par la grande hétérogénéité de glycanes portés par les différents constituants glycoprotéiques du mucus. Il a été montré, par ailleurs, que des bactéries commensales (*Bacteroides*, *Ruminococcus*, *Bifidobacterium*...) étaient capables d'utiliser, par l'intermédiaire de différentes enzymes, les oligosaccharides portés par les mucines de l'hôte comme source nutritive (Salyers *et al.*, 1977 ; Miller & Hoskins, 1981 ; Corfield *et al.*, 1992 ;

Sonnenburg *et al.*, 2005). L'implantation de cette flore endogène permet à l'organisme de lutter indirectement contre les pathogènes en contact du mucus digestif en gênant leur adhésion et leur multiplication. Elle joue aussi un rôle dans la dégradation d'aliments que les enzymes de l'hôte sont incapables de digérer, comme les sucres complexes ou certaines protéines et synthétisent un grand nombre de vitamines (Vitamine K, indispensable à la coagulation sanguine), d'acides aminés essentiels, de facteurs anti-inflammatoires et agents antimicrobiens (Konisky, 1982 ; Berg, 1996).

Afin de lutter contre **la microflore pathogène** le mucus contient diverses molécules antimicrobiennes (McGuckin *et al.*, 2011) soit en provenance de la circulation sanguine (immunoglobulines) soit directement sécrétées par les cellules épithéliales (histatines, défensines...). En outre, le mucus possède certains motifs glycaniques, portés par les mucines, capable d'inhiber la croissance de pathogènes (Kawakubo *et al.*, 2004) et agit en masquant les adhésines présentes à la surface bactérienne pour inhiber ainsi leur adhésion entraînant une élimination plus rapide du tractus digestif (Paerregaard *et al.*, 1991).

La viscosité, la propriété de former un gel et une partie des caractéristiques biochimiques sont induites par des macromolécules appelées mucines.

## 2. Les mucines

Les mucines sont les glycoprotéines majoritaires du mucus formant une large famille et sont responsables de ses propriétés rhéologiques. Les mucines peuvent être glycosylées de trois façons : la *O*-, *N*- et la *C*-glycosylation. La *O*-glycosylation est de loin, la glycosylation la plus représentée sur les mucines, pouvant représenter jusqu'à 80% de la masse totale de la glycoprotéine. Les mucines sont très hétérogènes, modulaires et de très haute masse moléculaire puisque pouvant atteindre plusieurs millions de daltons sous leur forme native (Rose, 1992 ; Dekker *et al.*, 2002 ; Porchet & Aubert, 2004 ; Linden *et al.*, 2008).

Le terme « mucine » a initialement était associé aux glycoprotéines sécrétées et donc formant un gel de mucus. Par la suite, d'autres glycoprotéines ancrées dans la membrane et sécrétées mais ne formant pas de gel ont été qualifiées de mucines. Tous les membres de cette famille sont désignés avec les trois lettres MUC suivis de chiffres parfois complétés de lettres. En considérant que seules les glycoprotéines sécrétées par les cellules épithéliales appartiennent à la famille des mucines, cette dernière contient 16 membres (Linden *et al.*,

2008) divisés en trois classes : les mucines sécrétées formant un gel (MUC2, MUC5B, MUC5AC, MUC6 et MUC19), les mucines sécrétées ne formant pas de gel (MUC7) et les mucines membranaires (MUC1, MUC3A/B, MUC4, MUC12, MUC13, MUC15, MUC16, MUC17, MUC20 et MUC21). Le dernier membre à avoir été identifié est MUC21 (Itoh *et al.*, 2008). Le tractus gastro-intestinal comprend un nombre limité de mucines qui sont spécifiques à chaque compartiment (van Klinken *et al.*, 1998 ; McGuckin *et al.*, 2011) (Tableau 3). Mise à part MUC2, toutes les autres mucines, ne sont pas retrouvées uniquement dans le tractus gastro-intestinal (Figure 9).

Tableau 3 : Les différentes espèces de mucines présentes dans le tractus gastro-intestinal.

Tissus (Conditions normales)	Mucines sécrétées	Mucines membranaires
Estomac	MUC5AC, MUC6	MUC1, MUC16
Petit intestin	MUC2	MUC1, MUC3A/B, MUC4, MUC12, MUC13, MUC15, MUC16, MUC17
Gros intestin	MUC2 (détecté en quantité limitée au cours de certaines études : MUC5AC, MUC6, MUC5B)	MUC1, MUC3A/B, MUC4, MUC12, MUC13, MUC15, MUC16, MUC17

Les gènes *MUC* codent **les apomucines** qui constituent l'axe peptidique des mucines et peuvent comporter de 400 à 7000 acides aminés. Les apomucines possèdent plusieurs domaines et régions qui leur sont caractéristiques. L'une des régions les plus caractéristiques représente 50% du corps protéique. Elle possède des séquences peptidiques répétées en tandem, d'où son nom de région *Tandem Repeat* (TR) ou région PTS à cause du nombre élevé en proline, thréonine et sérine (PTS) qu'elle contient. La séquence initiale est, chez l'Homme, composée de 8 à 169 acides aminés selon l'apomucine. MUC2, MUC5AC, MUC5B et MUC6 en contiennent 23, 8, 29 et 169 respectivement (Byrd & Bresalier, 2004). Elle est le siège de la *O*-glycosylation par ses thréonines et sérines. Elle est variable en longueur et en séquences, est propre à chaque mucine et à chaque espèce. Elle est en revanche localisée systématiquement dans la partie centrale de l'apomucine (Hollingsworth & Swanson, 2004). La répétition en tandem dans le gène *MUC* du fragment d'ADN codant les TR engendre des **VNTR** ou répétitions en tandem en nombre variable (variable number tandem repeats). Ce qui a pour conséquence chez une même espèce et pour une mucine donnée, un nombre défini

d'acides aminés composant le TR mais un nombre variable de répétition. Pour le gène *MUC2* chez l'Homme 69 nucléotides sont répétés de 51 à 115 fois (Toribara *et al.*, 1991) ; pour le gène *MUC6*, 507 nucléotides sont répétés de 15 à 26 fois. Tandis que pour *MUC5B* aucun polymorphisme de type VNTR n'est observé (Vinall *et al.*, 1998). D'autres domaines fonctionnels sont présents sur les mucines mais sont dépendants de la nature de celles-ci.

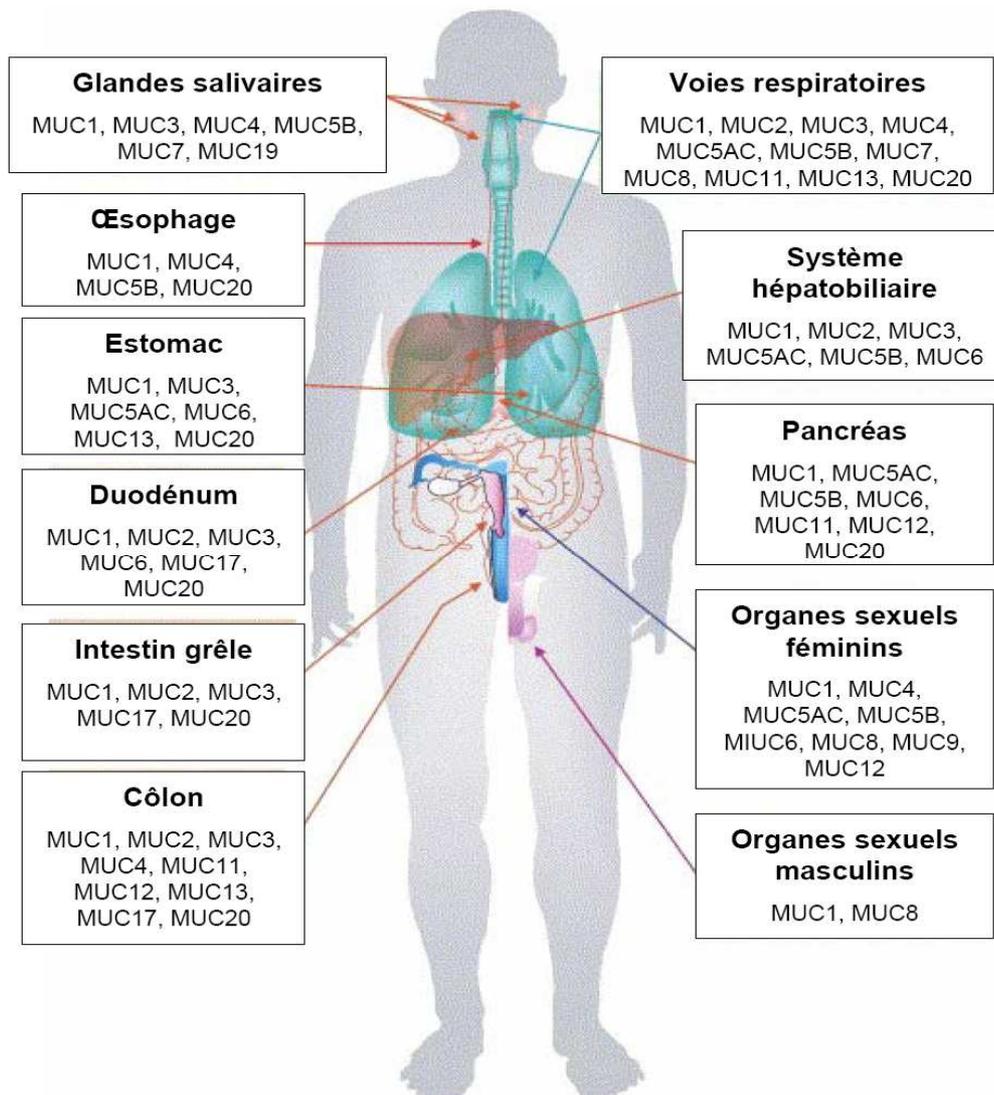


Figure 9 : Répartition des mucines dans le corps humain d'après Andrianifahana *et al.*, 2006.

## 2.1 Les mucines-like

Différentes glycoprotéines sont sécrétées par, ou, à la surface de différents types cellulaires dont les épithélia. Elles sont considérées comme mucine-like par l'existence de nombreux sites potentiels de *O*- et de *N*-glycosylation dans leur séquence. Parmi elles

MUC10, MUC14 et MUC18, bien que considérées initialement comme appartenant à la famille des mucines, méritent une meilleure caractérisation biochimique afin d'en confirmer la légitimité de classification. D'autant qu'un prérequis pour l'appartenance à la famille des mucines est leur sécrétion par des cellules épithéliales et non des cellules endothéliales ou de mélanome (Johnson *et al.*, 1996 ; Melnick *et al.*, 2001 ; Kinoshita *et al.*, 2001). DMBT1 (*deleted in malignant brain tumor 1*) est quant à elle une glycoprotéine sécrétée appartenant à la superfamille des récepteurs de type SRCR (*Scavenger Receptor Cystein-Rich*). Elle est exprimée principalement dans les épithélia du tractus respiratoire et digestif, dans le cerveau et dans le système reproducteur. Elle est codée par le gène du même nom qui a été cloné pour la première fois il y a 14 ans (Mollenhauer *et al.*, 1997). Elle a été initialement proposée comme gène suppresseur de tumeur du fait de la fréquence élevée de sa délétion homozygote et l'absence d'expression dans les carcinomes cérébraux, gastriques et pulmonaires (Mollenhauer *et al.*, 2001 ; Wu *et al.*, 1999). Cependant le rôle exact joué par DMBT1 dans le développement et la progression tumorale n'est pas encore élucidé, d'autant que l'expression de DMBT1 augmente dans les cancers du sein, des glandes salivaires et colorectaux (Bikker *et al.*, 2004 ; Blackburn *et al.*, 2007).

## 2.2 Les mucines membranaires

Les mucines membranaires sont des glycoprotéines modulaires qui possèdent en plus des domaines PTS et des régions nues, un domaine transmembranaire qui leur est caractéristique et permet leur ancrage dans la membrane cellulaire. Elles portent un domaine intracellulaire, qui pour certaines d'entre elles est riche en résidus tyrosine, offrant un site interagissant avec de nombreuses protéines impliquées dans la carcinogénèse, la genèse de métastases et l'adhésion cellulaire (Li *et al.*, 2001 ; Schroeder *et al.*, 2003). La partie extracellulaire qui est porteuse de tous les autres domaines, contient les **domaines epidermal growth factor-like** (EGF). Les EGF-like sont impliqués dans l'interaction récepteur-ligand comme démontré pour MUC4, qui interagit avec ErbB2 et influe sur la régulation de la croissance et la différenciation cellulaire. Il a également été proposé que ce domaine pouvait agir directement comme facteur de croissance après clivage et libération dans le milieu extracellulaire (Carraway & Carraway, 2007 ; Carraway *et al.*, 2007). Autre fragment de la partie extracellulaire, le **domaine SEA** (Sea urchin sperm protein Enterokinase and Agrin). Il est porté par de nombreuses mucines membranaires et est impliqué dans le clivage et l'association de sous-unités de la mucine (Macao *et al.*, 2006). Il est, en effet, composé d'un

site de coupure protéolytique qui permettrait la libération des mucines membranaires sous forme soluble (Wreschner *et al.*, 2002 ; Linden *et al.*, 2009). D'autres domaines sont uniquement retrouvés portés par MUC4 chez les mucines membranaires, comme par exemple le domaine AMOP (Adhesion-associated domain in MUC4 and Other Proteins), NIDO, les domaines riches en cystéines et D de von Willebrand (vWF-D). Le **domaine AMOP** est supposé être impliqué dans l'adhésion cellulaire car les autres protéines identifiées avec ce dernier sont impliquées dans ce phénomène (Ciccarelli *et al.*, 2002). Concernant le **domaine NIDO** (porté par la protéine nidogène qui est une protéine de la matrice extracellulaire, également connue sous le nom d'entactine) sa fonction est inconnue. Par ailleurs ces deux domaines possèdent plusieurs sites de *N*-glycosylations (Moniaux *et al.*, 2001). Les domaines riches en cystéines et vWF-D sont très importants chez les mucines sécrétées pour leur oligomérisation.

## 2.3 Les mucines sécrétées

Les mucines sécrétées sont riches en cystéines et en domaines du pro-**von Willebrand factor** (pro-vWF) aux deux extrémités amino terminales (N-terminale, Nt) et carboxy terminales (C-terminales, Ct). Le vWF est une glycoprotéine multimérique sécrétée dans le sang, essentielle à l'homéostasie et à la coagulation. Le pro-vWF est constitué de quatre domaines répétés et désignés par les lettres A, B, C et D organisés comme suit : D1-D2-D'-D3-A1-A2-A3-D4-B1-B2-B3-C1-C2-CK. CK pour **Cystine-Knot** également retrouvée chez les mucines et D' correspondant à un domaine D tronqué (Shelton-Inloes *et al.*, 1987). CK est toujours trouvé du côté Ct, en dernière position et possède des similitudes avec la protéine Norrin, impliquée dans la maladie de Norrie (Perez-Vilar & Hill, 1998). CK intervient dans la formation de dimères de mucines par la création de ponts disulfures dans le réticulum endoplasmique (RE) sous l'influence des *N*-glycanes (Bell *et al.*, 2003). Les quatre domaines de D1 à D3 portés du côté Nt sur toutes les mucines sécrétées, vont ensuite directement influencer sur la formation d'oligomères de mucines. Les dimères formés sont préalablement transportés jusqu'à l'appareil de Golgi pour être correctement *O*-glycosylés et former des multimères par la formation de ponts disulfures entre les cystéines du domaine D3. Cette multimérisation peut être visualisée à l'aide d'un microscope électronique où l'on observe de longs filaments de mucines ayant une taille variant de 100 nm à 5µm (Carlstedt & Sheehan, 1984 ; Sheehan *et al.*, 1986 ; Sheehan *et al.*, 1996). Ceci dit, d'autres mécanismes sont probablement mis en œuvre pour l'assemblage et la formation de complexes muciniques

mettant vraisemblablement d'autres liaisons covalentes et des liaisons non-covalentes en jeu (Perez-Vilar & Boucher, 2004). De plus, aux extrémités Nt et Ct de ces apomucines se situent des régions pouvant subir des clivages autocatalytiques au niveau de la séquence peptidique Gly-Asp-Pro-His trouvée sur MUC2 (Khatri *et al.*, 1998 ; Lidell *et al.*, 2003) et MUC5AC (Lidell & Hansson, 2006). Les peptides issus du clivage atteignent une taille proche de 120kDa et sont retrouvés dans le tractus gastro-intestinal (Pearson *et al.*, 1981 ; Robertson *et al.*, 1989). Leur rôle n'est pas clairement démontré mais est supposé être en relation avec la conformation des mucines au cours de leur synthèse. Par ailleurs, les mucines sécrétées possèdent une caractéristique qui leur est propre à l'intérieur ou juste en périphérie du domaine TR, le **domaine CYS**, riche en cystéines. Il est très conservé chez les mucines sécrétées de différents organismes, suggérant une fonction importante et peut être retrouvé de 2 à 9 fois sur chacune d'elles (Desseyn, 2009). Ce domaine est très hydrophobe, ce qui est supposé favoriser l'agrégation des mucines entre-elles et avec d'autres protéines dans le mucus (Brunelli *et al.*, 2007). En outre, tous les domaines CYS sont composés d'une séquence conservée Trp-(Ser/thr)-Aaa-Trp (où Aaa représente n'importe quel acide aminé) qui est consensus à la C-mannosylation. Cette glycosylation s'effectue dans le réticulum endoplasmique, l'abolition de la séquence peptidique consensus conduit à la rétention de la protéine recombinante générée dans ce dernier. La fonction de la C-mannosylation est donc probablement l'exportation de la mucine dans l'appareil de Golgi, sa conformation au cours de la synthèse, son trafic et l'interaction avec d'autres composants du mucus (Desseyn *et al.*, 2000 ; Perez-Vilar *et al.*, 2004).

Parmi les cinq gènes de mucines sécrétées existants, tous sont localisés sur le chromosome 11 au niveau p15 dans une zone longue de 400 kb et organisés en cluster (Pigny *et al.*, 1996) à l'exception de MUC19 qui l'est en 12q12 (Chen *et al.*, 2004 ; Culp *et al.*, 2004). MUC2, MUC5AC et MUC6 sont les trois mucines sécrétées retrouvées en conditions normales dans le tractus gastro-intestinal (Figure10). Elles sont largement impliquées dans différents phénomènes physiologiques.

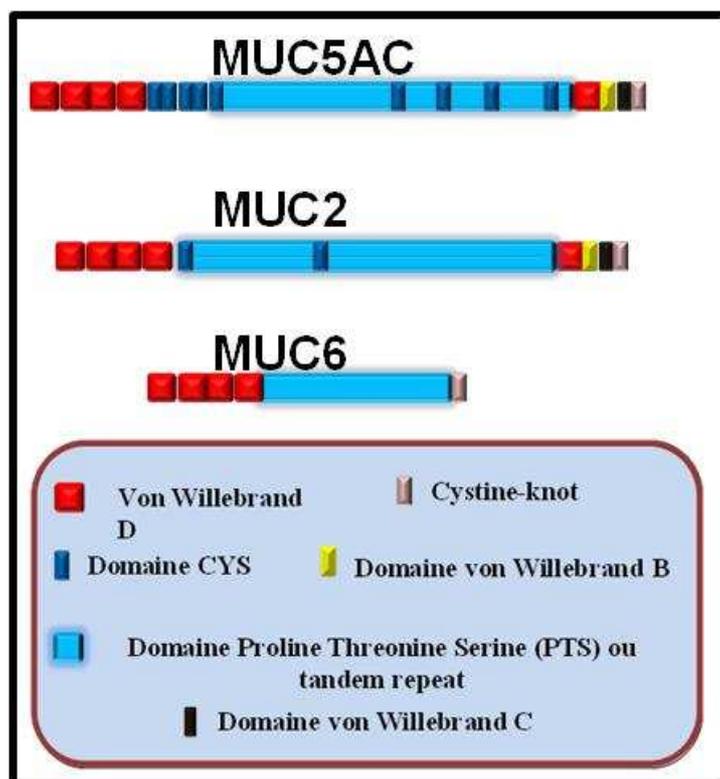


Figure 10 : Structures des trois principales mucines sécrétées retrouvées dans le tractus gastro-intestinal.

### 2.3.1 MUC2

MUC2 est la mucine sécrétée de l'intestin grêle et du côlon chez des individus sains. Isolée à partir d'une banque d'ADNc (Gum *et al.*, 1989), c'est la plus étudiée des mucines sécrétées humaines. L'organisation du promoteur de *MUC2*, comparable à celles des autres mucines sécrétées, est composée d'une boîte TATA localisée à 25 nucléotides en amont du site d'initiation de la transcription, ainsi que d'un motif CACCC au niveau -88/-80. Le promoteur est séparé en deux régions : l'une riche en AT (-8000/-4000) et l'autre riche en GC (en aval de -4000). Enfin, différentes régions en amont de la boîte TATA peuvent se lier à différentes protéines à activité transcriptionnelle (AP-1 et 2, CREB) (Velcich *et al.*, 1997 ; Gum *et al.*, 1997). La séquence prédite en acides aminés des apomucines, à partir des données génétiques, est classiquement divisée en trois régions : centrale, Nt et Ct pour une masse moléculaire de 540kDa pour MUC2. La région centrale comporte deux tandem repeat (TR). La première, délimitée par deux domaines CYS de part et d'autre, ne présente pas de polymorphisme de type VNTR, contrairement à la seconde séquence de TR. La région N-terminale renferme les 4 domaines D (D1, D2, D' et D3), communs aux mucines sécrétées localisées sur le chromosome 11p15.5. Le côté C-terminal comporte 859 acides aminés

portant dans l'ordre un domaine vWF-C, un domaine vWF-B et un domaine CK. Ce dernier est formé de 85 acides aminés, dont 11 sont des cystéines. Il existe 31 sites potentiels de *N*-glycosylation le long de l'apomucine, concentrés dans les domaines Nt et Ct (Gum *et al.*, 1992 ; Gendler & Spicer., 1995 ; Allen *et al.*, 1998 ; Rousseau *et al.*, 2004).

### 2.3.2 MUC5AC

MUC5AC est la mucine majoritaire dans l'estomac, on la trouve aussi dans le tractus trachéo-bronchique, dans les épithélia oculaire, le système hépatobiliaire, le pancréas, l'endomètre et faiblement dans le colon chez des individus sains (Audie *et al.*, 1993 ; Ho *et al.*, 1995 ; Gipson *et al.*, 1997 ; Bartman *et al.*, 1999 ; Andrianifahana *et al.*, 2001 ; Forge-Laffite *et al.*, 2007). Initialement, lorsque les ADNc de mucines ont été clonés, il a été décidé d'utiliser la nomenclature suivante : MUC5A, MUC5B et MUC5C. Il a ensuite été démontré que MUC5A et MUC5C étaient issues du même gène d'où le nom de *MUC5AC* (Porchet *et al.*, 1991 ; Aubert *et al.*, 1991 ; Guyonnet Duperat *et al.*, 1995). L'apomucine, de 640kDa, peut également être divisée en trois régions : centrale, Nt et Ct. La région centrale se compose de 3500 acides aminés, et est organisée en neuf domaines CYS de 110 acides aminés chacun portant 10 résidus de cystéines. Entre les cinq premiers domaines CYS du côté Nt s'intercalent des régions PTS sans TR. Les quatre domaines CYS restant sont également entrecoupés par 4 domaines PTS renfermant des séquences répétées en tandem de 8 acides aminés chacune. Ces TRs montrent un polymorphisme important de taille et de séquence. De nombreux site de *O*-glycosylation y sont retrouvés et un seul site potentiel de *N*-glycosylation. La région Nt contient 1370 acides aminés et présente une grande homologie (45% environ) avec la région Nt de MUC2 et est riche en cystéine et en sites de *N*-glycosylation (7 sites potentiels). Cette deuxième région contient, en plus, un motif « leucine zipper » entre les acides aminés 273 et 300, pour faciliter la dimérisation de MUC5AC. La région Ct est constituée de 1227 acides aminés, impliqués dans une région PTS d'une cinquantaine d'acides aminés et dans les domaines D4, B, C de vWF et CK. Cette dernière région renferme 12 sites potentiels de *N*-glycosylation (Buisine *et al.*, 1998 ; Van de Bovenkamp *et al.*, 1998 ; Escande *et al.*, 2001).

### 2.3.3 MUC6

MUC6 est la moins bien caractérisée de ces trois mucines. Elle a été identifiée à partir d'une banque d'ADNc gastrique et est exprimée chez les individus sains dans l'estomac, les glandes de Brunner duodénales, le pancréas, la vésicule biliaire et faiblement dans le côlon droit, l'iléon et dans les glandes endocervicales (Toribara *et al.*, 1993 ; Toribara *et al.*, 1997 ; Bartman *et al.*, 1998). Contrairement à MUC2 et MUC5AC, MUC6 ne contient pas de domaine CYS et possède un domaine Ct court de 101 acides aminés. Les trois domaines de vWF-D4, B et C sont absents, seul subsiste le domaine CK (Desseyn & Laine, 2003 ; Rousseau *et al.*, 2004).

## 3. La glycosylation des mucines

### 3.1 La O-glycosylation de type mucine

La O-glycosylation de type mucine est une modification s'effectuant dans l'appareil de Golgi entre un résidu d'acide aminé hydroxylé (sérine ou thréonine) de l'apomucine et un résidu de N-acétylgalactosamine ou GalNAc par le biais d'une liaison O- $\alpha$ -glycosidique. Elle représente la modification post-traductionnelle majeure des mucines et plus de 80% de leur masse moléculaire. Il existe, par ailleurs, 6 autres types de O-glycosylation, qui n'ont jusqu'à présent pas encore été identifiés sur les mucines : la O-glucosylation (Luther & Haltiwanger, 2008), la O-mannosylation (Lommel & Strahl, 2009), la O-xylosylation (Bülow & Hobert, 2006), la O-fucosylation (Haltiwanger & Stanley, 2002), la O-galactosylation (Spiro, 2002) et la O-N-acétylglucosaminylation (Hart *et al.*, 2007). La O-glycosylation de type mucine, une fois liée avec le résidu de GalNAc, se poursuit le plus souvent avec de nombreux autres résidus glycaniques ou aglyconiques qui sont structurés en trois régions. Le **noyau ou core**, qui est la partie impliquant la GalNAc initiale, est composé de galactose (Gal), N-acétylglucosamine (GlcNAc) et GalNAc. Il est suivi du **squelette ou backbone qui est** constitué d'une alternance de Gal et GlcNAc appelée chaîne lactosaminique. Il existe le type 1 qui correspond à une liaison en  $\beta$ 1-3 entre le Gal et la GlcNAc et le type 2 correspondant à une liaison en  $\beta$ 1-4 entre les mêmes résidus (Mutsaers *et al.*, 1986). La dernière région, appelée **périphérie**, est quant à elle terminée par différents résidus glycaniques tels que les groupes sanguins portant du fucose (Fuc), Gal et GalNAc, des structure osidiques acides

(acide sialique) et des aglycones comme du sulfate (Hounsell & Feizi, 1982 ; Brockhausen, 1999). Afin de déterminer le répertoire de *O*-glycosylation le plus complet possible, les techniques de RMN (résonance magnétique nucléaire) et de spectrométrie de masse sont souvent utilisées. Ceci a permis par exemple de caractériser le profil de *O*-glycosylation des mucines du tractus gastro-intestinal, au niveau de l'iléon et du côlon (Podolsky, 1985a ; Podolsky, 1985b ; Capon *et al.*, 2001 ; Robbe *et al.*, 2003, 2004 ; Larsson *et al.*, 2009) et au niveau de la muqueuse gastrique (Slomiany *et al.*, 1984 ; Hanisch *et al.*, 1993). Ces travaux, bien que préliminaires concernant la muqueuse gastrique, montrent clairement des **variations d'expression glycanique entre ces tissus**. Il a été démontré, par exemple, que les mucines intestinales exprimaient essentiellement du core 3 sialylé alors que dans l'estomac était majoritairement retrouvé du core 2 avec peu d'acide sialique. Il a par ailleurs, été clairement décrit un gradient d'acidité, de bas en haut, de l'intestin grêle jusqu'au côlon. En effet, les *O*-glycanes de la périphérie, présents dans le petit intestin sont globalement neutres et fucosylés tandis que le côlon distal exprime plus de 70% de glycanes sialylés ou sulfatés (Robbe *et al.*, 2003, 2004).

### 3.1.1 Noyaux glycaniques

Le noyau peut être composé par 2 ou 3 résidus saccharidiques. Huit types différents ont été décrits jusqu'à aujourd'hui sur les glycoprotéines de mammifères (Tableau 4). Ils sont classés de 1 à 8, seuls les cores de 1 à 5 sont portés par les mucines gastro-intestinales. La GalNAc, reliée à l'acide aminé hydroxylé, peut être substituée sur le C3 (carbone 3), le C6 simultanément ou indépendamment ; avec un  $\alpha$  ou  $\beta$  Gal relié au C3, un  $\beta$  GlcNAc sur le C3 ou le C6 ou les deux et enfin une  $\alpha$  GalNAc en C3 ou C6. La biosynthèse des cores sur l'apomucine est l'étape d'initiation de la *O*-glycosylation. Elle nécessite le transfert initial d'une GalNAc sur une sérine ou une thréonine par une UDP-*N*-acétylgalactosamine sous l'action d'une polypeptide *N*-acétylgalactosaminyltransférase (ppGalNAc-T). Le produit de ce transfert, correspondant à une molécule de GalNAc reliée à l'acide aminé, est nommé antigène Tn. 24 ppGalNAc-Ts ont été identifiées par analyse *in silico* et 12 d'entre elles ont été caractérisées *in vitro* (Ten Hagen *et al.*, 2003). Ce grand nombre peut s'expliquer par l'influence éventuelle de la position et de la structure du glycanes précédemment ajouté sur l'apomucine. Actuellement aucune séquence consensus en acide aminé n'a encore été identifiée pour l'action de ces ppGalNAc-Ts. Le core 1 identifié à partir de mucines sous-maxillaires de porc, a été le premier core à avoir été identifié et constitue, par ailleurs, le

déterminant antigénique T ou Thomsen-Friedenreich (Carlson, 1968). Ce core nécessite l'action d'une core 1  $\beta$ 1,3-galactosyltransférase (C1  $\beta$ 3Gal-T1 ou T-synthase), qui est exprimée dans de très nombreux tissus humains (Ju *et al.*, 2002) et d'une chaperonne spécifique pour l'enzyme, appelée Cosmc (Core 1  $\beta$ 3Gal-T-specific molecular chaperon). Cosmc est une protéine transmembranaire de 318 acides aminés et qui protège l'enzyme d'un adressage au protéasome (Ju & Cummings, 2002). Une fois le core 1 synthétisé, l'enzyme permettant la synthèse du core 2 peut entrer en jeu. Trois gènes différents codent des cores 2  $\beta$ 1,6-*N*-acetylglucosaminyltransferases (C2  $\beta$ 6GlcNAc-T) dans le génome humain. Le core 2 est exprimé dans de nombreux tissus et notamment dans l'intestin et l'estomac (Bierhuizen & Fukuda, 1992 ; Schwientek *et al.*, 2000). Le core 3 est synthétisé, à l'instar du core 1, par une seule transférase appelée  $\beta$ 1,3-*N*-glucosyltransférase ( $\beta$ 3Gn-T6) et retrouvée de l'estomac au côlon (Iwai *et al.*, 2002). Le core 4, quant à lui, nécessite comme prérequis l'action de la  $\beta$ 3Gn-T6, suivi de l'action de la  $\beta$ 6Gn-T4 du core 2 également nommée C2/C4GnT. Le core 4 a été identifié dans des cellules colorectales cancéreuses, dans l'intestin grêle adulte et fœtal humain (Capon *et al.*, 1992 ; Robbe *et al.*, 2004 ; Robbe-Masselot *et al.*, 2009). Le dernier core porté par les mucines du tractus gastro-intestinal est le core 5, il est détecté dans tout l'intestin, l'enzyme permettant sa synthèse doit, par contre, être caractérisé (Feeney *et al.*, 1986 ; Robbe *et al.*, 2003). L'ensemble de ces cores est indispensable à l'élongation des *O*-glycanes, sans eux la fonction de protection des oligosaccharides des mucines n'est pas possible, comme l'atteste les résultats obtenus sur une souris déficiente pour l'enzyme du core 1 présentant des colites spontanées (Fu *et al.*, 2011).

Tableau 4 : Structure des différents noyaux *O*-glycaniques.

Désignation	Structure
Core 1	GalNAc Gal(β1-3)
Core 2	GlcNAc(β1-6) GalNAc Gal(β1-3)
Core 3	GalNAc GlcNAc(β1-3)
Core 4	GlcNAc(β1-6) GalNAc GlcNAc(β1-3)
Core 5	GalNAc GalNAc(α1-3)
Core 6	GlcNAc(β1-6) GalNAc
Core 7	GalNAc(α1-6) GalNAc
Core 8	GalNAc Gal(α1-3)

Les cores sont soit allongés par le squelette soit sialylés. Chez l'Homme, un type majeur d'acide sialique est retrouvé, l'acide *N*-acétylneuraminique (Neu5Ac). Cependant, des acides 9-*O*-acétyl-*N*-acétylneuraminique (Neu5,9Ac<sub>2</sub>), 7-*O*-acétyl-*N*-acétylneuraminique (Neu5,7Ac<sub>2</sub>) 7,9-di-*O*-acétyl-*N*-acétylneuraminique (Neu5,7,9Ac<sub>3</sub>), Neu5,8,9Ac<sub>3</sub>, Neu5,8Ac<sub>2</sub>9-lactyl ou encore Neu5Ac8Me (Neu5AC *O*-méthylé sur le carbone 8) ont été

caractérisés dans les mucines coliques humaines avec pour certains une spécificité de tissu très étroite comme le Neu5,8Ac<sub>2</sub> retrouvé uniquement dans le sigmoïde du côlon. Au contraire, dans l'estomac, seuls le Neu5,9Ac<sub>2</sub> et l'acide 9-*O*-lactyl-*N*-acetylneuraminique en faible quantité ont été mis en évidence (Muchmore *et al.*, 1987 ; Corfield *et al.*, 1993 ; Robbe *et al.*, 2003). Les acides sialiques peuvent être liés sur la GalNAc du point d'attache en  $\alpha$ 2-6 des cores 1, 3 et 5 et en  $\alpha$ 2-3 ou  $\alpha$ 2-6 sur un Gal terminal.

### 3.1.2 Squelette glycanique

Le squelette contribue, pour l'essentiel, à la longueur des chaînes glycaniques par l'enchaînement des résidus de Gal et GlcNAc lié en  $\beta$ . Lorsque plusieurs dimères osidiques se succèdent, les chaînes résultantes seront qualifiées de polylactosaminiques. Outre la différence de carbone impliqué dans la liaison générant les chaînes de type 1 ou 2, le squelette peut être sous forme linéaire ou ramifiée par l'émergence d'une liaison sur le C6 du Gal. Ceci ajoute un degré de complexité à l'ensemble et est désigné par le terme antigène i pour la forme linéaire et antigène I pour la forme branchée (Hounsell *et al.*, 1988) (Figure 11). De nombreux enzymes sont impliqués dans la synthèse des chaînes lactosaminique, les GlcNAc transférases appelée iGnT, les  $\beta$ 4-Gal-T pour les chaînes i et les IGnT pour former la liaison  $\beta$ 1,6 des chaînes I (Sasaki *et al.*, 1997 ; Ujita *et al.*, 1998 ; Inaba *et al.*, 2003).

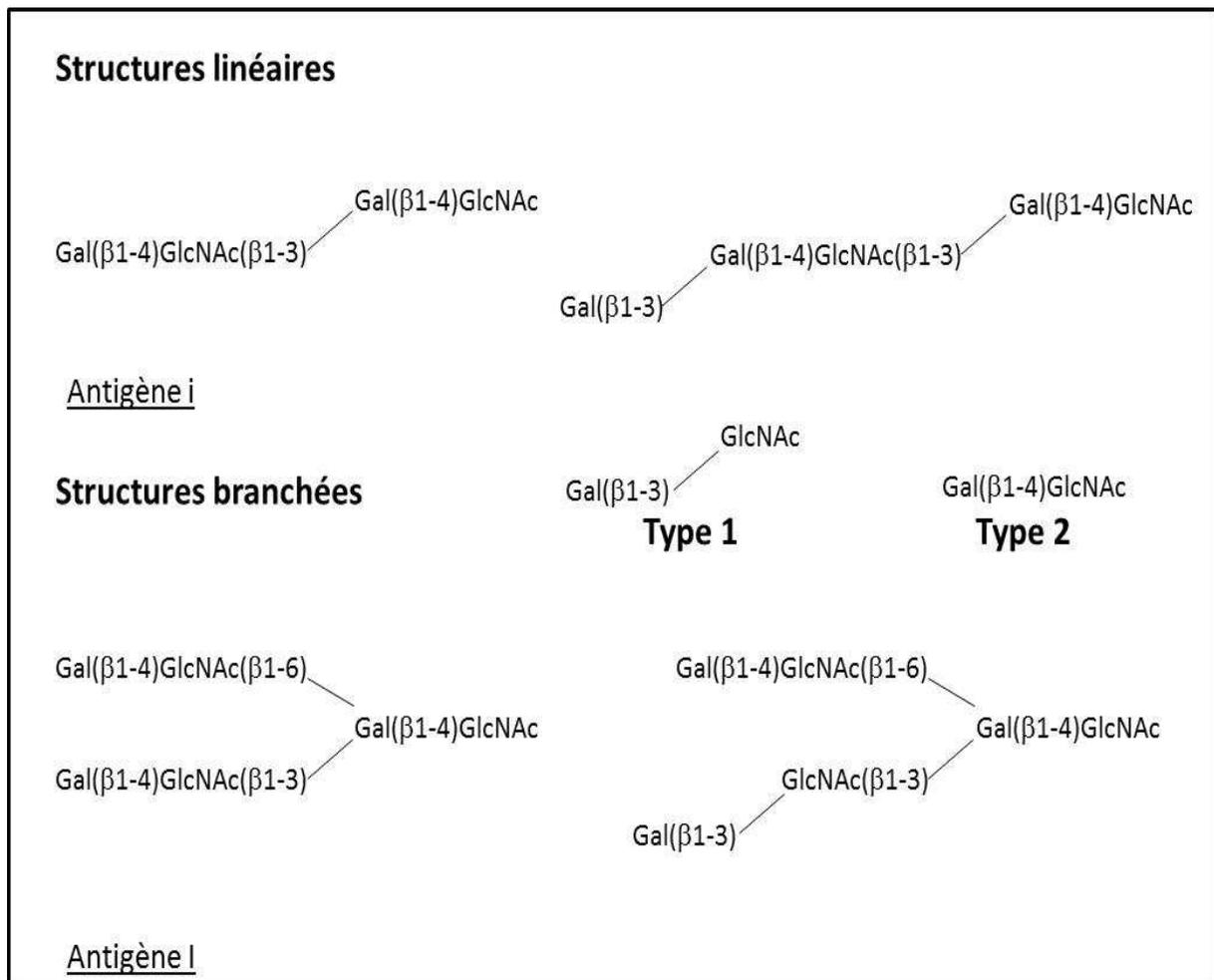


Figure 11 : Exemple de structures du squelette *O*-glycaniques.

### 3.1.3 Périphérie glycanique

La région périphérique des oligosaccharides des mucines présente une grande hétérogénéité dans les différents étages du tractus gastro-intestinal. Elle peut être générée aux extrémités des chaînes polylactosaminiques terminales ou internes. La plupart des oses ou dérivés d'oses sont en configuration anomérique  $\alpha$  et avec une spécificité de liaison étroite. Les acides sialiques sont liés sur le C3 ou le C6 d'un Gal et le C6 d'une GalNAc, l' $\alpha$ Fuc sur le C2 du Gal et le C3 ou le C4 du GlcNAc, l' $\alpha$ Gal sur le C3 du Gal, l' $\alpha$ GalNAc sur le C3 du Gal, l' $\alpha$ GlcNAc sur le C3 ou le C4 du Gal et le  $\beta$ GalNAc sur le C4 du Gal. Le sulfate est, quant à lui, retrouvé le plus souvent sur un résidu de Gal, GalNAc ou GlcNAc. Lorsqu'un résidu d'acide sialique ou de sulfate est en position terminale cela a pour conséquence d'inhiber l'élongation de l'oligosaccharide en cours de synthèse. Sous l'action de différentes glycosyltransférases, ces différents résidus sont impliqués dans la formation des antigènes de

groupes sanguins (A, B, O et Lewis) (Figure 12). Quel que soit le groupe sanguin le Fuc est toujours présent ; quand il est relié à un Gal il forme le groupe O (ou H en anglais), lorsque ce même Gal est substitué par un autre Gal ceci forme le groupe B ou par une GalNAc le groupe A. Cependant certains individus, représentant 20% de la population, qualifiés de non sécréteurs, ne sont pas capables de synthétiser ce résidu de Fuc lié en  $\alpha$ 1-2 sur des chaînes de type 1. Ce phénomène est dû à l'absence d'une fucosyltransférase spécifique appelée FUT2, enzyme capable de catalyser le transfert d'un résidu de L-fucose sur une chaîne lactosaminique de type 1 principalement (Mollicone *et al.*, 1985 ; Kelly *et al.*, 1995). D'autres fucosyltransférases existent mais agissent sur d'autres glycoprotéines, seules la FUT1 et la FUT3 ont une action sur les mucines. La FUT1 est capable de transférer le Fuc sur des chaînes de type 2 sur du Gal pour former le groupe H, tandis que la FUT3 catalyse la réaction de transfert du Fuc sur une GlcNAc en  $\alpha$ 1-4 sur des chaînes de type 1 ou 2 permettant la synthèse des groupes Lewis. Il existe deux groupes de Lewis, le couple Lewis<sup>a</sup> et <sup>b</sup> constitué d'un enchaînement de Gal et de GlcNAc lié en  $\beta$ 1-3 et le couple Lewis<sup>x</sup> et <sup>y</sup> constitué du même enchaînement mais lié en  $\beta$ 1-4. Les Lewis<sup>a</sup> et <sup>b</sup> ont comme point commun un Fuc sur la GlcNAc lié en  $\alpha$ 1-4 et ce qui les différencie est l'ajout d'un Fuc sur le Gal en  $\alpha$ 1-2 uniquement sur le Lewis<sup>b</sup>. De la même façon, le couple Lewis<sup>x</sup> et <sup>y</sup> possède comme point commun un Fuc en  $\alpha$ 1-3 sur le GlcNAc et comme différence l'ajout d'un Fuc sur le Gal en  $\alpha$ 1-2 uniquement sur le Lewis<sup>y</sup>. Les antigènes Lewis peuvent être complétés par des acides sialiques pouvant former par exemple, le sialyl Lewis<sup>a</sup> et le sialyl Lewis<sup>x</sup> plus connus sous leurs appellations cliniques respectives CA19-9 et NCC-ST-43 et utilisés comme marqueurs tumoraux (Nakagoe *et al.*, 2002). Ils peuvent être également sulfatés, sous l'action de sulfotransférases, donnant par exemple du sulfo-Lewis<sup>x</sup>, trouvé dans les mucines colique chez les individus sains ou disialylés comme le Disialyl-Lewis<sup>x</sup> portées par les mucines coliques issues de patients atteints d'un cancer (Robbe-Masselot *et al.*, 2009). De nombreuses sialyl (Harduin-Lepers *et al.*, 2005) et sulfotransférases (Brockhausen, 2003) ont été identifiées, les modifications qui en découlent apportent une grande complexité structurale aux mucines et sont impliquées dans de nombreux phénomènes biologiques (Nieuw Amerongen *et al.*, 1998 ; Jass & Walsh, 2001). Certains autres antigènes, comme le Sda/Cad, ont été identifiés dans le côlon d'individus sains et sont portés par les mucines (Morton *et al.*, 1988 ; Capon *et al.*, 2001). L'antigène Sda/Cad est composé d'une GalNAc terminale reliée en  $\beta$ 1-4 à un résidu de Gal, lui-même relié à une GlcNAc en  $\beta$ 1-3/4. En plus du résidu de GalNAc terminal, un acide sialique se lie aussi au Gal, en  $\alpha$ 2-3, ce qui caractérise cet antigène. Par ailleurs, de nombreux

antigènes ne sont pas retrouvés chez l'Homme mais uniquement portés par d'autres espèces animales. C'est par exemple, le cas de l'antigène de Galili qui consiste en l'enchaînement de deux résidus de Gal reliés en  $\alpha 1-3$  et qui est impliqué notamment dans le rejet des xénogreffes de porc réalisées chez l'Homme (Galili, 2006).

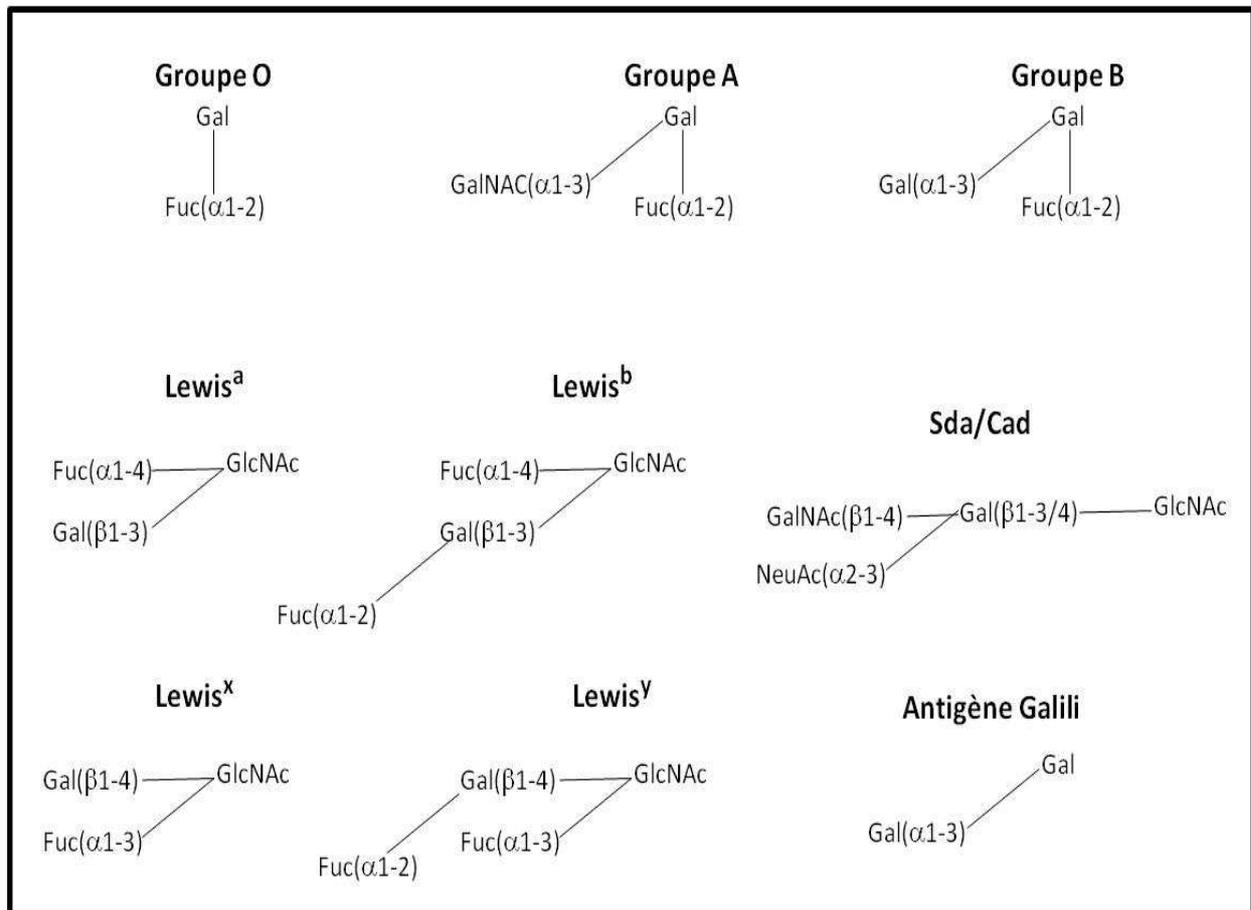


Figure 12 : Exemple de structures périphériques *O*-glycaniques.

### 3.2 La *N*-glycosylation

La *N*-glycosylation est une modification débutant dans le RE et s'achevant dans l'appareil de Golgi entre la fonction amide d'un résidu d'asparagine de l'apomucine et un résidu de *N*-acétylglucosamine ou GlcNAc par le biais d'une liaison *O*- $\beta$ -glycosidique. Contrairement à la *O*-glycosylation de type mucine, une séquence consensus existe : Asn-Aaa-Ser/Thr (où Aaa représente n'importe quel acide aminé sauf la proline) (Kornfeld & Kornfeld, 1985). Cependant certains site de *N*-glycosylation atypique ont été identifiés, du type Asn-Aaa-Cys (Satomi *et al.*, 2004) ou du type Asn-Gly-Gly-Thr (Kehry *et al.*, 1979). La *N*-glycosylation se déroule en deux étapes, la première dans le RE rugueux (RER) où un

tétradécasaccharide ( $\text{Glc}_3 \text{Man}_9 \text{GlcNAc}_2$ ) est synthétisé conjugué à un intermédiaire lipidique appelé dolichol-phosphate. Il est ensuite transféré en bloc sur la chaîne peptidique en cours de synthèse. La seconde étape se passe dans le RE lisse (REL) et l'appareil de Golgi lorsque la chaîne peptidique est synthétisée et consiste en la maturation du glycane et sa transformation en structure de type oligomannosidique, complexe (*N*-acétyllactosaminique) ou hybride. Les *N*-glycanes possèdent tous un noyau pentasaccharidique trimannosyl-*N,N'*-diacétylchitobiose ( $\text{Man}_3 \text{GlcNAc}_2$ ) qui peut être substitué par des acides sialiques, des Fuc sur des résidus de Gal terminaux, des groupements sulfate en C3 de Gal ou C6 de GlcNAc internes. Ils peuvent donc, au même titre que la *O*-glycosylation, porter des groupes sanguins et autres déterminants antigéniques (Marionneau *et al.*, 2001). Les *N*-glycanes peuvent être classés en trois types : oligomannes constitués exclusivement d' $\alpha$ -Man, le type complexe, possédant une composition en oses variée et le type hybride, mélangeant les deux précédents types (Figure 13).

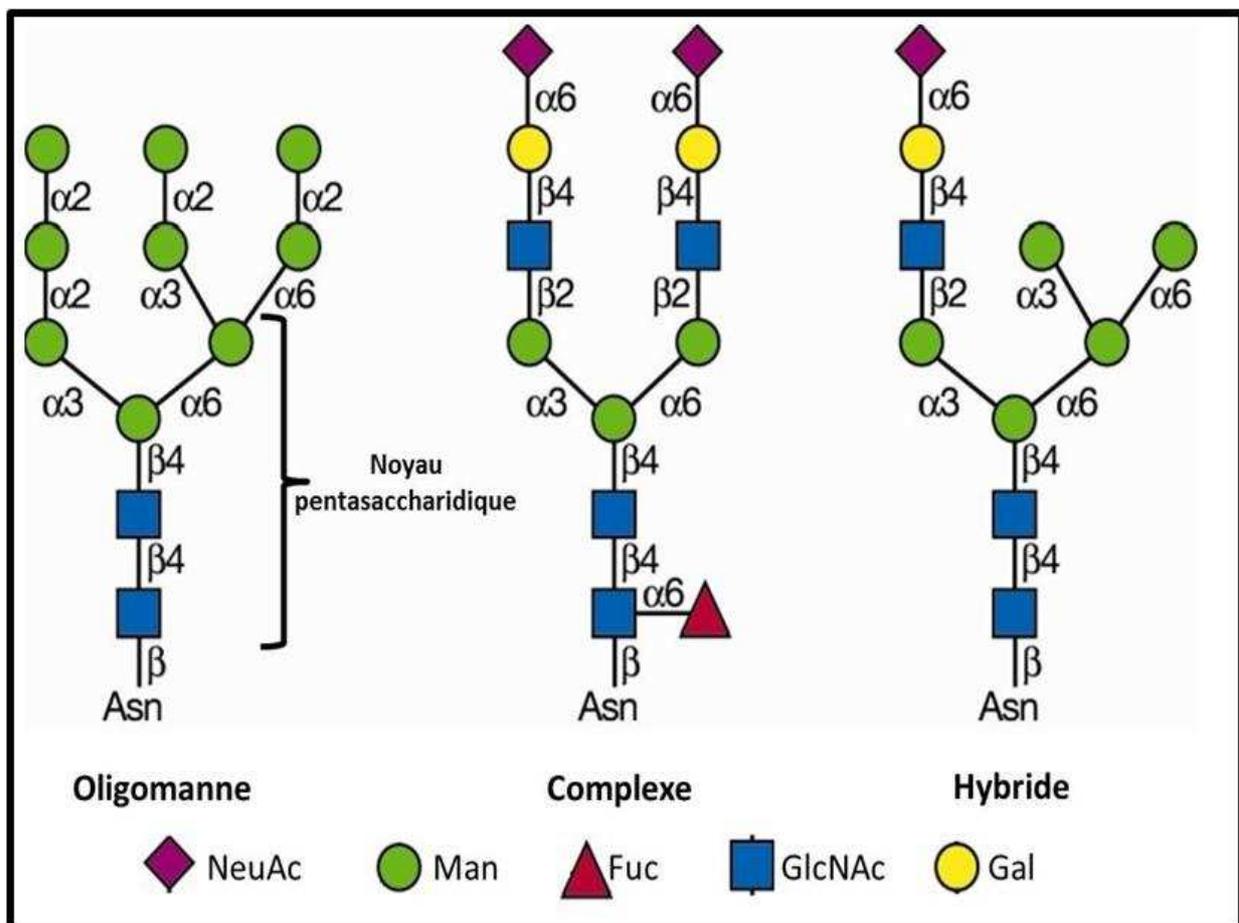


Figure 13 : Représentation des différents types de *N*-glycanes.

### 3.3 La C-glycosylation

La C-glycosylation est une modification co-translationnelle, s'effectuant dans le RE, consistant en l'ajout d'un résidu Mannose (Man) sur un résidu de tryptophane (Trp) de la protéine. Elle possède, chez les mucines, une séquence consensus Trp-(Ser/Thr)-Aaa-Trp (où Aaa représente n'importe quel acide aminé). La liaison s'opère entre le C1 de l' $\alpha$ Man et le C2 du premier Trp du noyau indole dans le RER (Figure 14). Cette glycosylation a initialement été découverte sur la ribonucléase 2 et n'est pas une liaison glycosidique conventionnelle car elle s'effectue entre deux carbones C-C contrairement au C-O et C-N des autres types de liaisons (Hofsteenge *et al.*, 1994). Elle a été caractérisée dans les domaines CYS des mucines MUC5AC et MUC5B (Perez-Vilar *et al.*, 2004) mais serait absente de ce même domaine chez MUC2 (Ambort *et al.*, 2011). La fonction de la C-mannosylation dans les mucines semble être en corrélation avec la maturation de ces dernières au cours de leur synthèse, mais doit encore être investiguée pour en élucider toutes les subtilités.

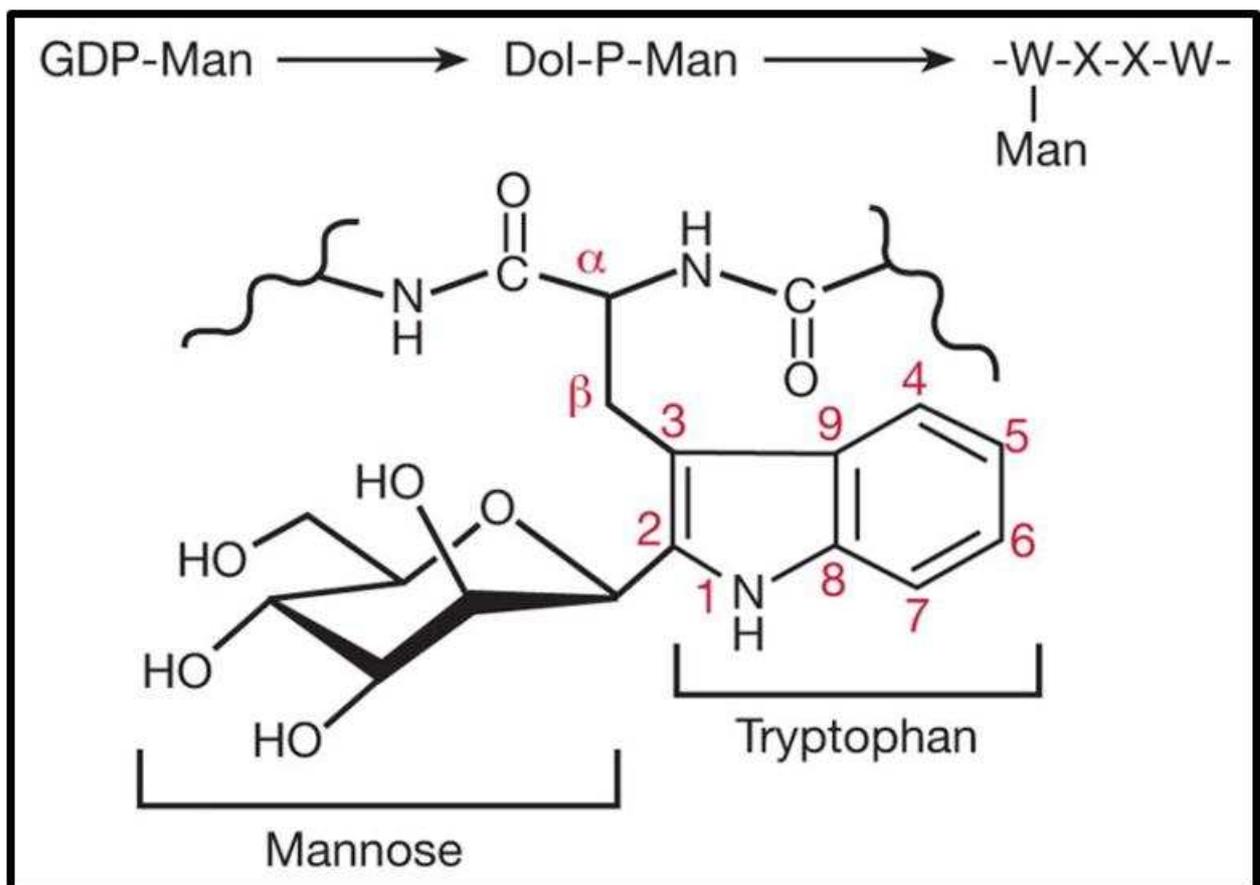


Figure 14 : Liaison C-mannosidique d'après Essentials of Glycobiology. 2nd edition. Varki A, Cummings RD, Esko JD, *et al.*, editors. Cold Spring Harbor (NY).

### III Implication de MUC2, MUC5AC et MUC6 dans les pathologies du tractus gastro-intestinal

MUC2 est la mucine sécrétée majeure du tractus intestinal. Des modifications de son expression ont été décrites lors de pathologies telle que la recto-colite hémorragique (RCH) où MUC2 est sous exprimée aux abords du tissu inflammatoire (Longman *et al.*, 2006). MUC2 est également la cible de parasites, comme *Entamoeba histolytica* (amibe) dans le but de déstructurer la couche de mucus intestinal et favoriser, de ce fait, le développement du pathogène (Lidell *et al.*, 2006). Nombre de micro-organismes envahissant la muqueuse gastro-intestinale influent sur la composition du mucus en usant de différents mécanismes visant directement le gel de mucines. Pour cela, les mucines peuvent être dégradées, tout comme leurs oligosaccharides (Silva *et al.*, 2003 ; Tu *et al.*, 2008). En outre, l'absence de MUC2 dans l'intestin, chez une souris génétiquement invalidée pour cette mucine, a pu mettre en évidence le développement spontané d'adénomes et d'adénocarcinomes chez l'animal, ceci renforçant le rôle protecteur de MUC2 dans l'intestin (Velcich *et al.*, 2002).

Concernant MUC6, plusieurs études contradictoires décrivent soit une absence d'expression de MUC6 dans les tissus colorectaux sains ou cancéreux ou au contraire une expression très rare dans du tissu colique sain, mais MUC6 serait présente dans de nombreux adénomes (Sylvester *et al.*, 2001 ; Bartman *et al.*, 1999). Dans l'estomac, son expression est moins controversée, tout comme sa fonction. MUC6 est décrite pour être localisée dans le fond des cryptes et être porteuse d'un glycane particulier avec une  $\alpha$ 1,4-*N*-acetylglucosamine branchée à un core 2. Quand ce glycane est assimilé par *Helicobacter pylori*, bactérie pathogène gastrique, il bloque la synthèse de sa paroi en inhibant la synthèse d' $\alpha$ -glucosyl cholestérol, un composé majeur de la paroi bactérienne (Kawakubo *et al.*, 2004).

MUC5AC est, quant à elle, la mucine majeure normalement exprimée dans l'estomac. Elle peut être retrouvée avec MUC2 dans l'intestin lors de maladies inflammatoires comme la RCH et dans les adénocarcinomes (Forgue-Lafitte *et al.*, 2007). Elle est également induite lors d'infections bactériennes ou parasitaires dans ce tissu (Nutten *et al.*, 2002 ; Radhakrishnan *et al.*, 2007 ; Takeda *et al.*, 2010 ; Vieira *et al.*, 2010). De récents travaux ont d'ailleurs démontré le rôle de MUC5AC dans l'élimination de vers nématodes (*Trichuris muris*, *Trichinella spiralis* et *Nippostrongylus brasiliensis*) dans le tractus intestinal de souris. En effet, des animaux déficients pour la mucine MUC5AC se sont montrés incapables d'éliminer

ces pathogènes. Il a même été démontré un rôle délétère porté par MUC5AC seule et directement sur le nématode *in vitro* (Hasnain *et al.*, 2011).

De nombreux travaux ont permis de caractériser chez l'Homme une expression aberrante de ces différentes mucines lors de pathologies gastro-intestinales. Par exemple, en cas de métaplasie intestinale complète gastrique, connue pour précéder un cancer gastrique, il y a expression de MUC2, normalement absente du tissu gastrique alors que MUC5AC et MUC6 voient leur expression diminuer. L'expression et la glycosylation de ces trois mucines sont d'ailleurs utilisées afin de classer les trois types de métaplasies existantes (Silva *et al.*, 2002). La première étape du développement de la carcinogénèse colique, qui correspond à l'apparition d'une hyperprolifération épithéliale que l'on appelle foyer de cryptes aberrantes (FCA ou ACF pour Aberrant Crypt Foci), est corrélée à l'expression *de novo* de MUC5AC. Cette mucine est également retrouvée dans divers adénomes et pathologies coliques précancéreuses (Bara *et al.*, 1983 ; Myerscough *et al.*, 2001 ; Maurin *et al.*, 2007 ; Forgue-Lafitte *et al.*, 2007 ; Bu *et al.*, 2010). Initialement MUC5AC fut connue sous l'appellation d'antigène M1 (Bara *et al.*, 1977) puis fut parfois désignée par les initiales HMG (Human Gastric Mucin) avant que la corrélation entre le gène et la protéine soit établit, indiquant qu'il s'agissait de la même molécule. Les différentes études qui ont suivi, ont décrit l'expression de MUC5AC dans le côlon sain chez certains patients mais uniquement à une faible intensité, tandis que dans les polypes adénomateux l'expression est plus intense (Buisine *et al.*, 1996 ; Bartmann *et al.*, 1999). Au contraire, lorsque la tumeur se transforme en adénocarcinome, MUC5AC n'est plus exprimée (Bu *et al.*, 2010). Cette mucine est, par ailleurs, plus fréquemment exprimée dans les adénomes villosés et dentelés que dans les adénomes tubuleux (Takata *et al.*, 2003 ; Hirono *et al.*, 2004) et serait exprimée lors d'inflammation du tube digestif de longue date (Buisine *et al.*, 2001 ; Forgue-Lafitte *et al.*, 2007). La néo-expression de MUC5AC dans le côlon peut être qualifiée de réexpression, étant donné que durant les 8<sup>ème</sup> et 18<sup>ème</sup> semaines du développement fœtal MUC5AC est exprimée (Bara & Burtin, 1980 ; Bara *et al.*, 1986). L'ensemble de ces résultats font de cette mucine un bon marqueur précoce du cancer colorectal.

# Le cancer colorectal

## 1. Epidémiologie

Le cancer colorectal (CCR) est la deuxième cause de décès par cancer chez l'homme après le cancer du poumon et la troisième cause de décès chez la femme après le cancer du sein et du poumon. Le CCR représente, dans le monde, 9200 décès par an pour le sexe masculin et 8200 décès par an chez le sexe féminin (*Dynamique d'évolution des taux de mortalité des principaux cancers en France*, Institut National du Cancer, 2010). La France est l'un des pays les plus touchés par le CCR, tout comme la plupart des pays industrialisés derrière l'Australie, la Nouvelle Zélande mais surtout les Etats-Unis (Faivre *et al.*, 2001). L'incidence du CCR en France, qui correspond à l'étude du nombre de nouveaux cas par an, était de 37413 en 2005. La survie relative à cinq ans standardisée pour l'âge est de 57 % en moyenne, sachant que les cas les plus récemment diagnostiqués ont un meilleur pronostic (*Bulletin épidémiologique hebdomadaire*, Institut National du Cancer, 2009). Ce cancer est rare avant 50 ans mais au-delà son incidence augmente rapidement (Figure 15). Le vieillissement de la population contribue donc à l'augmentation de ce cancer, ceci en association avec différents facteurs environnementaux tels que l'alimentation, l'activité physique, l'alcool et le tabac.

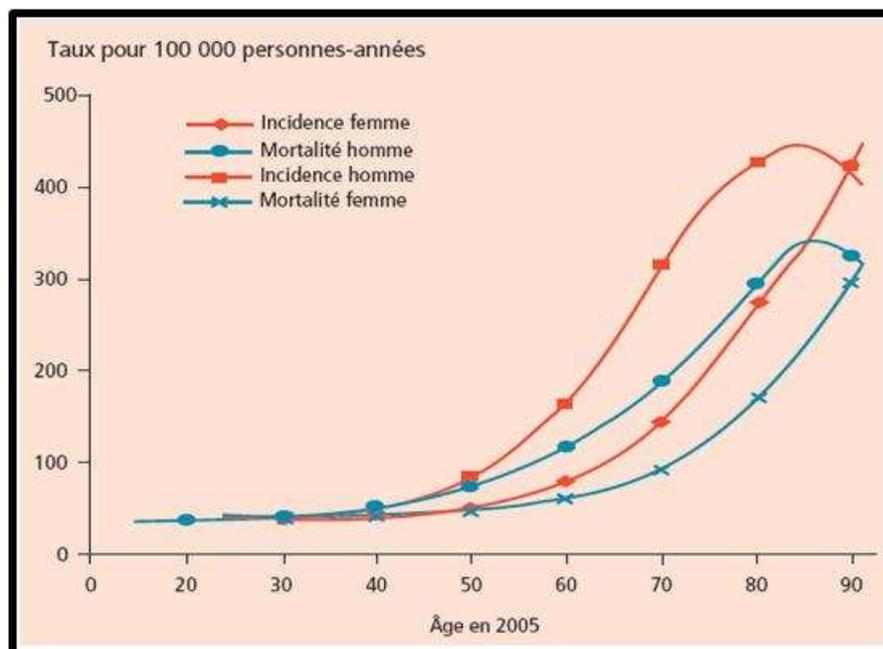


Figure 15 : Cancer colorectal : incidence et mortalité par âge en 2005 en France. D'après le *Bulletin épidémiologique hebdomadaire*, Institut National du Cancer, 2009.

## 2. Histoire naturelle du cancer colorectal

Au plan histologique, la première anomalie décelable du CCR correspond aux **FCA**. Il s'agit de cryptes au diamètre plus large entourées d'un épithélium épaissi, parfois déformées et pouvant sécréter moins de mucus. Il en existe trois types, pouvant séquentiellement être simples, hyperplasiques et dysplasiques. Leur point commun est l'élargissement des cryptes tandis que ce qui les différencie est la formation d'une architecture irrégulière pour les FCA hyperplasiques et l'apparition cumulée d'une dédifférenciation pour les FCA dysplasiques. Les FCA dysplasiques sont ainsi pourvues de noyaux stratifiés, d'une augmentation de la mitose et d'une raréfaction de cellules à mucus (Di gregorio *et al.*, 1997). Certains FCA peuvent se résorber (Schoen *et al.*, 2008) et d'autres augmenter en taille, de par la prolifération de cellules dédifférenciées, ce qui peut conduire à la formation d'un **polype adénomateux**. Celui-ci ne va pas forcément devenir un adénocarcinome, il n'est d'ailleurs actuellement pas possible de distinguer un adénome capable d'induire un cancer d'un adénome qui ne l'est pas. Cependant quatre critères peuvent influencer son devenir : la taille, le nombre, le type histologique et le degré de dysplasie. Un adénome dont la taille est proche de 5mm ne présente de tissus malins que de façon exceptionnelle (Faivre & Bader, 1987), à l'inverse on peut estimer qu'un quart des adénomes ayant atteint une taille d'1 cm de diamètre se transformeront en cancer, et ce, indépendamment de leur âge (Muto *et al.*, 1975 ; Stryker *et al.*, 1987). Le nombre important d'adénomes chez un même patient est également un risque plus élevé de développer un CCR (Winawer *et al.*, 1993). Différents types histologiques de polypes adénomateux existent et sont classés selon leur architecture tissulaire : les adénomes tubuleux, tubulo-villeux, vilieux et dentelés (serrated en anglais) (Figure 16).

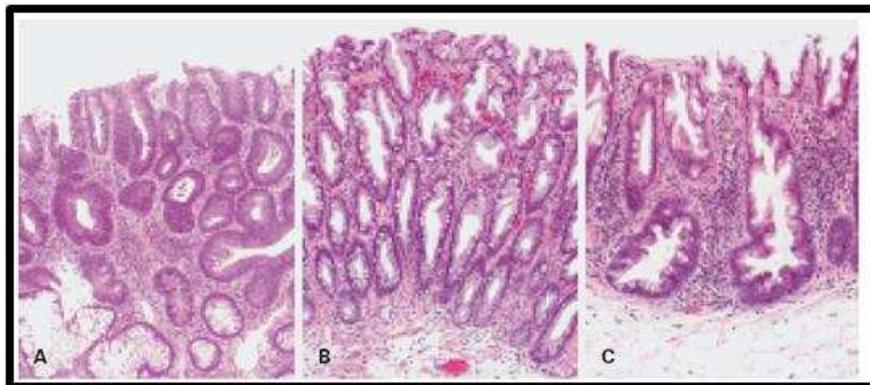


Figure 16 : Adénome tubulo-villeux avec dysplasie épithéliale minimale (A), polype hyperplasique dentelé (B) et adénome dentelé sessile (C). Coloration Hématoxyline-éosine, agrandissement X100 d'après Cathomas, 2006.

Plus l'adénome possède un contingent vilieux important plus le risque de transformation maligne est élevée (O'Brien *et al.*, 1990). Le degré de dysplasie est aussi une donnée importante, car lorsque l'épithélium est fortement touché par des anomalies architecturales, cellulaires et nucléaires cela sous-entend un nombre plus important d'anomalies génétiques. En effet, il est connu à présent que le CCR suit une cascade de mutations génétiques qui varie selon le type de cancer, sporadique ou d'origine familiale, et selon le type de polype adénomateux (Figure 17) (Leggett & Whitehall, 2010).

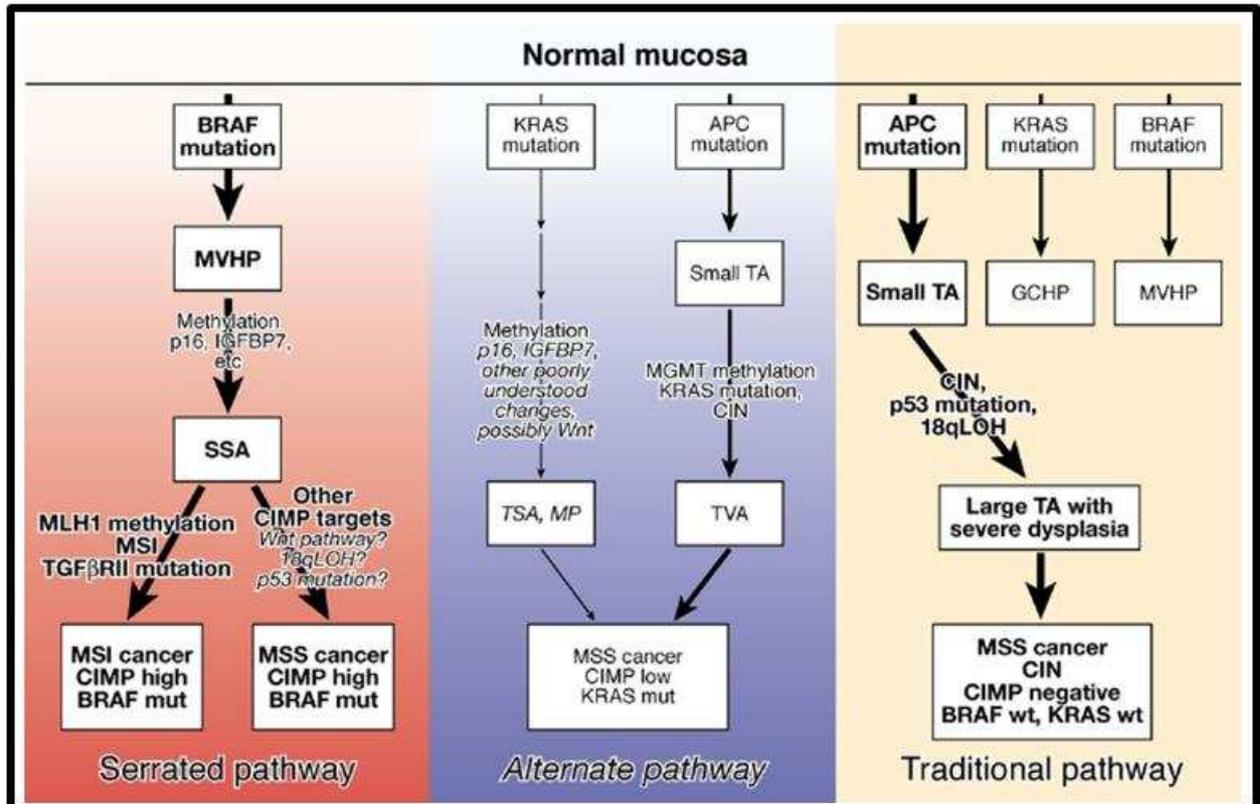


Figure 17 : Modèle de la tumorigénèse colorectale d'après Leggett & Whitehall, 2010.

