

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique



Université Frères Mentouri Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Animale

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة والحياة
قسم بيولوجيا الحيوان

Thèse présentée en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat 3^{ème} cycle LMD

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie
Filière : Sciences Biologiques
Spécialité : *Génétique Moléculaire*

N° d'ordre : 76/D3C/2019
N° de série : 12/BA/2019

Identification des souches de *Helicobacter pylori* par l'utilisation des marqueurs génétiques

Présentée et soutenue par : MEHASNI Samiha

Le 18/11/2019

Jury d'évaluation :

Président du jury:
KITOUNI Mahmoud

Prof. Université Frères Mentouri, Constantine 1

Directeur de thèse :
BENHIZIA Yacine

Prof. Université Frères Mentouri, Constantine 1

Co-directrice :
BENTCHOULA Chafia

Prof. Université Salah Boubnider, Constantine 3

Examineurs :

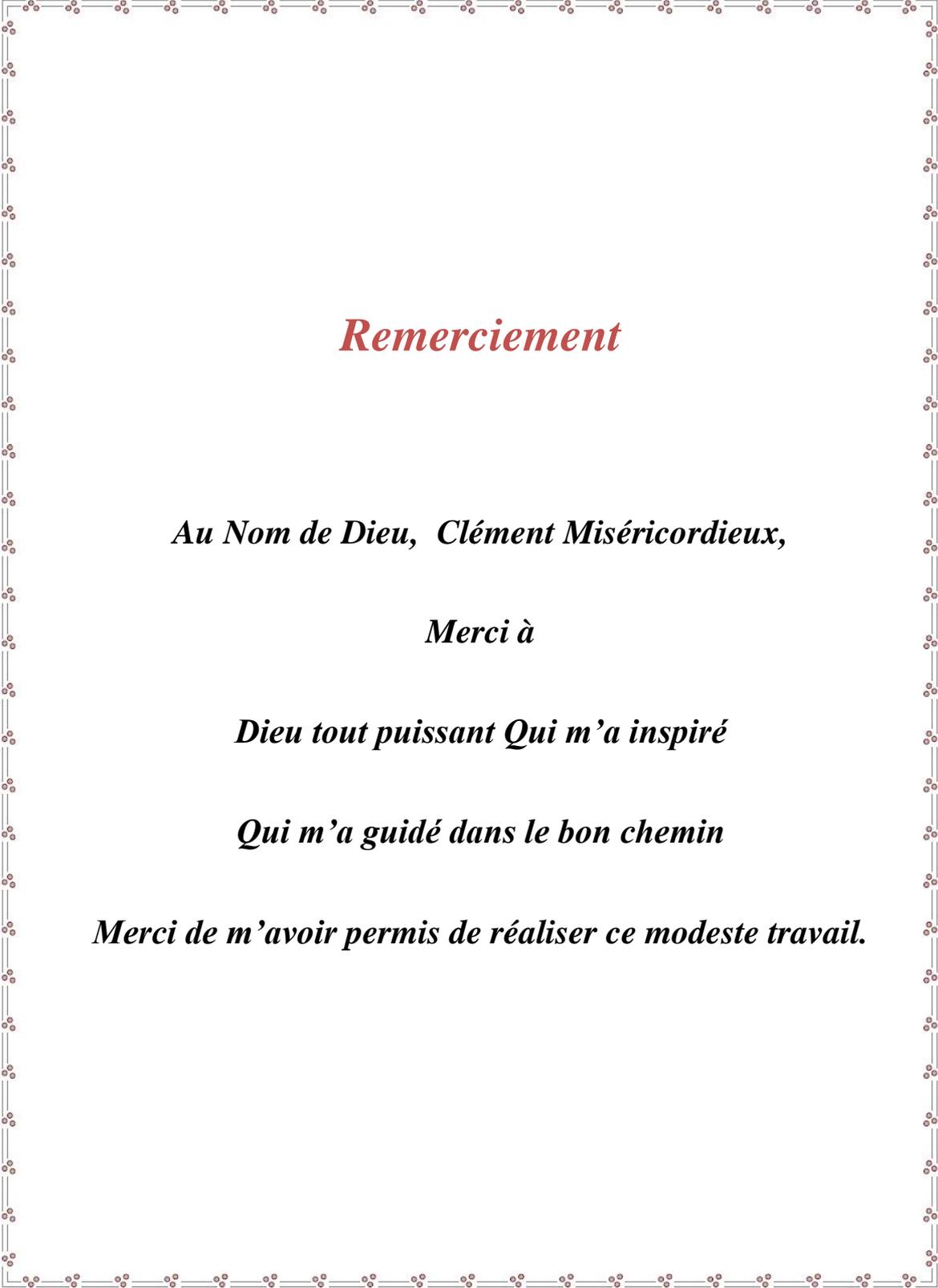
KITOUNI Yacine

Prof. Université Salah Boubnider, Constantine 3

GHAZOUALI Razika

MCA. Université Frères Mentouri, Constantine 1

**Année universitaire
2018 - 2019**



Remerciement

Au Nom de Dieu, Clément Miséricordieux,

Merci à

Dieu tout puissant Qui m'a inspiré

Qui m'a guidé dans le bon chemin

Merci de m'avoir permis de réaliser ce modeste travail.

Remerciements

Je voudrais tout d'abord remercier grandement mes directeurs de thèse, le Professeur Yacine BENHIZIA et le Professeur Chafia BENTCHOUALA, pour avoir accepté de diriger ce travail. Ils ont toujours été là pour me soutenir et me conseiller au cours de l'élaboration de cette thèse. Merci d'avoir permis qu'une « paillasse » Helicobacter voit le jour au service de bactériologie du CHU de Constantine, merci pour les nombreux encouragements que vous m'avez prodigué dans les moments difficiles.

J'exprime toute ma reconnaissance au Professeur Dalila SATTA responsable de la filière « Génétique » à l'Université Frères Mentouri Constantine 1 qui m'a suivi régulièrement lors de l'élaboration de cette thèse. Je vous remercie pour votre générosité, bonté, disponibilité et soutien indéfectible.

Mes remerciements s'adressent également aux membres du jury, les Professeurs Mahmoud Kitouni, Yacine Kitouni et Docteur Razika Gharzouli pour m'avoir fait l'honneur d'accepter d'évaluer ce travail. Veuillez accepter, chers maîtres, mes sincères remerciements et toute ma reconnaissance.

Je remercie énormément le Professeur Talel HAMMADA, Chef de Service d'Hépatogastroentérologie et d'Endoscopie Digestive, CHU de Constantine, le Professeur Badereddine BOUSSAFSAF, ancien Chef de Service des Explorations Endoscopiques, CHU de Constantine et le Professeur Kamel Hannache, Service de Médecine Interne, CHU de Constantine pour leur collaboration.

Merci également à l'ensemble des cliniciens et gastroentérologues, plus particulièrement Dr SLIMANI, Dr BENDJLOUL, Dr BOUTERAA, Dr BOUMENDJEL, Dr BOUHOUCHE, Dr CHEHAD, Dr HOUAME. Merci à tout le personnel paramédical, en particulier FOUJIL et HOUCINE pour leur contribution à ce travail.

Je remercie le Professeur BELABED Chef de Service de Bactériologie CHU de Constantine de m'avoir ouvert les portes de son laboratoire. Merci de m'avoir permis de travailler dans les meilleures conditions. Merci à tous le personnel du Laboratoire de Bactériologie pour leur aide.

Un grand Merci à Dr Fazia DJENNANE Service de Microbiologie CHU Mustapha Bacha, Alger de m'avoir appris les techniques d'isolement et d'identification de H. pylori.

J'aimerais remercier particulièrement Monsieur le Professeur Francis MEGRAUD Ancien Directeur du Centre Nationale Français de Référence des Campylobacter et Helicobacter (CNRCH, Bordeaux, France) pour votre accueil chaleureux au sein du laboratoire, votre grande gentillesse, disponibilité et vos précieux conseils. Sans votre aide, ce travail n'aurait pu être réalisé. Merci également au Professeur Philippe LEHOURS, actuel Directeur du CNRCH.

Merci à l'ensemble des membres du CNRCH, Mme Astrid DUCOURNAU, Mme Elodie SIFRE, Mme Alice BUISSONIERE et en particulier Mme Lucie BENEJAT pour leur aide technique, disponibilité et amabilité.

Mme Ann CARTON DE WIART, tous les mots ne suffisent pas pour vous exprimer mes sincères remerciements et ma gratitude pour votre douce gentillesse, votre soutien moral et vos encouragements durant mon stage.

Merci à tous mes enseignants de la faculté des sciences de la nature et de la vie de l'université frères Mentouri Constantine 1 et plus particulièrement les enseignants du département de biologie animale .Merci infiniment à Dr REZGOUNE ML et Dr GHARZOULI R pour leur aide.

Merci à tous mes amis surtout Naima ,Ahmed, AbdelHamid ,Samah et Sabrina.

Un Merci Spécial à mon amie Halima KHACHA pour sa précieuse aide et son soutien moral.

Merci à toute ma famille.

«Enfin, Merci à tous les patients qui ont participé à cette étude et à tous ceux qui, de loin ou de près ont contribué à la réalisation de cette thèse »

Dédicace

*Je dédie ce modeste travail à la mémoire de mes très
chères parents, que Dieu, le tout puissant et
miséricordieux les accueille dans son vaste paradis.*

"A Dieu nous appartenons et à lui retournerons".

Table des matières

Remerciements et dédicace	
Table des matières	
Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction.....	1
Revue Bibliographique	
1. Historique.....	4
2. Présentation du germe.....	6
2.1. Classification et Taxonomie	6
2.2. Caractères bactériologiques	8
2.2.1. Morphologie.....	8
2.2.2. Culture et croissance	9
2.2.3. Biochimie.....	10
2.2.4. Caractéristiques et diversité génétique	11
3. Epidémiologie de l'infection à <i>H. pylori</i>	12
3.1. Réservoir	12
3.2. Prévalence de l'infection.....	13
3.3. Transmission.....	14
3.3.1. La voie oro-orale.....	14
3.3.2. La voie féco-orale	15
4. Facteurs de virulence de <i>H. pylori</i>	15
4.1. Facteurs de colonisation et de persistance	15
4.1.1. L'uréase	15
4.1.2. Les flagelles et la mobilité.....	16
4.1.3. Les Adhésines	16
4.2. Facteurs liés à l'inflammation et aux lésions tissulaires.....	17
4.2.1. L'îlot de pathogénicité <i>cag</i> (<i>cag PAI</i>)	17
4.2.2. La cytotoxine vacuolisante A (VacA).....	20

4.2.3. Le lipopolysaccharide (LPS).....	23
4.2.4. Le Peptidoglycane (PG).....	23
4.2.5. Autres protéines pro-inflammatoires.....	23
5. Pathologies associées à l'infection à <i>H. pylori</i>	24
5.1. Pathologies digestives... ..	25
5.1.1. Gastrite aiguë et chronique... ..	25
5.1.2. Ulcère gastrique et duodéal... ..	26
5.1.3. Adénocarcinome gastrique... ..	27
5.1.4. Lymphome gastrique de MALT... ..	28
5.2. Pathologies extra-digestives	29
6. Facteurs influençant l'évolution vers la pathologie	29
6.1. Facteurs bactériens.....	29
6.2. Facteurs de l'hôte	30
6.2.1. Réponse inflammatoire et immunitaire chez l'hôte	30
6.2.2. Perturbation de la sécrétion acide	30
6.2.3. Polymorphismes génétiques de l'hôte	31
6.3. Facteurs environnementaux	31
7. Méthodes de diagnostic biologique de <i>H. pylori</i>	32
7.1. Méthodes invasives.....	32
7.1.1. L'examen anatomopathologique	33
7.1.2. Le test rapide à l'uréase	34
7.1.3. La culture bactérienne.....	34
7.1.4. L'amplification génique.....	35
7.2. Méthodes non invasives.....	35
7.2.1. La sérologie.....	35
7.2.2. Le test respiratoire à l'urée marquée	36
7.2.3. La détection des antigènes bactériens dans les selles	37
8. Indications de recherche et d'éradication	37
9. Traitement de l'infection à <i>H. pylori</i>	40
9.1. Les antibiotiques	40
9.1.1. Métronidazole	40
9.1.2. Clarithromycine	41
9.1.3. Amoxicilline	42
9.1.4. Tétracycline.....	42

9.1.5. Lévoﬂoxacine	42
9.1.6. Rifampicine.....	43
9.2. Les schémas thérapeutiques	43
9.2.1. Bithérapie.....	43
9.2.2. Trithérapie.....	44
9.2.3. Quadrithérapies	44
9.3. Les stratégies thérapeutiques recommandées	45
9.3.1. Traitement de première ligne	45
9.3.2. Traitement de deuxième ligne.....	46
9.3.3. Traitement de troisième ligne	46
10. Facteurs associés aux échecs d'éradication	46
11. Nouvelles stratégies thérapeutiques	47
11.1. L'utilisation des suppléments au traitement	47
11.2. La vaccination	48

Matériels et Méthodes

1. Type d'étude	49
2. Population étudiée	49
2.1. Critères d'inclusion	49
2.2. Critères d'exclusion	49
3. Recueil des données.....	49
4. Etude bactériologique.....	49
4.1. Isolement et identiﬁcation de <i>Helicobacter pylori</i>	49
4.1.1. Prélèvements.....	49
4.1.2. Transport et conservation des biopsies.....	50
4.1.3. Examen bactériologique standard.....	50
4.1.3.1. Broyage des biopsies.....	50
4.1.4. Identiﬁcation des isolats	52
4.1.4.1. Vérification de la pureté des souches.....	52
4.1.4.2. Caractéristiques biochimiques.....	52
4.2. Antibiogramme.....	53
4.3. Conservation des isolats.....	53
5. Etude moléculaire.....	54

5.1. Extraction d'ADN.....	54
5.2. Détection de l'infection à <i>H. pylori</i> et les mutations associées à la résistance à la clarithromycine par PCR en temps réel.....	54
5.3. Contrôle de l'extraction d'ADN par la détection de la hGAPDH.....	56
5.4. Détermination des mutations associées à la résistance à la tétracycline.....	57
5.5. Détermination des mutations associées à la résistance aux quinolones.....	60
5.6. Détection des facteurs de pathogénicité.....	62
5.6.1. PCR <i>cagA</i> site vide.....	62
5.6.2. Motifs de phosphorylation.....	63
5.6.3. PCR <i>vacA</i> régions <i>s</i> et <i>m</i>	65
5.6.4. <i>vacA</i> régions <i>s1a</i> , <i>s1b</i> et <i>s1c</i>	66
5.6.5. <i>vacA</i> régions <i>i1</i> , <i>i2</i>	68
Résultats	
1. Caractéristiques générales des patients.....	70
2. La mise en évidence de la présence de <i>Helicobacter pylori</i>	70
2.1. Le frottis coloré et l'uréase test.....	70
2.2. La culture.....	71
2.3. Coloration de Gram.....	72
2.4. Tests biochimiques.....	72
3. Résultats de l'antibiogramme.....	73
4. Détermination de la prévalence de l'infection à <i>H. pylori</i>	74
5. Détermination de la résistance primaire aux antibiotiques par PCR.....	75
5.1. Mutations conférant la résistance à la clarithromycine.....	75
5.2. Mutations conférant la résistance à la tétracycline.....	76
5.3. Mutations conférant la résistance aux fluoroquinolones (Lévofloxacine).....	76
6. Détermination des facteurs de pathogénicité.....	78
6.1. <i>cagPAI</i> et motifs de phosphorylation.....	78
6.2. <i>vacA</i> régions <i>s</i> , <i>m</i> et <i>i</i> et sous types <i>sI</i>	80
6.3. La combinaison des facteurs de pathogénicité.....	84
Discussion	85
Conclusion et Perspectives.....	93
Bibliographie.....	95
Annexes	
Résumés	

Liste des abréviations

AINS : Anti-Inflamatoires Non Stéroïdiens

Alp : Adherence associated lipoproteins

API: Activator Protéine 1

Asn: Asparagine

BabA: Blood group Antigen Binding Adhesion

BHIB : Brain Heart Infusion Broth

CagA: Cytotoxin associated gene A

cagPAI : cag Pathogenicity Island

CHU : Centre Hospitalo-Universitaire

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

CNRCH : Centre National (Français) de Référence des Campylobacter et Helicobacter

dNTP: Mélange des quatre désoxyribonucléotides (Adénine, Cytosine, Guanine et Thymine)

DupA: Duodenal Ulcer Promoting gene

ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

EUCAST: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

FRET: Fluorescence Resonance Energy Transfer

hGAPDH: Humain GlycérAldéhyde-Phospho-DésHydrogénase

HP-NAP : *H. pylori* Neutrophil Activating Protein

iceA : Induced Contact Epithelium

IgG : Immunoglobuline

IL : Interleukine

IPP : Inhibiteurs de la Pompe à Proton

LPS : Lipopolysaccharide

MALT : Mucosa-Associated Lymphoid Tissue

NF- κ B : Nuclear Factor κ B

Nod : Nucleotide Oligomerization Domain

OipA : Outer Inflammatory Protein

OMS: Organisation Mondiale de la Santé

PCR : Polymerase Chain Reaction

PG : Peptidoglycane

pH: Potentiel Hydrogène

PTI : Purpura Thrombocytopénique Idiopathique

QRDR : Quinolone Resistant Determination Region

SabA : Sialic Acid Binding Adhesion

SSTIV : Système de Sécrétion de Type IV

Th1 : T helper

TLR : Toll-Like receptor

TNF: Tumor Necrosis Factor

VacA : Vacuolating Cytotoxin A

Liste des figures

Figure 1 : Prix Nobel de Barry Marshall et Robin Warren.....	5
Figure 2 : Arbre phylogénique représentant les différents taxons du genre <i>Helicobacter</i>	7
Figure 3 : <i>Helicobacter pylori</i> sous microscopie électronique.....	8
Figure 4 : Passage d'une forme spiralée à une forme coccoïde en cas de culture prolongée...	8
Figure 5 : Aspect des colonies de <i>H. pylori</i> en subculture	10
Figure 6 : Différentes parties de l'estomac humain.....	12
Figure 7 : Prévalence de l'infection à <i>Helicobacter pylori</i> dans le monde en 2017.....	13
Figure 8 : Organisation de l'opéron uréase de <i>Helicobacter pylori</i>	16
Figure 9 : Assemblage du système de sécrétion de type IV et conséquences au niveau de la signalisation cellulaire induite par la translocation de CagA dans la cellule hôte.....	18
Figure 10 : Polymorphisme de la région C-terminale de la protéine CagA et structure des motifs répétés EPIYA.....	19
Figure 11 : Représentation schématique des allèles <i>vacA</i>	21
Figure 12 : Différentes actions cellulaires de VacA au cours de l'infection chronique par <i>H. pylori</i>	22
Figure 13 : Pathologies induites par l'infection à <i>H. pylori</i>	25
Figure 14 : Aspects endoscopiques des gastrites.....	26
Figure 15 : Ulcères visualisés lors d'une endoscopie.....	26
Figure 16 : Adénocarcinome gastrique visualisé par endoscopie.....	27
Figure 17 : Lymphome gastrique du MALT	28
Figure 18 : les facteurs bactériens, de l'hôte et environnementaux impliqués dans la pathogenèse liée à l'infection à <i>H. pylori</i>	32
Figure 19 : Classification de Sydney	33
Figure 20 : Principe du test respiratoire à l'urée marquée au ¹³ C... ..	36
Figure 21 : Système d'incubation des bactéries en atmosphère microaérobie	52
Figure 22 : Mutations de domaine V de gène de l'ARN r 23 S de <i>H. pylori</i> conférant la résistance à la clarithromycine	54
Figure 23 : Principe de la PCR en temps réel FRET de détection de <i>H. pylori</i>	55
Figure 24 : Hybridation des sondes et détection de la résistance à la clarithromycine.....	55
Figure 25 : Détection de <i>Helicobacter pylori</i> dans les biopsies gastriques	71
Figure 26 : Aspect des colonies de <i>H. pylori</i> sur gélose Columbia au sang frais	71
Figure 27 : Coloration de Gram à partir des isolats	72

Figure 28 : Résultats des tests biochimiques	72
Figure 29 : Résultats de l'antibiogramme (E-test et disques)	73
Figure 30 : Répartition de la prévalence de l'infection à <i>H. pylori</i> selon le sexe	74
Figure 31 : Répartition de l'infection à <i>H. pylori</i> selon les tranches d'âge.....	75
Figure 32 : Résultat d'analyse des séquences pour la détection des mutations au niveau de la région QRDR.....	77
Figure 33 : Gel de migration des produits de PCR <i>cagA</i> site vide	78
Figure 34 : Répartition du statut <i>cagPAI</i>	78
Figure 35 : Répartition des motifs de phosphorylation.....	79
Figure 36 : Gel de migration des produits de PCR <i>cag A</i> phosphorylation	79
Figure 37 : Gel de migration des produits de PCR <i>vacA</i>	80
Figure 38 : Gel de migration des produits de PCR <i>vacA (s1a,s1b,s1c)</i>	81
Figure 39 : Répartition des allèles du gène <i>vacA s/m/i</i>	82
Figure 40 : Répartition des sous allèles du gène <i>vacA (s1a,s1b)</i>	82
Figure 41 : Répartition des génotypes des allèles <i>vacA s</i> et <i>m</i>	83
Figure 42 : Distribution des génotypes <i>vacA s/m/i</i>	83

Liste des Tableaux

Tableau 1 : La classification de l'espèce <i>H. pylori</i>	6
Tableau 2 : Avantages et inconvénients des méthodes diagnostiques de l'infection à <i>H. pylori</i>	38
Tableau 3 : Les recommandations de recherche et d'éradication de <i>H. pylori</i>	39
Tableau 4 : Séquences des amorces et sondes pour la détection de <i>H. pylori</i> et les mutations associées à la résistance à la clarithromycine par PCR en temps réel.....	56
Tableau 5 : Protocole de PCR en temps réel pour la détection de <i>H. pylori</i> et les mutations associées à la résistance à la clarithromycine.....	56
Tableau 6 : Protocole de PCR en temps réel de détection de la hGAPDH.....	57
Tableau 7 :Séquences des amorces du gène de l'ARNr 16S de <i>H. pylori</i>	57
Tableau 8 : Protocole de PCR FRET du gène de l'ARNr 16S de <i>H. pylori</i>	58
Tableau 9 : Protocole de PCR classique du gène de l'ARNr 16S	58
Tableau10 : Protocole de séquençage du gène ARNr 16S	59
Tableau 11 :Séquences des amorces de la région QRDR du gène <i>gyrA</i>	60
Tableau 12 : Amplification de la région QRDR du gène <i>gyrA</i>	60
Tableau 13 :Protocole de séquençage de la région QRDR du gène <i>gyrA</i>	61
Tableau 14 : Séquences des amorces du gène <i>cagA</i> site vide	62
Tableau 15 : Protocole de PCR <i>cagA</i> site vide	62
Tableau 16 :Séquences des amorces du motif de phosphorylation P1	63
Tableau 17 :Protocole de la PCR du motif de phosphorylation P1.....	63
Tableau 18 : Séquences des amorces du motif de phosphorylation P2	64
Tableau 19 :Protocole de la PCR du motif de phosphorylation P2.....	64
Tableau 20 : Séquences des amorces du motif de phosphorylation P3	64
Tableau 21 : Protocole de la PCR du motif de phosphorylation P3.....	65
Tableau 22 : Séquences des amorces du <i>vacA</i> régions <i>s et m</i>	65
Tableau 23 : Protocole de la PCR <i>vacA</i> régions <i>s et m</i>	66
Tableau 24 : Séquences des amorces de <i>vacA</i> région <i>slA</i>	66
Tableau 25 : Protocole de la PCR du <i>vacA</i> région <i>slA</i>	67
Tableau 26 : Séquences des amorces du <i>vacA</i> région <i>slB</i>	67

Tableau 27 : Protocole de la PCR <i>vacA</i> région <i>s1b</i>	67
Tableau 28 : Séquences des amorces du <i>vacA</i> région <i>s1c</i>	68
Tableau 29 : Protocole de la PCR <i>vacA</i> région <i>s1c</i>	68
Tableau 30 : Séquences des amorces du <i>vacA i1</i>	68
Tableau 31 : Protocole de la PCR <i>vacA i1</i>	69
Tableau 32 : Séquences des amorces du <i>vacA i2</i>	69
Tableau 33 : Protocole de la PCR <i>vacA i2</i>	69
Tableau 34 : Résultats de l’aspect endoscopique des patients	70
Tableau 35 : Pourcentage des biopsies positives à <i>H. pylori</i> par PCR en temps réel	74
Tableau 36 : Mutations conférant la résistance à la clarithromycine chez <i>H. pylori</i>	76
Tableau 37 : Mutations conférant la résistance à la tétracycline chez <i>H. pylori</i>	76
Tableau 38 : Pourcentage des mutations conférant la résistance aux fluoroquinolones.....	77
Tableau 39 : les mutations détectées au niveau de la région QRDR du gène <i>gyrA</i> de <i>H.pylori</i>	77
Tableau 40 : Combinaison des facteurs de pathogénicité <i>cag PAI</i> , <i>vacA s/m</i> et le profil endoscopique.....	84

Introduction

La découverte en 1982 de l'implication de *Helicobacter pylori* dans l'étiologie des pathologies gastriques par Marshall et Warren a révolutionné le monde de la gastro-entérologie (Marshall et Warren, 1984).

H. pylori est une bactérie microaérophile spiralée à Gram négatif. Elle infecte spécifiquement la muqueuse gastrique. Il s'agit d'un facteur de risque important incriminé dans les gastrites chroniques, l'ulcère peptique, le cancer gastrique et le lymphome du MALT (Mucosa-Associated Lymphoid Tissue) (Suerbaum et Michetti, 2002). L'infection est généralement acquise dans l'enfance et perdure pendant des dizaines d'années. Près de la moitié de la population mondiale en est infectée néanmoins, la prévalence de l'infection varie en fonction des populations, même au sein d'un même pays (Miendje Deyi, 2011). Elle est très élevée dans les pays en voie de développement où elle peut atteindre 90% alors qu'elle peut ne dépasser pas 20% dans les pays industrialisés (Mentis *et al.*, 2015). Si sa prévalence semble diminuer dans les pays développés, il s'agit toujours d'un problème majeur de santé publique dans les pays en voie de développement.

Le diagnostic de l'infection peut se faire par différentes méthodes, les méthodes invasives nécessitent la réalisation d'une endoscopie digestive haute. La culture est la méthode de diagnostic la plus spécifique, elle constitue le test de référence le plus fiable pour affirmer la présence de *H. pylori* et de tester la sensibilité aux antibiotiques, mais elle nécessite des conditions particulières (De Korwin, 2003). En revanche, la technique moléculaire utilisant la PCR n'est pas impactée par les contraintes de la culture. Elle a une excellente sensibilité et spécificité, ce qui la rend technique d'identification précise et fiable pour le diagnostic de l'infection à *H. pylori*.

La trithérapie standard contenant de la clarithromycine, proposée lors de la première conférence de Maastricht en 1997 pour traiter l'infection à *H. pylori*, est devenue universelle comme l'ont recommandé toutes les conférences de consensus organisées dans le monde. La perte d'efficacité observée dans de nombreux pays depuis le début

du XXI^e siècle est due à l'augmentation de la résistance à la clarithromycine chez *H. pylori* (Mégraud *et al.*, 2013).

En Algérie, malgré la forte prévalence de l'infection à *H. pylori* (80%), rapportait par une étude sérologique dans les années 80 (Mégraud *et al.*, 1989), très peu d'études ont été réalisées sur cette infection. Ce microorganisme pathogène demeure encore mal connu dans notre pays. Ainsi, le diagnostic de *H. pylori* se fait essentiellement par anatomopathologie. Peu de laboratoires pratiquent des techniques alternatives au diagnostic comme la culture, la PCR en temps réel n'est pas utilisée en pratique courante. Le manque de données actualisées de la résistance des bactéries vis-à-vis des antibiotiques entraîne la prescription de traitements de façon aléatoire par les cliniciens.

La connaissance du taux local de résistance aux antibiotiques est cruciale pour l'adaptation du choix d'un traitement empirique de première ligne efficace pour l'éradication de l'infection par *H. pylori* (Lahbabi *et al.*, 2013).

Il est maintenant évident que la présence des gènes de pathogénicité et de leurs différentes combinaisons génotypiques de *H. pylori* chez le patient influence le développement de la maladie gastrique. Certaines caractéristiques génotypiques des souches de *H. pylori* ont été associées à la progression de l'infection vers une maladie plus sévère, tels que les allèles *s1* et *m1* du gène *vacA* et la présence du gène *cagA*. Les gènes *cagA* et *vacA* sont considérés comme des marqueurs de virulence car ils sont responsable de la production de cytotoxines et à l'induction d'une réponse inflammatoire intense (Mustapha, 2011).



Les objectifs

L'objectif principal de notre étude est d'apporter des données concernant l'épidémiologie locale de l'infection à *H. pylori* pour la première fois à Constantine et de contribuer à l'amélioration de la prise en charge des infections à *H. pylori*, les objectifs spécifiques étant :

- La détection phénotypique et moléculaire de l'infection à *H. pylori* à partir des biopsies gastriques ;
- La détermination de la prévalence de l'infection à *H. pylori* à Constantine ;
- L'apport des données importantes sur l'état de la résistance primaire aux antibiotiques ;
- Le génotypage des facteurs de pathogénicité *cagPAI*, motifs de phosphorylation de CagA, *vacA s/m/i* incriminés dans l'infection à *H. pylori*.



*Revue
Bibliographique*

1. Historique

Depuis le début du XX siècle, de nombreuses observations suspectant la présence de *H. pylori* dans l'estomac humain, mais elles n'ont pas été validées par la communauté scientifique. C'est au cours de l'année 1982, que deux chercheurs australiens, J.R. Warren et B.J. Marshall, confirmèrent l'existence d'une bactérie dans le milieu stomacal (Marshall et Warren, 1984).

En réalité, l'histoire remonte à un siècle plus tôt. En 1893 un chercheur italien du nom de Giulio Bizzozero décrivit des bactéries spiralées dans l'environnement acide de l'estomac des chiens. Son observation eut peu d'impact et fut considérée comme une simple curiosité microbiologique (Bizzozero, 1893).

Six ans plus tard en 1899 le professeur Walery Jaworski de l'université Jagellonne de Cracovie (Pologne) fit état de la même observation de bactéries spiralées, cette fois-ci dans l'estomac humain et leur donna le nom de *Vibrio rugula*. Son travail était inclus dans un manuel de maladies gastriques mais malheureusement celui-ci a eu peu d'influences car il était rédigé en polonais (Jaworski, 1899).

Plusieurs petites études entreprises en début du 20ème siècle ont démontré la présence des bactéries incurvées dans l'estomac de beaucoup de patients présentant les ulcères gastriques et de cancer de l'estomac.

En 1906 Walter Krienitz, un médecin allemand trouve des bactéries spiralées dans l'estomac d'un patient atteint d'ulcère gastroduodénal (Krienitz, 1906).

Les scientifiques de l'époque étant convaincus de la stérilité de l'estomac vu la très forte acidité qui y règne, n'accordent pas d'importance à cette observation pensant qu'il ne peut s'agir que de contaminants.

En 1954, Palmer recherche des bactéries spiralées sur 1180 biopsies mais la négativité des résultats entraîne un arrêt de cette voie de recherche pendant 20 ans (Bigard et Colin, 1996).

Steer et Colin Jones (1975) découvrent chez l'homme une association entre l'ulcère gastrique et la présence à la surface de la muqueuse gastrique d'un micro-organisme visible au microscope optique et de coloration Gram négatif (Steer, 1975).

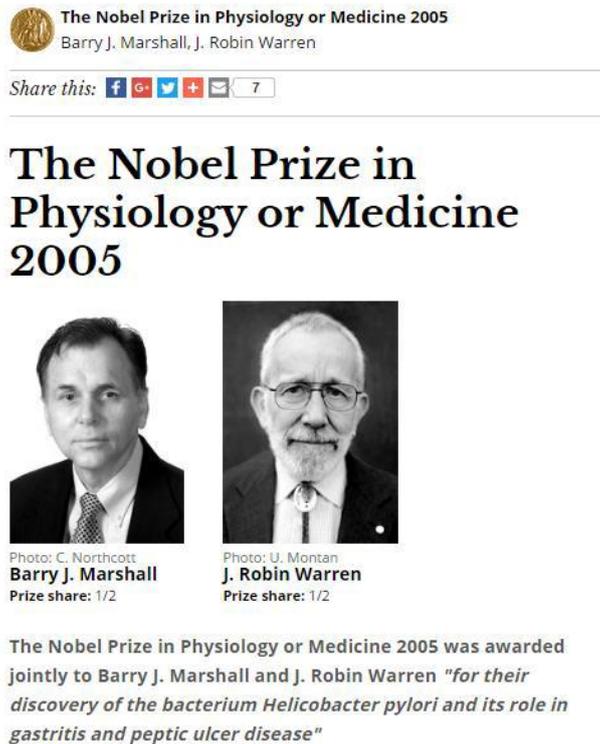
Après avoir échoués plusieurs fois à cultiver la bactérie les deux chercheurs ont finalement réussi à visualiser les colonies en 1982 quand ils ont involontairement laissé leurs boîtes de Pétri en incubation pendant cinq jours au cours du week-end de Pâques. Ils la baptisèrent initialement *Campylobacter-like organisme* (CLO) en pensant que c'était une nouvelle espèce du genre *Campylobacter* (Marshall et Warren, 1984).

La bactérie fut ensuite nommée *Campylobacter pyloridis* sur base de la suggestion de Skirrow. Pour des raisons de grammaire latine, elle prit le nom de *Campylobacter pylori* (Marshall *et al.*, 1985 ; Marshall *et al.*, 1988). Puis finalement la bactérie devint *Helicobacter pylori* en 1989 après un séquençage de son ADN et d'autres études sur sa morphologie.

De ces études, ils ont découvert qu'il n'appartient pas au genre *Campylobacter*, mais plutôt à son propre genre celui des *Helicobacters*.

La découverte de *H. pylori* a révolutionné l'approche de l'ulcère, et l'axiome classique « pas d'acide, pas d'ulcère » s'est complété par « pas de *Helicobacter pylori* pas d'ulcère ».

H. pylori est classé carcinogène de type I par l'Organisation Mondiale de la Santé en 1994. En 2005 Barry Marshall et Robin Warren reçoivent le prix Nobel de physiologie et de médecine pour leurs travaux sur *H. pylori* et l'ulcère gastroduodénal (Fig. 1).



The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2005
Barry J. Marshall, J. Robin Warren

Share this:      7

The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2005



Photo: C. Northcott
Barry J. Marshall
Prize share: 1/2



Photo: U. Montan
J. Robin Warren
Prize share: 1/2

The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2005 was awarded jointly to Barry J. Marshall and J. Robin Warren "for their discovery of the bacterium *Helicobacter pylori* and its role in gastritis and peptic ulcer disease"

Figure 1 : Prix Nobel de Barry Marshall et Robin Warren
http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2005/index.html

2. Présentation du germe

2.1. Classification et Taxonomie

H. pylori est une bactérie de forme hélicoïdale découverte dans une zone de l'estomac proche du pylore, d'où son nom. Elle est considérée comme le chef de file d'un nouveau groupe de bactéries, appelées super Famille VI des bacilles Gram négatif, qui comprend quatre genres : *Helicobacter*, *Campylobacter*, *Arcobacter* et *Wolinella*. *H. pylori* est différencié des autres groupes essentiellement par la structure de son ARN ribosomal (16S) mais aussi par la multitude de flagelles gainés (4 à 6), et par la possession d'acide gras et de ménaquinones particulières qui ont une valeur taxonomique précieuse (Mégraud, 1993).

Tableau 01 : La classification de l'espèce *H. pylori* (Garrity *et al.*, 2005).

Règne	Eubactéries
Embranchement	Proteobacteria
Classe	Epsilonproteobacteria
Ordre	Campylobacterales
Famille	Helicobacteraceae
Genre	<i>Helicobacter</i>
Espèce	<i>Helicobacter pylori</i>

Depuis la découverte de *H. pylori* en 1982, de nombreuses autres espèces du genre *Helicobacter* ont été identifiées. Elles colonisent la muqueuse digestive de l'homme ou d'animaux (Mégraud, 2003).

Le genre *Helicobacter* regroupe actuellement 30 espèces validées (Ménard *et al.*, 2016). En fonction des niches spécifiques auxquelles ils sont associés, les Hélicobacters sont divisés en deux groupes : les Hélicobacters gastriques comprenant *H. pylori* et *H. felis* notamment et les Hélicobacters entérohépatiques colonisant le tractus gastro-intestinal et les voies biliaires (Fig. 2).

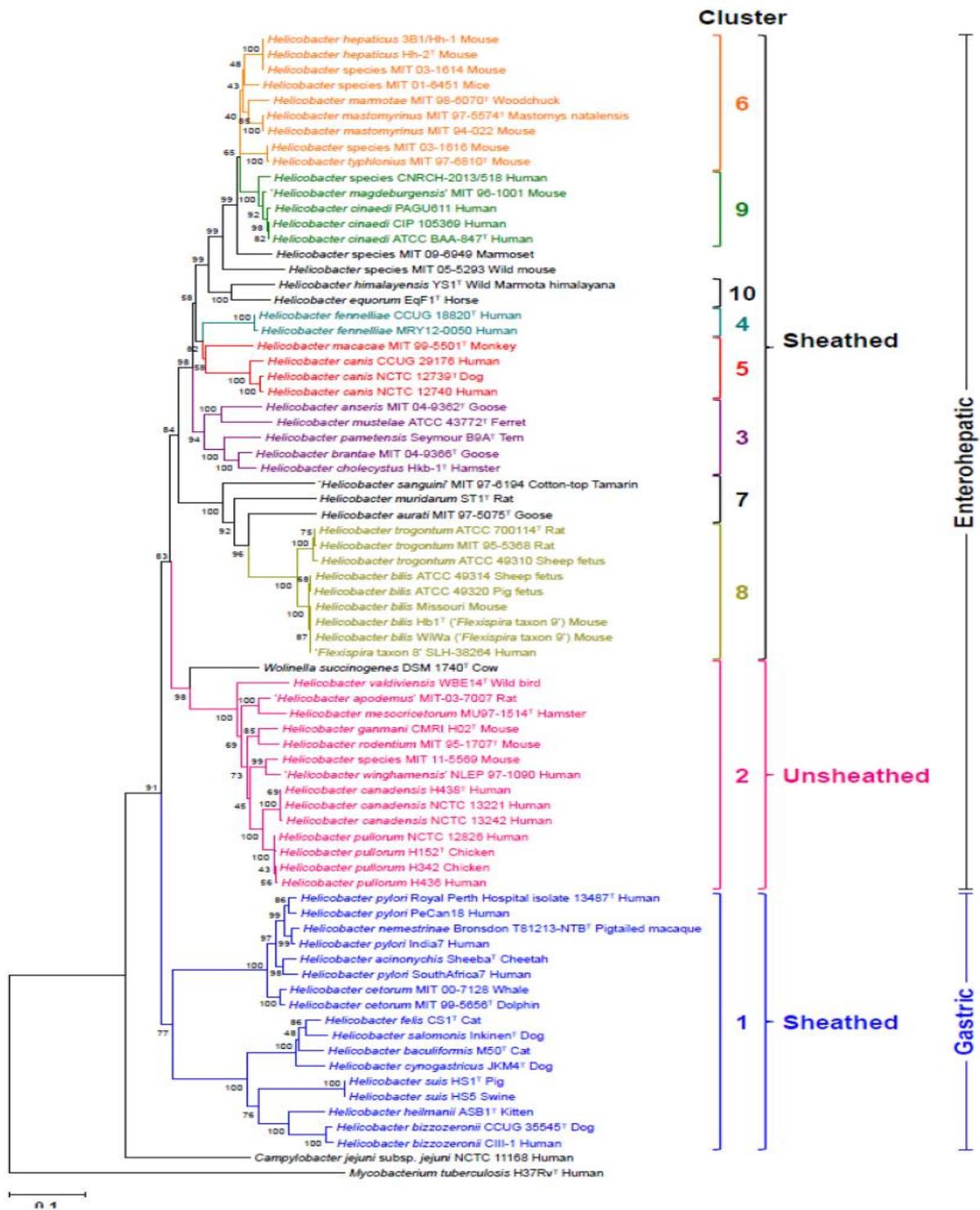


Figure 2 : Arbre phylogénique représentant les différents taxons du genre *Helicobacter*.

Figure reproduite d'après Ménard *et al.*, 2016. L'arbre phylogénique présenté est basé sur l'alignement d'environ 700 résidus de la protéine GyrA. Il a été réalisé avec la méthode du neighbor-joining. La séquence du gène *gyrA* de *Mycobacterium tuberculosis* a été utilisée comme séquence de groupe externe. Cet arbre permet une séparation des *Helicobacter* gastriques et entéro-hépatiques, et différencie parmi ces derniers les espèces dont les flagelles sont gainés (sheathed) de celles qui ont des flagelles non-gainés (unsheathed).

2.2. Caractères bactériologiques

2.2.1. Morphologie

Helicobacter pylori est un bacille à Gram négatif spiralé non sporulé. Il mesure 0,5 à 1 µm de largeur sur 2,5 à 5 µm de longueur (Goodwin *et al.*, 1989).

Il possède à l'une de ses extrémités 4 à 6 flagelles unipolaires, qui présentent la particularité d'être engainées et de comporter un bulbe terminal analogue à celui présent sur les flagelles des bactéries du genre *Vibrio*. La présence de ces flagelles associée à la forme spiralée de la bactérie confère à *H. pylori* une grande mobilité (Mégraud, 1998) (Fig. 3).

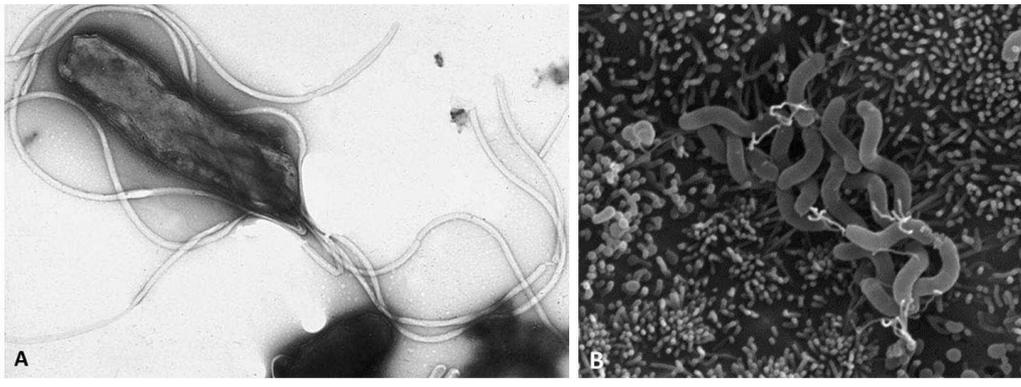


Figure 3 : *Helicobacter pylori* sous microscopie électronique.

A. *H. pylori* ; B. Amas de *H. pylori* au niveau des cellules épithéliales gastriques (Tan *et al.*, 2009).

Les bactéries du genre *Helicobacter* présentent une grande diversité morphologique, l'aspect au Gram peut varier entre une forme bacillaire incurvé en U, en S, C ou en O. De plus lorsque les cultures sont vieilles, apparaissent des formes coccoïdes rondes non cultivables (Fig. 4).