Lorsque la dysplasie du polype est très importante, son développement conduit à l'invasion en profondeur de la muqueuse, ce qui marque la **transformation adénocarcinomateuse**. Une fois que l'adénocarcinome a dépassé la musculaire muqueuse, il peut conduire à la formation de métastases pouvant généraliser le cancer. Les étapes précédant le CCR suivent donc de multiples étapes de modifications génétiques, que ce cancer soit héréditaire ou sporadique. Les formes héréditaires représentent 5 à 10% des cas de CCR, les principaux syndromes de prédisposition aux cancers du côlon sont la polypose adénomateuse familiale (PAF ou FAP), le CCR héréditaire sans polypose (HNPCC pour hereditary non polyposis colorectal cancer, également appelé syndrome de Lynch), le

syndrome de polypose juvénile (Weitz *et al.*, 2005) et le syndrome de Peutz-Jeghers qui induit un risque élevé de CCR impliquant dans 40 à 60 % des cas une mutation du gène *stk 11* (Leggett *et al.*, 2003). Le plus retrouvé est le FAP qui est dû à des mutations du gène suppresseur de tumeur adenomatous polyposis coli (*apc*) conduisant à une inactivation du produit du gène. Pour le syndrome de Lynch, ce sont les mutations de gènes de réparation de l'ADN (*msh2*, *mlh1*, *mlh6*, *pms2*) qui sont impliquées (Lynch & Lynch, 1998). Pour la polypose juvénile, des mutations de *smad4* ont été mises en évidence (Howe *et al.*, 1998).

Certains cancers du côlon se développent suite à des maladies inflammatoires telles que la maladie de Crohn ou la colite ulcéreuse. Toutefois, ces cas ne concernent qu'un faible pourcentage des CCR (Ullman & Itzkowitz, 2011).

Les CCR sont majoritairement sporadiques (environ 90% des cas), mais impliquent forcément plusieurs modifications génétiques acquises au cours de l'existence et non transmises. Le schéma initialement proposé décrivant la perte d'*apc* suivie de celle de *k-ras* et enfin *p53* (Figure 18) (Fearon & Vogelstein, 1990) s'est avéré incomplet suggérant l'existence de nombreuses autres mutations impliquées dans le CCR (Smith *et al.*, 2002).

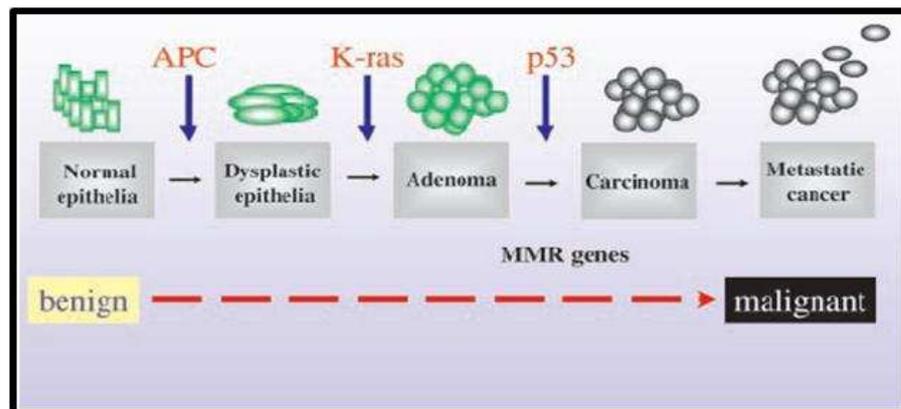


Figure 18 : Modèle de délétion génétique dans le CCR proposé par Vogelstein d'après Smith *et al.*, 2002.

L'ensemble des mutations retrouvées dans le CCR peuvent être induites par des instabilités génomiques qui sont soit des instabilités chromosomiques soit des instabilités microsatellitaires (MSI) (Worthley *et al.*, 2007). Les conséquences de ces phénomènes sont l'accumulation d'erreurs et donc de mutations dans les séquences génomiques.

On peut aussi ajouter, à ces instabilités, des modifications épigénétiques, qui vont entraîner des changements d'expression génique. Ces dérégulations épigénétiques peuvent être la méthylation de l'ADN ou la modification des histones ou encore de la chromatine (Van Engeland *et al.*, 2011).

Il n'existe donc pas un seul type de CCR répondant à une cascade de changements histologiques et moléculaires mais une multitude de causes et changements conduisant à la formation d'un adénocarcinome colorectal (Figure 19).

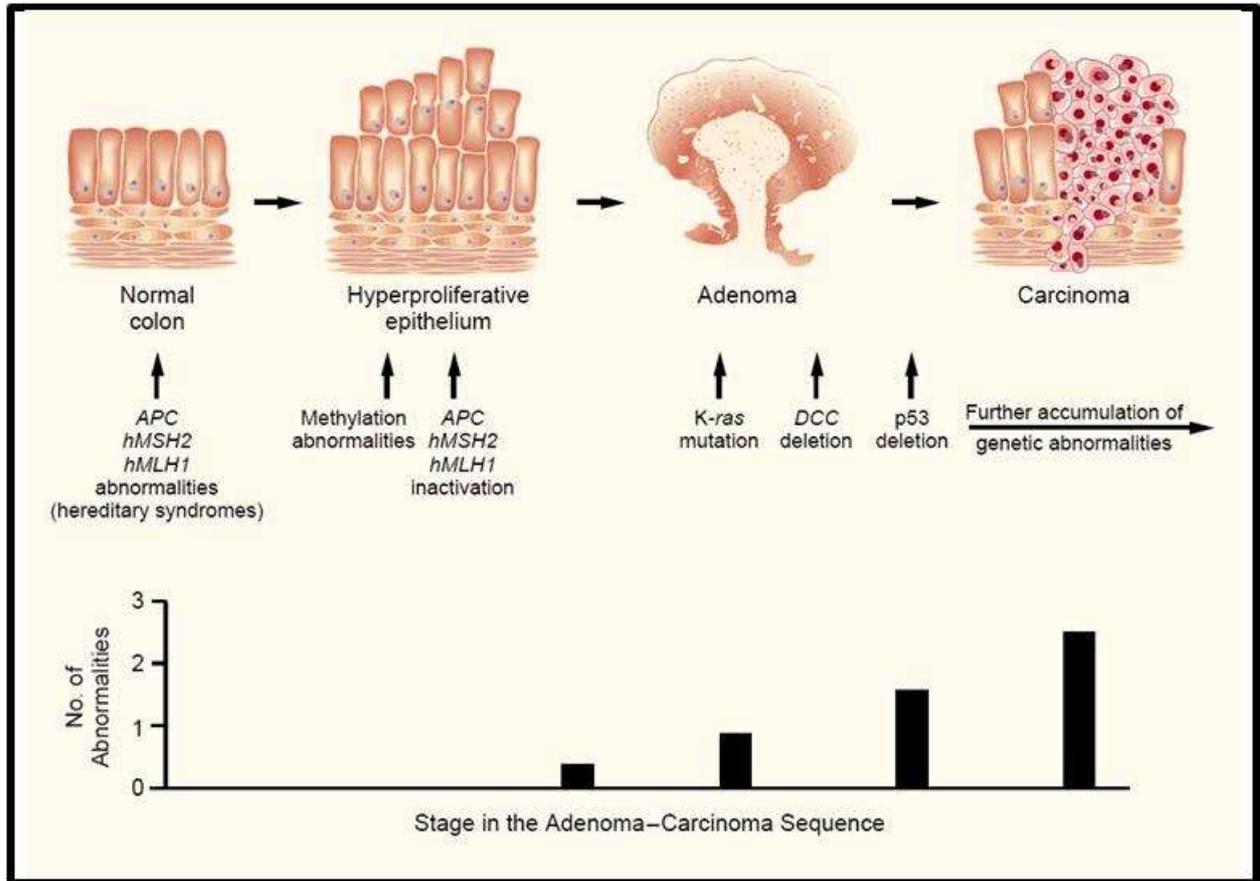


Figure 19 : Evénements durant la carcinogénèse colorectale, d'après Toribara & Sleisenger, 1995.

## 2.1 Les foyers de cryptes aberrantes

Les FCA ont initialement été décrits dans les côlons de souris traitées avec un agent carcinogène et proposées comme étant des lésions préneoplasiques (Bird, 1987). Plusieurs années après, ces lésions ont été observées chez l'Homme en histologie classique et avec coloration au bleu de méthylène, par chromoendoscopie, permettant une visualisation plus simple (Figure 20) (Roncucci *et al.*, 1991 ; Pretlow *et al.*, 1991). Une étude à plus grande échelle a permis ensuite de mettre en évidence la diminution du nombre de FCA après traitement avec un anti-inflammatoire non stéroïdien (Sulindac) connu pour diminuer le risque de cancer colorectal et le nombre de polypes chez des patients atteints de polyposes adénomateuses familiales (Takayama *et al.*, 1998). Ultérieurement une corrélation entre un nombre accru de FCA et le risque de développer un CCR, chez des patients consommant

conjointement du tabac et de l'alcool de façon régulière, a été établie ; mais aussi une augmentation du nombre de FCA avec l'âge et une localisation majoritaire des FCA dans le sigmoïde, où 70% des cancers colorectaux se localisent (Alrawi *et al.*, 2006 ; Sakai *et al.*, 2011). Ceci permet d'associer l'apparition des FCA avec les stades précoces de la carcinogène colique, pouvant en faire un marqueur des lésions précancéreuses.

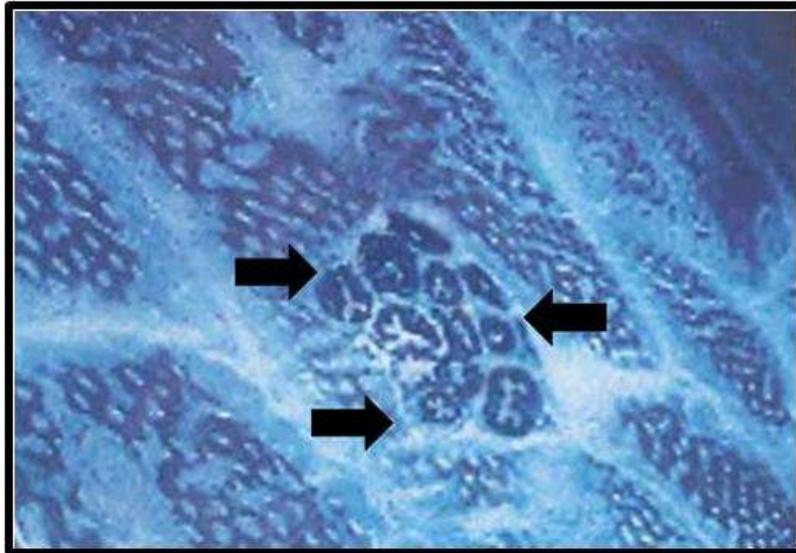


Figure 20 : Photographie de cryptes aberrantes (désignées par les flèches noires) par chromoendoscopie au bleu de méthylène d'après Takayama *et al.*, 1998.

## 2.2 Les polypes adénomateux

Les polypes adénomateux ou adénomes peuvent être classés en plusieurs catégories basées sur leurs aspects morphologiques : les polypes pédiculés, bien visibles, sessiles, moins proéminents et plans, difficiles à distinguer (Figure 21). Les premiers ont un pédicule leur donnant l'aspect d'un champignon tandis que les seconds n'en possèdent pas et sont donc reliés directement à la muqueuse avec une implantation plus large. Les adénomes plans sont, quant à eux, légèrement surélevés au-dessus du plan muqueux, de teinte rougeâtre et plus foncée que la muqueuse de voisinage (Muto *et al.*, 1985). Ces lésions sont difficiles à voir et une analyse très attentive de la muqueuse est nécessaire pour les détecter en ayant recours à l'utilisation de colorants (indigo, carmin).



Polype pédiculé



Polype sessile



Polype plan

Figure 21 : Aspects morphologiques des polypes adénomateux.

### 3. Classification du CCR

Les tumeurs peuvent être classées selon leur degré de développement, une classification internationale a été élaborée. Tout d'abord l'envahissement de la tumeur dans les différentes couches de la paroi colique est prise en compte, et ce, jusqu'au niveau du péritoine et des tissus péri-rectaux tels que le vagin ou la vessie. Ensuite il faut considérer la dissémination par voie lymphatique et la formation des métastases. Ainsi la classification de la tumeur prend en compte l'envahissement tumoral au niveau de la paroi colique et des organes voisins par contiguïté (T), l'envahissement ganglionnaire (N) et les métastases à distance (M). (Tableau 5).

**Tableau 5** : Classification TNM selon l'OMS 2010.

<p>T - Tumeur primitive</p> <p>Tx Renseignements insuffisants pour classer la tumeur primitive</p> <p>T0 Pas de signe de tumeur primitive</p> <p>Tis Carcinome in situ : intra-épithélial ou envahissant le chorion muqueux</p> <p>T1 Tumeur envahissant la sous-muqueuse</p> <p>T2 Tumeur envahissant la musculature</p> <p>T3 Tumeur envahissant la sous-séreuse ou les tissus péri-coliques ou péri-rectaux non péritonéalisés</p> <p>T4 Tumeur envahissant directement les autres organes ou structures et/ou perforant le péritoine viscéral</p> <p style="padding-left: 20px;">T4a Tumeur perforant le péritoine viscéral</p> <p style="padding-left: 20px;">T4b Tumeur envahissant directement les autres organes ou structures</p> <p>N – Adénopathies régionales</p> <p>Nx Renseignements insuffisants pour classer les adénopathies régionales</p> <p>N0 Pas de métastase ganglionnaire régionale</p> <p>N1 Métastase dans 1 à 3 ganglions lymphatiques régionaux</p> <p style="padding-left: 20px;">N1a Métastase dans 1 ganglion lymphatique régional</p> <p style="padding-left: 20px;">N1b Métastase dans 2 à 3 ganglions lymphatiques régionaux</p> <p style="padding-left: 20px;">N1c nodule(s) tumoral, c. à d., satellite(s) dans la sous-séreuse ou dans les tissus non- péritonéalisés péri-coliques ou péri-rectaux sans métastase ganglionnaire régionale</p> <p>N2 Métastase dans 4 ou plusieurs ganglions lymphatiques régionaux</p> <p style="padding-left: 20px;">N2a Métastase dans 4-6 ganglions lymphatiques régionaux</p> <p style="padding-left: 20px;">N2b Métastase dans 7 ou plusieurs ganglions lymphatiques régionaux</p>	<p>M – Métastases à distance</p> <p>M0 Pas de métastase à distance</p> <p>M1 Présence de métastase(s) à distance</p> <p style="padding-left: 20px;">M1a Métastase localisée à un seul organe (foie, poumon, ovaire, ganglion(s) lymphatique(s) autre que régional)</p> <p style="padding-left: 20px;">M1b Métastase dans plusieurs organes ou métastases péritonéales</p>																																																																								
	<p>Classification</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Stade</th> <th>T</th> <th>N</th> <th>M</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Stade 0</td> <td>Tis</td> <td>N0</td> <td>M0</td> </tr> <tr> <td>Stade I</td> <td>T1, T2</td> <td>N0</td> <td>M0</td> </tr> <tr> <td>Stade II</td> <td>T3, T4</td> <td>N0</td> <td>M0</td> </tr> <tr> <td>Stade IIA</td> <td>T3</td> <td>N0</td> <td>M0</td> </tr> <tr> <td>Stade IIB</td> <td>T4a</td> <td>N0</td> <td>M0</td> </tr> <tr> <td>Stade IIC</td> <td>T4b</td> <td>N0</td> <td>M0</td> </tr> <tr> <td>Stade III</td> <td>tous T</td> <td>N1, N2</td> <td>M0</td> </tr> <tr> <td>Stade IIIA</td> <td>T1, T2</td> <td>N1</td> <td>M0</td> </tr> <tr> <td></td> <td>T1</td> <td>N2a</td> <td>M0</td> </tr> <tr> <td>Stade IIIB</td> <td>T3, T4a</td> <td>N1</td> <td>M0</td> </tr> <tr> <td></td> <td>T2, T3</td> <td>N2a</td> <td>M0</td> </tr> <tr> <td></td> <td>T1, T2</td> <td>N2b</td> <td>M0</td> </tr> <tr> <td>Stade IIIC</td> <td>T4a</td> <td>N2a</td> <td>M0</td> </tr> <tr> <td></td> <td>T3, T4a</td> <td>N2b</td> <td>M0</td> </tr> <tr> <td></td> <td>T4b</td> <td>N1, N2</td> <td>M0</td> </tr> <tr> <td>Stade IVA</td> <td>tous T</td> <td>tous N</td> <td>M1a</td> </tr> <tr> <td>Stade IVB</td> <td>tous T</td> <td>tous N</td> <td>M1b</td> </tr> </tbody> </table>	Stade	T	N	M	Stade 0	Tis	N0	M0	Stade I	T1, T2	N0	M0	Stade II	T3, T4	N0	M0	Stade IIA	T3	N0	M0	Stade IIB	T4a	N0	M0	Stade IIC	T4b	N0	M0	Stade III	tous T	N1, N2	M0	Stade IIIA	T1, T2	N1	M0		T1	N2a	M0	Stade IIIB	T3, T4a	N1	M0		T2, T3	N2a	M0		T1, T2	N2b	M0	Stade IIIC	T4a	N2a	M0		T3, T4a	N2b	M0		T4b	N1, N2	M0	Stade IVA	tous T	tous N	M1a	Stade IVB	tous T	tous N	M1b
Stade	T	N	M																																																																						
Stade 0	Tis	N0	M0																																																																						
Stade I	T1, T2	N0	M0																																																																						
Stade II	T3, T4	N0	M0																																																																						
Stade IIA	T3	N0	M0																																																																						
Stade IIB	T4a	N0	M0																																																																						
Stade IIC	T4b	N0	M0																																																																						
Stade III	tous T	N1, N2	M0																																																																						
Stade IIIA	T1, T2	N1	M0																																																																						
	T1	N2a	M0																																																																						
Stade IIIB	T3, T4a	N1	M0																																																																						
	T2, T3	N2a	M0																																																																						
	T1, T2	N2b	M0																																																																						
Stade IIIC	T4a	N2a	M0																																																																						
	T3, T4a	N2b	M0																																																																						
	T4b	N1, N2	M0																																																																						
Stade IVA	tous T	tous N	M1a																																																																						
Stade IVB	tous T	tous N	M1b																																																																						

Lorsqu'un CCR est dépisté, le pronostic vital du patient dépend du stade TNM de la tumeur (Tableau 6).

Tableau 6 : Survie à 5 ans selon le stade TNM.

Stades TNM	Pronostic : survie à 5 ans
T1/T2 N0 M0	95%
T3 N0 M0	80%
T4 N0 M0	80%
T1/T2 N1 M0	47%
T3/T4 N1 M0	47%
Tous T N2M0	47%
Tous T tous N M1	5%

## 4. Dépistage et diagnostic

Le CCR est un cancer à évolution lente qui, lorsqu'il est détecté à temps, peut être éradiqué facilement contrairement à d'autres cancers (poumon, pancréas...). Pour cette raison les pouvoirs publics français ont lancé un programme de dépistage gratuit de ce cancer pour les personnes entre 50 et 74 ans. Pour cela le test HémocultII® est utilisé, il a l'avantage d'être d'un coût abordable et accessible pour la majorité de la population exposée mais avec l'inconvénient d'être peu fiable. Différentes techniques visant à détecter certains marqueurs sériques, ou à visualiser les potentielles anomalies de la paroi intestinale sont utilisées. Parmi les différents marqueurs sériques (comme CA 19-9, CA 242, CA 72-4), seul le CEA (antigène carcino-embryonnaire) (Thomson *et al.*, 1969) est employé pour suivre d'éventuelles métastases ou récidives chez des patients ayant été opérés d'un CCR. Il est cependant peu fiable comme marqueur précoce du CCR (Fletcher, 1986 ; Duffy, 2001) et ne peut donc pas être utilisé dans ce cas. Les techniques d'imageries les plus utilisées sont le scanner et la coloscopie, qui sont très répandues chez des populations ciblées comme les individus possédant des antécédents familiaux de CCR. Le dépistage du CCR peut être divisé en deux catégories, les tests capables de visualiser directement la muqueuse colorectale (Imagerie colorectale) comme l'endoscopie et les tests qui révèlent la présence de sang dans les selles. Ces derniers sont des tests de sélection dont la positivité conduit à un examen diagnostique, dont le plus utilisé est la coloscopie totale. Le choix des techniques mises en œuvre dépend du but recherché. En effet, le diagnostic de masse nécessite l'utilisation de moyens peu onéreux, rapide d'exécution et peu contraignant pour le patient. A l'inverse, des moyens plus complexes et coûteux seront appliqués dans des populations définies classées comme ayant de forts risques de contracter un CCR. De ce fait, la population peut être classée en trois catégories de risques dont chacune d'elle sera dépistée de façon adéquate.

- 1) Les populations à risque moyen, correspondant aux patients dont l'âge est compris entre 50 et 74 ans, n'ayant pas d'antécédents familiaux, personnels ou tout autre facteur identifié.
- 2) Les populations à risque élevé, dans lesquelles se situent les sujets ayant des antécédents personnels d'adénomes ou de CCR et familiaux avec un ou plusieurs parents de premier degré atteints d'un adénome de plus de 1 cm ou de CCR. Il en est de même pour les individus souffrant de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) telles que les maladies de Crohn ou la rectocolite hémorragique.
- 3) Les populations avec un risque très élevé, qui sont sujets par leur contexte familial à être touchés par des CCR à transmission héréditaire autosomale dominante comme les PAF, HNPCC, les polyposes juvéniles et le syndrome de Peutz-Jeghers.

Les deux dernières populations doivent être suivies par coloscopie, très régulièrement et être exclues des dépistages de masse.

## 4.1 La détection d'hémoglobine dans les selles

Afin de détecter l'hémoglobine, deux approches sont utilisées : le test au gaïac et les tests immunologiques. Le test au gaïac, utilisé par le test HémocultII®, met en jeu une résine du même nom qui est extraite d'arbres d'origine américaine : le *Guajacum officinale* et le *Guajacum sanctum*. L'extrait est un mélange complexe contenant principalement les acides  $\alpha$ - et  $\beta$ -guaiaconique, mais aussi de l'acide guaiacinique et d'autres composants secondaires. La résine de gaïac, en présence d'une solution alcoolique d'eau oxygénée détecte l'activité pseudoperoxydasique de l'hémoglobine. La première limite de ce test est qu'il n'est pas spécifique de l'hémoglobine humaine et est donc dépendant du régime alimentaire des jours qui précèdent le test. Il peut donc présenter des faux positifs avec certains aliments riches en peroxydases comme la viande rouge, certains fruits et légumes (Coughlin & Friend, 1987). La seconde est toujours dépendante de l'alimentation mais est liée aux effets d'inhibition par la vitamine C (Jaffe *et al.*, 1975). Les tests immunologiques reposent, quant à eux, sur l'utilisation d'anticorps polyclonaux ou monoclonaux anti-hémoglobine humaine, limitant ainsi les faux positifs. Plusieurs systèmes de révélations existent comme l'immunochromatographie et l'immunodiffusion radiale (Detectacol®, Hemotest®...). Outre le manque de sensibilité de cette approche (Morikawa *et al.*, 2005), son coût la rend moins adaptée à une utilisation de masse. De plus, ces deux techniques reposent sur la détection de sang dans les selles qui est également le signe d'hémorroïdes, lésions diverses ou fistules. De

plus un test négatif ne signifie pas forcément l'absence de lésions cancéreuses puisque les adénomes ne saignent pas toujours (Ransohoff & Sandler, 2002). Cependant différents travaux ont démontré la diminution de la mortalité par CCR, par l'emploi du test HémocultII®, après dépistage de masse induisant la détection de 50 à 60% des carcinomes et 20 à 30% des adénomes de plus de 1 cm (Kewenter *et al.*, 1988 ; Hardcastle *et al.*, 1996 ; Kronborg *et al.*, 1996 ; Faivre *et al.*, 2004).

## 4.2 L'imagerie du côlon

La technique la plus utilisée pour « imager » le côlon est la **coloscopie totale**, initialement décrite par différents groupes japonais (Kanazawa & Tanaka, 1965 ; Oshiba & Wanatabe, 1965 ; Niwa, 1965). Le principe repose sur l'utilisation d'une sonde flexible, introduite par l'anus, comportant une caméra et des instruments permettant l'ablation de polypes, à son extrémité (Figure 22). Elle ne peut, néanmoins, être utilisée que dans certaines conditions, de par sa complexité de mise en place et les risques éventuels encourus par le patient lors de sa réalisation, liés à la sédation et aux risques, assez rares, de perforations. Elle permet dans le même temps la résection puis l'analyse histologique de toute lésion retrouvée mais peut parfois être incomplète ou manquer des lésions en raison de l'existence d'un angle ou d'un pli. Elle est réalisée chez les patients ayant un test d'hémoculture positif, ainsi que chez les patients appartenant à des populations aux risques élevés et très élevés, *à fortiori* lorsque des douleurs intestinales ou autres manifestations seront ressenties. Par ailleurs, des contre-indications existent en cas d'infarctus du myocarde très récent, d'une sigmoïdite diverticulaire aiguë avec fièvre ou en cas de perforation. De ce fait, plusieurs alternatives existent.

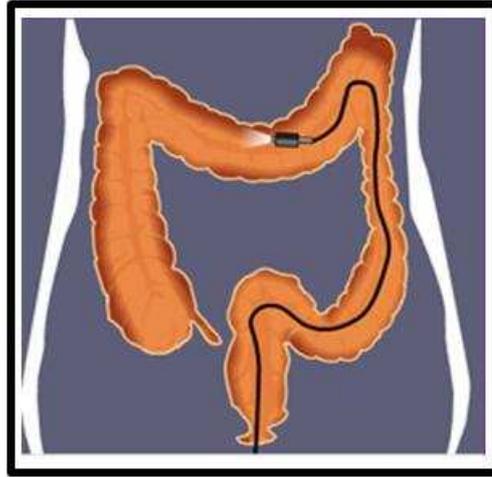


Figure 22 : Schématisation de la coloscopie totale d'après [www.astrazeneca.fr](http://www.astrazeneca.fr).

La **coloscopie virtuelle**, (également appelée *computed tomography (CT) colonography* ou encore coloscopie virtuelle par tomographie assistée par ordinateur) dont le principe repose sur l'étude de la surface colique en réalisant une distension de la lumière colique par insufflation de gaz ( $\text{CO}_2$  ou air), permettant d'obtenir des images 3D du gros intestin. Ceci se fait à partir d'images acquises à l'aide d'un scanner rayons X (Vining *et al.*, 1994). Plusieurs études ont été réalisées afin d'évaluer l'efficacité de cette technique comparativement à la coloscopie ; l'une d'elles décrit, lors de l'étude de 1233 patients adultes asymptomatiques, une sensibilité de 93,8% pour des polypes d'au moins 10 mm de diamètre, 93,9% et 88,7% pour les polypes d'au moins 8 et 6 mm de diamètre respectivement. En comparaison l'étude de ces mêmes patients, dont les polypes ont été classés de la même façon, par coloscopie totale, a révélé une sensibilité de 87,5%, 91,5% et 92,3% (Pickhardt *et al.*, 2003). La coloscopie virtuelle est donc considérée comme aussi sensible que la coloscopie totale pour des polypes dont la taille est supérieure à 5 mm (Graser *et al.*, 2009) mais doit être suivie d'une coloscopie totale lorsqu'un polype doit être prélevé (Pickhardt *et al.*, 2011).

La **médecine nucléaire** met en jeux des molécules radioactives ou radiotraceurs, qui pour le côlon, sont utilisés en tomographies d'émission de positons (TEP ou positron emission tomography). Les radioisotopes les plus utilisés sont le technétium  $^{99\text{m}}$  et le 2-deoxy-2- $(^{18}\text{F})$ fluoro-D-glucose, leurs durées de vie respectives sont de 6 heures et 2 heures. L'utilisation du glucose marqué repose sur l'augmentation du métabolisme glucidique dans les cellules cancéreuses. Les radiotraceurs produisent des positons qui, lorsqu'ils s'annihilent, produisent deux photons, qui seront ensuite visualisés à l'aide d'une caméra adaptée permettant de localiser la zone anatomique où s'accumule le radiotracteur. Le TEP est

maintenant plus utilisé associé à la CT, ce qui offre d'une part une information fonctionnelle avec le TEP et d'autre part anatomique avec la CT. Cependant cette technologie est plus couramment utilisée dans le côlon et le rectum afin de suivre l'apparition de métastases (Papathanassiou *et al.*, 2009).

Le **lavement baryté** qui consiste à introduire de la baryte dans le côlon par lavement, permettant son dépôt en une couche fine sur la paroi colique, a la propriété d'être opaque aux rayons X. Il peut ainsi faire ressortir les parois intestinales qui seront visibles sur les clichés. Sa sensibilité est très faible, comparativement à la technique de référence de coloscopie totale, puisque pour des lésions supérieures ou égales à 10 mm et 6 mm seules 48% et 35% respectivement ont été détectées par cette technique, sur une population à risque élevé (Rockey *et al.*, 2005).

La **coloscopie partielle ou recto-sigmoïdoscopie** offre l'avantage de ne pas nécessiter une préparation du tube digestif aussi drastique que les précédentes techniques, à savoir un lavement complet par 2 à 4 litres d'une solution hydroélectrolytique contenant du PEG 4000 ou du phosphate de sodium. La recto-sigmoïdoscopie se fait après un ou deux lavements, sans anesthésie, et est interrompue lorsqu'elle est gênée par des matières ou en cas de douleur. Cette technique ne permet de visualiser que le côlon distal et reste moins résolutive que la coloscopie totale dans ce compartiment (Lieberman *et al.*, 2001).

L'**ultrasonographie hydrocolique** (ou échographie hydrocolique) qui est une technique, comme son nom l'indique, basée sur l'utilisation des ultrasons pour visualiser le côlon, s'est avérée très peu sensible pour la détection de polypes. De plus, elle s'est montrée sur une étude comprenant 52 patients, risquée puisque deux d'entre eux ont eu des complications (Chui *et al.*, 1994).

Le **système NBI (Narrow Band Imaging)** récemment développé permet de filtrer 3 bandes spectrales d'intérêt au sein du spectre lumineux visible et ainsi favoriser le passage de la lumière bleue. Cette technique repose sur la corrélation, clairement démontrée, entre l'angiogenèse des tissus tumoraux et la stimulation de leur croissance (Folkman, 1971 ; Folkman *et al.*, 1989). En effet, le système NBI offre une meilleure visualisation de la microvascularisation tissulaire grâce à l'absorption de la lumière bleue par l'hémoglobine, mais aussi une image plus contrastée permettant de mieux apprécier l'organisation tissulaire de la muqueuse colique. Cependant le gain qu'apporte le système NBI, comparativement à la

coloscopie totale, reste à déterminer clairement puisque différentes études ont démontré soit une amélioration (Uraoka *et al.*, 2008), soit aucun apport dans la détection des adénomes (Rex & Helbig, 2007 ; Adler *et al.*, 2008).

De nombreuses alternatives sont en développement comme la **capsule colique** permettant de visualiser le tractus digestif par une caméra incorporée à une petite sonde préalablement ingérée, dont l'efficacité est discutée (Eliakim *et al.*, 2006 ; Van Gossum *et al.*, 2009 ; Spada *et al.*, 2011), la **côlonographie IRM** (Imagerie par résonance magnétique) (Luboldt *et al.*, 1997 ; Kuehle *et al.*, 2007) et la **microendoscopie confocale** (Hisiung *et al.*, 2008).

## 4.2.1 L'IRM

### Principe de l'IRM

L'IRM est une technique qui permet de générer des images bi- et tridimensionnelles, permettant de visualiser de nombreuses précisions anatomiques. Elle présente l'avantage d'être non invasive et sans effet secondaire connu, hormis les incompatibilités avec des matériaux contenant du fer (Stimulateur cardiaque, défibrillateur...). L'IRM consiste à observer la RMN (résonance magnétique nucléaire) principalement des **protons** de l'eau contenue dans l'organisme, c'est-à-dire la réponse des noyaux soumis à un champ magnétique extérieur et à une excitation électromagnétique. En effet, le proton qui constitue le noyau de l'atome d'hydrogène possède un **moment magnétique** qui s'apparente à un petit aimant, que l'on qualifie de spin. On peut considérer que lorsque l'on place un sujet dans un champ magnétique et qu'on lui applique une onde électromagnétique à une fréquence bien définie dite de **résonance** ou de Larmor, alors la fréquence ajustée au mouvement de rotation de ces spins va permettre l'orientation des protons dans la direction de ce champ. L'analyse IRM consiste à mesurer l'aimantation résultante en chaque point des tissus analysés, mais plus particulièrement, la relaxation de cette aimantation après le phénomène de résonance magnétique. La relaxation, définie comme le processus par lequel les spins excités évoluent et retournent à leur état d'équilibre, est caractérisé par deux temps appelés T1 pour le temps de **relaxation longitudinale** (axe Z) ou spin-réseau et T2 pour le temps de **relaxation transversale** (x-0-y) ou spin-spin. Par ailleurs, il est possible également de modifier le temps de répétition correspondant à l'intervalle entre deux excitations et le temps d'écho qui est l'intervalle de temps entre l'excitation et la survenue du signal IRM.

On peut localiser les atomes en réalisant un gradient directionnel sur le champ magnétique, afin de modifier la fréquence de résonance des protons, puis en appliquant des techniques de traitement du signal utilisant les algorithmes de la transformée de Fourier. Etant donné que l'aimantation est proportionnelle à la quantité de noyaux d'hydrogène présents et que les différents tissus ont un contenu en eau variable, pouvant influencer le T1 et le T2, les images IRM résultantes reproduisent l'anatomie des tissus avec une bonne résolution et un bon contraste. Les images sont d'ailleurs composées de pixels dont le niveau sur l'échelle de gris représente l'intensité du signal produit par le voxel (volume élément) correspondant. Il existe un grand nombre de séquences d'imagerie. Certaines favorisent l'influence du T1, d'autres du T2 et seront qualifiées de pondérées en T1 ou T2 respectivement.

Parallèlement à cela, on peut améliorer le contraste grâce à l'utilisation d'agents de contraste. Ces produits sont capables d'influencer localement la relaxation des protons de l'eau des tissus. Un agent de contraste IRM peut ainsi faire varier les temps de relaxation T1 et/ou T2, avec une augmentation de l'intensité du signal pour T1 et une diminution pour T2. Ils seront qualifiés d'agents de contraste positif (effet T1) ou négatif (effet T2). Les agents de contraste peuvent ensuite être classés en deux catégories **paramagnétiques** et **superparamagnétiques** selon leur nature, les premiers sont des complexes d'ions possédant un ou plusieurs électrons libres leur conférant un grand moment magnétique (le gadolinium(III) est le plus utilisé) alors que les seconds sont constitués de cristaux d'oxyde de fer nanométriques. On distingue les SPIO (Small Particles of Iron Oxide) et les USPIO (Ultrasmall Particles of Iron Oxide) dont les diamètres respectifs sont supérieurs à 50 nm et entre 10-50 nm. Les particules superparamagnétiques agissent comme agents de contraste négatif tandis que les molécules paramagnétiques se comportent comme des agents de contraste positif.

L'un des objectifs actuels de la recherche en imagerie IRM est l'**imagerie moléculaire** (Weissleder & Mahmood, 2001) qui consiste à coupler l'une ou l'autre catégorie d'agents de contraste, à des molécules permettant d'augmenter leur tropisme vis-à-vis de tissus touchés par une pathologie. Les produits en cours de développement touchent des pathologies aussi diverses que la maladie d'Alzheimer (Poduslo *et al.*, 2004 ; Higuchi *et al.*, 2005 ; Larbanoix *et al.*, 2010), les plaques d'athéromes (Jaffer *et al.*, 2006 ; Burtea *et al.*, 2008) et différentes pathologies cancéreuses (Harisinghani *et al.*, 2003 ; Kelly *et al.*, 2008 ; Penet *et al.*, 2009 ; Capala & Bouchelouche, 2010).

## La colonographie par IRM

Différentes modalités d'utilisation de l'IRM du côlon sont actuellement utilisées dans le but de visualiser des polypes existants, mais seuls les produits de contrastes non couplés à des molécules pouvant cibler des biomarqueurs, sont employés en clinique. Ils peuvent être utilisés en intraveineuse ou par lavement en mélange avec de l'eau. Cette technique a initialement été élaborée en utilisant 15 à 20 mL de gadolinium-diethylenetriaminepentaacetic acid (Gd-DTPA) à 0,5 mol/L repris dans 1,5 à 2 litres d'eau pour être introduits dans le côlon puis analysé avant et après injection intraveineuse de Gd-DTPA sur trois patients présentant des anomalies coliques diverses, en utilisant la séquence d'acquisition d'images GRE (breath-hold 3D gradient-echo) par coupe coronale. Cette étude a permis de révéler des diverticules, des carcinomes et des polypes après retraitement et analyse des images (Luboldt *et al.*, 1997). D'autres études ont démontré la faisabilité « d'imager » le côlon après y avoir introduit l'agent de contraste, précédemment décrit, par lavement à l'aide d'imageur IRM de 1 ou 1,5 Tesla (Saar *et al.*, 2000 ; Pappalardo *et al.*, 2000). Par ailleurs, plusieurs essais ont été réalisés afin de distendre le côlon à l'aide d'air ou de CO<sub>2</sub>, mais le lavement reste la technique la plus utilisée (Morrin *et al.*, 2000 ; Lomas *et al.*, 2001).

Trois types de marquage colique ont ensuite été envisagés : bright (brillante) lumen, dark lumen et marquage des selles (Figure 23). Les deux premières techniques nécessitent que le côlon soit préalablement vidé de son contenu, la technique dite brillante utilise un lavement eau/Gd ce qui permet d'obtenir un signal plus clair dans la lumière intestinale (Luboldt *et al.*, 2000). La seconde technique utilise, quant à elle, une injection de Gd intraveineuse avec un simple lavement à l'eau et permet un éclaircissement de la paroi colique contrastant avec la lumière (Lauenstein *et al.*, 2001 ; Hartmann *et al.*, 2006). La dernière technique, des selles marquées, utilise du sulfate de baryum ingéré 36H avant l'analyse IRM associée à un régime sans fibres et sans sources de manganèse comme le chocolat et les fruits. Ceci permet de visualiser la lumière intestinale sans en vider le contenu, et la détection des polypes dont la taille est supérieure à 8 mm (Lauenstein *et al.*, 2002).

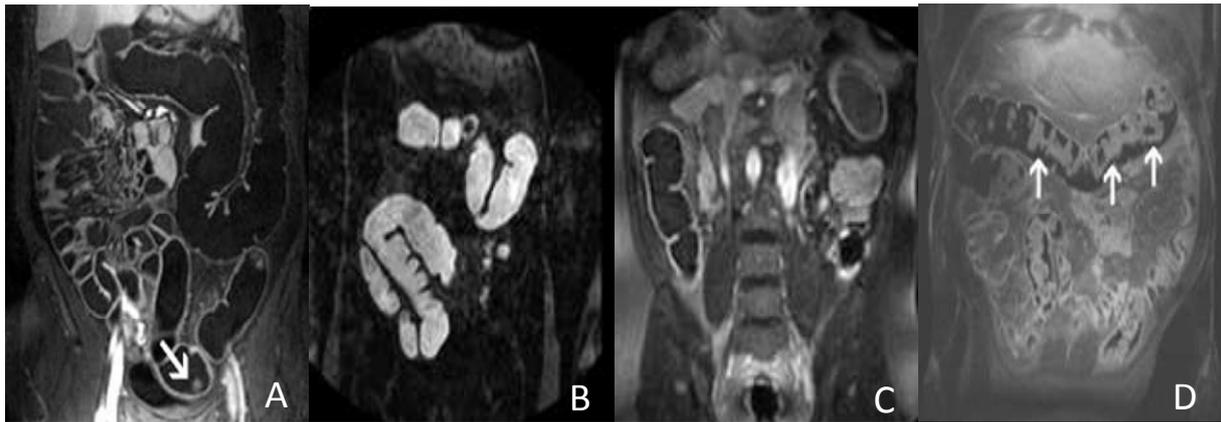


Figure 23 : Images IRM en dark lumen (A), bright lumen (B), bright et dark lumen (C) et marquage des selles (D) d'après Geenen *et al.*, 2003 ; Lauenstein *et al.*, 2001, 2002.

### L'imagerie moléculaire IRM du cancer

Le but premier de l'imagerie moléculaire IRM est d'utiliser une molécule affine greffée à un agent de contraste dans le but d'observer des phénomènes biologiques à l'échelle de la cellule ou de l'organe. Dans le cas du cancer, l'imagerie moléculaire, permet la visualisation des tissus tumoraux qui expriment des marqueurs spécifiques. Pour cela des anticorps ont initialement été utilisés (Cerdan *et al.*, 1989 ; Folli *et al.*, 1994 ; Neri *et al.*, 1997 ; Curtet *et al.*, 1998), avec cependant l'inconvénient d'être immunogène, pouvant rendre les produits de contrastes greffés insolubles, mais aussi de posséder une demi-vie plasmatique trop longue (Goldsmith, 1997). De ce fait, d'autres molécules affines ont été testées, les protéines, peptides, peptidomimétiques et des ligands d'autre nature, afin de cibler plusieurs types de cancers mais rarement le CCR, comme par exemple, après identification d'un peptide de 15 acides aminés dans le paratope d'un anticorps monoclonal reconnaissant une forme faiblement glycosylée de MUC1, elle-même caractéristique des tumeurs. Ce peptide a été greffé à un agent de contraste (nanoparticules d'oxyde de fer) afin de tester la spécificité par IRM sur des souris ayant préalablement subi une xéno greffe de lignées cellulaires, exprimant ou non MUC1 sous-glycosylée (Moore *et al.*, 2004). La transferrine a également déjà été utilisée, greffée à des agents de contraste (nanoparticules d'oxyde de fer), afin de cibler son récepteur présent en plus grande quantité chez des individus touchés par différents cancers (Moore *et al.*, 1998 et 2001). Un autre exemple est l'utilisation de l'acide folique greffé à un agent superparamagnétique, avec l'objectif d'observer la fixation à son récepteur surexprimé dans les tumeurs solides (Sonvico *et al.*, 2005). De nombreuses applications sont possibles, mais le développement d'outils d'imagerie moléculaire IRM pour le dépistage ou le diagnostic du CCR, sont encore à réaliser.

## 4.2.2 La microendoscopie confocale colique

De nouveaux outils d'imagerie ont récemment été développés afin d'améliorer la visualisation des tissus sans prélèvement préalable. Ils utilisent pour cela une technique endoscopique avec la résolution d'un microscope confocal associé à l'application préalable, topique ou par intra-veineuse, d'un fluorochrome (fluorescéine, acridine). Ceci permet d'obtenir par voie endoscopique des images à des profondeurs variables dans le tissu, avec une résolution de quelques micromètres. Les images obtenues offrent ainsi des informations comparables à l'histologie classique (Krohne *et al.*, 2002 ; Rouse *et al.*, 2004 ; Kiesslich *et al.*, 2004 ; Wang *et al.*, 2007). De très récents travaux ont utilisé une approche d'imagerie moléculaire couplée à la coloscopie totale en utilisant un peptide affiné pour les dysplasies coliques humaines et murines, couplé à la fluorescéine (Hsiung *et al.*, 2008 ; Miller *et al.*, 2011). Ces travaux ont pour finalité d'éviter la résection systématique des petits polypes et d'améliorer la détection des polypes plans et sessiles difficilement identifiables par coloscopie classique.

## 5. Les modèles animaux du cancer colorectal et MUC5AC

### 5.1 Les xénogreffes murines

Le principe de la xénogreffe est d'injecter des lignées cellulaires coliques humaines chez des modèles murins immunodéprimés afin de mimer une tumeur humaine. Il existe 5 types d'implantations : l'injection ectopique (sous cutanée), l'injection orthotopique (côlon, caecum ou paroi rectale), l'injection intrasplénique, l'injection intra péritonéale et l'injection dans la veine porte. La plus utilisée et la plus simple à mettre en œuvre est l'injection sous-cutanée. Ce mode d'implantation présente l'inconvénient d'être éloigné de l'environnement d'une véritable tumeur colique, avec comme conséquence un changement du profil d'expression cellulaire donc potentiellement du profil d'expression des mucines et de l'angiogénèse. Le second mode d'injection le plus utilisé est la greffe orthotopique qui présente l'avantage d'être localisée dans un environnement plus proche physiologiquement de celui d'une véritable tumeur et de former spontanément des métastases. Cependant, il présente l'inconvénient d'être difficile à réaliser et moins reproductible que le précédent mode d'injection. Les types cellulaires utilisés dépendent des caractéristiques moléculaires recherchées. Dans le cas de lignées coliques humaines exprimant MUC5AC, plusieurs ont été

décrites dans la littérature comme DLD1, HCTC, LS174T, LS180, KM12C, Caco2 et HT29 (Iida *et al.*, 1998 ; Leteurtre *et al.*, 2004).

## 5.2 La chimio-induction chez les rongeurs

De nombreuses molécules ont été évaluées afin d'en établir leur capacité à développer des tumeurs cancéreuses chez les modèles murins (Tableau 7). Les amines hétérocycliques en complément du DSS (Dextran sodium sulfate), administrées par voie gastrique, induisent chez 50% des animaux des tumeurs en utilisant le PHiP (Nishikawa *et al.*, 2005). Les amines aromatiques avec le 3,2'-diméthyl-4-aminobiphényl ou DMAB, sont capables d'induire de multiples tumeurs dans différents organes (Cleveland *et al.*, 1967), les alkylnitrosamides avec le Methyl-N'-Nitro-N-Nitroso-Guanidine (MNNG) par instillation intrarectale répétées (Narisaw *et al.*, 1971 ; Maurin *et al.*, 2007) et l'injection d'azoxyméthane (AOM).

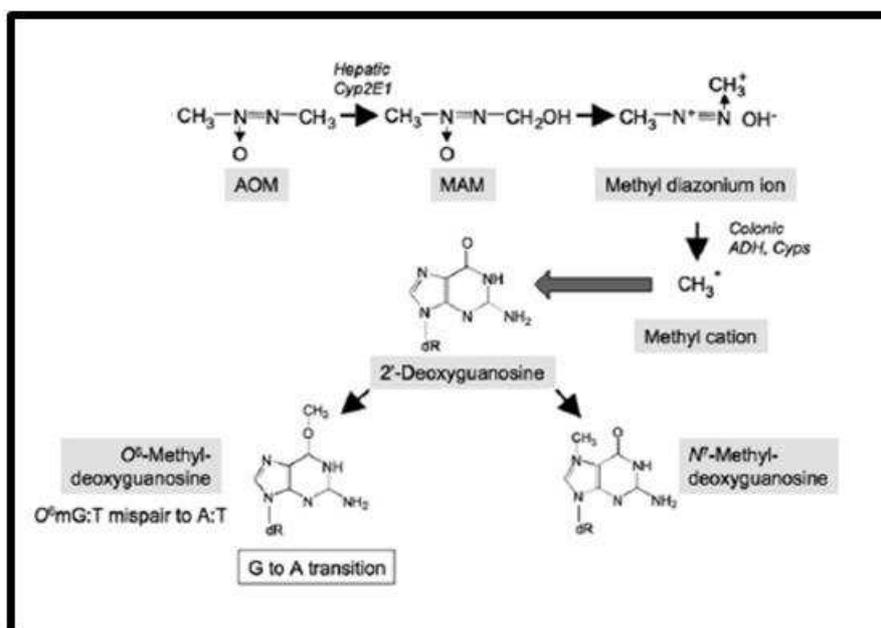


Figure 24 : Métabolisme de l'AOM adapté de Rosenberg *et al.*, 2009.

L'injection d'AOM permet après 3 semaines l'induction d'adénomes chez 2 souris sur 5 et après 6 semaines de traitement 100% d'induction (Rosenberg *et al.*, 2009). De plus, l'AOM est spécifique du côlon puisque dégradé par des enzymes coliques. Comme décrit dans la figure 24, l'AOM est métabolisé tout d'abord en MAM dans le foie pour donner ensuite un ion diazonium méthyle sous l'action de la NAD déshydrogénase (présente dans le côlon et le foie). Ceci permet de libérer un ion méthyle sous l'action d'enzymes coliques. Cet ion pourra

se fixer à la 2'-deoxyguanosine en N<sup>7</sup> ou en O<sup>6</sup> entraînant ainsi une mutation par mésappariement, localisée uniquement dans le côlon.

Il y a, sans conteste, bien plus de données concernant la chimio induction par AOM/DSS chez la souris que chez le rat. Différentes lignées de souris ont été injectées avec de l'AOM (une fois, 10mg/kg) avec et sans ajout dans l'eau de boisson de 2% de DSS (40 000 Da) puis sacrifiées de 3 à 25 semaines après injection. Ces études ont permis de déterminer que la lignée BALB/c était la plus encline à développer des tumeurs lorsque l'on associait l'AOM et le DSS, avec 100% d'animaux présentant des adénocarcinomes après 18 semaines de traitement (Tanaka *et al.*, 2003 ; Suzuki *et al.*, 2006).

Tableau 7 : Les différents agents chimio-inducteurs chez les rongeurs.

Les composés chimio inducteurs	Les alkylnitrosamides (MNNG et MNU)	Les amines aromatiques (DMAB)	Les amines hétérocycliques (IQ et PhIP)	AOM/DSS
Temps d'induction	20 semaines	20 semaines	55 à 72 semaines	3 à 20 semaines
Mode d'injection	Intra rectale (difficile et peu reproductible)	Sous-cutanée	Dans l'alimentation	Intra péritonéale
Nombre d'injections nécessaires	1 à 2	Plus de 10	Plusieurs semaines	1 d'AOM puis DSS dans l'eau de boisson, 1 semaine
Spécificité tissulaire	Par son mode d'injection, spécifique	Pas spécifique	Peu spécifique	Spécifique
Dangerosité	CMR	CMR	Nocif	CMR
Efficacité d'induction	50 à 70% d'induction	Faible	Faible	100% après 6 semaines

### 5.3 Autres modèles décrits

De nombreuses lignées murines ont été invalidées pour différents gènes, dont la liste n'est pas exhaustive, et développent à plus ou moins long terme des polypes et adénocarcinomes coliques comme la souris invalidée pour *Muc2* (Velcich *et al.*, 2002) ou encore la lignée invalidée pour le gène *apc* (*adenomatous polyposis coli*) en complément d'un traitement au DSS. Les souris sauvages ayant servi à la conception du mutant APC ne

présentent pas de dysplasie, alors que les souris mutées traitées avec 1 à 2 cycles de DSS (incubation 20 semaines) possèdent 100% de dysplasie. Ce modèle est d'autant plus pertinent que chez l'Homme des mutations sur le gène APC sont associées à l'émergence du CCR (Kinzler *et al.*, 1991 ; Groden *et al.*, 1991).

# *Helicobacter pylori*

## 1. Historique

Au cours des années 40, plusieurs travaux ont mis en évidence la présence d'une bactérie spiralée dans la muqueuse gastrique humaine et de macaque rhésus. Cette bactérie identifiée dans de nombreuses biopsies gastriques traitées en routine, n'était pas corrélée à un phénotype particulier (Doenges, 1938 ; Freedburg & Barron, 1940 ; Palmer, 1954 ; Fung *et al.*, 1979). Plusieurs années après ces travaux, deux scientifiques ont associé cette bactérie spiralée à une inflammation et à des ulcères de la muqueuse gastrique (Marshall & Warren, 1984). La culture de cette bactérie a, dans un premier temps, été problématique puisqu'en utilisant des temps d'incubation classiques de 24 à 48 heures, aucune bactérie ne se développait. C'est en prolongeant la durée de façon fortuite, lors d'un week-end prolongé, que la bactérie, nommée initialement *Campylobacter pyloridis*, puis en 1989 *Helicobacter pylori*, s'est multipliée (Romaniuk *et al.*, 1987 ; Goodwin *et al.*, 1989). L'implication de *H. pylori*, dans la formation d'ulcères gastriques et duodénaux a longuement été discutée par la communauté médicale, jusque-là incrédule et persuadée d'une origine psychosomatique de ces pathologies. Afin de prouver leur hypothèse, Marshall décida d'expérimenter l'effet des bactéries sur lui-même. Il avala une culture de *H. pylori*, ce qui eut pour effet de déclencher des vomissements après une semaine et l'apparition d'une gastrite. La biopsie confirma la présence de bactéries spiralées colonisant la muqueuse gastrique. Plusieurs jours plus tard, Marshall débuta une cure d'antibiotiques, ce qui permit la disparition des symptômes dans les 24 heures après le début du traitement. Cette démonstration a, par la suite, été étayée par d'autres travaux sur différents patients souffrant d'ulcères gastriques ou duodénaux résorbés par antibiothérapie (Graham *et al.*, 1992). Ces travaux ont été récompensés par un prix Nobel de médecine en 2005 pour Warren et Marshall. On s'aperçut ultérieurement que les ulcères gastro-duodénaux, dus à l'infection chronique par *H. pylori*, étaient souvent le signe précurseur de cancers gastriques. Le traitement de ce pathogène a donc diminué la fréquence des cancers gastriques dans la population, faisant de *H. pylori* l'unique bactérie connue capable de générer un cancer (Eurogast *et al.*, 1993). Elle a d'ailleurs été classée dans les agents carcinogènes de groupe 1 lors d'une conférence au NIH (National Institutes of Health) en 1994.

## 2. Microbiologie

*Helicobacter pylori* est un petit bacille de 2 à 3  $\mu\text{m}$  de long à Gram négatif, légèrement incurvé et mobile grâce à une ciliature polaire, composée de 2 à 6 flagelles par cellule (Geis *et al.*, 1989) (Figure 25). A l'instar des *Campylobacter*, *H. pylori* est microaérophile, nécessitant 5% d' $\text{O}_2$  et 5 à 10% de  $\text{CO}_2$ . Sa culture se déroule en atmosphère humide à 37°C durant 3-5 jours sur des milieux solides comme la gélose chocolat ou encore Brucella-Agar. En dehors de ces conditions, la croissance est difficile voire nulle. *H. pylori* est uniquement retrouvée chez l'Homme et les primates avec un tropisme pour l'estomac. Elle est capable de survivre dans cet organe grâce à son uréase, très active, capable de dégrader l'urée, retrouvée à une concentration de 2 à 4 mM dans l'estomac, en deux molécules d'ammoniaque et une molécule de  $\text{CO}_2$ . Ces molécules produites tamponnent ainsi le pH du micro-environnement bactérien, la protégeant de l'acidité gastrique (Moblely *et al.*, 1988). L'uréase de *H. pylori* est la plus affine des uréases bactériennes, vis-à-vis de son substrat (Moblely *et al.*, 1995). *H. pylori* n'est donc pas une bactérie acidophile mais neutrophile qui a développé un système de tolérance au milieu acide. L'uréase peut être sécrétée, membranaire ou intracellulaire. Lorsque l'enzyme est intracellulaire, ceci permet d'augmenter le pH dans le périplasma bactérien et la synthèse protéique, quand le pH du milieu extérieur est faible, renforçant la résistance bactérienne (Scott *et al.*, 1998). L'activité enzymatique est régulée par UreI qui permet la formation d'un canal à urée lorsque le pH est acide (Weeks *et al.*, 2000). Dans un milieu neutre ou basique, UreI n'est pas actif ; sans cette régulation la bactérie verrait son pH intracellulaire augmenter continuellement, entraînant sa mort (Clyne *et al.*, 1995). Par ailleurs, l'alcalinisation du périplasma est également due à la conversion du dioxyde de carbone, produit par l'uréase, en bicarbonate par l'anhydrase carbonique périplasmique (Marcus *et al.*, 2005). De plus, elle possède d'autres enzymes produisant de l'ammoniaque, deux amidases aliphatiques (AmiE et AmiF) capables d'hydrolyser de courtes chaînes portant un groupement amide (comme le propionamide ou encore l'acétamide) (Skouloubris *et al.*, 1997, 2001) et une arginase appelée RocF, hydrolysant l'arginine en ornithine et ammoniaque (McGee *et al.*, 1999, 2004). L'ensemble de ces enzymes est régulé par un système à deux composantes ArsSR lui-même activé par une valeur de pH faible (Forsyth *et al.*, 2002; Pflock *et al.*, 2006). Ce système est constitué d'une histidine kinase (ArsS) et d'une réponse OmpR-like (ArsR). ArsS est responsable de la réactivité aux faibles pH (Pflock *et al.*, 2004) et a été identifié comme essentiel à la survie des bactéries dans des conditions acides (Loh & Cover, 2006). ArsR est, quant à lui, essentiel à la croissance *in vitro* (Schar *et al.*, 2005).

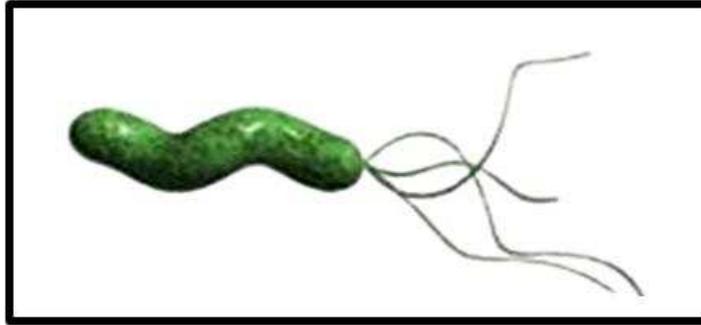


Figure 25 : Représentation schématique de *Helicobacter pylori*.

L'uréase est, en outre, utilisée comme outil pour le dépistage de *H. pylori* soit directement à partir d'une biopsie soit à l'aide d'un test respiratoire utilisant de l'urée marquée au  $^{13}\text{C}$ . Celle-ci est administrée au patient et on détectera par spectrométrie de masse le produit de dégradation ( $\text{CO}_2$ ) portant du  $^{13}\text{C}$  lorsque la bactérie est présente. L'examen anatomopathologique, la détection par PCR du génome bactérien ainsi que l'étude sérologique sont autant d'outils alternatifs au dépistage d'*H. pylori* (Calvet *et al.*, 2010).

### 3. Infections et maladies associées

*Helicobacter pylori* est responsable de gastrites chroniques, de maladies ulcéreuses gastro-duodénales et considérée comme un facteur de risque associé aux adénocarcinomes et aux lymphomes de type MALT (mucosa-associated lymphoïde tissue) (Wotherspoon *et al.*, 1993 ; Blaser *et al.*, 1995 ; Blaser, 1997). La bactérie est capable de coloniser l'ensemble de l'estomac, excepté le cardia et avec une préférence pour l'antrum et le pylore (Parsonnet *et al.*, 1991 ; Dawsey *et al.*, 2002). *H. pylori* est retrouvée partout dans le monde, mais sa prévalence dépend du pays et du mode de vie de différentes populations au sein d'un même pays. En effet, ce pathogène est plutôt retrouvé dans des populations vivant dans un contexte socio-économique peu favorable (Malaty & Graham, 1994). La prévalence de l'infection à *H. pylori*, au sein d'une population adulte d'âge moyen, est de 80% dans les pays en développement et de 20 à 50% dans les pays industrialisés. La transmission se fait par ingestion orale de la bactérie et principalement tôt durant l'enfance (Rowland *et al.*, 1999). Aucune preuve de transmission entre l'Homme et l'animal n'a été mise en évidence et ce, malgré la mise en évidence occasionnelle d'*H. pylori* chez le chat ou le mouton (Handt *et al.*, 1994 ; Dore *et al.*, 2001).

Sans traitement, *H. pylori* provoque tout d'abord une **gastrite aiguë** suivie quasi systématiquement d'une **gastrite chronique** caractérisée par des infiltrats inflammatoires de

lymphocytes, plasmocytes et neutrophiles (Wyatt & Rathbone, 1988 ; Stolte & Eid, 1989). Ces changements histologiques peuvent être suivis par une atrophie tissulaire (raréfaction du nombre de glandes gastriques) et par la formation d'**ulcère peptique** pouvant conduire à une **métaplasie gastrique intestinale** pour finir par un **adénocarcinome gastrique**. Cette cascade d'événements histologiques se déroule avec une évolution pouvant excéder 30 ans (Correa *et al.*, 1975). Deux types d'adénocarcinomes peuvent être distingués, l'adénocarcinome de type intestinal et de type diffus. Le premier suit exclusivement la cascade précédemment décrite, tandis que le second peut avoir une origine pathologique différente puisqu'il n'est pas uniquement imputé à *H. pylori* et peut avoir une origine génétique due à la mutation du gène de la *E-cadhérine* (Guilford *et al.*, 1998). Il ne représente que 20% des adénocarcinomes de l'estomac et survient à des âges généralement plus précoces tout en affectant de façon prédominante les femmes (Lauren & Nevalainen, 1993).

La **métaplasie intestinale** est caractérisée par le remplacement de la muqueuse gastrique par une muqueuse de type intestinal. Elle peut être classée en trois types pour lesquels la nature des mucines est variable. Elle peut être complète avec des mucines sialylées (type I), incomplète sialylée sans ou avec peu de mucines sulfatées (type II) ou incomplète avec mucines sulfatées (Type III). Les métaplasies de type I possèdent une organisation histologique comparable aux adénocarcinomes diffus tandis que les métaplasies de type III sont directement assimilées à un adénocarcinome de type intestinal à l'exception de la présence des mucines sulfatées, absentes dans l'adénocarcinome, qui lui est riche en mucines sialylées. Il est, en outre, admis qu'une métaplasie intestinale de type I peut évoluer en type III durant le développement de l'adénocarcinome gastrique (Jass & Robertson, 1994). La métaplasie intestinale de type I n'exprime plus les deux mucines sécrétées normalement retrouvées dans l'estomac, MUC5AC et MUC6, mais uniquement MUC2 qui est la mucine sécrétée caractéristique de l'intestin et du côlon. On retrouve, par contre, dans les métaplasies intestinales de type II et III, MUC5AC et MUC6 en mélange avec MUC2 (Ho *et al.*, 1995 ; Reis *et al.*, 1999). Etrangement, il a été démontré que *H. pylori*, n'était plus capable d'adhérer à la muqueuse gastrique quand celle-ci était affectée par une métaplasie intestinale de type I, à l'inverse des métaplasies incomplètes (Reis *et al.*, 1999 ; Teixeira *et al.*, 2002).

Comme décrit précédemment, tous les cancers de l'estomac ne sont pas des adénocarcinomes, 15% d'entre eux sont des **lymphomes non-hodgkiniens à cellules B** des MALT. Même si l'estomac ne contient pas de tissus lymphoïdes organisés, les MALT

apparaissent en réponse à l'infection à *H. pylori* (Isaacson & Spencer, 1987 ; Wotherspoon *et al.*, 1991).

L'**ulcère duodénal** est acquis de façon indirecte puisque *H. pylori* n'est pas capable de coloniser l'épithélium de type duodénal normal. Par contre, lorsque l'on traite la muqueuse gastrique contre la bactérie, les ulcères gastriques et duodénaux se résorbent simultanément (Rauws & Tytga, 1990). L'effet indirect exercé par *H. pylori* peut s'expliquer par une altération de la sécrétion acide gastrique quand la bactérie colonise l'estomac. Cependant, la localisation de la colonisation bactérienne dans l'estomac influence la dérégulation des sécrétions acides. Dans la région antrale, la production acide est augmentée tandis que dans le corps la sécrétion acide est faible (McGowan *et al.*, 1996). En effet, lors d'une gastrite antrale, une hypergastrinémie est observée, car les cellules G de la muqueuse gastrique du corps sont intactes mais sans le rétrocontrôle de la somatostatine normalement produite par les cellules D de l'antra (Moss *et al.*, 1992 ; Graham *et al.*, 1993 ; El-omar *et al.*, 1995). De plus, les patients touchés par des ulcères duodénaux ne sont plus capables de produire d'ions bicarbonates, nécessaires à la neutralisation des acides gastriques, entraînant des dommages tissulaires supplémentaires (Hogan *et al.*, 1996). A l'instar de l'estomac, la pathologie duodénale induite par l'infection antrale de *H. pylori*, conduit à une cascade de changements histologiques débutant par la **métaplasie gastrique duodénale** puis la duodénite et suivie de l'ulcération (Walker & Dixon, 1996). La métaplasie gastrique peut être différenciée, par histologie, de l'épithélium normal par l'absence de résidus acides portés par les mucines et de MUC2, mais aussi par la présence de MUC5AC et MUC6, les deux mucines sécrétées gastriques (Van De Bovenkamp *et al.*, 2003). Une fois la métaplasie présente, *H. pylori* est capable d'adhérer au duodénum (Carrick *et al.*, 1989). Sa résorption complète est longue à obtenir et requiert l'association d'un inhibiteur de pompe à protons et une antibiothérapie dirigée contre *H. pylori* (Noach *et al.*, 1993; Rimbara *et al.*, 2011).

## 4. Facteurs de virulences

*Helicobacter pylori* est capable de persister dans son hôte durant de longues périodes pouvant excéder plusieurs décennies, l'équilibre existant entre les effecteurs bactériens et la réponse de l'hôte permettent une persistance bactérienne mais avec un risque sérieux, pour l'hôte, de développer des pathologies. La persistance bactérienne est rendue possible par divers mécanismes, qui additionnés, sont caractéristiques d'*H. pylori*. L'un des premiers est la **plasticité de son génome** afin qu'elle puisse s'adapter rapidement et efficacement à son

environnement, notamment lors des changements histologiques au cours de l'évolution des gastrites (Suerbaum *et al.*, 1998). La diversité génomique peut s'opérer par mutations endogènes (Bjorkholm *et al.*, 2001), permettant l'émergence de variants au sein de la population ayant subi une pression de sélection. La meilleure illustration est l'émergence très rapide de souches résistantes aux antibiotiques couramment utilisés (De Francesco *et al.*, 2010). *H. pylori* est également fortement compétente pour l'assimilation d'ADN provenant d'autres souches de son espèce (Falush *et al.*, 2001). La recombinaison intra-génomique est basée sur la présence de séquences d'ADN répétées, facilitant eux-mêmes des délétions et duplications (Aras *et al.*, 2003). De plus *H. pylori*, ne possède pas de système de réparation des mésappariements (ou mismatch repair), ce qui engendre l'augmentation des variations géniques aléatoires (Tomb *et al.*, 1997).

*Helicobacter pylori* est capable de produire différents facteurs de virulences dont les mieux caractérisés sont la cytotoxine VacA (vacuolating cytotoxin A) et l'îlot de pathogénicité cag ainsi que son effecteur CagA (cytotoxin-associated gene A). Cela a d'ailleurs permis d'aboutir à une classification, par l'étude de l'expression différentielle de ces deux facteurs : les souches d'*H. pylori* de type I et de type II qui expriment respectivement *cagA* et *vacA* ou *vacA* seul. Différentes études ont démontré que les patients ayant développé des duodénites, des ulcères duodénaux et des tumeurs gastriques étaient majoritairement infectés par des souches de type I (Covacci *et al.*, 1993 ; Xiang *et al.*, 1995 ; Weel *et al.*, 1996). Ces observations ont également été réalisées sur modèle murin. En effet, des extraits des souches de type I administrées oralement, ont induit des dommages et changements histologiques comparables à ce qui est observé chez l'Homme, contrairement aux souches de type II. En outre, alors que les souches de type I et II peuvent coloniser les souris, seul le type I peut induire des pathologies gastriques observées chez l'Homme (Marchetti *et al.*, 1995). Les souches de type I sont, par ailleurs, capables d'induire la sécrétion de différentes molécules ayant des activités inflammatoires (Crabtree *et al.*, 1995 ; Yamaoka *et al.*, 1997).

**VacA** est un polypeptide formant des pores (donnant l'aspect de vacuoles en microscopie) (Leunk *et al.*, 1988), par insertion dans la membrane des cellules épithéliales (Garner *et al.*, 1996). VacA peut être transféré vers la cellule hôte par le système de sécrétion (sec) puis est accumulé à la surface bactérienne pour être transféré une fois en contact avec les cellules eucaryotes (Ilver *et al.*, 2004). VacA peut ensuite être internalisé par la cellule hôte (Sommi *et al.*, 1998) et être inséré dans la membranes des vésicules endosomales tardives,

perturbant notamment le système de présentation des antigènes intervenant dans la réponse immunitaire (Molinari *et al.*, 1998 ; Czajkowsky *et al.*, 1999). La dérégulation engendrée est provoquée par la formation de canaux voltage dépendants, qui peuvent également transporter des ions bicarbonates et des anions organiques. Ces molécules peuvent potentiellement être utilisées comme source de nutriment par la bactérie lorsque VacA est inséré dans la barrière épithéliale (Szabo *et al.*, 1999). VacA peut aussi cibler la membrane des mitochondries de l'hôte relarguant ainsi du cytochrome C et induisant l'apoptose (Galmiche *et al.*, 2000). L'analyse du rôle de VacA dans l'infection est compliquée par la variabilité génique de *vacA*, cependant certaines études ont démontré l'importance de certains variants dans la sévérité de la pathologie (Atherton *et al.*, 1997).

La plupart des souches de *H. pylori* possèdent un **îlot de pathogénicité cag** (cag-PAI) contenant 29 gènes (Censini *et al.*, 1996). Les raisons pour lesquelles le cag-PAI est associé à différentes pathologies ne sont pas complètement comprises, cependant, de nombreux mécanismes d'actions ont été élucidés. L'un d'eux, récemment décrit, est l'inhibition d'une enzyme de réparation de l'ADN (P53) par l'expression aberrante d'une cytidine déaminase, engendrant des mutations progressives pouvant conduire au cancer (Matsumoto *et al.*, 2007). Ensuite, le cag-PAI ne contient pas uniquement le gène *cagA* mais aussi des gènes adjacents possédant une homologie de séquence avec des composants du système de sécrétion de type IV (TFSS) (Covacci *et al.*, 1999). Ces différents composants, une fois assemblés, forment une structure macromoléculaire permettant le transfert, à la manière d'une seringue, d'effecteurs bactériens (Odenbreit *et al.*, 2000). Avant que la fonction des composants du TFSS soit démontrée, plusieurs travaux avaient caractérisé l'induction par *H. pylori*, sur des lignées cellulaires gastriques humaines, d'un réarrangement du cytosquelette, d'un changement de la forme des cellules et de la phosphorylation de résidus de tyrosine de certaines protéines (Segal *et al.*, 1996, 1997). Initialement les changements de phosphorylation ont été imaginés comme étant une réponse de la cellule hôte à l'attachement de la bactérie à sa surface. Par la suite, il a clairement été identifié que cette protéine était d'origine bactérienne, injectée dans la cellule eucaryote et n'était autre que **CagA**. (Segal *et al.*, 1999 ; Asahi *et al.*, 2000 ; Stein *et al.*, 2000 ; Backert *et al.*, 2000). Pour injecter CagA, *H. pylori* utilise une adhésine présente dans son cag-PAI appelée CagL, qui va adhérer aux intégrines  $\alpha_5\beta_1$  et lui permettre d'injecter la protéine oncogène CagA (Kwok *et al.*, 2007). Jusqu'à maintenant CagA est la seule protéine effectrice connue qui est injectée dans la cellule humaine. Cependant d'autres composants bactériens sont co-injectés, comme le peptidoglycane de *H. pylori* qui induit une

réponse inflammatoire Nod1 dépendante (Viala *et al.*, 2004). La phosphorylation de CagA s'opère directement dans la cellule hôte par deux tyrosine kinases identifiées (c-abl et c-src) et connues pour être impliquées dans l'oncogénèse (Stein *et al.*, 2002 ; Tammer *et al.*, 2007). Une fois que CagA est phosphorylée, elle interagit avec de nombreuses protéines de l'hôte déclenchant des signaux mimant ceux induits par l'activation des récepteurs de facteurs de croissance à activité tyrosine kinase (Higashi *et al.*, 2002 ; Hatakeyama *et al.*, 2003). Une autre cible de CagA, indépendante de la phosphorylation des résidus tyrosine, concerne les protéines des jonctions apicales épithéliales qui entrent dans la formation de la barrière gastrique entre la lumière et l'espace interstitiel. Ces jonctions sont indispensables pour l'établissement de la polarité cellulaire, la prolifération cellulaire, l'adhésion cellule-cellule et les mouvements cellulaires. CagA est donc capable d'influer sur chacune de ces fonctions, engendrant différents changements phénotypiques cellulaires (Amieva *et al.*, 2003 ; Bagnoli *et al.*, 2005 ; Murata-Kamiya *et al.*, 2007) (Figure 26).

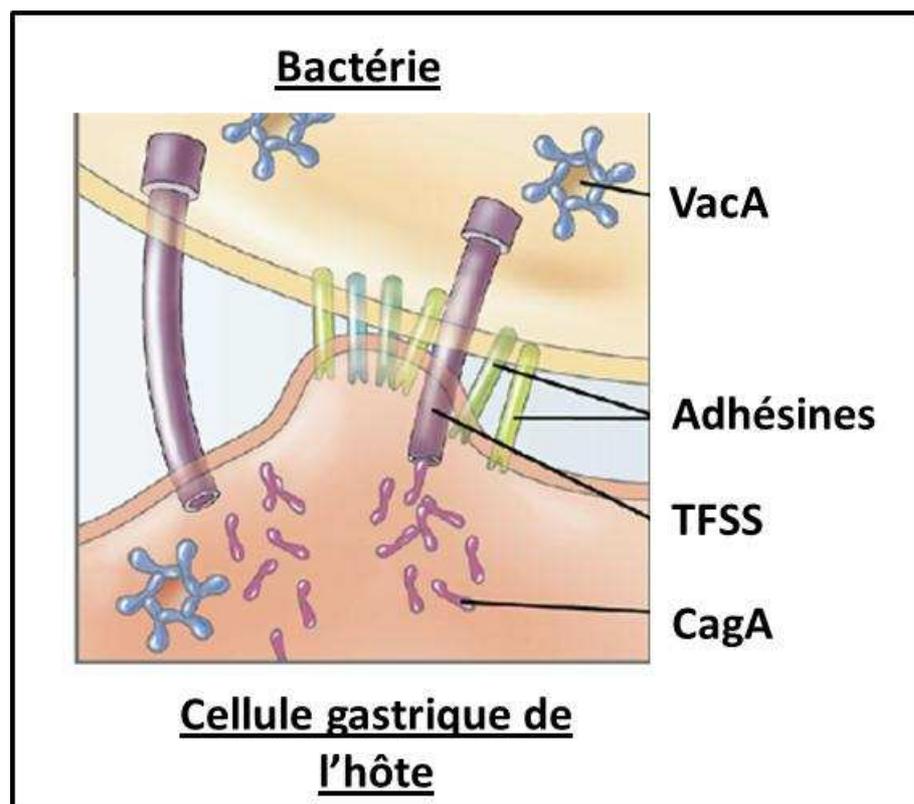


Figure 26 : Représentation des deux facteurs de virulence les mieux étudiés de *H. pylori* adapté de Amieva & El-Omar, 2008.

A l'instar des autres bactéries Gram négatif, *H. pylori* possède du **LPS (Lipopolysaccharide)** ou endotoxine qui est essentiel à sa survie. Sur le plan structural, le

LPS est constitué d'un lipide A et d'une partie polysaccharidique, appelée antigène O, dépassant de la membrane externe. Le LPS, chez la plupart des bactéries, est très toxique, sauf chez *H. pylori*, où il n'induit qu'une réaction immunitaire faible (Muotiala *et al.*, 1992). De façon intéressante, l'antigène O isolé de différentes souches de *H. pylori* contient très souvent des antigènes de groupes sanguins ABO ou Lewis, comme ceux retrouvés portés par les O-glycanes des mucines gastro-intestinales (Aspinall *et al.*, 1996 ; Monteiro *et al.*, 1998). Ceci laisse suggérer une adaptation de la bactérie à son hôte afin d'échapper à ses mécanismes de défense immunitaire par mimétisme. Ceci a été confirmé par l'étude de la composition du LPS au cours de l'inflammation, montrant un changement d'expression glycanique en fonction de l'état physiologique de l'hôte (Nilsson *et al.*, 2006). Mais aussi sur modèle animaux, où, lorsque l'on infecte des souris invalidées pour les enzymes impliqués dans la synthèse du Lewis<sup>b</sup>, la bactérie ne produit pas ce glycane dans son LPS, et ce, contrairement aux mêmes souches inoculées à des souris sauvages (Pohl *et al.*, 2009). *H. pylori* est donc capable d'échapper au système immunitaire de l'hôte en s'adaptant à son environnement, en l'imitant.

Comme décrit précédemment, l'infection à *H. pylori* est associée à une infiltration dans la muqueuse gastrique de cellules immunitaires, essentiellement des neutrophiles, induisant des dommages tissulaires. La **HP-NAP (*Helicobacter pylori*-neutrophil-activating protein)** a été identifiée pour induire l'adhésion des neutrophiles aux cellules endothéliales et la synthèse des radicaux oxygénés (Evans *et al.*, 1995). Cette protéine est immunogène chez l'Homme et la souris, puisque la majorité des individus infectés par *H. pylori* produit des anticorps dirigés contre elle (Satin *et al.*, 2000).

Par ailleurs, *Helicobacter pylori* utilise l'activité uréasique dans le but de résister au faible pH de son environnement. Cependant, elle est également capable de fuir l'acidité présente dans la lumière en colonisant le gel de mucus qui est naturellement tamponné (Williams & Turnberg, 1980), ce qui permet à la bactérie d'atteindre la surface de l'épithélium gastrique et lui évite d'être emporté par le mucus. Ceci est rendu possible par sa **motilité**, considérée comme étant un facteur de colonisation, dont le degré est corrélé à l'agressivité (Eaton *et al.*, 1992, 1996).

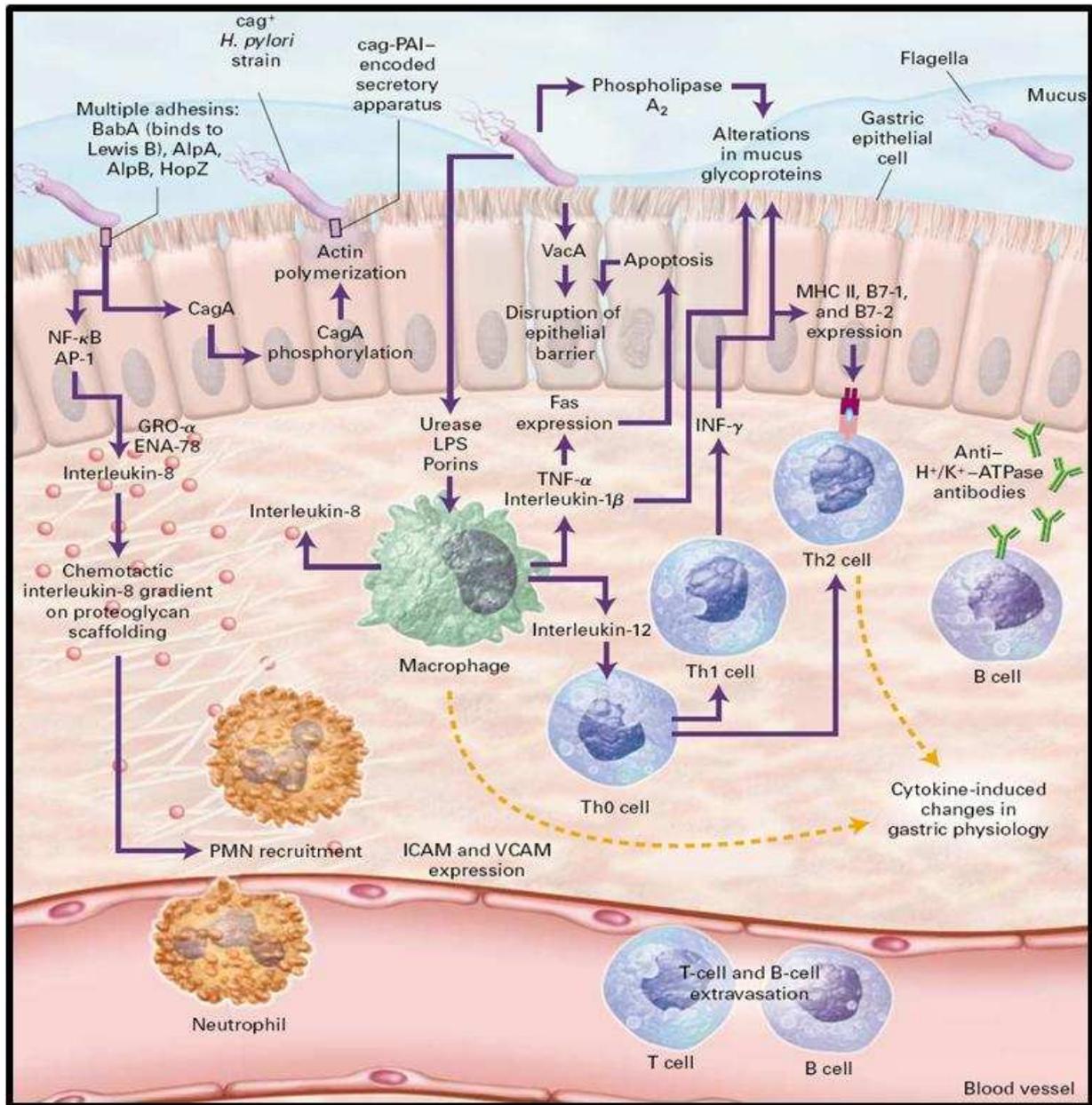


Figure 27 : Principaux mécanismes utilisés par *H. pylori* pour coloniser son hôte d'après Suerbaum & Michetti, 2002.

## 5. Mécanismes d'adhésion utilisés par *Helicobacter pylori*

L'adhésion de *H. pylori* à la muqueuse est l'étape qui initie sa colonisation, ceci fait de ce mécanisme une étape importante pour le succès de l'infection bactérienne. Pour cela différents mécanismes sont utilisés, l'un d'eux est la fixation du **LPS** de *H. pylori* à une protéine co-sécrétée avec les mucines gastriques que l'on appelle **TFF-1** (trefoil factor 1 ou peptide en trèfle 1). TFF-1 est exprimé dans le corps et la région antro-pylorique gastrique (Rio *et al.*, 1988) et son expression est fortement induite lors de lésions tissulaires (Taupin *et*

*al.*, 2001). L'interaction entre ces deux molécules serait impliquée dans l'initiation de l'adhésion gastrique et pourrait expliquer le tropisme d'organe de *H. pylori* (Clyne *et al.*, 2004 ; Reeves *et al.*, 2008).

Parallèlement à cela, de nombreuses **protéines de la membrane externe (OMP)** ont été identifiées par analyses du génome de deux souches de *H. pylori* pour avoir soit une activité de porine soit d'adhésine. 33 OMPs différentes ont été identifiées (Alm *et al.*, 1999 ; Tomb *et al.*, 1997). Les membres de cette famille peuvent posséder une taille comprise entre 20 et 130 kDa, 21 d'entre-eux ont des extrémités N-terminale et C-terminale très conservées et sont appelés protéines Hop (*H. pylori* outer membrane protein). Les 12 autres ne contiennent pas d'extrémité N-terminale et sont qualifiés de Hor (Hop-related). Les extrémités conservées permettent l'intégration des protéines à la membrane ou l'interaction avec d'autres membres de la famille (Alm *et al.*, 2000) (Figure 28).

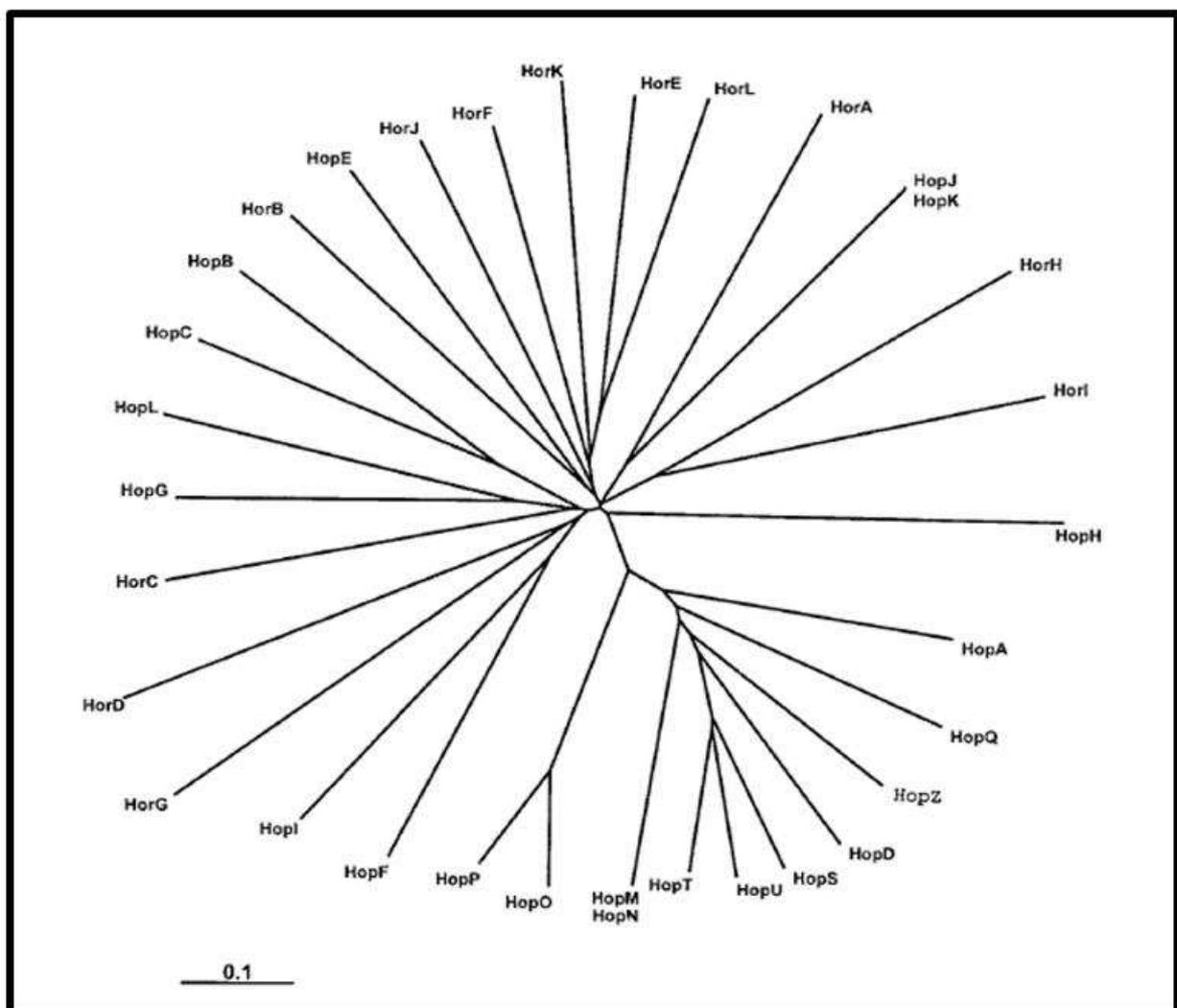


Figure 28 : Arbre phylogénétique des protéines de la famille OMP chez *H. pylori* d'après Alm *et al.*, 2000.

Six Hop et une Hor ont clairement été identifiées comme adhésines et/ou importantes à la colonisation, BabA (HopS) (Ilver *et al.*, 1998), SabA (HopP) (Mahdavi *et al.*, 2002), HopZ (Peck *et al.*, 1999), AlpA (HopC) et AlpB (HopB) (Odenbreit *et al.*, 1996), OipA (HopH) (Yamaoka *et al.*, 2000 ; Jonge *et al.*, 2004) et HorB (Snelling *et al.*, 2007). Des analyses du génome ont démontré que plusieurs membres de la famille Hop possédaient des copies de gènes dupliquées comme BabA et BabB (Hop T) (Solnick *et al.*, 2004). Leur présence suggère le cheminement suivi lors de l'émergence de nouvelles adhésines. En effet, chacune des copies peut subir des mutations indépendantes, qui vont progressivement les faire diverger des unes et des autres et faire apparaître de nouvelles cibles de fixation (Aspholm-Hurtig *et al.*, 2004). La duplication des gènes serait également un moyen pour la bactérie de s'adapter à son hôte durant l'infection en régulant l'expression des adhésines (Ilver *et al.*, 1998 ; Solnick *et al.*, 2004).

Les deux adhésines les mieux caractérisées jusqu'à maintenant sont BabA (blood group antigen binding adhesion) et SabA (sialic acid binding adhesin). **BabA** est capable d'adhérer aux antigènes des groupes sanguins fucosylés portés par les O-glycanes des mucines, majoritairement le Lewis<sup>x</sup> et le groupe H. Deux types de BabA ont été identifiés, 95% reconnaissent le Lewis<sup>b</sup> et ses dérivés (Ale<sup>b</sup>, Ble<sup>b</sup>), les souches porteuses sont qualifiées de généralistes. Les autres souches, reconnaissant uniquement le Lewis<sup>b</sup> sont qualifiées de spécialistes. Cette adhésine est directement impliquée dans la sévérité des pathologies gastriques et dans la densité de colonisation de *H. pylori* (Boren *et al.*, 1993 ; Ilver *et al.*, 1998 ; Aspholm-Hurtig *et al.*, 2004). **SabA** adhère à des glycanes portés par des glycosphingolipides exprimés dans l'estomac lors de l'inflammation induite par *H. pylori*, comme le sialyl Lewis<sup>x</sup> et sialyl Lewis<sup>a</sup>. En outre, elle possède de fortes similarités de séquence avec HopO (SabB). Cette adhésine est corrélée à la progression de l'infection à *H. pylori* vers l'adénocarcinome gastrique. (Mahdavi *et al.*, 2002 ; Marcos *et al.*, 2008). Cependant ces deux adhésines ne sont pas les seules impliquées dans l'adhésion de *H. pylori*, une étude de l'expression de 7 adhésines sur 200 isolats cliniques différents a mis en évidence une expression variable de SabA et BabA puisque seuls 38% et 58% respectivement des isolats cliniques les portent. A l'inverse **AlpA** (adherence-associated lipoproteins) et **AlpB** sont retrouvés chez 100% des bactéries, suggérant un rôle important de ces deux adhésines bien que leurs ligands ne soient pas encore identifiés (Odenbreit *et al.*, 2009). Il a d'ailleurs été démontré qu'en l'absence de AlpA et AlpB, *H. pylori* n'était pas capable de coloniser l'estomac de cochons d'Indes et qu'il colonise peu la muqueuse de souris, tout en n'induisant

plus de cytokines pro-inflammatoires (Jonge *et al.*, 2004 ; Lu *et al.*, 2007). Tout comme AlpA et AlpB, OipA (outer inflammatory protein A) et HopZ n'ont pas de ligands connus. **OipA** a initialement été identifiée comme induisant la synthèse d'interleukine-8 (IL-8), elle a ensuite été définie comme adhésine lors d'études où le gène a été invalidé (Dossumbekova *et al.*, 2006). **HopZ** est, quant à elle, encore peu étudiée ; seule son implication dans l'adhésion a été démontrée jusqu'à maintenant (Peck *et al.*, 1999). Concernant ces quatre dernières molécules, des analyses ultérieures doivent encore être réalisées afin de déterminer si elles sont directement impliquées dans l'adhésion ou ont plutôt un rôle d'adhésines « chaperonnes », nécessaires à la bonne conformation des autres adhésines.

## 6. *Helicobacter pylori* et les mucines sécrétées

Les mucines sécrétées de l'estomac sont MUC5AC, à la surface du tissu, et MUC6 dans le fond des glandes. Elles sont chez l'Homme différemment glycosylées, MUC5AC exprimant majoritairement les groupes Lewis de type 1 (Le<sup>b</sup> et Le<sup>a</sup>), tandis que MUC6 porte des antigènes Lewis de type 2 (Le<sup>x</sup> et Le<sup>y</sup>) (Sakamoto *et al.*, 1989 ; Nordman *et al.*, 2002). La localisation à la surface de la muqueuse gastrique et la glycosylation de MUC5AC en fait une molécule impliquée dans l'adhésion bactérienne, et ce, en adéquation avec les résultats décrits concernant l'adhésine BabA portée par *H. pylori*, reconnaissant le Lewis<sup>b</sup> (Van de Bovenkamp *et al.*, 2003). Lorsque les patients sont infectés, on observe une délocalisation de MUC6 à la surface et une diminution de l'expression de MUC5AC pouvant être corrigées après élimination de l'infection (Byrd *et al.*, 1997 ; Ho *et al.*, 2004). La diminution de synthèse de MUC5AC, induite par *H. pylori*, conduit à la déstructuration du gel de mucus alors que la présence de MUC6 en surface favorise l'inhibition de la colonisation bactérienne par l'existence d'un motif glycanique inhibant sa croissance (Kawakubo *et al.*, 2004). La dégradation du mucus gastrique par *H. pylori*, dans le but de faciliter son accès à l'épithélium gastrique, par des protéases ou des glycosydases est controversée (Sidebotham *et al.*, 1991 ; Slomiany & Slomiany, 1992). *H. pylori* serait capable de tirer profit de la viscosité du mucus, sans la dégrader, grâce à sa forme hélicoïdale qui favorise sa motilité (Hazell *et al.*, 1986 ; Sycuro *et al.*, 2010 ; Bonis *et al.*, 2010). Elle est également capable de s'orienter dans le mucus, grâce à des chimiorécepteurs protéiques reliés à l'activité du moteur flagellaire comme ChePep (Howitt *et al.*, 2011). Ceci lui permet d'accéder plus rapidement à la couche de mucus, dont le pH est proche de la neutralité (Schreiber *et al.*, 2004) (Figure 29). De plus, le gradient de pH serait modifié par l'activité uréasique de *H. pylori*, ce qui aurait pour effet de neutraliser l'acidité du mucus à sa surface et d'en diminuer la viscosité, favorisant ainsi les

déplacements bactériens (Celli *et al.*, 2009). D'autant que la fixation de *H. pylori* aux mucines a été décrite comme régulée par le pH (Linden *et al.*, 2004).

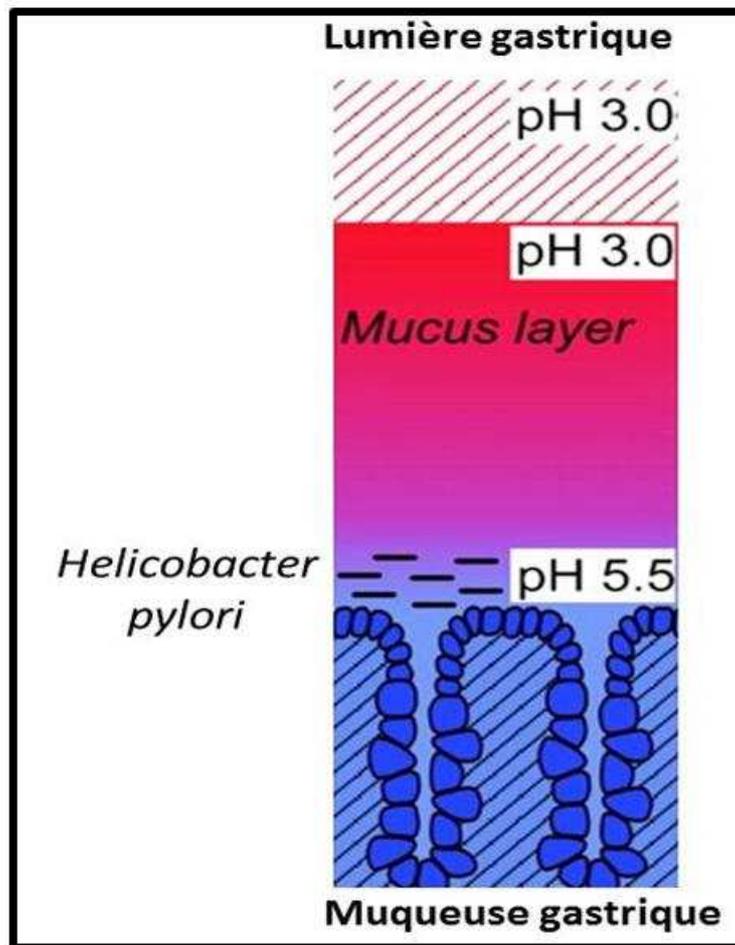


Figure 29 : Localisation de *H. pylori* dans la couche de mucus gastrique en fonction du pH d'après Schreiber *et al.*, 2004.

## *Matériels et méthodes*

## ▪ **Matériel biologique humain**

Les tissus intestinaux proviennent de pièces opératoires de patients des deux sexes, jeunes et/ou adultes, tout comme les tissus gastriques ayant servi au travail sur coupe (Protocole DC-2008-242 après avis du CPP). Les échantillons ont été préparés par l'anatomo-pathologiste (Dr P. Gosset, Hôpital Saint-Vincent, Lille) à partir des pièces opératoires, après soustraction de tissus nécessaire pour l'analyse anatomo-pathologique et l'établissement du diagnostic. Les échantillons ont été stockés à  $-80^{\circ}\text{C}$  jusqu'à leur utilisation. Les tissus gastriques ayant servi à la purification des mucines ont été préparés par le Dr Bara (Dr J. Bara, U482 Inserm).

## ▪ **Culture cellulaire**

Les lignées cellulaires humaines d'adénocarcinome colique HCT116, HT29 et HT29 5M21 (Lesuffleur *et al.*, 1998) (clone mucosécréteur obtenu à partir de la sous-population HT29-MTX, qui se caractérise par une sécrétion de mucus particulièrement abondante) ont été cultivées en milieu de Eagle modifié par Dubelcco (DMEM), supplémenté en antibiotiques (pénicilline et streptomycine 100U/ml) et additionné de 10% de sérum de veau fœtal décomplémenté. La culture est réalisée à  $37^{\circ}\text{C}$  en atmosphère humide sous 5% de  $\text{CO}_2$ , avec renouvellement du milieu quotidiennement. Les cellules sont repiquées une fois par semaine après traitement par une solution stérile de NaCl 153mM contenant de la trypsine 0,25% et de l'EDTA 0,1% à une densité de 20 000/cm<sup>2</sup>.

## ▪ **Purification de MUC2**

Une des caractéristiques de MUC2 est d'être la seule mucine intestinale insoluble dans le chlorure de guanidine (Herrmann *et al.*, 1999). Les échantillons sont donc solubilisés dans une solution de chlorure de guanidine 4M, contenant un cocktail d'inhibiteurs de protéases (EDTA 5mM, benzamidine 10mM, *N*-ethylmaleimide 5mM, inhibiteur de trypsine 0,1mg/ml, DTT 10mM, azide de sodium 0,02% et PMSF 1mM dissous dans 500 $\mu\text{l}$  d'isopropanol). MUC2 est ensuite précipitée par trois étapes de centrifugation pendant 30 minutes à 12500 g. Le surnageant est conservé à  $-20^{\circ}\text{C}$  jusqu'à utilisation et le culot est resuspendu dans la solution de chlorure de guanidine. Le précipité contenant MUC2 est finalement réduit et alkylé pour solubiliser la mucine.

## ▪ Ultracentrifugation en gradient de chlorure de césium

Les échantillons contenant des mucines à purifier sont repris dans une solution de chlorure de guanidine 4M, contenant un cocktail d'inhibiteurs de protéases (EDTA 5mM, benzamidine 10mM, *N*-ethylmaleimide 5mM, inhibiteur de trypsine 0,1mg/ml, DTT 10mM, azide de sodium 0,02% et PMSF 1mM dissous dans 500µl d'isopropanol). Leur densité est ajustée à 1,4g/ml à l'aide de chlorure de césium solide puis l'ultracentrifugation est réalisée à 308500 g, pendant 48 heures à 20°C en utilisant un rotor *Beckman* 70.1 Ti (Carlstedt *et al.*, 1983). Des fractions de 1ml sont récupérées à l'aide d'un collecteur de fractions (*Biorad*) et d'une pompe péristaltique (*Pharmacia*) réglée à un débit de 500µl/min.

Les mucines sont repérées par le biais de la mesure de la densité de chaque fraction (comprise entre 1,35g/mL et 1,45g/mL pour les mucines) et de l'utilisation d'anticorps spécifiques anti-mucines à l'aide d'un slot blot. Pour cela, 20µL de chacune des fractions sont déposées sur membrane de nitrocellulose à l'aide d'un appareil à slot blot. La membrane est saturée par une solution à 5% de lait écrémé dans du TBS-T pendant 1 heure à température ambiante. L'immunodétection est réalisée en utilisant un anticorps anti-mucine au 1 : 1000 dans du TBS-T avec 5% de lait pendant 1 heure à température ambiante. La membrane est lavée 5 fois 10 minutes dans le TBS-T. Elle est ensuite incubée avec un anticorps secondaire anti-souris ou anti-lapin le cas échéant marqué à la peroxydase (*Amersham Biosciences*) utilisé à une dilution au 1/10 000<sup>e</sup> dans 5% de lait dans le TBS-T, 45 minutes sous agitation lente. Après 5 fois 10 minutes de lavage, la révélation se fait par chimiluminescence (ECL-Advance, *Amersham Biosciences*) pour être visualisée à l'aide d'un film photo.

## ▪ Chromatographie de tamisage moléculaire

Les fractions contenant les mucines sont rassemblées, dialysées contre du chlorure de guanidine 4M et séparées par chromatographie sur une colonne de Sépharose CL-4B (80×2cm, *Pharmacia*). Les molécules sont éluées avec du GuHCl 4M à un débit de 11mL/heure. Les glycoprotéines d'intérêt sont repérées par slot blotting puis dialysées contre de l'eau.

## ▪ **Chromatographie échangeuse d'anions pour la purification de MUC5AC**

La dernière étape de purification est réalisée par chromatographie liquide basse pression sur un appareil FPLC ÄKTA Purifier (*Amersham Biosciences*, Uppsala, Suède) avec une colonne Mono Q HR 5/5 (*Pharmacia*, 5mm de diamètre, 5cm de haut). Deux tampons sont utilisés : un tampon A composé d'urée 8M, pH 8,8 et un second tampon B constitué du tampon A avec du NaCl 2M (Thornton *et al.*, 2001). Les molécules sont éluées à un débit de 1 ml/min et des fractions de 1ml sont récupérées. Les glycoprotéines sont éluées par un gradient linéaire de tampon B (de 0 à 50% en 40minutes). Les protéines et glycoprotéines sont détectées par absorbance à 280nm et 215nm respectivement. Les fractions contenant MUC5AC sont rassemblées, dialysées dans de l'eau ultra pure puis lyophilisées.

## ▪ **Rounds de sélection de la bibliothèque PhD-C7C sur MUC5AC**

Nous avons utilisé une banque de phages M13 exprimant des heptapeptides randomisés cyclisés par des ponts disulfure (PhD-C7C<sup>TM</sup> New England Biolabs Inc., Leusden, Pays-Bas) dans le but d'isoler un peptide affiné vis-à-vis de la mucine MUC5AC colique. Afin de sélectionner les phages exprimant les peptides affinis vis-à-vis de MUC5AC, nous avons préalablement épuisé la bibliothèque initiale de peptides ( $1,2 \times 10^9$  peptides différents présents en 200 exemplaires chacun) dans un premier puits bloqué par une solution de blocage non-protéique (PFBB, Thermo Fisher Scientific Inc., USA) suivi d'un second contenant MUC2 immobilisée (100µg/mL). De cette façon les clones non spécifiques pour notre cible sont éliminés avant d'être mis en contact avec la cible (immobilisée à une concentration de 100µg/mL, 0,1 µL/puits), qui elle est dans le troisième et dernier puits. En outre, nous avons, au fil des rounds, intensifié la pression de sélection en augmentant la quantité de détergent (Tween-20), en débutant avec 0,1% pour le 1<sup>er</sup> round pour ensuite passer à 0,3% pour le second et terminer à 0,5%. Conjointement à cela, nous avons augmenté au cours des rounds le temps de contact avec les deux puits non spécifiques (30, 45 et 60 minutes respectivement) et l'avons diminué avec la cible (120, 90 et 75 minutes respectivement).

MUC2 et MUC5AC ont été préalablement purifiées à partir de pièces opératoires coliques provenant de patients atteints de cancers colorectaux. Le couplage des deux mucines sur une plaque de polystyrène 96 puits (Greiner Bio-One, Wemmel, Belgium) est effectué à

100µg/mL de MUC5AC (cible) et MUC2 (contre cible) à l'aide d'un tampon bicarbonate (0,1M NaHCO<sub>3</sub>, pH 8,6) une nuit à 4°C (Phillips *et al.*, 2006). Le jour suivant, les puits sont vidés et bloqués 2h à 4°C avec 200µL de tampon de blocage (PFBB, Thermo Fisher Scientific Inc., USA). Les puits sont ensuite rincés avec du tampon phosphate (PBS) complété avec 0,1/0,3/0,5% de Tween-20 pour les rounds 1, 2 et 3 respectivement. Après ce rinçage, la bibliothèque phagique (2x10<sup>11</sup> phages dans 100µL de PBS-Tween) est ajoutée sur les puits et incubée comme décrit précédemment à 37°C. Après plusieurs rinçages du puits contenant la cible, les phages liés à la cible sont élués avec un tampon glycine-HCl 0,2M, pH 2,2 complété avec 0,1% d'albumine sérique bovine (BSA). Dix minutes plus tard la solution est neutralisée à l'aide de tampon Tris-HCl 1M, pH 9,1. Entre chaque round de sélection, les phages élués sont amplifiés en infectant une culture d'*Escherichia coli* (souche ER2738, New England Biolabs Inc.). Après amplification, les bactéries sont éliminées par centrifugation et les phages sont purifiés par précipitation au PEG/NaCl (20% PEG-8000, 2,5M NaCl) à 4°C. Un culot de phages est obtenu par centrifugation pour être finalement solubilisé dans du tampon TBS (50mM Tris-HCl, 150mM NaCl, pH 7,4) complété avec du NaN<sub>3</sub> 0,02%.

Les phages sont titrés après chaque round de sélection en comptant le nombre de colonies obtenues après infection d'*E. coli* sur un milieu sélectif contenant de l'isopropyl-beta-D-thiogalactoside (IPTG) (ICN Biomedicals Inc., Bruxelles, Belgique) et du 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside (Xgal) (Sigma-Aldrich, Bornem, Belgique). Le génome du phage contient une partie du gène LacZ qui confère à la bactérie la capacité de produire la β-galactosidase, laquelle réagit avec le substrat X-gal et donne des colonies bleues.

### ▪ Séquençage des clones sélectionnés

L'ADN simple brin des phages sélectionnés a été isolé par extraction phénol/chloroforme (Sambrook *et al.*, 1989). Le séquençage de l'insert contenu dans le génome phagique a été réalisé par la méthode de Sanger à l'aide de l'amorce 5'-CCCTCATAGTTAGCGTAACG-3' (New England Biolabs) s'hybridant à 96 nucléotides en amont de la séquence insérée. La séquence d'ADN a été analysée par un CEQ 2000 XL (Beckman Coulter<sup>TM</sup>, Analis, Namur, Belgique). La lecture de la séquence a été réalisée à l'aide du logiciel JaMBW 1.1 (<http://bioinformatics.org/JaMBW/>).

## ▪ **Criblage des clones et évaluation de leur affinité (ELISA)**

La mise au point du test ELISA a nécessité l'utilisation d'un anticorps primaire monoclonal anti-MUC5AC de souris (45M1), d'un pool de 8 anticorps monoclonaux anti-MUC5AC de souris (PM8) au 1:200 et d'un anticorps secondaire anti-souris conjugué à la peroxydase au 1:5000 (Pharmacia Biotech Benelux, Roosendaal, Pays-Bas). L'immobilisation de la cible sur la plaque ELISA a été réalisée comme décrit précédemment.

Pour tester la spécificité des phages vis-à-vis des mucines, chaque puits est incubé avec  $10^{12}$  phages dans 100 $\mu$ L de PBS-T 0,5% 2h à 37°C. Les phages sont détectés à l'aide d'un anticorps monoclonal anti-M13 couplé à la peroxydase (Amersham Pharmacia Biotech Benelux, Roosendaal, Pays-bas) dilué au 1:5000 dans du tampon bicarbonate/BSA (0,1M NaHCO<sub>3</sub>, pH 8,6, 0,02% NaN<sub>3</sub>, 0,5% BSA). La réaction de coloration à la peroxydase est réalisée en présence d'ABTS sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azino-bis (3-éthylbenzotiazoline-6-sulfonique), Sigma-Aldrich ; 22mg dans 100mL de citrate de sodium, pH 4 complété avec 0,05% d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Après 30 à 60 minutes d'incubation à température ambiante la DO<sub>405nm</sub> est lue sur un lecteur de microplaque (Stat-Fax-2100, Awarness Technology Inc., Fisher Bioblock Scientific, Tournai, Belgique).

Pour déterminer la constante de dissociation apparente ( $K_d$ ), les puits coatés sont mis en présence d'une gamme de dilutions d'ordre 2 de phages. La première dilution débute à 2  $10^{12}$  virions/puits tandis que la dernière s'achève à 4,88  $10^8$ /puits.

## ▪ **Evaluation de l'affinité des peptides par ELISA**

La faible masse des heptapeptides impose dans un premier temps des mises au point afin de limiter le risque de fixation non spécifique sur le support utilisé. Pour ce faire différents agents de blocages ont été testés directement sur une plaque de polystyrène 96 puits (*Greiner Bio-One*, Courtaboeuf, France) : lait en poudre 0,1% (Régilait), gélatine de poisson, la solution de blocage non-protéique utilisée lors du criblage des phages (PFBB, *Thermo Fisher Scientific Inc.*, USA) et BSA 0,1%. Une fois le meilleur agent de blocage déterminé et incubé 2H à température ambiante, les mucines coatées sont mises en présence des peptides biotinylés qui sont incubés 2H à 37°C dans une gamme de concentration comprise entre  $10^{-3}$ M et  $10^{-6}$ M. Les peptides biotinylés fixés à la cible sont révélés à l'aide d'anticorps anti-biotine de chèvre incubés une heure à température ambiante (*Vectors laboratories*, Paris,

France) dilués dans du PBS à 1 µg/mL. Une seconde incubation d'une heure à température ambiante est réalisée en présence d'anticorps anti-chèvre marqués à la peroxydase à 0,2 µg/mL (Sigma-Aldrich) dilués dans du PBS complété par 0,1% de Tween-20. La réaction de coloration a été réalisée comme décrit précédemment. Après 30 à 60 minutes d'incubation à température ambiante la  $DO_{405nm}$  est lue sur un lecteur de microplaque (ELx800, Biotek Instrument, Colmar, France). Entre chaque incubation trois lavages par du PBS+Tween 0,1% sont effectués.

## ▪ **Caractérisation de l'expression de MUC5AC par les lignées cellulaire utilisées**

Dans un premier temps, les deux lignées cellulaires (HT29 5 M 21 et HCT116) ont été testées par RT-PCR (Reverse transcriptase-PCR) à l'aide d'amorces se fixant spécifiquement à l'ADNc (ADN complémentaire) de MUC5AC. L'ARN a été extrait à l'aide du kit d'extraction *RNeasy Mini Kit* (Qiagen SA, Courtaboeuf, France) selon les recommandations du fabricant. Le protocole d'extraction comprend 4 étapes : la lyse des cellules dans l'échantillon, la fixation de l'ARN du lysat cellulaire à la membrane de la colonne, le lavage de la membrane et l'élution de l'ARN de la membrane. Cette technique permet de purifier rapidement l'ARN des protéines, nucléases et autres contaminants ou inhibiteurs pour les étapes ultérieures. L'ARN purifié doit ensuite être soumis à une rétrotranscription afin d'obtenir un double brin d'ADNc qui pourra être amplifié et détecté après PCR le cas échéant. Pour se faire, la rétrotranscription a été effectuée à l'aide du kit *MMLV Reverse Transcriptase 1st-Strand cDNA Synthesis Kit* (Promega) contenant 2 µL de l'enzyme (200UI/µL), 5 µL du tampon 5X adéquat, 1 µL d'un inhibiteur de RNases (40 µg/µL), 2 µL d'un mélange de nucléotides (10 mM) et complété par de l'eau RNase free qsp 25 µL. Le mélange contenant l'ARN (1 µg pour 25 µL) est placé à 37°C pendant une heure puis conservé à 4°C.

La PCR a été réalisée en utilisant ce couple d'amorces : 5'TGATCATCCAGCAGCAGGGCT3' et 5'CCGAGCTCAGAGGACATATGGG3' durant 30 cycles (1 minute 94°C, 1 minute 50°C et 1 minute 72°C). La composition du prémix de PCR est : Tampon 5 µL de Taq 5X (Promega), 2 µL de chacune des deux amorces à 10 µM, 5 µL de dNTP 10 mM (Promega), 1,25 µL de Taq polymérase 5 UI/µL (Promega), qsp 23µL avec de l'eau distillée. Le mélange est complété par 2 µL d'ADNc (0,5 ng d'ADN). L'amplification se déroule dans un thermocycler *Flex Cycler* (Analytik Jena). Parallèlement à cela une RT-PCR contrôle a été réalisée afin de contrôler la quantité d'ADNc entre les

différents échantillons vis-à-vis de la GAPDH avec ce couple d'amorces : 5'GGTGGACCTGACCTGCCGTCTA3' et 5'GAGGTCCACCACCCTGTTGCTG3' durant 30 cycles (1 minute 94°C, 1 minute 69°C et 1 minute 72°C).

Une électrophorèse en gel d'agarose 2% complété par 5 µL de bromure d'éthidium est ensuite réalisée afin de révéler le produit de PCR. La migration se fait sous un courant de 100 Volts pendant 45 minutes dans du tampon TAE (Tris/Acétate 40mM - EDTA 1 mM - pH 8). Le gel est ensuite observé sur un trans-illuminateur UV. L'interprétation se fait directement par visualisation d'une bande apparente correspondant à la présence de MUC5AC dans les échantillons testés.

### ▪ **Evaluation de l'affinité des peptides par ELISA sur cellules**

Après 21 jours de culture pour les cellules HT29-5M21 et 7 jours pour les cellules HCT116 en plaque de 96 puits (*Greiner Bio-One*, Courtaboeuf, France), les cellules sont rincées avec du PBS à 4°C, puis fixées avec 1% de glutaraldehyde dilué dans du PBS. Les cellules sont ensuite rincées à nouveau 3 fois avec du PBS à 4°C et incubées 2 heures à température ambiante avec la solution de blocage non-protéique (PFBB, *Thermo Fisher Scientific Inc.*, USA) et 2 heures à 37°C dans une gamme de concentration comprise entre 10<sup>-3</sup>M et 10<sup>-6</sup>M de peptides biotinylés. Les peptides biotinylés fixés à la cible sont révélés à l'aide d'anticorps anti-biotine de chèvre incubés une heure à température ambiante (*Vectors laboratories*, Paris, France) dilués dans du PBS à 1 µg/mL. Une seconde incubation d'une heure à température ambiante est réalisée en présence d'anticorps anti-chèvre marqués à la peroxydase à 0,2 µg/mL (Sigma-Aldrich) dilués dans du PBS complété par 0,1% de Tween-20. La réaction de coloration à la peroxydase est réalisée en présence d'ABTS comme décrit précédemment. Entre chaque incubation 3 lavages par du PBS sont effectués.

### ▪ **Dosage de MUC5AC par ELISA**

La détermination de la quantité de MUC5AC a été réalisée à l'aide d'une gamme de concentrations allant de 2,5 à 50 µg/mL de MUC5AC gastrique humaine. Les échantillons sont préalablement coatés sur une plaque de polystyrène 96 puits (*Greiner Bio-One*, Courtaboeuf, France) repris dans du tampon bicarbonate (0,1M NaHCO<sub>3</sub>, pH 8,6) et incubés à 4°C en atmosphère humide durant une nuit. On ajoute ensuite un agent de blocage non-protéique (PFBB, *Thermo Fisher Scientific Inc.*, USA) que l'on incube 2H à température ambiante. Les mucines fixées sont révélées à l'aide d'un anticorps anti-MUC5AC de souris (45M1 dilué au 1:200 dans du PBS, fourni par le Dr J. Bara, U482 Inserm) incubé une heure à

température ambiante. Une seconde incubation d'une heure à température ambiante est réalisée en présence d'anticorps anti-souris marqués à la peroxydase à 0,2 µg/mL (Sigma-Aldrich) dilués dans du PBS complété par 0,1% de Tween-20 et 0,5% de BSA. La réaction de coloration à la peroxydase est réalisée en présence d'ABTS comme décrit précédemment. Après 30 à 60 minutes d'incubation à température ambiante la DO<sub>405nm</sub> est lue sur un lecteur de microplaque (ELx800, Biotek Instrument, Colmar, France). Entre chaque incubation 3 lavages par du PBS+Tween 0,1% sont effectués.

### ▪ **Spécificité des peptides par immunohistochimie**

Des coupes de muqueuses gastrique, colique saine et d'adénome colorectal humains (5 µm d'épaisseur) ont été fixées 24h par du paraformaldéhyde 4% et incluses dans de la paraffine. Pour le marquage, les coupes sont tout d'abord déparaffinées dans du toluène et réhydratées dans de l'alcool 95%. Après rinçages dans de l'eau, les lames sont portées à ébullition durant 10 minutes dans un tampon citrate (50 mM, pH 4). Une fois la température du tampon revenue à 25-30°C, les lames sont ensuite rincées au PBS puis successivement incubées durant 15 minutes dans une solution de peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 0,15% et un kit de blocage de la biotine endogène pendant une 1 heure (*Invitrogen*, Cergy Pontoise, Paris). Puis les coupes sont bloquées à l'aide de PFBB, 1 heure à température ambiante, pour être ensuite incubées à 4°C, 18 heures avec les peptides à différentes concentrations (20 µM, 10 µM, 1 µM, 0,2 µM, 0,04 µM) ou les anticorps (MUC5AC : PM8 à la dilution 1/100 et MUC2 : LUM2-3 à la dilution 1/100) dilués dans du PBS. La révélation des peptides est réalisée comme décrit précédemment, tandis que les anticorps anti-MUC5AC et MUC2 sont révélés à l'aide d'un anticorps secondaire anti-souris et anti-lapin, respectivement, couplés à la peroxydase et dilués chacun au 1/250 (*Amersham Biosciences*). Après différents lavages dans du PBS les lames sont incubées avec du DAB (3,3'-Diaminobenzidine tetrahydrochloride) 0,05%, complété avec 0,015% d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durant 50 minutes.

### ▪ **Evaluation de la spécificité des USPIO sur modèles cellulaires**

Après 21 jours de culture pour les cellules HT29-5M21 et 7 jours pour les cellules HCT116 en plaque 6 puits (*Greiner Bio-One*, Courtaboeuf, France), les cellules sont rincées avec du PBS à 4°C, puis directement mises en contact avec 0,5mL d'USPIO dilués dans du PBS durant 30 minutes, 1 heure ou 2 heures à 37°C (incubateur 5% de CO<sub>2</sub>). Les USPIO sont testés à différentes concentrations de 1/2/4/8 mM en fer pour chaque temps et sur chacune des

lignées. Après aspiration du surnageant, les cellules sont lavées deux fois avec du PBS puis grattées pour ensuite être reprises par 250µL de PBS (deux fois). Les cellules sont ensuite agitées vigoureusement afin de détacher la couche de mucines de ces dernières et ainsi les mettre en suspension. Pour les cellules HT29 5M21 la suspension est centrifugée 5 minutes à 1500 g puis le culot est éliminé afin de s'affranchir de la grande quantité de cellules (difficile à hydrolyser). Pour les cellules HCT116 la suspension est conservée dans son intégralité. Ces deux préparations sont ensuite lyophilisées puis reprises par 100µL d'une solution d'HCl à 5N 4H à 80°C au bain-marie en vortexant les tubes de temps à autre pour homogénéiser la solution. Le dosage est ensuite réalisé par relaxométrie à l'aide d'un Minispec Mq-60 (*Bruker*, Ettlingen, Germany). Pour réaliser le Perls on utilise 10µL de solution à doser dans 100µL de réactif, incubation durant 15 minutes à température ambiante dans une solution de PBS-ferrocyanure de potassium 1% - HCl 1%.

### ▪ **Le modèle animal de xénogreffe**

Des souris (femelles) Nude NMRI (25-30g) ont été commandées chez Janvier (*Centre d'élevage Roger Janvier CERJ*, Le Genest St Isle, France), livrées à l'institut Pasteur de Lille et stabulées pendant une semaine de quarantaine. Les injections des souris préalablement endormies à l'isoflurane (par inhalation) ont été réalisées à l'aide d'une suspension de  $4 \times 10^6$  cellules/50µL pour les cellules HCT116 et d'une suspension de  $2 \times 10^6$  cellules/40µL pour les cellules HT29 5M21 en sous cutané dans la zone dorsale. Les tumeurs sont prélevées sur les animaux après euthanasie par injection létale d'anesthésiant et sont conservées dans du formaldéhyde 4% jusqu'à leur fixation en paraffine. Ce protocole a été soumis à un comité d'éthique au sein de l'entreprise Guerbet sous l'appellation ER-10-00078 selon le protocole DR-10-01709-PRO.

### ▪ **Caractérisation immunohistologique des xénogreffes**

Une fois la fixation en paraffine réalisée, des coupes de 3µm d'épaisseur ont été réalisées. Afin de réaliser la révélation immunohistologique proprement dite un déparaffinage est réalisé. Différents paramètres ont été étudiés : l'expression de MUC5AC à l'aide d'un anticorps polyclonal de lapin (LUM5-1 au 1/1000), hémalum éosine safran (HES) pour évaluer la nécrose tissulaire et la vascularisation. Toutes les réactions de coloration ou immunorévélations sont réalisées en automate pour la caractérisation du modèle murin (*Benchmark Ventana*, Strasbourg, France).

## ▪ Synthèse des USPIO

Les nanoparticules ont été préparées selon les méthodes décrites dans le brevet WO2004/058 275 (US 2004/253181) pour la préparation des solutions colloïdales de particules magnétiques et selon les méthodes décrites dans le brevet WO2004/058 275 pour la complexation des particules magnétiques par des fonctions carboxylates. Les particules décorées avec des fonctions carboxylates sont couplées successivement aux peptides vecteurs (C60 cyclique) et au PEG après activation des résidus carboxyliques selon un protocole classique de chimie peptidique. Elles sont alors dénommées P3667 avec le peptide et P3007 sans le peptide. Après ultrafiltration, les suspensions colloïdales sont caractérisées par dosage de Fer, mesure de la taille PCS et des relaxivités  $r_1$  et  $r_2$ .

### Dosage du Fer total

Le fer est dosé par spectroscopie d'absorption atomique (Spectrophotomètre VARIAN AA10) après minéralisation par HCl concentré et dilution par rapport à une gamme étalon d'ions ferrique (0, 5, 10, 15 et 20 ppm).

### Taille des particules

Le diamètre hydrodynamique de la particule greffée a été déterminé par PCS (appareil Malvern 4700, laser 488 nm à 90°) sur un échantillon dilué à ~ 1 millimolaire avec de l'eau PPI filtrée sur 0,22  $\mu\text{m}$ . PCS = Photon Correlation Spectroscopy = Technique par Diffusion de Lumière Dynamique (Pecora *et al.*, 2000).

### Mesures de relaxivité

Les temps de relaxation  $T_1$  et  $T_2$  ont été déterminés par des procédures standards sur un appareil Minispec 120 (Bruker) à 20 Mhz (0,47T) et 37°C. Le temps de relaxation longitudinal  $T_1$  est mesuré en utilisant une séquence d'Inversion Récupération et le temps de relaxation transverse  $T_2$  est mesuré par une technique CPMG. Les vitesses de relaxation  $R_1$  ( $=1/T_1$ ) et  $R_2$  ( $=1/T_2$ ) ont été calculées pour différentes concentrations en métal total (variant de  $0,1 \times 10^{-3}$  à  $1 \times 10^{-3}$  mole/L) en solution aqueuse à 37°C. La corrélation entre  $R_1$  ou  $R_2$  en fonction de la concentration est linéaire, et la pente représente la relaxivité  $r_1$  ( $R_1/C$ ) ou  $r_2$  ( $R_2/C$ ) exprimées en (1 / seconde) x (1/ mM/L) soit ( $\text{mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ).

A une concentration en fer de 265mM, la taille des particules déterminée par technique PCS est de 28nm. La relaxivité dans l'eau (20MHz) est pour r1 de 34 mM<sup>-1</sup>.s<sup>-1</sup> et pour r2 de 91 mM<sup>-1</sup>.s<sup>-1</sup>.

### ▪ **IRM moléculaire de MUC5AC sur xénogreffes**

Le produit de contraste portant le peptide (P3667) a été testé sur les deux modèles tandis que le produit de contraste seul (P3007) n'a été testé que sur le modèle MUC5AC positif. Les produits de contraste ont été injectés par intraveineuse caudale et testés à trois doses : 20 µmol Fe/kg, 40 µmol Fe/kg et 100 µmol Fe/kg.

Une séquence d'IRM a été utilisée dans cette étude : la séquence RARE (Rapid Acquisition with Relaxation Enhancement) pondérée en T<sub>2</sub> (Tableau 8).

L'effet du produit de contraste a été mesuré en RARE pondéré en T<sub>2</sub> en utilisant cette équation. Avec SI pour Signal Intensity, SI<sub>post</sub> et SI<sub>pré</sub> pour respectivement l'intensité du signal dans la tumeur après et avant injection du produit de contraste.

$$\Delta SI / Ref \% = \frac{(SI_{post} / SI_{Ref}) - (SI_{pre} / SI_{Ref})}{(SI_{pre} / SI_{Ref})} \times 100$$

L'augmentation du SI (mesuré avec le logiciel ImageJ) a été calculé en considérant le SI d'un échantillon de référence (SI<sub>Ref</sub>) à 20µM de Gd.

Tableau 8 : Protocoles d'IRM RARE.

Séquence IRM (Bruker/Biospin, Pharmascan, 7T)	Paramètres d'acquisition
RARE	TR/TE <sub>eff</sub> = 3000 / 48,7 ms, facteur RARE = 4, NEX = 4, matrice = 256x256, FOV = 2,3 cm, épaisseur de coupe = 1 mm, 20 coupes axiales, résolution spatiale = 90 µm, Temps d'acquisition = 12 min 48 sec

## ■ Immunohistochimie

L'immunohistochimie a été réalisée sur des coupes de tissus fixés dans la paraffine (3 à 5µm d'épaisseur). Elles sont dans un premier temps déparaffinées par deux bains successifs de toluène pendant 10 minutes, deux bains d'éthanol 100% pendant 5 minutes et un bain d'éthanol 96% pendant 5 minutes. On réalise ensuite un traitement à la chaleur pendant 10 minutes à ébullition dans un tampon citrate 0,05M, pH 4. Après avoir laissé refroidir durant 20 minutes, on bloque la coupe à l'aide d'une solution de PFBB pendant au moins 30 minutes. On ajoute alors les anticorps primaires (Tableau 9) pendant 1 heure à 37°C. La coupe est lavée plusieurs fois dans le PBS 0,5% Tween puis incubée avec des anticorps secondaires anti-IgG de lapin et anti-IgG de souris (1:5000 dans du PBS, 1 heure à 37°C) marqués à l'aide de fluorophores Alexa fluor 488 et 546 (*Invitrogen*). Après plusieurs rinçages dans le PBS 0,5% Tween et une fois dans le PBS, la lame est montée avec du Mowiol et examinée sous un microscope confocal (*Zeiss LSM 510*; objectif ×63). Une coloration des noyaux peut être réalisée avant le montage avec du DAPI pendant 30 secondes.

Tabelau 9 : Liste des anticorps utilisés.

Anticorps anti-	Polyclonal de lapin	Monoclonal de souris
MUC2	LUM2-3 (Nordman <i>et al.</i> , 2002)	
MUC5AC	LUM5-1 (Nordman <i>et al.</i> , 2002)	45M1 et PM8 (Bara <i>et al.</i> , 1986)
MUC6	LUM6-1 (Nordman <i>et al.</i> , 2002)	CLH-5 (Reis <i>et al.</i> , 2000)
MUC5B	LUM5B (Nordman <i>et al.</i> , 2002)	
LDN		273-3F2 (Van Remoortere <i>et al.</i> , 2000)
Lewis <sup>b</sup>		2.25LE (Bara <i>et al.</i> , 1988)
Lewis <sup>y</sup>		22-1B3-A (Van Remoortere <i>et al.</i> , 2000)

## ▪ **Détection histologique des USPIO sur tissus**

La détection histologique des USPIO a nécessité un anticorps anti-PEG (Poly éthylène glycol), puisque le PEG est directement utilisé lors de la synthèse des USPIO. Cet anticorps (Epitomics, Netherlands, PEG-B-47) est une IgG de lapin. Les échantillons ont tout d'abord été déparaffinés comme décrit précédemment, les peroxydases endogènes ont été bloquées par une incubation de la coupe 15 minutes dans 0,15% d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> avant d'être bloquées dans du PFBB durant 45 minutes à température ambiante. Les anticorps anti-PEG ont ensuite été incubés une nuit à 4°C au 1 : 250. Trois lavages, 5 minutes chacun au PBS sont ensuite effectués, suivi d'une incubation avec un anticorps secondaire anti-lapin marqué à la peroxydase (*Amersham Biosciences*) 1 heure à température ambiante au 1 : 250. Les lames sont à nouveau lavées trois fois 5 minutes au PBS et incubées 50 minutes avec du DAB 0,05% dans 0,015% d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> avant d'être montées entre lame et lamelle.

## ▪ **Analyse de la glycosylation des mucines**

### Libération chimique des glycanes

Les mucines purifiées lyophilisées sont dissoutes dans une solution de NaOH 0,1M contenant du BH<sub>4</sub>Na 1M. La solution est incubée à 45°C pendant 24 heures, sous agitation magnétique. La réaction est ensuite stoppée par addition d'une résine échangeuse de cations (Dowex 50x8, 20-50 mesh, forme H<sup>+</sup>) et la solution est filtrée puis évaporée à sec. L'excédent de sels de borate est éliminé par co-distillations successives avec du méthanol (Carlson, 1968). Les glycanes libérés sont sous forme d'oligosaccharide-alditols.

### Chromatographie échangeuse de cations

Les peptides sont éliminés du mélange par passage de la solution sur une colonne de Dowex 50x2 (200-400 mesh, forme H<sup>+</sup>). Les oligosaccharides sont élués par de l'eau désionisée tandis que les peptides restent fixés sur la résine. Après détection des oses par coloration à l'orcinol sulfurique sur couche mince de silice, les différentes fractions sont neutralisées à l'aide d'une solution de NH<sub>4</sub>OH 1M et concentrées sous évaporateur rotatif à 25°C.

### Dessalage des oligosaccharides

Les oligosaccharides sont dessalés et purifiés par passage de la solution sur une colonne de Bio-Gel P<sub>2</sub> (90x1,6cm) éluee par de l'eau désionisée à un débit de 10mL/heure.

Les glycanes sont repérés par un détecteur UV ( $\lambda_{\text{abs}}=206\text{nm}$ ) en sortie de colonne et une vérification est faite par coloration à l'orcinol.

#### Analyse des oligosaccharides par ESI-MS/MS ( Nanospray-Q-TOF )

Les spectres ESI-MS et ESI-MS/MS ont été réalisés sur un spectromètre de masse de géométrie Q-TOF et de type Q-Star Pulsar I (*Applied Biosystems/MDS Sciex*, Toronto, Canada) équipé d'une source nanoélectrospray (*Protana*, Odense, Denmark). Les échantillons ont été dissous dans un solvant méthanol/eau/0,1% acide formique (50/50, v/v), à une concentration de 60pmol/ $\mu\text{L}$ . La tension appliquée au capillaire oscille entre 800 et 1000 Volts.

Pour les spectres MS/MS, l'énergie de collision appliquée aux précurseurs varie de 20 à 90eVolts en fonction de l'état de charge et de la stabilité de l'ion sélectionné. L'acquisition a été réalisée en mode pulse d'ions (fonction « enhance » activée), et les spectres présentés résultent de l'accumulation de 50 à 100 cycles de balayage de la gamme de masse choisie. Toutes les analyses ont été réalisées en mode positif et en mode négatif.

### ▪ **Purification des oligosaccharides par HPLC**

Le mélange des oligosaccharides alditols de chaque échantillon est injecté sur une HPLC (Dionex Chromeleon System, Sunnyvale, CA, USA) montée avec une colonne de silicie greffée amino (Supelcosyl, LC-NH<sub>2</sub>, 4,6 x 250 mm, Supelco, Bellefonte, CA, USA). La colonne est initialement équilibrée avec un mélange acétonitrile/eau (80 : 20) à un débit de 1mL/min. Après l'injection du produit, un gradient linéaire débute pour atteindre un ratio de 40 : 60 (acétonitrile/eau) à 80 minutes. L'eau est ensuite remplacée par une solution de phosphate 30mM à ratio de 50 : 50 jusque 110 minutes. Puis la colonne est à nouveau équilibrée pendant 20 minutes. Une seconde étape d'HPLC a ensuite été effectuée afin de purifier certaines structures restées en mélange après la première étape sur colonne amino. Elle consiste à utiliser une phase réverse C18 à un débit de 0,5mL/min. Les oligosaccharides sont élués avec de l'eau et détectés par spectroscopie UV à 200nm.

### ▪ **Analyse RMN des oligosaccharides**

Les échantillons à analyser sont d'abord lyophilisés avec du <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O (99,97% <sup>2</sup>H atoms, Euriso-top, CEA, Saclay, France) et transférés dans un tube de 200 X 5-mm BMS-005B Shigemi®. Les déplacements chimiques sont exprimés en parts par million (ppm) et ont été

calibrés en utilisant de l'acétone interne D6 ( $\delta^1\text{H}$  2,225 and  $\delta^{13}\text{C}$  31,55 ppm). Les spectres ont été acquis à 300 K sur un spectromètre de 9,4 testlas (Bruker®) où  $^1\text{H}$  résonait à 400,33 MHz et  $^{13}\text{C}$  à 100,25 MHz. Afin de caractériser la structure complète des oligosaccharides différents spectres ont été réalisés :  $^1\text{H}$ -1D,  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY,  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -TOCSY et  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC.

### ▪ ***Helicobacter pylori* et conditions de culture**

Les souches de *H. pylori* B128 (Israel *et al.*, 2001), 26695 (Tomb *et al.*, 1997), J99 (Alm *et al.*, 1999), G27 (Covacci *et al.*, 1993), P12 (Haas *et al.*, 1993) et B38 (Thiberge *et al.*, 2010) ont été cultivées en gélose au sang ou en BHI (brain heart infusion) contenant 10% de sérum de veau décomplémenté à 37°C en atmosphère microaérophile. Ces deux milieux peuvent être supplémentés avec un mélange antibiotiques-antifongiques (0,31  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  de polymyxin B, 2,5  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  d'amphotéricin B, 12,5  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  de vancomycin et 6,25  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  de triméthoprim) et d'antibiotiques appropriés (20  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  de kanamycin, 5  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  d'apramycin ou 5  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  de chloramphenicol).

### ▪ ***Helicobacter pylori* et adhésion à la muqueuse gastrique**

*H. pylori* a été marquée avec de la fluorescéine isothiocyanate (FITC, Sigma) et testée pour son adhésion sur coupes de tissus gastriques comme décrit dans la littérature (Falk *et al.*, 1993). Les bactéries sont reprises dans 1 mL d'une solution 0,15 M NaCl/0,1 M carbonate de sodium, pH 9,0 puis incubées dans une solution fraîchement préparée à 10mg/mL de FITC repris dans du diméthyl sulfoxyde (DMSO) durant 1 heure dans l'obscurité. Après plusieurs lavages suivis de centrifugations, la solution bactérienne est diluée 5 fois dans le PFBB avant utilisation. Le tissu est préalablement déparaffiné et réhydraté suivi d'une incubation dans une solution de blocage (PFBB, Thermo Fisher Scientific Inc., USA). Les bactéries sont incubées 2 heures à température ambiante avec ou sans glycanes (v/v) à une concentration de 1 mM pour le LDN (LacdiNAc) ou le Lewis<sup>b</sup>. Les lames sont ensuite rincées 3 fois avec du PBS contenant 0,05% de Tween 20 et colorées au DAPI. L'évaluation de l'adhésion bactérienne est estimée au grossissement 400 par dénombrement des bactéries. Chaque valeur représente au moins 5 champs différents.

### ▪ **Identification de LabA**

Les lysats bactériens des souches B128 et 26695 ont été soniqués et centrifugés (4500 g pendant 2 minutes) puis incubés une nuit à 4°C en présence de mucines gastriques purifiées

avec (condition 1) ou sans (condition 2) LDN à 2mM. Les tubes ont à nouveau été centrifugés (4500 g pendant 2 minutes), le surnageant a été collecté et séparé par électrophorèse à 7,5% de polyacrylamide. Le gel a ensuite été coloré au bleu colloïdale et les bandes différenciellement colorées entre les conditions 1 et 2 ont été découpées pour analyse en spectrométrie de masse. Chaque bande bien résolue a été soumise à une digestion trypsique après décolorations successives avec une solution à 100 mM de  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  et une solution à 100 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ /Acétonitrile (v/v). Les bandes ont ensuite été déshydratées dans une solution d'acétonitrile (ACN) et séchées. Les protéines ont été réduites dans une solution de DTT 10mM dans une solution à 0,1 M de  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  à 56°C pendant 30 minutes puis à nouveau séchées. Soumises à une alkylation avec une solution de  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (0,1 M) complétée d'iodoacétamide 55 mM pendant 20 minutes à l'obscurité. Les bandes sont à nouveau séchées et réhydratées dans une solution contenant 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , 5 mM  $\text{CaCl}_2$ , et 12,5 ng/ $\mu\text{L}$  de trypsine à 4°C pendant 20 minutes. L'excès de tampon est éliminé et la digestion s'effectue une nuit à 37°C. Les peptides sont alors libérés du gel. Après addition de 25 $\mu\text{L}$  d'une solution à 25 mM de  $\text{MNH}_4\text{HCO}_3$ , la bande de gel est incubée 15 minutes sous agitation et le surnageant est collecté. Cette étape est renouvelée deux fois avec une solution d'ACN 45%/0,1% de TFA et 95%/0,1% TFA. Tous les surnageants sont mélangés et séchés. Les peptides sont ensuite repris dans une solution de TFA 0,1% pour être dessalés en Zip-Tips  $\text{C}_{18}$ . Les peptides élués sont directement préparés sur une matrice d'acide  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamique à 10mg/mL dans une solution d'ACN/TFA 0,1% (v/v) et déposés sur la cible du MALDI-TOF ou TOF/TOF (AB Sciex TOF TOF 5800, Applied Biosystems, Foster City, California). Chaque spectre obtenu est calibré par la masse monoisotopique de fragments peptidiques issus de l'autoprotéolyse de la trypsine (842,5100, 1045,5642 et 2211,1046 Da). Les protéines ont été identifiées en utilisant Protein Prospector (<http://prospector.ucsf.edu/>, UniProt release 2011\_03 - Mar 8, 2011). Les paramètres suivants ont été utilisés : *Helicobacter pylori*, tolérance de masse 50 ppm, un site de clivage oublié. Les critères utilisés pour accepter l'identification prennent en compte le taux de recouvrement, le nombre de peptides retrouvés, le score et la précision.

### ▪ Electrophorèse SDS polyacrylamide

Les échantillons sont repris dans du tampon Laemmli (62,5mM Tris/HCl ; 10% glycérol (v/v) ; 2% SDS (m/v) ; 5%  $\beta$ -mercaptoéthanol (v/v) ; 0,02% bleu de bromophénol (m/v) ; pH 6,8), puis chauffés 10 minutes à 95°C. Les protéines sont déposées sur un gel polyacrylamide contenant, dans le gel de concentration 4,5% de polyacrylamide, 0,125M de

Tris/HCl pH 6,8, 0,1% de SDS, 0,0125% de *N,N,N',N'*-tétraméthylethylenediamine et 0,005% de persulfate d'ammonium. Le gel de séparation 7.5% de polyacrylamide est composé de 0,375M de Tris/HCl pH 8,8, 0,1% de SDS, 0,0125% de *N,N,N',N'*-tétraméthylethylenediamine et 0,005% de persulfate d'ammonium. Le gel est coulé dans un mini-Protean III (*Bio-Rad, Hercules, CA, U.S.A.*). La migration est réalisée dans un tampon dénaturant (20mM de Tris, 150mM de glycine et 0,1% de SDS) à voltage constant (100V, pendant 2-3 heures).

A l'issue de la migration, le gel est soit coloré au nitrate d'argent soit transféré sur une membrane de nitrocellulose de porosité 0,45µm en vue de l'analyse par western blotting. Le transfert est réalisé deux heures à 250mA dans le tampon de transfert 20mM Tris et 150mM glycine. L'efficacité du transfert est vérifiée par coloration de la membrane au rouge Ponceau (200mg Ponceau ; 3mL ATCA ; 97mL eau). L'immunodétection est réalisée comme décrite précédemment pour le slot blot.

## *Résultats*

# MUC5AC et le Cancer colorectal

## Présentation de l'étude

L'objectif de ce travail est de rendre possible le diagnostic précoce de lésions coliques malignes par une méthode non invasive d'IRM en ciblant la mucine MUC5AC colique. Pour ce faire, nous avons couplé un heptapeptide affiné pour la cible, sélectionné par la technique du phage display, à un produit de contraste IRM. Lors du criblage de la banque de phages, treize clones ont été sélectionnés sur la base de leur séquençage peptidique. La mesure de leur affinité vis-à-vis de MUC5AC a permis de conserver deux peptides qui ont été synthétisés sous forme linéaire et circulaire, couplés à la biotine. Nous avons ensuite utilisé ce couplage pour caractériser l'affinité et la spécificité de chaque peptide. Un seul candidat a été conservé, pour être greffé à des particules superparamagnétiques formées de cristaux d'oxydes de fer (magnétite :  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ). Préalablement, nous avons pu réaliser la capture sur modèle cellulaire pour valider la fonctionnalité du complexe avant une utilisation sur modèles animaux. Nous avons, conjointement à cela, caractérisé ces modèles par analyse anatomo-pathologique. Deux campagnes d'IRM ont été réalisées sur animaux, afin d'évaluer la dose optimale à injecter ainsi que la spécificité du produit. Et enfin, nous avons confronté les résultats IRM avec l'histologie du produit de contraste injecté.

## ▪ Purification de MUC5AC gastrique et colique

Les échantillons de mucus repris dans du chlorure de guanidine ont été soumis à une ultracentrifugation en gradient de chlorure de césium. Comme le montre la figure 30, la densité des fractions contenant MUC5AC est comprise entre 1,4 et 1,2g/ml, ce qui correspond bien à la densité attendue pour les mucines (entre 1,35 et 1,45g/ml). Cette étape permet de concentrer les mucines, tout en éliminant les protéoglycanes, les acides nucléiques, les protéines et glycoprotéines de bas poids moléculaires.

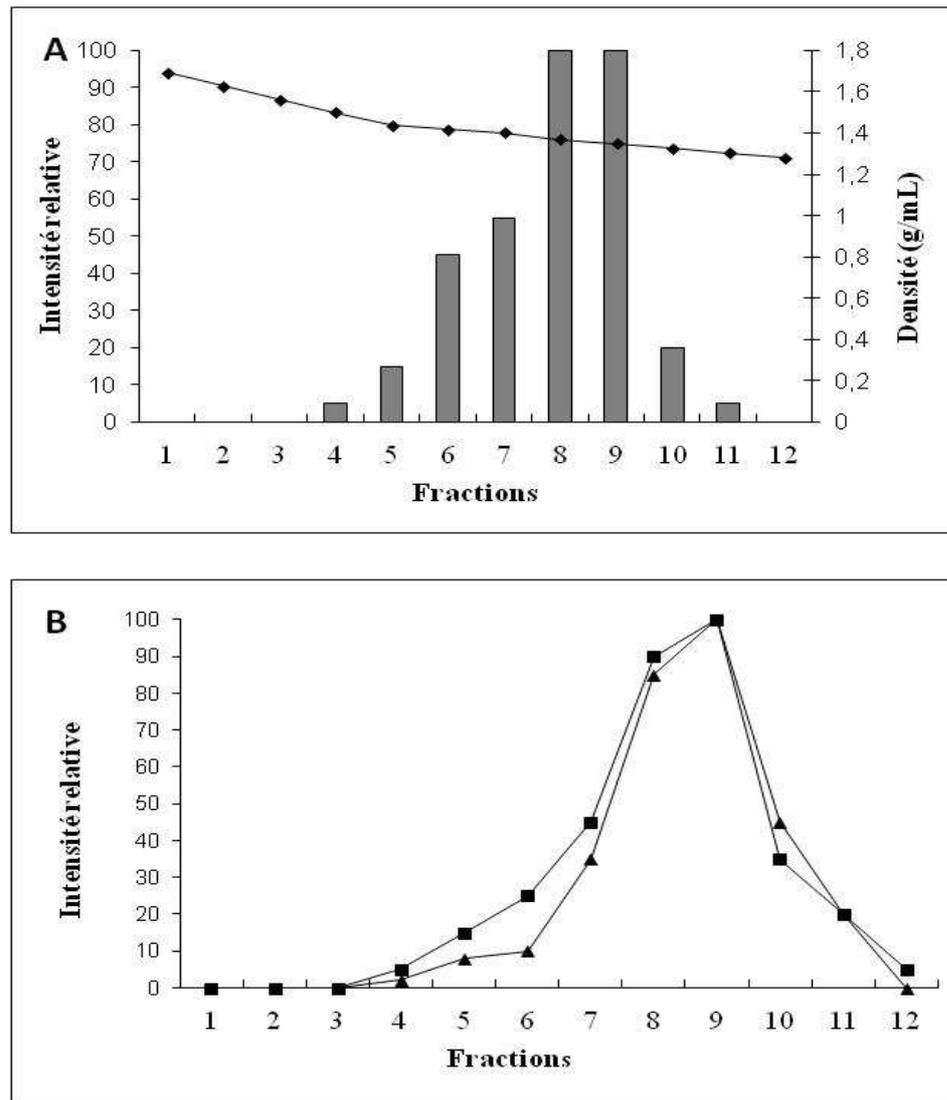


Figure 30 : Purification des mucines coliques par ultracentrifugation en gradient de chlorure de césium. Le mucus a été obtenu directement par grattage des tissus puis soumis à une ultracentrifugation en gradient de chlorure de césium dans une solution de chlorure de guanidine 4M. Les fractions ont été collectées et analysées pour leur densité (◆), leur réactivité au PAS (■) (A), leur réactivité avec un anticorps anti-MUC5AC (45M1) (■) et avec un anticorps anti-MUC2 (LUM2-3) (▲) (B).