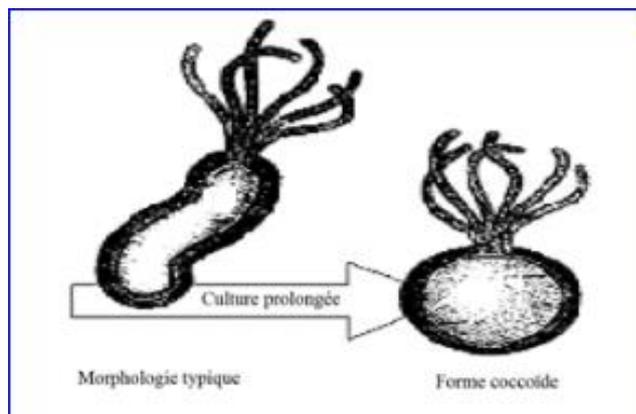


Figure 4 : Passage d'une forme spiralée à une forme coccoïde en cas de culture prolongée (Conroy *et al.*, 1994)

La forme coccoïdale peut également être observée dans un milieu pauvre ou dans des conditions défavorables de culture (Kusters *et al.*, 1997). Ces coccoïdes sont incapables de se diviser en culture mais elles maintiennent un certain métabolisme et conservent des structures fonctionnelles compatibles avec la viabilité.

2.2.2. Culture et croissance

La mise en culture est la méthode de référence qui permet la détection de *Helicobacter pylori* dans les biopsies gastriques. *H. pylori* est une bactérie fragile très exigeante, sa culture est longue, difficile et délicate.

La culture de cette bactérie nécessite un milieu nutritionnel spécifique. Pour cela différents milieux constitué d'une base gélosée sont utilisés (Columbia, Brucella, cœur-cervelle et Wilkins Chalgren ou Mueller-Hinton). Ces milieux sont additionnés de 10% de sang frais de cheval, mouton ou humain. Certains auteurs ont proposé de remplacer le sang par du sérum (de veau, de cheval ou humain). D'autres suppléments de croissance ont été proposés (vitamines, β -cyclodextrine....) (Glupczynski, 1997 ; Mégraud, 1996).

H. pylori est naturellement résistant à de nombreux antibiotiques : glycopeptides, sulfamides, triméthoprime, polymyxines, acide nalidixique, streptogramines, cefsulodine et antifongiques : nystatine, amphotéricine B et cycloheximide. Ceux-ci peuvent d'ailleurs être utilisés, afin de créer des milieux sélectifs, visant à éliminer les contaminants (Mégraud et Lahours, 2007).

H. pylori est une bactérie microaérophile, elle est sensible à l'oxygène au taux de l'air et requiert pour vivre une atmosphère appauvrie en oxygène. Elle requiert une faible proportion d'oxygène de 3 à 6% (optimum de l'ordre de 5%) et une proportion en CO₂ de 6 à 10% (Goodwin *et al.*, 1989). Cependant en subculture beaucoup de souches peuvent croître en atmosphère simplement enrichie en CO₂ à 10%. *H. pylori* ne peut croître en anaérobiose car il est incapable d'utiliser un autre accepteur final d'électrons que l'O₂ (Tompkins *et al.*, 1994).

La température optimale de culture est de 37 °C. Toutes les souches peuvent se développer à des températures variant entre 33 et 40 °C, certaines poussent mal à 30 °C et 42 °C, mais aucune souche ne pousse à 25 °C.

La croissance de *H. pylori* se situe dans un intervalle de pH de 5,5 à 8,5 avec une croissance optimale entre 6,9 et 8,0 (Goodwin *et al.*, 1989).

Dans les conditions optimales, après incubation de la culture, les colonies apparaissent en 3 à 5 jours pour une primoculture et en 2 à 3 jours pour une subculture (la croissance est plus

rapide). Les colonies sont petites, régulières, rondes de 1 à 2 mm de diamètre, bombées, transparentes et luisantes (Marshall et Warren, 1984) (Fig. 5).

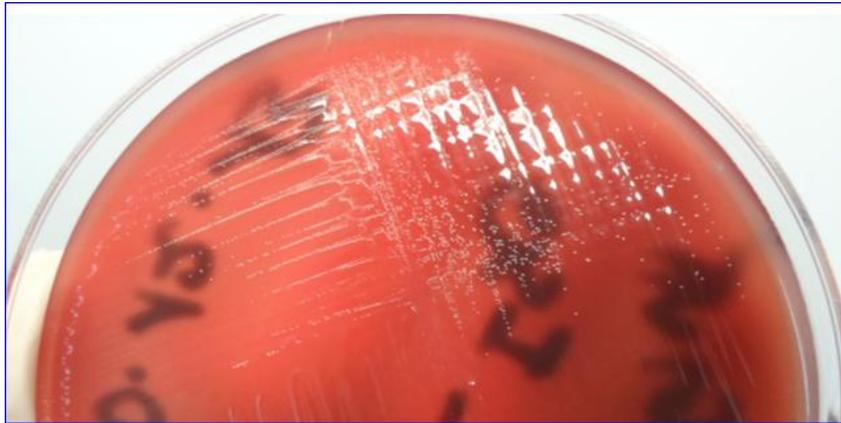


Figure 5: Aspect des colonies de *H. pylori* en subculture (photo de l'étude)

2.2.3. Biochimie

H. pylori utilise les acides aminés et les acides organiques comme source d'énergie mais pas les sucres, ni par fermentation, ni par oxydation, ce qui signifie que *H. pylori* est une bactérie asaccharolytique (Owen, 1998). Cependant certains travaux laissent supposer que *H. pylori* pourrait utiliser faiblement le glucose par la voie des pentoses (Entner-Doudoroff) (Kelly, 1998).

Le capital enzymatique de *H. pylori* est important puisqu'il possède une catalase, une cytochrome oxydase et une superoxyde dismutase qui lui permettent de résister au stress oxydatif généré par la réponse immunitaire (Marshall et Warren, 1984 ; Hazell *et al.*, 1991 ; Spiegelhalder *et al.*, 1993). Il possède de plus des activités : phosphatase alcaline, phosphatase acide, DNase, γ - glutamyl transférase, leucine aminopeptidase, phospholipase et lipase estérase (Owen, 1998 ; Kelly, 1998).

La particularité de *H. pylori* est de fabriquer de grandes quantités d'uréase, qui constitue un élément important de leur survie dans l'estomac, en créant un micro environnement qui permet de lutter contre l'acidité gastrique (Mégraud, 2008). L'activité uréasique a pour conséquence la production d'ammonium et de bicarbonate à partir de l'antre. En utilisant l'urée normalement présente dans l'estomac, la bactérie tamponne son environnement proche et se protège de l'acidité gastrique (Smoot *et al.*, 1990). Les mutants non uréolytiques sont incapables de coloniser la muqueuse gastrique (Eaton *et al.*, 1991 ; Tsuda *et al.*, 1994).

Une autre propriété de l'activité uréasique est peut être de fournir une source d'ammoniac pour le métabolisme de l'azote chez *H. pylori* (Tomb *et al.*, 1997), par exemple, La glutamine synthétase catalyse la conversion de l'ammoniac et du glutamate en glutamine, qui peut être directement incorporée dans la synthèse des protéines.

2.2.4. Caractéristiques et diversité génétique

Le génome de *H. pylori* a été séquencé pour la première fois en 1997 à partir de la souche 26695 chez un patient anglais atteint de gastrite chronique (Tomb *et al.*, 1997).

L'ADN génomique (chromosomique) de *H. pylori* est une molécule circulaire unique de petite taille de 1,4 à 1,73 Mb selon les souches, mais l'analyse génomique de 30 souches a abouti à une valeur moyenne de 1,71 Mb (Taylor *et al.*, 1992).

La teneur en GC dans le génome de *H. pylori* est de l'ordre de 39% (Thiberge *et al.*, 2010 ; McClain *et al.*, 2009). 30% des gènes de *H. pylori* seraient spécifiques à l'espèce. Cependant environ 1200 gènes sont communs à toutes les souches, et 200 à 400 gènes situés principalement dans des zones de plasticité ou dans l'îlot de pathogénicité *cag* (*cag PAI*), sont présents de manière variable entre les différentes souches (Varon et Mégraud, 2013).

Le génome de *H. pylori* contient 2 copies des gènes de l'ARNr 16S et 23S ainsi que plusieurs éléments mobiles (Alm *et al.*, 1999).

La présence de plasmide a été observée chez plusieurs isolats de *H. pylori* (Minnis *et al.*, 1995). En effet, certaines études ont reporté que 58% d'isolats de *H. pylori* contiennent des plasmides dont la taille varie de 1,8 à 40 kbp (Penfold *et al.*, 1988).

La comparaison du génome des souches séquencées a permis de mettre en évidence une grande diversité génétique chez *H. pylori* (Breurec, 2011). Cette diversité peut être présentée sous l'angle d'une microdiversité (polymorphisme intragénétique) et d'une macrodiversité (absence ou présence d'un gène entre les souches) (Lehours, 2003).

Le polymorphisme génétique (microdiversité) trouvé entre le génome des différentes souches séquencées apporte une explication au caractère quasi unique de chaque souche de telle sorte que chaque souche isolée d'un sujet est virtuellement différente de toutes les autres (Labigne, 1994 ; Megraud, 1994).

La macrodiversité concerne principalement la présence ou l'absence de gènes entre les souches (gènes spécifiques de souches).

Ainsi selon les différentes études publiées (Salama *et al.*, 2000 ; Gressmann *et al.*, 2005 ; Romo-Gonzalez *et al.*, 2009) 20 à 25% des gènes étaient « souches-spécifiques » ou « non-ubiquistes ».

La plupart de ces gènes codent pour des protéines de fonctions inconnues, des transposases ou des gènes appartenant au système de restriction-modification.

Ces gènes non-ubiquistes sont localisés principalement dans 2 grandes régions de l'ADN génomique de *H. pylori*, le *cag PAI* et la zone de plasticité (*PZ*), caractérisées par un GC% différent de celui du reste du génome. Le *cag PAI* est principalement transmis sous la forme d'un bloc unique de 27 gènes, tandis que la *PZ* contient de multiples transposases, endonucléases, suggérant des phénomènes de recombinaison, insertion et délétion (Breurec, 2011). Cette diversité génétique permet à *H. pylori* d'adapter son génotype à celui de son hôte (Israel *et al.*, 2001; Giannakis *et al.*, 2008) et est probablement à l'origine de la variabilité de son pouvoir pathogène.

La séquence génomique des différentes souches de *H. pylori* varie en fonction des régions géographiques (Falush *et al.*, 2003 ; Linz *et al.*, 2007).

3. Epidémiologie de l'infection à *H. pylori*

3.1. Réservoir

L'estomac humain est le principal réservoir de *H. pylori*. C'est le microorganisme le plus fréquemment retrouvé dans la muqueuse gastrique humaine en association avec les cellules épithéliales (Cover et Blaser, 2009 ; Miendje Deyi, 2011). Sa localisation est essentiellement antrale mais la bactérie peut être présente dans toutes les parties de l'estomac (Fig. 6)

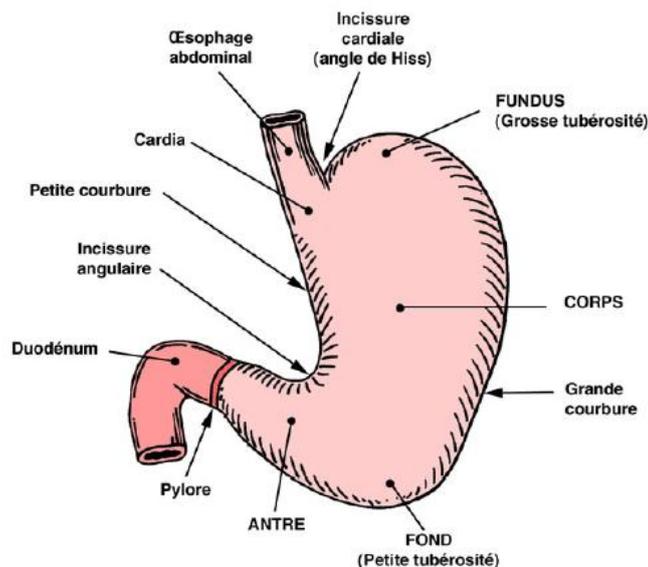


Figure 6: Différentes parties de l'estomac humain
<https://lecorpshumain.fr/categories/anatomie/lestomac>

En dehors de la muqueuse gastrique, *H. pylori* a pu être détecté dans la salive, les selles (Momtaz *et al.*, 2012) et la plaque dentaire (Al Sayed *et al.*, 2014) par des méthodes de Polymerase Chain Reaction (PCR). Ces réservoirs extra-gastriques sont transitoires et seraient impliqués dans la transmission de la bactérie.

3.2. Prévalence de l'infection

L'infection à *H. pylori* est l'infection bactérienne chronique la plus répandue dans le monde. Elle s'acquiert généralement pendant l'enfance mais persiste toute la vie tant qu'il n'y a pas d'éradication (Mégraud, 2003). Le taux d'infection varie en fonction de nombreux critères comme l'âge, l'origine géographique et les conditions de vie.

Elle affecte au moins 50% de la population mondiale. Cependant il existe de grandes disparités géographiques. En effet sa prévalence est très élevée dans les pays en voie de développement où elle peut atteindre 90% tandis, elle est estimée à environ 20% dans les pays occidentaux (Fig. 7). Cette disparité géographique peut s'expliquer par des études épidémiologiques qui mettent en évidence que la prévalence de l'infection à *H. pylori* augmente avec l'âge et diminue quand le statut socio-économique augmente (Lamouliatte *et al.*, 1992).

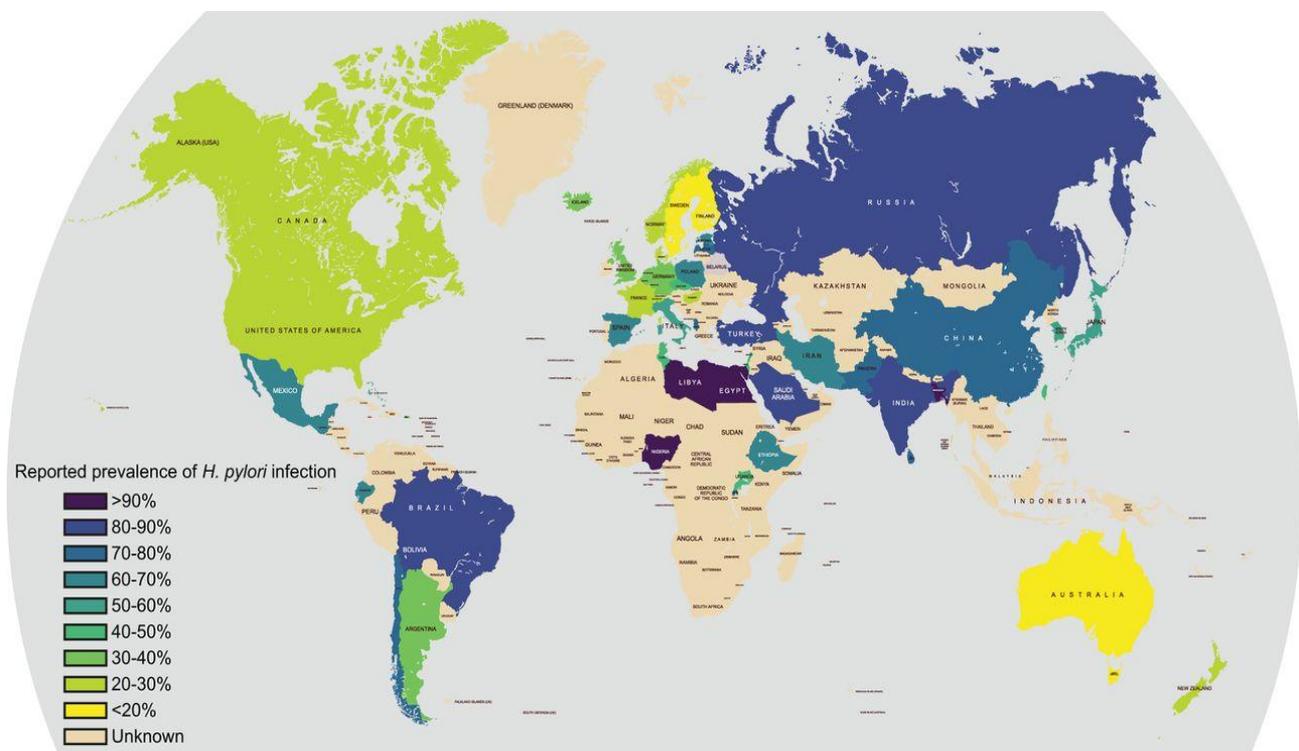


Figure 7 : Prévalence de l'infection à *Helicobacter pylori* dans le monde en 2017 (Michael *et al.*, 2017).

Dans les pays non-industrialisés, cette prévalence augmente rapidement tôt après la naissance et peut atteindre 80 à 90% à l'âge de 20 ans, et persiste à ce niveau pour le reste de la vie adulte en absence d'éradication (Mégraud, 2003). Cependant, dans les pays industrialisés, l'infection est relativement moins fréquente avant l'âge de 25 à 30 ans. La prévalence s'élève ensuite graduellement avec l'âge (Salles et Mégraud, 2007).

Les deux sexes (hommes et femmes) ont le même risque de s'infecter à tout âge (Mégraud, 1993). Cependant, il semble que la prévalence de l'infection à *H. pylori* était légèrement plus élevée chez l'homme que chez la femme (Woodward *et al.*, 2000).

Le statut socio-économique est le facteur le plus important dans l'infection à *H. pylori*. Plus la population est pauvre, plus tôt elle sera infectée dès le jeune âge, et plus élevé sera le taux cumulé de l'infection (Brown, 2000).

Plusieurs études ont rapporté une diminution significative de la prévalence de l'infection à *H. pylori* dans certains pays en développement avec l'augmentation du niveau socioéconomique et l'amélioration des conditions d'hygiène (Ashtari *et al.*, 2015 ; Darko *et al.*, 2015 ; Frugis *et al.*, 2016).

3.3. Transmission

La transmission de l'infection à *H. pylori* de personne à personne a principalement lieu au cours de la petite enfance (Mégraud et Broutet, 2000). Elle est facilitée par l'immaturation de la muqueuse gastrique qui favorise l'implantation de la bactérie et par certains facteurs influençant la contamination notamment l'hygiène, les gastro-entérites, les contacts rapprochés et les logements surpeuplés (Vincent, 1996).

Les sources les plus probables de transmission directe de l'infection sont la voie oro-orale et féco-orale.

3.3.1. La voie oro-orale

C'est la principale voie de transmission dans les pays développés. Elle se font par le biais de la salive ou du liquide gastrique contaminés, lors de vomissement ou de reflux gastro-oesophagien (RGO) (Granstrom *et al.*, 1997).

Certaines pratiques culturelles peuvent également faciliter la transmission oro-orale. Par exemple, dans les pays en voie de développements par les mères qui prémastiquent les aliments des enfants (Mégraud, 2003).

3.3.2. La voie féco-orale

Elle est plus présente dans les payes en voie de développement. En effet, la bactérie peut-être retrouvée dans les selles après un transit accéléré. La transmission de *H. pylori* à un autre hôte à partir des selles pourrait se faire directement par les mains en cas d'hygiène déficiente ou encore à cause de l'eau ou d'aliments contaminés (De Korwin et Lehours, 2010).

4. Facteurs de virulence de *H. pylori*

H. pylori possède une multitude de facteurs de virulence codés par des gènes dont le polymorphisme est à la base d'un déterminisme pathologique plus ou moins sévère. Ces facteurs de pathogénicité peuvent déclencher et moduler la nature de la réponse inflammatoire et altérer l'intégrité de la muqueuse gastrique conférant à cette bactérie un caractère carcinogène et pro-inflammatoire (Mustapha, 2011).

4.1. Facteurs de colonisation et de persistance

4.1.1. L'uréase

H. pylori exprime une métalloenzyme à nickel de localisation cytoplasmique, l'uréase, produite en quantité abondante (6 à 10% des protéines totales). Elle confère à *H. pylori* une capacité de résistance à l'acidité gastrique unique dans le monde bactérien. Il a été observé que les bactéries mutantes déficitaires en uréase sont incapables de survivre dans le milieu gastrique (Eaton *et al.*, 1991).

L'uréase est un déterminant essentiel de la virulence de *H. pylori*, elle intervient à la fois dans les mécanismes de colonisation, de survie et de pathogénicité.

Elle est codée par un opéron bicistronique comprenant les gènes de structures de l'apoenzyme (*ureA* et *ureB*) et cinq gènes *ureI*, *ureE*, *ureF*, *ureG*, *ureH* codent pour les protéines accessoires qui participent à l'activation de l'apoenzyme par incorporation des ions nickel (Contreras et Labigne, 2003) (Fig. 8). L'activité enzymatique de l'uréase dépend indirectement du gène *ureI* codant pour une porine membranaire qui forme un canal dont l'ouverture et la fermeture sont contrôlées par les conditions acides du milieu gastrique (Weeks *et al.*, 2000 ; Toledo *et al.*, 2002).

L'uréase hydrolyse l'urée présente dans l'environnement gastrique en permettant la production d'ammoniac et de dioxyde de carbone. L'ammoniac produit par l'uréase capte un proton pour former l'ammonium, ce qui permet à la bactérie de maintenir son pH intracellulaire proche de la neutralité (Smoot *et al.*, 1990).