Les fractions contenant MUC5AC ont été rassemblées, dialysées contre de l'eau et concentrées pour être chromatographiées sur une colonne de Sépharose CL-4B. Cette étape permet d'éliminer les contaminants de faible masse moléculaire. En effet, les mucines étant très lourdes elles sont éluées au volume mort de la colonne. Les glycoprotéines d'intérêt sont repérées à l'aide des anticorps anti-MUC5AC (Figure 31), poolées puis dialysées contre de l'eau avant d'être concentrées pour la dernière étape de purification.

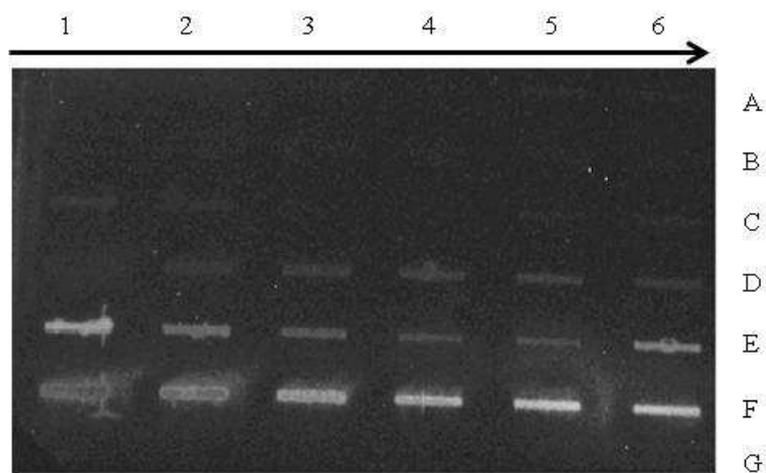


Figure 31 : Slot-blot des différentes fractions récupérées après chromatographie de gel filtration, à l'aide de l'anticorps monoclonal anti MUC5AC (45M1). Les dépôts sont réalisés de gauche à droite et de haut en bas.

Après réduction-alkylation des échantillons, les mucines ont été séparées sur une colonne de monoQ, en augmentant progressivement la concentration en NaCl. Comme le montre la figure 32, MUC5AC est éluée à une concentration de sels comprise entre 150 et 300mM. Les fractions sont contrôlées à l'aide d'un anticorps spécifique anti-MUC5AC puis sont rassemblées, dialysées dans l'eau ultrapure pour être lyophilisées.

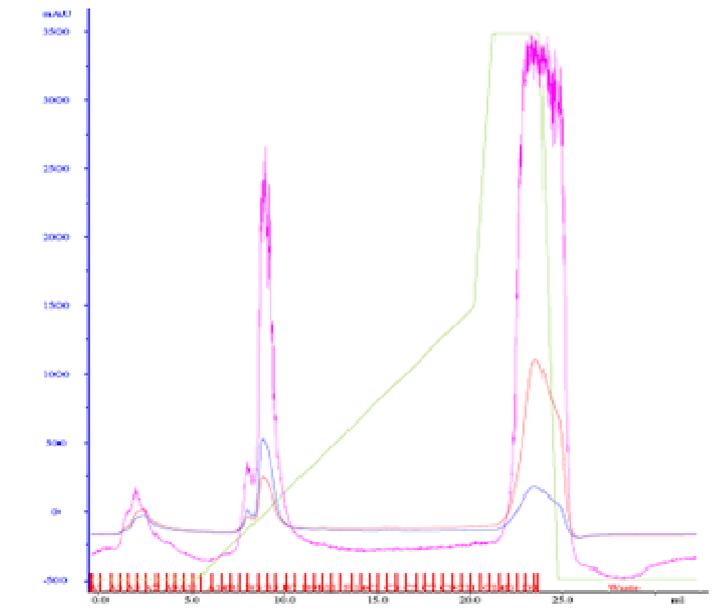


Figure 32 : Chromatogramme obtenu lors de la purification de MUC5AC provenant de tissus coliques. Chromatographie échangeuse d'anions sur une colonne monoQ. En rose, visualisation des glycoprotéines, en bleu, les protéines et vert, le gradient de NaCl.

### ■ Immobilisation de la cible

L'immobilisation de MUC2 et MUC5AC, préalablement purifiées à partir de pièces opératoires coliques et gastriques (saines et avec CCR) a été réalisée sur une plaque de polystyrène 96 puits (Greiner Bio-One, Wemmel, Belgique) à 100 $\mu$ g/mL de MUC5AC (Cible) et MUC2 (contre cible) à l'aide d'un tampon bicarbonate une nuit à 4°C (Phillips J.E *et al.*, 2006). La fixation a été contrôlée à l'aide d'un marquage immunologique indirect. Cela a nécessité l'utilisation d'un anticorps primaire monoclonal anti-MUC5AC de souris (45M1) et polyclonal anti-MUC2 de lapin (LUM2-3) dans un premier temps et ensuite d'un anticorps secondaire anti-souris ou anti-lapin conjugué à la peroxydase, que l'on révèle par l'ajout d'ABTS. Celui-ci a révélé une réponse spécifique équivalente optimale à 60,2 $\mu$ g/mL pour MUC5AC colique et 12,5 $\mu$ g/mL pour MUC5AC gastrique (Figure 33) et à 100 $\mu$ g/mL pour MUC2. Il y a donc bien une fixation des mucines sur les plaques de polystyrène.

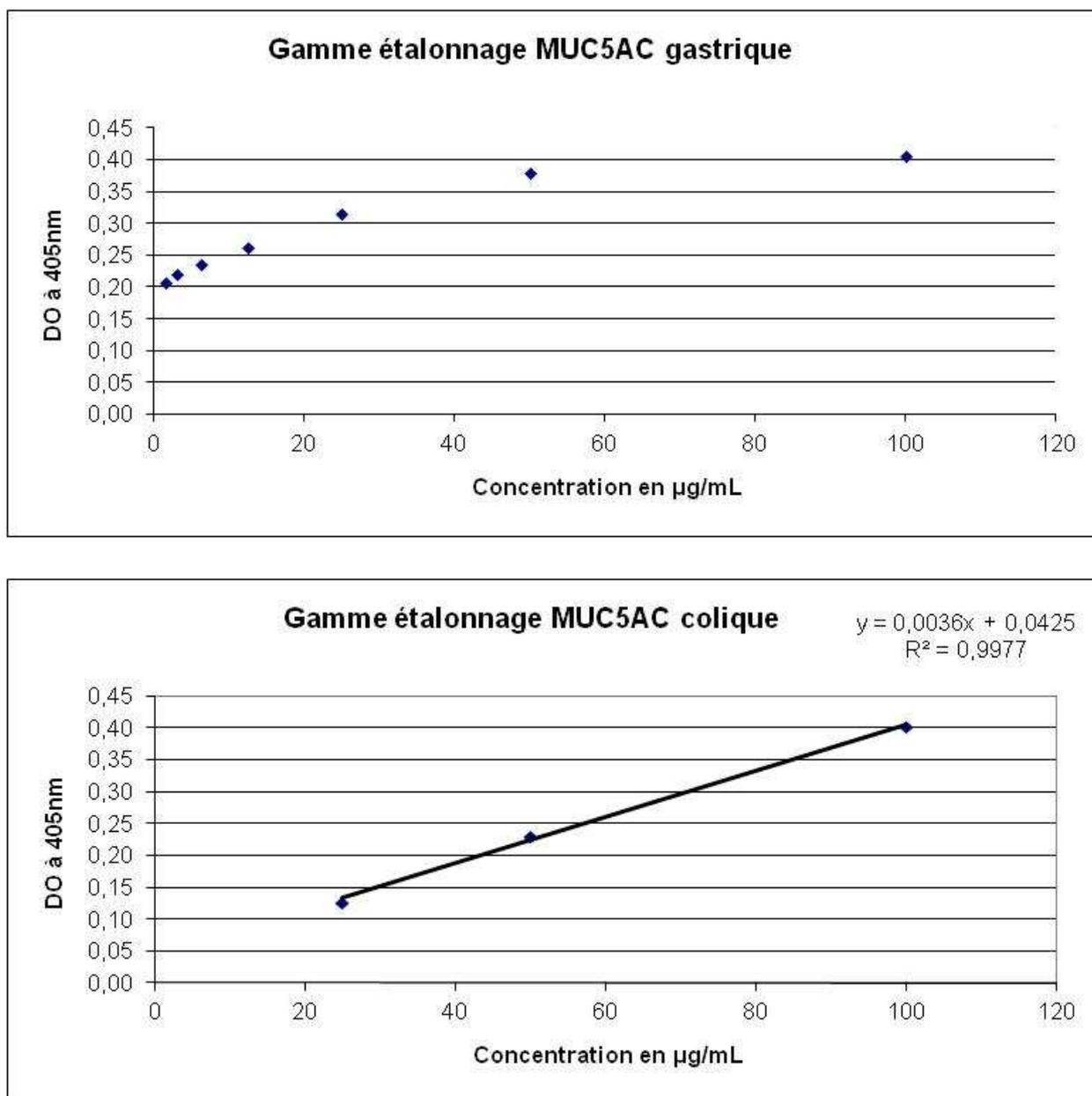


Figure 33 : Comparaison de l'immobilisation des deux MUC5AC en utilisant l'anticorps 45M1.

### ▪ Rounds de sélection des phages

A l'issue de chaque round de sélection et des étapes d'amplification, nous avons titré les phages (Figure 34). Nous constatons entre les rounds 1 et 2 une augmentation importante de phages se fixant à la cible, ce qui prouve l'efficacité de l'enrichissement pour des clones d'intérêt. A l'inverse, on observe une légère diminution entre les rounds 2 et 3 ce qui confirme l'efficacité de l'augmentation de la pression de sélection.

Par ailleurs, nous avons été contraints d'arrêter les rounds de sélection à 3 passages car la cible a introduit une contamination de phages lytiques sauvages. Ceci s'explique par la

présence de coliphages en grande quantité dans les intestins et donc potentiellement encore présents sur les mucines qui ne peuvent être autoclavées sans risque d'être endommagées.

Round	Phages retenus (output)	Amplifié
1	$2,26^5$	$1,78^{12}$
2	$3,07^6$	$7,52^{11}$
3	$1,87^6$	$4,95^{11}$

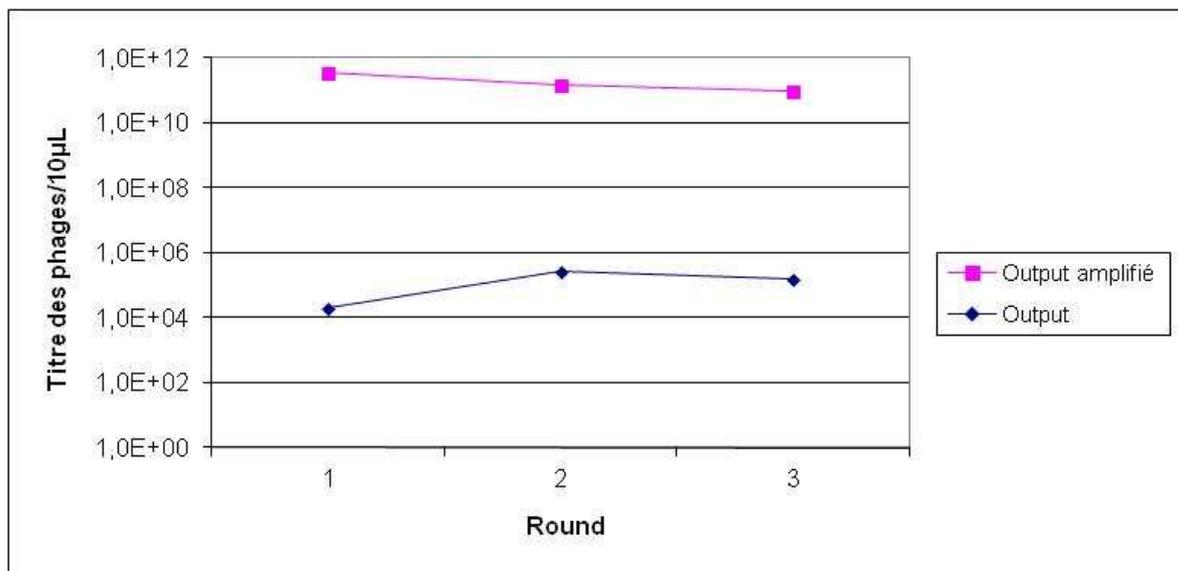


Figure 34 : Titre des phages récupérés au cours des rounds de sélection.

### ▪ Test des pools phagiques après les rounds de sélection

Nous avons ensuite testé les phages retenus (Output) sur la cible après chaque round vis-à-vis de leur fixation spécifique et non spécifique, ceci dans le but d'observer un enrichissement en phages d'intérêt (Figure 35). On constate une augmentation significative de l'affinité spécifique entre les rounds 1 et 2. *A contrario*, une confirmation de ce phénomène n'est pas observée pour le round 3. Ceci s'explique probablement par la contamination phagique préalablement observée et qui « pollue » l'ensemble du signal, d'autant que les

phages sauvages se répliquent plus rapidement que les phages possédants un insert (exprimant un peptide).

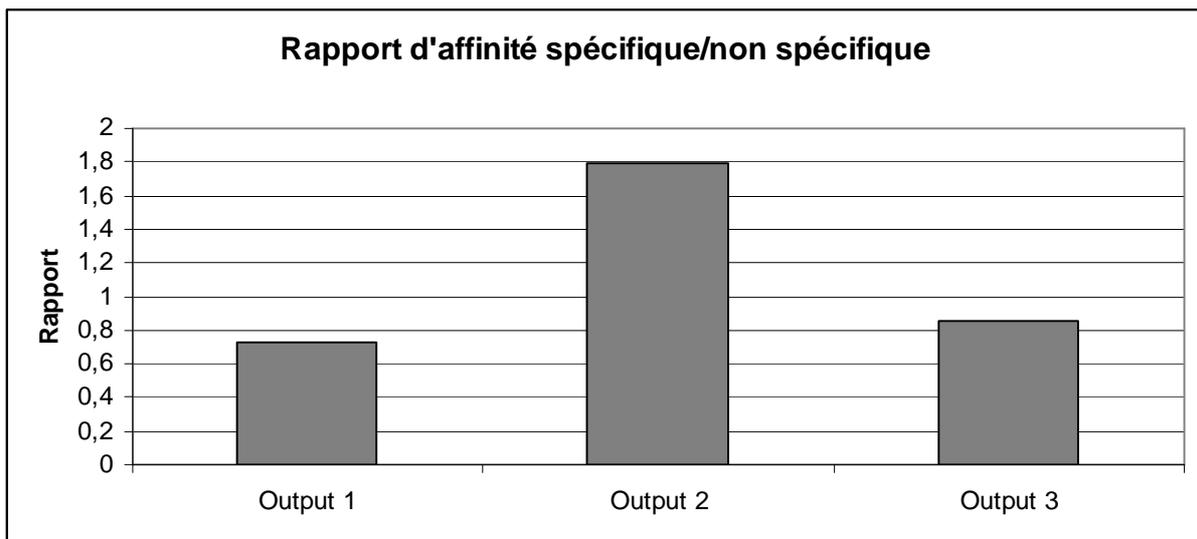
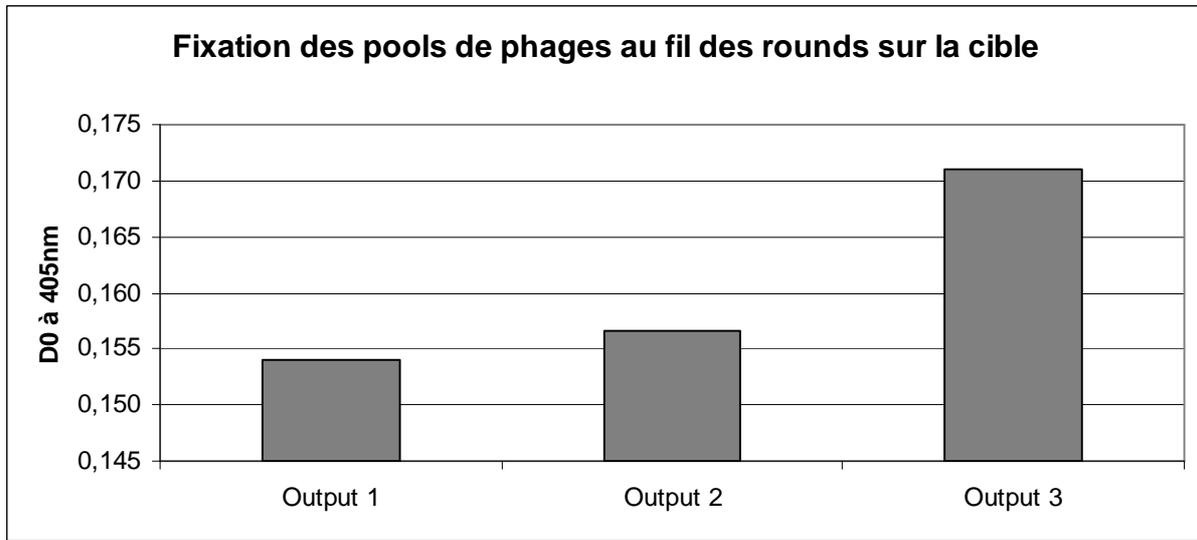


Figure 35 :  $DO_{405nm}$  vis-à-vis de la cible et évaluation de l'affinité spécifique des Outputs ( $DO_{405nm}$  MUC5AC colique/  $DO_{405nm}$  MUC2).

### ■ Isolement et amplification clonale

Nous avons, dans un premier temps, sélectionné 96 colonies isolées sur boîte de Pétri pour les amplifier et ainsi se constituer une banque de phages potentiellement affins pour la cible tout en la conservant dans des conditions permettant leur utilisation à long terme.

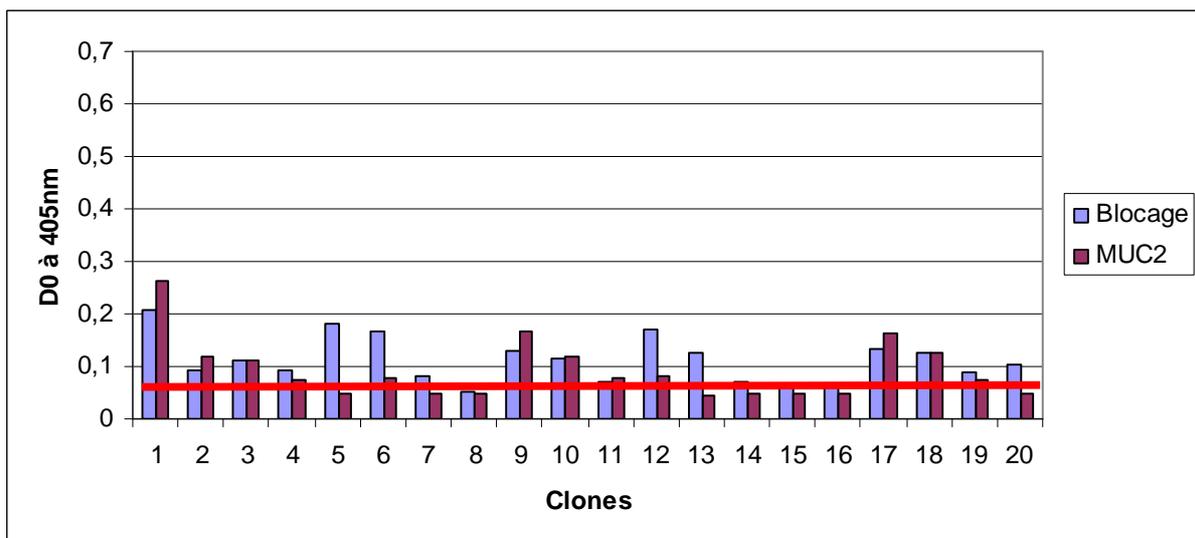
Nous avons ensuite réalisé la macro-amplification des 96 clones afin d'avoir suffisamment de phages ( $10^{12}$  phages par puits) pour leur criblage, ce qui a nécessité au total 125 amplifications.

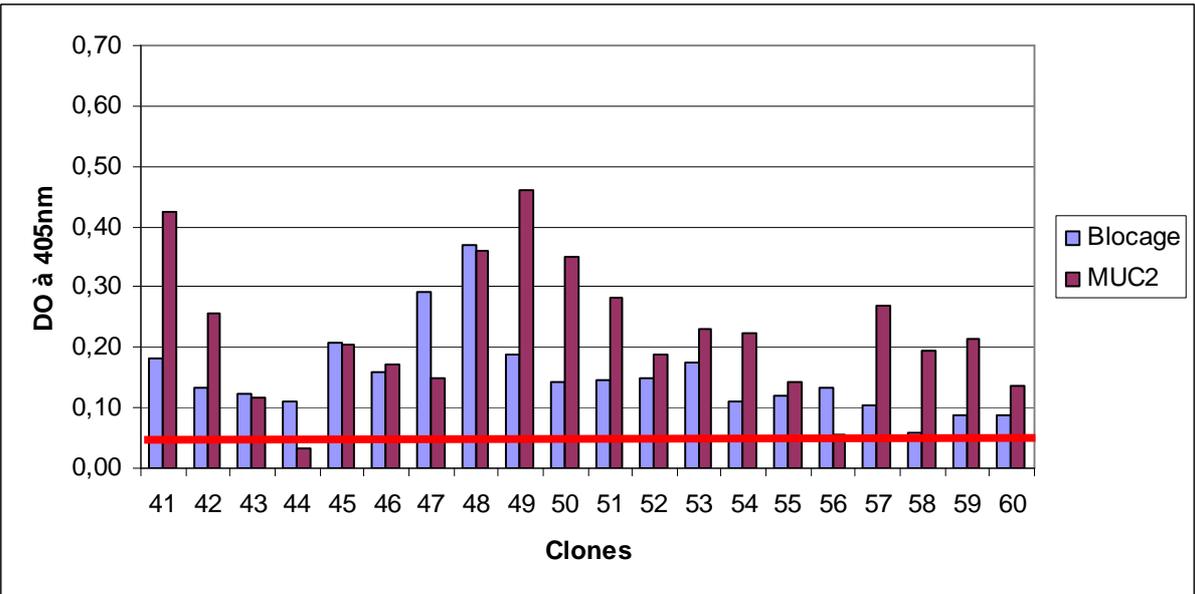
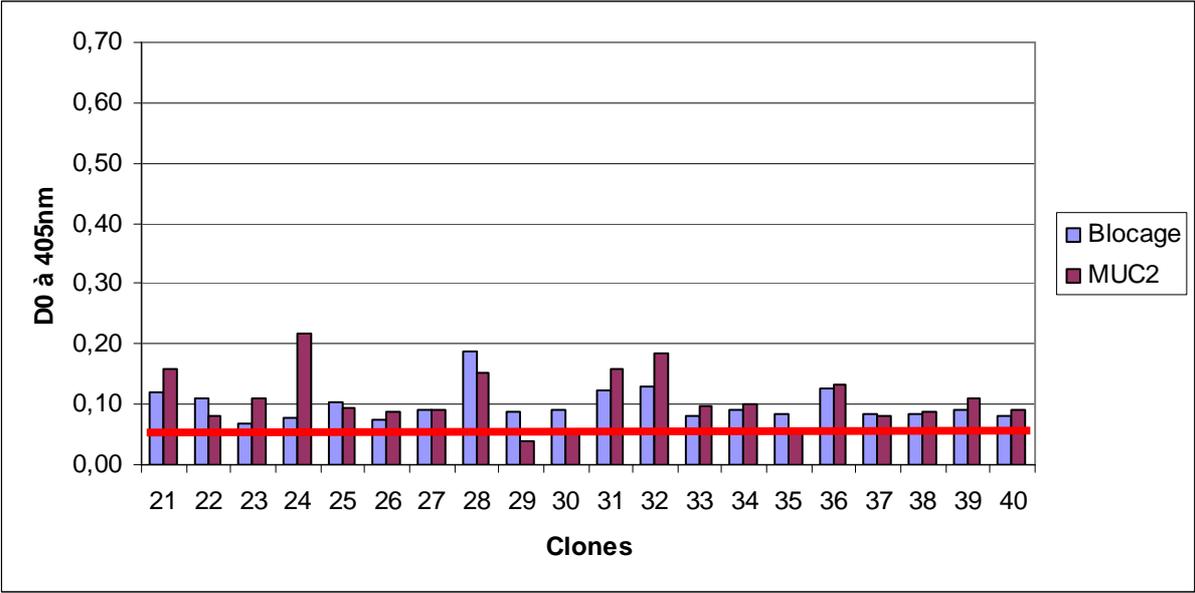
### ▪ Protocole de criblage des clones

Nous avons testé chaque amplification clonale en appliquant  $10^{12}$  phages sur 4 puits différents : un puits ne contenant que l'agent de blocage, un puits avec 20 $\mu$ g/mL de MUC2, un puits avec 20 $\mu$ g/mL de MUC5AC gastrique et un puits contenant 20 $\mu$ g/mL de MUC5AC colique.

### ▪ Elimination des clones non spécifiques

La première sélection est réalisée en utilisant les deux premiers puits non spécifiques (agent de blocage et MUC2) ce qui permet de ne conserver que 41 clones sur 96 (élimination des clones possédant une  $DO_{405nm} > 0,1$ ) (Figure 36).





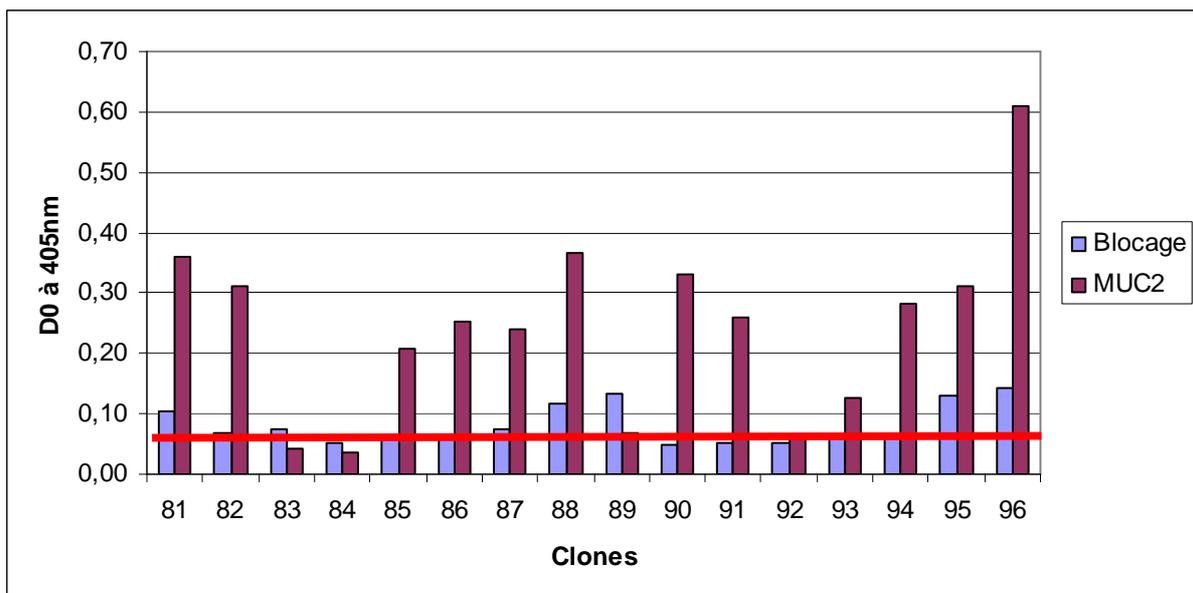
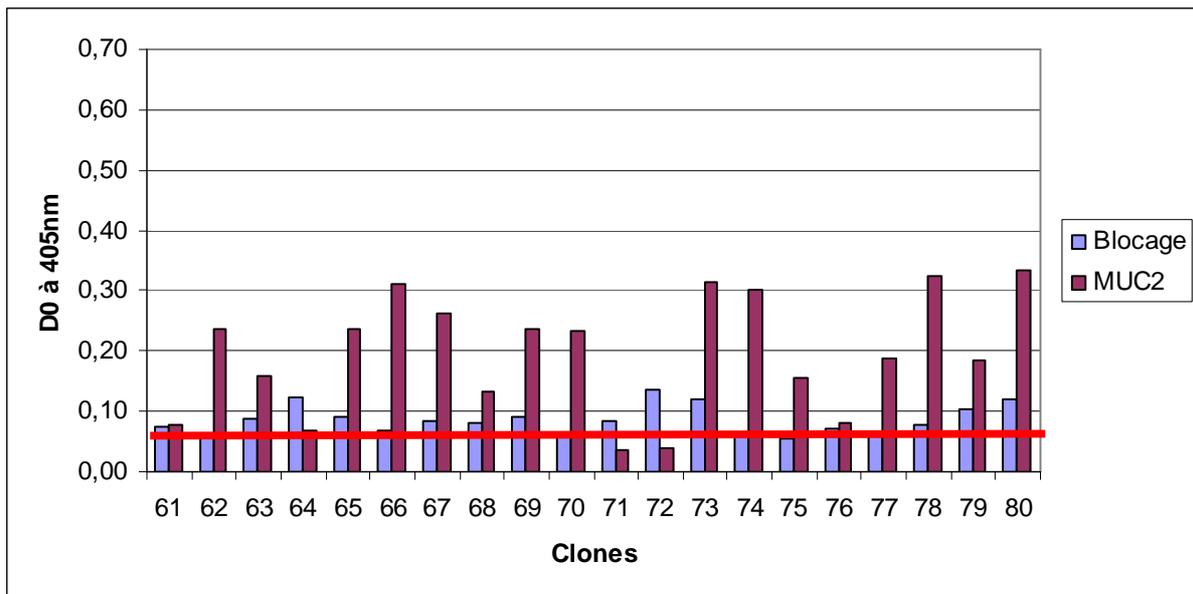


Figure 36 : Sélection des clones se fixant peu aux puits non spécifiques (MUC2 et agent de blocage) sur les 96 initiaux, en écartant ceux ayant une  $DO_{405nm}$  supérieure à 0,1. Seuls 41 clones sont conservés (2, 3, 4, 7, 8, 11, 14, 16, 19, 20, 22, 23, 25, 26, 27, 29, 30, 33, 34, 35, 37, 38, 39, 40, 43, 44, 55, 56, 60, 61, 64, 68, 71, 72, 75, 76, 83, 84, 89, 92 et 93).

### ▪ Sélection des clones spécifiques

Nous avons ensuite criblé les 41 clones préalablement sélectionnés pour leur faible fixation envers l'agent de blocage et MUC2 (Figure 37). Cette étape permet de conserver 36 clones qui ont des  $DO_{405nm}$  comprises entre 0,1 et 0,9 pour MUC5AC gastrique et de 0,2 à 0,9 pour MUC5AC colique.

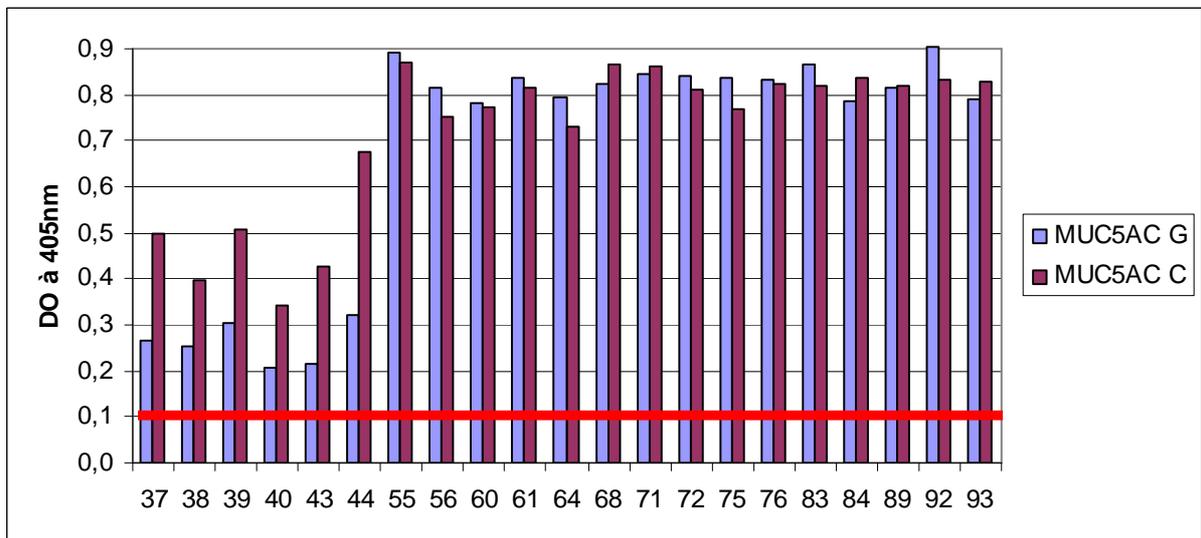
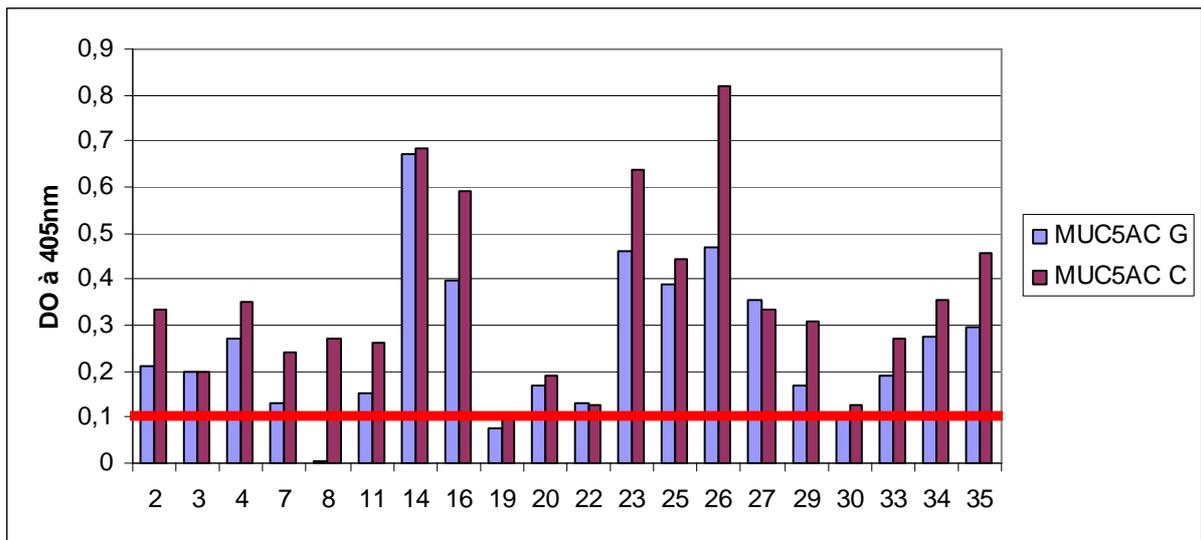


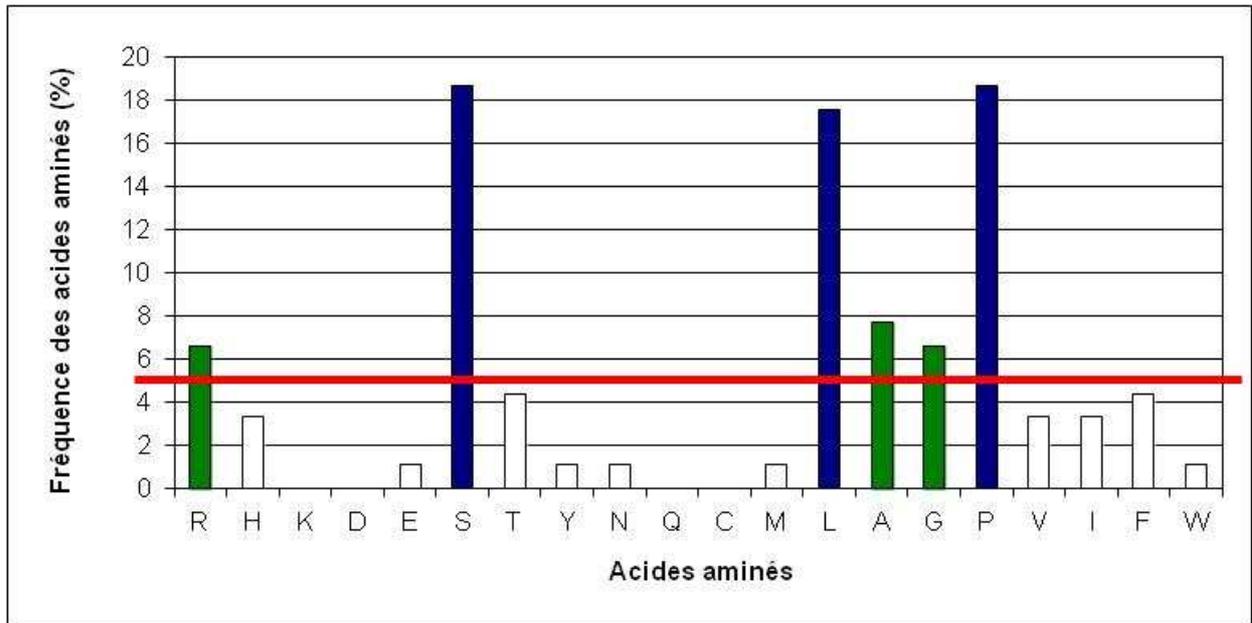
Figure 37 : DO<sub>405nm</sub> des 41 clones se fixant à la MUC5AC colique (MUC5AC C) et à la MUC5AC gastrique (MUC5AC G). 36 clones sont retenus (2, 4, 7, 8, 11, 14, 16, 23, 25, 26, 27, 29, 33, 34, 35, 37, 38, 39, 40, 43, 44, 55, 56, 60, 61, 64, 68, 71, 72, 75, 76, 83, 84, 89, 92 et 93).

## ▪ Séquençage peptidique

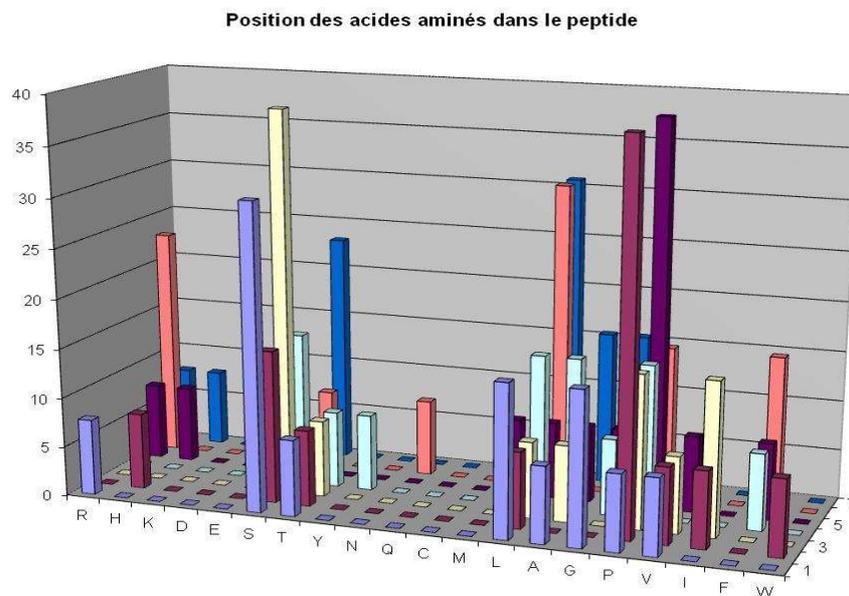
Tableau 10 : Séquences peptidiques des 22 clones séquencés, leur P (probabilité que la bibliothèque contienne au moins une de ces séquences peptidiques), leur pI et leur temps de ½ vie plasmatique théorique (d'après [www.expasy.ch](http://www.expasy.ch), protparam).

Clone	P (K>0) %	½ vie plasmatique théorique (heure)	pI
7	99	30	5,52
16	100	4,4	5,57
25	99	1	9,76
27	97	5,5	9,75
33	100	5,5	9,75
34	100	1,9	5,24
35	97	100	9,73
37	99	7,2	6,40
38	98	1,9	9,47
39	37	1,9	5,24
44	98	1,9	5,24
55	100	>20	5,95
56	100	>20	5,95
60	100	>20	5,95
61	100	>20	5,95
64	100	>20	5,95
72	100	>20	5,95
83	100	>20	5,95
84	100	>20	5,95
89	100	>20	5,95
92	100	>20	5,95
93	95	30	6,00

Sur les 36 clones séquencés, 7 clones sont des phages M13 sans insert (2, 4, 8, 11, 29, 40 et 43), 7 possèdent un insert ne correspondant pas à un heptapeptide (14, 23, 26, 68, 71, 75 et 76) et 22 ont été séquencés avec succès (7, 16, 25, 27, 33, 34, 35, 37, 38, 39, 44, 55, 56, 60, 61, 64, 72, 83, 84, 89, 92, 93). Sur ces 22 clones, 13 inserts peptidiques différents ont été identifiés, puisque l'un des inserts a été retrouvé sur 9 clones différents (Tableau 10). On constate l'enrichissement de la bibliothèque par une séquence après le 3<sup>ème</sup> round de sélection pour les clones 55, 56, 60, 61, 64, 72, 83, 84, 89 et 92. Cette séquence, tout comme les autres, possède majoritairement des acides aminés apolaires (Glycine, Alanine, Proline et Leucine). Par ailleurs, plusieurs acides aminés sont bien représentés dans l'ensemble des séquences : la Sérine, la Proline, la Leucine et dans une moindre mesure la Glycine l'Alanine et l'Arginine. La Proline est plus retrouvée aux positions 2 et 5, la Sérine aux positions 1 et 3 et la Leucine aux positions 6 et 7 (Figures 38A et 38B).



(A)



(B)

Figures 38 : (A) Fréquence des acides aminés contenus dans les heptapeptides exprimés par les phages sélectionnés. La ligne rouge représente la valeur moyenne. (B) Fréquence des acides aminés à chaque position de l'heptapeptide.

- **Mesure du  $K_d$  des phages vis-à-vis de MUC5AC colique et gastrique**

Le  $K_d$  a été estimé sur les 13 clones différents dans le but d'identifier le ou les clones les plus spécifiques pour la cible. Pour le peptide retrouvé à plusieurs reprises, un seul clone a

été amplifié (le clone 60). Un total de 40 amplifications aura été nécessaire afin d'estimer le  $K_d$  de chacun des 13 clones sur la MUC5AC colique et gastrique. Pour chaque constante 12 puits de MUC5AC colique et 12 puits de MUC5AC gastrique à 60,2 $\mu$ g/mL et 12,5 $\mu$ g/mL respectivement sont recouverts. Les séquences peptidiques désignées clone 60 et clone 93 ont respectivement un  $K_d$  de 3,25x10<sup>-10</sup> M et de 1,05x10<sup>-9</sup> M pour la cible et de 5,13x10<sup>-11</sup> M et 1,27x10<sup>-9</sup> M pour MUC5AC gastrique, ce qui en font les clones les plus affins pour les deux MUC5AC. Par ailleurs, on peut constater que tous les clones, sauf 93 et 39, ont une meilleure affinité vis-à-vis de la MUC5AC gastrique (Figure 39). L'ensemble des graphiques qui ont servi au calcul des  $K_d$  sont présentés en annexe 1.

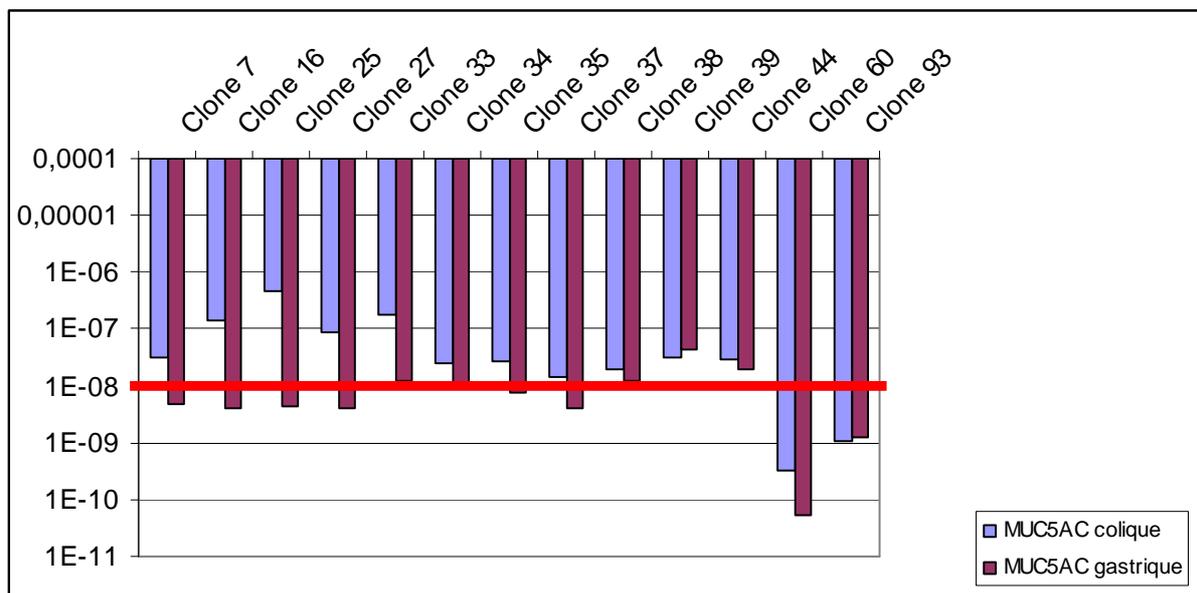


Figure 39 : Valeurs des  $K_d$  déterminées pour chacun des 13 clones. On constate que les clones 60 et 93 ont les meilleures affinités pour MUC5AC gastrique et MUC5AC colique.

### ▪ Synthèse peptidique

Les séquences peptidiques du clone 60 et du clone 93 ont été synthétisées par la société Polypeptide group (France) sous formes circulaire et linéaire (sans les cystéines) couplées à la biotine (linker 8-amino-3,6-dioxaocytanoyl) qui permettra de révéler leur fixation sur les modèles *in vitro/ex vivo*.

### ▪ Sélection du meilleur agent de blocage pour tester les peptides en ELISA

Les peptides ont préalablement été testés avec différents agents de blocage sans la cible. Nous avons utilisé comme agents de blocage de la BSA 0,1%, du lait 0,1%, de la

gélatine de poisson à 0,1%, du PFBB et l'association de ces différents agents (Figure 40). On peut constater que le mélange présentant le moins de bruit de fond est l'association PFBB+lait 0,1%. Nous utiliserons donc pour la suite des manipulations ce dernier.

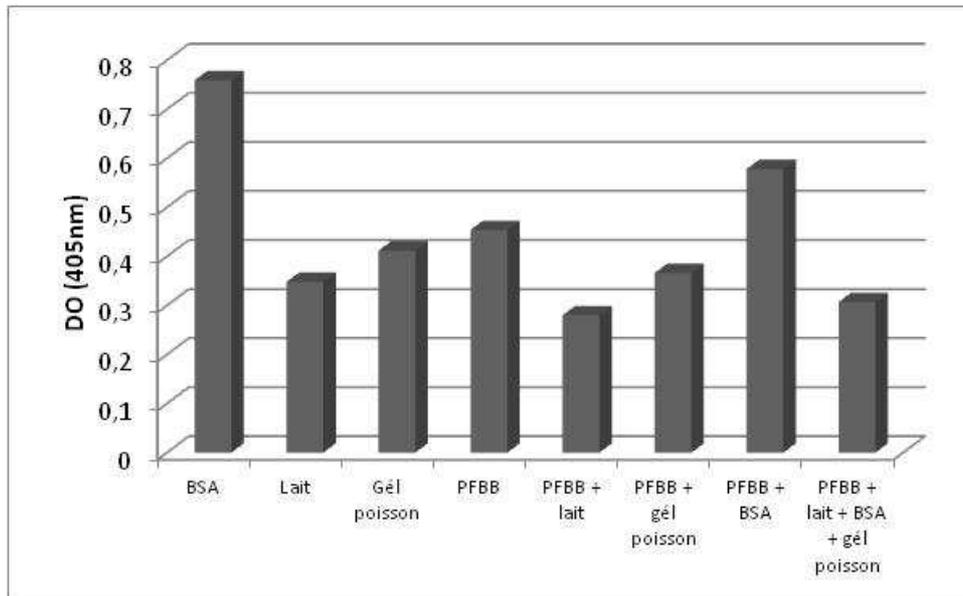


Figure 40 : Test de différents agents de blocage.

### ▪ **Mesure du $K_d$ des peptides vis-à-vis de MUC5AC gastrique**

Le calcul du  $K_d$  a été réalisé à partir de la même préparation de MUC5AC gastrique et dans les mêmes conditions employées durant la sélection des clones. Les modifications du protocole sont le remplacement des anticorps anti-phage par un anticorps anti-biotine de chèvre (1/1000), suivi après lavage d'un anticorps anti-chèvre couplé à la peroxydase (dilution 1/10 000). On constate que le peptide 60 circulaire (60C) présente le  $K_d$  le plus affiné pour la mucine (Figures 41 et 42).

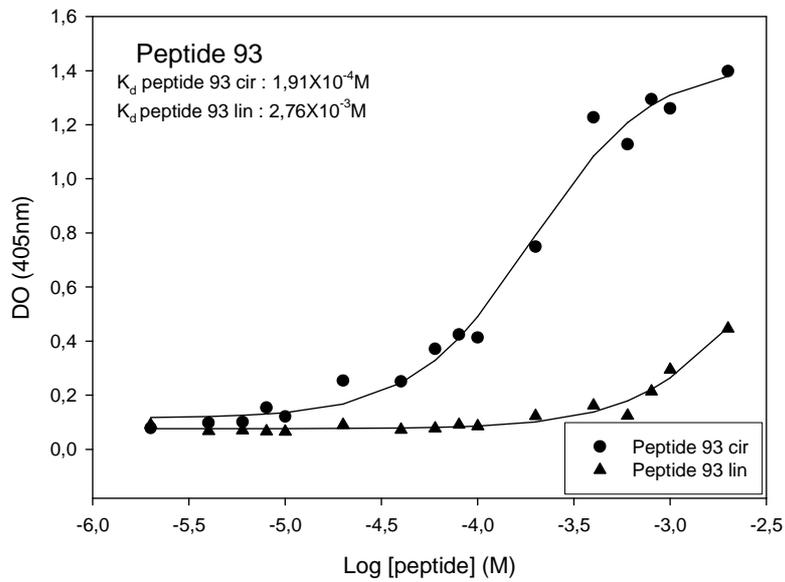
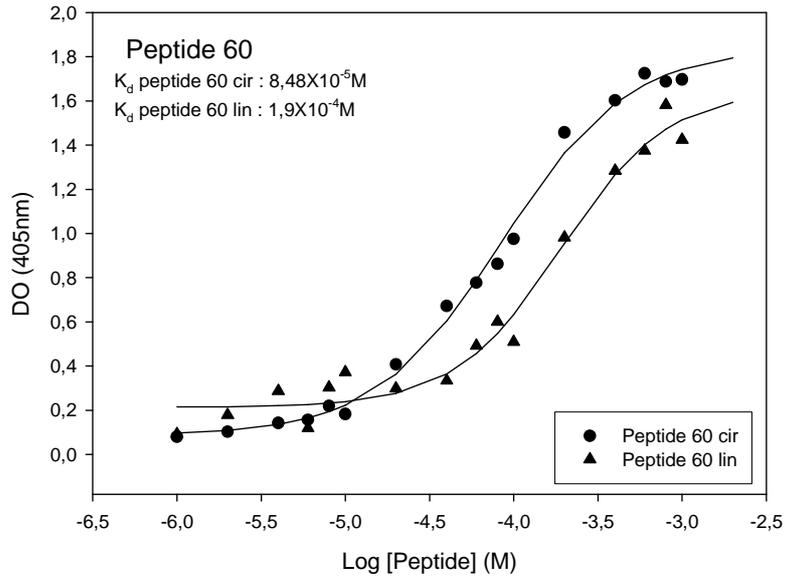


Figure 41 : Courbes de titration ayant servi au calcul de  $K_d$  pour chaque peptide vis-à-vis de MUC5AC gastrique humaine.

Peptides	Circulaire	Linéaire
Clone 60	$8,48 \cdot 10^{-5} \text{ M}$	$1,90 \cdot 10^{-4} \text{ M}$
Clone 93	$1,91 \cdot 10^{-4} \text{ M}$	$2,76 \cdot 10^{-3} \text{ M}$

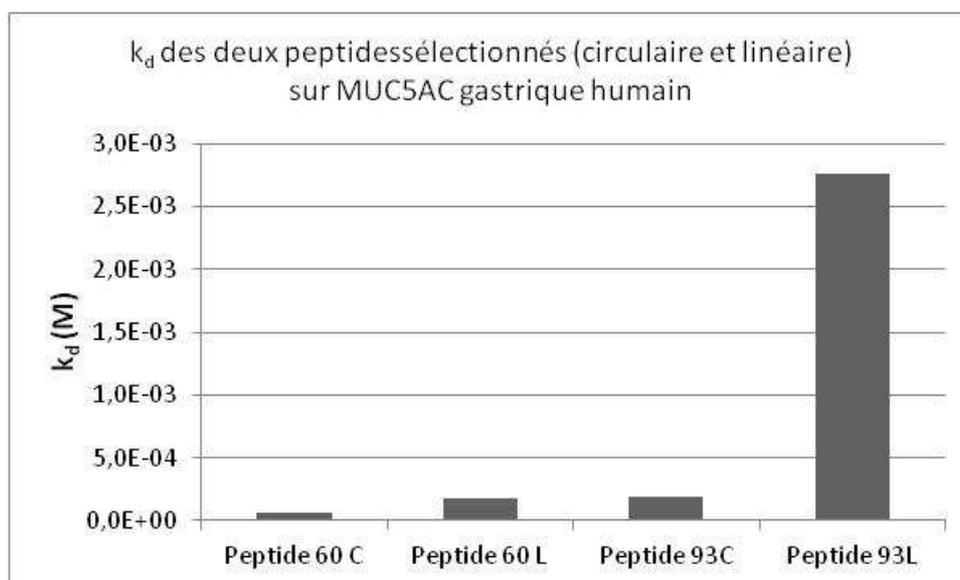


Figure 42 : K<sub>d</sub> des peptides 60 et 93 circulaires et linéaires calculés sur MUC5AC gastrique humaine.

### ▪ Mesure du K<sub>d</sub> des peptides vis-à-vis de MUC5AC et MUC2 colique humaines

Le calcul du K<sub>d</sub> a été réalisé à partir de la même préparation de MUC5AC colique et dans les mêmes conditions employées durant la sélection des clones. Seul le peptide 60C a été testé, car il semble être le plus prometteur et la quantité de MUC5AC colique restante est insuffisante pour multiplier les essais sur plusieurs peptides. On constate (Figure 43) que le K<sub>d</sub> du peptide 60C sur MUC5AC colique est très proche de celui trouvé sur MUC5AC gastrique, ce qui nous laisse à penser que les peptides 93 (C et L) ainsi que le peptide 60C ont des comportements similaires pour MUC5AC gastrique et MUC5AC colique humaines. Concernant MUC2, préalablement purifiée à partir de polypes de patients, aucun peptide a été capable d'y adhérer.

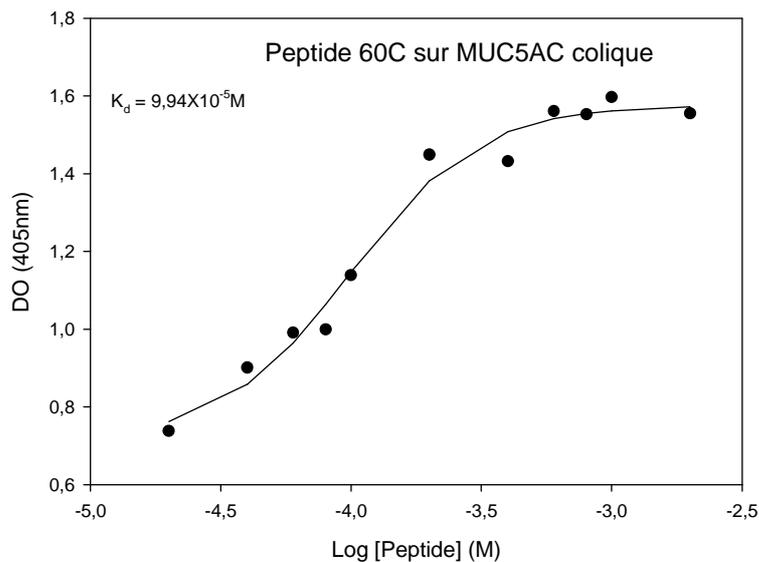


Figure 43 : Courbes de titration ayant servi au calcul de  $K_d$  pour le peptide 60C vis-à-vis de MUC5AC colique humain.

### ▪ Expression de MUC5AC par les modèles cellulaires

Les lignées HT29-5M21 et HCT116 ont été cultivées durant 3 semaines et de 7 à 15 jours respectivement. Ce temps est nécessaire pour que la lignée HT29-5M21 exprime la mucine MUC5AC (Lesuffleur *et al*, 1998), tandis que la lignée HCT116 se décolle après 15 jours de culture. La PCR met en évidence que, quel que soit le nombre de jours passés en culture, la lignée HCT116 n'exprime pas MUC5AC contrairement à la lignée HT29-5M21 (Figure 44). La taille de l'amplicon correspond à la taille attendue de 400 paires de bases (pb) comme l'indique le témoin de masse (M). Parallèlement à cela la présence de GAPDH a été testée dans les mêmes échantillons comme témoin positif (non montré).

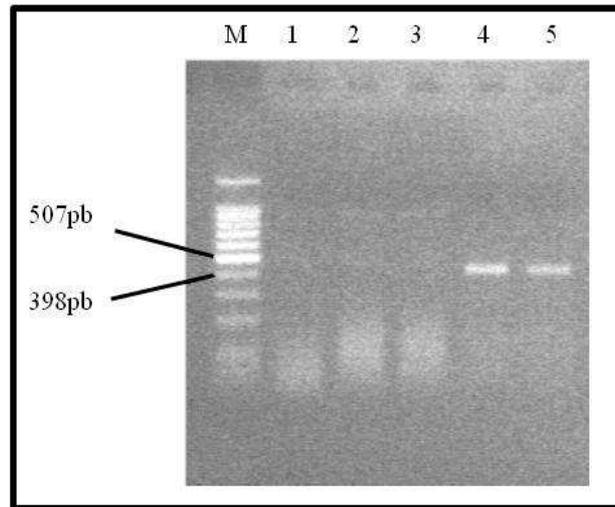


Figure 44 : Résultat de la RT-PCR après électrophorèse en gel d'agarose. Chaque échantillon déposé correspond à une culture indépendante, le dépôt 1 correspond à la lignée HCT116 à 7 jours de culture, les dépôts 2, 3 pour HCT116 à 12 jours et 4 et 5 pour la lignée HT29 5M21 à 21 jours de culture.

#### ▪ **Mesure du $K_d$ sur cellules HT29-5M21 et HCT116**

Le calcul du  $K_d$  a été réalisé sur des cellules HT29-5M21 cultivées 3 semaines et HCT116 cultivées 7 jours. Parallèlement au calcul du  $K_d$ , les cellules ont été testées à l'aide d'anticorps anti-MUC5AC et anti-MUC2. Nous avons uniquement testé les peptides 60C et 93C (Figure 45). On constate que sur les cellules HT29-5M21, le  $K_d$  du peptide 60C est comparable aux  $K_d$  calculés sur MUC5AC colique et MUC5AC gastrique humaine. Par ailleurs, on peut constater que la densité optique observée sur les cellules HT29 est plus faible que lors des autres essais. Ceci peut s'expliquer par l'instabilité des mucines sur les cellules et le manque de robustesse de la mesure du  $K_d$  directement sur cellules. Concernant le peptide 93C, on constate une DO très légèrement inférieure à celles observées précédemment ainsi qu'un  $K_d$  identique à celui déterminé sur MUC5AC gastrique humaine. Concernant les cellules HCT116, il n'y a aucune fixation du peptide 60C alors que le peptide 93C se lie avec un  $K_d$  comparable à celui obtenu sur les cellules HT29-5M21. **Ceci suggère une très bonne spécificité du peptide 60C, mais une mauvaise pour le peptide 93C.**

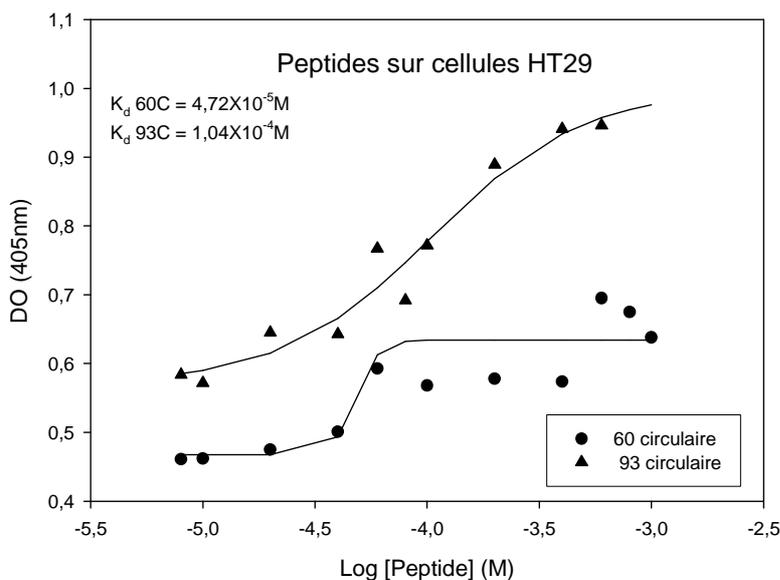


Figure 45 : Courbes de titration ayant servi au calcul de  $K_d$  pour les peptides circulaires vis-à-vis des cellules HT29.

### ▪ Mesure du $K_d$ des peptides sur MUC5AC gastrique de rat et souris

Le peptide 93C est plus affiné vis-à-vis des Muc5ac de souris et de rat que sur MUC5AC humaine (Figure 46), et ce, contrairement au peptide 60C. Ceci laisse penser que les peptides 60 et 93 n'ont pas la même spécificité de ciblage vis-à-vis de MUC5AC. En effet, les mucines gastriques de rat et souris utilisées dans ce test ont été moins purifiées (mélange de MUC5AC et MUC6) que les mucines humaines gastriques et coliques. La quantité réelle de MUC5AC coatée sur la plaque de microtitration est donc plus faible, ce qui peut justifier une affinité plus faible.

Le peptide 60C est le plus spécifique de la MUC5AC humaine qui est notre cible. On peut supposer que la reconnaissance des motifs de MUC5AC par les deux peptides est très fine puisque les valeurs de  $K_d$  varient d'un facteur 10 entre les mucines humaines et animales qui ont 60% d'homologie (d'après le site web [www.ExPASy.org](http://www.ExPASy.org)) dans leur séquence primaire en acides aminés.

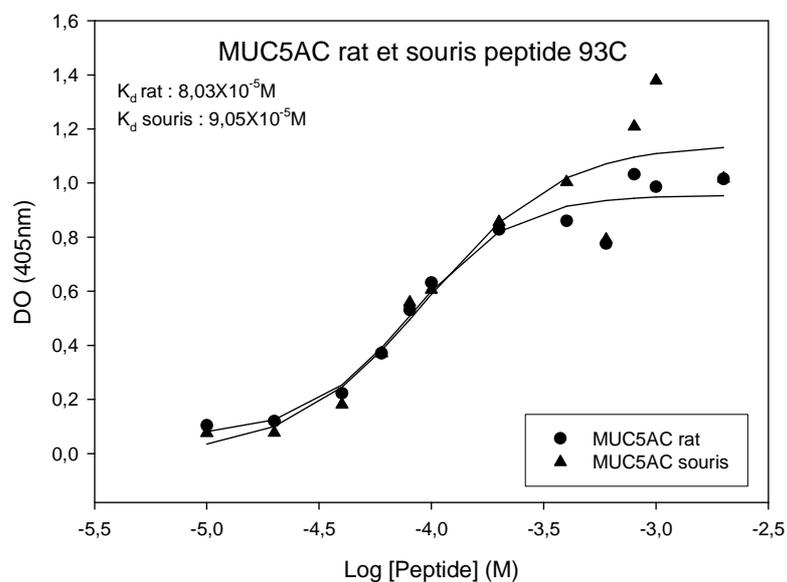
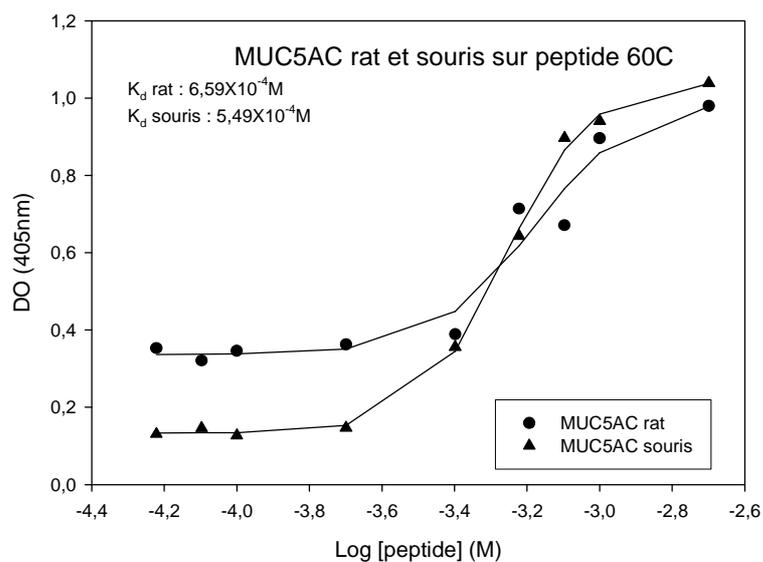


Figure 46 : Courbes de titration ayant servi au calcul de  $K_d$  pour les peptides circulaires vis-à-vis des mucines gastriques de rat et de souris.

▪ **Récapitulatif des différentes valeurs de  $K_d$  des différents peptides**

Peptide	MUC5AC gastrique humaine	MUC5AC colique humaine	HT29 5M21 à 3 semaines de culture	MUC5AC gastrique rat	MUC5AC gastrique souris
<b>60C</b>	$8,48.10^{-5}M$	$9,94.10^{-5}M$	$4,72.10^{-5}M$	$6,59.10^{-4}M$	$5,49.10^{-4}M$
<b>60L</b>	$1,9.10^{-4}M$	NC	Pas de réaction	NC	NC
<b>93C</b>	$1,9.10^{-4}M$	NC	$1,04.10^{-4}M$	$8,03.10^{-5}M$	$9,05.10^{-5}M$
<b>93L</b>	$2,76.10^{-3}M$	NC	NC	NC	NC

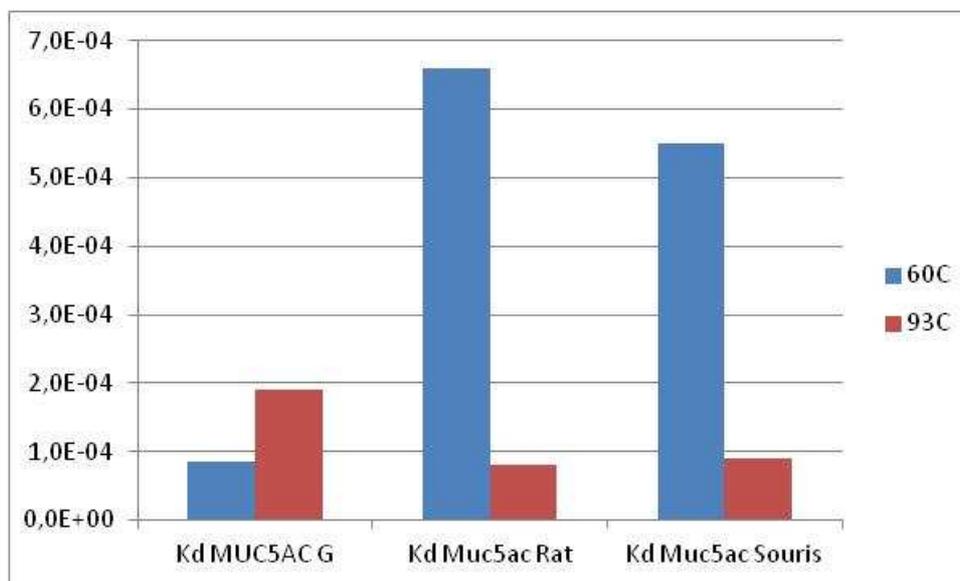


Figure 47 : Récapitulatif des affinités des différents peptides. Chaque  $K_d$  a été calculé au minimum deux fois et de façon indépendante donnant à chaque essai des valeurs très proches ou identiques.

## ▪ Spécificité des peptides sur coupes de tissus humains

Les différents peptides sont incubés directement sur des tissus gastriques et coliques humains. Les figures 48, 49, 50 et 51 montrent les résultats obtenus pour les marquages histochimiques des différentes coupes.

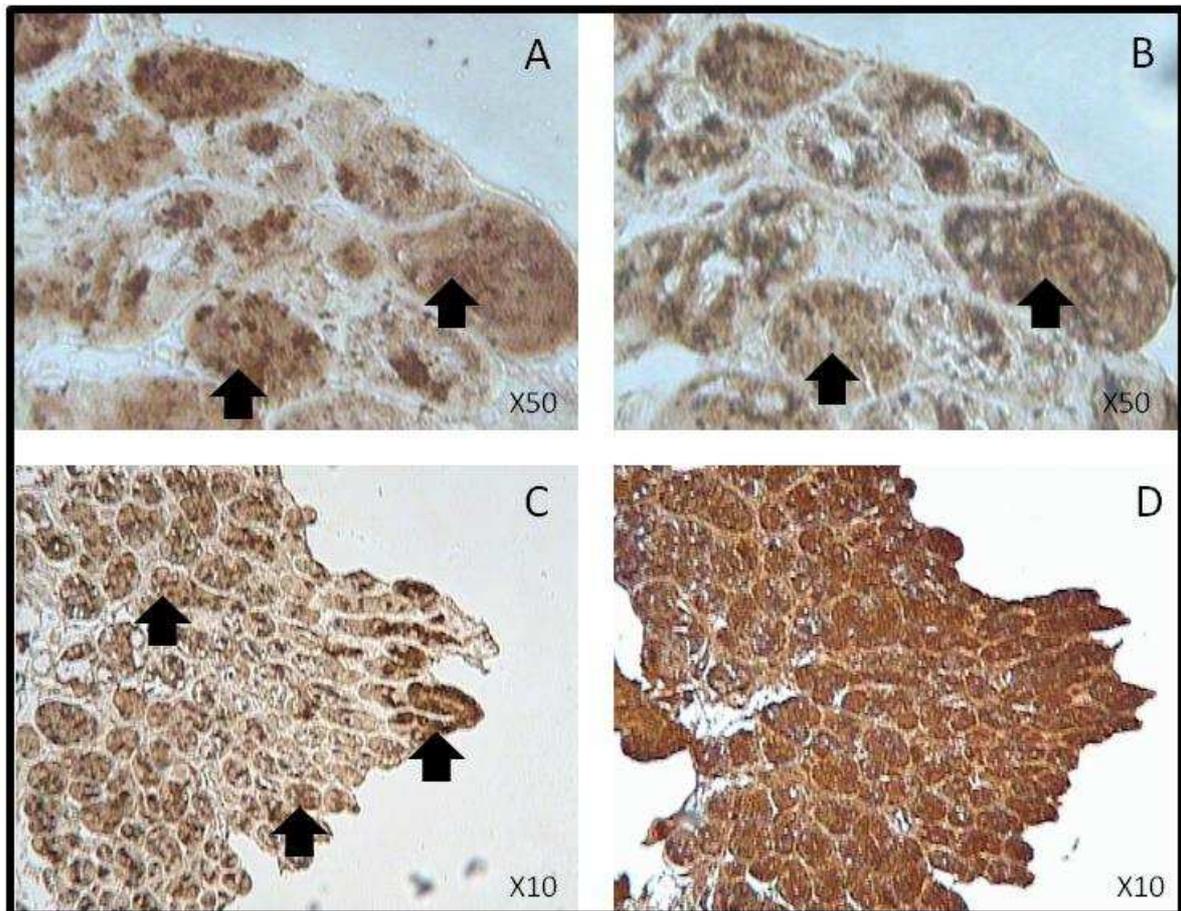


Figure 48 : Marquage de coupes d'épithélia gastriques sains à l'aide du **peptide 60C biotinylé** à la concentration de 20  $\mu\text{M}$  (A), d'anticorps monoclonaux anti-MUC5AC, (PM8) (B). Visualisation des vacuoles de sécrétions (Flèches) par le peptide 60C et l'anticorps anti-MUC5AC. Marquage de coupes d'épithélia gastriques sains humains à l'aide d'anticorps monoclonaux anti-MUC5AC, (PM8) (C) et à l'aide du **peptide 93C biotinylé** à la concentration de 10  $\mu\text{M}$  (D). Le peptide 93C marque l'ensemble du tissu, en comparaison l'anticorps anti-MUC5AC marque les glandes désignées par des flèches sur la figure C.