L'ammoniac produit sous l'action de l'uréase est cytotoxique et peut aussi altérer l'épithélium gastrique en inhibant le renouvellement et la réparation cellulaire (Kuwahara *et al.*, 2000). Par ailleurs, l'uréase contribue aux altérations tissulaires par recrutement des neutrophiles et des monocytes dans la muqueuse et par l'induction de la production de cytokines pro-inflammatoires (Harris *et al.*, 1998).

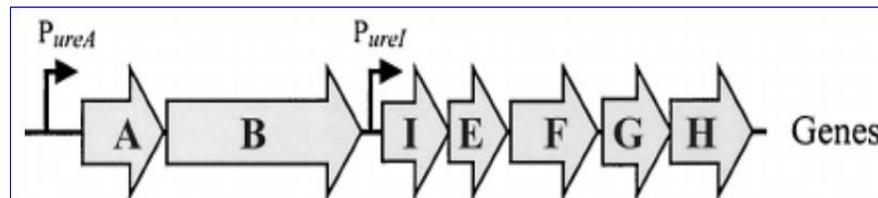


Figure 8 : Organisation de l'opéron uréase de *Helicobacter pylori* (Van Vliet *et al.*, 2001).

4.1.2. Les flagelles et la mobilité

La rotation flagellaire est assurée par la protéine flagellaire motrice MotB codée par le gène *motB* (Ottemann et Lowenthal, 2002). Les filaments flagellaires sont constitués d'un copolymère de flagellines FlaA (sous-unité majeure) et FlaB (sous-unité mineure) (Leying *et al.*, 1992; Suerbaum *et al.*, 1993). FlaA et FlaB sont recouverts d'une gaine de composition similaire à celle de la membrane externe de la bactérie permettant une protection contre l'acidité gastrique (Josenhans *et al.*, 1995). De plus, cette gaine diminuerait le relargage d'épitopes immunogènes expliquant l'absence d'activation de la voie immunitaire innée du Toll Like Receptor 5 (TLR5), ce qui permet à *H. pylori* d'échapper à la réponse immunitaire et de persister dans la muqueuse gastrique (Lee *et al.*, 2003).

La rotation des flagelles et la forme hélicoïdale de la bactérie assure la propulsion de la bactérie à travers le mucus gastrique très visqueux lui conférant ainsi la capacité de se mouvoir facilement dans la muqueuse jusqu'à atteindre les couches muqueuses profondes et les cellules épithéliales. La motilité de *H. pylori* est indispensable pour assurer une meilleure colonisation gastrique et contribuer à la pathogenèse de la bactérie (Josenhans *et al.*, 1995 ; Eaton *et al.*, 1996).

4.1.3. Les Adhésines

La capacité d'adhérence de *H. pylori* à l'épithélium gastrique facilite la colonisation, la persistance de l'infection et la délivrance des facteurs de virulence à l'intérieur des cellules épithéliales.

▪ **BabA (Blood group antigen binding adhesin)**

BabA est parmi les adhésines de *H. pylori* les plus étudiées. Elle est codée par les gènes *babA1*, *babA2* et *babB*, se lie à l'antigène de groupe sanguin *Lewis^b* fucosylé situé à la surface des cellules épithéliales (Zabaleta, 2012). Les souches BabA2+ sont plus souvent associées aux pathologies gastriques sévères comme l'ulcère et l'adénocarcinome gastrique (Gerhard *et al.*, 1999).

▪ **SabA (Sialic acid binding adhesion)**

SabA est une protéine adhésine de 70kDa qui se lie à la structure sialylée de l'antigène *Lewis^x* exprimé à la surface des cellules épithéliales. Elle est associée au risque de développement de cancer gastrique mais pas au risque d'ulcère duodéal (Yamaoka *et al.*, 2006).

SabA serait l'agent agglutinant des érythrocytes et des neutrophiles (Unemo *et al.*, 2005 ; Aspholm *et al.*, 2006). La reconnaissance des neutrophiles par SabA permettrait leur activation, et donc un relargage de radicaux oxygénés et azotés, induisant des lésions épithéliales (Unemo *et al.*, 2005 ; Yoshikawa et Naito, 2000) .

▪ **Adherence associated lipoproteins Alp A et B**

Les lipoprotéines d'adhérence associées AlpA et AlpB (adherence associated lipoproteins) sont codées respectivement par les gènes *alpA* (hp0912) et *alpB* (hp0913) (Odenbreit *et al.*, 1999) dont l'inactivation conduit pour chacun d'eux à une diminution de l'adhésion au tissu gastrique humain (Labigne, 2003). AlpA et AlpB induisent des lésions gastriques en modulant la cascade de signalisation pro-inflammatoires intracellulaires (Lu *et al.*, 2007).

4.2. Facteurs liés à l'inflammation et aux lésions tissulaires

4.2.1. L'îlot de pathogénicité *cag* (*cag PAI*)

L'îlot de pathogénicité *cag PAI* (cytotoxin associated gene Pathogenicity Island) est une région génomique de 40 kb comprenant une trentaine de gènes (Blaser et Atherton, 2004). Elle a été acquise au cours de l'évolution, lors d'un transfert horizontal de gènes d'une espèce inconnue (Gressmann *et al.*, 2005 ; Olbermann *et al.*, 2010). Les souches de *H. pylori* ont été classées en deux catégories : celles qui possèdent un îlot de pathogénicité *cag* complet et fonctionnel et celles qui en sont totalement ou partiellement dépourvues (Covacci *et al.*, 1999). Associé aux pathologies cliniques, la présence de l'îlot de pathogénicité augmente le risque de développement de gastrite atrophique, de maladies ulcéreuses et de pathologies tumorales comparativement aux souches qui en sont dépourvues (Kuipers *et al.*, 1999 ; Parsonnet *et al.*, 1997). Cet îlot code pour un système de sécrétion type IV (SSTIV) permettant

la translocation de la protéine CagA, du peptidoglycane ainsi que d'autres éléments à l'intérieur de la cellule épithéliale (Covacci *et al.*, 1993 ; Censini *et al.*, 1996 ; Akopyants *et al.*, 1998).

▪ **Le système de sécrétion de type IV (SSTIV)**

Le SSTIV est un complexe multimérique composé de l'assemblage de 11 protéines, VirB1 à 11, couplées à une NTPase, VirD4. Il est localisé au niveau de la membrane de *H. pylori*. De structure analogue à une seringue (Fig. 9A), il joue le rôle de transporteur et assure les échanges génétiques (conjugaison et transfert d'ADN), ainsi que le transport de divers substrats à travers la membrane cellulaire. Il contribue à la virulence de *H. pylori* en assurant la translocation de facteurs bactériens à l'intérieur de la cellule épithéliale notamment le peptidoglycane (PG), ainsi que la protéine CagA, responsable de nombreux effets délétères sur la cellule épithéliale tels que des réarrangements du cytosquelette d'actine, une déstabilisation des jonctions cellulaires au niveau des jonctions serrées et des jonctions adhérentes (Backert et Selbach, 2008) (Fig. 9B).

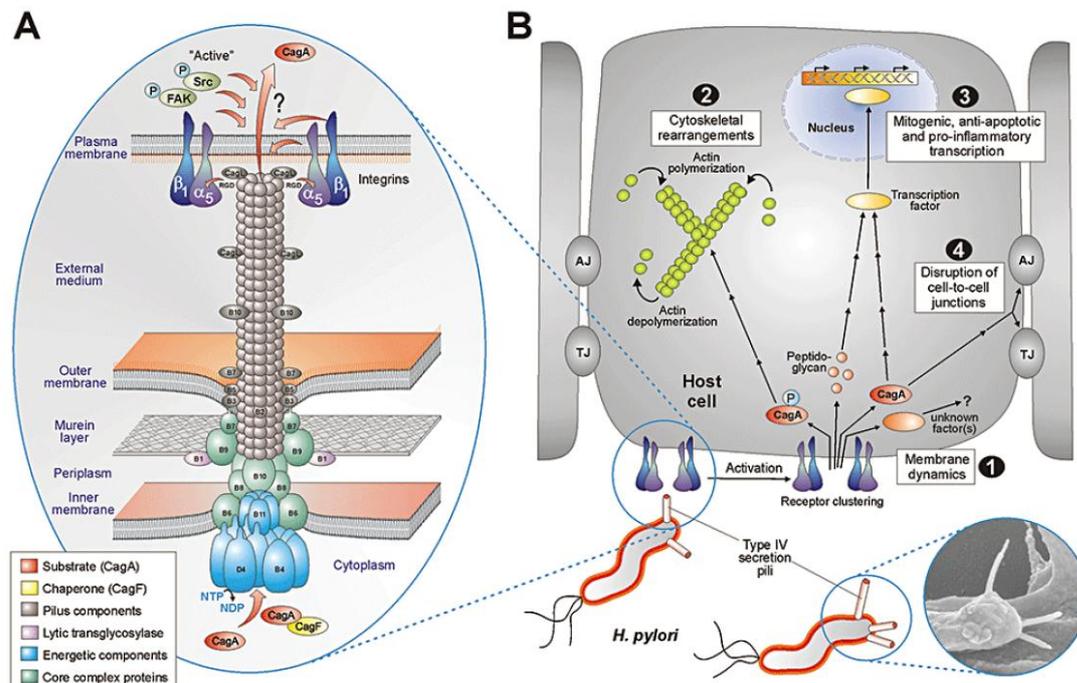


Figure 9 : Assemblage du système de sécrétion de type IV et conséquences au niveau de la signalisation cellulaire induite par la translocation de CagA dans la cellule hôte (Backert et Selbach, 2008).

A : Modèle hypothétique du SSTIV. **B :** L'activité fonctionnelle du pilus SSTIV nécessite des récepteurs d'intégrine de la cellule hôte.

Le SSTIV active la réponse inflammatoire via le récepteur NOD1 (Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 1) qui reconnaît ces éléments du peptidoglycane de *H. pylori* activant ainsi la voie du NF-κB (Nuclear Factor κB), ce qui permet l'induction de la synthèse de l'interleukine-8 (IL-8) à partir des cellules épithéliales (Viala *et al.*, 2004 ; Roesler *et al.*, 2014).

▪ **La protéine CagA**

La protéine bactérienne CagA est codée par le gène *cagA* présent à l'extrémité 3' de l'îlot *cag PAI* (Covacci *et al.*, 1993). Cette protéine de 135-145 kDa est injectée à l'intérieur de la cellule épithéliale par le SSTIV. Une fois injectée, elle est phosphorylée par les kinases de la famille Abl et Src au niveau d'une tyrosine située dans un motif EPIYA (Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala) présent en plusieurs copies et localisé dans la partie C-terminale de la protéine (Selbach *et al.*, 2004 ; Stein *et al.*, 2002). En fonction des séquences flanquantes des motifs EPIYA, 4 segments EPIYA peuvent être distingués, EPIYA-A, EPIYA-B, EPIYA-C et EPIYA-D (Aras *et al.*, 2003 ; Kim *et al.*, 2006) (Fig. 10).

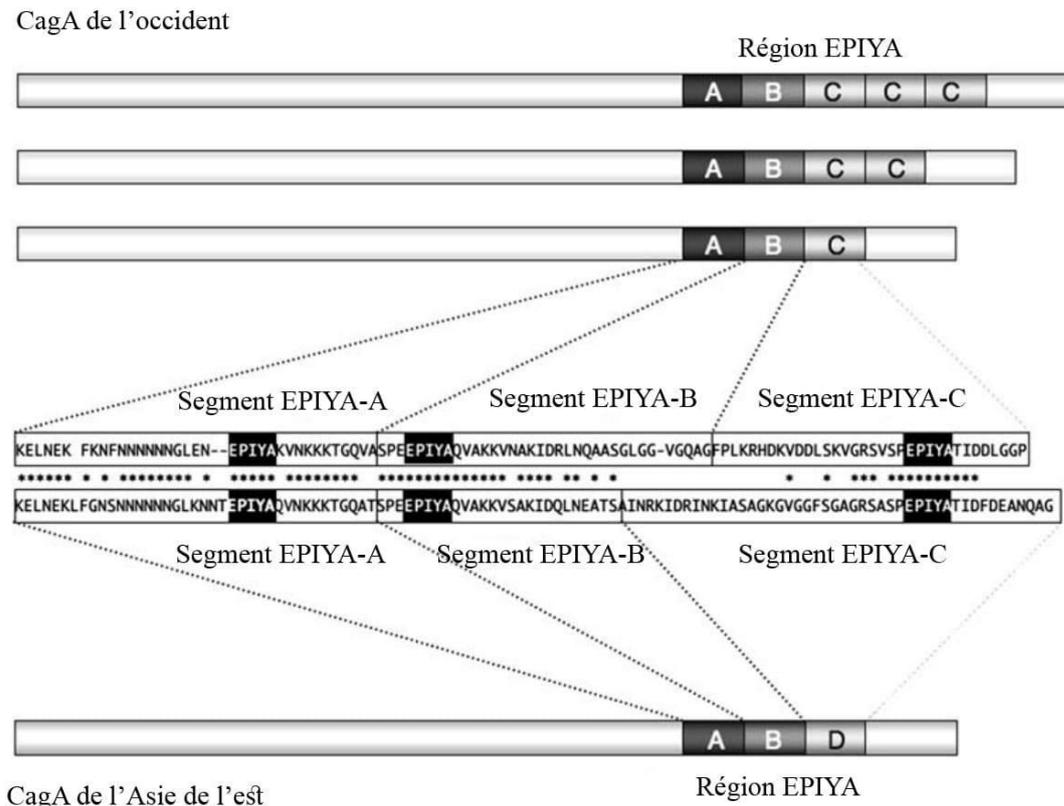


Figure 10 : Polymorphisme de la région C-terminale de la protéine CagA et structure des motifs répétés EPIYA (Hatakeyama, 2009).

Dans les pays Occidentaux, les régions contenant les motifs EPIYA des souches de *H. pylori* correspondent à un arrangement des segments EPIYA-A, EPIYA-B et EPIYA-C (présent pour ce dernier en 1 à 3 copies) alors que les souches de *H. pylori* d'Extrême Orient (Japon, Chine, Corée) possèdent un segment EPIYA-D. Les types C et D ont été associés à un risque plus important de cancer (Ren *et al.*, 2006).

La phosphorylation de la protéine CagA entraîne des altérations morphologiques cellulaires désignés par « becs de colibris » (Odenbreit *et al.*, 2000 ; Stein *et al.*, 2002). La protéine CagA phosphorylée interagit avec plusieurs effecteurs à l'intérieur de la cellule hôte. Son association avec la tyrosine phosphatase SHP-2 induit l'activation des kinases ERK 1 et 2 (Higashi *et al.*, 2002). CagA perturbe également le cycle cellulaire de la cellule épithéliale via l'activation du facteur de transcription AP-1 qui est à l'origine de l'expression des proto-oncogènes (Naumann *et al.*, 1999).

La protéine CagA non phosphorylée peut aussi avoir des effets pathogènes à l'intérieur de la cellule. Sa simple translocation entraîne l'activation aberrante de la β -caténine, des altérations au niveau des jonctions cellulaires apicales et une perte de polarité cellulaire (Suzuki *et al.*, 2005).

4.2.2. La cytotoxine vacuolisante A (VacA)

Toutes les souches de *H. pylori* possèdent le gène *vacA* codant pour une cytotoxine vacuolisante appelée protéine VacA. Toutefois, seules certaines souches expriment la forme active de la cytotoxine (Atherton, 1997 ; Cover, 1996).

Au cours de sa sécrétion la protéine VacA va être clivée aux extrémités N-terminale et C-terminale (Rieder *et al.*, 2005). Au niveau extracellulaire, la protéine mature est clivée en deux sous-unités A et B de 33 et 55 kDa liées de façon non covalente. La toxine se lie aux cellules épithéliales par l'intermédiaire de la plus grande sous-unité, puis elle est internalisée et localisée autour du noyau (Garner et Cover, 1996).

La séquence de *vacA* présente une grande diversité allélique au niveau de trois principales régions (Fig. 11) :

- la région *s* codant pour la séquence signal de la protéine, elle correspond à 2 allèles différents avec *s1* (les sous types *s1a*, *s1b* et *s1c*) qui est associé à la toxine complètement active, et *s2* qui produit une extension N-terminal courte bloquant la formation de vacuoles (Atherton *et al.*, 1995).

- la région *i* (intermédiaire) codant pour la sous unité *p33*. Cette région est divisée en 3 allèles *i1*, *i2* et *i3* (Rhead *et al.*, 2007).

-la région centrale *m* codant pour une partie de la sous unité p55 avec les allèles *m1* et *m2* (*m2a* et *m2b*), *m1* provoque une activité vacuolisante plus forte que *m2* (Atherton *et al.*, 1995 ; Blaser et Atherton, 2004).

Par ailleurs, la région de délétion *d* dont le rôle reste encore mal connu est divisée en 2 allèles. *d1* sans délétion et *d2* avec une délétion de 69 à 81 pb (Ogiwara *et al.*, 2009).

Ce polymorphisme génique conduit à différentes combinaisons alléliques possibles et à une activité cytotoxique variable suivant les souches (Pelayo Correa et Blanca Piazuolo, 2011). Ainsi, les souches *s1/m1* sont les plus virulentes et corrélées à un risque accru de cancer gastrique et d'ulcère, elles sont suivies de *s1/m2* alors que les souches *s2/m2* n'ont pas d'activité cytotoxique et les souches *s2/m1* sont rares (Kusters *et al.*, 2006).

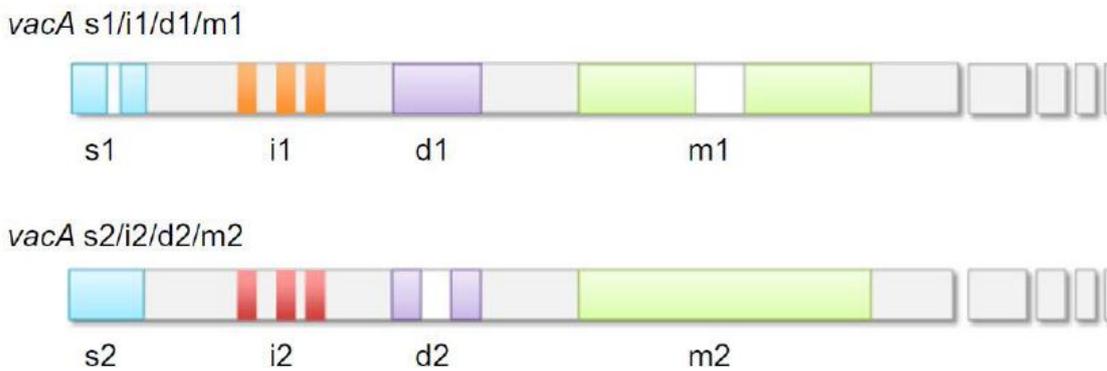


Figure 11 : Représentation schématique des allèles *vacA* (Suzuki *et al.*, 2012).

VacA induit de multiples activités cellulaires, elle altère la structure de la cellule épithéliale, en agissant sur le cycle cellulaire et joue un rôle dans la modulation de la réponse inflammatoire (Cover et Blanke, 2005). Elle peut s'accumuler au niveau de la membrane interne des mitochondries induisant une diminution du potentiel transmembranaire mitochondrial, une libération du cytochrome c, l'activation des caspases 8 et 9 et l'induction de l'apoptose (Fig. 12) (Peek *et al.*, 1999 ; Galmiche *et al.*, 2000 ; Cover *et al.*, 2003 ; Willhite *et al.*, 2003 ; Manente *et al.*, 2008).

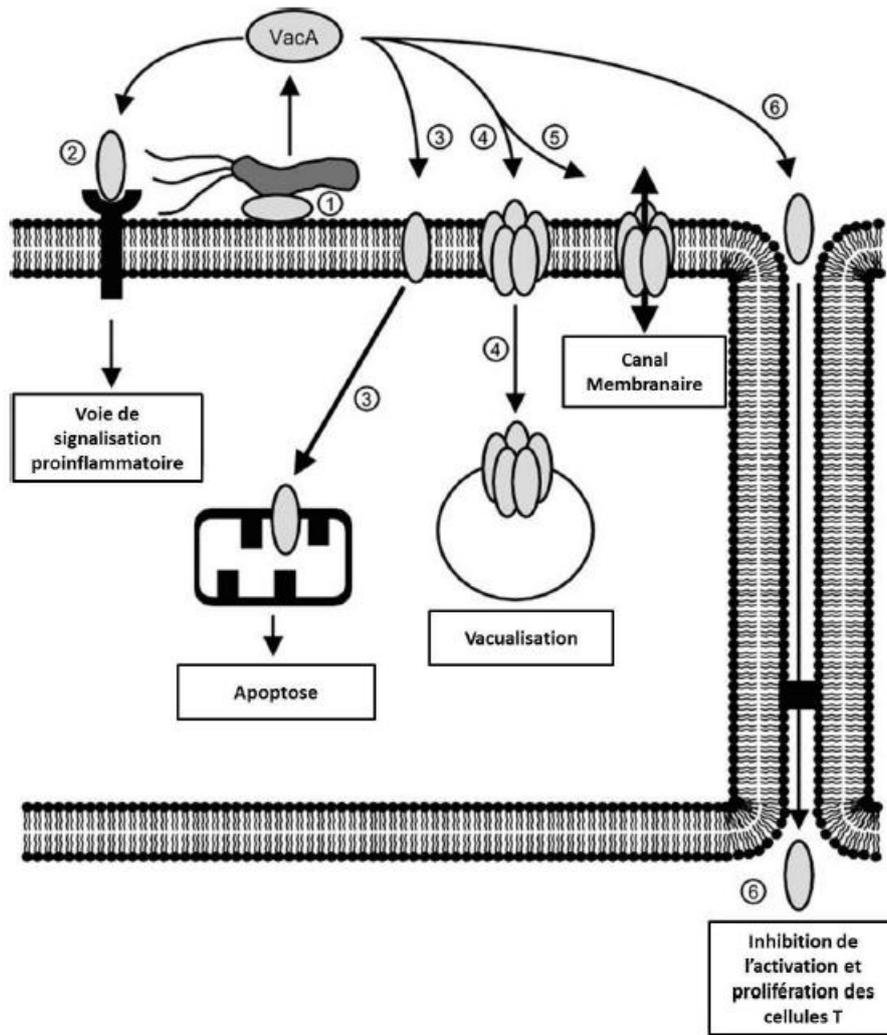


Figure 12 : Différentes actions cellulaires de VacA au cours de l'infection chronique par *H. pylori*

(1) Attachement de VacA a la surface de la cellule épithéliale, (2) Fixation de VacA sur son récepteur et initiation de la réponse inflammatoire, (3) Accumulation de vacA a la membrane mitochondriale et induction de l'apoptose, (4) Induction de la vacuolisation, (5) Formation d'un canal membranaire constitué de plusieurs molécules VacA entraînant une libération des nutriments hors de la cellule épithéliale, (6) Vac A traversant les jonctions serrées intercellulaires et inhibition de l'activation et prolifération des lymphocytes T (Kusters *et al.*, 2006).

4.2.3. Le lipopolysaccharide (LPS)

Le LPS est un lipoglycane phosphorylé retrouvé au niveau de la membrane externe des bactéries à Gram négatif. Le LPS est composé de 3 éléments : une chaîne polysaccharide ayant une partie constante « core » et une autre variable correspondant à l'antigène O et le lipide A. Le lipide A est responsable de l'activité biologique et immunologique du LPS. Le LPS de *H. pylori* est considéré comme un facteur de virulence important. Cependant, le lipide A du LPS de *H. pylori* est 1000 fois moins actif biologiquement que le LPS de *E. coli* (Moran et Aspinall, 1997). Mais, il semble que le LPS de *H. pylori* pourrait être un ligand du TLR2 dont l'activation induit, via une cascade de voies de signalisation, l'activation de NF- κ B et l'induction de chimiokines (Smith *et al.*, 2011).

Plus de 80 % des souches de *H. pylori* sont porteuses d'antigènes Lewis qui correspondent à l'antigène O (Simoons-Smit *et al.*, 1996 ; Wirth *et al.*, 1996). La chaîne O du LPS de *H. pylori* a une composition similaire aux antigènes de type Lewis X ou Y des groupes sanguins également retrouvés au niveau des cellules épithéliales gastriques (Vandenbroucke-Grauls et Appelmelk, 1998). Ceci a pour conséquence un échappement à la réponse immunitaire, favorisant la colonisation et l'adhésion cellulaire tout en contribuant ainsi à la chronicité de l'infection et à l'apparition d'une atrophie gastrique (Appelmelk *et al.*, 2000 ; Appelmelk *et al.*, 1996 ; Moran, 1996).

4.2.4. Le Peptidoglycane (PG)

Le peptidoglycane (PG) forme la paroi des bactéries Gram négatives et Gram positives. Au cours de l'infection par *H. pylori*, le PG est un acteur de l'induction de la réponse immunitaire innée et de l'inflammation (Chaput *et al.*, 2006). La translocation du PG de *H. pylori* à l'intérieur de la cellule épithéliale dépend de la présence chez la bactérie d'un SSTIV fonctionnel (Viala *et al.*, 2004). L'interaction du PG injecté avec la protéine intracellulaire motifs-reconnaissante Nod-1, détectrice spécifique du PG, induit l'activation d'une réponse inflammatoire NF- κ B dépendante entraînant la sécrétion de l'IL-8 et de la β -défensine 2 (Boughan *et al.*, 2006 ; Grubman *et al.*, 2010).

4.2.5. Autres protéines pro-inflammatoires

▪ OipA (Outer inflammatory protein)

OipA est une protéine de la membrane externe, pro-inflammatoire qui contribue à l'induction de l'IL-8 et par conséquent à l'aggravation de l'inflammation (Patel *et al.*, 2014). Il existe un polymorphisme de OipA. La présence chez *H. pylori* du gène *oipA* sous une forme fonctionnelle est significativement associée aux ulcères duodénaux, au cancer gastrique et des

infiltrations accrues de polynucléaires neutrophiles et d'une augmentation de la synthèse d'IL-8 (Yamaoka *et al.*, 2000 ; Franco *et al.*, 2008). OipA contribue également à l'induction de la métalloprotéase matricielle MMP-1 fortement associée au cancer gastrique (Wu *et al.*, 2006).

- **HP-NAP (*H. pylori* Neutrophil Activating Protein)**

La protéine HP-NAP est impliquée dans le recrutement des monocytes et des polynucléaires neutrophiles au site de l'infection (Contreras et Labigne, 2003).

- **Duodenal ulcer promoting gene (*DupA*)**

Le gène *dupA* est situé dans la zone de plasticité du génome de *H. pylori* et semble être un marqueur de virulence. *In vitro*, DupA augmente la production d'IL-8 (Lu *et al.*, 2005). L'association entre la présence de *dupA* et le risque élevé de développement d'ulcère duodéal et/ou cancer gastrique est très variable entre différentes populations (Wroblewski *et al.*, 2010).

- **Induced Contact Epithelium (*iceA*)**

Le gène *iceA* a été identifié chez *H. pylori* isolée à partir des patients souffrant de gastrite et d'ulcère duodéal. Il y a deux principales variantes alléliques du gène: *iceA1* et *iceA2* (Yakoob *et al.*, 2015). L'expression de *iceA* est induite par le contact avec l'épithélium. Le génotype *iceA1* est associé avec la sécrétion élevée de l'IL-8 par la muqueuse et l'inflammation aigue de l'antra. Plusieurs études suggèrent une association du variant *iceA1* avec l'ulcère duodéal. En revanche, *iceA2* n'a aucune homologie avec les gènes connus, et la fonction du produit *iceA2* n'est pas encore claire en dépit du fait que cet allèle est associé à la gastrite asymptomatique et la dyspepsie non ulcéreuse (Amjad *et al.*, 2010).

5. Pathologies associées à l'infection à *H. pylori*

L'infection à *H. pylori* entraîne toujours une réaction inflammatoire de la muqueuse gastrique. La gastrite liée à *H. pylori* est asymptomatique dans la majorité des cas (85%) mais peut évoluer vers des pathologies plus sévères comme le lymphome gastrique du MALT dans environ 0,1% des cas, l'ulcère gastrique et duodéal dans 5 à 10% des cas et 1% des cas qui présentent une gastrite atrophique évoluée vers un adénocarcinome (Fig.13).

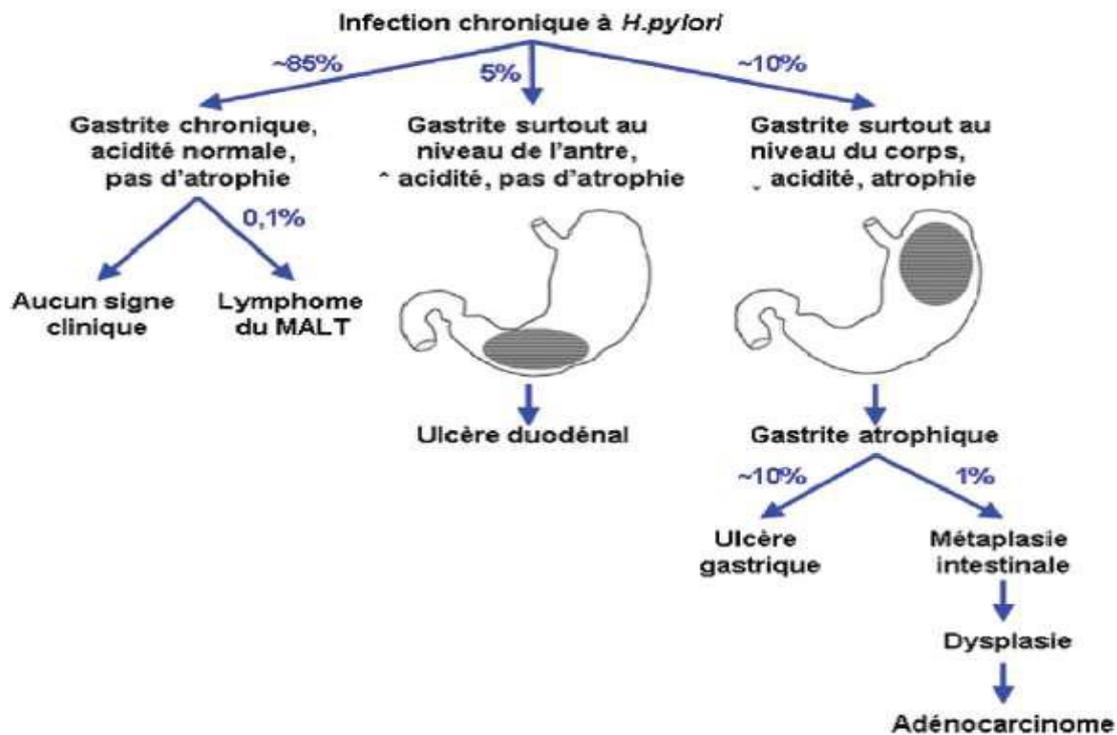


Figure 13: Pathologies induites par l'infection à *H. pylori* (Mégraud *et al.*, 2015).

5.1. Pathologies digestives

5.1.1. Gastrite aiguë et chronique

L'infection à *H. pylori* provoque une réaction inflammatoire de la muqueuse gastrique : c'est la gastrite (Fig.14). Elle induit une infiltration massive de polynucléaires neutrophiles au niveau de la muqueuse gastrique. La phagocytose des bactéries provoque la libération de substances toxiques induisant des lésions et aboutit à une diminution du nombre de glandes gastriques (De Vries et Kuipers, 2007 ; Graham *et al.*, 2004). L'inflammation et la persistance de *H. pylori* permettent le passage de la gastrite aiguë vers une gastrite chronique. A ce stade, une forte corrélation existe entre le niveau de sécrétion d'acide, la distribution de la gastrite et l'évolution vers l'ulcère ou le cancer (Kusters *et al.*, 2006). La gastrite fundique ou touchant l'ensemble de l'estomac est généralement associée à une hypochlorhydrie pouvant évoluer vers l'ulcère gastrique puis une atrophie avec un risque de cancer gastrique. La gastrite à prédominance antrale au contraire, provoque une hyperchlorhydrie qui peut conduire au développement d'un ulcère duodénal (Atherton, 2006).

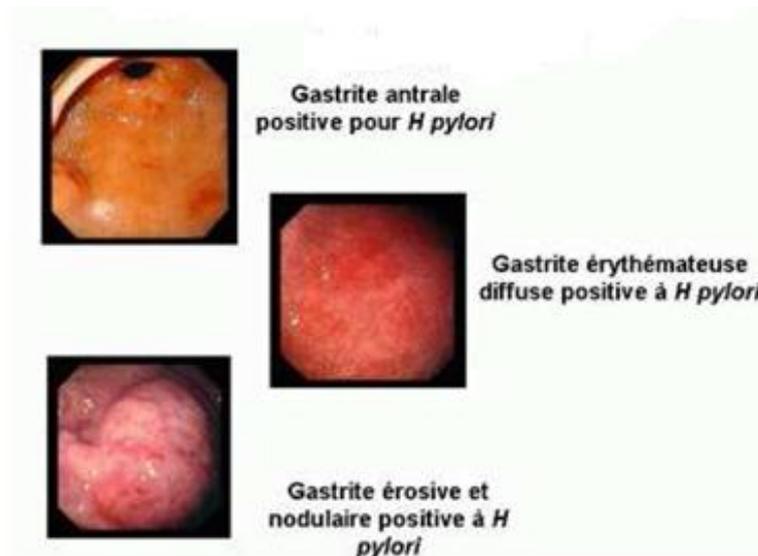


Figure 14: Aspects endoscopiques des gastrites

<http://allodocteur.blogspot.com/2013/10/gastrite-estomac.html>

5.1.2. Ulcère gastrique et duodénal

Les ulcères se caractérisent par des lésions pénétrant jusqu'à la couche musculaire. *H. pylori* est responsable de 70% des ulcères gastriques et de 90% des ulcères duodénaux (Mégraud et Lamouliatte, 1992) (Fig.15).

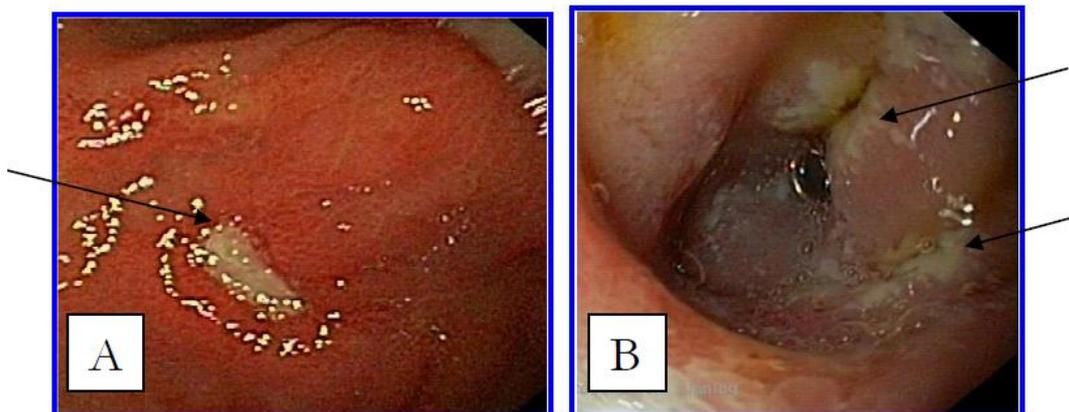


Figure 15: Ulcères visualisés lors d'une endoscopie.

A. Ulcère gastrique prépylorique - B. Multiples ulcères bulbaires
(Photo de R. Ntounda, CHU-Saint Pierre)

L'ulcère gastrique est localisé vers l'antrum, plus précisément dans la région de transition entre le corps de l'estomac et l'antrum. L'ulcère gastrique résulte d'une pangastrite associée à une normochlorhydrie ou une hypochlorhydrie (Atherton, 2006).

L'ulcère duodéal est localisé au niveau du bulbe duodéal qui est le plus exposé à l'acidité gastrique. La gastrite à prédominance antrale associée à une hyperchlorhydrie entraîne le développement de l'ulcère duodéal et produirait alors une métaplasie antrale protectrice (Atherton, 2006).

5.1.3. Adénocarcinome gastrique

L'adénocarcinome gastrique est le quatrième cancer à l'échelle planétaire par sa fréquence et le deuxième par sa mortalité (Yaghoobi *et al.*, 2010). En 1994, l'OMS conclut que l'infection à *H. pylori* est carcinogène de type I pour l'homme.

D'un point de vue anatomopathologique, il est nécessaire de distinguer deux grands groupes d'adénocarcinomes en fonction de leur localisation : les tumeurs du cardia, qui pour la plupart ne sont pas liées à l'infection à *H. pylori*, et celles de la partie distale de l'estomac. L'infection par *H. pylori* est associée uniquement aux cancers distaux. Selon des critères histologiques établis par Lauren, il existe deux types d'adénocarcinomes gastriques : le type diffus composé de cellules néoplasiques individuelles infiltrantes qui ne forment pas de structures glandulaires et l'adénocarcinome de type intestinal qui progresse à travers une série d'étapes histologiques (Correa, 1996 ; Wroblewski *et al.*, 2010). Ce dernier est initié par la transition d'une muqueuse normale vers une gastrite chronique superficielle suivie d'une atrophie gastrique et d'une métaplasie intestinale pour enfin engendrer une dysplasie et un adénocarcinome (Sipponen *et al.*, 2000).



Figure 16 : Adénocarcinome gastrique visualisé par endoscopie.

(Photo de R. Ntounda, CHU-Saint Pierre)

Le rôle de *H. pylori* dans la genèse de l'adénocarcinome gastrique a été clairement démontré par la mise en évidence de mécanismes cellulaires de carcinogenèse par la bactérie. *H. pylori*

a un effet carcinogène direct via la production de facteurs de pathogénicité comme la protéine CagA (Ding *et al.*, 2007).

Le stress oxydatif généré au cours de l'infection peut contribuer à un dysfonctionnement cellulaire et *H. pylori* induit des dommages oxydatifs directs au niveau de l'ADN (Baik *et al.*, 1996 ; Farinati *et al.*, 1998 ; Obst *et al.*, 2000). La fréquence des polymorphismes génétiques plus ou moins virulents des gènes *cagA* et *vacA* dans les différentes populations du globe est bien corrélée avec le taux d'incidence de cancers (Rhead *et al.*, 2007 ; Basso *et al.*, 2008 ; Jung *et al.*, 2009 ; Jang *et al.*, 2010). Plusieurs polymorphismes de l'hôte tels que celui de l'interleukine 1 peuvent accroître la réponse inflammatoire à la bactérie favorisant l'évolution vers le cancer (El-Omar *et al.*, 2000).

5.1.4. Lymphome gastrique de MALT

C'est un lymphome extra-ganglionnaire, qui se développe à partir du tissu lymphoïde associé aux muqueuses (MALT) (Fig.17). A l'état normal, la muqueuse gastrique est dépourvue de lymphocytes. Lors de l'infection chronique par *H. pylori*, la réaction inflammatoire induit un afflux de lymphocytes de type B au niveau de la muqueuse gastrique. Dans certains cas, suite à une immuno-stimulation, le tissu lymphoïde peut s'organiser en follicules lymphoïdes. Le lymphome se caractérise alors par une prolifération monoclonale des lymphocytes B de la zone marginale des follicules lymphoïdes (Zucca *et al.*, 1998). La prolifération de ces lymphocytes entraîne une destruction des glandes gastriques et aboutit à la formation de lésions épithéliales tumorales d'aspect micronodulaire décelables en endoscopie digestive (Capelle *et al.*, 2008).

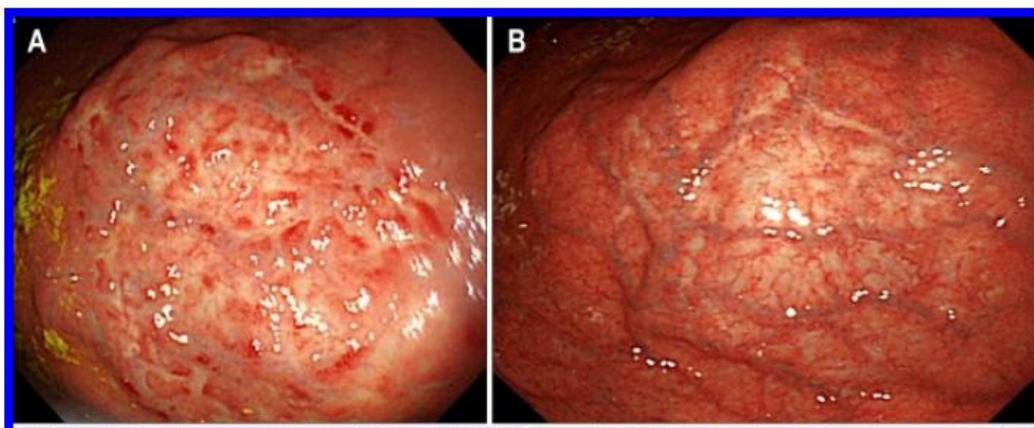


Figure 17 : Lymphome gastrique du MALT (Suzuki *et al.*, 2009).

(A) Endoscopie réalisée 1 mois après éradication de *H. pylori*. Lésion nodulaires montrant des spots rouges dans le fond de l'image. (B) Endoscopie réalisée 22 mois après éradication. Régression des lésions.

5.2. Pathologies extra-digestives

L'évolution prolongée de la gastrite chronique induite par *H. pylori* a fait suspecter un lien avec des pathologies extra-digestives, susceptibles d'être favorisées ou entretenues par l'inflammation chronique (Malfertheiner *et al.*, 2012).

-Le purpura thrombopénique idiopathique (PTI) est une pathologie auto-immune qui se manifeste par une destruction des plaquettes, elle fait intervenir une réponse immunitaire humorale et cellulaire. Plusieurs études revendiquent l'association entre le PTI et l'infection à *H. pylori* (Audia *et al.*, 2011). L'éradication de la bactérie, dans certaines études, s'accompagnait d'une augmentation du taux de plaquettes, mais avec une association variable et des succès inconstants (Stasi *et al.*, 2009).

- L'anémie ferriprive inexplicée, cette anémie serait causée par une malabsorption du fer liée à une hypochlorhydrie (en relation avec la gastrite chronique diffuse) et/ou par le saignement occulte d'érosions gastriques (Goddard *et al.*, 2011). En plus, l'infection à *H. pylori* entraîne une diminution de concentration de vitamine C dans le suc gastrique, ce qui entraînerait la diminution de l'absorption du fer (Annibale *et al.*, 2003).

- De nombreuses autres pathologies ont été attribuées à *H. pylori*, sans association directe de causes à effets : dyspepsie fonctionnelle, complications ischémiques de la maladie athéromateuse (AVC et cardiopathie ischémique), troubles cardiovasculaires, pathologies auto-immunes, maladie d'Alzheimer, maladie de Parkinson, migraines, retard de croissance,... (Atherton et Blaser, 2009). Ces résultats, bien qu'intéressants, n'ont actuellement pas d'impact en pratique clinique (De Korwin et Lehours, 2010).

6. Facteurs influençant l'évolution vers la pathologie

L'évolution d'une infection asymptomatique à *H. pylori* et d'une inflammation chronique vers des pathologies gastroduodénales plus sévères est la conséquence d'une interaction complexe entre les facteurs de virulence et la diversité génétique de la souche bactérienne, les polymorphismes génétiques et les prédispositions de l'hôte et les facteurs environnementaux. Ainsi le déterminisme pathologique associé à *H. pylori* est dépendant des facteurs bactériens, de l'hôte et de l'environnement (Fig.18).