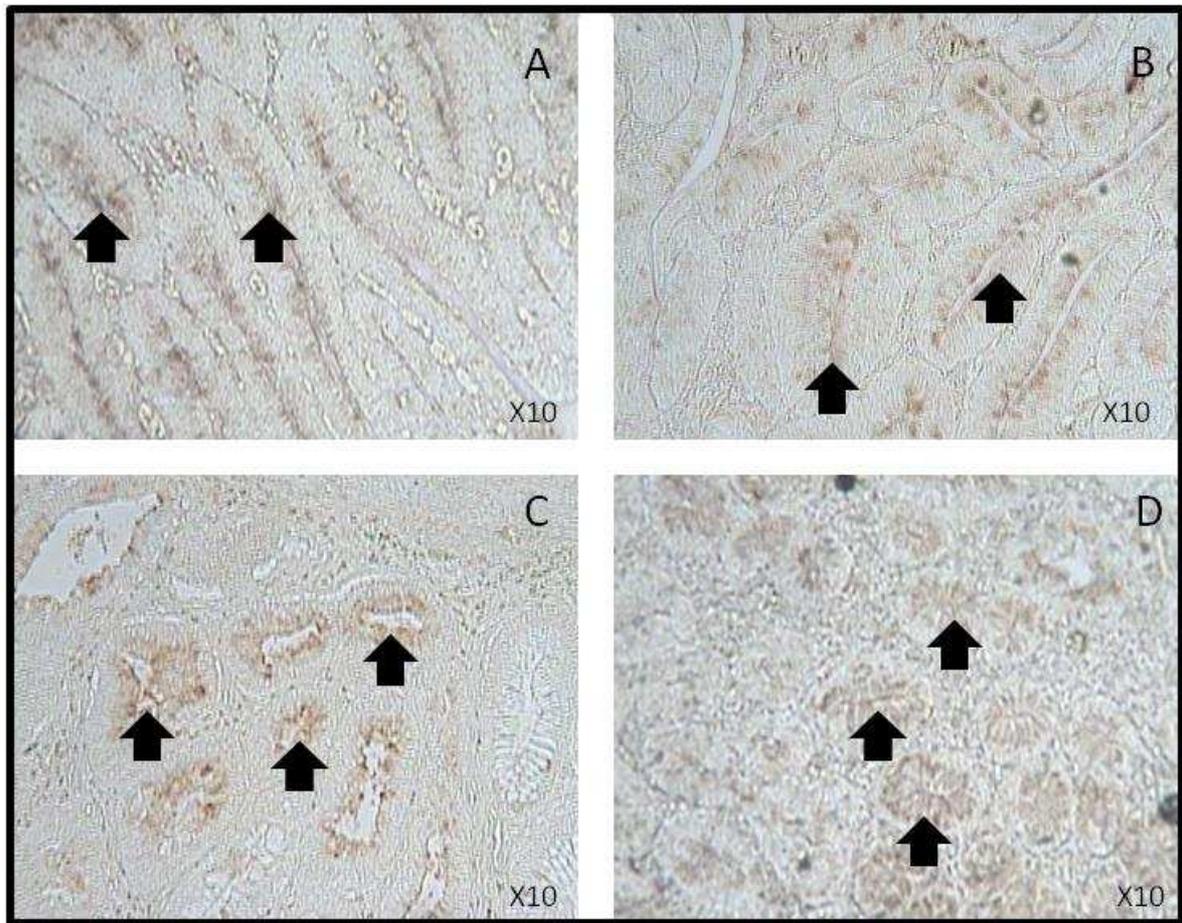


Figure 49 : Marquage de coupes d'adénomes coliques à l'aide du peptide 60C à la concentration de 20  $\mu$ M, sur cryptes coupées de façon longitudinale (A), d'anticorps monoclonaux anti-MUC5AC, (PM8), sur cryptes coupées de façon longitudinale (B), d'anticorps monoclonaux anti-MUC5AC, (PM8), sur cryptes coupées de façon transversale (C) et à l'aide du **peptide 60C biotinylé** à la concentration de 20  $\mu$ M, sur cryptes coupées de façon transversale (D). Le marquage des glandes est désigné par des flèches.

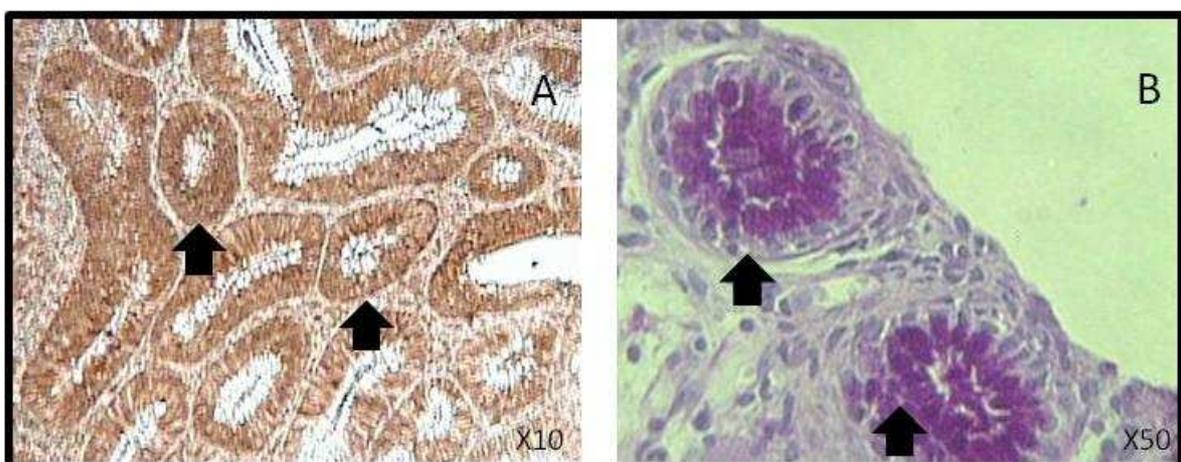


Figure 50 : Marquage de coupes d'adénomes coliques à l'aide d'anticorps monoclonaux anti-MUC2, (LUM2-3) (A) et d'un réactif révélant les mucines en rose (Periodic Acid Schiff stain : PAS ; coloration en rose) en ciblant leurs glycanes, sur cryptes coupées de façon transversale (B). Le marquage des glandes est désigné par des flèches.

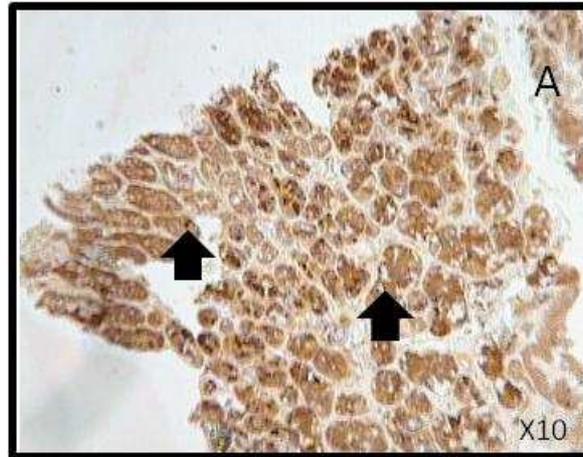


Figure 51 : Marquage d'une coupe d'épithélium gastrique sain à l'aide du **peptide 60L biotinylé** à la concentration de 20  $\mu\text{M}$  (A). Absence de marquage à la concentration de 10  $\mu\text{M}$ . Le marquage des glandes est désigné par des flèches.

#### Tableau récapitulatif des observations immunohistochimiques

Peptide	Epithélium gastrique humain sain	Adénome colique humain
<b>60C</b>	Bon marquage à différentes concentrations en peptide (20 $\mu\text{M}$ , 10 $\mu\text{M}$ , 1 $\mu\text{M}$ , 0,2 $\mu\text{M}$ et 0,04 $\mu\text{M}$ ) sauf pour les deux dernières concentrations où la réponse est assez faible. Marquage identique avec les anticorps anti-MUC5AC (coupes sériées).	Bon marquage sur les deux concentrations testées (20 $\mu\text{M}$ et 10 $\mu\text{M}$ ). Pas de coupes sériées disponibles mais marquage identique à celui observé avec les anticorps anti-MUC5AC.
<b>60L</b>	Absence de marquage à 10 $\mu\text{M}$ . Présence d'un marquage comparable à celui observé avec le 60C à la concentration de 20 $\mu\text{M}$ .	Non réalisé
<b>93C</b>	<b>Marquage non spécifique</b> : le peptide réagit sur toute la coupe.	Même constat que sur l'épithélium gastrique

#### ▪ **Synthèse des produits de contraste**

Le peptide a été greffé à des particules superparamagnétiques appelées USPIO (Ultra Small Particle Iron Oxide) qui sont des nanoparticules d'oxyde de fer. La particule seule sera désignée sous l'appellation P3007 et la particule greffée au peptide 60C P3667.

## ▪ Capture des USPIO sur modèles cellulaires

Différents temps d'incubation des cellules, après mise en contact avec les USPIO, ont été testés. La concentration en USPIO est déterminée par mesure de la relaxométrie. Lorsque l'on compare 3 temps d'incubation des figures 52, 53 et 54, on peut constater que le temps de mise en contact optimal est à 1 heure d'incubation. En effet, après deux heures d'incubation, la composante spécifique de l'interaction est proche de l'aspécifique comme on peut le constater sur la figure 52 pour les cellules MUC5AC positives (HT29 5M21) puisque la relaxivité due à l'USPIO P3007 est proche de celle avec l'USPIO P3667. A l'inverse, après une heure d'incubation (Figure 53), seule l'USPIO P3667 se fixe spécifiquement aux cellules MUC5AC positives de façon très nette. On peut également constater qu'une demi-heure (Figure 54) de mise en présence des produits de contraste avec les cellules MUC5AC positives ne permet pas une fixation spécifique de l'USPIO P3667 à MUC5AC à des concentrations inférieures à 8mM.

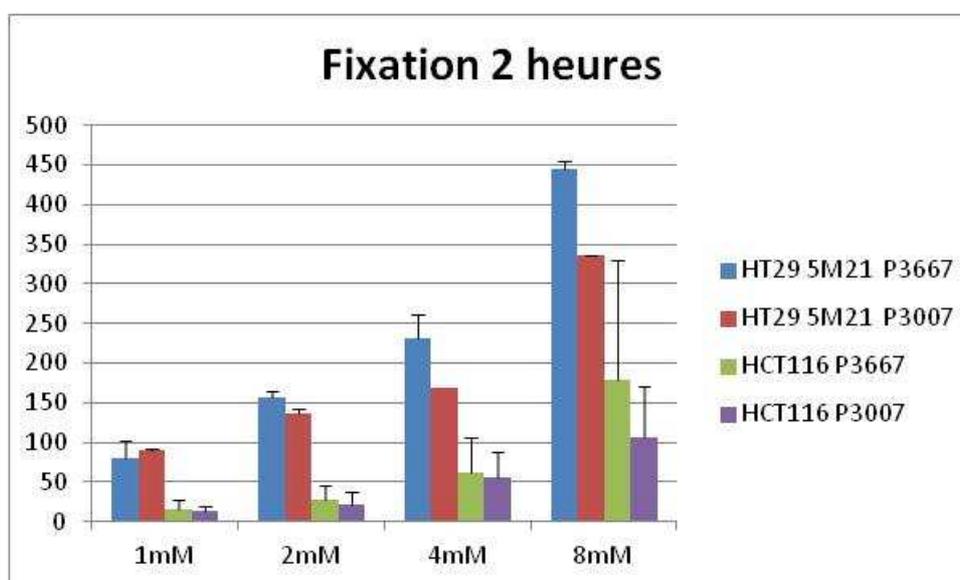


Figure 52 : Dosage de la quantité de fer sur les cellules (HCT116 et HT29 5M21) après mise en contact de 2H des USPIO (P3667 et P3007) par relaxométrie.

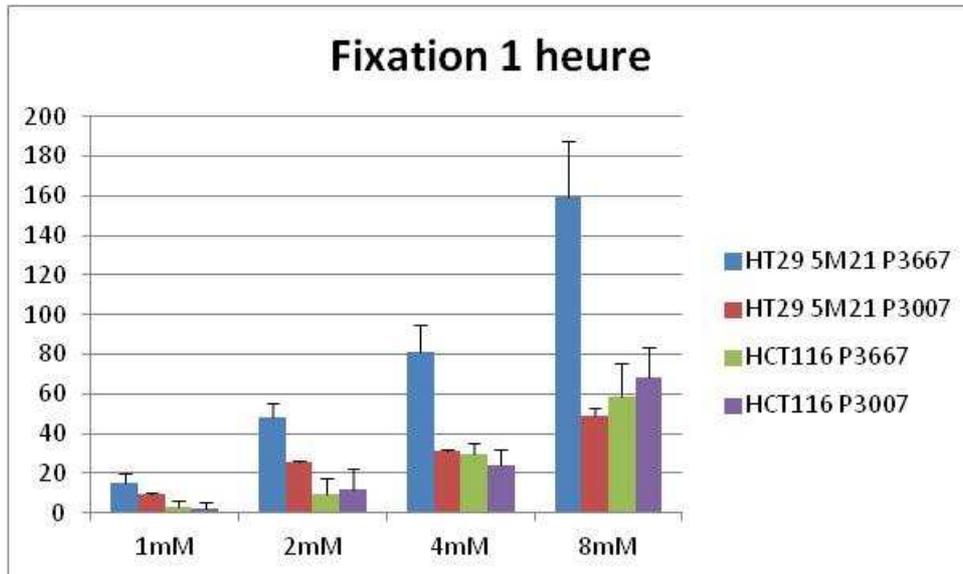


Figure 53 : Dosage de la quantité de fer sur les cellules (HCT116 et HT29 5M21) après mise en contact de 1H des USPIO (P3667 et P3007) par relaxométrie.

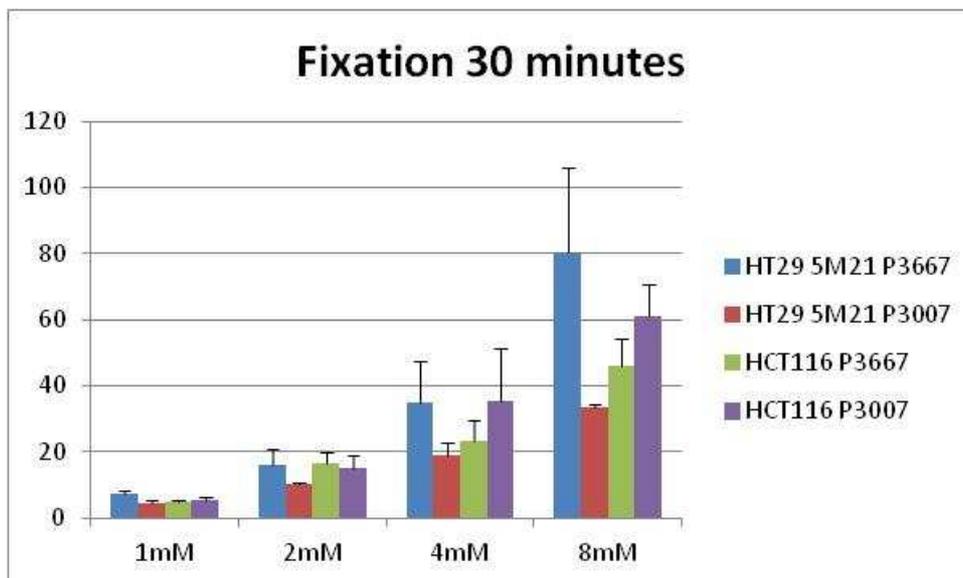


Figure 54 : Dosage de la quantité de fer sur les cellules (HCT116 et HT29 5M21) après mise en contact de 30minutes des USPIO (P3667 et P3007) par relaxométrie.

La quantité de mucines a été déterminée par test ELISA dans les cellules HT29 5M21. Elle s'est avérée constante puisque variant de 48 à 54 $\mu$ g/puits (moyenne pour 36 puits : 51 $\mu$ g/puits), cette précision n'a donc pas une grande incidence sur la variabilité des résultats. Le dosage de MUC5AC pour les cellules HCT116 donne une valeur proche de 0 $\mu$ g/puits.

## ▪ **Modèles animaux de xéno greffe**

Afin de tester le produit de contraste sur modèles animaux, une première série d'animaux avec xéno greffe a été générée pour estimer le nombre de jours nécessaire à la formation d'une tumeur après injection des cellules tumorales HCT116 et HT29 5M21 (Tableau 11) parallèlement à l'expression de MUC5AC. On constate, pour le modèle HT29 5M21 (MUC5AC positif), une différenciation du tissu formant des pseudo-cryptes (Figure 55 C) renfermant la mucine MUC5AC (en marron). A l'inverse, le modèle HCT116 (MUC5AC négatif) ne présente pas de différenciation tissulaire et n'exprime pas ou peu de MUC5AC (Figure 55 D).

Tableau 11 : Descriptif macroscopique de chaque tumeur.

Souris	Lignées	Jours	Longueur (mm)	Largeur (mm)	Profondeur (mm)	vol (mm <sup>3</sup> )
1	HT29 5M21	15	9,4	7,2	4,6	311,3
2	HT29 5M21	15	7,2	4,4	3,8	120,4
3	HT29 5M21	15	6,4	4,1	3,5	91,8
4	HT29 5M21	15	11,9	7,12	4,7	398,2
5	HCT116	15	13,9	8,6	5,4	645,5
6	HCT116	15	13,3	7,8	5,7	591,3
7	HCT116	15	11,6	6,2	3,6	258,9
8	HCT116	15	13,5	6,5	4,4	386,1
9	HCT116	18	11,7	5,7	2	133,4
10	HCT116	18	12,8	10,4	6,3	838,7
11	HCT116	18	14	13,8	10,2	1970,6
12	HCT116	18	15,7	12,1	10,2	1937,7
13	HT29 5M21	25	20	17,8	8,4	2990,4
14	HT29 5M21	25	14,2	11,7	8,8	1462,0
15	HT29 5M21	25	12,4	9,8	6	729,1
16	HT29 5M21	25	11,7	7,9	6	554,6
17	HT29 5M21	35	14,4	10,2	4,5	661,0
18	HT29 5M21	35	13,8	11,7	5,6	904,2
19	HT29 5M21	35	6,1	3	5,1	93,3
20	HT29 5M21	35	9,9	4,6	3,5	159,4

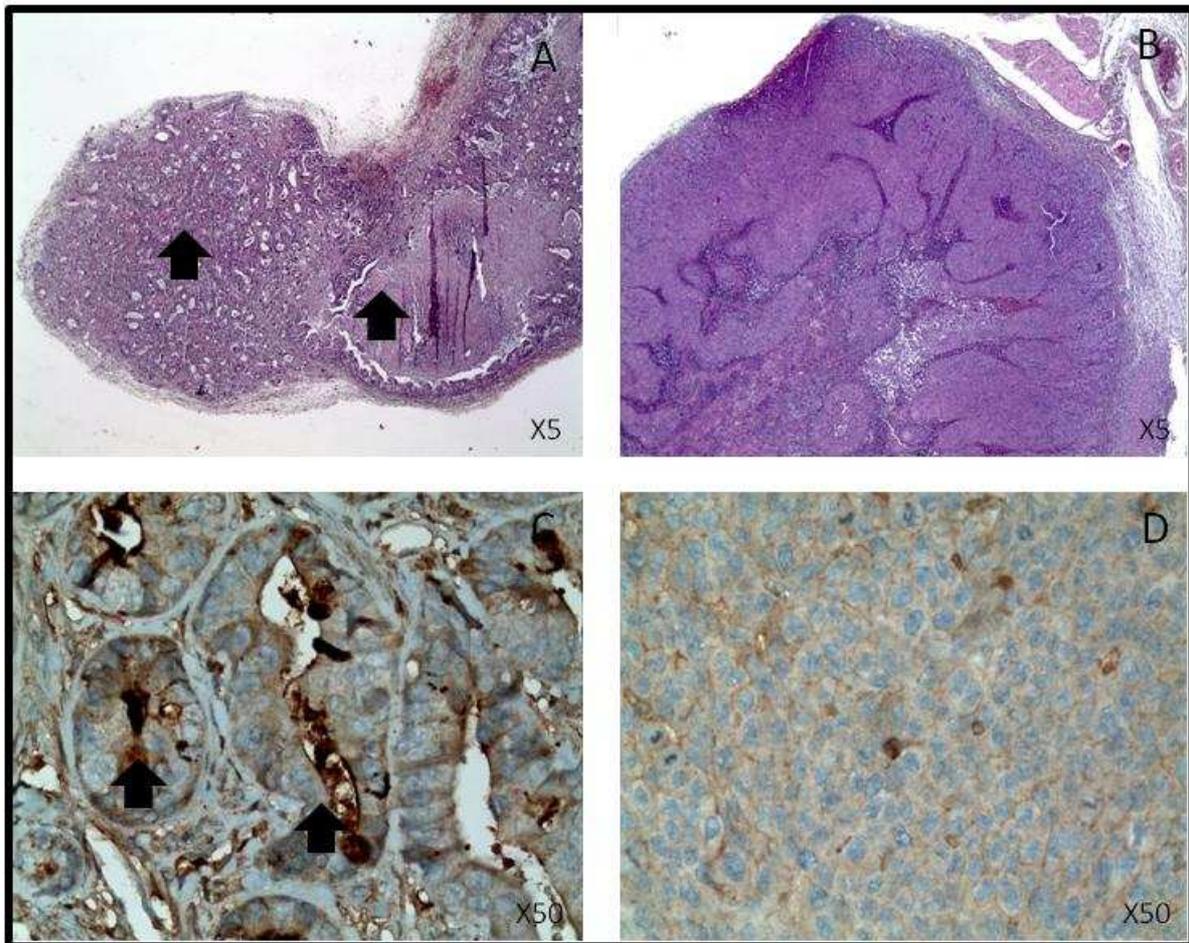


Figure 55 : Caractérisation histologique des xénogreffes du modèle murin, A et B : coloration HES ; C et D coloration DAB avec anticorps anti MUC5AC.

L'étude a également permis de conclure à une utilisation des animaux après quinze jours d'injection des cellules tumorales. En effet, plus les cellules tumorales restent implantées sur l'animal plus la nécrose est importante et donc peut induire des erreurs d'interprétation induite par une fixation non spécifique du produit de contraste aux tissus nécrosés. Ce phénomène est accentué par un ralentissement de la division cellulaire au fil du temps (Figure 56). Par ailleurs, l'évaluation de la vascularisation (par coloration HES) a permis d'observer une localisation en périphérie de la tumeur des vaisseaux et en quantité significative.

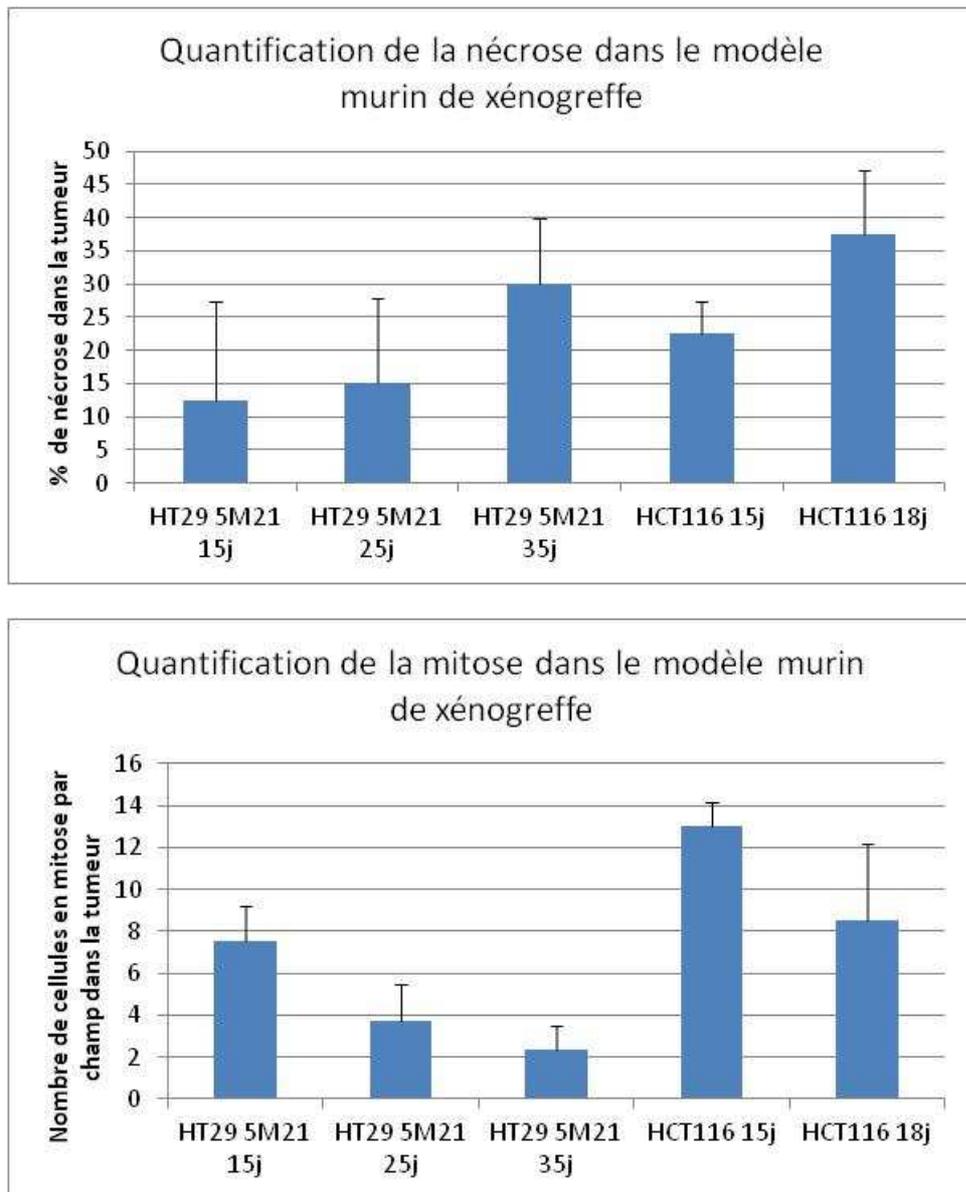


Figure 56 : Evaluations de la nécrose et de la mitose dans les tumeurs HCT116 et HT29 5M21.

## ▪ IRM moléculaire

La souris de la figure 57 possède une tumeur MUC5AC positive et a été injectée avec le produit spécifique (P3667). La souris de la figure 58 possède une tumeur MUC5AC positive injectée avec le produit non greffé au peptide spécifique (P3007). Tandis que la souris de la figure 59 possède une tumeur MUC5AC négative injectée avec le produit spécifique. La tumeur de la figure 57, qui a été traitée avec le produit P3667, apparaît plus sombre et a donc une image en contraste négatif après injection du produit. A l'inverse, la tumeur de la figure 58, qui a été traitée avec le produit P3007, apparaît plus claire et a donc une image en contraste positif avec une forte intensité de pixels. L'effet observé dans la tumeur de la figure 57 n'est pas retrouvé chez la souris de la figure 59 (MUC5AC négative),

puisque l'on n'observe pas de variation de contraste dans la tumeur. L'estomac a également été imagé puisqu'il possède naturellement chez l'Homme et les rongeurs de la mucine MUC5AC. On peut observer après injection du produit spécifique chez les souris des figures 57 et 59 (injectées avec P3667) une zone gastrique en contact avec la lumière qui présente un net assombrissement délimité par le tissu supérieur gastrique. Ce résultat démontre clairement la validité du produit P3667 pour cibler la mucine MUC5AC. En effet, en utilisant le produit spécifique à concentration égale chez des animaux ayant des tumeurs au profil d'expression de MUC5AC, opposé, mais possédant la même caractéristique de sécrétion de mucines dans l'estomac, nous observons clairement une réponse différentielle dans la tumeur mais pas dans l'estomac.

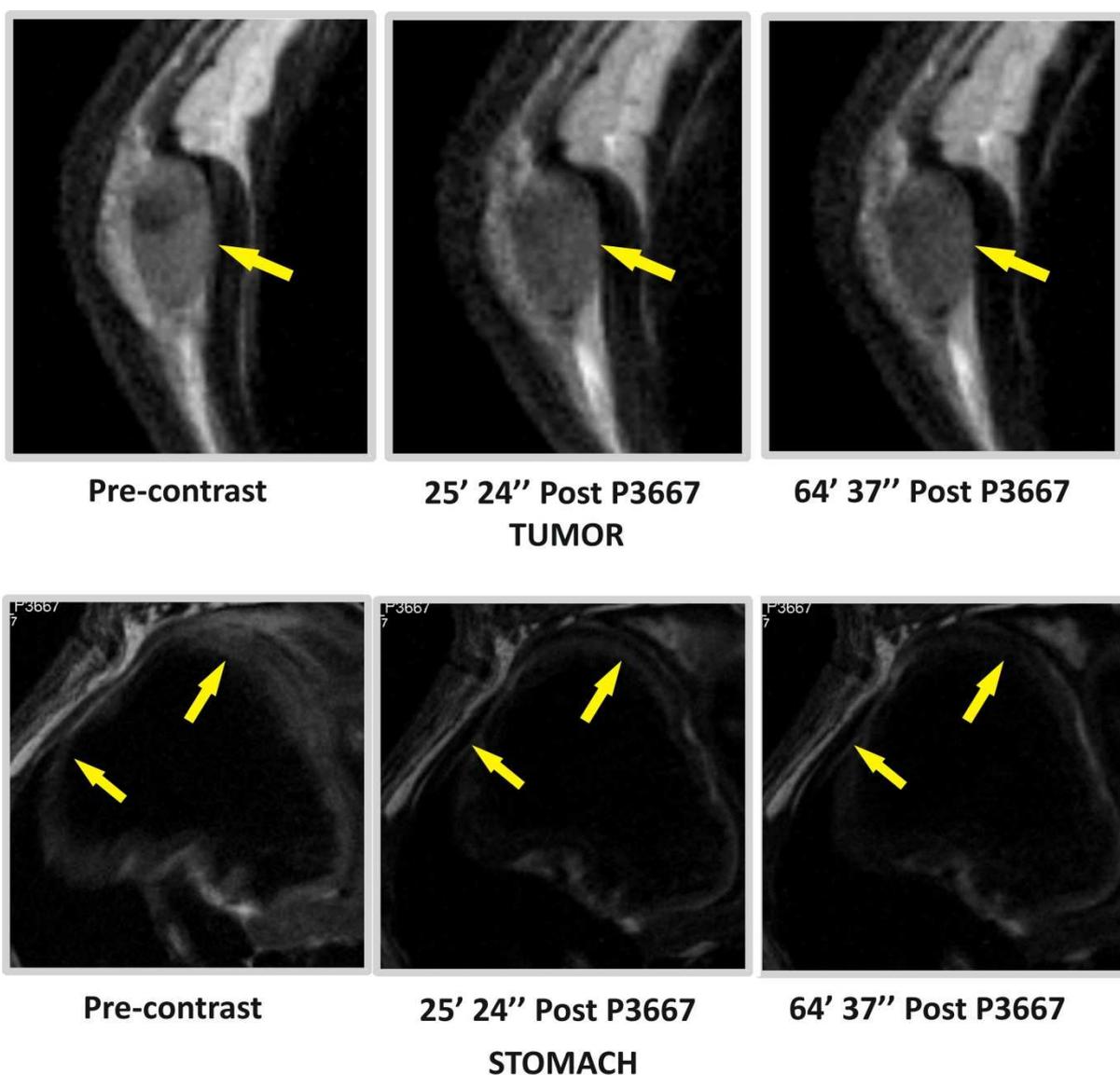


Figure 57 : IRM pré et post contraste sur le modèle cellulaire sécrétant MUC5AC (HT29 5M21) avec le produit spécifique P3667 à  $100\mu\text{mol/kg}$ . Images de la tumeur positive et de l'estomac. Les flèches désignent d'une part la tumeur et d'autre part, la paroi stomacale.

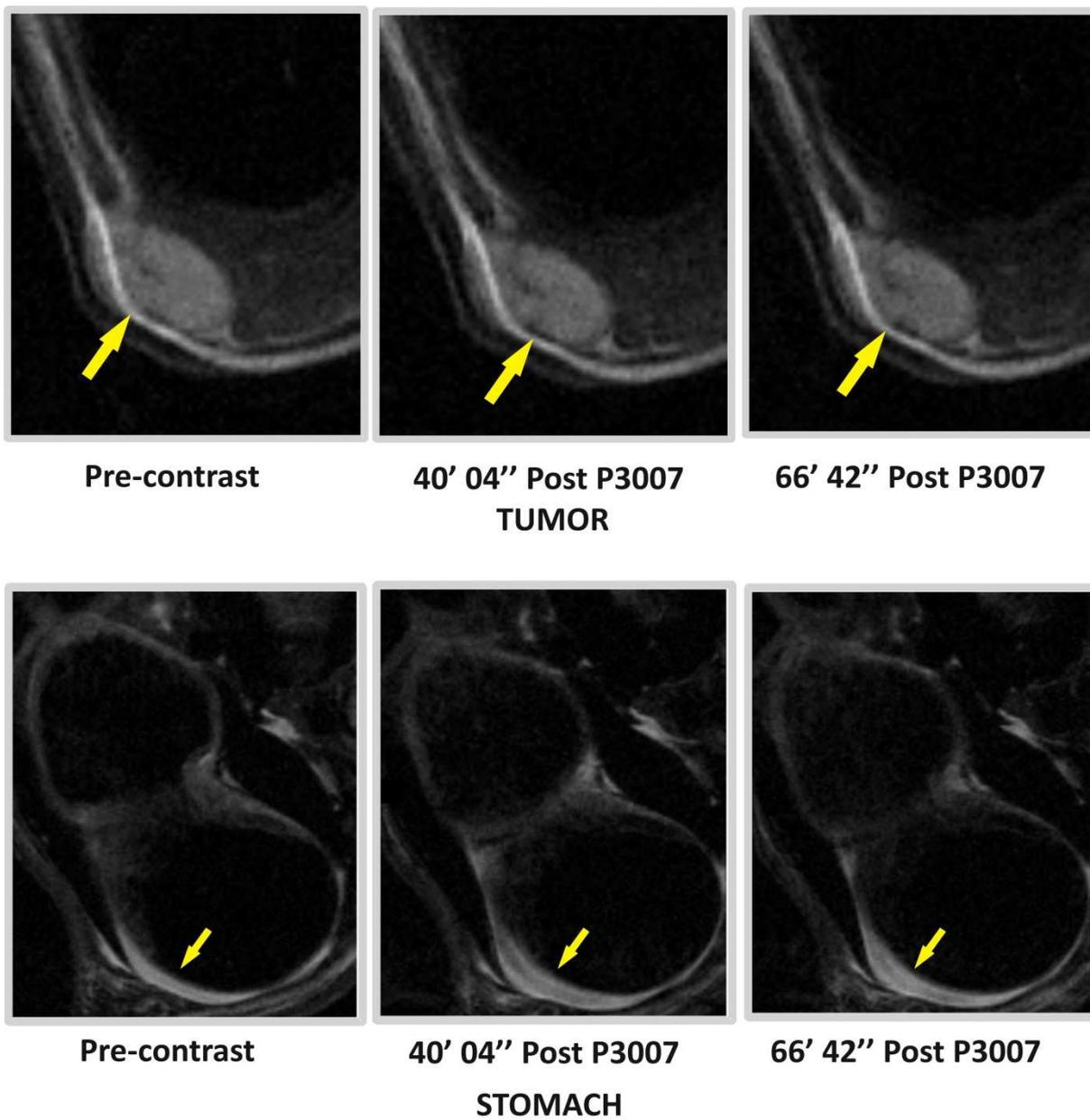


Figure 58 : IRM pré et post contraste sur le modèle cellulaire sécrétant MUC5AC (HT29 5M21) avec le produit non spécifique P3007 à 100 $\mu$ mol/kg. Images de la tumeur positive et de l'estomac. Les flèches désignent d'une part la tumeur et d'autre part, la paroi stomacale.

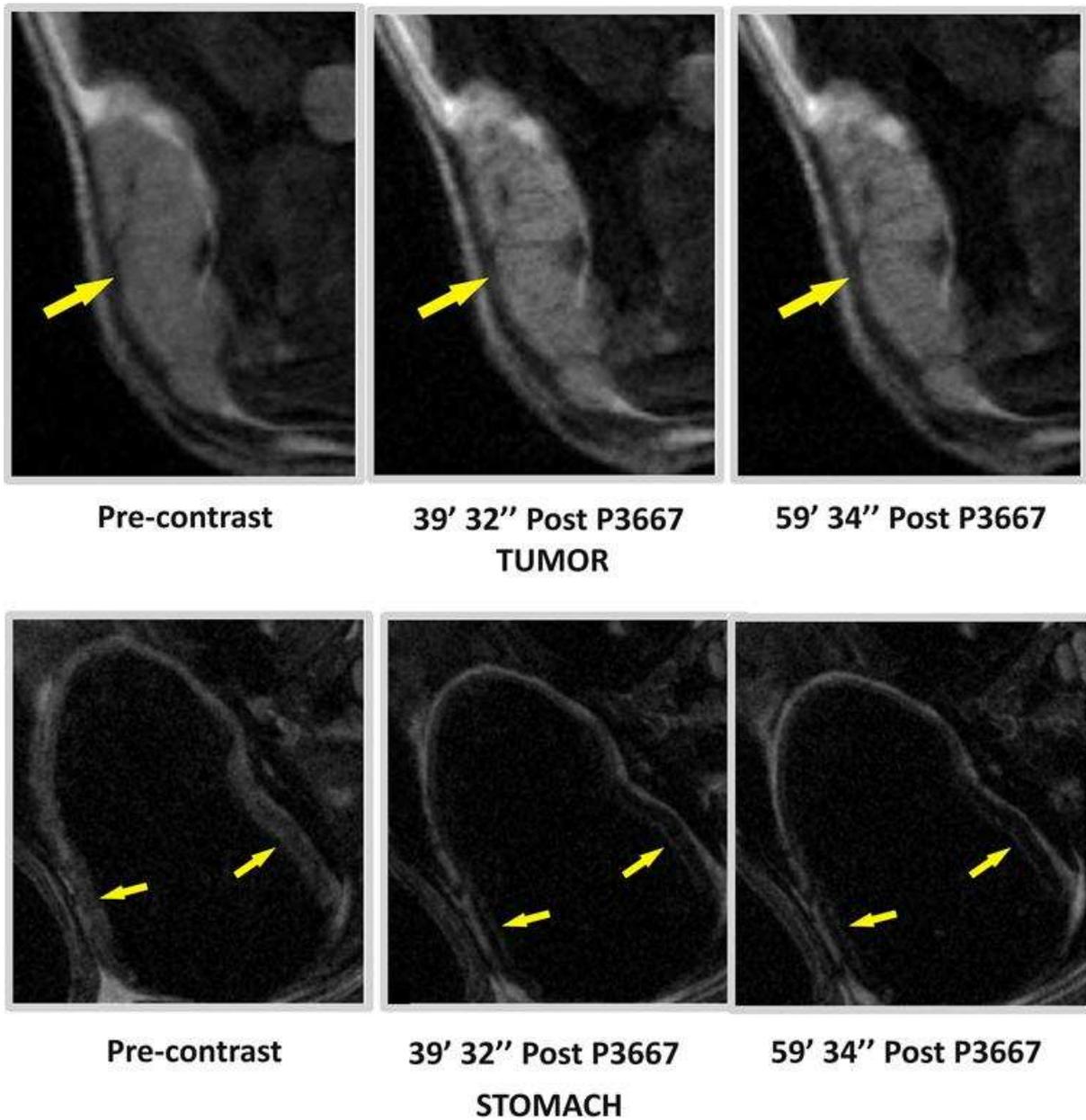


Figure 59 : IRM pré et post contraste sur le modèle cellulaire ne sécrétant pas MUC5AC (HCT116) avec le produit spécifique P3667 à 100 $\mu$ mol/kg. Images de la tumeur MUC5AC négative et de l'estomac. Les flèches désignent d'une par la tumeur et d'autre part, la paroi stomacale.

L'imagerie IRM sur les animaux porteurs de xénogreffes s'est déroulée en deux campagnes distinctes résumées dans le tableau 12.

Tableau 12 : Récapitulatif de toutes les souris ayant servies pour l'analyse IRM dans la tumeur au cours des deux campagnes d'imagerie.

	100 $\mu$ mol d'USPIO/kg d'animaux	20 $\mu$ mol d'USPIO/kg d'animaux
MUC5AC+ P3667	4	3
MUC5AC+ P3007	5	5
MUC5AC- P3667	2	4

Quelle que soit la concentration de produit de contraste spécifique (P3667) utilisée, les tumeurs MUC5AC positives présentent un signal reproductible. Le signal décroît de -10% (post-contraste) à -15% avec respectivement 20 $\mu$ mol de fer/kg et 100 $\mu$ mol de fer/kg (Figures 60 et 61). Dans les mêmes conditions, les deux contrôles négatifs (P3667/MUC5AC négatif et P3007/MUC5AC positif) voient leur signal dans la tumeur ne pas évoluer ou augmenter légèrement.

Il est intéressant de noter que le  $\Delta SI/Ref\%$  n'est pas proportionnel à la dose injectée mais que lorsque l'on augmente la dose de produit injecté on améliore le signal. On constate dans l'estomac après injection de P3667 à 100 $\mu$ mol/kg, qu'il y a une décroissance de signal importante comprise entre -40% et -45%. L'injection de P3007 abaisse le signal dans l'estomac de -15%. A la concentration de 20 $\mu$ mol/kg, le nombre d'images traitées n'est pas suffisant. On observe également, dans le foie ou la rate à une concentration de 100 $\mu$ mol/kg, et ce quel que soit le produit injecté, une diminution du  $\Delta SI/Ref\%$  de 30% en moyenne dans le foie et de 50% en moyenne dans la rate. A la concentration de 20 $\mu$ mol/kg d'agent de contraste, seul le foie a pu être imagé et les images traitées *a posteriori*. On constate que pour les animaux MUC5AC positifs injectés avec soit le produit P3667 ou P3007 une diminution du signal d'approximativement 15% et de 10% pour les animaux MUC5AC négatifs injectés avec P3667.

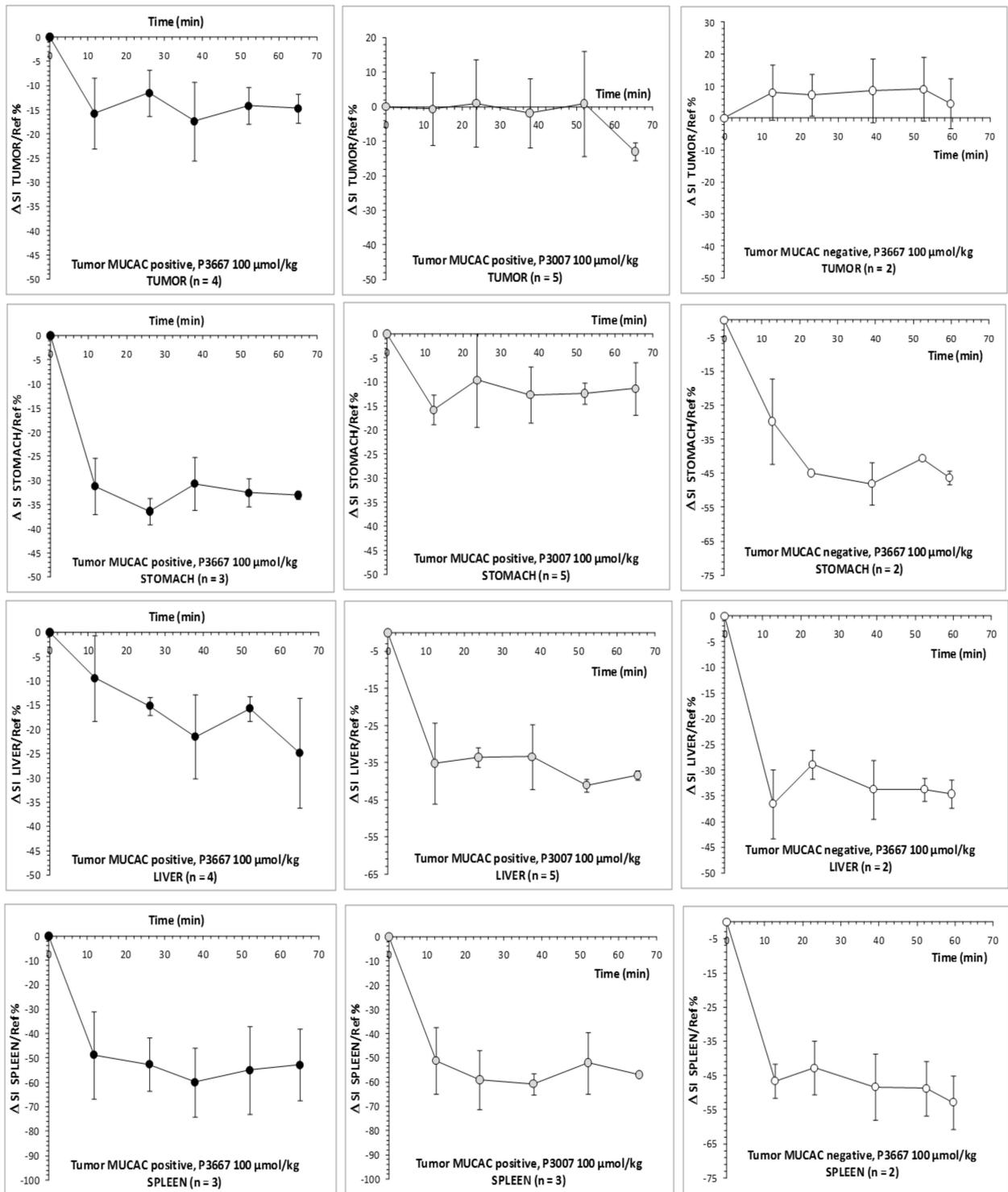


Figure 60 : Analyse RARE des souris injectées avec une dose de 100 $\mu$ mol de fer/kg dans la tumeur, l'estomac, le foie et la rate.

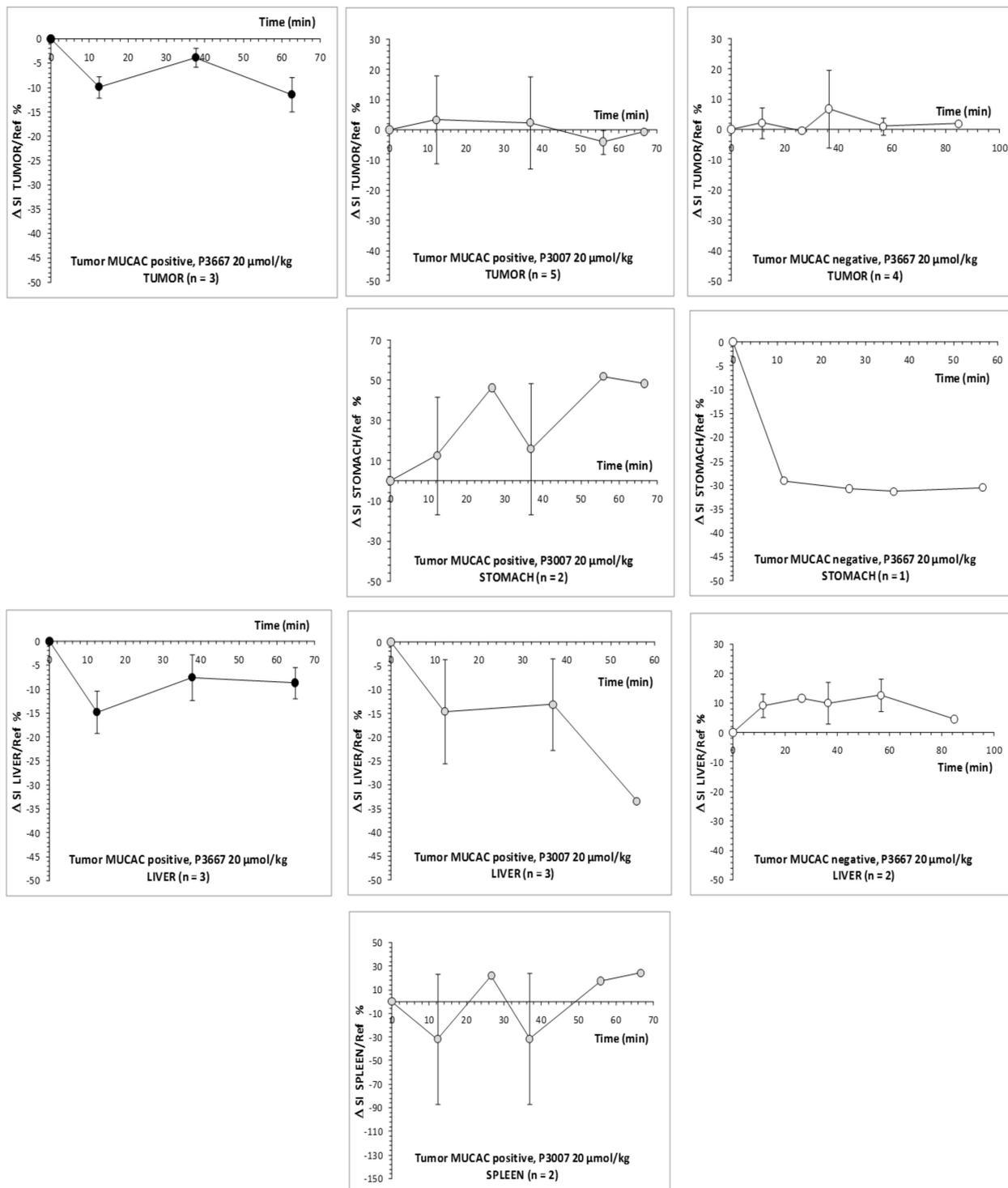


Figure 61 : Analyse RARE des souris injectées avec une dose de 20 $\mu\text{mol}$  de fer/kg dans les tumeurs, l'estomac, le foie et la rate.

▪ **Calcul de la concentration en USPIO contenue dans le plasma des souris imagées**

On peut observer dans les tableaux 13 et 14 que les concentrations en fer sont proportionnelles à la dose de produit injectée. De plus, les concentrations déterminées suggèrent que les produits ne sont que très peu éliminés 1h-1h30 après leur injection.

Tableau 13 : Concentration en fer mesurée par relaxométrie dans le plasma des souris de la première campagne.

Souris	Concentration en fer ( $\mu\text{mol/L}$ )
1 MUC5AC positive P3667 20 $\mu\text{mol Fe/kg}$	380
2 MUC5AC positive P3007 20 $\mu\text{mol Fe/kg}$	411,5
3 MUC5AC négative P3667 20 $\mu\text{mol Fe/kg}$	471,5
4 MUC5AC positive P3667 40 $\mu\text{mol Fe/kg}$	909,6
6 MUC5AC positive P3667 20 $\mu\text{mol Fe/kg}$	486,8
7 MUC5AC positive P3667 100 $\mu\text{mol Fe/kg}$	1555,5
8 MUC5AC positive P3007 100 $\mu\text{mol Fe/kg}$	1804,8
9 MUC5AC positive P3007 20 $\mu\text{mol Fe/kg}$	306,4
10 MUC5AC positive P3667 20 $\mu\text{mol Fe/kg}$	312,4
11 MUC5AC négative P3667 20 $\mu\text{mol Fe/kg}$	442,5
12 MUC5AC positive P3007 20 $\mu\text{mol Fe/kg}$	334,4
13 MUC5AC positive P3007 20 $\mu\text{mol Fe/kg}$	343,3
14 MUC5AC négative P3667 20 $\mu\text{mol Fe/kg}$	350,7

Tableau 14: Concentration en fer mesurée par relaxométrie dans le plasma des souris de la deuxième campagne.

Souris	Concentration en fer ( $\mu\text{mol/L}$ )
1 MUC5AC positive P3667 100 $\mu\text{mol Fe/kg}$	2590
2 MUC5AC positive P3007 100 $\mu\text{mol Fe/kg}$	1883
3 MUC5AC positive P3667 100 $\mu\text{mol Fe/kg}$	3871
4 MUC5AC positive P3007 100 $\mu\text{mol Fe/kg}$	1667
5 MUC5AC positive P3667 100 $\mu\text{mol Fe/kg}$	1959
6 MUC5AC positive P3007 100 $\mu\text{mol Fe/kg}$	1781
7 MUC5AC positive P3007 100 $\mu\text{mol Fe/kg}$	1908
8 MUC5AC positive P3007 20 $\mu\text{mol Fe/kg}$	182
9 MUC5AC négative P3667 20 $\mu\text{mol Fe/kg}$	337
10 MUC5AC négative P3667 100 $\mu\text{mol Fe/kg}$	2806
11 MUC5AC négative P3667 100 $\mu\text{mol Fe/kg}$	3638
12 MUC5AC positive P3007 100 $\mu\text{mol Fe/kg}$	2082

### ▪ **Corrélation entre les résultats d'imagerie et les modèles animaux**

On peut constater dans les tableaux 15 et 16, après analyse anatomopathologique, que toutes les tumeurs ont un profil d'expression de MUC5AC attendu. En effet, les xénogreffes réalisées avec la lignée sécrétant MUC5AC (HT29 5M21) expriment toujours la mucine MUC5AC de façon constante et la lignée ne la sécrétant pas ne l'exprime jamais. Ces résultats permettent de valider les résultats observés par analyse IRM.

Tableau 15 : Animaux utilisés lors de la campagne IRM 1 et profil d'expression de MUC5AC par histologie.  
Avec + pour présent et – pour absent.

Animaux	Produit injecté	Dose ( $\mu$ mol/kg)	Cellules	Immuno MUC5AC
Souris 1	P3667	20	HT29 5M21	+
Souris 3	P3667	20	HCT116	-
Souris 4	P3667	40	HT29 5M21	+
Souris 6	P3667	20	HT29 5M21	+
Souris 7	P3667	100	HT29 5M21	+
Souris 10	P3667	20	HT29 5M21	+
Souris 11	P3667	20	HCT116	-
Souris 14	P3667	20	HCT116	-
Souris 2	P3007	20	HT29 5M21	+
Souris 8	P3007	100	HT29 5M21	+
Souris 9	P3007	20	HT29 5M21	+
Souris 12	P3007	20	HT29 5M21	+
Souris 13	P3007	20	HT29 5M21	+

Tableau 16 : Animaux utilisés lors de la campagne IRM 2 et profil d'expression de MUC5AC par histologie.

	Produit injecté	Dose (µmol/kg)	Cellules	Immuno MUC5AC
Souris 1	P3667	100	HT29 5M21	+
Souris 3	P3667	100	HT29 5M21	+
Souris 5	P3667	100	HT29 5M21	+
Souris 9	P3667	20	HCT116	-
Souris 10	P3667	100	HCT116	-
Souris 11	P3667	100	HCT116	-
Souris 4	P3007	100	HT29 5M21	+
Souris 2	P3007	100	HT29 5M21	+
Souris 6	P3007	100	HT29 5M21	+
Souris 7	P3007	100	HT29 5M21	+
Souris 8	P3007	20	HT29 5M21	+
Souris 12	P3007	100	HT29 5M21	+

▪ **Détection des USPIO sur tissus après injection *in vivo* chez l'animal**

On peut constater, dans les tumeurs, une accumulation du produit de contraste greffé au peptide (P3667) uniquement lorsqu'elles sécrètent MUC5AC. De plus, on peut remarquer un marquage spécifique, donc une accumulation du P3667 dans le tissu gastrique de souris (Figure 62 E) et une absence de marquage chez les animaux traités avec le P3007 (Figure 62 F). Ces résultats permettent de valider l'analyse imagerie et de confirmer les images obtenues en IRM dans l'estomac de souris injectées avec le P3667. En effet, on peut observer une apparition de signal dans une couche indirectement en contact avec la lumière gastrique chez les animaux traités. On peut donc en conclure que le produit ne s'accumule pas jusqu'à la partie supérieure de l'épithélium gastrique, là où, pourtant, MUC5AC se trouve également. Ceci peut s'expliquer par l'impossibilité de l'USPIO à diffuser jusqu'à la surface, à sa

détérioration au pH acide de l'estomac ou encore une captation par MUC5AC présent dans le bas des cryptes gastriques empêchant ainsi la progression des USPIO.

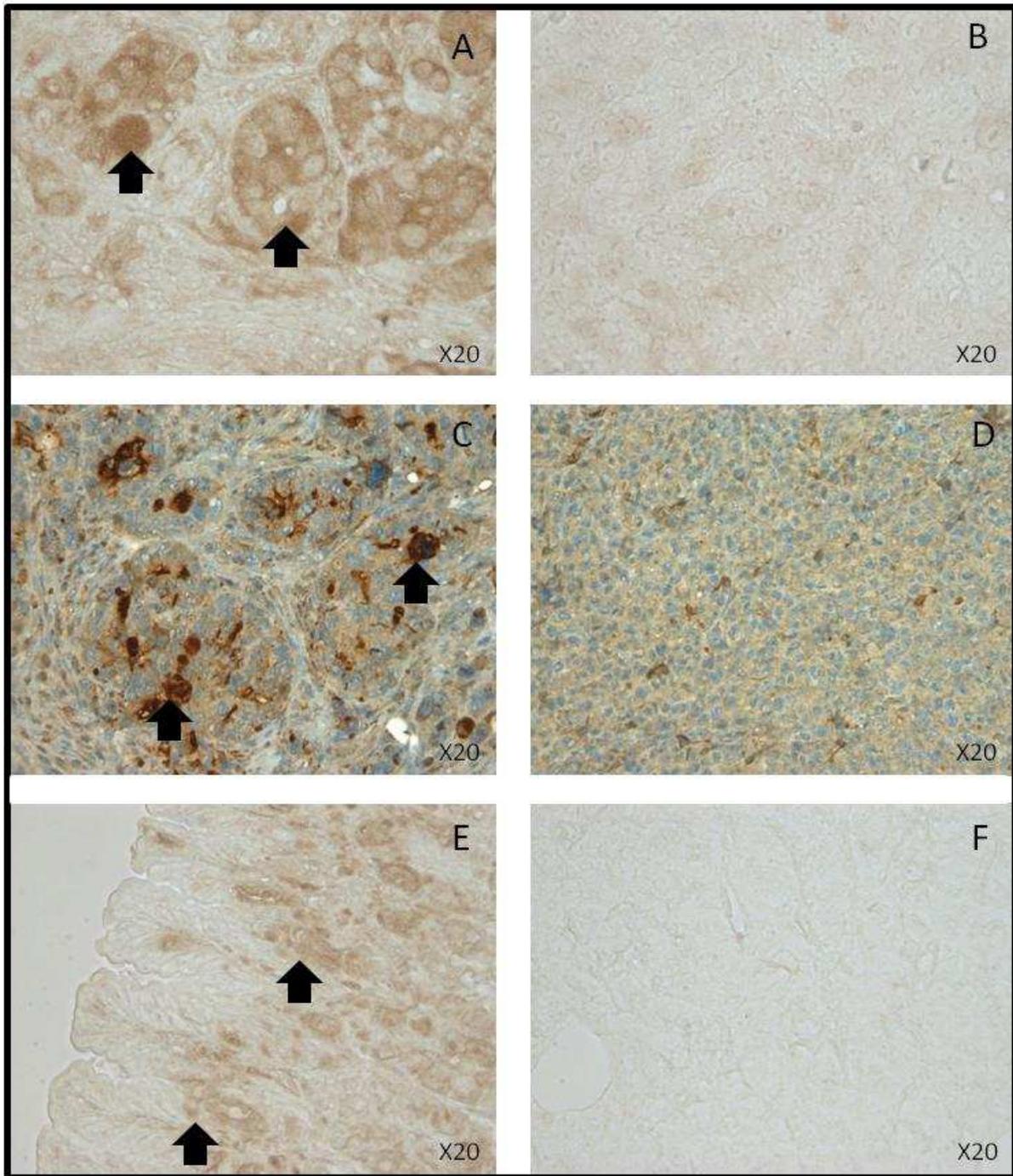


Figure 62 : Détection du P3667 à l'aide de l'anticorps anti-PEG (A) sur xéno greffe HT29 5M21, (B) sur xéno greffe HCT116 et sur coupe d'estomac de souris (E) sans contre coloration. Absence de détection du P3007 sur coupe d'estomac de souris (F) sans contre coloration. Les coupes ont été parallèlement révélées avec un anticorps anti-MUC5AC sur HT29 5M21 (C) et HCT116 (D). Le marquage des glandes est désigné par des flèches.

L'ensemble de ces résultats apporte une preuve de concept IRM validée par histologie du produit de contraste ciblant MUC5AC.

# *Discussion*

## MUC5AC et le cancer colorectal

Ce travail a permis d'isoler une séquence de 7 acides aminés, affine pour la mucine MUC5AC humaine et Muc5ac de rongeurs qui est exprimée de façon aberrante dans les stades précoces de CCR humain et murins. Ce peptide a été couplé à un agent de contraste IRM du fait des trois avantages majeurs de cette technique, à savoir : l'absence d'exposition irradiante, son caractère non-invasif et sa bonne résolution spatiale. Le conjugué a été testé sur modèles animaux par injection intraveineuse, ce qui a permis de mettre en évidence sa spécificité pour les tumeurs et les organes exprimant MUC5AC.

La technique du phage display est couramment employée afin d'identifier des séquences peptidiques utilisables en imagerie moléculaire pour cibler le CCR. Or jusqu'à présent les peptides utilisés ciblent soit une molécule non identifiée (Kelly & Jones, 2003 ; Hsiung *et al.*, 2008) soit des molécules dont la signification biologique est mal comprise et non spécifique du CCR, comme le TAG-72 ou la Galectine-3 (Chen *et al.*, 2008 ; Kumar & Deutscher, 2008). Lors de la sélection de peptides contre des cibles non identifiées, la bibliothèque de phages est enrichie sur des lignées cellulaires coliques (HCT116, HT29...) et parfois suivie d'une étape de sélection sur biopsies tumorales coliques. Dans ce cas, pour appauvrir la bibliothèque, l'agent de contre sélection était une biopsie colique saine (Hsiung *et al.*, 2008). L'atout majeur de notre travail est le nombre important d'études ayant révélé les anomalies d'expression de MUC5AC dans le CCR, permettant de mieux cerner la nature des pathologies mises en évidence (Buisine *et al.*, 1996 ; Bartman *et al.*, 1999 ; Myerscough *et al.*, 2001 ; Forgue-Lafitte *et al.*, 2007 ; Bu *et al.*, 2010). L'utilisation de peptides *in vivo* plutôt que d'anticorps est préférable du fait de l'immunogénicité de ces derniers (Goldsmith, 1997). Les peptides sont également non toxiques, faciles à produire en grande quantité et leur petite taille permet une meilleure diffusion dans les tissus.

Après avoir démontré la spécificité du peptide identifié, il a été greffé à des USPIO, (agents de contraste négatif) afin de l'utiliser par IRM. Le choix de l'agent de contraste a été effectué en se basant sur sa petite taille. Après avoir caractérisé deux modèles de xénogreffes sur souris Nude, un exprimant MUC5AC et l'autre non, le produit a clairement démontré sa spécificité pour la cible. Fort de ce constat, nous avons entrepris d'étudier son efficacité à cibler l'estomac, organe exprimant naturellement la cible, dans le but de connaître sa capacité à traverser la barrière gastro-intestinale après injection intraveineuse. Nous avons donc observé le ciblage de l'estomac uniquement lorsque l'animal a été injecté avec le produit de contraste greffé avec le peptide. Dans le but d'évaluer la spécificité des images observées, nous avons étudié la présence des USPIO dans le tissu par immunohistochimie. Cela a permis

de démontrer le passage du produit jusque dans une partie intermédiaire de la muqueuse, sans que celui-ci n'atteigne la lumière, validant ainsi les résultats IRM. A ce jour, très peu d'analyses ont démontré le passage d'un produit de contraste spécifique de la voie sanguine vers la lumière gastrique. Ce résultat laisse donc penser que les USPIO peuvent traverser la barrière gastro-intestinale. Cependant, ce phénomène doit être testé sur modèles animaux ayant développés des tumeurs coliques exprimant MUC5AC, comme le modèle AOM/DSS dont l'analyse de l'expression de MUC5AC n'est pas encore connue.

L'utilisation de ce produit de contraste ciblant MUC5AC, pourra être indiquée dans certains types de population mais n'a pas vocation à être utilisé comme moyen de diagnostic de masse, comme le test Hémocult (Kewenter *et al.*, 1988). Les populations pouvant être la cible de ce produit sont celles à risques élevés et très élevés de développer un CCR. En effet, ces populations sont plus sujettes de développer des CCR et nécessitent donc un suivi régulier par coloscopie totale. Cette technique est certes très résolutive mais a le double inconvénient de nécessiter une anesthésie tout en pouvant provoquer des perforations (Feld & Feld, 2010). Le produit de contraste ciblant MUC5AC pourra donc être injecté et imagé sans sédation et permettre le suivi de l'expression de MUC5AC par une technique non invasive d'IRM.

En outre, les modalités d'injection du produit ciblant MUC5AC semblent prometteuses par voie intraveineuse mais nécessitent des travaux complémentaires afin de connaître sa capacité à marquer le côlon dont l'organisation tissulaire et la vascularisation sont différentes de l'estomac. La colonographie IRM, déjà utilisée sur les patients, utilise des produits de contraste non spécifiques injectés par voie intraveineuse (dark lumen), intracolique (bright lumen) ou par marquage des selles (Luboldt *et al.*, 2000 ; Lauenstein *et al.*, 2001 ; Lauenstein *et al.*, 2002). L'utilisation du peptide greffé à un produit de contraste pourra être envisagée selon ces trois modes d'injection qui ont déjà fait leur preuve chez l'Homme. Cependant afin d'avoir le même type de contraste, le peptide devra être greffé à un produit de contraste positif, capable d'éclaircir l'image comme le Gd-DTPA. L'expression physiologique de MUC5AC dans d'autres organes doit également être prise en compte pour le mode d'administration du produit de contraste. En effet, le produit de contraste peut être capté par les autres sources de MUC5AC, de l'estomac, du pourmon, du système hépatobiliaire et du pancréas (Andrianifahana *et al.*, 2006). En tenant compte de ces points, il faudra donc privilégier une administration par voie rectale ou encore par voie orale, dans ce cas, en développant un système capable de libérer le produit uniquement lorsqu'il est présent dans l'intestin grêle.

Bien que la résolution des images IRM soit très supérieure aux autres techniques d'imagerie, la sensibilité du produit de contraste en IRM demande des concentrations en produit de contraste de l'ordre du micromolaire (contrairement à la médecine nucléaire utilisant des concentrations jusqu'à 10 000 fois inférieures). Comme l'expression de MUC5AC en cas de cancer colique est plus faible que dans l'estomac sain, le couplage du peptide avec des radiotraceurs employés en TEP, pourrait donc augmenter la sensibilité de détection de MUC5AC si celle-ci s'avérait insuffisante en imagerie IRM colique.

Par ailleurs, l'utilisation du peptide reconnaissant MUC5AC a également été envisagée en microendoscopie confocale. Le principe repose sur le marquage de ce dernier avec une molécule fluorescente comme le FITC, que l'on pulvérise ensuite dans le côlon du patient lors d'une coloscopie. Après rinçage de l'excédent de peptides marqués, le tissu est observé à l'aide d'un microendoscope confocal (Hisiung *et al.*, 2008). La suite de ce travail pourra être de tester, *ex-vivo*, la fixation spécifique du peptide fluorescent sur des pièces tumorales coliques exprimant ou non MUC5AC. Si les premiers résultats sont concluants, cette étude conduira rapidement à une application chez les patients. Elle permettra d'aider les gastroentérologues dans le diagnostic différentiel des polypes identifiés en coloscopie. La caractérisation *in vivo* en temps réel d'une lésion au cours de l'acte endoscopique avant sa résection représenterait un progrès majeur en permettant de limiter le risque de la polypectomie aux seuls polypes comportant un contingent adénomateux, immédiatement au cours de la coloscopie initiale.

# MUC5AC et *Helicobacter pylori*

## Présentation de l'étude

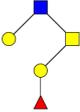
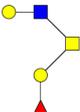
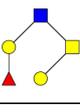
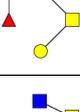
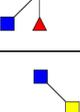
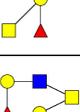
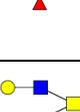
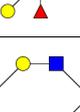
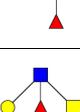
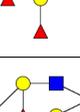
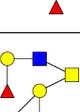
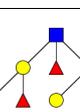
Le but de ce travail est de connaître le profil *O*-glycanique du mucus gastrique pour mieux en appréhender les fonctions biologiques, et en particulier dans l'interaction hôte-pathogènes. Nous avons pour cela, tout d'abord, entrepris l'étude de la *O*-glycosylation des mucines gastriques humaines sécrétées afin d'identifier d'éventuelles nouvelles cibles pour l'adhésion d'*Helicobacter pylori* à la muqueuse gastrique. Au cours des analyses, un motif glycanique jamais identifié chez l'Homme et uniquement porté par MUC5AC gastrique, a été quantifié et caractérisé. Nous avons ensuite étudié sa répartition tissulaire dans l'organisme humain et certains modèles animaux d'infection à *H. pylori* par immunohistochimie. Nous avons également utilisé cette nouvelle structure glycanique pour tester l'inhibition de l'adhésion de *H. pylori* sur des coupes de tissus gastriques et protéines purifiées (par ELISA). Les résultats nous ont conduits à la caractérisation de la protéine portée par la bactérie pouvant reconnaître ce nouveau motif glycanique et ainsi élaborer le mutant *ad hoc* pour mieux comprendre le rôle de l'adhésine.

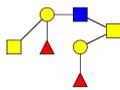
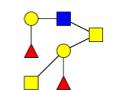
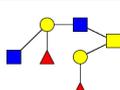
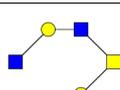
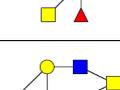
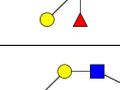
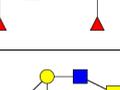
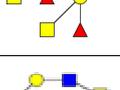
## ▪ *O*-glycosylation des mucines gastriques secrétées adultes humaines

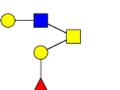
Après purification des mucines gastriques, comme décrit dans le chapitre précédent, les *O*-glycanes ont été libérés par  $\beta$ -élimination en milieu réducteur, dessalés et purifiés en HPLC. Chaque pic a été collecté, conditionné et analysé en spectrométrie de masse pour 2 groupes sanguins B sains, 12 groupes A sains et 10 groupes O sains. Les résultats ont permis de quantifier et d'identifier la plupart des structures glycaniques du mélange (Tableau 17). Différents constats peuvent être réalisés, tout d'abord, la plupart des structures possèdent un core 2, la majorité (70 à 80%) des motifs sont porteurs d'au moins un groupe sanguin A, B ou O. Les groupes Lewis sont peu représentés (2 à 3% en moyenne), la structure glycanique décrite pour inhiber la croissance d'*H. pylori* :  $\alpha$ 1,4-*N*-acetylglucosamine branchée à un core 2 (Kawakubo *et al.*, 2004) est bien présente mais ne représente que 2 à 3% des motifs. Un motif de masse  $m/z$  960, avec une structure non identifiable par spectrométrie de masse, où deux HexNAc se succèdent, représente 7% de la totalité des glycanes. Enfin, les structures acides sont très peu présentes par rapport à ce que l'on peut retrouver dans l'intestin, sans aucune structure sulfatée. 8 à 9% des structures portent au moins un acide sialique dans l'estomac contre, dans le côlon distal, 70% de glycanes sialylés ou sulfatés (Robbe *et al.*, 2003). Cet état de fait n'avait jamais été étudié en structure, cependant des données histologiques avaient déjà montré l'absence de coloration en utilisant le bleu alcian, connu pour colorer uniquement les mucosubstances acides (Sheahan & Jervis, 1976).

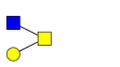
Tableau 17 : Structures glycaniques portées par les mucines humaines gastriques identifiées par nanoESI MS/MS en mode positif et négatif chez d'individus adultes « sains ». G représente un Galactose, HexNAc pour *N*-acétylhexosamine, Fuc pour Fucose et GalNAcol pour une *N*-acétyl galactosamine réduite (qui était au point d'attache avec l'apomucine).