6.1. Facteurs bactériens

Les facteurs de virulence de *H. pylori* jouent un rôle déterminant dans l'issue de l'infection et ceci est dû à la vaste hétérogénéité génétique présente chez la bactérie. Certains facteurs de virulence sont présents uniquement dans certaines souches et certains sous-types sont parfois corrélés à une pathologie plus ou moins sévère (Yamaoka, 2010). Le génotype

sIm1 de *VacA* et les souches *CagA* positives sont associés à un risque élevé d'ulcère duodéal et d'adénocarcinome gastrique.

6.2. Facteurs de l'hôte

Les facteurs de virulence bactériens ne sont pas les seuls déterminants qui contribuent à l'évolution de l'infection vers des stades pathologiques sévères (Mustapha, 2011). La réponse inflammatoire et immunitaire, le degré de sécrétion acide et la prédisposition génétique de l'hôte participent aussi à l'expression pathologique de l'infection.

6.2.1. Réponse inflammatoire et immunitaire chez l'hôte

L'infection à *H. pylori* est responsable d'une inflammation gastrique chronique symptomatique ou asymptomatique chez l'hôte infecté (Robinson *et al.*, 2007).

La persistance de la bactérie provoque une forte réponse immunitaire cellulaire et humorale impliquée dans les lésions gastriques. L'adhérence de *H. pylori* à l'épithélium gastrique via les adhésines, ou par la sécrétion de toxines bactériennes capables de pénétrer dans les cellules (PG, uréase, protéine CagA) provoque la libération de facteurs chimiotactiques et de cytokines, notamment l'IL-8 par les cellules épithéliales qui ont un rôle chimiotactique sur les polynucléaires, les macrophages et les lymphocytes qui vont à leur tour produire des cytokines essentiellement pro-inflammatoires et entretenir l'inflammation gastrique (Van Doorn *et al.*, 1999 ; Lamarque *et al.*, 2002).

L'activation des lymphocytes B et T permet d'orienter la réponse vers la voie Th1 qui favorise l'immunité cellulaire alors que *H. pylori* est un pathogène extracellulaire. Ceci peut contribuer à expliquer l'échec de l'élimination de cette bactérie par la réponse immune de l'hôte (Blaser et Atherton, 2004). Les cytokines produites par les cellules T conduisent à la réponse humorale qui fait intervenir les lymphocytes B responsables de la production d'immunoglobulines IgA et IgG (Vaughan et Chisholm, 2011).

Les cytokines pro-inflammatoires produites abondamment lors de la réaction inflammatoire, ainsi que les radicaux libres et le monoxyde d'azote, conduisant à une inflammation active chronique qui provoque l'apoptose et l'atrophie des cellules épithéliales (Lamarque *et al.*, 2003).

6.2.2. Perturbation de la sécrétion acide

H. pylori peut inhiber ou stimuler la sécrétion d'acide en fonction du contexte de l'infection. L'infection aiguë est souvent associée à une hypochlorhydrie résultant d'une surproduction de la cytokine pro-inflammatoire IL-1 β (Schubert *et al.*, 2008).

L'infection chronique par *H. pylori* peut induire une hypochlorhydrie ou une hyperchlorhydrie selon la distribution et sévérité de la gastrite (Atherton, 2006).

6.2.3 Polymorphismes génétiques de l'hôte

Les polymorphismes génétiques de l'hôte touchant les gènes impliqués dans la réponse inflammatoire sont associés à une prédisposition au cancer gastrique et sont aussi impliqués dans l'évolution de l'infection à *H. pylori*.

En effet, Les sujets ayant des polymorphismes d'expression élevée de l'IL1- β ont un risque plus élevé de développer une hypochlorhydrie, une atrophie gastrique et un adénocarcinome gastrique (El-Omar *et al.*, 2000). Il en est de même pour les gènes codant pour l'IL8, l'IL10 et le TNF α sont aussi associés au risque de cancer gastrique (El-Omar *et al.*, 2003).

Ces génotypes peuvent varier considérablement entre les populations humaines (El-Omar *et al.*, 2000).

6.3. Facteurs environnementaux

Certains facteurs environnementaux contribuent à l'évolution de l'infection à *H. pylori*, parmi ces facteurs exogènes, l'alimentation : une consommation élevée de sel et d'aliments salés favorise l'atrophie gastrique et le cancer de l'estomac (Tsugane et Sasazuki, 2007). La production de cytokines pro-inflammatoires en réponse à un régime riche en sel pourrait contribuer au processus de carcinogenèse et moduler l'expression génique de *H. pylori* (Loh *et al.*, 2007 ; Gancz *et al.*, 2008).

Les nitrites sont également un facteur de risque. Ils proviennent essentiellement des procédés de fabrication (salaisons, fumaisons, conserves) (Jakszyn et Gonzalez, 2006 ; Mitry *et al.*, 2011). Une alimentation appauvrie en fruits et légumes est également corrélée à un risque accru de cancer gastrique (Kobayashi *et al.*, 2002), les antioxydants naturels joueraient au contraire un rôle protecteur (Wroblewski *et al.*, 2010).

Le tabagisme est un autre facteur qui favorise la progression des lésions pré-néoplasiques et l'évolution vers le cancer gastrique, augmente le risque d'ulcère duodénal et retarde la cicatrisation des ulcères (Camargo *et al.*, 2007 ; Koivisto *et al.*, 2008).

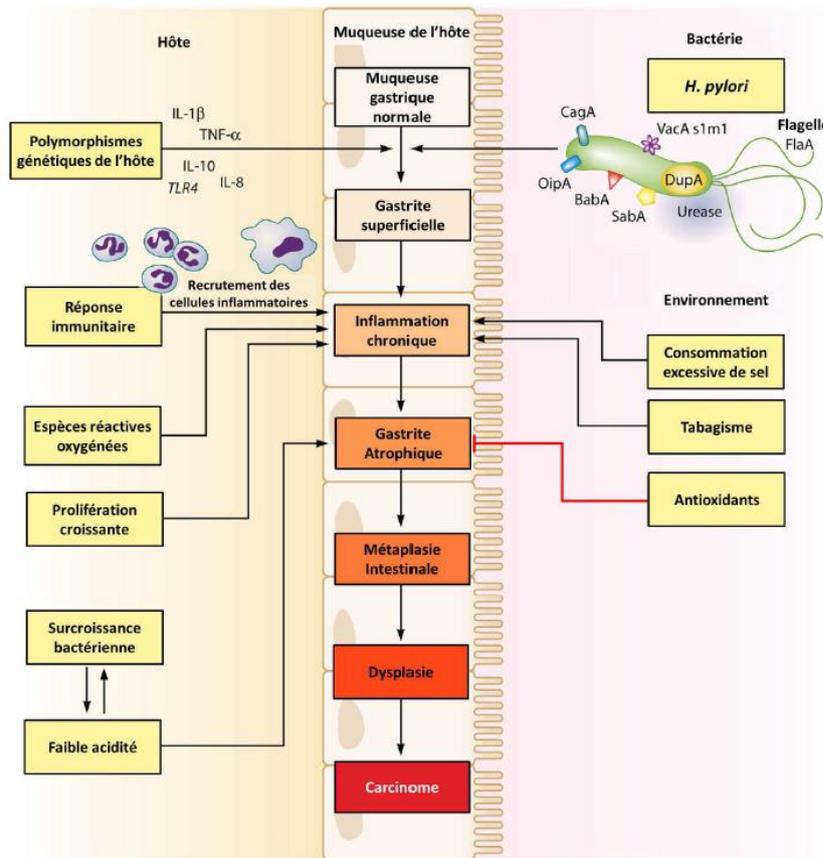


Figure 18: les facteurs bactériens, de l'hôte et environnementaux impliqués dans la pathogenèse liée à l'infection à *H. pylori* (Wroblewski *et al.*, 2010).

7. Méthodes de diagnostic biologique de *H. pylori*

La recherche de l'infection à *H. pylori* doit être réalisée en dehors de toute prise récente d'antibiotiques ou d'anti-sécrétoires (IPP) du fait du risque de faux négatifs (De Korwin et Lehours, 2010 ; Mégraud *et al.*, 2014).

Les méthodes de diagnostic de l'infection à *H. pylori* comprennent des méthodes immunologiques, biochimiques, microbiologiques et anatomopathologiques. Ces méthodes sont divisées en deux types : les méthodes dites directes ou invasives et les méthodes indirectes ou non invasives.

Le choix des méthodes diagnostiques repose sur leurs disponibilités, la nécessité de connaître la sensibilité aux antibiotiques et sur la prise en compte des avantages et inconvénients de chaque technique ainsi que de leurs coûts respectifs (Tableau. 2).

7.1. Méthodes invasives

Ces méthodes nécessitent la réalisation de biopsies gastriques effectuées lors d'une endoscopie gastroduodénale.

7.1.1. L'examen anatomopathologique

L'examen anatomopathologique est la méthode de diagnostic la plus fréquemment utilisée. C'est la technique privilégiée en routine en raison de sa disponibilité, de sa réalisation aisée dans les laboratoires et de sa fiabilité (De Korwin, 2003).

La détection de *H. pylori* dépend de la densité bactérienne, du nombre et de la taille des biopsies, de la méthode de coloration et de l'expertise de l'anatomopathologiste. La répartition de la bactérie sur la muqueuse gastrique est hétérogène et peut être affectée par un traitement antérieur par antibiotique ou IPP, de multiples biopsies sont nécessaires pour affirmer l'infection.

L'évaluation histologique des biopsies gastriques (deux biopsies fundiques, deux biopsies antrales et une biopsie dans l'angulus) permet de déterminer l'intensité et la topographie de la gastrite selon un score conforme à la classification de Sydney (Dixon *et al.*, 1996), qui est actuellement la classification internationale des gastrites (Fig.19).

Le gros avantage de cette méthode est qu'elle permet conjointement le dépistage de la gastrite et la recherche de complications, telles que l'atrophie, la métaplasie intestinale et la dysplasie (Dixon *et al.*, 1996).

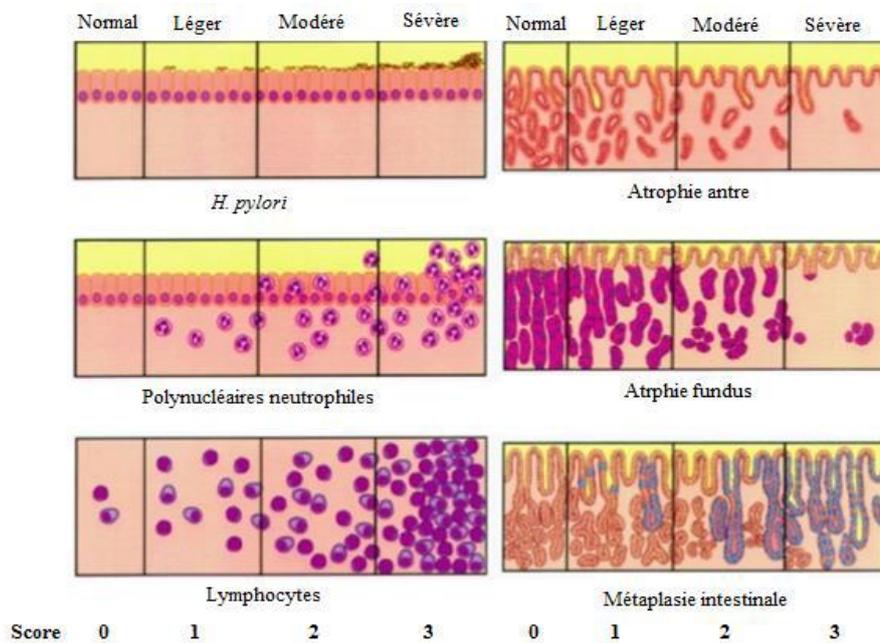


Figure 19 : Classification de Sydney (Dixon *et al.*, 1996)

L'utilisation de colorants permet de détecter la présence de *H. pylori* ; divers colorants sont utilisés mais en pratique, l'association hématoxyline et Giemsa permet d'obtenir d'excellents résultats. La sensibilité et la spécificité de l'examen anatomopathologique est élevée, supérieure à 90%, et cette technique est accessible à tous les centres d'endoscopie digestive (De Korwin, 2003).

7.1.2. Le test rapide à l'uréase

Son principe repose sur la forte activité uréasique de *H. pylori* qui transforme l'urée en ammoniac et dioxyde de carbone provoquant une augmentation du pH du milieu de réaction et fait virer la couleur de l'indicateur de pH du jaune au rose violacé dans un délai de 1 heure, ce qui indique la présence de *H. pylori*.

Il existe plusieurs kits commercialisés : CLOtest®, Pyloritek®, ProtonDry® (Uotani et Graham, 2015) dont la sensibilité et la spécificité sont de l'ordre de 90% chez les patients non traités (Lamarque *et al.*, 2012). La positivité du test permet de prescrire un traitement empirique d'éradication mais sa négativité n'exclue pas une infection en raison de sa sensibilité qui peut être insuffisante si la densité bactérienne est faible à cause des antibiotiques ou des IPP, donc il doit être couplé à un autre test comme l'anatomopathologie afin d'améliorer la sensibilité diagnostique (Midolo et Marshall, 2000 ; Calvet *et al.*, 2013).

7.1.3. La culture bactérienne

La culture est la méthode diagnostic la plus spécifique et constitue le test de référence le plus fiable pour affirmer la présence de *H. pylori* et tester la sensibilité aux antibiotiques, mais elle nécessite des conditions particulières pour maintenir la viabilité des bactéries et sa réalisation nécessite un personnel entraîné (De Korwin, 2003).

Elle a une spécificité maximale 100% et sa sensibilité est excellente quand elle est réalisée dans de bonnes conditions. Le facteur limitant est surtout le transport rapide des biopsies qui doit être effectué dans une atmosphère de microaérophilie réfrigérée à + 4 °C pendant l'acheminement au laboratoire en moins de 4h. Au delà de 4h, l'usage d'un milieu gélose semi-solide de transport de type Portagerm Pylori est indispensable. Après 24h, il est préférable de les congeler à -70 °C ou dans de l'azote liquide (Heep *et al.*, 1999).

Ces contraintes de transport, la difficulté et le coût de la culture sont des obstacles à la diffusion de la méthode en pratique courante.

En pratique, la culture n'est réalisée qu'à la demande, généralement après deux échecs d'éradication afin d'obtenir un antibiogramme, deux biopsies sont réalisées, l'une antrale et l'autre fundique (Lamarque *et al.*, 2012 ; Mégraud, 2010).

La culture permet aussi de caractériser certains marqueurs de virulence et de réaliser un typage génétique pour les études épidémiologiques (De Korwin, 2003).

7.1.4. L'amplification génique

L'amplification génique par PCR est une technique de biologie moléculaire permettant de détecter l'ADN de *H. pylori*. Elle peut être réalisée sur différents supports : biopsie fraîche, liquide gastrique, selles, urines, salive, plaque dentaire (Rimbara *et al.*, 2013).

Les performances diagnostiques sont supérieures à celle de l'histologie et de la culture. La sensibilité est de 98,2% et la spécificité de 97,5% (Tankovic *et al.*, 2007).

La détection moléculaire est une alternative à la culture avec antibiogramme et présente l'avantage d'être une méthode rapide réalisable sur des bactéries non viables.

- Plusieurs techniques sont utilisées:

- ✓ **La PCR standard** : après extraction de l'ADN, l'amplification est effectuée en utilisant des amorces ciblant des gènes spécifiques de *H. pylori* : *ARNr16S*, *ARNr23S*, *ureA*, *cagA*, *vacA*... (Megraud et Lehours, 2007). Les produits PCR peuvent être utilisés à des fins de typage moléculaire.
- ✓ **La PCR en temps réel** : elle permet une détection et une quantification rapide de la bactérie grâce à l'adjonction d'une sonde. Elle est utilisée pour la détection des mutations à l'origine de la résistance à la clarithromycine (Tankovic *et al.*, 2007).
- ✓ Le kit GenoType HelicoDR® : basé sur la PCR multiplexe couplée à l'hybridation sur bandelette, permet la détection de *H. pylori* et des résistances associées à la clarithromycine et aux fluoroquinolones (Cambau *et al.*, 2009).

7.2. Méthodes non invasives

Les méthodes non invasives sont utilisées lorsqu'il n'est pas nécessaire de procéder à une endoscopie. Elles sont surtout pratiquées pour contrôler l'éradication de *H. pylori* après traitement.

7.2.1. La sérologie

Les méthodes immunoenzymatiques ELISA permettent la détection des anticorps IgG spécifiques de *H. pylori* dans le sérum qui apparaissent deux à trois semaines après le début de l'infection, ses performances sont supérieures à 90% (De Korwin *et al.*, 2014 ; Burucoa *et al.*, 2013). Les avantages de la sérologie sont son faible coût, sa large disponibilité et sa rapidité de réalisation.

Les résultats sérologiques ne sont pas affectés par la prise médicamenteuse (antibiotique ou anti-sécrétoire), l'hémorragie ou la diminution de la charge bactérienne. Ainsi, la sérologie est intéressante lorsque l'utilisation des autres techniques est impossible ou risque de donner

des faux négatifs. Cependant, elle n'est pas adaptée au contrôle post thérapeutique, puisque la séroposivité peut se maintenir des années après un traitement d'éradication efficace de *H. pylori* (Mégraud, 2010).

D'autres techniques sérologiques peuvent être utilisées, telle que le Western-Blot, agglutination au latex, hémagglutination, immunochromatographie, immunofluorescence.

7.2.2. Le test respiratoire à l'urée marquée

Le test respiratoire à l'urée marquée au ^{13}C permet de détecter une infection active à *H. pylori* grâce à l'activité uréasique de la bactérie (Lamarque *et al.*, 2012).

Il consiste à faire absorber au patient de l'urée marquée au ^{13}C (isotope stable non radio-actif). Le $^{13}\text{CO}_2$ qui résulte par hydrolyse de l'urée est détecté dans l'air expiré 30 min après l'ingestion. La détection du CO_2 se fait par spectrométrie infrarouge ou spectrométrie de masse. Le taux du $^{13}\text{CO}_2$ dégagé est comparé à celui obtenu juste avant l'ingestion (Sobhani *et al.*, 2000 ; De Korwin, 2003) (Fig. 20). Le patient doit être à jeun, et absorber une solution d'acide citrique ou de jus d'orange avec l'urée marquée au ^{13}C principalement afin de retarder la vidange gastrique et allonger les temps de contact entre l'uréase bactérienne et l'urée ^{13}C .

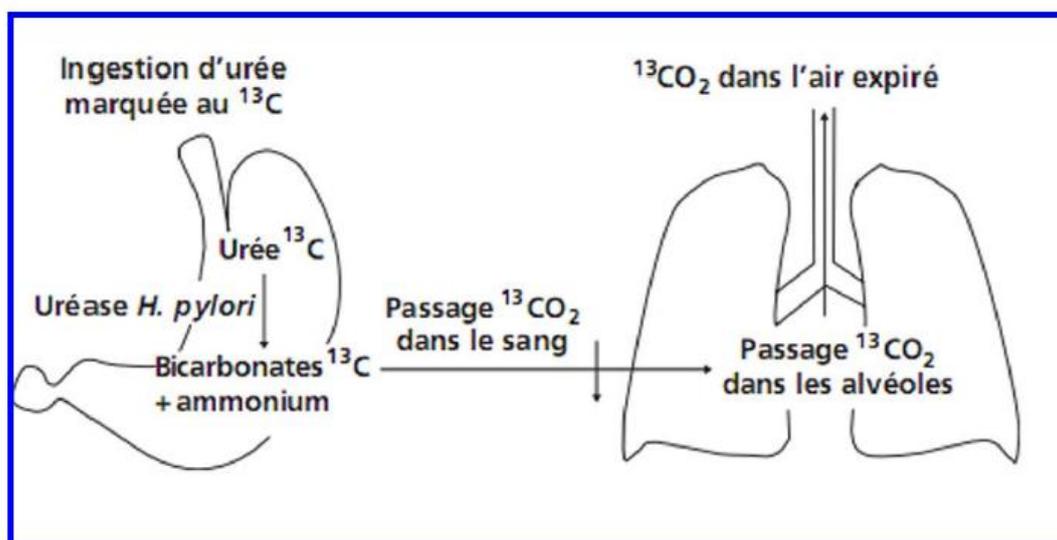


Figure 20: Principe du test respiratoire à l'urée marquée au ^{13}C

<http://umvf.univ-nantes.fr/hepato-gastro-enterologie/enseignement/item290/site/html/iconographie.html>

Les performances diagnostiques du test respiratoire sont excellentes, avec des sensibilités et spécificités supérieures à 95% aussi bien avant qu'après traitement d'éradication de *H. pylori*.

Cependant, la sensibilité du test est diminuée par les traitements par IPP, les antibiotiques et le bismuth qui réduisent la densité bactérienne et l'activité uréasique. Le test doit être réalisé au moins 4 semaines après l'arrêt du traitement (Lamarque *et al.*, 2012). Ces précautions indispensables évitent les résultats faussement négatifs (Mégraud, 2010).

Le test respiratoire est considéré comme la meilleure méthode de diagnostic et de contrôle d'éradication lorsque l'endoscopie digestive n'est pas nécessaire (Isomoto *et al.*, 2002).

7.2.3. La détection des antigènes bactériens dans les selles

La recherche d'antigènes de *H. pylori* dans les selles est effectuée par technique immunoenzymatique type ELISA ou immuno-chromatographie avec un anticorps monoclonal dirigé contre la bactérie (Lamarque *et al.*, 2012).

L'utilisation d'anticorps monoclonaux a permis d'améliorer la sensibilité et la spécificité de ce test 94%. Elle peut être intéressante quand le test respiratoire à l'urée marquée n'est pas utilisable (performances comparables) et chez le jeune enfant (Mégraud *et al.*, 2014).

Il présente l'avantage de sa simplicité d'utilisation, et peut être réalisé sur un échantillon de selles fraîches ou congelées. Ce test détecte une infection active et peut notamment être utilisé dans le contrôle de l'éradication en respectant un délai de 4 semaines après la fin du traitement (De korwin et Lehours, 2010).

Différents kits sont proposés à cet effet ; ceux utilisant les anticorps monoclonaux (HpStar) offrent de meilleurs résultats que les kits utilisant des anticorps polyclonaux (Premier platinum HpSA) (Zhou *et al.*, 2014).

8. Indications de recherche et d'éradication

Depuis sa découverte en 1982, les connaissances sur l'implication de l'infection à *H. pylori* dans diverses pathologies gastriques et extra-gastriques se sont élargies.

La recherche de l'infection à *H. pylori* est en pratique justifiée en cas d'indication d'un traitement d'éradication. Deux indications étaient déjà validées depuis de nombreuses années : la pathologie ulcéreuse gastro-duodénale et le lymphome gastrique du MALT. Les recommandations ont ensuite été élargies à d'autres situations cliniques notamment le cancer gastrique et le dépistage des sujets à haut risque de cancer gastrique (Petitgars, 2015).

Actuellement, la recherche de *H. pylori* et son éradication sont réservées aux patients présentant des troubles significativement améliorés, ou des risques graves prévenus, par la guérison de la gastrite infectieuse (De Korwin, 2016). Les recommandations de recherche et d'éradication de *H. pylori* sont résumées dans le Tableau. 3.

Tableau 2: Avantages et inconvénients des méthodes diagnostiques de l'infection à *H. pylori* (De Korwin, 2007)

Tests invasifs	Avantages	Inconvénients
Anatomopathologie	Excellente sensibilité, spécificité et disponibilité. Diagnostic de la gastrite sans surcoût.	Relativement coûteux, Personnel entraîné Sensibilité diminuée (IPP, antibiotiques, hémorragie, atrophie)
Test rapide de l'uréase	Peu coûteux, résultat rapide (1h), très bonne spécificité	Sensibilité insuffisante surtout en post-éradication et si traitement (IPP, antibiotiques), hémorragie digestive ou atrophie
Culture	Excellente spécificité Possibilité d'antibiogramme et de recherche génotypique	Coûteux Centre spécialisé Milieu de transport des biopsies (délai 24h) Sensibilité variée et diminuée si traitement (IPP, antibiotiques, hémorragie, atrophie)
Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)	Pas de condition de transport Conservation des échantillons Excellente sensibilité et spécificité Évaluation de la sensibilité aux antibiotiques (clarithromycine)	Coût supplémentaire Centre spécialisé Méthodologie non standardisée
Tests non invasifs	Avantages	Inconvénients
Sérologie (anticorps spécifique de <i>H. pylori</i>)	Pas coûteux Disponibilité Très bonne valeur prédictive Sensibilité conservée (IPP, antibiotiques, hémorragie digestive, atrophie)	Valeur prédictive positive dépendante de la prévalence de <i>H. pylori</i> Non utilisable en post-éradication à court terme
Test respiratoire à l'urée ¹³ C	Identifié une infection active Excellente valeur prédictive négative et positive avant et après traitement d'éradication	Sensibilité diminuée (IPP, antibiotiques, hémorragie digestive, estomac opéré)
Détection antigénique dans les selles	Identifie une infection active excellente valeurs prédictives négatives et positives avant et après traitement d'éradication	Tests polyclonaux moins performants que les tests monoclonaux (post-éradication) Inconfort du malade (recueil des selles) Conservation des échantillons à -20 °C Sensibilité diminuée (IPP, antibiotiques)

Tableau 3: Les recommandations de recherche et d'éradication de *H. pylori* (Lamarque *et al.*, 2012).

Indication	Niveau de recommandation
Ulcère gastroduodéal, évolutif ou non, incluant les ulcères compliqués	Elevé
Lymphome de MALT	Elevé
Prise d'AINS ou d'aspirine faible dose chez des patients ayant eu un ulcère compliqué ou non	Elevé
Traitement au long court par aspirine chez des patients ayant eu un ulcère gastroduodéal hémorragique	Elevé
Prévention des ulcères avant de débiter un traitement par AINS, particulièrement en cas de traitement prolongé, chez des patients sans antécédent d'ulcère et non précédemment traités par AINS	Elevé
Patients ayant une endoscopie pour dyspepsie	Elevé
Traitement au long cours (au moins 6 mois) par antisécrotoires gastriques (IPP).	Elevé
Antécédents familiaux de cancer gastrique au premier degré	Moyen
Mutations des gènes de réparation de l'ADN (syndrome de Lynch)	Moyen
Lésions pré-néoplasiques de la muqueuse gastrique : atrophie avec ou sans métaplasie intestinale	Moyen
Antécédents de résection localisée d'un cancer gastrique	Moyen
Anémie par carence en fer sans cause retrouvée	Moyen
Carence en vitamine B12	Moyen
Purpura thrombopénique chronique idiopathique	Moyen
Prévention d'un cancer gastrique chez les patients devant avoir un by-pass gastrique pour traitement d'une obésité morbide	Faible
Enfants avec des douleurs épigastriques sans étiologie évidente	Faible

9. Traitement de l'infection à *H. pylori*

Suite à la reconnaissance de *H. pylori* comme agent étiologique des maladies gastroduodénales, un grand espoir est né de pouvoir guérir ces maladies avec des traitements à base d'antibiotiques. Le traitement est envisagé dès lors que la présence de la bactérie a été confirmée par une méthode diagnostique. Les schémas thérapeutiques sont choisis en fonction de la sensibilité de la bactérie aux antibiotiques, des facilités d'observance, des effets indésirables et du coût.

9.1. Les antibiotiques

H. pylori est sensible *in vitro* à de nombreux antibiotiques ; cependant peu sont efficaces pour son éradication *in vivo*. Ceci est en raison de ses particularités et de sa localisation dans un site protégé (De Korwin, 2002).

Les caractéristiques optimales d'une molécule anti-*H. pylori* sont : bonne activité *in vitro*, forte concentration au niveau du suc gastrique, activité par voie endoluminale et systémique, stabilité sur des gammes étendues de pH (1 à 7), bonne tolérance et peu d'effets secondaires, faible propension à la résistance et coût abordable (Vakil et Mégraud, 2007).

Les antibiotiques recommandés pour le traitement de *H. pylori* sont : la clarithromycine, le métronidazole, l'amoxicilline, la lévofloxacine, la tétracycline et la rifampicine.

9.1.1. Métronidazole

Le métronidazole appartient à la famille des 5-nitro-imidazolés. Il agit spécifiquement sur les bactéries anaérobies ainsi que sur certaines espèces microaérophiles dont *H. pylori*. Il agit par inhibition de synthèse de l'ADN bactérien. C'est la réduction du NO₂ du nitro-imidazole par une nitroréductase bactérienne qui va lui conférer son activité *in vivo* dans le cytoplasme bactérien. Les radicaux générés provoquent des mutations de l'ADN bactérien conduisant à la mort bactérienne (Miendje Deyi, 2011).

La résistance au métronidazole concerne plusieurs gènes. La plus représentée est la mutation du gène *rdxA* codant pour une nitroréductase indispensable à l'activation de l'antibiotique dans le cytoplasme bactérien. Des mutations sur d'autres gènes (*frxA* et *fdxB*) sont également impliquées dans les résistances aux nitro-imidazolés (Marais *et al.*, 2003).

Il semble que le potentiel redox de l'environnement soit important dans la réduction du métronidazole. Ce potentiel peut varier aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*, ce qui pourrait expliquer, d'une part, une faible reproductibilité des tests phénotypiques de dépistage de la résistance et, d'autre part, une discordance entre les données *in vitro* et *in vivo* (Mégraud, 2007).

Le nombre important de mutations du gène *rdxA*, n'a pas permis d'établir des tests moléculaires de détection de la résistance au métronidazole. Les résistances sont déterminées par l'établissement d'un antibiogramme. Seulement, les résultats des tests de sensibilité sont peu fiables car très variables d'un laboratoire à un autre (Cambau *et al.*, 2009 ; Mégraud et Lehours, 2007).

La résistance de *H. pylori* au métronidazole est la résistance la plus fréquente aux antibiotiques. Les taux de résistance les plus élevées sont retrouvés en Afrique avec 75,02% suivi de l'Amérique du sud avec 52,85%, de l'Asie avec 46,57%, de l'Europe avec 31,19%, et de l'Amérique du nord avec 30,5% (Ghotaslou *et al.*, 2015). Cet écart de résistance entre les pays industrialisés et les pays en développement peut être dû à l'utilisation du métronidazole pour des infections de gynécologie et de maladies infectieuses d'origine dentaire et parasitaire (Glupczynski *et al.*, 2001 ; Frenck et Clemens, 2003).

9.1.2. Clarithromycine

La clarithromycine fait partie de la famille des macrolides. Elle se fixe sur la sous-unité 50S du ribosome bactérien, notamment au niveau de la boucle peptidyl transférase du domaine V de l'ARN ribosomal (ARNr) 23S. Il en résulte une inhibition de l'élongation du peptide en cours de synthèse, par blocage des étapes de transfert peptidique ou de translocation (Weisblum, 1995 ; Versalovic *et al.*, 1996).

La clarithromycine reste le macrolide le plus utilisé pour le traitement d'éradication de *H. pylori* (Camarota *et al.*, 2004). Elle diffuse très bien dans la muqueuse gastrique et agit en synergie avec les supprimeurs de l'acidité.

Le mécanisme de résistance aux macrolides est bien connu se caractérisant par des mutations ponctuelles au niveau des gènes codant pour l'ARNr 23S. Ces mutations, en modifiant la structure des ribosomes, diminuent l'affinité des antibiotiques pour leur cible ribosomale et confèrent à la bactérie une résistance croisée pour les différents macrolides. Une seule mutation est donc suffisante pour obtenir un haut degré de résistance. Trois mutations ponctuelles majeures dans deux positions nucléotidiques de l'ARNr 23S ont été décrits A2142C, A2142G et A2143G (Occhialini *et al.*, 1997 ; Stone *et al.*, 1997 ; Versalovic *et al.*, 1996). D'autres mutations plus rares ont aussi été associées à une résistance : A2115G, G2141A, A2144T, T2182C et T2717C (Taylor *et al.*, 1997 ; Stone *et al.*, 1997 ; Toracchio *et al.*, 2004).

9.1.3. Amoxicilline

L'amoxicilline est l'antibiotique de référence dans le traitement d'éradication de *H. pylori*. C'est un antibiotique appartenant à la famille des bêtalactamines. Il inhibe la synthèse du peptidoglycane, constituant de la paroi bactérienne en s'attaquant aux protéines liant les pénicillines (PLP). La résistance de *H. pylori* à l'amoxicilline est très rare, elle n'a pas évolué et reste pour l'instant exceptionnelle, inférieure à 1% (Mégraud, 2004 ; Mégraud *et al.*, 2013). Elle est due à des mutations sur le gène *plp-1a* notamment par la substitution d'acide aminé Ser-4143Arg conduisant au blocage du transport des pénicillines (Kwon *et al.*, 2003 ; Gerrits *et al.*, 2006 ; Gerrits *et al.*, 2002).

9.1.4. Tétracycline

La tétracycline est un antibiotique appartenant à la famille des cyclines, elle inhibe la synthèse des protéines bactérienne en se liant à la sous unité 30S du ribosome où elle bloque la fixation de l'aminocyl-ARNt résultant en la synthèse d'un peptide tronqué.

Le mécanisme de résistance de *H. pylori* de haut niveau à la tétracycline est associé à un changement d'un triplet nucléotidique (AGA 926–928 TTC) au niveau du gène *ARNr16S*, site de liaison de la tétracycline (Gerrits *et al.*, 2002 ; Trieber et Taylor, 2002).

La substitution d'un seul ou deux nucléotides dans la même région ne conduit pas à une vraie résistance mais à une diminution de la sensibilité. La nécessité d'une triple mutation peut expliquer la rareté des résistances à la tétracycline (Dailidienė *et al.*, 2002 ; Gerrits *et al.*, 2003). Des souches de *H. pylori* résistantes à la tétracycline et dépourvues de mutations en positions 926 à 928 ont été décrites, un mécanisme d'efflux est susceptible d'être impliqué dans cette résistance ce qui aboutit à une diminution de l'accumulation de la tétracycline dans la cellule (Wu *et al.*, 2005).

9.1.5. Lévofloxacine

La lévofloxacine est un antibiotique issu de la famille des fluoroquinolones, inhibiteur de la sous-unité A de l'ADN gyrase bactérienne codée par le gène *gyrA*.

La résistance est liée à la survenue de mutations ponctuelles dans une région particulière du gène *gyrA* : la Quinolone Resistance Determining Region (QRDR) aux niveaux des positions d'acides aminés 87, 88, 91 et 97 (Cattoir *et al.*, 2007 ; Moore *et al.*, 1995 ; Tankovic *et al.*, 2003). Une seule mutation est suffisante pour conférer la résistance. La résistance croisée entre les différentes fluoroquinolones augmente le risque de sélection de souches résistantes à de nouvelles molécules prometteuses (Debets-Ossenkopp *et al.*, 1999 ; Mégraud, 2004).

9.1.6. Rifampicine

La rifampicine inhibe la synthèse de l'ARNm bactérien en se liant à la sous unité β de l'ARN polymérase. Chez *H. pylori* la résistance est due à une mutation ponctuelle au niveau du gène *rpoB* (Heep *et al.*, 1999 ; Heep *et al.*, 2000).

La résistance à la rifampicine reste très rare, puisque elle est utilisée que chez un nombre limité de patients pour traiter les infections mycobactériennes, mais son utilisation pour traiter d'autres infections pourrait conduire à l'émergence de souches résistantes (Heep *et al.*, 2000).

9.2. Schémas thérapeutiques

La sensibilité variable de *H. pylori* aux antibiotiques et les difficultés d'éradication ont conduit à l'élaboration de plusieurs schémas thérapeutiques combinant l'utilisation de deux ou trois médicaments associant un inhibiteur de la pompe à proton (IPP) et/ou sels de bismuth et antibiotiques (Petitgars, 2015).

Les IPP ont une activité inhibitrice directe sur *H. pylori in vitro* (Mégraud et Lehours, 2007) mais utilisés seuls, ils ne permettent pas de l'éradiquer. Leur rôle dans le traitement éradicateur est essentiellement lié à l'augmentation du pH intra-gastrique car la plupart des antibiotiques ne sont pas actifs à pH faible.

L'efficacité clinique du traitement est nettement améliorée lorsqu'ils sont associés à deux ou trois antibiotiques. En effet, une association permet d'augmenter l'efficacité car la diffusion des antibiotiques au site de l'infection est limitée et permet d'éviter la sélection de bactéries résistantes. Ils peuvent être associés différemment selon les schémas thérapeutiques.

9.2.1. Bithérapie

La bithérapie associant un IPP et l'amoxicilline, a fait un retour ces dernières années après avoir été abandonné dans les années 90 au profit des trithérapies, elle vient d'être reprise avec une meilleure efficacité, en raison de l'optimisation du traitement sur une durée de 14 jours, l'augmentation des doses d'IPP et la répartition des doses d'amoxicilline, plus en accord avec sa pharmacocinétique (O'Connor *et al.*, 2015). Un essai randomisé multicentrique chinois réalisé en 2015 chez des patients naïfs a montré qu'une bithérapie à fortes doses, avait une efficacité supérieure (95,3%), par rapport au traitement séquentiel de 10 jours (85,3%) et à la trithérapie standard de 7 jours (80,7%) (Yang *et al.*, 2015). Cette bithérapie était également plus efficace chez les patients ayant déjà eu un traitement d'éradication (Yang *et al.*, 2015).

9.2.2. Trithérapie

La trithérapie standard est un schéma thérapeutique de 7 jours associant IPP-amoxicilline-clarithromycine, ou IPP-clarithromycine -métronidazole en cas de résistance aux β -lactamines. Elle est moins efficace depuis les années 2000, l'allongement de la durée à 14 jours permet une meilleure efficacité. Son efficacité dépend de la résistance aux macrolides, avec des variations importantes selon les pays et l'usage des antibiotiques (Lamarque *et al.*, 2012 ; De Korwin *et al.*, 2014 ; O'Connor *et al.*, 2015 ; Li *et al.*, 2015).

Dans les régions où le taux de résistance à la clarithromycine est élevé (>15%), elle ne doit plus être employée qu'après vérification de la sensibilité à la clarithromycine, qui garantit une bonne efficacité (De Korwin *et al.*, 2014).

Différentes autres combinaisons d'antibiotiques pour la trithérapie existent : la trithérapie associant IPP, amoxicilline et métronidazole dont l'efficacité diminue régulièrement à cause du taux élevé de résistance au métronidazole (Lamouliatte *et al.*, 2003 ; De Korwin et Lehours, 2010) ; la trithérapie utilisant la lévofloxacine à la place de la clarithromycine ont une efficacité variable en fonction des résistances aux quinolones (O'Connor *et al.*, 2015).

9.2.3. Quadrithérapies

Ces traitements probabilistes de 10 à 14 jours combinent, soit un IPP avec 3 antibiotiques (amoxicilline, clarithromycine, et métronidazole), soit un IPP avec le subcitra de Bismuth et 2 antibiotiques (tétracycline et métronidazole) (Malfertheiner *et al.*, 2012 ; Lamarque *et al.*, 2012 ; De Korwin *et al.*, 2014).

▪ La quadrithérapie séquentielle

Elle consiste en 5 jours de traitement avec un IPP et de l'amoxicilline suivi de 5 jours de prise d'IPP avec deux autres antibiotiques (clarithromycine et métronidazole). Deux méta-analyses réalisées en 2013 et en 2015 indiquent une efficacité globale du traitement séquentiel, supérieure à celle de la trithérapie standard en première ligne (Gatta *et al.*, 2013 ; Feng *et al.*, 2016).

▪ La quadrithérapie concomitante

Associe les 3 antibiotiques (amoxicilline, métronidazole et clarithromycine) et l'IPP pendant toute la durée du traitement de 10 à 14 jours (Ren *et al.*, 2014 ; Feng *et al.*, 2016). Cette thérapie a un taux d'éradication de 85 à 94%, et elle semble plus efficace que les autres quadrithérapies non bismuthées. La quadrithérapie concomitante est actuellement utilisée dans les régions où la résistance à la clarithromycine est supérieure à 15% à la place de la trithérapie (Treiber *et al.*, 2002 ; Wang *et al.*, 2015 ; Molina–Infante *et al.*, 2013 ; Malfertheiner *et al.*, 2017).

- **La quadrithérapie hybride**

Cette thérapie associe l'amoxicilline et l'IPP pendant 7 jours suivis de l'amoxicilline, la clarithromycine, le métronidazole et l'IPP pendant 7 jours (Chen *et al.*, 2015). C'est une alternative au traitement concomitant, permettant de réduire la durée des antibiotiques (Wang *et al.*, 2015).

Une étude taiwanaise randomisée en 2015 montre une supériorité du traitement hybride (14 jours) par rapport au traitement séquentiel de 10 jours, avec des taux d'éradication voisins de 90%, et avec une meilleure efficacité en cas de souches résistantes à la clarithromycine (Sardarian *et al.*, 2013 ; Chen *et al.*, 2015).

- **La quadrithérapie bismuthée**

La quadrithérapie bismuthée associant un IPP, le métronidazole, la tétracycline et le sel de bismuth. Elle est difficile à évaluer en raison de posologies différentes et de durée de traitement variant de 7 jours (insuffisante) à 14 jours (O'Connor *et al.*, 2015).

Elle est très efficace en première ligne par rapport à la trithérapie standard de 10 jours, avec un taux d'éradication supérieur à 90% (Malfertheiner *et al.*, 2012 ; Lamarque *et al.*, 2012 ; De Korwin *et al.*, 2014). Cependant, ces effets secondaires semblent plus fréquents et en plus le sel de bismuth n'est pas disponible dans tous les pays (Delchier *et al.*, 2014).

9.3. Les stratégies thérapeutiques recommandées

Le taux de résistance aux antibiotiques de *H. pylori* est en augmentation dans la plupart des régions du monde et contribue à la diminution du taux d'éradication de *H. pylori*. Le traitement d'éradication de première et deuxième ligne est choisi selon la prévalence de la résistance aux antibiotiques dans la région. Cependant, le traitement de troisième ligne doit être choisi selon les résultats de l'étude de sensibilité de la souche aux antibiotiques. Différents schémas thérapeutiques ont été proposés (Malfertheiner *et al.*, 2017).

9.3.1. Traitement de première ligne

Selon les recommandations de Maastricht V, au-delà de 15% de résistance, la trithérapie à base de clarithromycine n'est plus recommandée.

La quadrithérapie bismuthée pendant 14 jours ou quadrithérapie concomitante pendant 14 jours est le traitement alternatif recommandé dans les zones à forte résistance à la clarithromycine.

Dans les zones à faible résistance à la clarithromycine, la trithérapie standard associant un IPP, amoxicilline et clarithromycine pendant 14 jours est recommandée, (amoxicilline remplacé par le métronidazole en cas d'allergie aux β -lactamines).

La résistance à la clarithromycine diminue l'efficacité de la trithérapie et la thérapie séquentielle, la résistance au métronidazole diminue l'efficacité de la thérapie séquentielle, et la double résistance à la clarithromycine et au métronidazole diminue l'efficacité de la thérapie séquentielle, hybride et concomitante (Malfertheiner *et al.*, 2017).

9.3.2. Traitement de deuxième ligne

- Dans les zones à forte résistance à la clarithromycine: une trithérapie associant un IPP, amoxicilline et lévofloxacine pendant 14 jours (faible résistance à la lévofloxacine) est recommandée en cas d'échec de la quadrithérapie bismuthée en première ligne.