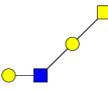
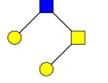
Structures proposées des <i>O</i> -glycanes portants des groupes sanguins	[M+Na] <sup>+</sup>	Commentaires	ALe <sup>b</sup>	BLe <sup>b</sup>	OLe <sup>b</sup>
	554	Core 1, H antigen	Traces	Traces	Traces
	757	Core 2, H antigen	4,2+/-0,5%	4,1+/-0,3%	7,7+/-0,4%

	757	Core 1, A antigen	5,8+/-0,5%	-	-
	919	Core 2, H antigen	3,9+/-0,2%	4,9+/-0,5%	8,7+/-0,7%
	919	Core 2, H antigen	Traces	Traces	Traces
	919	Core 2, H antigen	Traces	Traces	Traces
	919	Core 2, H antigen	Traces	Traces	Traces
	960	Core 2, H antigen	1,5+/-0,1%	3,5+/-0,3%	-
	960	Core 1, A antigen	2,4+/-0,2%	-	-
	1065	Core 2, di-H antigen	18+/-1%	17,1+/-2%	29,7+/-1,2%
	1081	Core 2, B antigen	-	5,7+/-0,5%	-
	1122	Core 2, H antigen	Traces	Traces	Traces
	1211	Core 2, Le <sup>b</sup> antigen	2,9+/-0,2%	4,7+/-0,2%	11,2+/-0,5%
	1227	Core 2, B and H antigens	-	13,7+/-1%	-
	1227	Core 2, B and H antigens	-	7,2+/-1%	-
	1227	Core 2, B Le <sup>b</sup> antigen	-	5,1+/-0,3%	-

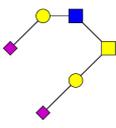
	1268	Core 2, A and H antigens	16+/-2%	-	-
	1268	Core 2, A and H antigens	4,2+/-0,3%	-	-
	1268	Core 2, H antigen	-	-	9,4+/-0,5%
	1325	Core 2, A antigen	Traces	-	-
	1389	Core 2, di-B antigens	-	9,6+/-1,5%	-
	1430	Core 2, di-H antigens	2,5+/-0,2%	Traces	5,8+/-0,2%
	1471	Core 2, di-A antigens	5,7+/-0,5%	-	-
	1592	Core 2, B and H antigens	-	2,9+/-0,2%	-

Structures proposées des O-glycanes portants des antigènes particuliers	[M+Na] <sup>+</sup>	Commentaires	ALe <sup>b</sup>	BLe <sup>b</sup>	OLe <sup>b</sup>
	408	Core 1, TF antigen	Traces	Traces	Traces
1G, 2HexNAc, 1Fuc, GalNAcol	960 (contient du 429)	Core 2, H et HexNAc-HexNAc	6,7+/-0,6%	6,3+/-0,5%	6,5+/-0,7%
	1122	Core 2 capped O-glycan (terminal GlcNAc alpha 1-4), H antigen	2,2+/-0,2%	2,8+/-0,1%	2,9+/-0,2%

Structures proposées des O-glycanes neutres	[M+Na] <sup>+</sup>	Commentaires	ALe <sup>b</sup>	BLe <sup>b</sup>	OLe <sup>b</sup>
	611	Core 2	-	Traces	Traces
	611	Core 1	Traces	Traces	Traces

					
	773	Core 1	2,4+/-0,2%	Traces	Traces
	773	Core 2	Traces	Traces	Traces
2G, 2HexNAc, GalNAcol	976		Traces	Traces	Traces
3G, 2HexNAc, GalNAcol	1138		Traces	Traces	Traces
1G ,3HexNAc, 1Fuc,GalNAcol	1163		2,2+/-0,1%	Nd	Nd
3G, 1HexNAc, 1Fuc, GalNAcol	1284		Traces	Traces	Traces
2G ,3HexNAc, 1Fuc,GalNAcol	1325		Traces	Traces	Traces
3G ,3HexNAc, GalNAcol	1341		Traces	Traces	Traces
4G ,2HexNAc, 1Fuc,GalNAcol	1446		-	Traces	-
3G ,3HexNAc, 1Fuc,GalNAcol	1487		Traces	Traces	Traces
4G, 3HexNAc, GalNAcol	1503		Traces	Traces	Traces
3G, 4HexNAc, GalNAcol	1544		Traces	Traces	Traces
2G ,2HexNAc, 4Fuc,GalNAcol	1560		Traces	Traces	Traces
3G ,2HexNAc, 3Fuc,GalNAcol	1576		Traces	Traces	Traces
3G ,3HexNAc, 2Fuc,GalNAcol	1633		2,5+/-0,3%		5+/-0,5%
4G ,3HexNAc, 1Fuc,GalNAcol	1649		Traces	Traces	Traces
2G, 4HexNAc, 2Fuc, GalNAcol	1674		2,5+/-0,7%	-	-
3G, 4HexNAc, Fuc, GalNAcol	1690		Traces	Traces	Traces
3G, 5HexNAc, GalNAcol	1747		Traces	Traces	Traces
3G, 3HexNAc, 3Fuc, GalNAcol	1779		Traces	Traces	Traces
4G, 3HexNAc, 2Fuc, GalNAcol	1795		Traces	Traces	Traces
3G, 4HexNAc, 2Fuc, GalNAcol	1836		Traces	Traces	Traces
4G, 4HexNAc, Fuc, GalNAcol	1852		2,4+/-0,2%	Traces	Traces
3G, 3HexNAc, 4Fuc, GalNAcol	1925		Traces	Traces	Traces
4G, 3HexNAc, 3Fuc, GalNAcol	1941		Traces	Traces	Traces
5G, 3HexNAc,	1957		Traces	Traces	Traces

2Fuc, GalNAcol					
4G, 4HexNAc, 2Fuc, GalNAcol	1998		Traces	Traces	Traces
4G, 3HexNAc, 4Fuc, GalNAcol	2087		Traces	Traces	Traces
6G, 3HexNAc, 2Fuc, GalNAcol	2119		-	Traces	-
4G, 4HexNAc, 3Fuc, GalNAcol	2144		Traces	Traces	Traces
5G, 4HexNAc, 2Fuc, GalNAcol	2160		Traces	Traces	Traces
4G, 5HexNAc, 2Fuc, GalNAcol	2201		Traces	Traces	Traces
5G, 4HexNAc, 3Fuc, GalNAcol	2306		Traces	Traces	Traces
4G, 5HexNAc, 3Fuc, GalNAcol	2348		Traces	Traces	Traces

Structures proposées des <i>O</i> -glycanes acides	[M-H]-	Comments	ALe <sup>b</sup>	BLe <sup>b</sup>	OLe <sup>b</sup>
	537	Sialyl Tn antigen	Traces	Traces	Traces
	675	Sialyl T antigen	2,7+/-0,2%	2,6+/-0,3%	1,6+/-0,2%
	675	Sialyl T antigen	2,1+/-0,2%	2,8+/-0,3%	1,8+/-0,2%
	821		1,8+/-0,2%	Traces	Traces
	878	Sialylated core 2	1,2+/-0,1%	Traces	2,0+/-0,2%
	966	Disialyl T antigen	2,3+/-0,2%	2,3+/-0,2%	2,8+/-0,3%
	1040	Sialylated core 2	nd	2+/-0,3%	Nd
	1331	Disialylated core 2	Traces	Traces	Traces

▪ **Détermination de la structure de l'ion possédant une masse m/z 960.**

Le motif glycanique de masse m/z 960 a particulièrement retenu notre attention puisque lorsqu'on le fragmente en spectrométrie de masse, on observe un ion fragment atypique : le 429, correspondant à la succession de deux résidus de *N*-acétylhexosamine (Figure 63).

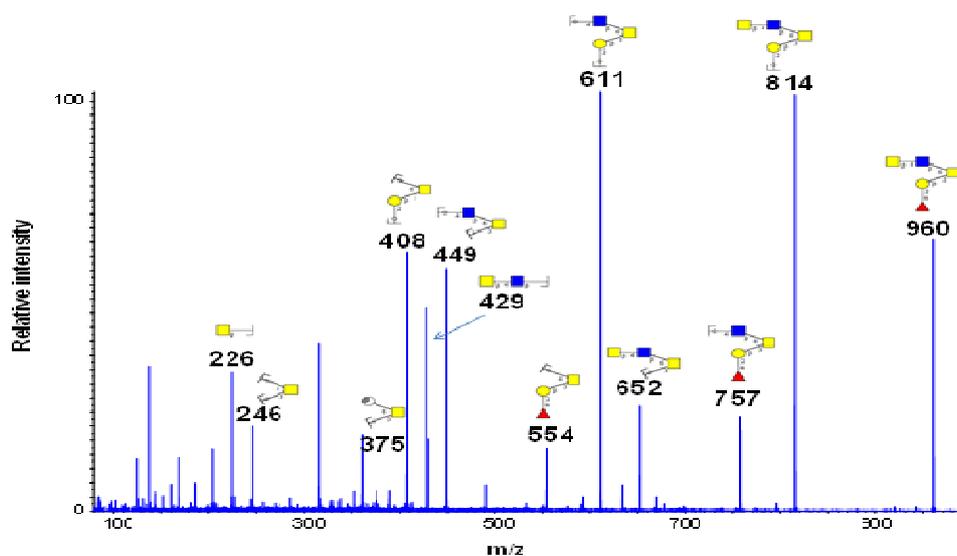


Figure 63 : Spectre MS/MS de l'ion 960, en mode positif.

La spectrométrie de masse ne permet pas, à elle seule, de caractériser précisément la structure du 960, pour cela nous avons utilisé la résonance magnétique nucléaire (RMN). Ceci nécessite un oligosaccharide pur, or le motif préalablement purifié est, quel que soit l'individu, en mélange avec ion de masse m/z 919. Nous avons donc réalisé une HPLC avec une colonne C18 afin de séparer ces deux glycanes pour l'analyse en RMN (Figure 64).

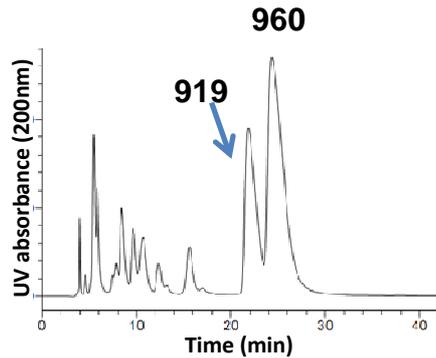


Figure 64 : Profil HPLC C18 d'une fraction préalablement purifiée et contenant un mélange de deux oligosaccharides.

L'analyse RMN effectuée, en utilisant des expériences homonucléaires de type COSY90, TOCSYs, ROESY ainsi qu'un HSQC hétéronucléaire  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ , a permis de déterminer que le glycane inconnu contenait un motif glycanique singulier : le LacdiNAc (LDN). Ce qui correspond à la succession d'une GlcNAc, initialement impliquée dans la formation du core 2, reliée en  $\beta$ 1-4 à une GalNAc terminale (Figure 65 et annexe 2). Le Gal disponible du core 2, est, quant à lui, relié en  $\alpha$ 1-2 à du Fuc pour former le groupe H. Jusqu'à maintenant, les travaux portant sur le LDN ont montré que cette structure est très peu exprimée et uniquement portée par des *N*-glycanes chez l'Homme, jouant un rôle important dans la physiologie de parasites humains, comme *Schistosoma*, Elle n'a jamais été retrouvée portée par des mucines (Dell *et al.*, 1995 ; Khoo *et al.*, 1997 ; van Remoortere *et al.*, 2000 ; Dell *et al.*, 2003). De plus, elle a été décrite comme pouvant induire une réaction immunitaire, par la formation de granulomes, chez des modèles animaux (Van de Vijver *et al.*, 2006 ; van den Berg *et al.*, 2004).

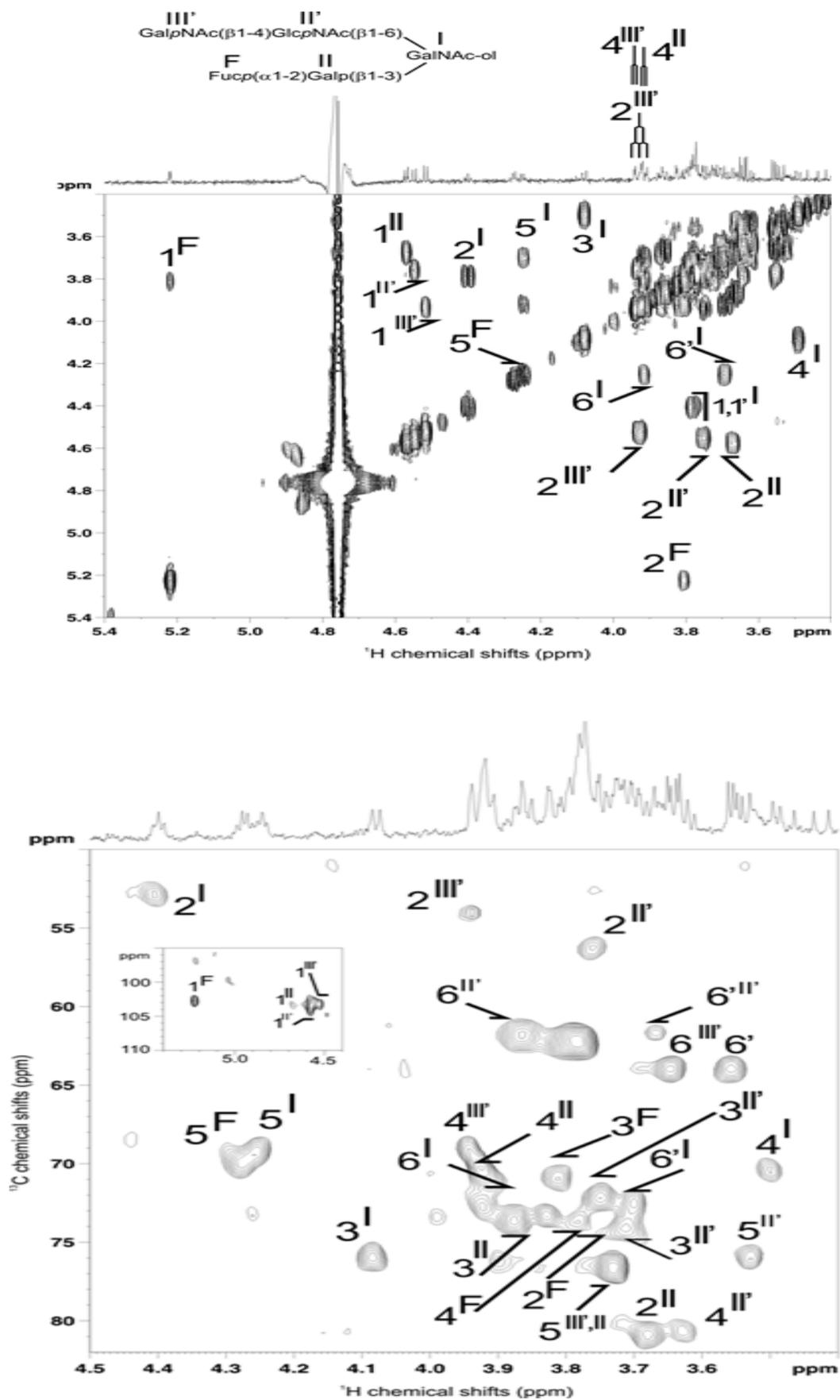


Figure 65 : Spectre RMN 2D du m/z 960.

## ▪ Répartition du LacdiNAc dans l'organisme humain

Nous avons ensuite étudié la localisation tissulaire du LacdiNAc par immunohistochimie en utilisant différents anticorps dirigés contre MUC5AC (LUM5-1), MUC6 (CLH-5) et le LDN (273-3F2). Nous avons, dans un premier temps, étudié son expression dans les différents compartiments gastriques et à l'extrémité supérieure de l'intestin grêle, le duodénum (Figure 66). Le LDN est observé dans le pylore, le corps et le fundus, alors qu'il est absent du cardia et du duodénum sain. Il est toujours exprimé avec MUC5AC, mais lorsque cette mucine est exprimée plus profondément dans le tissu, elle ne porte pas le LDN. Par ailleurs, MUC6, qui est elle-même exprimée plus profondément que MUC5AC, ne porte pas ce motif glycanique. Il est intéressant de noter lorsque le tissu duodéal est porteur d'une métaplasie gastrique duodénale, exprimant MUC5AC (normalement absent du tissu sain) il y a présence conjointe de LDN (F, désigné par une flèche).

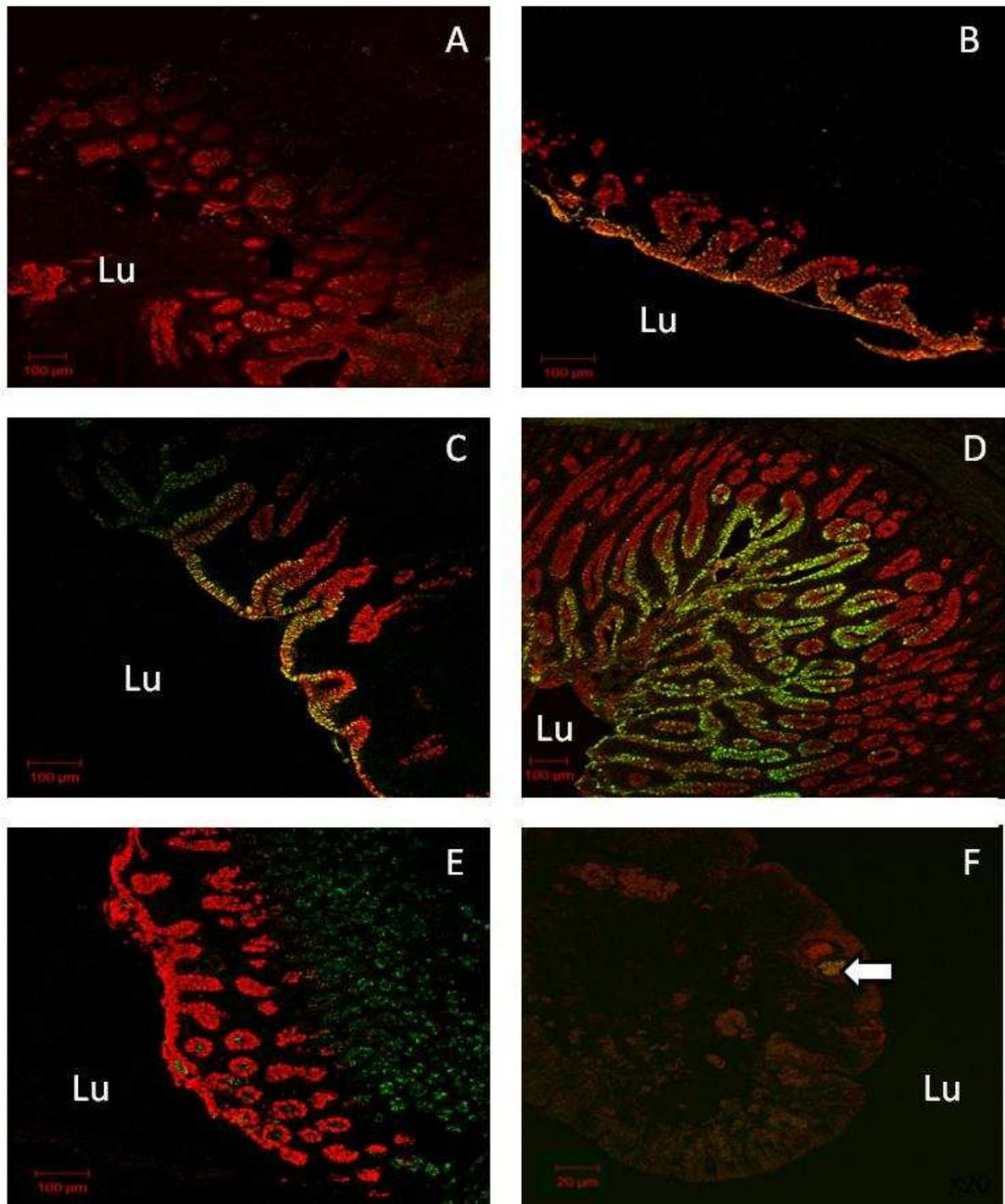


Figure 66 : Double immunomarquage pour MUC5AC (rouge), et le LDN (vert) dans le cardia (A), fundus (B), pylore (C) et le corps, dont on voit le détail d'une crypte (D). Double marquage dans le corps MUC6 (vert) et MUC5AC (rouge) (E). Colocalisation de MUC5AC et du LDN dans une métaplasie gastrique duodénale (jaune) (F). Lu représente la lumière.

En cas de métaplasie intestinale gastrique complète et incomplète, on constate l'absence du LDN dès que MUC5AC n'est plus exprimée et même lorsque une autre mucine sécrétée est présente, en l'occurrence MUC2 (Figure 67).

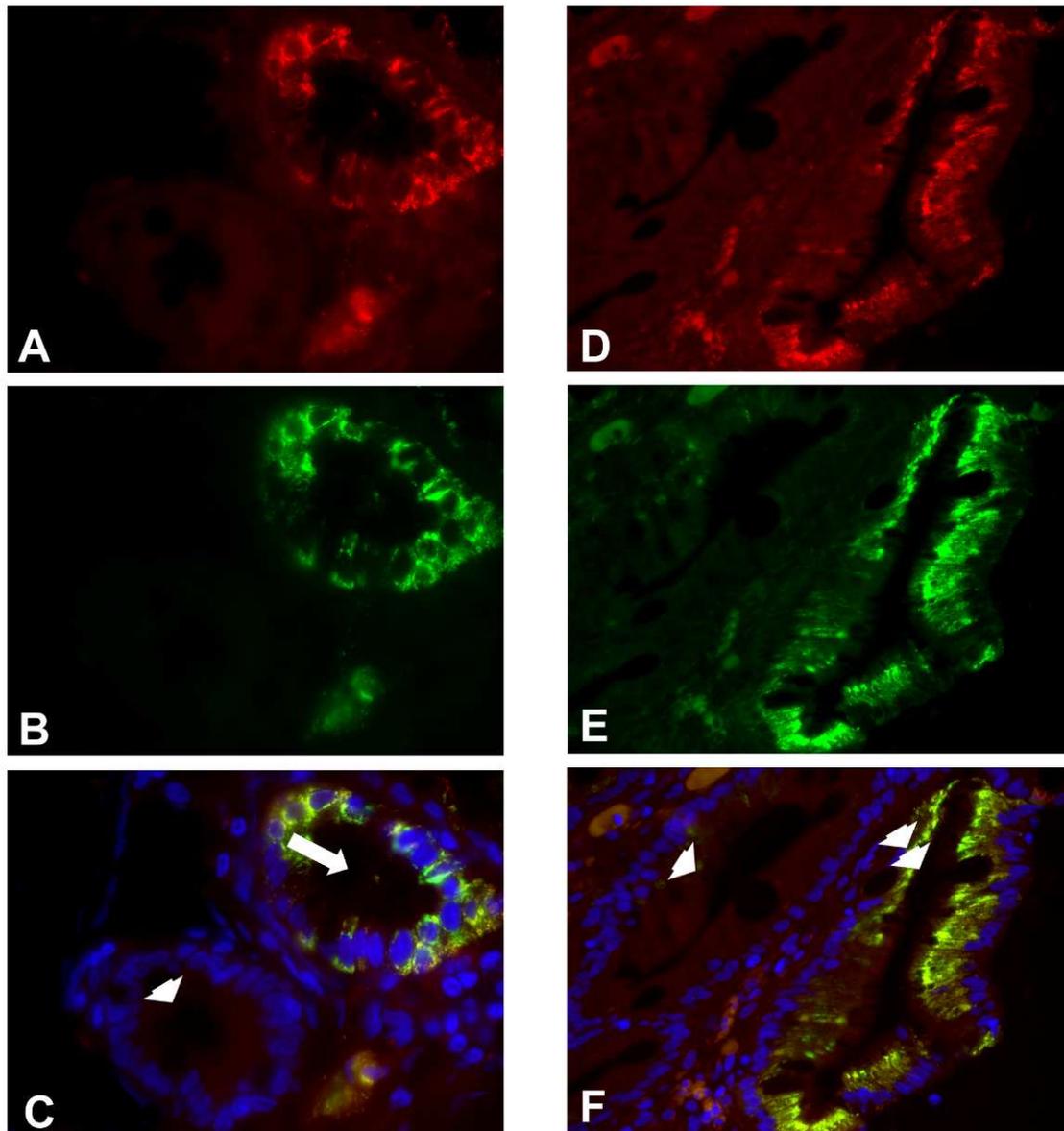


Figure 67 : Double marquage par immunofluorescence de MUC5AC (rouge) et du LDN (vert). Coloration des noyaux en bleu par DAPI. Métaplasie intestinale complète sur la crypte de gauche en A, B et C avec présence de tissu normal sur la droite (désigné avec la grande flèche blanche). Métaplasie intestinale incomplète coexprimant MUC5AC et MUC2 (non immunorévéleé mais désigné par une simple flèche) avec une coexpression de MUC5AC et du LDN en D, E et F (désigné par une double flèche).

L'étude d'autres tissus exprimant des mucines sécrétées dont MUC5AC, n'a pas révélé la présence du LDN dans d'autres organes comme les poumons, le côlon ou encore les glandes salivaires. La présence de LDN dans l'estomac de fœtus est beaucoup plus faible que chez l'adulte et il est peu porté par MUC5AC mais probablement par MUC6 (Figure 68A). Cette différence de répartition du LDN entre l'estomac adulte et fœtal humain suggère son implication dans l'homéostasie gastrique. De plus, on peut constater que lorsque MUC5AC

est exprimé dans un polype colique humain, celui-ci ne porte pas de LDN. Cependant, on peut observer, dans une zone exempte de mucine en périphérie de la glande muco-sécrétante, un marquage spécifique correspondant à d'autres glycoprotéines portant du LDN (Figure 68B, désigné par des flèches).

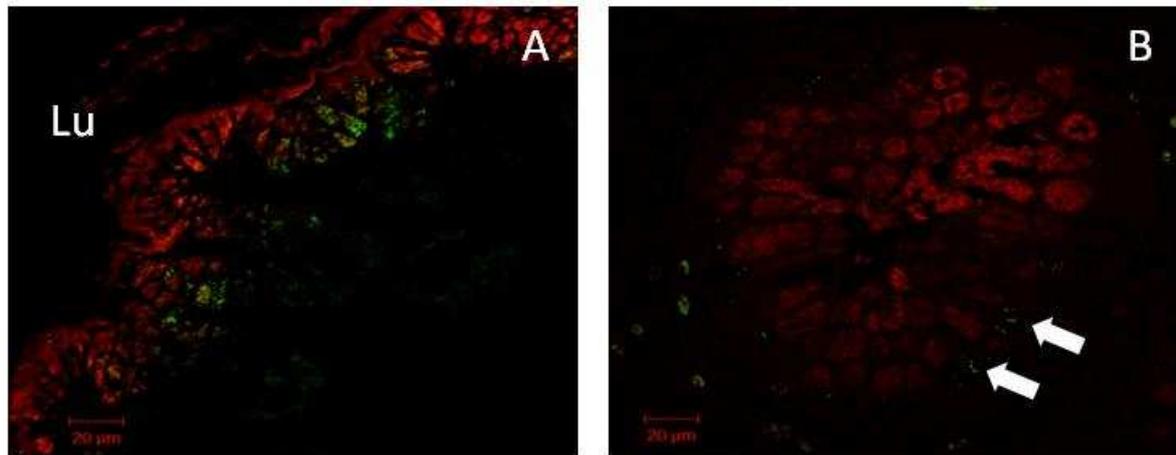


Figure 68 : Double marquage par immunofluorescence de MUC5AC (rouge) et du LDN (vert) dans le fœtus humain (19 semaines) (A) et dans un polype colique humain exprimant MUC5AC. Lu représente la lumière.

Comme le LDN est exclusivement porté par MUC5AC chez l'adulte, qui est elle-même la mucine sécrétée majeure du mucus gastrique en contact avec la lumière, on peut supposer l'implication de ce motif dans l'interaction hôte-pathogène. De plus, plusieurs données épidémiologiques relient ces résultats histologiques avec les pathologies gastriques à *H. pylori*. D'une part, le cancer du cardia a été démontré comme indépendant de la colonisation à cette bactérie (Parsonnet *et al.*, 1991), ce qui coïncide avec l'absence d'expression du LDN. En outre, il est clairement démontré lors de métaplasies intestinales gastriques, lorsque les tissus gastriques n'expriment plus le LDN, une absence d'adhésion de *H. pylori* à la dite muqueuse (Craanen *et al.*, 1992). Inversement, lors de métaplasie gastrique duodénale, où le LDN est anormalement exprimé, on peut observer une colonisation du duodénum par la bactérie qui en est absente en condition normale (Wyatt *et al.*, 1990 ; Khulusi *et al.*, 1996). Nous avons donc entrepris de démontrer l'interaction du LDN et de *H. pylori*.

### ▪ Implication du LacdiNAc dans l'adhésion d'*H. pylori*

Nous avons utilisé tout d'abord l'inhibition de l'adhésion de différentes souches d'*H. pylori* par différents ligands glycaniques sur coupes de tissus gastriques humains. Nous avons utilisé comme ligand, le glycane décrit dans la littérature comme reconnu par *H. pylori* (Lewis<sup>b</sup>), notre motif m/z 960 purifié par HPLC et le motif commercial LDN seul. Le Lewis<sup>b</sup>

a été largement caractérisé pour inhiber certaines souches bactériennes, et ce, en adéquation avec l'expression de l'adhésine bactérienne le reconnaissant : BabA (Boren *et al.*, 1993). La figure 69 représente les résultats d'adhésion de la souche 26695 d'*H. pylori* préalablement incubée ou non avec les différents glycanes sur les tissus gastriques humains. On constate une diminution significative du nombre de bactéries adhérentes au tissu gastrique lorsque l'on ajoute du LDN seul ou sous la forme du motif de masse m/z 960. Ceci est particulièrement intéressant puisque cette souche est décrite pour ne pas reconnaître le Lewis<sup>b</sup>, comme observé ici, et de ne pas avoir de ligand spécifique (Mahdavi *et al.*, 2002 ; Aspholm-Hurtig *et al.*, 2004), ce qui fait du LDN son premier ligand glycanique connu.

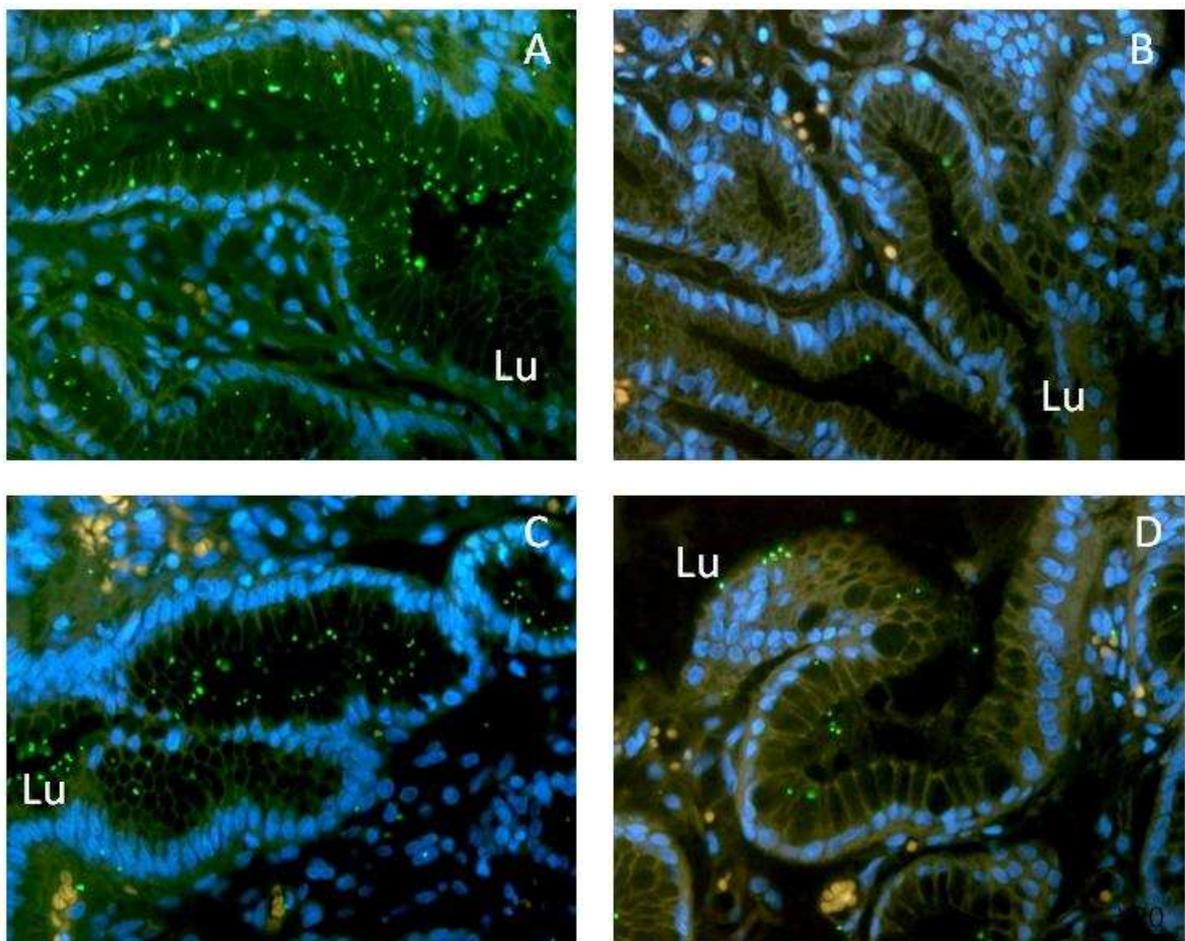


Figure 69 : La souche de *H. pylori* 26695 préalablement rendue fluorescente a été incubée sur des tissus gastriques ( $\times 400$ ) sans glycan (A), avec 0,5mM de LDN (B), le Lewis<sup>b</sup> à 0,5mM (C) et 0,5mM du motif naturellement trouvé dans l'estomac et contenant du LDN (D). Lu représente la lumière.

Six souches ont été testées dans ces conditions à 0,5mM de glycanes et à 25mM uniquement pour les glycanes contenant du LDN. On peut constater que toutes les souches se fixent au LDN excepté la souche B128, qui se fixe faiblement au Lewis<sup>b</sup> à la concentration de 0,5mM (Figure 70).

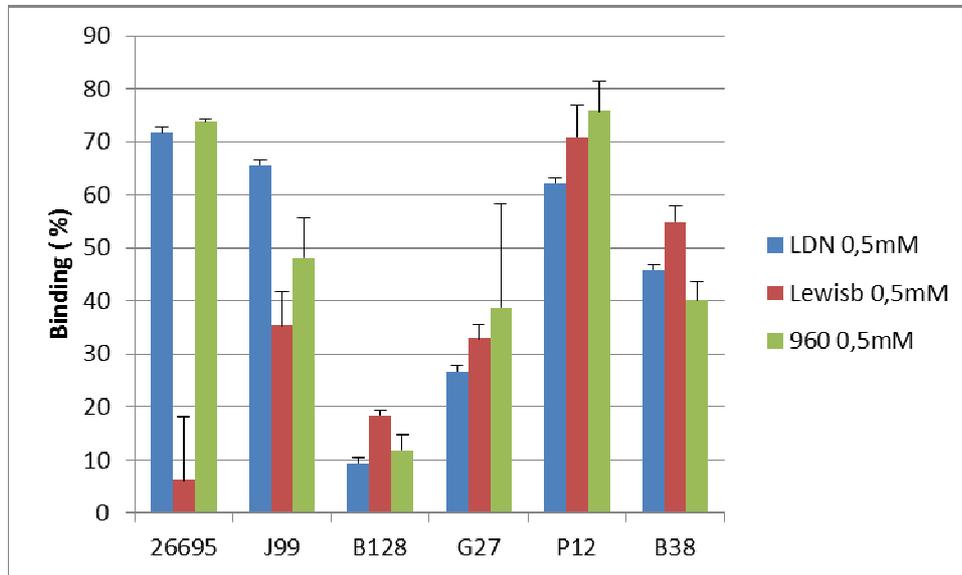


Figure 70 : Inhibition de l'adhésion sur coupes de tissus gastriques humain des souches 26695, J99, B128, G27, P12 et B38, rapporté en % d'inhibition d'adhésion, avec une concentration de 0,5mM de LDN, 960 et Lewis<sup>b</sup>.

Lorsqu'on augmente la quantité de ligand à 25mM, on observe alors une augmentation de l'inhibition de l'adhésion bactérienne, non seulement vis-à-vis de la souche B128, mais aussi des autres souches (Figure 71). Le fait de devoir augmenter la quantité de LDN spécifiquement avec la souche B128 afin d'en inhiber l'adhésion, suggère que cette dernière exprime une quantité d'adhésine reconnaissant le LDN plus importante que les autres souches.

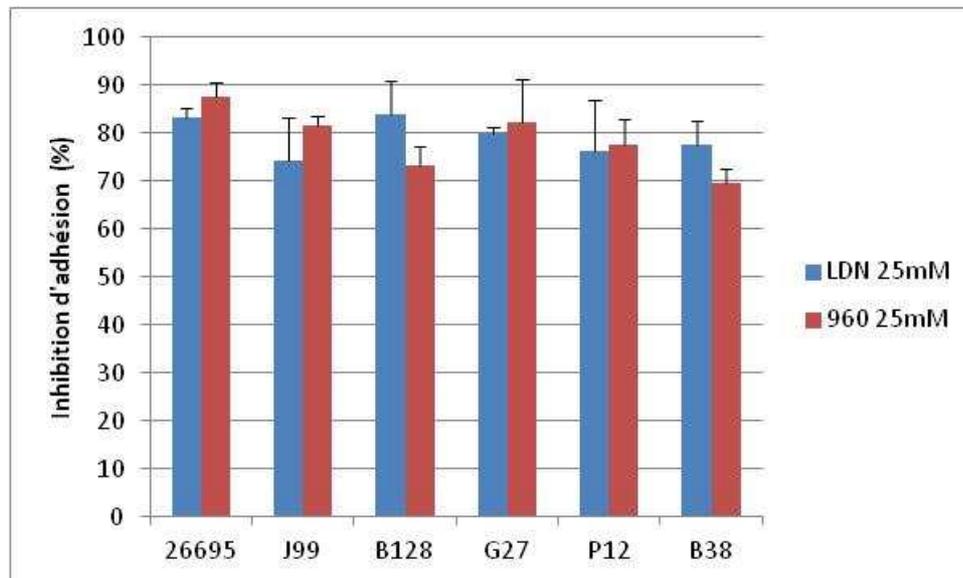


Figure 71 : Inhibition de l'adhésion sur coupes de tissus gastriques humain des souches 26695, J99, B128, G27, P12 et B38, rapporté en % d'inhibition d'adhésion, avec une concentration de 25mM de LDN et 960.

Le même type de résultat a été obtenu sur les souches J99, B128 et 26695 en utilisant des anticorps anti-Lewis<sup>b</sup> et anti-LDN bloquant ainsi l'accès des ligands présents sur le tissu gastrique aux bactéries, confirmant les résultats précédemment démontrés en utilisant les structures glycaniques (Figure 72).

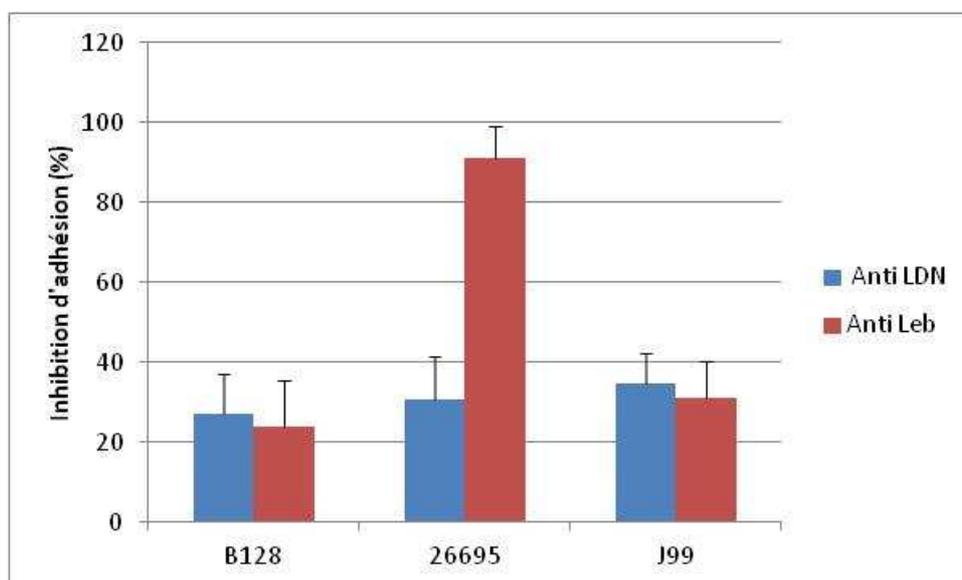


Figure 72 : Inhibition de l'adhésion bactérienne des souches J99, B128 et 26695 sur coupe de tissu gastrique avec des anticorps anti-glycanes (2.25LE pour le Lewis<sup>b</sup> et 273-3F2 pour le LDN).

Fort de ces résultats démontrant clairement l'interaction entre le LDN et *H. pylori*, nous avons entrepris d'identifier l'adhésine portée par la bactérie reconnaissant le LDN. Pour cela, nous avons développé un protocole utilisant la propriété des mucines à être insolubles

dans l'eau associée au LDN, qui lui est soluble. Dans la première condition, nous avons ajouté le lysat des souches de *H. pylori* B128 et 26695 et des mucines gastriques purifiées. Après incubation, la suspension a été centrifugée afin de faire précipiter les mucines ainsi que les protéines bactériennes s'étant fixées dessus. Le surnageant est conservé pour réaliser une électrophorèse (Figure 73A). La deuxième condition consiste à ajouter du LDN à 25mM dans la première condition, ce qui aura pour effet d'inhiber l'adhésion aux mucines de la protéine bactérienne impliquée dans la reconnaissance du LDN (Figure 73B). Les deux surnageants sont ensuite soumis à une électrophorèse SDS-PAGE puis colorés au bleu colloïdal et les bandes dont l'expression varie ont été découpées puis analysées en spectrométrie de masse afin d'identifier la protéine (Figure 73C). Après électrophorèse, on peut constater qu'une seule bande de 77kDa voit son expression varier. Dix peptides ont été identifiés dans les gènes *hpb128155g82* pour la souche B128 et *hp0025* pour la souche 26695 également appelé *hopD* (Cf annexe 3). Parmi les dix peptides, six ont été séquencés par spectrométrie de masse MALDI-TOF/TOF. Comme cette protéine reconnaît le motif LDN, l'adhésine est donc renommée, à l'instar des autres adhésines identifiées BabA et SabA (Ilver *et al.*, 1998 ; Mahdavi *et al.*, 2002), LabA pour LactiNAc antigen binding adhesin.

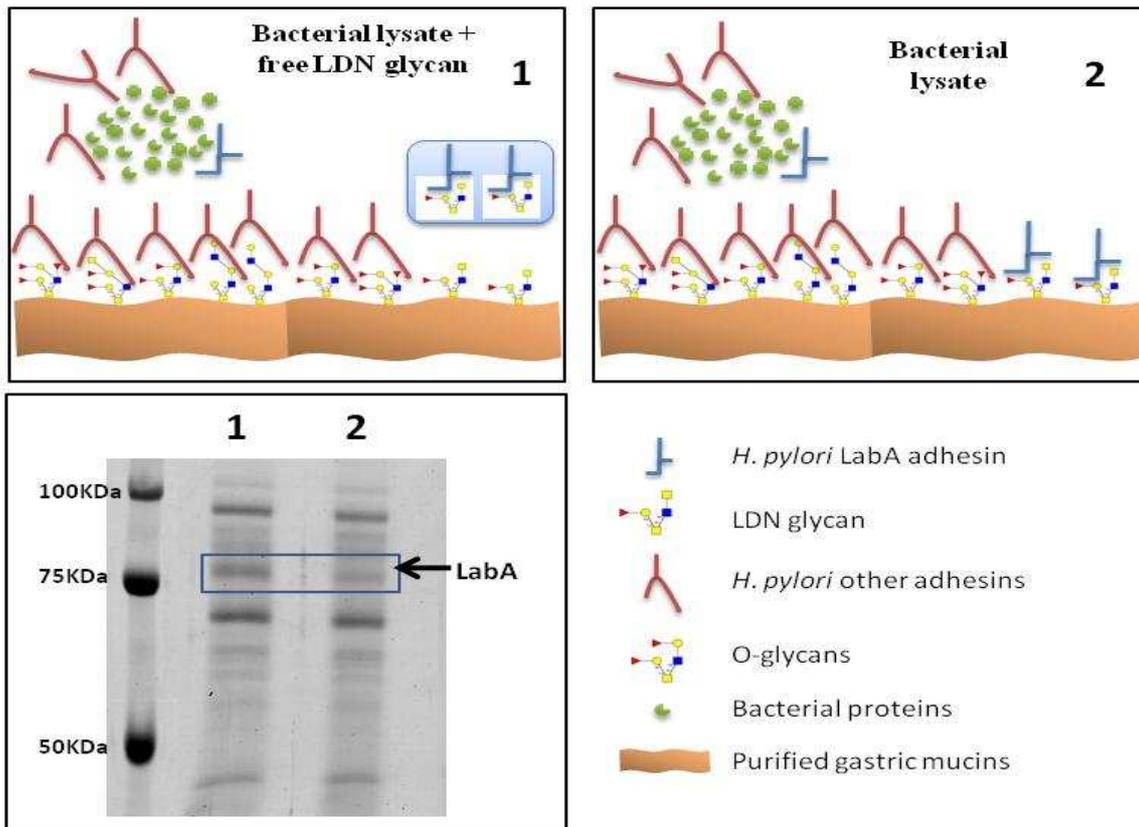


Figure 73 : Identification de l'adhésine portée par les souches B128 et 26695 de *H. pylori*. Incubation du lysat bactérien avec les mucines gastriques purifiées, portant du LDN, avec (1) et sans (2) LDN. Après centrifugation le surnageant de chaque condition est déposé sur électrophorèse SDS-PAGE pour analyse par spectrométrie de masse.

Nous avons ensuite réalisé le mutant dont le gène *labA* a été inactivé sur la souche B128 (Figure 74).

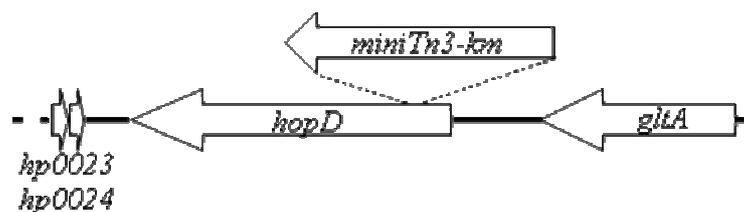


Figure 74 : Inactivation du gène *hopD* ou *labA* par insertion de cassette dans la souche B128.

Le mutant dénommé  $\Delta labA$ , a ensuite été soumis à des coupes de tissus gastriques avec et sans LDN, afin de vérifier l'inhibition de l'adhésion en surface de l'épithélium gastrique, en adéquation avec l'expression de LDN (Figure 75). On observe en surface du tissu gastrique, une très forte diminution de l'adhésion chez le mutant sans (75 B) et avec LDN (75 D), tandis que la souche sauvage adhère sans LDN (75 A) et est inhibée avec une concentration de 25mM de LDN (75 C).

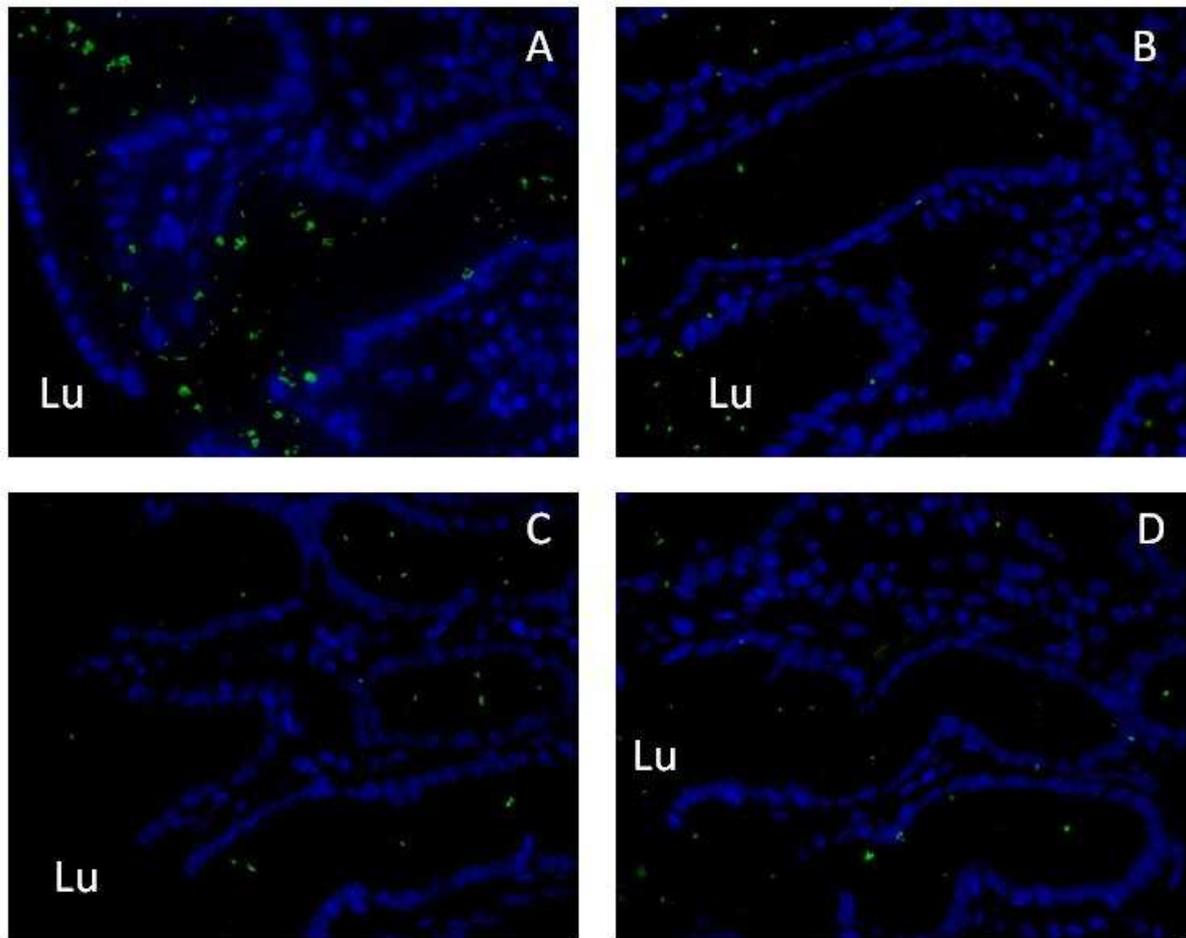


Figure 75 : Fixation des bactéries en surface de la muqueuse gastrique. B128 sauvage (WT) (A), B128 mutant  $\Delta labA$  (B), B128 WT avec ajout de LDN (C), B128 mutant  $\Delta labA$  avec ajout de LDN (D). Coloration des noyaux des cellules gastriques en bleu avec du DAPI, avec Lu pour visualiser la lumière (x400).

Par ailleurs, lorsque l'on observe sur la même coupe, l'adhésion du mutant sur des zones plus profondes exprimant encore MUC5AC mais plus le LDN (76A), on constate que le mutant malgré l'ajout de 25mM de LDN, est encore capable d'adhérer au tissu (76B). Ceci s'explique par le fait que dans cette zone de tissu, il y a présence de Lewis<sup>b</sup> porté par MUC5AC (76C).

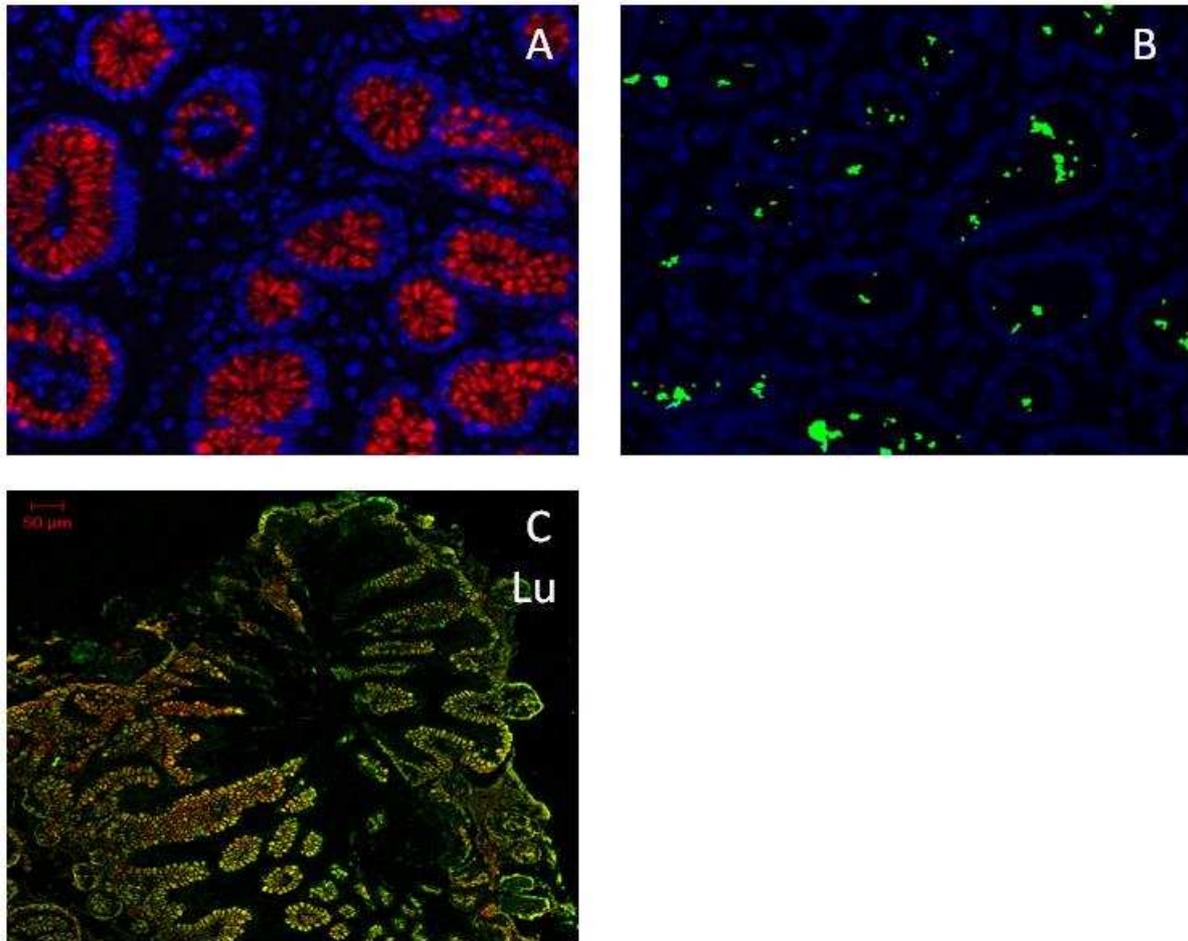


Figure 76 : Zone de muqueuse antrale plus profonde avec expression de MUC5AC (rouge) mais absence de LDN (A). Fixation du mutant  $\Delta labA$  (en vert) avec ajout de LDN (B). Co-expression du Lewis<sup>b</sup> et de MUC5AC sur une coupe antrale (C). Coloration des noyaux des cellules gastriques en bleu avec du DAPI, avec Lu pour visualiser la lumière (x400).

Afin de caractériser la reconnaissance du LDN par LabA, nous avons également développé un test ELISA utilisant des glycanes greffés à du polyacrylamide (PAA) et les bactéries. Nous avons, pour cela, immobilisé du LDN-PAA, du glucitol-PAA comme témoin négatif et du MUC5AC gastrique purifié comme témoin positif. Les bactéries mutantes et sauvages ont ensuite été incubées avec chacune de ces molécules. Après lavages, les bactéries sont révélées avec un anticorps anti-*H. pylori*, lui-même révélé avec un anticorps marqué à la peroxydase en présence d'ABTS. On peut constater, après lecture de la plaque, une bonne fixation de la souche B128 sauvage à la mucine gastrique ainsi qu'une absence de fixation au glucitol (glucose réduit), ceci permettant de valider ce test d'adhésion (Figure 77). Le mutant est incapable, quant à lui, de se fixer sur MUC5AC, le glucitol ainsi que le LDN.

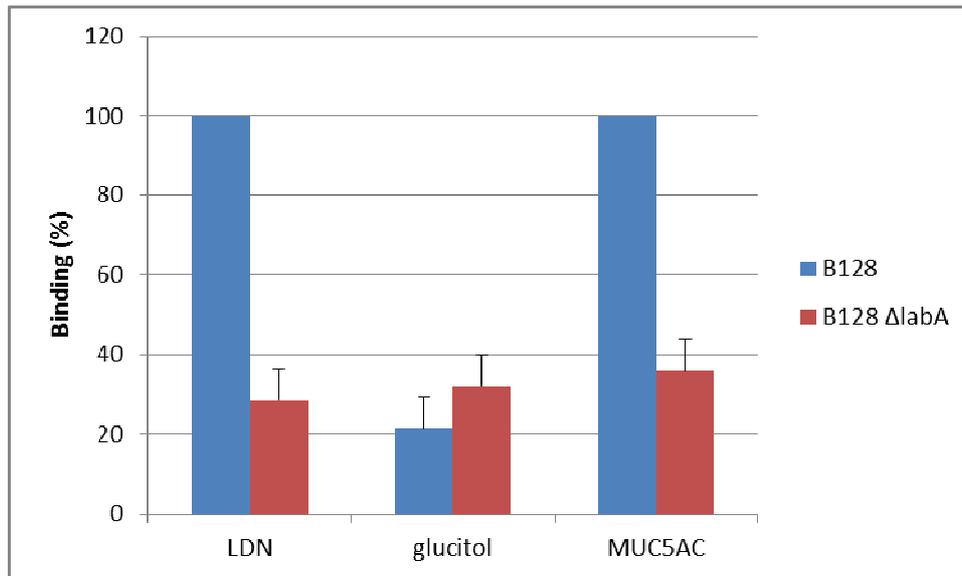


Figure 77 : Evaluation de l'adhésion de la souche de *H. pylori* sauvage et mutée pour LabA vis-à-vis du MUC5AC gastrique, le LDN et le glucitol comme témoin négatif.

### ▪ Expression du LacdiNAc dans l'estomac de différents modèles animaux d'infection à *H. pylori*

L'ensemble de ces résultats démontrent l'importance du LDN dans l'adhésion de *H.pylori* dans l'estomac humain. Cependant, certains modèles animaux ont été développés pour étudier la pathogénèse de cette bactérie. Nous avons donc étudié l'expression du LDN dans l'estomac de souris, rat, singe rhésus, cochon d'Indes et gerbille de Mongolie par immunohistochimie et de porc et souris par analyse de spectrométrie de masse. Les glycanes possédant un ion de m/z 429 ont été listés dans le tableau 18, montrant une quantité importante de motifs différents chez la souris et uniquement deux chez le porc. Dans les deux cas, l'ion m/z 960 trouvé chez l'Homme est présent.

Tableau 18 : Liste des glycanes portant potentiellement un motif LacdiNAc dans les mucines gastriques chez la souris et le porc.

Composition	[M+Na] <sup>+</sup>	Mucines gastriques de porc	Mucines gastriques de souris
2 HexNAc, 1 Hex, GalNAc-ol	814	-	+
2 HexNAc, 1 Hex, 1 Fuc, GalNAc-ol	960	+	+
2 HexNAc, 2 Hex, GalNAc-ol	976	-	+
2 HexNAc, 2 Hex, 1 Fuc, GalNAc-ol	1122	+	+
3 HexNAc, 2 Hex, GalNAc-ol	1179	-	+
3 HexNAc, 2 Hex, 1 Fuc, GalNAc-ol	1325	-	+
4 HexNAc, 3 Hex, GalNAc-ol	1544	-	+
4 HexNAc, 4 Hex, GalNAc-ol	1706	-	+
5 HexNAc, 3 Hex, GalNAc-ol	1747	-	+
4 HexNAc, 3 Hex, 2 Fuc, GalNAc-ol	1836	-	+
4 HexNAc, 4 Hex, 2 Fuc, GalNAc-ol	1982	-	+

La détection du LDN par immunohistochimie a été entreprise initialement sur le singe Rhésus, conjointement à l'expression de MUC5AC. On peut constater une absence de LDN dans l'estomac simien mais une conservation de l'expression de MUC5AC en surface des glandes (Figure 78A). Ceci suggère une organisation de la muqueuse simienne complètement différente de la muqueuse humaine et rend l'utilisation de ce modèle impossible pour l'étude de l'interaction de *H. pylori* avec le LDN. Le cochon d'Indes qui est un autre modèle animal pour étudier les mécanismes d'infection d'*H. pylori*, (Shomer *et al.*, 1998 ; Sturegard *et al.*, 1998) est également exempt de LDN (Figure 78C) ; à l'inverse le rat et la gerbille de Mongolie présentent à la surface de leur muqueuse gastrique du LDN (Figure 78B et D). On peut constater également que l'organisation du tissu gastrique de cochon d'Indes est très différentes des autres tissus, et *a fortiori* humains. On observe une localisation de MUC5AC très diffuse sur tout le tissu avec une absence de cryptes et de rassemblement de vésicules de sécrétions.

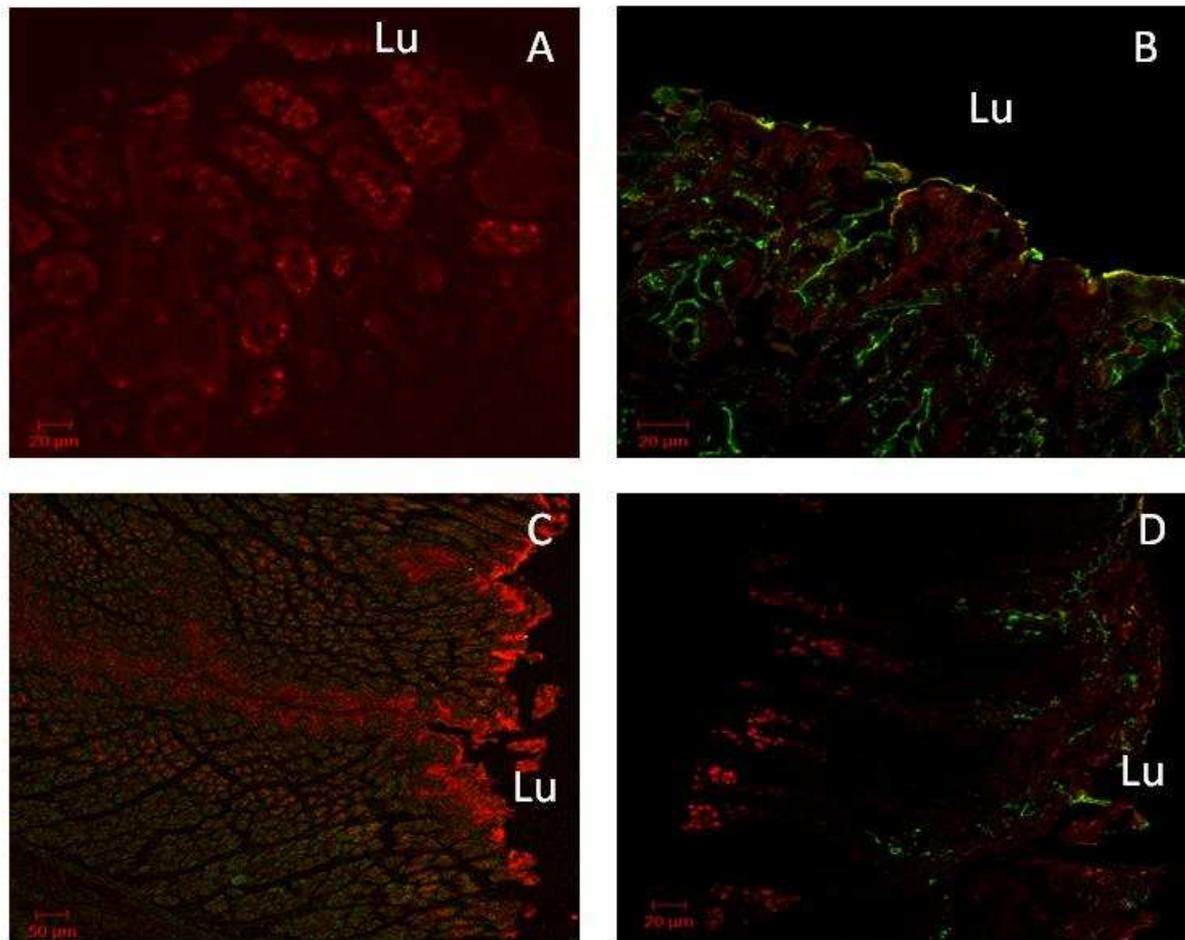


Figure 78 : Immunohistochimie de MUC5AC (rouge) et du LDN (vert) sur le singe rhésus (A), le rat (B), le cochon d'Indes (C) et la gerbille de Mongolie (D). Lu représente la lumière.

### ▪ Etude du profil de glycosylation en cas de métaplasie intestinale gastrique de type 1

Afin d'étudier la dynamique de glycosylation des mucines gastriques humaines lors de pathologies gastriques, nous avons utilisé les données obtenues chez l'adulte sain. Nous avons donc pu obtenir une comparaison du profil chromatographique des *O*-glycanes, entre deux individus adultes ayant ou non une métaplasie intestinale. Le programme utilisé pour l'HPLC permet l'élution des glycanes neutres pendant les 80 premières minutes puis acides jusqu'à son terme (Figure 79). On peut constater une augmentation de la quantité de structures acides en cas de métaplasie (IM) puisque la surface des pics acides est plus importante et qu'il y a une augmentation du nombre de pics. Parallèlement à cela, on peut observer, hormis pour le groupe O, que les structures neutres sont éluées plus rapidement en cas de métaplasie, laissant penser à une simplification des motifs. Ceci a été confirmé par analyse par

spectrométrie de masse qui a permis de mettre en évidence une diminution de la quantité de motifs glycanique de groupes sanguins A et B à la faveur du groupe O.

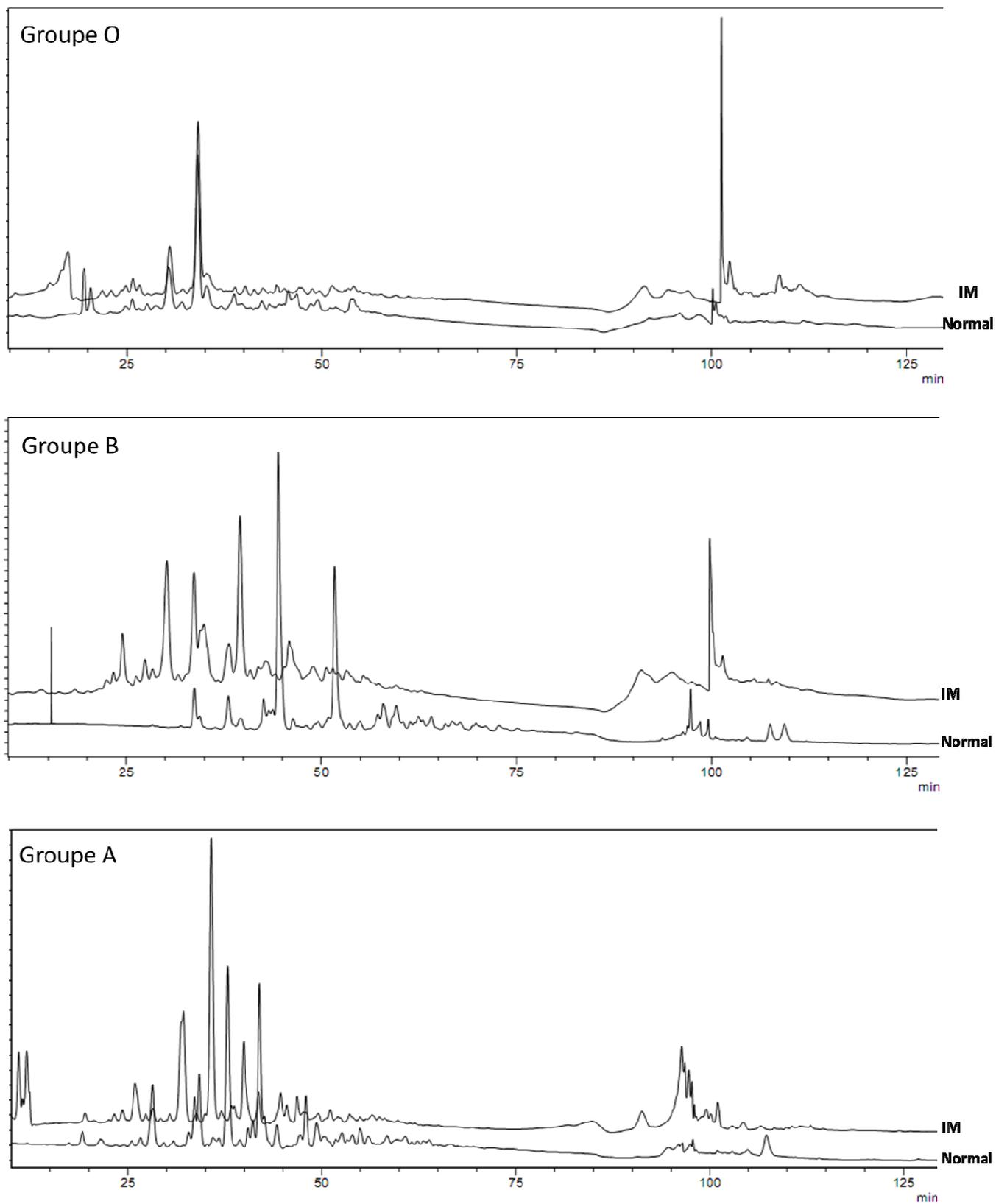


Figure 79 : Profils HPLC des oligosaccharides gastriques provenant d'individus adultes sains et avec métaplasie intestinale. Comparaison pour chaque même groupe sanguin d'échantillon avec (IM) et sans (Normal) métaplasie intestinale.

L'analyse par spectrométrie de masse a également permis de caractériser les glycanes quantifiés par HPLC permettant de mettre en évidence une variation du motif glycanique portant du LDN, de 6-7% chez l'adulte sain à 2-3% chez les patients présentant une métaplasie, comme décrit par immunohistochimie. Hormis cela, peu de variation d'expression des Lewis et de l' $\alpha$ GlcNAc terminale ont été observés (Figure 80).

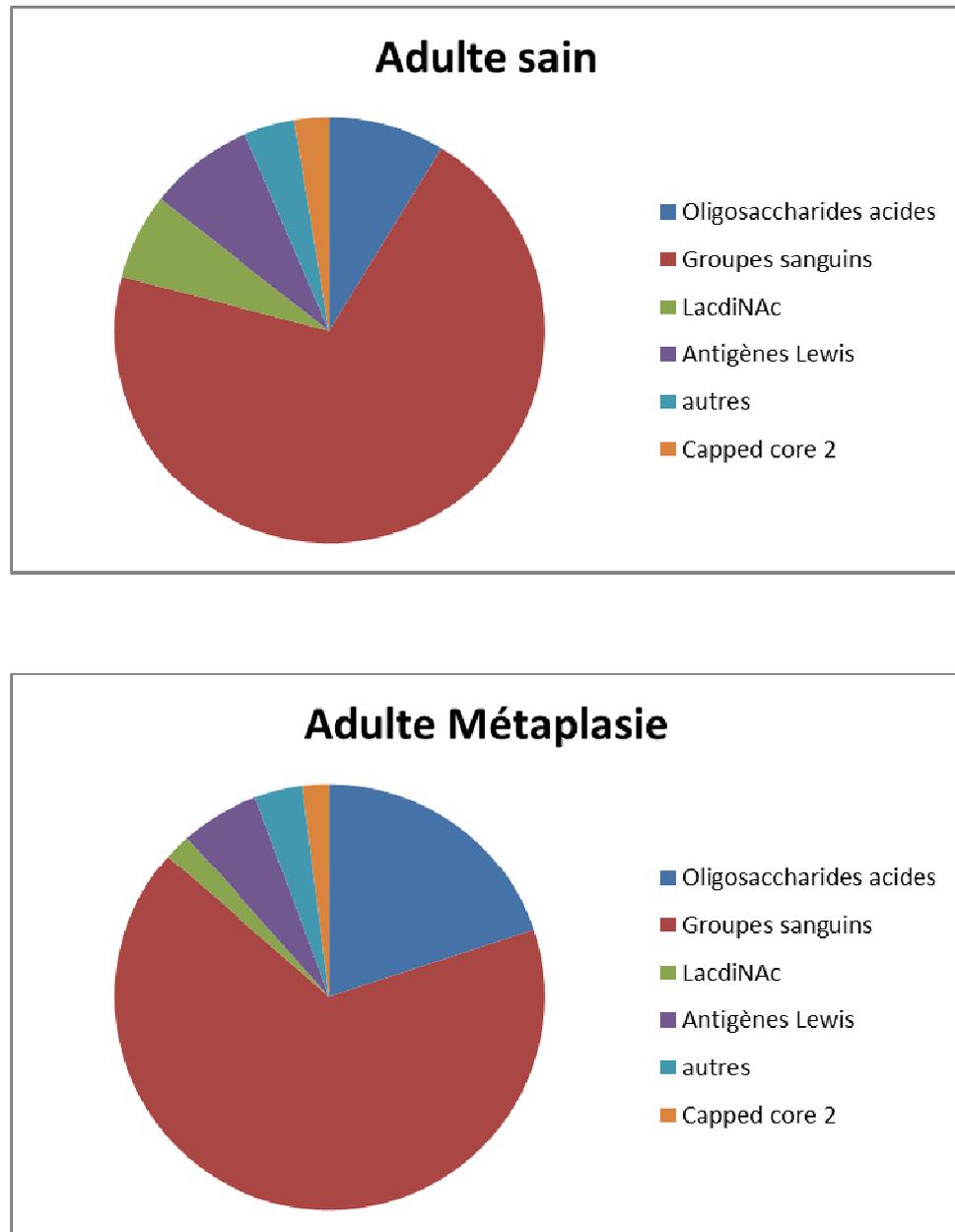


Figure 80 : Répartition oligosaccharidique des mucines gastriques de patients sains et atteints de métaplasie intestinale.

# *Discussion*

*MUC5AC et Helicobacter pylori*

Ce travail a permis d'une part de caractériser le profil *O*-glycanique exhaustif des mucines gastriques humaines et d'autre part l'implication d'un nouveau motif glycanique dans l'adhésion de *Helicobacter pylori*. Ce glycane n'a jamais été détecté auparavant sur des mucines humaines.

Très peu d'analyses de la *O*-glycosylation des mucines gastriques ont été réalisées jusqu'à maintenant. Les travaux de Hanisch *et al.* ont démontré l'absence d'expression de core portant le motif Gal $\beta$ 1-6GalNAc et la prédominance des cores 1, 2 et une faible expression du core 3 chez l'Homme adulte. Cette étude a mis en évidence l'existence de 30 oligosaccharides neutres différents par spectrométrie de masse (Hanisch *et al.* 1993). Au cours de mon travail de thèse, plus de 60 structures neutres ont été identifiées grâce à la sensibilité plus grande du spectromètre de masse nano-ESI par rapport à des approches RMN ou des techniques de spectrométrie de masse de type trappe ionique. Cependant, les structures déterminées par Hanisch *et al.* ont été à nouveau identifiées durant notre travail avec la même prédominance pour le core 2, mais moins nette pour le core 1. D'autres travaux ont identifié une structure composée d'un résidu de GlcNAc lié en  $\alpha$ 1-4 à un résidu de  $\beta$  Gal, portée par MUC6 dans les glandes gastriques et les glandes de Brunner duodénales (Nakamura *et al.* 1998 ; Kawakubo *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2008). Cette structure a également été retrouvée dans notre étude mais à un faible pourcentage (2 à 3%). Ce motif est impliqué dans l'inhibition de la croissance de *H. pylori* car il entre en compétition avec un enzyme responsable de la synthèse de la paroi bactérienne.

D'autres types d'analyses, mettant en jeu des lectines ou des anticorps, ont mis en évidence par histochimie, la présence de motifs fucosylés et des groupes sanguins dans l'estomac humain, avec par exemple l'utilisation de la lectine DBA qui marque les épitopes de groupe A et l'UEA reconnaissant les résidus de L-fucose terminaux (Jiang *et al.* 2004) ou encore la présence des antigènes de type Lewis à l'aide d'anticorps (Sakamoto *et al.*, 1989). Ces approches ont l'inconvénient de révéler la glycosylation totale, sans faire de distinction concernant la protéine qui la porte ou encore le type de glycosylation (*N*- ou *O*-). La plupart des structures périphériques déterminées par analyse histochimique ont été retrouvées dans notre étude et confirmées par RMN, à l'exception des antigènes Lewis de type 2, suggérant que ces motifs sont portés par d'autres types de molécules que les mucines.

Parmi toutes les structures identifiées dans ce travail, la majorité sont neutres et fucosylées (plus de 85%), très peu de structures sont sialylées (entre 5 et 10%) et aucun résidu

sulfaté n'a été détecté. Ce dernier résultat n'est pas en corrélation avec la *O*-glycosylation des mucines gastriques de rat fortement impactée dans leur diversité par le sulfate (Van Beurden-Lamers *et al.* 1989). L'absence de résidus acides dans la muqueuse gastrique adulte est connue de longue date par les anatomopathologistes qui utilisent la coloration au bleu alcian sans succès dans cet organe. Le bleu alcian réagit avec les groupements acides des acides sialiques et des sulfates (Sheahan & Jervis, 1976). La faible représentativité de résidus d'acide sialiques et l'absence de sulfates peuvent être expliquées de différentes façons. Ces résidus acides sont connus pour être très impliqués dans l'interaction hôte/pathogène, soit pour protéger l'hôte en lui conférant une résistance aux protéases bactériennes soit en facilitant la mise en place de la flore commensale (Corfield *et al.*, 1992 ; Lu & Walker, 2001 ; Martens *et al.*, 2009). Cependant l'estomac humain, de par son acidité extrême, ne permet pas une colonisation bactérienne durable, excepté pour *H. pylori*. La flore bactérienne ne représente que  $10^3$  à  $10^4$  bactéries/mL dans l'estomac adulte humain alors que chez le rat, dont le pH gastrique est plus élevé,  $10^5$  à  $10^6$  bactéries/mL sont trouvées (Dethlefsen *et al.* 2007). Par ailleurs, d'un point de vue purement chimique, le faible pH gastrique entraîne une protonation du sulfate et des groupes carboxyliques, qui diminue la stabilité de ces molécules en entraînant une répulsion des différents groupes chargés.

Parallèlement, nous avons comparé le profil de glycosylation de patients atteints de métaplasie intestinale gastrique de type 1 par profil HPLC et spectrométrie de masse. Nous avons pu constater d'une part l'apparition de motifs glycaniques portant des acides sialiques et d'autre part la diminution de la complexité des glycanes neutres. En effet, on peut observer chez les patients ayant les groupes sanguins A et B, une diminution drastique de la quantité de motifs portant ces groupes sanguins, et ce, en faveur du groupe O. L'apparition des motifs acides dans les métaplasie de type 1 a déjà été décrit (Silva *et al.*, 2002). Par contre, aucune étude n'a actuellement mis en évidence la prédominance des antigènes de groupe sanguin O dans cette pathologie. Cette observation a été possible grâce à l'utilisation d'un programme d'HPLC, développé durant ma thèse et visant à optimiser la séparation des structures neutres contenues dans l'estomac. Ce résultat suggère l'importance du groupe O dans l'homéostasie du tissu gastrique stressé et ouvre la perspective d'études visant à mieux appréhender l'importance de ce phénotype. D'autre part, les tissus utilisés lors de l'étude sont certes atteints de métaplasie mais comporte également de larges zones saines. Comme l'augmentation du groupe O est clairement observée sur l'ensemble du tissu, on peut supposer que ceci va faciliter la fixation de *H. pylori* de par l'implication du fucose dans l'adhésion

bactérienne (Falk *et al.*, 1993 ; Boren *et al.*, 1993 ; Liu *et al.*, 2009). A l'inverse, ceci ne peut pas être envisagé dans les zones métaplasiques, puisqu'il est décrit qu'elles ne permettent pas l'adhésion de *H. pylori* (Reis *et al.*, 1999 ; Teixeira *et al.*, 2002).

La découverte la plus surprenante de ce travail est la mise en évidence de la succession de deux *N*-acétyl hexosamines portées par des *O*-glycanes et représentant 7% de la totalité des motifs glycaniques gastriques. Ce motif a été identifié par RMN comme étant le N,N'-diacetyllactosédiamine ou LacdiNAc (LDN), consistant en l'enchaînement d'une GlcNAc, reliée à une GalNAc terminale en  $\beta$ 1,4. Le LDN a déjà été caractérisé sur des parasites de l'Homme, du genre *Schistosoma* (Neeleman *et al.*, 1994), et serait impliqué lors de l'invasion par ce parasite dans la réaction inflammatoire (van den Berg, *et al.*, 2004). Il est même capable, à lui seul, d'induire une réaction immunitaire chez un modèle murin de granulomes (Van de Vijver *et al.*, 2006).

Cependant, le LDN a été trouvé chez l'Homme sur les *N*-glycanes de certaines glycoprotéines et glycohormones comme la lutropine (LH), thyrotropine (TSH), la glycodéline-A (Pierce & Parsons, 1980 ; Smith & Baenziger, 1988 ; Dell *et al.*, 1995 ; Manzella *et al.*, 1996) et la TFP1 (tissue factor pathway inhibitor) produite par les cellules HEK 293 (Smith *et al.*, 1992). Les enzymes capables de transférer un résidu de GalNAc sont au nombre de 9 et sont qualifiés de  $\beta$ 4GalNAc-Ts. Ils peuvent être classés en trois sous-groupes. Le premier comportant des gangliosides synthases GM2/GD2 et la Sda/Cad synthase (Yamashiro *et al.*, 1995 ; Dohi *et al.*, 1996). Le second sous-groupe contient deux chondroïtines sulfates *N*-acétylgalactosaminyltransférases et 3 chondroïtines sulfates synthases (Uyama *et al.*, 2002 ; Yada *et al.*, 2003). Ces enzymes transfèrent un résidu de GalNAc sur un résidu d'acide glucuronique en  $\beta$ 1,4 et aucune des cinq ne transfère un résidu de GalNAc sur un résidu de GlcNAc. Le troisième et dernier groupe contient deux membres capables de transférer une GalNAc, la  $\beta$ 4GalNAc-T3 et la  $\beta$ 4GalNAc-T4 (Sato *et al.*, 2003 ; Gotoh *et al.*, 2004). Ces deux enzymes peuvent transférer du GalNAc depuis l'UDP-GalNAc sur la GlcNAc avec une liaison en  $\beta$ 1,4 sur des *N*- et *O*-glycanes. Les ARNm de la  $\beta$ 4GalNAc-T3 ont été détectés dans l'estomac et le côlon, alors que les transcrits de la  $\beta$ 4GalNAc-T4 ont été détectés dans le cerveau, les ovaires et les glandes mammaires. Ceci fait de la  $\beta$ 4GalNAc-T3 le meilleur candidat pour l'enzyme capable de synthétiser le LDN dans l'estomac. Une étude histochimique utilisant une lectine, la *Wisteria floribunda* agglutinin (WFA) a permis d'étudier la localisation du LDN gastrique humain. Or, cette lectine a été décrite pour réagir préférentiellement avec du GalNAc terminal porté par les *N*-

glycanes (Mengeling *et al.*, 1991) et reconnaissant le Sda/Cad des O-glycanes (Ikehara *et al.*, 2006). Dans l'estomac, la WFA réagit à la surface du tissu, co-localisant avec les mucines. L'auteur suggère ainsi que le LDN serait porté par des O-glycoprotéines hormonales gastriques ou directement par les mucines (Ikehara *et al.*, 2006). Dans notre étude, nous apportons la preuve formelle que le LDN est porté par les mucines gastriques et uniquement par MUC5AC donc en surface de l'épithélium. Cette localisation fait potentiellement du LDN un récepteur glycanique de choix pour *H. pylori*, d'autant qu'il est retrouvé chez tous les patients et en plus grande quantité que le Lewis<sup>b</sup> (2 à 3%). De futures études pourront se focaliser sur la variabilité de l'expression du LDN au cours de l'infection par *H. pylori*, comme déjà démontré pour les groupes sanguins et les antigènes Lewis (Linden *et al.*, 2008).

Après avoir démontré l'interaction entre le LDN et différentes souches d'*H. pylori* dont le génome est entièrement séquencé pour chacune, nous avons pu identifier l'adhésine reconnaissant le LDN, faisant de HopD une nouvelle adhésine dont le ligand est connu et que l'on a rebaptisé LabA. La conception du mutant sur la souche B128 n'a fait que conforter ce résultat puisque les analyses d'adhésion sur tissus et par test ELISA ont démontré une perte de fixation sur le LDN ou dans les zones histologiques portant le LDN. Cette découverte ouvre de nombreuses perspectives sur la régulation de l'expression de l'adhésine dans différents souches de *H. pylori* et dans des conditions pathologiques variables. LabA, peut en tout état de cause, être une cible potentielle dans l'inhibition de la colonisation bactérienne. Par ailleurs, la spécificité de LabA vis-à-vis du LDN pourrait expliquer, conjuguée à d'autres facteurs de virulences, le tropisme d'organe de *H. pylori*. Cette hypothèse est étayée par la démonstration de l'absence du LDN dans tous les tissus testés et sécrétant des mucines, mais aussi par l'absence de LDN dans les métaplasies intestinales de type 1 et dans le cardia ; puisque les cancers du cardia ne sont pas corrélés à la présence de *H. pylori* (Parsonnet *et al.*, 1991). L'expression du LDN est également observée dans les tissus duodénaux touchés par une métaplasie gastrique, ce qui est en adéquation avec la fixation de *H. pylori* (Carrick *et al.*, 1989).

L'expression du LDN dans différents types de tissus gastriques animaux est une bonne façon de déterminer quels modèles utiliser pour étudier l'implication de LabA dans la pathologie. Le Cochon d'Indes et le singe Rhésus sont les deux modèles n'exprimant pas le LDN, à *contrario* la souris, le rat, le porc et la gerbille l'expriment. L'analyse par spectrométrie de masse a été réalisée sur le rat, la souris et le porc et a permis de révéler que seul le porc possédait un seul motif de LDN, comme chez l'Homme, avec la même structure.

Ce qui sous-entend une interaction plus difficile à étudier chez les modèles murins. Cependant, une étude chez la gerbille reste pertinente et plus facile à mettre en place que chez le porc, puisqu'elle est considérée comme l'un des meilleurs modèles d'infection à *H. pylori* (Hirayama *et al.*, 1996 ; Sugiyama *et al.*, 1998). L'absence de LDN chez le cochon d'Indes et le singe Rhésus, dont seul le second modèle est un hôte naturel de *H. pylori* (Dubois *et al.*, 1994), démontre l'adaptation de la bactérie à son hôte et pour la première fois une différence notable dans le mécanisme d'infection entre l'Homme et le singe. Contrairement au singe, tous les autres modèles animaux utilisés nécessitent l'adaptation de souches initialement isolées d'échantillons humains (Marchetti *et al.*, 1995). L'adaptation de la bactérie à cette grande variété d'hôtes repose sur la grande plasticité de son génome qui lui permet notamment de produire ou non ses adhésines (Solnick *et al.*, 2004 ; Dossumbekova *et al.*, 2006). On peut donc penser que selon le même principe *H. pylori* est capable de s'adapter à l'environnement gastrique de singe. En outre, de récents travaux ont décrit une variation du profil glycanique induite par l'infection à *H. pylori* chez le singe Rhésus (Cooke *et al.*, 2009). Le LDN pourrait donc être induit durant l'infection bactérienne pour renforcer son adhésion et absent de la muqueuse non infectée. Les premières étapes d'adhésions seraient possibles grâce aux antigènes de type Lewis présents dans l'estomac de singes sains (Linden *et al.*, 2008). Le cochon d'Indes est également considéré comme un bon modèle par certains auteurs (Shomer *et al.*, 1998 ; Sturegard *et al.*, 1998), cependant son organisation tissulaire gastrique, en plus de l'absence de LDN, en fait un modèle très éloigné de la physiologie humaine.

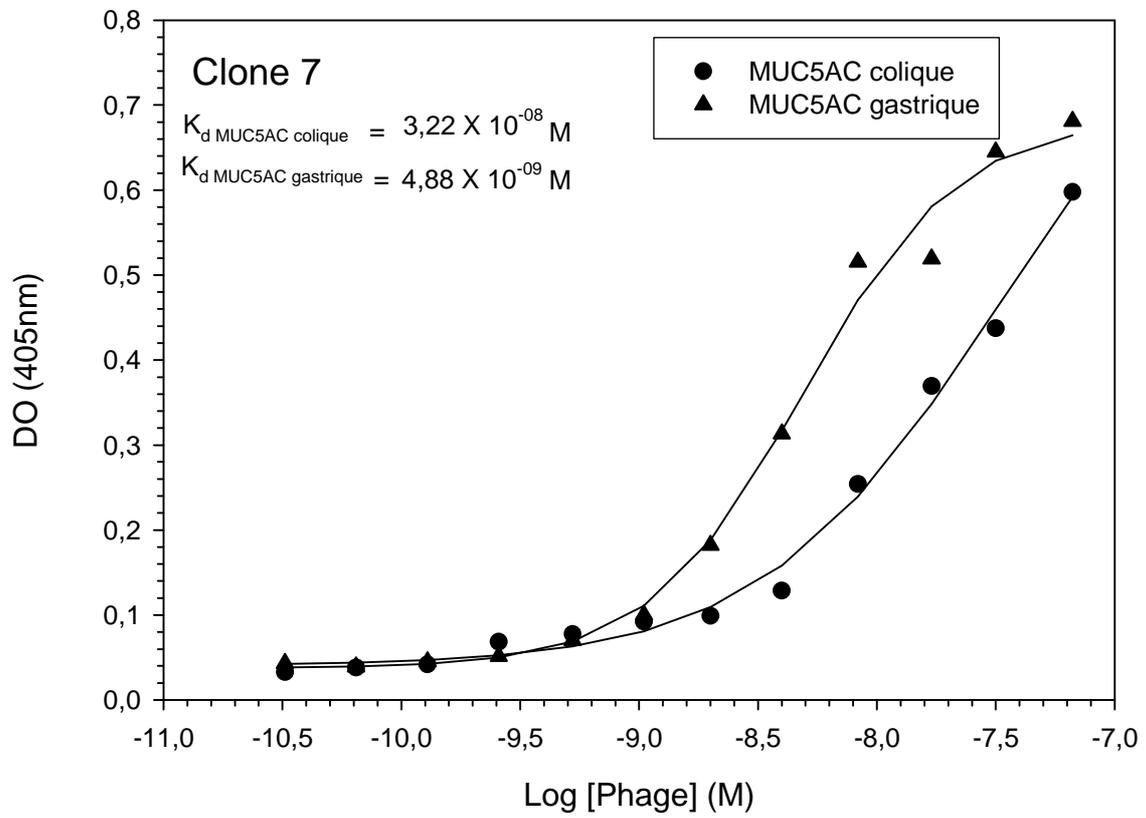
Un autre constat intéressant, que nous avons fait en testant différents tissus humains, est la présence, lors d'un CCR exprimant MUC5AC, de molécules portant du LDN en marge des vésicules de sécrétion. Ceci suggère un rôle important du LDN, porté par d'autres glycoprotéines, dans l'homéostasie du CCR et dont la fonction reste à élucider. Cependant, l'analyse d'autres tissus coliques pathologiques devra être réalisée vis-à-vis de l'expression du LDN. L'implication du LDN dans des phénomènes de différenciation cellulaire est renforcée par les résultats de l'étude immunohistochimique des tissus gastriques fœtaux, où l'on observe un changement de localisation du glycane entre l'estomac adulte et fœtal. Le LDN est présent en surface de la muqueuse gastrique chez l'adulte, tandis que chez le fœtus, le LDN est présent majoritairement dans une zone intermédiaire. Dans la littérature, l'étude de l'expression des antigènes de type Lewis au cours de développement fœtal, a permis de mettre en évidence un changement de localisation des Lewis de type 1 et de Type 2. Les Lewis de type 1 sont localisés chez l'adulte, plutôt en surface de la muqueuse et portés par MUC5AC,

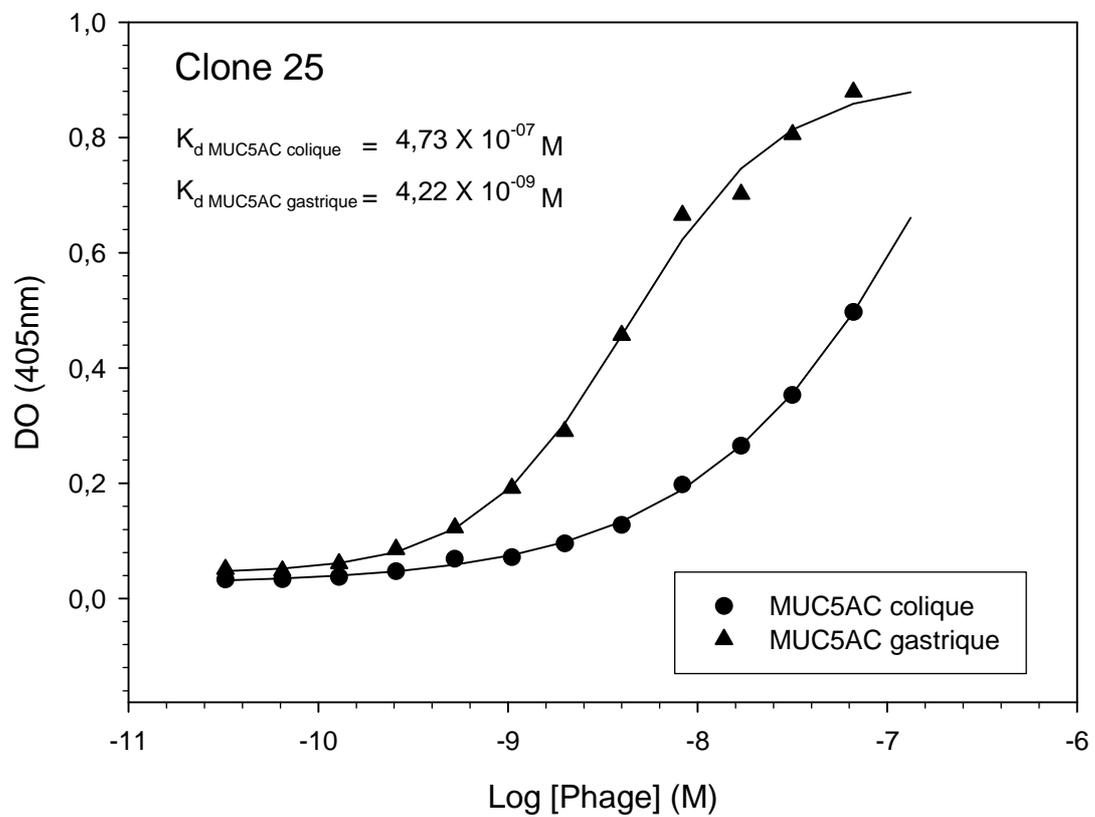
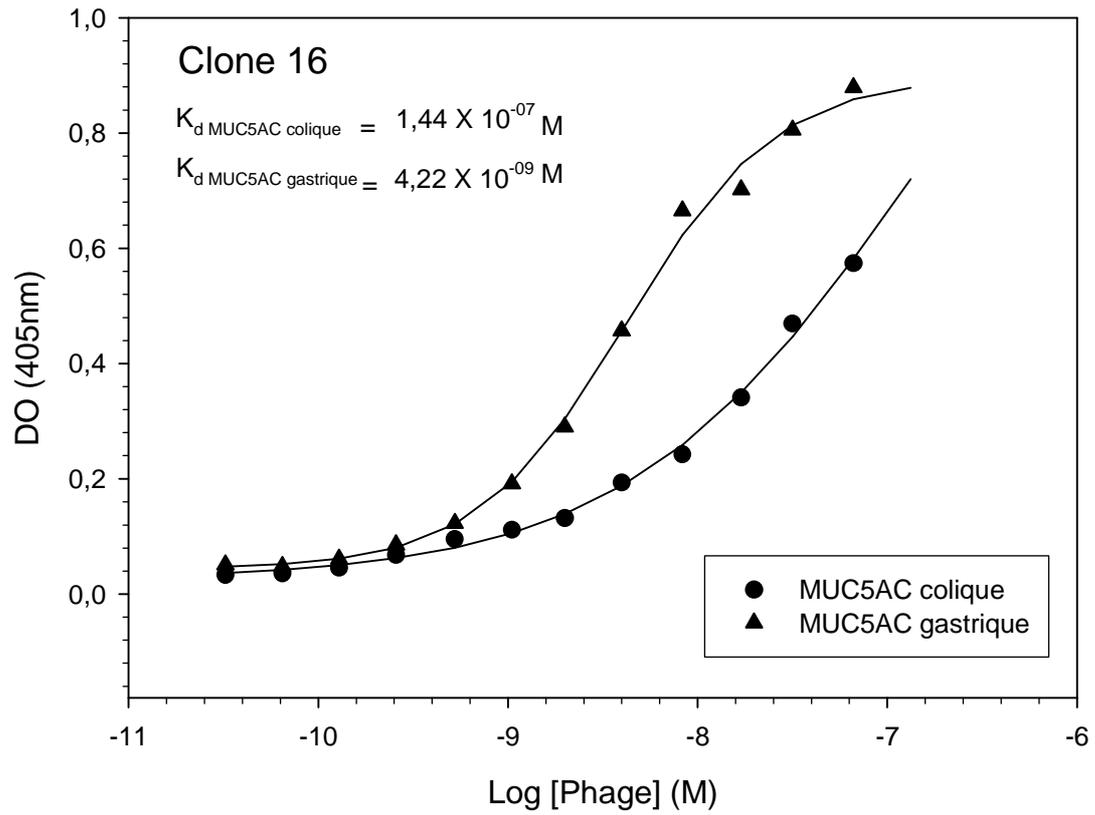
alors que les antigènes de type 2 se situent au fond et portés par MUC6. Il apparaît que chez le fœtus, les mucines portent chacun des types de Lewis différents, et qu'ensuite la distribution des Lewis mime celle de l'adulte lorsque le fœtus s'approche du terme (López-Ferrer *et al.*, 2001).

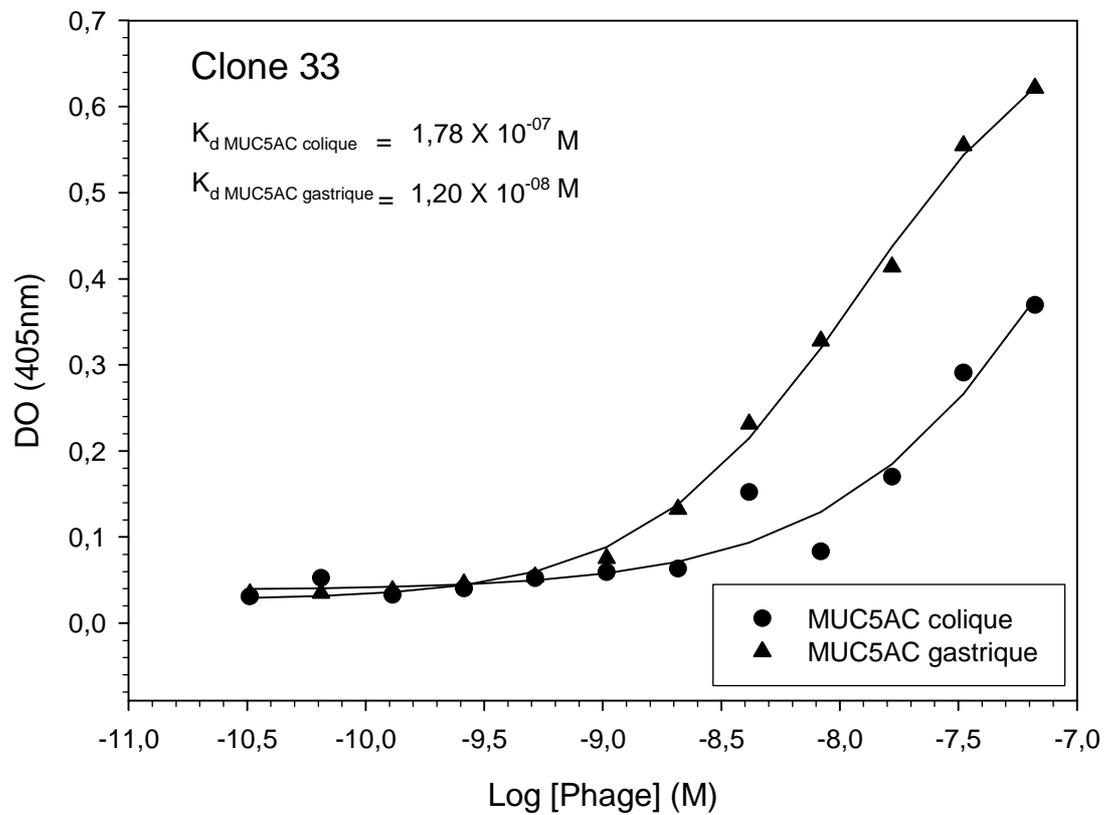
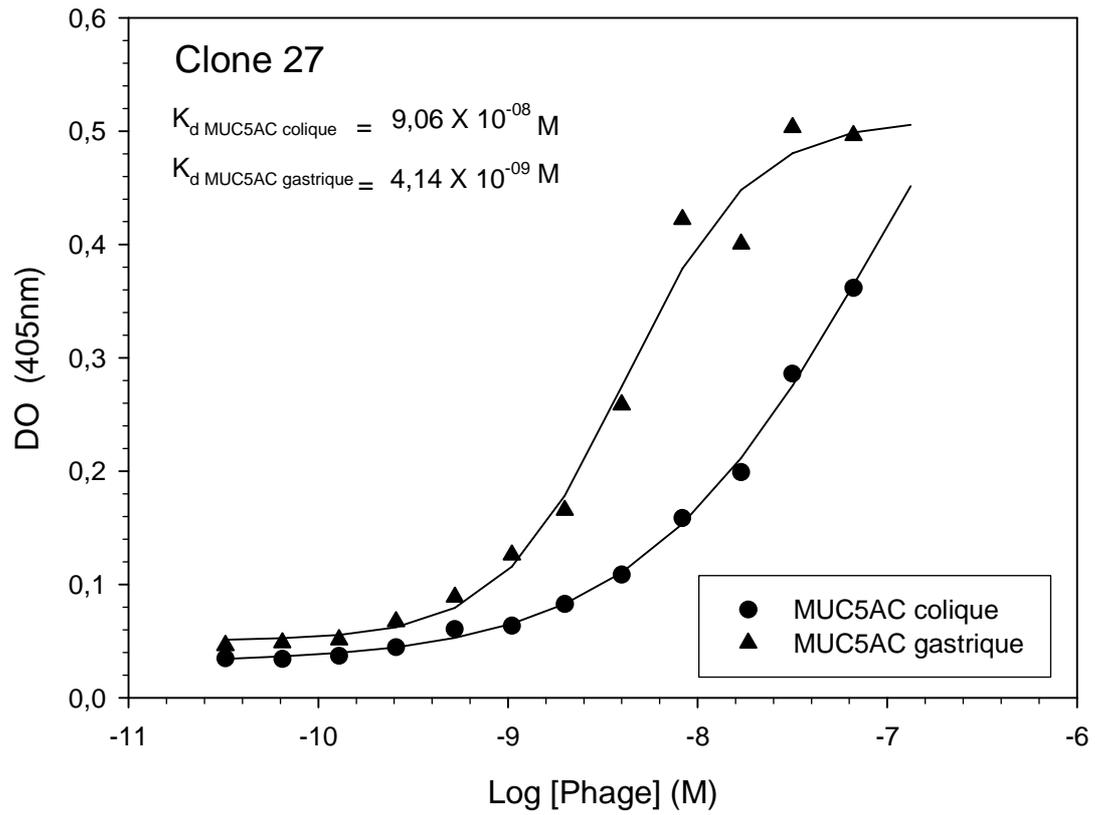
L'ensemble de ces résultats démontrent d'une part, l'importance des mucines dans l'interaction hôte/pathogènes et en particulier les glycanes qu'elles portent. Et d'autre part, ce travail ouvre de nombreuses perspectives dans l'étude de l'implication d'un nouveau motif glycanique porté par les mucines gastriques dans différents phénomènes pathologiques (cancer) et physiologiques (développement).

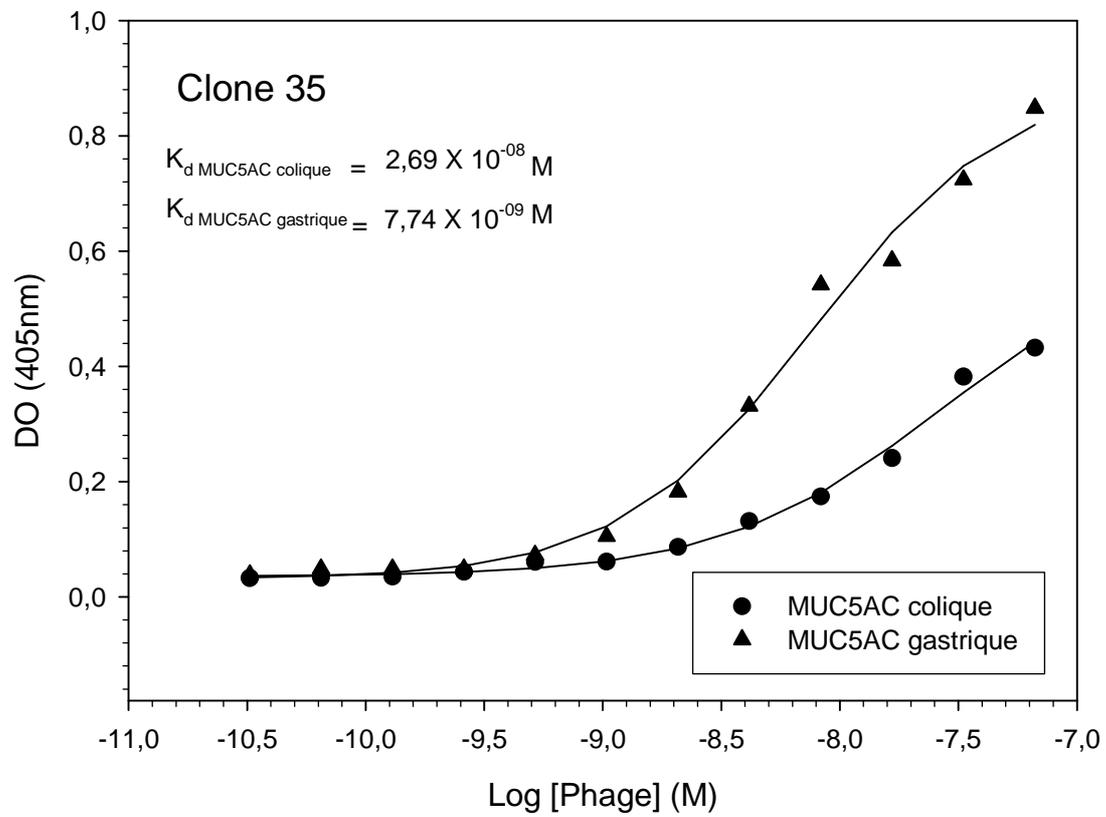
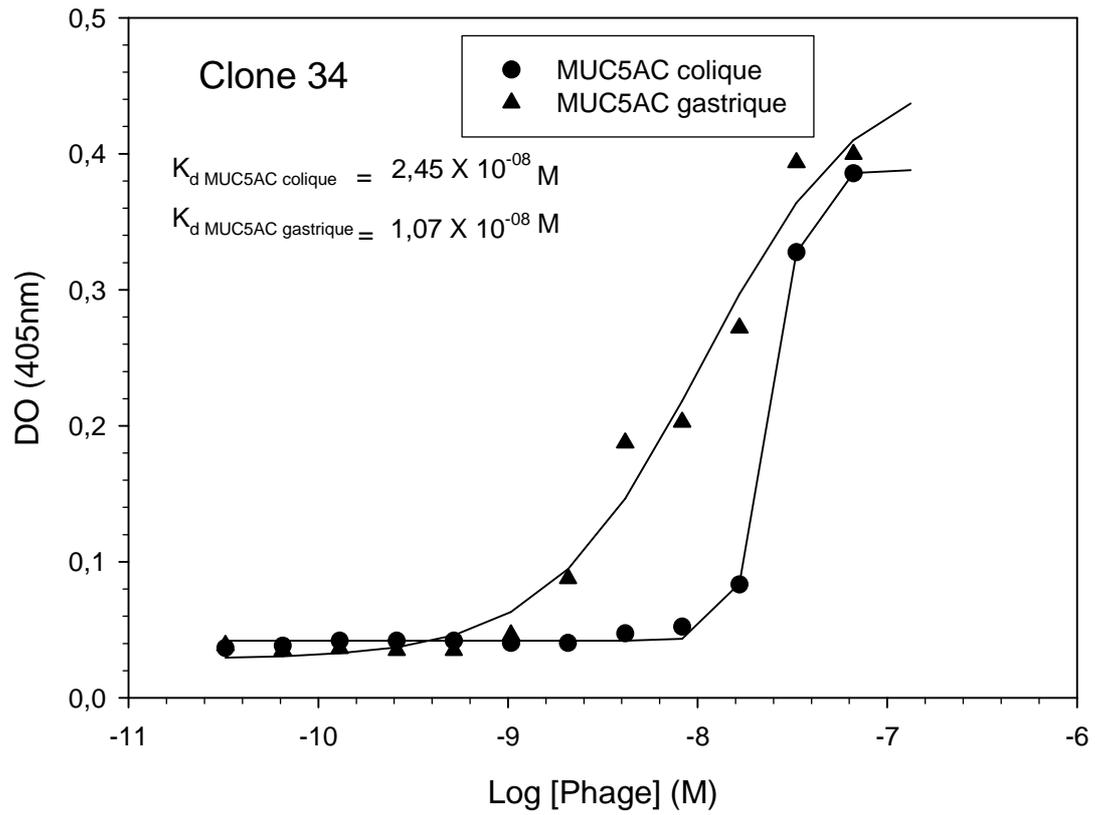
## *Annexes*

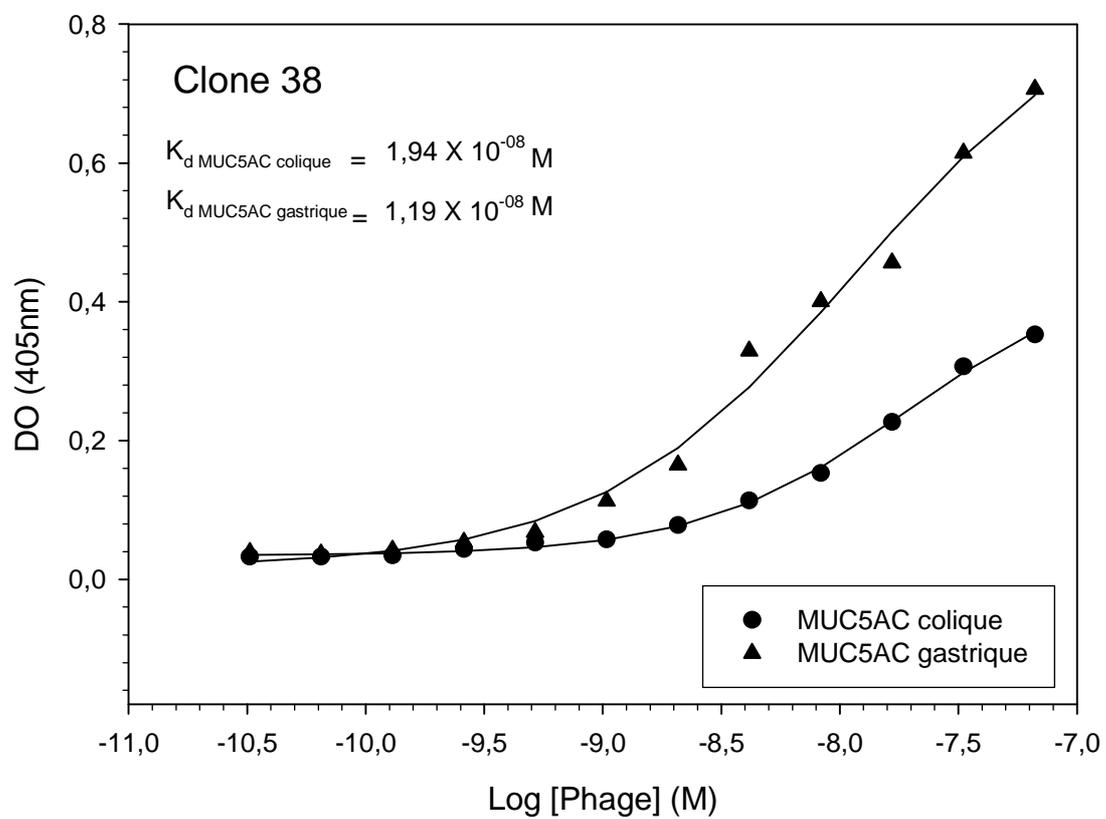
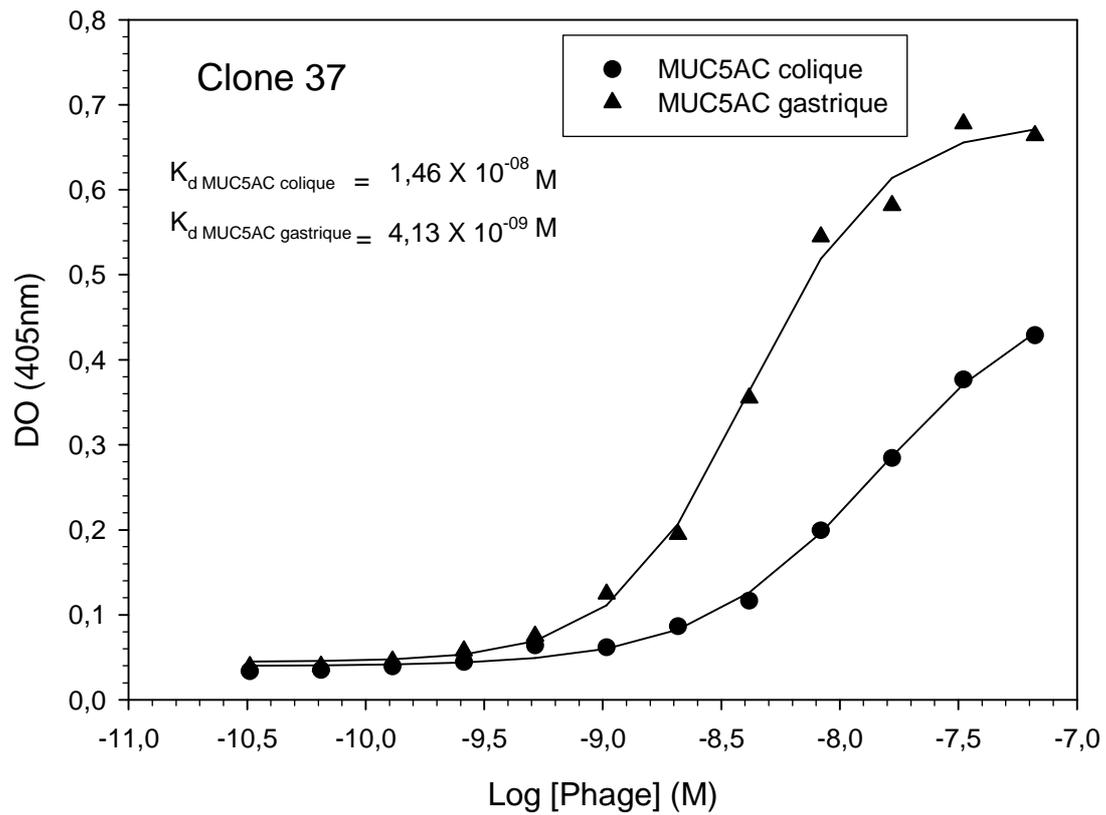
**Annexe 1 : Courbes de titration ayant servi au calcul de  $K_d$  pour chaque clone.**

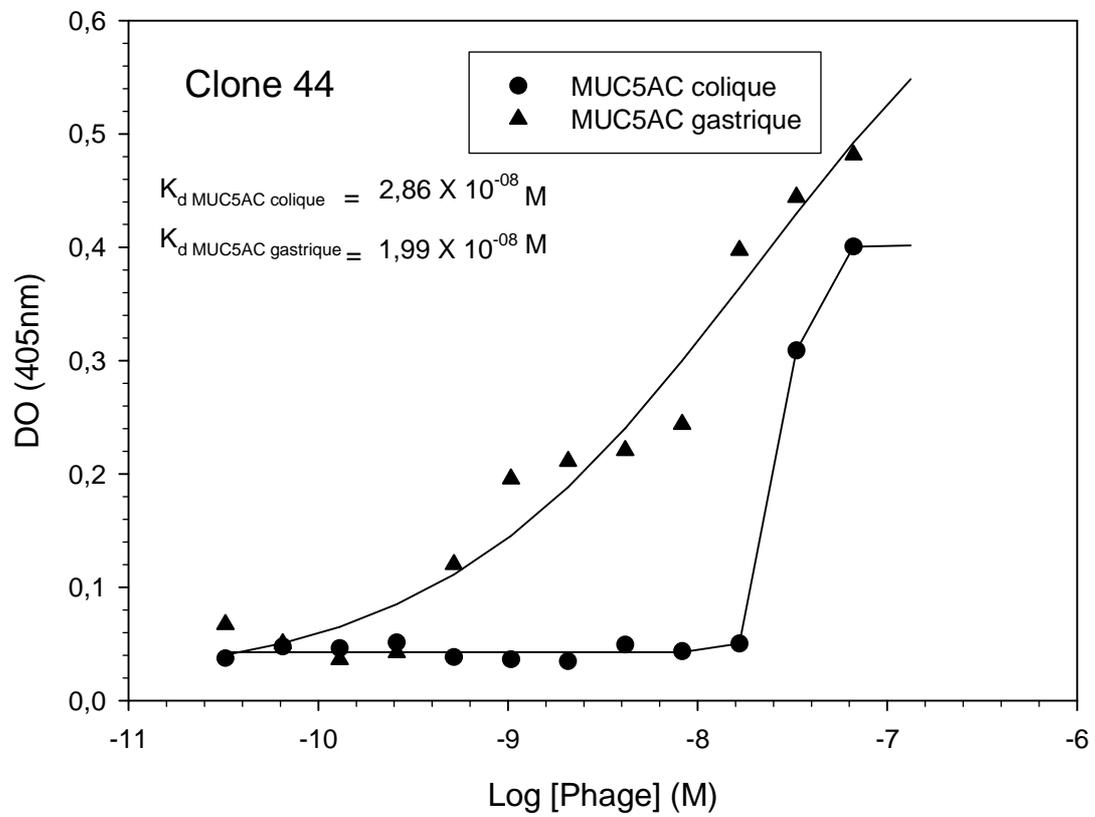
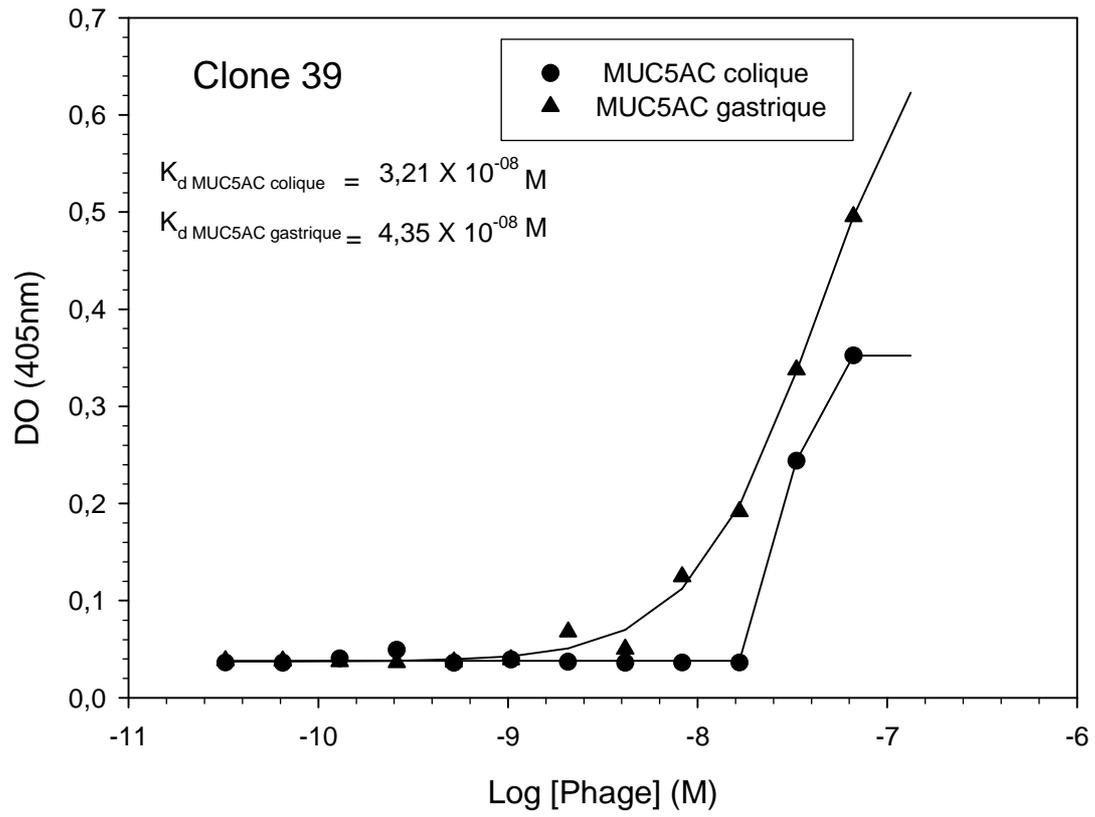


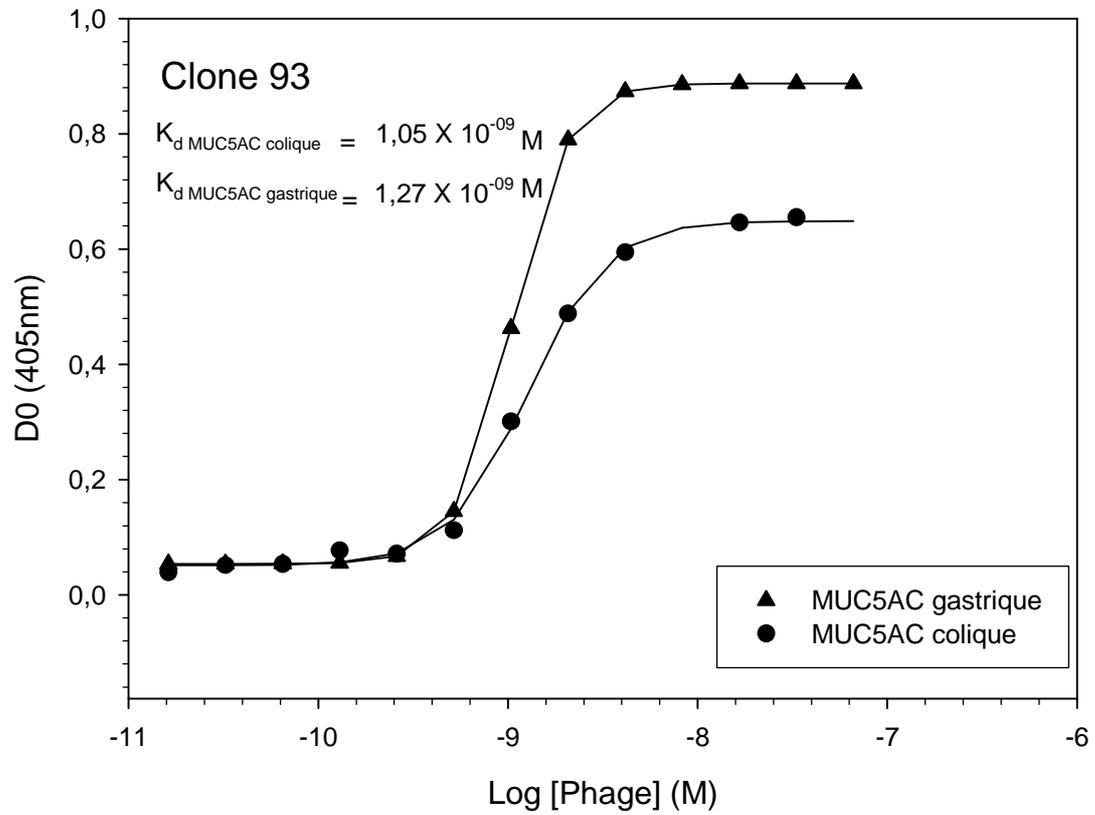
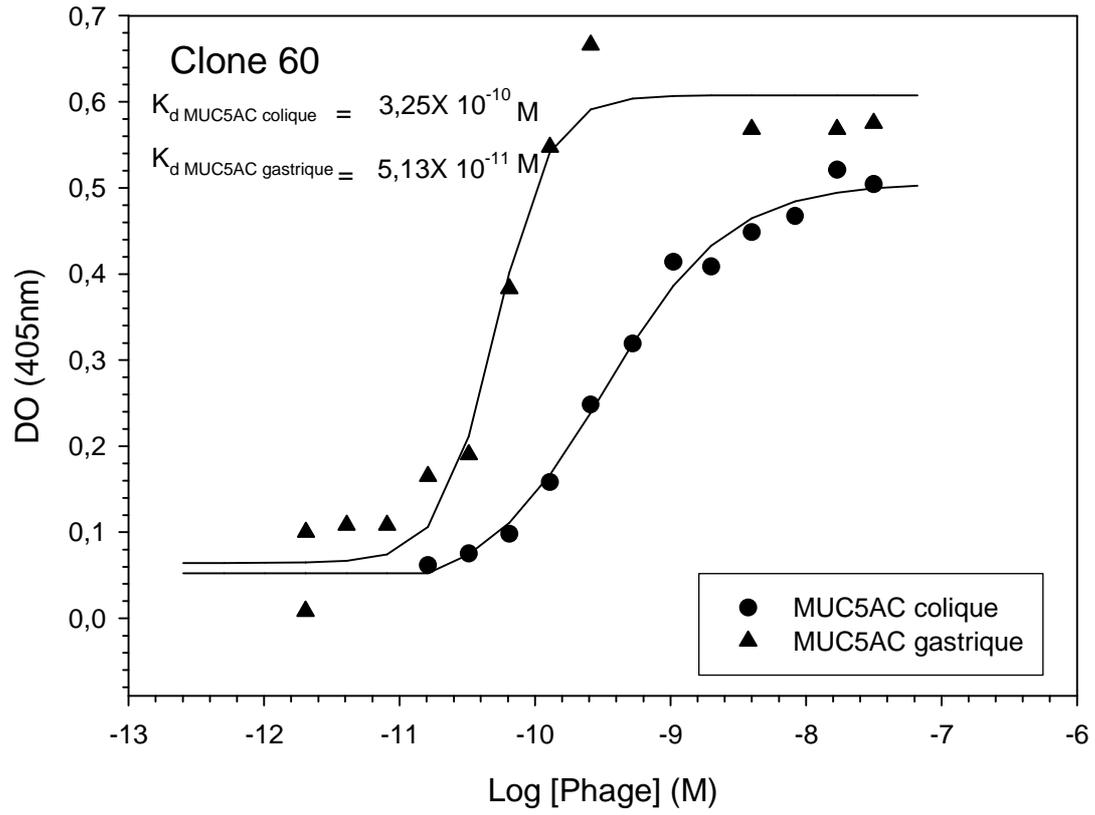












**Annexe 2 : Déplacements chimiques de l'ion m/z 960 identifié par spectrométrie de masse en mode positif.** La valeur H1/C1 du résidu GalNAc-ol correspond à ses atomes H1 et H1'. Les protons méthyléniques des groupes NAc des hexosamines résonnent à 2.070 (III'), 2.053 (II') et 2.050 (I) ppm respectivement. Tous les atomes de carbone méthylenique résonnent à 23.7 ppm.

Atomes Résidus	Atomes					
	H-1/C-1	H-2/C-2	H-3/C-3	H-4/C-4	H-5/C-5	H-6,6'/C-6
GalNAc-ol (I)	3.78/62.1	4.401/52.8	4.080/ <b>74.3</b>	3.500/70.3	4.253/69.4	3.9,3.7/ <b>72.5</b>
Gal(β1-3) (II)	4.569/103.3	3.678/ <b>80.8</b>	3.876/73.6	3.924/70.2	3.735/76.5	3.86/61.8
GlcNAc(β1-6) (II')	4.548/103.1	3.760/56.2	3.711/74.1	3.627/ <b>80.6</b>	3.530/76.0	3.86,3.67/61.7
GalNAc(β1-4) (III')	4.517/103.3	3.939/54.0	3.750/72.1	3.942/69.3	3.728/76.5	3.65,3.55/64.0
Fuc(α1-2) (F)	5.220/102.7	3.783/73.7	3.811/71.0	3.838/73.4	4.274/69.8	1.244/17.1
SOACS index (Maes <i>et al.</i> , 2009)	18.854					
SOACS-ol index	23.255					

**Annexe 3 : Peptides caractérisés par protéomique ayant permis l'identification de l'adhésine bactérienne LabA.** En vert, les peptides ont été séquencés.

10	20	30	40	50	60
MKKKFLSLTL	GSLLVSALSA	EDNGFFVSAG	YQIGESAQMV	KNTKGIQDLS	DSYERLNNLL
	70	80	90	100	110
TSYSALNTLI	RQSADPNAIN	NARGNLNASA	KNLINDKTNS	PAYQAVLLAL	NAAAGLWQVM
	130	140	150	160	170
SYSISVCGPG	SDKNKNGGVQ	TFENVPANGE	TTITCDSFYE	PGKWSAISTE	NYAKINKAYQ
	190	200	210	220	230
IIQKAFGASG	KDIPALSDTK	ELNFEIKGKK	NDNAQPGERW	KFPWTNGEFV	SIKVVNGTYT
	250	260	270	280	290
ETKEDIK	NAQELLKQAS	TILTTLNEAC	PWLSNGGAGG	VGGGNSLWVG	IDKGDGSACG
	310	320	330	340	350
IFKNEISAIQ	DMIKNAEIAV	EQSKIIVAANA	QNQHNLDTGK	TFNPYKDANF	AQSMFANAKA
	370	380	390	400	410
QAEILNRAQA	VVKDFER	IPT	EFVKDSLQVC	HEKGSQGNLR	GTPSGTVTSN
	430	440	450	460	470
ETVTNLKNSI	AHFGDQAEQI	HNAQNLAYTL	ANFSGQYKKL	GEHYDSITAA	ISSLPDAQSL
	490	500	510	520	530
QNVVSKK	TNP	NSPQGIQDNY	YIDSNIHSQV	QSR	TQELGSN
	550	560	570	580	590
IGFQVGYKQF	FGKNKRWGAR	YYGFVDYNHT	YNK	SQFFNSD	SDVWTYGVGS
	610	620	630	640	650
ATKHNKISFG	AFGGIQLAGT	SWLNSQYVNL	ANVNNYYKAK	INTSNFQFLF	NLGLRTNLAR

670

680

690

700

710

NKRRGADHSA QHGMELGVKI PTINTNYYSL LGTTLQYRRL YSVYLNIVFA Y

## *Bibliographie*

- Adler, A., Aschenbeck, J., *et al.* (2009). "Narrow-band versus white-light high definition television endoscopic imaging for screening colonoscopy: a prospective randomized trial." Gastroenterology **136**(2): 410-6 e1; quiz 715.
- Allen, A. (1977). "Structure and function in gastric mucus." Adv Exp Med Biol **89**: 283-99.
- Allen, A. (1978). "Structure of gastrointestinal mucus glycoproteins and the viscous and gel-forming properties of mucus." Br Med Bull **34**(1): 28-33.
- Allen, A., Hutton, D. A., *et al.* (1998). "The MUC2 gene product: a human intestinal mucin." Int J Biochem Cell Biol **30**(7): 797-801.
- Alm, R. A., Bina, J., *et al.* (2000). "Comparative genomics of *Helicobacter pylori*: analysis of the outer membrane protein families." Infect Immun **68**(7): 4155-68.
- Alm, R. A., Ling, L. S., *et al.* (1999). "Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*." Nature **397**(6715): 176-80.
- Alrawi, S. J., Schiff, M., *et al.* (2006). "Aberrant crypt foci." Anticancer Res **26**(1A): 107-19.
- Ambort, D., Van Der Post, S., *et al.* (2011). "Function of the CysD domain of the gel-forming MUC2 mucin." Biochem J **436**(1): 61-70.
- Amieva, M. R. and El-Omar, E. M. (2008). "Host-bacterial interactions in *Helicobacter pylori* infection." Gastroenterology **134**(1): 306-23.
- Amieva, M. R., Vogelmann, R., *et al.* (2003). "Disruption of the epithelial apical-junctional complex by *Helicobacter pylori* CagA." Science **300**(5624): 1430-4.
- Andrianifahanana, M., Moniaux, N., *et al.* (2006). "Regulation of mucin expression: mechanistic aspects and implications for cancer and inflammatory diseases." Biochim Biophys Acta **1765**(2): 189-222.
- Andrianifahanana, M., Moniaux, N., *et al.* (2001). "Mucin (MUC) gene expression in human pancreatic adenocarcinoma and chronic pancreatitis: a potential role of MUC4 as a tumor marker of diagnostic significance." Clin Cancer Res **7**(12): 4033-40.
- Aras, R. A., Kang, J., *et al.* (2003). "Extensive repetitive DNA facilitates prokaryotic genome plasticity." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(23): 13579-84.
- Artis, D., Wang, M. L., *et al.* (2004). "RELMbeta/FIZZ2 is a goblet cell-specific immune-effector molecule in the gastrointestinal tract." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(37): 13596-600.
- Asahi, M., Azuma, T., *et al.* (2000). "*Helicobacter pylori* CagA protein can be tyrosine phosphorylated in gastric epithelial cells." J Exp Med **191**(4): 593-602.
- Aspholm-Hurtig, M., Dailide, G., *et al.* (2004). "Functional adaptation of BabA, the *H. pylori* ABO blood group antigen binding adhesin." Science **305**(5683): 519-22.
- Aspinall, G. O. and Monteiro, M. A. (1996). "Lipopolysaccharides of *Helicobacter pylori* strains P466 and MO19: structures of the O antigen and core oligosaccharide regions." Biochemistry **35**(7): 2498-504.
- Atherton, J. C., Peek, R. M., Jr., *et al.* (1997). "Clinical and pathological importance of heterogeneity in *vacA*, the vacuolating cytotoxin gene of *Helicobacter pylori*." Gastroenterology **112**(1): 92-9.
- Atuma, C., Strugala, L., *et al.* (2001). "The adherent gastrointestinal mucus gel layer: thickness and physical state in vivo." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **280**5: G922-9.

- Aubert, J. P., Porchet, N., *et al.* (1991). "Evidence for different human tracheobronchial mucin peptides deduced from nucleotide cDNA sequences." Am J Respir Cell Mol Biol **5**(2): 178-85.
- Audie, J. P., Janin, A., *et al.* (1993). "Expression of human mucin genes in respiratory, digestive, and reproductive tracts ascertained by in situ hybridization." J Histochem Cytochem **41**(10): 1479-85.
- Backert, S., Ziska, E., *et al.* (2000). "Translocation of the Helicobacter pylori CagA protein in gastric epithelial cells by a type IV secretion apparatus." Cell Microbiol **2**(2): 155-64.
- Bagnoli, F., Buti, L., *et al.* (2005). "Helicobacter pylori CagA induces a transition from polarized to invasive phenotypes in MDCK cells." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(45): 16339-44.
- Bansal, M., Fenoglio, C. M., *et al.* (1984). "Are metaplasias in colorectal adenomas truly metaplasias?" Am J Pathol **115**(2): 253-65.
- Bara, J. and Burtin, P. (1980). "Mucus-associated gastrointestinal antigens in transitional mucosa adjacent to human colonic adenocarcinomas: their 'fetal-type' association." Eur J Cancer **16**(10): 1303-10.
- Bara, J., Gautier, R., *et al.* (1986). "Monoclonal antibodies against oncofetal mucin M1 antigens associated with precancerous colonic mucosae." Cancer Res **46**(8): 3983-9.
- Bara, J., Gautier, R., *et al.* (1988). Immunochemical characterization of mucins. Polypeptide (M1) and polysaccharide (A and Leb) antigens. Biochem J **254**: 185-93.
- Bara, J., Languille, O., *et al.* (1983). "Immunohistological study of precancerous mucus modification in human distal colonic polyps." Cancer Res **43**(8): 3885-91.
- Bara, J., Malarewicz, A., *et al.* (1977). "Antigens common to human ovarian mucinous cyst fluid and gastric mucosa." Br J Cancer **36**(1): 49-56.
- Bartman, A. E., Buisine, M. P., *et al.* (1998). "The MUC6 secretory mucin gene is expressed in a wide variety of epithelial tissues." J Pathol **186**(4): 398-405.
- Bartman, A. E., Sanderson, S. J., *et al.* (1999). "Aberrant expression of MUC5AC and MUC6 gastric mucin genes in colorectal polyps." Int J Cancer **80**(2): 210-8.
- Bell, S. L., Xu, G., *et al.* (2003). "N-linked oligosaccharides play a role in disulphide-dependent dimerization of intestinal mucin Muc2." Biochem J **373**(Pt 3): 893-900.
- Berg, R. D. (1996). "The indigenous gastrointestinal microflora." Trends Microbiol **4**(11): 430-5.
- Bhaskar, K. R., Garik, P., *et al.* (1992). "Viscous fingering of HCl through gastric mucin." Nature **360**(6403): 458-61.
- Bierhuizen, M. F. and Fukuda, M. (1992). "Expression cloning of a cDNA encoding UDP-GlcNAc:Gal beta 1-3-GalNAc-R (GlcNAc to GalNAc) beta 1-6GlcNAc transferase by gene transfer into CHO cells expressing polyoma large tumor antigen." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(19): 9326-330.
- Bikker, F. J., Van Der Wal, J. E., *et al.* (2004). "Salivary agglutinin/DMBT1SAG expression is up-regulated in the presence of salivary gland tumors." J Dent Res **83**(7): 567-71.
- Bird, R. P. (1987). "Observation and quantification of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogen: preliminary findings." Cancer Lett **37**(2): 147-51.

- Bjorkholm, B., Sjolund, M., *et al.* (2001). "Mutation frequency and biological cost of antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(25): 14607-12.
- Blackburn, A. C., Hill, L. Z., *et al.* (2007). "Genetic mapping in mice identifies DMBT1 as a candidate modifier of mammary tumors and breast cancer risk." Am J Pathol **170**(6): 2030-41.
- Blaser, M. J. (1997). "Introduction: Medical Significance of *H. pylori*." Methods Mol Med **8**: 1-6.
- Blaser, M. J., Chyou, P. H., *et al.* (1995). "Age at establishment of *Helicobacter pylori* infection and gastric carcinoma, gastric ulcer, and duodenal ulcer risk." Cancer Res **55**(3): 562-5.
- Bonis, M., Ecobichon, C., *et al.* (2010). "A M23B family metallopeptidase of *Helicobacter pylori* required for cell shape, pole formation and virulence." Mol Microbiol **78**(4): 809-19.
- Boren, T., Falk, P., *et al.* (1993). "Attachment of *Helicobacter pylori* to human gastric epithelium mediated by blood group antigens." Science **262**(5141): 1892-5.
- Brockhausen, I. (1999). "Pathways of O-glycan biosynthesis in cancer cells." Biochim Biophys Acta **1473**(1): 67-95.
- Brockhausen, I. (2003). "Sulphotransferases acting on mucin-type oligosaccharides." Biochem Soc Trans **31**(2): 318-25.
- Brunelli, R., Papi, M., *et al.* (2007). "Globular structure of human ovulatory cervical mucus." Faseb J **21**(14): 3872-6.
- Bu, X. D., Li, N., *et al.* (2010). "Altered expression of MUC2 and MUC5AC in progression of colorectal carcinoma." World J Gastroenterol **16**(32): 4089-94.
- Buisine, M. P., Desreumaux, P., *et al.* (2001). "Mucin gene expression in intestinal epithelial cells in Crohn's disease." Gut **49**(4): 544-51.
- Buisine, M. P., Desseyn, J. L., *et al.* (1998). "Genomic organization of the 3'-region of the human MUC5AC mucin gene: additional evidence for a common ancestral gene for the 11p15.5 mucin gene family." Biochem J **332** ( Pt 3): 729-38.
- Buisine, M. P., Janin, A., *et al.* (1996). "Aberrant expression of a human mucin gene (MUC5AC) in rectosigmoid villous adenoma." Gastroenterology **110**(1): 84-91.
- Bulow, H. E. and Hobert, O. (2006). "The molecular diversity of glycosaminoglycans shapes animal development." Annu Rev Cell Dev Biol **22**: 375-407.
- Burtea, C., Laurent, S., *et al.* (2008). "Molecular imaging of alpha v beta3 integrin expression in atherosclerotic plaques with a mimetic of RGD peptide grafted to Gd-DTPA." Cardiovasc Res **78**(1): 148-57.
- Byrd, J. C. and Bresalier, R. S. (2004). "Mucins and mucin binding proteins in colorectal cancer." Cancer Metastasis Rev **23**(1-2): 77-99.
- Byrd, J. C., Yan, P., *et al.* (1997). "Aberrant expression of gland-type gastric mucin in the surface epithelium of *Helicobacter pylori*-infected patients." Gastroenterology **113**(2): 455-64.
- Calvet, X., Lehours, P., *et al.* (2010). "Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection." Helicobacter **15** Suppl 1: 7-13.

- Capala, J. and Bouchelouche, K. (2010). "Molecular imaging of HER2-positive breast cancer: a step toward an individualized 'image and treat' strategy." Curr Opin Oncol **22**(6): 559-66.
- Capon, C., Laboisse, C. L., *et al.* (1992). "Oligosaccharide structures of mucins secreted by the human colonic cancer cell line CL.16E." J Biol Chem **267**(27): 19248-57.
- Capon, C., Maes, E., *et al.* (2001). "Sd(a)-antigen-like structures carried on core 3 are prominent features of glycans from the mucin of normal human descending colon." Biochem J **358**(Pt 3): 657-64.
- Carlson, D. M. (1968). "Structures and immunochemical properties of oligosaccharides isolated from pig submaxillary mucins." J Biol Chem **243**(3): 616-26.
- Carlstedt, I., Lindgren, H., *et al.* (1983). "Isolation and characterization of human cervical-mucus glycoproteins." Biochem J **211**(1): 13-22.
- Carraway, C. A. and Carraway, K. L. (2007). "Sequestration and segregation of receptor kinases in epithelial cells: implications for ErbB2 oncogenesis." Sci STKE **2007**(381): re3.
- Carraway, K. L., 3rd, Funes, M., *et al.* (2007). "Contribution of membrane mucins to tumor progression through modulation of cellular growth signaling pathways." Curr Top Dev Biol **78**: 1-22.
- Carrick, J., Lee, A., *et al.* (1989). "Campylobacter pylori, duodenal ulcer, and gastric metaplasia: possible role of functional heterotopic tissue in ulcerogenesis." Gut **30**(6): 790-7.
- Celli, J. P., Turner, B. S., *et al.* (2009). "Helicobacter pylori moves through mucus by reducing mucin viscoelasticity." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(34): 14321-6.
- Censini, S., Lange, C., *et al.* (1996). "cag, a pathogenicity island of Helicobacter pylori, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(25): 14648-53.
- Cerdan, S., Lotscher, H. R., *et al.* (1989). "Monoclonal antibody-coated magnetite particles as contrast agents in magnetic resonance imaging of tumors." Magn Reson Med **12**(2): 151-63.
- Chen, L., Wang, Y., *et al.* (2008). "A new TAG-72 cancer marker peptide identified by phage display." Cancer Lett **272**(1): 122-32.
- Chen, Y., Zhao, Y. H., *et al.* (2004). "Genome-wide search and identification of a novel gel-forming mucin MUC19/Muc19 in glandular tissues." Am J Respir Cell Mol Biol **30**(2): 155-65.
- Chui, D. W., Gooding, G. A., *et al.* (1994). "Hydrocolonic ultrasonography in the detection of colonic polyps and tumors." N Engl J Med **331**(25): 1685-8.
- Ciccarelli, F. D., Doerks, T., *et al.* (2002). "AMOP, a protein module alternatively spliced in cancer cells." Trends Biochem Sci **27**(3): 113-5.
- Cleveland, J. C., Litvak, S. F., *et al.* (1967). "Identification of the route of action of the carcinogen 3:2-dimethyl-4-aminobiphenyl in the induction of intestinal neoplasia." Cancer Res **27**(4): 708-14.
- Clyne, M., Dillon, P., *et al.* (2004). "Helicobacter pylori interacts with the human single-domain trefoil protein TFF1." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(19): 7409-14.

- Clyne, M., Labigne, A., *et al.* (1995). "Helicobacter pylori requires an acidic environment to survive in the presence of urea." Infect Immun **63**(5): 1669-73.
- Cooke, C. L., An, H. J., *et al.* (2009). "Modification of gastric mucin oligosaccharide expression in rhesus macaques after infection with Helicobacter pylori." Gastroenterology **137**(3): 1061-71, 1071 e1-8.
- Corfield, A. P., Wagner, S. A., *et al.* (1992). "Mucin degradation in the human colon: production of sialidase, sialate O-acetyl esterase, N-acetylneuraminidase, arylesterase, and glycosulfatase activities by strains of fecal bacteria." Infect Immun **60**(10): 3971-8.
- Corfield, A. P., Wagner, S. A., *et al.* (1993). "The roles of enteric bacterial sialidase, sialate O-acetyl esterase and glycosulfatase in the degradation of human colonic mucin." Glycoconj J **10**(1): 72-81.
- Correa, P., Haenszel, W., *et al.* (1975). "A model for gastric cancer epidemiology." Lancet **2**(7924): 58-60.
- Coughlin, R. J. and Friend, W. G. (1987). "Dietary restrictions and fecal occult blood testing." Am Fam Physician **35**(5): 118-20.
- Covacci, A., Censini, S., *et al.* (1993). "Molecular characterization of the 128-kDa immunodominant antigen of Helicobacter pylori associated with cytotoxicity and duodenal ulcer." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(12): 5791-5.
- Covacci, A., Telford, J. L., *et al.* (1999). "Helicobacter pylori virulence and genetic geography." Science **284**(5418): 1328-33.
- Craanen, M. E., Blok, P., *et al.* (1992). "Subtypes of intestinal metaplasia and Helicobacter pylori." Gut **33**(5): 597-600.
- Crabtree, J. E., Covacci, A., *et al.* (1995). "Helicobacter pylori induced interleukin-8 expression in gastric epithelial cells is associated with CagA positive phenotype." J Clin Pathol **48**(1): 41-5.
- Cross, C. E., Halliwell, B., *et al.* (1984). "Antioxidant protection: a function of tracheobronchial and gastrointestinal mucus." Lancet **1**(8390): 1328-30.
- Culp, D. J., Latchney, L. R., *et al.* (2004). "The gene encoding mouse Muc19: cDNA, genomic organization and relationship to Smgc." Physiol Genomics **19**(3): 303-18.
- Curtet, C., Maton, F., *et al.* (1998). "Polylysine-Gd-DTPAn and polylysine-Gd-DOTAn coupled to anti-CEA F(ab')<sub>2</sub> fragments as potential immunocontrast agents. Relaxometry, biodistribution, and magnetic resonance imaging in nude mice grafted with human colorectal carcinoma." Invest Radiol **33**(10): 752-61.
- Czajkowsky, D. M., Iwamoto, H., *et al.* (1999). "The vacuolating toxin from Helicobacter pylori forms hexameric pores in lipid bilayers at low pH." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(5): 2001-6.
- Dawsey, S. M., Mark, S. D., *et al.* (2002). "Gastric cancer and H pylori." Gut **51**(3): 457-8.
- De Francesco, V., Giorgio, F., *et al.* (2010). "Worldwide H. pylori antibiotic resistance: a systematic review." J Gastrointest Liver Dis **19**(4): 409-14.
- De Jonge, R., Durrani, Z., *et al.* (2004). "Role of the Helicobacter pylori outer-membrane proteins AlpA and AlpB in colonization of the guinea pig stomach." J Med Microbiol **53**(Pt 5): 375-9.

- Dekker, J., Rossen, J. W., *et al.* (2002). "The MUC family: an obituary." Trends Biochem Sci **27**(3): 126-31.
- Dell, A., Chalabi, S., *et al.* (2003). "Murine and human zona pellucida 3 derived from mouse eggs express identical O-glycans." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(26): 15631-6.
- Dell, A., Morris, H. R., *et al.* (1995). "Structural analysis of the oligosaccharides derived from glycodefin, a human glycoprotein with potent immunosuppressive and contraceptive activities." J Biol Chem **270**(41): 24116-26.
- Desseyn, J. L. (2009). "Mucin CYS domains are ancient and highly conserved modules that evolved in concert." Mol Phylogenet Evol **52**(2): 284-92.
- Desseyn, J. L., Aubert, J. P., *et al.* (2000). "Evolution of the large secreted gel-forming mucins." Mol Biol Evol **17**(8): 1175-84.
- Desseyn, J. L. and Laine, A. (2003). "Characterization of mouse muc6 and evidence of conservation of the gel-forming mucin gene cluster between human and mouse." Genomics **81**(4): 433-6.
- Dethlefsen, L., Mcfall-Ngai, M., *et al.* (2007). "An ecological and evolutionary perspective on human-microbe mutualism and disease." Nature **449**(7164): 811-8.
- Di Gregorio, C., Losi, L., *et al.* (1997). "Histology of aberrant crypt foci in the human colon." Histopathology **30**(4): 328-34.
- Doenges, J.L. (1938). "Spirochaetes in gastric glands of macacus rhesus and humans without definite history of related disease." Proc Soc Exp Biol Med **38**: 536-38.
- Dohi, T., Yuyama, Y., *et al.* (1996). "Detection of N-acetylgalactosaminyltransferase mRNA which determines expression of Sda blood group carbohydrate structure in human gastrointestinal mucosa and cancer." Int J Cancer **67**(5): 626-31.
- Dore, M. P., Sepulveda, A. R., *et al.* (2001). "Isolation of Helicobacter pylori from sheep-implications for transmission to humans." Am J Gastroenterol **96**(5): 1396-401.
- Dossumbekova, A., Prinz, C., *et al.* (2006). "Helicobacter pylori HopH (OipA) and bacterial pathogenicity: genetic and functional genomic analysis of hopH gene polymorphisms." J Infect Dis **194**(10): 1346-55.
- Dubois, A., Fiala, N., *et al.* (1994). "Natural gastric infection with Helicobacter pylori in monkeys: a model for spiral bacteria infection in humans." Gastroenterology **106**(6): 1405-17.
- Duffy, M. J. (2001). "Carcinoembryonic antigen as a marker for colorectal cancer: is it clinically useful?" Clin Chem **47**(4): 624-30.
- Eaton, K. A., Morgan, D. R., *et al.* (1992). "Motility as a factor in the colonisation of gnotobiotic piglets by Helicobacter pylori." J Med Microbiol **37**(2): 123-7.
- Eaton, K. A., Suerbaum, S., *et al.* (1996). "Colonization of gnotobiotic piglets by Helicobacter pylori deficient in two flagellin genes." Infect Immun **64**(7): 2445-8.
- Eliakim, R., Fireman, Z., *et al.* (2006). "Evaluation of the PillCam Colon capsule in the detection of colonic pathology: results of the first multicenter, prospective, comparative study." Endoscopy **38**(10): 963-70.
- El-Omar, E. M., Penman, I. D., *et al.* (1995). "Helicobacter pylori infection and abnormalities of acid secretion in patients with duodenal ulcer disease." Gastroenterology **109**(3): 681-91.

- Escande, F., Aubert, J. P., *et al.* (2001). "Human mucin gene MUC5AC: organization of its 5'-region and central repetitive region." Biochem J **358**(Pt 3): 763-72.
- Eurogast (1993). "Epidemiology of, and risk factors for, Helicobacter pylori infection among 3194 asymptomatic subjects in 17 populations. The EUROGAST Study Group." Gut **34**(12): 1672-6.
- Evans, D. J., Jr., Evans, D. G., *et al.* (1995). "Characterization of a Helicobacter pylori neutrophil-activating protein." Infect Immun **63**(6): 2213-20.
- Faivre, J. Boutron M. C., *et al.* (1987). "Epidemiology of adenoma : clinical data." In : Faivre J, Hill MJ eds. Causation and prevention of colorectal cancer. Amsterdam : Excerpta Medica, 1987:29-31.
- Faivre, J. and Bader, J. P. (1987). "[Screening for colorectal cancer: a national problem]." Ann Gastroenterol Hepatol (Paris) **23**(7): 351-2.
- Faivre, J., Dancourt, V., *et al.* (2004). "Reduction in colorectal cancer mortality by fecal occult blood screening in a French controlled study." Gastroenterology **126**(7): 1674-80.
- Falk, P., Roth, K. A., *et al.* (1993). "An in vitro adherence assay reveals that Helicobacter pylori exhibits cell lineage-specific tropism in the human gastric epithelium." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(5): 2035-9.
- Falush, D., Kraft, C., *et al.* (2001). "Recombination and mutation during long-term gastric colonization by Helicobacter pylori: estimates of clock rates, recombination size, and minimal age." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(26): 15056-61.
- Fearon, E. R. and Vogelstein, B. (1990). "A genetic model for colorectal tumorigenesis." Cell **61**(5): 759-67.
- Feeney, J., Frenkiel, T. A., *et al.* (1986). "Complete <sup>1</sup>H-n.m.r. assignments for two core-region oligosaccharides of human meconium glycoproteins, using 1D and 2D methods at 500 MHz." Carbohydr Res **152**: 63-72.
- Feld, K. A. and Feld, A. D. (2010). "Risk management and legal issues for colonoscopy." Gastrointest Endosc Clin N Am **20**(4): 593-601.
- Fletcher, R. H. (1986). "Carcinoembryonic antigen." Ann Intern Med **104**(1): 66-73.
- Folkman, J. (1971). "Tumor angiogenesis: therapeutic implications." N Engl J Med **285**(21): 1182-6.
- Folli, S., Westermann, P., *et al.* (1994). "Antibody-indocyanin conjugates for immunophotodetection of human squamous cell carcinoma in nude mice." Cancer Res **54**(10): 2643-9.
- Forgue-Lafitte, M. E., Fabiani, B., *et al.* (2007). "Abnormal expression of M1/MUC5AC mucin in distal colon of patients with diverticulitis, ulcerative colitis and cancer." Int J Cancer **121**(7): 1543-9.
- Forsyth, M. H., Cao, P., *et al.* (2002). "Genome-wide transcriptional profiling in a histidine kinase mutant of Helicobacter pylori identifies members of a regulon." J Bacteriol **184**(16): 4630-5.
- Freedburg, A.S. and Barron, L. E. (1940). "The presence of spirochaetes in human gastric mucosa." Am J Dig Dis **7**: 443-45.
- Fu, J., Wei, B., *et al.* (2011). "Loss of intestinal core 1-derived O-glycans causes spontaneous colitis in mice." J Clin Invest **121**(4): 1657-66.

- Fung, W. P., Papadimitriou, J. M., *et al.* (1979). "Endoscopic, histological and ultrastructural correlations in chronic gastritis." Am J Gastroenterol **71**(3): 269-79.
- Galmiche, A., Rassow, J., *et al.* (2000). "The N-terminal 34 kDa fragment of *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin targets mitochondria and induces cytochrome c release." Embo J **19**(23): 6361-70.
- Garner, J. A. and Cover, T. L. (1996). "Binding and internalization of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin by epithelial cells." Infect Immun **64**(10): 4197-203.
- Geenen, R. W., Hussain, S. M., *et al.* (2004). "CT and MR colonography: scanning techniques, postprocessing, and emphasis on polyp detection." Radiographics **24**(1): e18.
- Geis, G., Suerbaum, S., *et al.* (1993). "Ultrastructure and biochemical studies of the flagellar sheath of *Helicobacter pylori*." J Med Microbiol **38**(5): 371-7.
- Gendler, S. J. and Spicer, A. P. (1995). "Epithelial mucin genes." Annu Rev Physiol **57**: 607-34.
- Gipson, I. K., Ho, S. B., *et al.* (1997). "Mucin genes expressed by human female reproductive tract epithelia." Biol Reprod **56**(4): 999-1011.
- Goldsmith, S. J. (1997). "Receptor imaging: competitive or complementary to antibody imaging?" Semin Nucl Med **27**(2): 85-93.
- Gotoh, M., Sato, T., *et al.* (2004). "Molecular cloning and characterization of beta1,4-N-acetylgalactosaminyltransferases IV synthesizing N,N'-diacetyllactosediamine." FEBS Lett **562**(1-3): 134-40.
- Graham, D. Y., Lew, G. M., *et al.* (1992). "Effect of treatment of *Helicobacter pylori* infection on the long-term recurrence of gastric or duodenal ulcer. A randomized, controlled study." Ann Intern Med **116**(9): 705-8.
- Graham, D. Y., Lew, G. M., *et al.* (1993). "Antral G-cell and D-cell numbers in *Helicobacter pylori* infection: effect of *H. pylori* eradication." Gastroenterology **104**(6): 1655-60.
- Graser, A., Stieber, P., *et al.* (2009). "Comparison of CT colonography, colonoscopy, sigmoidoscopy and faecal occult blood tests for the detection of advanced adenoma in an average risk population." Gut **58**(2): 241-8.
- Groden, J., Thliveris, A., *et al.* (1991). "Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene." Cell **66**(3): 589-600.
- Guilford, P., Hopkins, J., *et al.* (1998). "E-cadherin germline mutations in familial gastric cancer." Nature **392**(6674): 402-5.
- Gum, J. R., Byrd, J. C., *et al.* (1989). "Molecular cloning of human intestinal mucin cDNAs. Sequence analysis and evidence for genetic polymorphism." J Biol Chem **264**(11): 6480-7.
- Gum, J. R., Hicks, J. W., *et al.* (1997). "Identification and characterization of the MUC2 (human intestinal mucin) gene 5'-flanking region: promoter activity in cultured cells." Biochem J **325** ( Pt 1): 259-67.
- Gum, J. R., Jr., Hicks, J. W., *et al.* (1992). "The human MUC2 intestinal mucin has cysteine-rich subdomains located both upstream and downstream of its central repetitive region." J Biol Chem **267**(30): 21375-83.

- Guyonnet Duperat, V., Audie, J. P., *et al.* (1995). "Characterization of the human mucin gene MUC5AC: a consensus cysteine-rich domain for 11p15 mucin genes?" Biochem J **305** ( Pt 1): 211-9.
- Haas, R., Meyer, T. F., *et al.* (1993). "Aflagellated mutants of *Helicobacter pylori* generated by genetic transformation of naturally competent strains using transposon shuttle mutagenesis." Mol Microbiol **8**(4): 753-60.
- Haltiwanger, R. S. and Stanley, P. (2002). "Modulation of receptor signaling by glycosylation: fringe is an O-fucose-beta1,3-N-acetylglucosaminyltransferase." Biochim Biophys Acta **1573**(3): 328-35.
- Handt, L. K., Fox, J. G., *et al.* (1994). "*Helicobacter pylori* isolated from the domestic cat: public health implications." Infect Immun **62**(6): 2367-74.
- Hanisch, F. G., Chai, W., *et al.* (1993). "Core-typing of O-linked glycans from human gastric mucins. Lack of evidence for the occurrence of the core sequence Gal1-6GalNAc." Eur J Biochem **217**(2): 645-55.
- Hardcastle, J. D., Chamberlain, J. O., *et al.* (1996). "Randomised controlled trial of faecal-occult-blood screening for colorectal cancer." Lancet **348**(9040): 1472-7.
- Harduin-Lepers, A., Mollicone, R., *et al.* (2005). "The animal sialyltransferases and sialyltransferase-related genes: a phylogenetic approach." Glycobiology **15**(8): 805-17.
- Harisinghani, M. G., Barentsz, J., *et al.* (2003). "Noninvasive detection of clinically occult lymph-node metastases in prostate cancer." N Engl J Med **348**(25): 2491-9.
- Hart, G. W., Housley, M. P., *et al.* (2007). "Cycling of O-linked beta-N-acetylglucosamine on nucleocytoplasmic proteins." Nature **446**(7139): 1017-22.
- Hartmann, D., Bassler, B., *et al.* (2006). "Colorectal polyps: detection with dark-lumen MR colonography versus conventional colonoscopy." Radiology **238**(1): 143-9.
- Hasnain, S. Z., Evans, C. M., *et al.* (2011). "Muc5ac: a critical component mediating the rejection of enteric nematodes." J Exp Med **208**(5): 893-900.
- Hatakeyama, M. (2003). "*Helicobacter pylori* CagA--a potential bacterial oncoprotein that functionally mimics the mammalian Gab family of adaptor proteins." Microbes Infect **5**(2): 143-50.
- Hazell, S. L., Lee, A., *et al.* (1986). "*Campylobacter pyloridis* and gastritis: association with intercellular spaces and adaptation to an environment of mucus as important factors in colonization of the gastric epithelium." J Infect Dis **153**(4): 658-63.
- Herrmann, A., Davies, J. R., *et al.* (1999). "Studies on the "insoluble" glycoprotein complex from human colon. Identification of reduction-insensitive MUC2 oligomers and C-terminal cleavage." J Biol Chem **274**(22): 15828-36.
- Higashi, H., Tsutsumi, R., *et al.* (2002). "SHP-2 tyrosine phosphatase as an intracellular target of *Helicobacter pylori* CagA protein." Science **295**(5555): 683-6.
- Higuchi, M., Iwata, N., *et al.* (2005). "19F and 1H MRI detection of amyloid beta plaques in vivo." Nat Neurosci **8**(4): 527-33.
- Hirayama, F., Takagi, S., *et al.* (1996). "Establishment of gastric *Helicobacter pylori* infection in Mongolian gerbils." J Gastroenterol **31** Suppl 9: 24-8.

- Hirono, H., Ajioka, Y., *et al.* (2004). "Bidirectional gastric differentiation in cellular mucin phenotype (foveolar and pyloric) in serrated adenoma and hyperplastic polyp of the colorectum." Pathol Int **54**(6): 401-7.
- Ho, S. B., Roberton, A. M., *et al.* (1995). "Expression cloning of gastric mucin complementary DNA and localization of mucin gene expression." Gastroenterology **109**(3): 735-47.
- Ho, S. B., Shekels, L. L., *et al.* (1995). "Mucin gene expression in normal, preneoplastic, and neoplastic human gastric epithelium." Cancer Res **55**(12): 2681-90.
- Ho, S. B., Takamura, K., *et al.* (2004). "The adherent gastric mucous layer is composed of alternating layers of MUC5AC and MUC6 mucin proteins." Dig Dis Sci **49**(10): 1598-606.
- Hofsteenge, J., Muller, D. R., *et al.* (1994). "New type of linkage between a carbohydrate and a protein: C-glycosylation of a specific tryptophan residue in human RNase Us." Biochemistry **33**(46): 13524-30.
- Hogan, D. L., Rapier, R. C., *et al.* (1996). "Duodenal bicarbonate secretion: eradication of *Helicobacter pylori* and duodenal structure and function in humans." Gastroenterology **110**(3): 705-16.
- Hollingsworth, M. A. and Swanson, B. J. (2004). "Mucins in cancer: protection and control of the cell surface." Nat Rev Cancer **4**(1): 45-60.
- Hounsell, E. F. and Feizi, T. (1982). "Gastrointestinal mucins. Structures and antigenicities of their carbohydrate chains in health and disease." Med Biol **60**(5): 227-36.
- Hounsell, E. F., Lawson, A. M., *et al.* (1988). "Identification of a novel oligosaccharide backbone structure with a galactose residue monosubstituted at C-6 in human foetal gastrointestinal mucins." Biochem J **256**(2): 397-401.
- Howe, J. R., Roth, S., *et al.* (1998). "Mutations in the SMAD4/DPC4 gene in juvenile polyposis." Science **280**(5366): 1086-8.
- Howitt, M. R., Lee, J. Y., *et al.* (2011). "ChePep Controls *Helicobacter pylori* Infection of the Gastric Glands and Chemotaxis in the Epsilonproteobacteria." MBio **2**(4).
- Hsiung, P. L., Hardy, J., *et al.* (2008). "Detection of colonic dysplasia in vivo using a targeted heptapeptide and confocal microendoscopy." Nat Med **14**(4): 454-8.
- Iida, S., Tsuiji, H., *et al.* (1998). "Expression of mucin genes and carbohydrate epitopes in 19 human colon carcinoma cell lines." Oncol Res **10**(8): 407-14.
- Ikehara, Y., Sato, T., *et al.* (2006). "Apical Golgi localization of N,N'-diacetyllactosylamine synthase, beta4GalNAc-T3, is responsible for LacdiNAc expression on gastric mucosa." Glycobiology **16**(9): 777-85.
- Ilver, D., Arnqvist, A., *et al.* (1998). "*Helicobacter pylori* adhesin binding fucosylated histo-blood group antigens revealed by retagging." Science **279**(5349): 373-7.
- Ilver, D., Barone, S., *et al.* (2004). "*Helicobacter pylori* toxin VacA is transferred to host cells via a novel contact-dependent mechanism." Cell Microbiol **6**(2): 167-74.
- Inaba, N., Hiruma, T., *et al.* (2003). "A novel I-branching beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase involved in human blood group I antigen expression." Blood **101**(7): 2870-6.
- Isaacson, P. G. and Spencer, J. (1987). "Malignant lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue." Histopathology **11**(5): 445-62.

- Israel, D. A., Salama, N., *et al.* (2001). "Helicobacter pylori genetic diversity within the gastric niche of a single human host." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(25): 14625-30.
- Itoh, Y., Kamata-Sakurai, M., *et al.* (2008). "Identification and expression of human epiglycanin/MUC21: a novel transmembrane mucin." Glycobiology **18**(1): 74-83.
- Iwai, T., Inaba, N., *et al.* (2002). "Molecular cloning and characterization of a novel UDP-GlcNAc:GalNAc-peptide beta1,3-N-acetylglucosaminyltransferase (beta 3Gn-T6), an enzyme synthesizing the core 3 structure of O-glycans." J Biol Chem **277**(15): 12802-9.
- Jaffe, R. M., Kasten, B., *et al.* (1975). "False-negative stool occult blood tests caused by ingestion of ascorbic acid (vitamin C)." Ann Intern Med **83**(6): 824-6.
- Jaffer, F. A., Nahrendorf, M., *et al.* (2006). "Cellular imaging of inflammation in atherosclerosis using magnetofluorescent nanomaterials." Mol Imaging **5**(2): 85-92.
- Jass, J. R. and Robertson, A. M. (1994). "Colorectal mucin histochemistry in health and disease: a critical review." Pathol Int **44**(7): 487-504.
- Jass, J. R. and Walsh, M. D. (2001). "Altered mucin expression in the gastrointestinal tract: a review." J Cell Mol Med **5**(3): 327-51.
- Jiang, C., McClure, S. F., *et al.* (2004). "Lectin histochemistry of normal human gastric mucosa." Glycoconj J **20**(6): 367-74.
- Johansson, M. E., Larsson, J. M., *et al.* (2010). "The two mucus layers of colon are organized by the MUC2 mucin, whereas the outer layer is a legislator of host-microbial interactions." Proc Natl Acad Sci U S A **108** **Suppl 1**: 4659-65.
- Johansson, M. E., Phillipson, M., *et al.* (2008). "The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(39): 15064-9.
- Johnson, J. P., Rummel, M. M., *et al.* (1996). "MUC18: A cell adhesion molecule with a potential role in tumor growth and tumor cell dissemination." Curr Top Microbiol Immunol **213** ( Pt 1): 95-105.
- Ju, T., Brewer, K., *et al.* (2002). "Cloning and expression of human core 1 beta1,3-galactosyltransferase." J Biol Chem **277**(1): 178-86.
- Ju, T. and Cummings, R. D. (2002). "A unique molecular chaperone Cosmc required for activity of the mammalian core 1 beta 3-galactosyltransferase." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(26): 16613-8.
- Kanazawa, T. and Tanaka, M. (1965). Endoscopy of the colon. Gastroenterol Endosc Tokyo **7** 398-400.
- Kang, W. and Reid, K. B. (2003). "DMBT1, a regulator of mucosal homeostasis through the linking of mucosal defense and regeneration?" FEBS Lett **540**(1-3): 21-5.
- Kawakubo, M., Ito, Y., *et al.* (2004). "Natural antibiotic function of a human gastric mucin against Helicobacter pylori infection." Science **305**(5686): 1003-6.
- Kehry, M., Sibley, C., *et al.* (1979). "Amino acid sequence of a mouse immunoglobulin mu chain." Proc Natl Acad Sci U S A **76**(6): 2932-6.
- Kelly, K. A., Bardeesy, N., *et al.* (2008). "Targeted nanoparticles for imaging incipient pancreatic ductal adenocarcinoma." PLoS Med **5**(4): e85.
- Kelly, K. A. and Jones, D. A. (2003). "Isolation of a colon tumor specific binding peptide using phage display selection." Neoplasia **5**(5): 437-44.

- Kelly, R. J., Rouquier, S., *et al.* (1995). "Sequence and expression of a candidate for the human Secretor blood group alpha(1,2)fucosyltransferase gene (FUT2). Homozygosity for an enzyme-inactivating nonsense mutation commonly correlates with the non-secretor phenotype." J Biol Chem **270**(9): 4640-9.
- Kewenter, J., Bjork, S., *et al.* (1988). "Screening and rescreening for colorectal cancer. A controlled trial of fecal occult blood testing in 27,700 subjects." Cancer **62**(3): 645-51.
- Khatri, I. A., Forstner, G. G., *et al.* (1998). "Susceptibility of the cysteine-rich N-terminal and C-terminal ends of rat intestinal mucin muc 2 to proteolytic cleavage." Biochem J **331** (Pt 1): 323-30.
- Khoo, K. H., Chatterjee, D., *et al.* (1997). "Structural mapping of the glycans from the egg glycoproteins of *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma japonicum*: identification of novel core structures and terminal sequences." Glycobiology **7**(5): 663-77.
- Khulusi, S., Badve, S., *et al.* (1996). "Pathogenesis of gastric metaplasia of the human duodenum: role of *Helicobacter pylori*, gastric acid, and ulceration." Gastroenterology **110**(2): 452-8.
- Kinoshita, M., Nakamura, T., *et al.* (2001). "Identification of human endomucin-1 and -2 as membrane-bound O-sialoglycoproteins with anti-adhesive activity." FEBS Lett **499**(1-2): 121-6.
- Kinzler, K. W., Nilbert, M. C., *et al.* (1991). "Identification of FAP locus genes from chromosome 5q21." Science **253**(5020): 661-5.
- Kobayashi, K., Ogata, H., *et al.* (2002). "Distribution and partial characterisation of IgG Fc binding protein in various mucin producing cells and body fluids." Gut **51**(2): 169-76.
- Konisky, J. (1982). "Colicins and other bacteriocins with established modes of action." Annu Rev Microbiol **36**: 125-44.
- Kornfeld, R. and Kornfeld, S. (1985). "Assembly of asparagine-linked oligosaccharides." Annu Rev Biochem **54**: 631-64.
- Krohne, I., Pfeifer, T., *et al.* (2002). "New concept for the development of a confocal endomicroscope." Biomed Tech (Berl) **47 Suppl 1 Pt 1**: 206-8.
- Kronborg, O., Fenger, C., *et al.* (1996). "Randomised study of screening for colorectal cancer with faecal-occult-blood test." Lancet **348**(9040): 1467-71.
- Kuehle, C. A., Langhorst, J., *et al.* (2007). "Magnetic resonance colonography without bowel cleansing: a prospective cross sectional study in a screening population." Gut **56**(8): 1079-85.
- Kumar, S. R. and Deutscher, S. L. (2008). "<sup>111</sup>In-labeled galectin-3-targeting peptide as a SPECT agent for imaging breast tumors." J Nucl Med **49**(5): 796-803.
- Kwok, T., Zabler, D., *et al.* (2007). "*Helicobacter* exploits integrin for type IV secretion and kinase activation." Nature **449**(7164): 862-6.
- Larbanoux, L., Burtea, C., *et al.* (2010). "Potential amyloid plaque-specific peptides for the diagnosis of Alzheimer's disease." Neurobiol Aging **31**(10): 1679-89.
- Larsson, J. M., Karlsson, H., *et al.* (2009). "A complex, but uniform O-glycosylation of the human MUC2 mucin from colonic biopsies analyzed by nanoLC/MSn." Glycobiology **19**(7): 756-66.
- Lauenstein, T. C., Goehde, S. C., *et al.* (2002). "Fecal tagging: MR colonography without colonic cleansing." Abdom Imaging **27**(4): 410-7.

- Lauenstein, T. C., Herborn, C. U., *et al.* (2001). "Dark lumen MR-colonography: initial experience." *Rofo* **173**(9): 785-9.
- Lauren, P. A. and Nevalainen, T. J. (1993). "Epidemiology of intestinal and diffuse types of gastric carcinoma. A time-trend study in Finland with comparison between studies from high- and low-risk areas." *Cancer* **71**(10): 2926-33.
- Lee, H., Wang, P., *et al.* (2008). "Alpha1,4GlcNAc-capped mucin-type O-glycan inhibits cholesterol alpha-glucosyltransferase from *Helicobacter pylori* and suppresses *H. pylori* growth." *Glycobiology* **18**(7): 549-58.
- Leggett, B. and Whitehall, V. (2010). "Role of the serrated pathway in colorectal cancer pathogenesis." *Gastroenterology* **138**(6): 2088-100.
- Lesuffleur, T., Violette, S., *et al.* (1998). "Resistance to high concentrations of methotrexate and 5-fluorouracil of differentiated HT-29 colon-cancer cells is restricted to cells of enterocytic phenotype." *Int J Cancer* **76**(3): 383-92.
- Leteurtre, E., Gouyer, V., *et al.* (2004). "Differential mucin expression in colon carcinoma HT-29 clones with variable resistance to 5-fluorouracil and methotrexate." *Biol Cell* **96**(2): 145-51.
- Leunk, R. D., Johnson, P. T., *et al.* (1988). "Cytotoxic activity in broth-culture filtrates of *Campylobacter pylori*." *J Med Microbiol* **26**(2): 93-9.
- Li, Y., Ren, J., *et al.* (2001). "The epidermal growth factor receptor regulates interaction of the human DF3/MUC1 carcinoma antigen with c-Src and beta-catenin." *J Biol Chem* **276**(38): 35239-42.
- Lidell, M. E. and Hansson, G. C. (2006). "Cleavage in the GDPH sequence of the C-terminal cysteine-rich part of the human MUC5AC mucin." *Biochem J* **399**(1): 121-9.
- Lidell, M. E., Johansson, M. E., *et al.* (2003). "An autocatalytic cleavage in the C terminus of the human MUC2 mucin occurs at the low pH of the late secretory pathway." *J Biol Chem* **278**(16): 13944-51.
- Lidell, M. E., Moncada, D. M., *et al.* (2006). "Entamoeba histolytica cysteine proteases cleave the MUC2 mucin in its C-terminal domain and dissolve the protective colonic mucus gel." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(24): 9298-303.
- Lieberman, D. A. and Weiss, D. G. (2001). "One-time screening for colorectal cancer with combined fecal occult-blood testing and examination of the distal colon." *N Engl J Med* **345**(8): 555-60.
- Linden, S., Mahdavi, J., *et al.* (2004). "Effects of pH on *Helicobacter pylori* binding to human gastric mucins: identification of binding to non-MUC5AC mucins." *Biochem J* **384**(Pt 2): 263-70.
- Linden, S., Mahdavi, J., *et al.* (2008). "Role of ABO secretor status in mucosal innate immunity and *H. pylori* infection." *PLoS Pathog* **4**(1): e2.
- Linden, S. K., Sheng, Y. H., *et al.* (2009). "MUC1 limits *Helicobacter pylori* infection both by steric hindrance and by acting as a releasable decoy." *PLoS Pathog* **5**(10): e1000617.
- Linden, S. K., Sutton, P., *et al.* (2008). "Mucins in the mucosal barrier to infection." *Mucosal Immunol* **1**(3): 183-97.
- Liu, T. W., Ho, C. W., *et al.* (2009). "Role for alpha-L-fucosidase in the control of *Helicobacter pylori*-infected gastric cancer cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(34): 14581-6.

- Loh, J. T. and Cover, T. L. (2006). "Requirement of histidine kinases HP0165 and HP1364 for acid resistance in *Helicobacter pylori*." *Infect Immun* **74**(5): 3052-9.
- Lomas, D. J., Sood, R. R., *et al.* (2001). "Colon carcinoma: MR imaging with CO<sub>2</sub> enema--pilot study." *Radiology* **219**(2): 558-62.
- Lommel, M. and Strahl, S. (2009). "Protein O-mannosylation: conserved from bacteria to humans." *Glycobiology* **19**(8): 816-28.
- Longman, R. J., Poulsom, R., *et al.* (2006). "Alterations in the composition of the supramucosal defense barrier in relation to disease severity of ulcerative colitis." *J Histochem Cytochem* **54**(12): 1335-48.
- Lopez-Ferrer, A., Barranco, C., *et al.* (2001). "Apomucin expression and association with Lewis antigens during gastric development." *Appl Immunohistochem Mol Morphol* **9**(1): 42-8.
- Lu, H., Wu, J. Y., *et al.* (2007). "Functional and intracellular signaling differences associated with the *Helicobacter pylori* AlpAB adhesin from Western and East Asian strains." *J Biol Chem* **282**(9): 6242-54.
- Lu, L. and Walker, W. A. (2001). "Pathologic and physiologic interactions of bacteria with the gastrointestinal epithelium." *Am J Clin Nutr* **73**(6): 1124S-1130S.
- Luboldt, W., Bauerfeind, P., *et al.* (1997). "Preliminary assessment of three-dimensional magnetic resonance imaging for various colonic disorders." *Lancet* **349**(9061): 1288-91.
- Luboldt, W., Bauerfeind, P., *et al.* (1999). "Contrast optimization for assessment of the colonic wall and lumen in MR colonography." *J Magn Reson Imaging* **9**(5): 745-50.
- Luboldt, W., Bauerfeind, P., *et al.* (2000). "Colonic masses: detection with MR colonography." *Radiology* **216**(2): 383-8.
- Luther, K. B. and Haltiwanger, R. S. (2009). "Role of unusual O-glycans in intercellular signaling." *Int J Biochem Cell Biol* **41**(5): 1011-24.
- Lynch, H. T. and Lynch, J. F. (1998). "Genetics of colonic cancer." *Digestion* **59**(5): 481-92.
- Macao, B., Johansson, D. G., *et al.* (2006). "Autoproteolysis coupled to protein folding in the SEA domain of the membrane-bound MUC1 mucin." *Nat Struct Mol Biol* **13**(1): 71-6.
- Maes, E., Bonachera, F., *et al.* (2009). "SOACS index: an easy NMR-based query for glycan retrieval." *Carbohydr Res* **344**(3): 322-30.
- Mahdavi, J., Sonden, B., *et al.* (2002). "*Helicobacter pylori* SabA adhesin in persistent infection and chronic inflammation." *Science* **297**(5581): 573-8.
- Malaty, H. M. and Graham, D. Y. (1994). "Importance of childhood socioeconomic status on the current prevalence of *Helicobacter pylori* infection." *Gut* **35**(6): 742-5.
- Manzella, S. M., Hooper, L. V., *et al.* (1996). "Oligosaccharides containing beta 1,4-linked N-acetylgalactosamine, a paradigm for protein-specific glycosylation." *J Biol Chem* **271**(21): 12117-20.
- Marchetti, M., Arico, B., *et al.* (1995). "Development of a mouse model of *Helicobacter pylori* infection that mimics human disease." *Science* **267**(5204): 1655-8.
- Marcos, N. T., Magalhaes, A., *et al.* (2008). "*Helicobacter pylori* induces beta3GnT5 in human gastric cell lines, modulating expression of the SabA ligand sialyl-Lewis x." *J Clin Invest* **118**(6): 2325-36.

- Marcus, E. A., Moshfegh, A. P., *et al.* (2005). "The periplasmic alpha-carbonic anhydrase activity of *Helicobacter pylori* is essential for acid acclimation." J Bacteriol **187**(2): 729-38.
- Marionneau, S., Cailleau-Thomas, A., *et al.* (2001). "ABH and Lewis histo-blood group antigens, a model for the meaning of oligosaccharide diversity in the face of a changing world." Biochimie **83**(7): 565-73.
- Marshall, B. J. and Warren, J. R. (1984). "Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration." Lancet **1**(8390): 1311-5.
- Martens, E. C., Roth, R., *et al.* (2009). "Coordinate regulation of glycan degradation and polysaccharide capsule biosynthesis by a prominent human gut symbiont." J Biol Chem **284**(27): 18445-57.
- Matsumoto, Y., Marusawa, H., *et al.* (2007). "Helicobacter pylori infection triggers aberrant expression of activation-induced cytidine deaminase in gastric epithelium." Nat Med **13**(4): 470-6.
- Maurin, N., Forgue-Lafitte, M. E., *et al.* (2007). "Progression of tumors arising from large ACF is associated with the MUC5AC expression during rat colon MNNG carcinogenesis." Int J Cancer **120**(3): 477-83.
- Mcgee, D. J., Radcliff, F. J., *et al.* (1999). "Helicobacter pylori rocF is required for arginase activity and acid protection in vitro but is not essential for colonization of mice or for urease activity." J Bacteriol **181**(23): 7314-22.
- Mcgee, D. J., Zabaleta, J., *et al.* (2004). "Purification and characterization of *Helicobacter pylori* arginase, RocF: unique features among the arginase superfamily." Eur J Biochem **271**(10): 1952-62.
- Mcgowan, C. C., Cover, T. L., *et al.* (1996). "Helicobacter pylori and gastric acid: biological and therapeutic implications." Gastroenterology **110**(3): 926-38.
- Mcguckin, M. A., Linden, S. K., *et al.* (2011). "Mucin dynamics and enteric pathogens." Nat Rev Microbiol **9**(4): 265-78.
- Melnick, M., Chen, H., *et al.* (2001). "An alternatively spliced Muc10 glycoprotein ligand for putative L-selectin binding during mouse embryonic submandibular gland morphogenesis." Arch Oral Biol **46**(8): 745-57.
- Mengeling, B. J., Smith, P. L., *et al.* (1991). "A microplate assay for analysis of solution-phase glycosyltransferase reactions: determination of kinetic constants." Anal Biochem **199**(2): 286-92.
- Miller, R. S. and Hoskins, L. C. (1981). "Mucin degradation in human colon ecosystems. Fecal population densities of mucin-degrading bacteria estimated by a "most probable number" method." Gastroenterology **81**(4): 759-65.
- Miller, S. J., Joshi, B. P., *et al.* (2011). "In vivo fluorescence-based endoscopic detection of colon dysplasia in the mouse using a novel peptide probe." PLoS One **6**(3): e17384.
- Mobley, H. L., Cortesia, M. J., *et al.* (1988). "Characterization of urease from *Campylobacter pylori*." J Clin Microbiol **26**(5): 831-6.
- Mobley, H. L., Island, M. D., *et al.* (1995). "Molecular biology of microbial ureases." Microbiol Rev **59**(3): 451-80.
- Molinari, M., Salio, M., *et al.* (1998). "Selective inhibition of Ii-dependent antigen presentation by *Helicobacter pylori* toxin VacA." J Exp Med **187**(1): 135-40.

- Mollenhauer, J., Herbertz, S., *et al.* (2001). "Deleted in Malignant Brain Tumors 1 is a versatile mucin-like molecule likely to play a differential role in digestive tract cancer." Cancer Res **61**(24): 8880-6.
- Mollenhauer, J., Wiemann, S., *et al.* (1997). "DMBT1, a new member of the SRCR superfamily, on chromosome 10q25.3-26.1 is deleted in malignant brain tumours." Nat Genet **17**(1): 32-9.
- Mollicone, R., Bara, J., *et al.* (1985). "Immunohistologic pattern of type 1 (Lea, Leb) and type 2 (X, Y, H) blood group-related antigens in the human pyloric and duodenal mucosae." Lab Invest **53**(2): 219-27.
- Moniaux, N., Escande, F., *et al.* (2001). "Structural organization and classification of the human mucin genes." Front Biosci **6**: D1192-206.
- Monteiro, M. A., Chan, K. H., *et al.* (1998). "Simultaneous expression of type 1 and type 2 Lewis blood group antigens by *Helicobacter pylori* lipopolysaccharides. Molecular mimicry between *h. pylori* lipopolysaccharides and human gastric epithelial cell surface glycoforms." J Biol Chem **273**(19): 11533-43.
- Moore, A., Basilion, J. P., *et al.* (1998). "Measuring transferrin receptor gene expression by NMR imaging." Biochim Biophys Acta **1402**(3): 239-49.
- Moore, A., Josephson, L., *et al.* (2001). "Human transferrin receptor gene as a marker gene for MR imaging." Radiology **221**(1): 244-50.
- Moore, A., Medarova, Z., *et al.* (2004). "In vivo targeting of underglycosylated MUC-1 tumor antigen using a multimodal imaging probe." Cancer Res **64**(5): 1821-7.
- Morikawa, T., Kato, J., *et al.* (2005). "A comparison of the immunochemical fecal occult blood test and total colonoscopy in the asymptomatic population." Gastroenterology **129**(2): 422-8.
- Morrin, M. M., Farrell, R. J., *et al.* (2000). "Utility of intravenously administered contrast material at CT colonography." Radiology **217**(3): 765-71.
- Morton, J. A., Pickles, M. M., *et al.* (1988). "The Sda antigen in the human kidney and colon." Immunol Invest **17**(3): 217-24.
- Moss, S. F., Legon, S., *et al.* (1992). "Effect of *Helicobacter pylori* on gastric somatostatin in duodenal ulcer disease." Lancet **340**(8825): 930-2.
- Muchmore, E. A., Varki, N. M., *et al.* (1987). "Developmental regulation of sialic acid modifications in rat and human colon." Faseb J **1**(3): 229-35.
- Muotiala, A., Helander, I. M., *et al.* (1992). "Low biological activity of *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide." Infect Immun **60**(4): 1714-6.
- Murata-Kamiya, N., Kurashima, Y., *et al.* (2007). "*Helicobacter pylori* CagA interacts with E-cadherin and deregulates the beta-catenin signal that promotes intestinal transdifferentiation in gastric epithelial cells." Oncogene **26**(32): 4617-26.
- Muto, T., Bussey, H. J., *et al.* (1975). "The evolution of cancer of the colon and rectum." Cancer **36**(6): 2251-70.
- Muto, T., Kamiya, J., *et al.* (1985). "Small "flat adenoma" of the large bowel with special reference to its clinicopathologic features." Dis Colon Rectum **28**(11): 847-51.
- Mutsaers, J. H., Van Halbeek, H., *et al.* (1986). "Typing of core and backbone domains of mucin-type oligosaccharides from human ovarian-cyst glycoproteins by 500-MHz <sup>1</sup>H-NMR spectroscopy." Eur J Biochem **157**(1): 139-46.

- Myerscough, N., Sylvester, P. A., *et al.* (2001). "Abnormal subcellular distribution of mature MUC2 and de novo MUC5AC mucins in adenomas of the rectum: immunohistochemical detection using non-VNTR antibodies to MUC2 and MUC5AC peptide." Glycoconj J **18**(11-12): 907-14.
- Nakagoe, T., Fukushima, K., *et al.* (2002). "Evaluation of sialyl Lewis(a), sialyl Lewis(x), and sialyl Tn antigens expression levels as predictors of recurrence after curative surgery in node-negative colorectal cancer patients." J Exp Clin Cancer Res **21**(1): 107-13.
- Nakamura, N., Ota, H., *et al.* (1998). "Histochemical reactivity of normal, metaplastic, and neoplastic tissues to alpha-linked N-acetylglucosamine residue-specific monoclonal antibody HIK1083." J Histochem Cytochem **46**(7): 793-801.
- Narisawa, T., Sato, T., *et al.* (1971). "Carcinoma of the colon and rectum of rats by rectal infusion of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine." Gann **62**(3): 231-4.
- Neeleman, A. P., Van Der Knaap, W. P., *et al.* (1994). "Identification and characterization of a UDP-GalNAc:GlcNAc beta-R beta 1-->4-N-acetylgalactosaminyltransferase from cercariae of the schistosome *Trichobilharzia ocellata*. Catalysis of a key step in the synthesis of N,N'-diacetyllactosedi amino (lacdiNAc)-type glycans." Glycobiology **4**(5): 641-51.
- Nieuw Amerongen, A. V., Bolscher, J. G., *et al.* (1998). "Sulfomucins in the human body." Biol Chem **379**(1): 1-18.
- Nilsson, C., Skoglund, A., *et al.* (2006). "An enzymatic ruler modulates Lewis antigen glycosylation of *Helicobacter pylori* LPS during persistent infection." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(8): 2863-8.
- Nishikawa, A., Imazawa, T., *et al.* (2005). "Induction of colon tumors in C57BL/6J mice fed MeIQx, IQ, or PhIP followed by dextran sulfate sodium treatment." Toxicol Sci **84**(2): 243-8.
- Niwa, H. (1965). Endoscopy of the colon. Gastroenterol Endosc Tokyo **7** 402-408.
- Noach, L. A., Rolf, T. M., *et al.* (1993). "Gastric metaplasia and *Helicobacter pylori* infection." Gut **34**(11): 1510-4.
- Nordman, H., Davies, J. R., *et al.* (2002). "Gastric MUC5AC and MUC6 are large oligomeric mucins that differ in size, glycosylation and tissue distribution." Biochem J **364**(Pt 1): 191-200.
- Oshiba, S., Wanatabe, A. (1965). Endoscopy of the colon. Gastroenterol Endosc Tokyo **7** 400-402.
- O'Brien, M. J., Winawer, S. J., *et al.* (1990). "The National Polyp Study. Patient and polyp characteristics associated with high-grade dysplasia in colorectal adenomas." Gastroenterology **98**(2): 371-9.
- Odenbreit, S., Puls, J., *et al.* (2000). "Translocation of *Helicobacter pylori* CagA into gastric epithelial cells by type IV secretion." Science **287**(5457): 1497-500.
- Odenbreit, S., Swoboda, K., *et al.* (2009). "Outer membrane protein expression profile in *Helicobacter pylori* clinical isolates." Infect Immun **77**(9): 3782-90.
- Odenbreit, S., Till, M., *et al.* (1999). "Genetic and functional characterization of the alpAB gene locus essential for the adhesion of *Helicobacter pylori* to human gastric tissue." Mol Microbiol **31**(5): 1537-48.

- Paerregaard, A., Espersen, F., *et al.* (1991). "Interactions between *Yersinia enterocolitica* and rabbit ileal mucus: growth, adhesion, penetration, and subsequent changes in surface hydrophobicity and ability to adhere to ileal brush border membrane vesicles." *Infect Immun* **59**(1): 253-60.
- Palmer, E. D. (1954). "Investigation of the gastric mucosa spirochetes of the human." *Gastroenterology* **27**(2): 218-20.
- Papathanassiou, D., Bruna-Muraille, J. C. *et al.* (2009). "Positron Emission Tomography in oncology: present and future of PET and PET/CT." *Crit Rev Oncol Hematol* **723**: 239-54.
- Pappalardo, G., Poletini, E., *et al.* (2000). "Magnetic resonance colonography versus conventional colonoscopy for the detection of colonic endoluminal lesions." *Gastroenterology* **119**(2): 300-4.
- Parsonnet, J., Friedman, G. D., *et al.* (1991). "Helicobacter pylori infection and the risk of gastric carcinoma." *N Engl J Med* **325**(16): 1127-31.
- Parsons, T. F. and Pierce, J. G. (1980). "Oligosaccharide moieties of glycoprotein hormones: bovine lutropin resists enzymatic deglycosylation because of terminal O-sulfated N-acetylhexosamines." *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**(12): 7089-93.
- Pearson, J. P., Allen, A., *et al.* (1981). "A 70000-molecular-weight protein isolated from purified pig gastric mucus glycoprotein by reduction of disulphide bridges and its implication in the polymeric structure." *Biochem J* **197**(1): 155-62.
- Peck, B., Ortkamp, M., *et al.* (1999). "Conservation, localization and expression of HopZ, a protein involved in adhesion of *Helicobacter pylori*." *Nucleic Acids Res* **27**(16): 3325-33.
- Pecora, R. (2000). "Dynamic light scattering measurement of nanometer particles in liquids." *J Nanopart Res* **2**: 123-31.
- Penet, M. F., Pathak, A. P., *et al.* (2009). "Noninvasive multiparametric imaging of metastasis-permissive microenvironments in a human prostate cancer xenograft." *Cancer Res* **69**(22): 8822-9.
- Perez-Vilar, J. and Hill, R. L. (1997). "Norrie disease protein (norrin) forms disulfide-linked oligomers associated with the extracellular matrix." *J Biol Chem* **272**(52): 33410-5.
- Perez-Vilar, J., Randell, S. H., *et al.* (2004). "C-Mannosylation of MUC5AC and MUC5B Cys subdomains." *Glycobiology* **14**(4): 325-37.
- Pflock, M., Dietz, P., *et al.* (2004). "Genetic evidence for histidine kinase HP165 being an acid sensor of *Helicobacter pylori*." *FEMS Microbiol Lett* **234**(1): 51-61.
- Pflock, M., Finsterer, N., *et al.* (2006). "Characterization of the ArsRS regulon of *Helicobacter pylori*, involved in acid adaptation." *J Bacteriol* **188**(10): 3449-62.
- Phillips, J. E., Case, N. R., *et al.* (2006). "An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the determination of mucin levels in bronchoalveolar lavage fluid." *J Pharmacol Toxicol Methods* **53**(2): 160-7.
- Pickhardt, P. J., Choi, J. R., *et al.* (2003). "Computed tomographic virtual colonoscopy to screen for colorectal neoplasia in asymptomatic adults." *N Engl J Med* **349**(23): 2191-200.

- Pickhardt, P. J., Hassan, C., *et al.* (2011). "Colorectal cancer: CT colonography and colonoscopy for detection--systematic review and meta-analysis." Radiology **259**(2): 393-405.
- Pigny, P., Guyonnet-Duperat, V., *et al.* (1996). "Human mucin genes assigned to 11p15.5: identification and organization of a cluster of genes." Genomics **38**(3): 340-52.
- Podolsky, D. K. (1985). "Oligosaccharide structures of human colonic mucin." J Biol Chem **260**(14): 8262-71.
- Poduslo, J. F., Curran, G. L., *et al.* (2004). "Design and chemical synthesis of a magnetic resonance contrast agent with enhanced in vitro binding, high blood-brain barrier permeability, and in vivo targeting to Alzheimer's disease amyloid plaques." Biochemistry **43**(20): 6064-75.
- Porchet, N. and Aubert, J. P. (2004). "[MUC genes: mucin or not mucin? That is the question]." Med Sci (Paris) **20**(5): 569-74.
- Porchet, N., Nguyen, V. C., *et al.* (1991). "Molecular cloning and chromosomal localization of a novel human tracheo-bronchial mucin cDNA containing tandemly repeated sequences of 48 base pairs." Biochem Biophys Res Commun **175**(2): 414-22.
- Pretlow, T. P., Barrow, B. J., *et al.* (1991). "Aberrant crypts: putative preneoplastic foci in human colonic mucosa." Cancer Res **51**(5): 1564-7.
- Puchelle, E., Beorchia, A., *et al.* (1991). "Three-dimensional imaging of the mucus secretory process in the cryofixed frog respiratory epithelium." Biol Cell **72**(1-2): 159-66.
- Radhakrishnan, P., Halagowder, D., *et al.* (2007). "Altered expression of MUC2 and MUC5AC in response to Shigella infection, an in vivo study." Biochim Biophys Acta **1770**(6): 884-9.
- Ransohoff, D. F. and Sandler, R. S. (2002). "Clinical practice. Screening for colorectal cancer." N Engl J Med **346**(1): 40-4.
- Rauws, E. A. and Tytgat, G. N. (1990). "Cure of duodenal ulcer associated with eradication of Helicobacter pylori." Lancet **335**(8700): 1233-5.
- Reeves, E. P., Ali, T., *et al.* (2008). "Helicobacter pylori lipopolysaccharide interacts with TFF1 in a pH-dependent manner." Gastroenterology **135**(6): 2043-54, 2054 e1-2.
- Reis, C. A., David, L., *et al.* (1999). "Intestinal metaplasia of human stomach displays distinct patterns of mucin (MUC1, MUC2, MUC5AC, and MUC6) expression." Cancer Res **59**(5): 1003-7.
- Reis, C. A., David, L., *et al.* (2000). Immunohistochemical study of the expression of MUC6 mucin and co-expression of other secreted mucins (MUC5AC and MUC2) in human gastric carcinomas. J Histochem Cytochem **483**(3): 377-88.
- Rex, D. K. and Helbig, C. C. (2007). "High yields of small and flat adenomas with high-definition colonoscopes using either white light or narrow band imaging." Gastroenterology **133**(1): 42-7.
- Rimbara, E., Fischbach, L. A., *et al.* (2011). "Optimal therapy for Helicobacter pylori infections." Nat Rev Gastroenterol Hepatol **8**(2): 79-88.
- Rindi, G., Leiter, A. B., *et al.* (2004). "The "normal" endocrine cell of the gut: changing concepts and new evidences." Ann N Y Acad Sci **1014**: 1-12.
- Rio, M. C., Bellocq, J. P., *et al.* (1988). "Breast cancer-associated pS2 protein: synthesis and secretion by normal stomach mucosa." Science **241**(4866): 705-8.

- Robbe, C., Capon, C., *et al.* (2004). "Structural diversity and specific distribution of O-glycans in normal human mucins along the intestinal tract." Biochem J **384**(Pt 2): 307-16.
- Robbe, C., Capon, C., *et al.* (2003). "Evidence of regio-specific glycosylation in human intestinal mucins: presence of an acidic gradient along the intestinal tract." J Biol Chem **278**(47): 46337-48.
- Robbe-Masselot, C., Maes, E., *et al.* (2009). "Glycosylation of human fetal mucins: a similar repertoire of O-glycans along the intestinal tract." Glycoconj J **26**(4): 397-413.
- Roberton, A. M., Mantle, M., *et al.* (1989). "The putative 'link' glycopeptide associated with mucus glycoproteins. Composition and properties of preparations from the gastrointestinal tracts of several mammals." Biochem J **261**(2): 637-47.
- Rockey, D. C., Paulson, E., *et al.* (2005). "Analysis of air contrast barium enema, computed tomographic colonography, and colonoscopy: prospective comparison." Lancet **365**(9456): 305-11.
- Romaniuk, P. J., Zoltowska, B., *et al.* (1987). "Campylobacter pylori, the spiral bacterium associated with human gastritis, is not a true Campylobacter sp." J Bacteriol **169**(5): 2137-41.
- Roncucci, L., Stamp, D., *et al.* (1991). "Identification and quantification of aberrant crypt foci and microadenomas in the human colon." Hum Pathol **22**(3): 287-94.
- Rose, M. C. (1992). "Mucins: structure, function, and role in pulmonary diseases." Am J Physiol **263**(4 Pt 1): L413-29.
- Rosenberg, D. W., Giardina, C., *et al.* (2009). "Mouse models for the study of colon carcinogenesis." Carcinogenesis **30**(2): 183-96.
- Rouse, A. R., Kano, A., *et al.* (2004). "Design and demonstration of a miniature catheter for a confocal microendoscope." Appl Opt **43**(31): 5763-71.
- Rousseau, K., Byrne, C., *et al.* (2004). "The complete genomic organization of the human MUC6 and MUC2 mucin genes." Genomics **83**(5): 936-9.
- Rowland, M., Imrie, C., *et al.* (1999). "How should Helicobacter pylori infected children be managed?" Gut **45 Suppl 1**: I36-9.
- Saar, B., Heverhagen, J. T., *et al.* (2000). "Magnetic resonance colonography and virtual magnetic resonance colonoscopy with the 1.0-T system: a feasibility study." Invest Radiol **35**(9): 521-6.
- Sakai, E., Takahashi, H., *et al.* (2011). "Investigation of the prevalence and number of aberrant crypt foci associated with human colorectal neoplasm." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **20**(9): 1918-24.
- Sakamoto, S., Watanabe, T., *et al.* (1989). "Expression of Lewisa, Lewisb, Lewisx, Lewisy, sialyl-Lewisa, and sialyl-Lewisx blood group antigens in human gastric carcinoma and in normal gastric tissue." Cancer Res **49**(3): 745-52.
- Salyers, A. A., West, S. E., *et al.* (1977). "Fermentation of mucins and plant polysaccharides by anaerobic bacteria from the human colon." Appl Environ Microbiol **34**(5): 529-33.
- Sartor, R. B. (2008). "Microbial influences in inflammatory bowel diseases." Gastroenterology **134**(2): 577-94.

- Sasaki, K., Kurata-Miura, K., *et al.* (1997). "Expression cloning of cDNA encoding a human beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase that is essential for poly-N-acetyllactosamine synthesis." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(26): 14294-9.
- Satin, B., Del Giudice, G., *et al.* (2000). "The neutrophil-activating protein (HP-NAP) of *Helicobacter pylori* is a protective antigen and a major virulence factor." J Exp Med **191**(9): 1467-76.
- Sato, T., Gotoh, M., *et al.* (2003). "Molecular cloning and characterization of a novel human beta 1,4-N-acetylgalactosaminyltransferase, beta 4GalNAc-T3, responsible for the synthesis of N,N'-diacetyllactosamine, galNAc beta 1-4GlcNAc." J Biol Chem **278**(48): 47534-44.
- Satomi, Y., Shimonishi, Y., *et al.* (2004). "N-glycosylation at Asn(491) in the Asn-Xaa-Cys motif of human transferrin." FEBS Lett **576**(1-2): 51-6.
- Schar, J., Sickmann, A., *et al.* (2005). "Phosphorylation-independent activity of atypical response regulators of *Helicobacter pylori*." J Bacteriol **187**(9): 3100-9.
- Schoen, R. E., Mutch, M., *et al.* (2008). "The natural history of aberrant crypt foci." Gastrointest Endosc **67**(7): 1097-102.
- Schreiber, S., Konradt, M., *et al.* (2004). "The spatial orientation of *Helicobacter pylori* in the gastric mucus." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(14): 5024-9.
- Schreiber, S. and Scheid, P. (1997). "Gastric mucus of the guinea pig: proton carrier and diffusion barrier." Am J Physiol **272**(1 Pt 1): G63-70.
- Schroeder, J. A., Adriance, M. C., *et al.* (2003). "MUC1 alters beta-catenin-dependent tumor formation and promotes cellular invasion." Oncogene **22**(9): 1324-32.
- Schwientek, T., Yeh, J. C., *et al.* (2000). "Control of O-glycan branch formation. Molecular cloning and characterization of a novel thymus-associated core 2 beta1, 6-n-acetylglucosaminyltransferase." J Biol Chem **275**(15): 11106-13.
- Scott, D. R., Weeks, D., *et al.* (1998). "The role of internal urease in acid resistance of *Helicobacter pylori*." Gastroenterology **114**(1): 58-70.
- Segal, E. D., Cha, J., *et al.* (1999). "Altered states: involvement of phosphorylated CagA in the induction of host cellular growth changes by *Helicobacter pylori*." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(25): 14559-64.
- Segal, E. D., Falkow, S., *et al.* (1996). "*Helicobacter pylori* attachment to gastric cells induces cytoskeletal rearrangements and tyrosine phosphorylation of host cell proteins." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(3): 1259-64.
- Segal, E. D., Lange, C., *et al.* (1997). "Induction of host signal transduction pathways by *Helicobacter pylori*." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(14): 7595-9.
- Sheahan, D. G. and Jervis, H. R. (1976). "Comparative histochemistry of gastrointestinal mucosubstances." Am J Anat **146**(2): 103-31.
- Sheehan, J. K. and Carlstedt, I. (1984). "The effect of guanidinium chloride on the behaviour of human cervical-mucus glycoproteins. Evidence for unfolding regions of ordered structure in 6M-guanidinium chloride." Biochem J **221**(2): 499-504.
- Sheehan, J. K., Oates, K., *et al.* (1986). "Electron microscopy of cervical, gastric and bronchial mucus glycoproteins." Biochem J **239**(1): 147-53.
- Sheehan, J. K., Thornton, D. J., *et al.* (1996). "Biosynthesis of the MUC2 mucin: evidence for a slow assembly of fully glycosylated units." Biochem J **315** ( Pt 3): 1055-60.

- Shelton-Inloes, B. B., Broze, G. J., Jr., *et al.* (1987). "Evolution of human von Willebrand factor: cDNA sequence polymorphisms, repeated domains, and relationship to von Willebrand antigen II." Biochem Biophys Res Commun **144**(2): 657-65.
- Shomer, N. H., Dangler, C. A., *et al.* (1998). "Experimental *Helicobacter pylori* infection induces antral gastritis and gastric mucosa-associated lymphoid tissue in guinea pigs." Infect Immun **66**(6): 2614-8.
- Sidebotham, R. L., Batten, J. J., *et al.* (1991). "Breakdown of gastric mucus in presence of *Helicobacter pylori*." J Clin Pathol **44**(1): 52-7.
- Silva, A. J., Pham, K., *et al.* (2003). "Haemagglutinin/protease expression and mucin gel penetration in El Tor biotype *Vibrio cholerae*." Microbiology **149**(Pt 7): 1883-91.
- Silva, E., Teixeira, A., *et al.* (2002). "Mucins as key molecules for the classification of intestinal metaplasia of the stomach." Virchows Arch **440**(3): 311-7.
- Skouloubris, S., Labigne, A., *et al.* (1997). "Identification and characterization of an aliphatic amidase in *Helicobacter pylori*." Mol Microbiol **25**(5): 989-98.
- Skouloubris, S., Labigne, A., *et al.* (2001). "The AmiE aliphatic amidase and AmiF formamidase of *Helicobacter pylori*: natural evolution of two enzyme paralogues." Mol Microbiol **40**(3): 596-609.
- Slomiany, B. L. and Slomiany, A. (1992). "Mechanism of *Helicobacter pylori* pathogenesis: focus on mucus." J Clin Gastroenterol **14 Suppl 1**: S114-21.
- Slomiany, B. L., Zdebska, E., *et al.* (1984). "Structural characterization of neutral oligosaccharides of human H+Leb+ gastric mucin." J Biol Chem **259**(5): 2863-9.
- Smith, G., Carey, F. A., *et al.* (2002). "Mutations in APC, Kirsten-ras, and p53--alternative genetic pathways to colorectal cancer." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(14): 9433-8.
- Smith, P. L. and Baenziger, J. U. (1988). "A pituitary N-acetylgalactosamine transferase that specifically recognizes glycoprotein hormones." Science **242**(4880): 930-3.
- Smith, P. L., Skelton, T. P., *et al.* (1992). "The asparagine-linked oligosaccharides on tissue factor pathway inhibitor terminate with SO<sub>4</sub>-4GalNAc beta 1, 4GlcNAc beta 1,2 Mana alpha." J Biol Chem **267**(27): 19140-6.
- Snelling, W. J., Moran, A. P., *et al.* (2007). "HorB (HP0127) is a gastric epithelial cell adhesin." Helicobacter **12**(3): 200-9.
- Solnick, J. V., Hansen, L. M., *et al.* (2004). "Modification of *Helicobacter pylori* outer membrane protein expression during experimental infection of rhesus macaques." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(7): 2106-11.
- Sommi, P., Ricci, V., *et al.* (1998). "Persistence of *Helicobacter pylori* VacA toxin and vacuolating potential in cultured gastric epithelial cells." Am J Physiol **275**(4 Pt 1): G681-8.
- Sonnenburg, J. L., Xu, J., *et al.* (2005). "Glycan foraging in vivo by an intestine-adapted bacterial symbiont." Science **307**(5717): 1955-9.
- Sonvico, F., Mornet, S., *et al.* (2005). "Folate-conjugated iron oxide nanoparticles for solid tumor targeting as potential specific magnetic hyperthermia mediators: synthesis, physicochemical characterization, and in vitro experiments." Bioconjug Chem **16**(5): 1181-8.
- Spada, C., Hassan, C., *et al.* (2011). "Second-generation colon capsule endoscopy compared with colonoscopy." Gastrointest Endosc **74**(3): 581-589 e1.

- Specian, R. D. and Neutra, M. R. (1980). "Mechanism of rapid mucus secretion in goblet cells stimulated by acetylcholine." J Cell Biol **85**(3): 626-40.
- Spiro, R. G. (2002). "Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds." Glycobiology **12**(4): 43R-56R.
- Stein, M., Bagnoli, F., *et al.* (2002). "c-Src/Lyn kinases activate *Helicobacter pylori* CagA through tyrosine phosphorylation of the EPIYA motifs." Mol Microbiol **43**(4): 971-80.
- Stein, M., Rappuoli, R., *et al.* (2000). "Tyrosine phosphorylation of the *Helicobacter pylori* CagA antigen after cag-driven host cell translocation." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(3): 1263-8.
- Stolte, M. and Eidt, S. (1989). "Lymphoid follicles in antral mucosa: immune response to *Campylobacter pylori*?" J Clin Pathol **42**(12): 1269-71.
- Stryker, S. J., Wolff, B. G., *et al.* (1987). "Natural history of untreated colonic polyps." Gastroenterology **93**(5): 1009-13.
- Sturegard, E., Sjunnesson, H., *et al.* (1998). "Severe gastritis in guinea-pigs infected with *Helicobacter pylori*." J Med Microbiol **47**(12): 1123-9.
- Suerbaum, S. and Michetti, P. (2002). "*Helicobacter pylori* infection." N Engl J Med **347**(15): 1175-86.
- Suerbaum, S., Smith, J. M., *et al.* (1998). "Free recombination within *Helicobacter pylori*." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(21): 12619-24.
- Sugiyama, A., Maruta, F., *et al.* (1998). "*Helicobacter pylori* infection enhances N-methyl-N-nitrosourea-induced stomach carcinogenesis in the Mongolian gerbil." Cancer Res **58**(10): 2067-9.
- Suzuki, R., Kohno, H., *et al.* (2006). "Strain differences in the susceptibility to azoxymethane and dextran sodium sulfate-induced colon carcinogenesis in mice." Carcinogenesis **27**(1): 162-9.
- Sycuro, L. K., Pincus, Z., *et al.* (2010). "Peptidoglycan crosslinking relaxation promotes *Helicobacter pylori*'s helical shape and stomach colonization." Cell **141**(5): 822-33.
- Sylvester, P. A., Myerscough, N., *et al.* (2001). "Differential expression of the chromosome 11 mucin genes in colorectal cancer." J Pathol **195**(3): 327-35.
- Szabo, I., Brutsche, S., *et al.* (1999). "Formation of anion-selective channels in the cell plasma membrane by the toxin VacA of *Helicobacter pylori* is required for its biological activity." Embo J **18**(20): 5517-27.
- Takata, M., Yao, T., *et al.* (2003). "Phenotypic alteration in malignant transformation of colonic villous tumours: with special reference to a comparison with tubular tumours." Histopathology **43**(4): 332-9.
- Takayama, T., Katsuki, S., *et al.* (1998). "Aberrant crypt foci of the colon as precursors of adenoma and cancer." N Engl J Med **339**(18): 1277-84.
- Takeda, K., Hashimoto, K., *et al.* (2010). "Direct effects of IL-4/IL-13 and the nematode *Nippostrongylus brasiliensis* on intestinal epithelial cells in vitro." Parasite Immunol **32**(6): 420-9.
- Tammer, I., Brandt, S., *et al.* (2007). "Activation of Abl by *Helicobacter pylori*: a novel kinase for CagA and crucial mediator of host cell scattering." Gastroenterology **132**(4): 1309-19.

- Tanaka, T., Kohno, H., *et al.* (2003). "A novel inflammation-related mouse colon carcinogenesis model induced by azoxymethane and dextran sodium sulfate." Cancer Sci **94**(11): 965-73.
- Taupin, D., Pedersen, J., *et al.* (2001). "Augmented intestinal trefoil factor (TFF3) and loss of pS2 (TFF1) expression precedes metaplastic differentiation of gastric epithelium." Lab Invest **81**(3): 397-408.
- Taupin, D. and Podolsky, D. K. (2003). "Trefoil factors: initiators of mucosal healing." Nat Rev Mol Cell Biol **4**(9): 721-32.
- Teixeira, A., David, L., *et al.* (2002). "Expression of mucins (MUC1, MUC2, MUC5AC, and MUC6) and type 1 Lewis antigens in cases with and without *Helicobacter pylori* colonization in metaplastic glands of the human stomach." J Pathol **197**(1): 37-43.
- Ten Hagen, K. G., Fritz, T. A., *et al.* (2003). "All in the family: the UDP-GalNAc:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferases." Glycobiology **13**(1): 1R-16R.
- Thiberge, J. M., Boursaux-Eude, C., *et al.* (2010). "From array-based hybridization of *Helicobacter pylori* isolates to the complete genome sequence of an isolate associated with MALT lymphoma." BMC Genomics **11**: 368.
- Thomson, D. M., Krupey, J., *et al.* (1969). "The radioimmunoassay of circulating carcinoembryonic antigen of the human digestive system." Proc Natl Acad Sci U S A **64**(1): 161-7.
- Thornton, D. J., Davies, J. R., *et al.* (2001). "Identification of a nonmucin glycoprotein (gp-340) from a purified respiratory mucin preparation: evidence for an association involving the MUC5B mucin." Glycobiology **11**(11): 969-77.
- Tomb, J. F., White, O., *et al.* (1997). "The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*." Nature **388**(6642): 539-47.
- Toribara, N. W., Gum, J. R., Jr., *et al.* (1991). "MUC-2 human small intestinal mucin gene structure. Repeated arrays and polymorphism." J Clin Invest **88**(3): 1005-13.
- Toribara, N. W., Ho, S. B., *et al.* (1997). "The carboxyl-terminal sequence of the human secretory mucin, MUC6. Analysis Of the primary amino acid sequence." J Biol Chem **272**(26): 16398-403.
- Toribara, N. W., Robertson, A. M., *et al.* (1993). "Human gastric mucin. Identification of a unique species by expression cloning." J Biol Chem **268**(8): 5879-85.
- Toribara, N. W. and Sleisenger, M. H. (1995). "Screening for colorectal cancer." N Engl J Med **332**(13): 861-7.
- Tu, Q. V., McGuckin, M. A., *et al.* (2008). "Campylobacter jejuni response to human mucin MUC2: modulation of colonization and pathogenicity determinants." J Med Microbiol **57**(Pt 7): 795-802.
- Ujita, M., Mcauliffe, J., *et al.* (1998). "Synthesis of poly-N-acetyllactosamine in core 2 branched O-glycans. The requirement of novel beta-1,4-galactosyltransferase IV and beta-1,3-n-acetylglucosaminyltransferase." J Biol Chem **273**(52): 34843-9.
- Ullman, T. A. and Itzkowitz, S. H. (2011). "Intestinal inflammation and cancer." Gastroenterology **140**(6): 1807-16.
- Uraoka, T., Saito, Y., *et al.* (2008). "Detectability of colorectal neoplastic lesions using a narrow-band imaging system: a pilot study." J Gastroenterol Hepatol **23**(12): 1810-5.

- Uyama, T., Kitagawa, H., *et al.* (2002). "Molecular cloning and expression of human chondroitin N-acetylgalactosaminyltransferase: the key enzyme for chain initiation and elongation of chondroitin/dermatan sulfate on the protein linkage region tetrasaccharide shared by heparin/heparan sulfate." *J Biol Chem* **277**(11): 8841-6.
- Van Beurden-Lamers, W. M., Spee-Brand, R., *et al.* (1989). "Sulphation causes heterogeneity of gastric mucins." *Biochim Biophys Acta* **990**(3): 232-9.
- Van De Bovenkamp, J. H., Hau, C. M., *et al.* (1998). "Molecular cloning of human gastric mucin MUC5AC reveals conserved cysteine-rich D-domains and a putative leucine zipper motif." *Biochem Biophys Res Commun* **245**(3): 853-9.
- Van De Bovenkamp, J. H., Korteland-Van Male, A. M., *et al.* (2003). "Metaplasia of the duodenum shows a Helicobacter pylori-correlated differentiation into gastric-type protein expression." *Hum Pathol* **34**(2): 156-65.
- Van De Bovenkamp, J. H., Mahdavi, J., *et al.* (2003). "The MUC5AC glycoprotein is the primary receptor for Helicobacter pylori in the human stomach." *Helicobacter* **8**(5): 521-32.
- Van De Vijver, K. K., Deelder, A. M., *et al.* (2006). "LacdiNAc- and LacNAc-containing glycans induce granulomas in an in vivo model for schistosome egg-induced hepatic granuloma formation." *Glycobiology* **16**(3): 237-43.
- Van Den Berg, T. K., Honing, H., *et al.* (2004). "LacdiNAc-glycans constitute a parasite pattern for galectin-3-mediated immune recognition." *J Immunol* **173**(3): 1902-7.
- Van Engeland, M., Derks, S., *et al.* (2011). "Colorectal cancer epigenetics: complex simplicity." *J Clin Oncol* **29**(10): 1382-91.
- Van Gossum, A., Munoz-Navas, M., *et al.* (2009). "Capsule endoscopy versus colonoscopy for the detection of polyps and cancer." *N Engl J Med* **361**(3): 264-70.
- Van Klinken, B. J., Einerhand, A. W., *et al.* (1998). "The oligomerization of a family of four genetically clustered human gastrointestinal mucins." *Glycobiology* **8**(1): 67-75.
- Van Remoortere, A., Hokke, C. H., *et al.* (2000). "Various stages of schistosoma express Lewis(x), LacdiNAc, GalNAcbeta1-4 (Fucalpha1-3)GlcNAc and GalNAcbeta1-4(Fucalpha1-2Fucalpha1-3)GlcNAc carbohydrate epitopes: detection with monoclonal antibodies that are characterized by enzymatically synthesized neoglycoproteins." *Glycobiology* **10**(6): 601-9.
- Velcich, A., Palumbo, L., *et al.* (1997). "Organization and regulatory aspects of the human intestinal mucin gene (MUC2) locus." *J Biol Chem* **272**(12): 7968-76.
- Viala, J., Chaput, C., *et al.* (2004). "Nod1 responds to peptidoglycan delivered by the Helicobacter pylori cag pathogenicity island." *Nat Immunol* **5**(11): 1166-74.
- Vieira, M. A., Gomes, T. A., *et al.* (2010). "Two atypical enteropathogenic Escherichia coli strains induce the production of secreted and membrane-bound mucins to benefit their own growth at the apical surface of human mucin-secreting intestinal HT29-MTX cells." *Infect Immun* **78**(3): 927-38.
- Vinall, L. E., Hill, A. S., *et al.* (1998). "Variable number tandem repeat polymorphism of the mucin genes located in the complex on 11p15.5." *Hum Genet* **102**(3): 357-66.
- Vining D. J., Shifrin R. Y., *et al.* (1994). "Virtual colonoscopy (abstr)" *Radiology* **193**(P): 446.

- Walker, M. M. and Dixon, M. F. (1996). "Gastric metaplasia: its role in duodenal ulceration." Aliment Pharmacol Ther **10 Suppl 1**: 119-28.
- Wang, T. D., Friedland, S., *et al.* (2007). "Functional imaging of colonic mucosa with a fibered confocal microscope for real-time in vivo pathology." Clin Gastroenterol Hepatol **5**(11): 1300-5.
- Weeks, D. L., Eskandari, S., *et al.* (2000). "A H<sup>+</sup>-gated urea channel: the link between *Helicobacter pylori* urease and gastric colonization." Science **287**(5452): 482-5.
- Weel, J. F., Van Der Hulst, R. W., *et al.* (1996). "The interrelationship between cytotoxin-associated gene A, vacuolating cytotoxin, and *Helicobacter pylori*-related diseases." J Infect Dis **173**(5): 1171-5.
- Weissleder, R. and Mahmood, U. (2001). "Molecular imaging." Radiology **219**(2): 316-33.
- Weitz, J., Koch, M., *et al.* (2005). "Colorectal cancer." Lancet **365**(9454): 153-65.
- Williams, S. E. and Turnberg, L. A. (1980). "Retardation of acid diffusion by pig gastric mucosa: a potential role in mucosal protection." Gastroenterology **79**(2): 299-304.
- Winawer, S. J., Zauber, A. G., *et al.* (1993). "Prevention of colorectal cancer by colonoscopic polypectomy. The National Polyp Study Workgroup." N Engl J Med **329**(27): 1977-81.
- Worthley, D. L., Whitehall, V. L., *et al.* (2007). "Colorectal carcinogenesis: road maps to cancer." World J Gastroenterol **13**(28): 3784-91.
- Wotherspoon, A. C., Doglioni, C., *et al.* (1993). "Regression of primary low-grade B-cell gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue type after eradication of *Helicobacter pylori*." Lancet **342**(8871): 575-7.
- Wotherspoon, A. C., Ortiz-Hidalgo, C., *et al.* (1991). "*Helicobacter pylori*-associated gastritis and primary B-cell gastric lymphoma." Lancet **338**(8776): 1175-6.
- Wreschner, D. H., McGuckin, M. A., *et al.* (2002). "Generation of ligand-receptor alliances by "SEA" module-mediated cleavage of membrane-associated mucin proteins." Protein Sci **11**(3): 698-706.
- Wu, W., Kemp, B. L., *et al.* (1999). "Expression of DMBT1, a candidate tumor suppressor gene, is frequently lost in lung cancer." Cancer Res **59**(8): 1846-51.
- Wyatt, J. I., Rathbone, B. J., *et al.* (1988). "*Campylobacter pylori* and development of duodenal ulcer." Lancet **1**(8577): 118-9.
- Wyatt, J. I., Rathbone, B. J., *et al.* (1990). "Gastric epithelium in the duodenum: its association with *Helicobacter pylori* and inflammation." J Clin Pathol **43**(12): 981-6.
- Xiang, Z., Censini, S., *et al.* (1995). "Analysis of expression of CagA and VacA virulence factors in 43 strains of *Helicobacter pylori* reveals that clinical isolates can be divided into two major types and that CagA is not necessary for expression of the vacuolating cytotoxin." Infect Immun **63**(1): 94-8.
- Yada, T., Sato, T., *et al.* (2003). "Chondroitin sulfate synthase-3. Molecular cloning and characterization." J Biol Chem **278**(41): 39711-25.
- Yamaoka, Y., Kita, M., *et al.* (1997). "Induction of various cytokines and development of severe mucosal inflammation by cagA gene positive *Helicobacter pylori* strains." Gut **41**(4): 442-51.
- Yamaoka, Y., Kwon, D. H., *et al.* (2000). "A M(r) 34,000 proinflammatory outer membrane protein (oipA) of *Helicobacter pylori*." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(13): 7533-8.

Yamashiro, S., Haraguchi, M., *et al.* (1995). "Substrate specificity of beta 1,4-N-acetylgalactosaminyltransferase in vitro and in cDNA-transfected cells. GM2/GD2 synthase efficiently generates asialo-GM2 in certain cells." J Biol Chem **270**(11): 6149-55.