- Dans les zones à faible résistance à la clarithromycine: une quadrithérapie bismuthée pendant 14 jours ou trithérapie associant un IPP, amoxicilline et lévofloxacine pendant 14 jours (faible résistance à la lévofloxacine) est recommandée (Malfertheiner *et al.*, 2017).

9.3.3. Traitement de troisième ligne

Après deux échecs thérapeutiques, l'adaptation de la thérapie en fonction de la culture (antibiogramme) et/ou PCR est indispensable avant de débiter un traitement de troisième ligne.

Une trithérapie associant un IPP, amoxicilline, lévofloxacine ou une trithérapie avec la rifampicine est recommandée en 3^{ème} ligne après l'échec de la trithérapie à base de clarithromycine en première ligne et de la quadrithérapie bismuthée en deuxième ligne.

La quadrithérapie bismuthée est recommandée en 3^{ème} ligne après l'échec de la quadrithérapie non bismuthée en première ligne et de la trithérapie avec la lévofloxacine en deuxième ligne. Dans les régions à forte résistance aux fluoroquinolones, une combinaison de bismuth avec d'autres antibiotiques pourrait être utilisée (Malfertheiner *et al.*, 2017).

10. Facteurs associés aux échecs d'éradication

-La mauvaise observance de traitement : le non respect de durée et de posologie de traitement et les éventuels effets indésirables attendus des antibiotiques conduisent à l'inefficacité d'éradication de la bactérie et le développement de résistance aux antibiotiques.

-Le manque d'efficacité des traitements actuels est classiquement attribué à la résistance de *H. pylori* aux antibiotiques. Cette bactérie est naturellement résistante à de nombreux antibiotiques principalement la vancomycine, les glycopeptides, les sulfamides, la polymyxine, le triméthoprime (Mégraud et Lahours, 2007) et sensible aux β -lactamines (sauf cefsulodine), La fosfomycine, les macrolides, les aminoglycosides, les tétracyclines, Le chloramphenicol, les rifampines, les fluoroquinolones, les 5-nitroimidazoles, et les nitrofuranes (Lambert *et al.*, 1986).

H. pylori acquiert la résistance par mutation chromosomique ponctuelle. Cette résistance concerne essentiellement les antibiotiques utilisés dans les protocoles d'éradication de la bactérie. Elle peut exister avant même la mise sous traitement, on parle de résistance primaire ou bien, survenir en cours de traitement: c'est la résistance secondaire.

Les données concernant la résistance aux antibiotiques varient d'un pays à l'autre en raison de politiques de prescription et de consommation d'antibiotiques différentes. Il semble que cette résistance soit liée essentiellement à l'utilisation de ces antibiotiques dans d'autres indications que l'éradication de *H. pylori* (De Francesco *et al.*, 2010).

-Le polymorphisme génétique du cytochrome P450 (CYP2C19) pourrait affecter le métabolisme hépatique de certain IPP et ainsi modifier l'efficacité des traitements combinés utilisant ces antisécrétoirs (De Korwin, 2002).

11. Nouvelles stratégies thérapeutiques

L'émergence de la résistance de *H. pylori* aux antibiotiques et les échecs thérapeutiques d'éradication conduisent à la recherche de nouvelles approches thérapeutiques permettant le contrôle de l'infection à *H. pylori*.

11.1. L'utilisation des suppléments au traitement

▪ Les probiotiques

Les probiotiques sont des micro-organismes vivants (bactéries ou levures). Ils peuvent être ajoutés à l'ensemble des schémas thérapeutiques anti-*H. pylori* (Malfertheiner *et al.*, 2007 ; Guarner *et al.*, 2008).

De nombreuses études suggèrent que différentes souches de probiotiques (*Lactobacillus* sp, *Bifidobacterium* sp, *Saccharomyces* sp...) développent une activité inhibitrice contre *H. pylori*. Elles agissent sur la viabilité de la bactérie et sur son adhérence aux cellules épithéliales et stabiliser la fonction gastrique en diminuant l'inflammation par leur action anti-oxydante et anti-inflammatoire. Or, les probiotiques ne permettent pas l'éradication mais ils maintiennent un taux diminué de bactéries pathogènes dans l'estomac, et combinés aux antibiotiques, ils augmentent le taux d'éradication et entraînent une diminution des effets secondaires gastro-intestinaux. Cependant, aucune étude n'a pu démontrer une éradication complète de la bactérie lors d'une utilisation exclusive de probiotiques (Bergonzelli *et al.*, 2005 ; Gooteland *et al.*, 2006 ; Zheng *et al.*, 2014 ; Vale et Oleastro, 2014).

Récemment, l'utilisation des probiotiques a démontré ces effets bénéfiques dans le traitement d'éradication de *H. pylori*. Cependant, les futures recherches devraient être focalisé sur le mécanisme d'action des probiotiques, la spécificité des souches, les doses et la durée de

traitement, les différences géographiques et l'influence du mode de vie (Malfertheiner *et al.*, 2017).

- **La phytothérapie**

Plusieurs études ont été menées en phytothérapie ; la plupart d'entre elles ont testé *in vitro* l'effet des plantes sur les cultures de *H. pylori*. Certaines de ces plantes semblent très prometteuses pour lutter contre la résistance de *H. pylori* aux antibiotiques, cependant, le mécanisme d'action et les tests *in vivo* des extraits de plantes devraient être abordés par les futures recherches. Le mécanisme d'action anti *H. pylori* de certaines plantes semble inclure l'inhibition des enzymes bactériennes essentielles, tandis que l'action gastroprotectrice semble être liée à la modulation du système immunitaire de l'hôte et / ou à l'atténuation de l'inflammation (Asha *et al.*, 2013 ; Vale et Oleastro, 2014).

11.2. La vaccination

Le développement d'un vaccin est particulièrement nécessaire dans les pays à forte prévalence à l'infection à *H. pylori* ainsi que dans les pays présentant une résistance croissante aux antibiotiques.

La mise au point d'un vaccin est une tâche difficile, en raison du caractère ubiquitaire de *H. pylori*, de la multiplicité des affections digestives associées à l'infection. La recherche d'un vaccin contre *H. pylori* a commencé dès les années 1990 (Vale et Oleastro, 2014).

Plusieurs antigènes ont été identifiés comme des agents potentiels pour l'induction d'une réponse immunitaire : l'uréase, CagA, VacA et la catalase, ils sont reconnus par des anticorps. De ce fait, ces antigènes semblent les meilleurs candidats pour une formulation vaccinale, en particulier l'uréase qui est fortement exprimée par toutes les souches de *H. pylori* (Ayala *et al.*, 2014).

De nombreux essais vaccinaux ont été effectués dans le monde, parmi ces études celle réalisée en Chine sur un groupe d'enfants, c'est un vaccin oral recombinant *H. pylori* utilisant la sous-unité de l'uréase B fusionnée avec l'entérotoxine B thermostable dérivé de *E. coli*.

L'efficacité du vaccin a été évaluée à 71,8%. Les résultats obtenus montrent que ce vaccin pourrait considérablement réduire la prévalence de l'infection à *H. pylori* (Zeng *et al.*, 2015).



*Matériels et
Méthodes*

1. Type d'étude

Il s'agit d'une étude prospective réalisée sur une période de trois ans allant d'avril 2013 à décembre 2015 au Centre Hospitalo-universitaire Benbadis Constantine en collaboration avec le CHU Mustapha Bacha d'Alger (Stage de formation de 3 mois) et le centre de référence Français des Campylobacters et Helicobacters Bordeaux France.

2. Population étudiée

L'étude a inclus des patients symptomatiques adressés au Centre Hospitalo-universitaire Benbadis Constantine au niveau des services : hépato-gastroentérologie et endoscopie digestive, explorations endoscopiques et médecine interne pour une endoscopie digestive haute.

2.1. Critères d'inclusion

- ✓ Patients adultes âgés de 16 ans et plus, des 2 sexes.
- ✓ n'ayant jamais reçu un traitement d'éradication contre *H. pylori*.
- ✓ Le consentement des patients des objectifs de l'étude.

2.2. Critères d'exclusion

- ✓ les patients âgés de moins de 16 ans.
- ✓ Prise d'un traitement d'éradication contre *H. pylori* dans les deux semaines précédant la fibroscopie.
- ✓ Le refus du patient à participer à l'étude.

3. Recueil des données

La collecte des données a été effectuée à l'aide du questionnaire (Annexe 1), des comptes rendus de l'endoscopie digestive et les dossiers médicaux des malades hospitalisés.

4. Etude bactériologique

4.1. Isolement et identification de *Helicobacter pylori*

4.1.1. Prélèvements

La recherche de *H. pylori* a été basée sur des méthodes directes invasives, nécessitant une fibroscopie. Les patients présentant une symptomatologie

gastroduodénale évocatrice, se présentaient à jeun pour subir une endoscopie digestive haute.

Deux prélèvements biopsiques de muqueuse gastrique sont réalisés au niveau de l'antrum pour chaque patient à l'aide de pince à biopsies stérile.

Les biopsies prélevées sont placées dans 1ml de sérum physiologique stérile à 0,9% pour l'étude bactériologique et moléculaire.

Le matériel d'endoscopie (fibroscope et pince) est nettoyé entre chaque examen dans une solution de steranos à 2% (solution de glutaraldéhyde). Après désinfection, le matériel est rincé.

4.1.2. Transport et conservation des biopsies

H. pylori est une bactérie fragile nécessitant des conditions de transport et de conservation particulières.

Les biopsies récupérées ont été transportées et conservées :

- Dans du sérum physiologique à 4 °C, pour une durée de 4 heures (le délai entre le prélèvement et la réalisation de l'examen ne doit pas dépasser 4 heures).
- Dans du BHIB (Brain Heart Infusion Broth) glycérolé à 25%, pour un temps indéterminé (au delà de 4 heures) et les stocker à -70 °C jusqu'à la culture.

4.1.3. Examen bactériologique standard

Cette partie a pour but d'isoler et d'identifier des souches *Helicobacter pylori*, impliquées dans diverses pathologies gastroduodénales à partir des biopsies gastriques antrales. Les isolats sont utilisés pour tester la sensibilité et la résistance aux antibiotiques.

4.1.3.1. Broyage des biopsies

Avant la mise en culture, les biopsies doivent être broyées pour permettre la dispersion des germes. Il existe deux types de broyage : le broyage manuel et le broyage mécanique qui donne le meilleur résultat de dispersion et de libération des germes.

Dans cette étude le broyage manuel des biopsies avec un scalpel a été utilisé.

La biopsie a été dilacérée avec un scalpel sur une lame stérile placée dans une boîte de Pétri stérile. A l'issue du broyage, les fragments obtenus sont soumis simultanément à trois traitements à savoir le test à l'uréase, le frottis coloré et la mise en culture.

- **Test à l'uréase**

Il est réalisé en déposant un fragment du broyat dans un tube à essai contenant 1 ml de milieu urée-indole et incubé à 37 °C pendant 24h. Ce milieu contient un indicateur coloré qui est le rouge de phénol. La présence de *H. pylori* dans l'échantillon test se manifeste par le virage colorimétrique du milieu de jaune au rose violacé.

- **Frottis coloré**

Un autre fragment biopsique du broyat a été étalé sur une lame propre en présence d'une goutte d'eau physiologique. Après séchage, La coloration a été faite par la Méthode de Gram. La lecture des frottis est réalisée au microscope optique (X100).

La présence de *H. pylori* à la surface de l'épithélium de la muqueuse gastrique est révélée par l'observation des bacilles de forme hélicoïdale, longues, colorés en rose (Gram négatif).

- **Mise en culture**

Le restant du broyat de chaque biopsie est ensemencé sur milieu solide à base Columbia supplémenté de 10% de sang frais humain, des vitamines (PVX-M, Biomérieux) et du supplément sélectif appelé (*Helicobacter pylori* selective supplement (Dent) (oxoid), SR0147E) contenant des antibiotiques (vancomycine (5mg), triméthoprime (2,5mg), cefsulodine (2,5mg), amphotericine B (2.5mg) qui permet d'inhiber la croissance de contaminants.

Les boites de Pétri ont été placées dans une jarre étanche contenant deux sachets générateurs d'atmosphère microaérophile (Genbox microaer, Biomérieux) et incubées à 37 °C à l'étuve pendant 5 à 7 jours.

Les cultures sont examinées tous les deux jours à partir du 3ème jour, puis réincubées avec un nouveau générateur de microaérophilie. Cette primoculture permet d'isoler les colonies suspectes de *H. pylori*, mais un réisolement en subculture sur milieu Columbia additionné du sang frais et des vitamines sans l'ajout du supplément est nécessaire pour obtenir des cultures riches. L'incubation des cultures négatives a été prolongée jusqu'à 12 jours.



Figure 21 : Système d'incubation des bactéries en atmosphère microaérobie (photo de l'étude)

4.1.4. Identification des isolats

L'identification de *H. pylori* est basée sur la vérification de la pureté des souches ainsi que leurs caractéristiques biochimiques.

4.1.4.1. Vérification de la pureté des souches

➤ **Examen macroscopique**

Après incubation, un examen macroscopique a été réalisé à partir des cultures bactériennes obtenues, il consiste à étudier l'aspect et les dimensions des colonies suspectes.

➤ **Examen microscopique**

Un frottis bactérien a été préparé à partir des colonies suspectes en suspension, après fixation et coloration par la méthode de Gram, une observation microscopique est effectuée au microscope optique afin de rechercher la présence des formes typiques de *H. pylori*.

4.1.4.2. Caractéristiques biochimiques

L'identification de *H. pylori* par les tests biochimiques est basée essentiellement sur la recherche de l'activité uréasique, de l'oxydase et de la catalase. À l'aide d'une pipette Pasteur quelques colonies ont été prélevées et déposées dans un tube à essai contenant le milieu urée-indole, sur un disque oxydase imprégné d'eau et dans une goutte d'eau oxygénée (H_2O_2) à 10 volumes. La lecture des résultats se fait immédiatement.

Pour détecter la présence d'autres enzymes spécifiques à *H. pylori* telle que la γ -glutamyl transférase, la phosphatase alcaline et la nitrate réductase, des galeries d'identification biochimiques Api Campy® (BioMérieux) ont été utilisées.

4.2. Antibiogramme

La sensibilité et la résistance des souches de *H. pylori* isolées aux antibiotiques a été testée par la réalisation de l'antibiogramme. Cette technique est basée sur deux méthodes phénotypiques de diffusion en milieu gélosé :

-La méthode de disques en utilisant les antibiotiques suivants :

- Clarithromycine (CLR) (disque de 15µg)
- Métronidazole (MTR) (disque de 4µg)
- Amoxicilline (AMX) (disque de 25µg)
- Ciprofloxacine (Cip) (disque de 5µg)

-La méthode d'E-test en utilisant la clarithromycine (CH), le métronidazole (MZ) et l'amoxicilline (AMX).

Une suspension bactérienne dense (3-4 unités Mac Ferland) est préparée en sérum physiologique stérile (2ml) à partir d'une culture de 48 h. Ensuite, le milieu Mueller-Hinton (gélose) supplémenté de 10% de sang frais humain et des vitamines est ensemencé par un écouvillon stérile plongé dans la suspension dans trois directions. Puis, les disques et les bandelettes E-test correspondants aux antibiotiques à tester y sont déposés. L'incubation s'effectue à 37 °C pendant 72 heures en microaérobiose. La lecture des résultats s'effectue par la mesure des diamètres de zone d'inhibition apparue autour des disques et la détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI).

L'interprétation des résultats de l'antibiogramme est réalisée selon les recommandations de l'EUCAST (<http://www.eucast.org>) :

- Clarithromycine : R > 0,5 µg/ml, S ≤ 0,25 µg/ml
- Métronidazole : R > 8 µg/ml, S ≤ 8 µg/ml ;
- Amoxicilline : R > 0,125 µg/ml, S ≤ 0,125 µg/ml.

Les diamètres des zones d'inhibition sont interprétés selon les valeurs suivantes :

- Clarithromycine: R < 17 mm, S > 22 mm
- Ciprofloxacine: R < 17 mm, S > 20 mm
- Amoxicilline: R < 17 mm, S >20 mm
- Métronidazole : R < 17 mm, S > 21 mm

4.3. Conservation des isolats

Une suspension bactérienne très dense de la souche isolée de *H. pylori* est préparée à partir des cultures 48h, la totalité de la boîte est raclée à l'aide d'un

écouvillon en coton stérile et ensemencée dans des microtubes contenant 1ml de milieu BHIB glycérolé à 25%. Les microtubes ont été conservés dans des boîtes à -80 °C.

5. Etude moléculaire

5.1. Extraction d'ADN

Un fragment biopsique destiné à l'analyse moléculaire est récupéré après décongélation, puis transféré dans un tube conique stérile. 180 µl de tampon de lyse tissulaire (Qiagen SA, Courtaboeuf, France) et 20 µl de protéinase K (Qiagen) sont ajoutés au tube respectivement, afin de subir une digestion enzymatique. Ensuite, le tube est incubé sous agitation dans un appareil thermomixer compact à 56 °C et à 1000 tours/minute toute la nuit.

L'extraction d'ADN est réalisée à l'aide de l'automate d'extraction "MagNA Pure LC DNA isolation kit I" (Qiagen). L'ADN extrait est récupéré dans un tube de 1,5 ml étiqueté et congelé à -20 °C.

5.2. Détection de l'infection à *H. pylori* et les mutations associées à la résistance à la clarithromycine par PCR en temps réel

La PCR en temps réel sur biopsies gastriques ou sur les colonies permet de détecter la présence de *H. pylori* et en même temps les éventuelles mutations de résistance à la clarithromycine (Fig. 22).

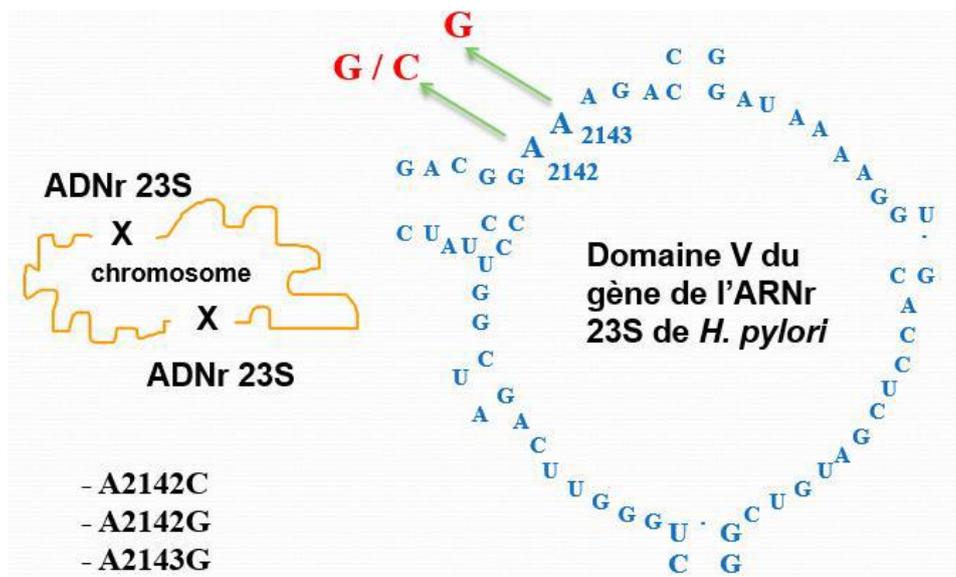


Figure 22 : Mutations de domaine V de gène de l'ARN r 23 S de *H. pylori* conférant la résistance à la clarithromycine (Mégraud et Lahours,2007).

Cette technique repose sur le principe FRET qui consiste en l'amplification d'un fragment du gène de l'ARNr 23S de *H. pylori* (la détection de la présence de *H. pylori*). Cette amplification est couplée à la détection simultanée de l'amplicon grâce à l'hybridation de sondes. Lorsque la sonde d'ancrage se fixe, il ya transfert d'énergie sur la sonde de détection avec émission de signal (Fig.23), suivie de l'analyse de la courbe de fusion qui permet la détection des mutations liées à la résistance à la clarithromycine (Fig. 24) (Oleastro *et al.*, 2003).

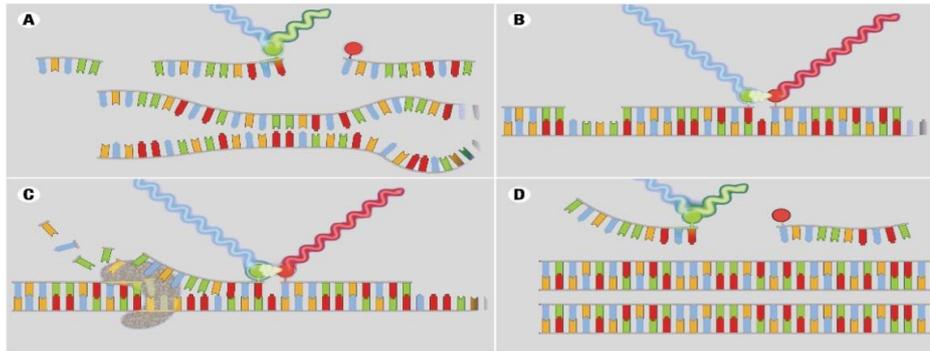


Figure 23: Principe de la PCR en temps réel FRET de détection de *H. pylori*

A : Dénaturation B : Hybridation C et D : Elongation

En absence de mutation, l'hybridation des sondes est parfaite et la température de fusion des sondes est maximale (génotype sauvage ou wild type). Mais en présence de mutation, l'hybridation n'est pas parfaite du fait d'un mésappariement, et la température de fusion est plus faible (génotypes mutés A2142G, A2142C, A2143G) (Fig. 24).

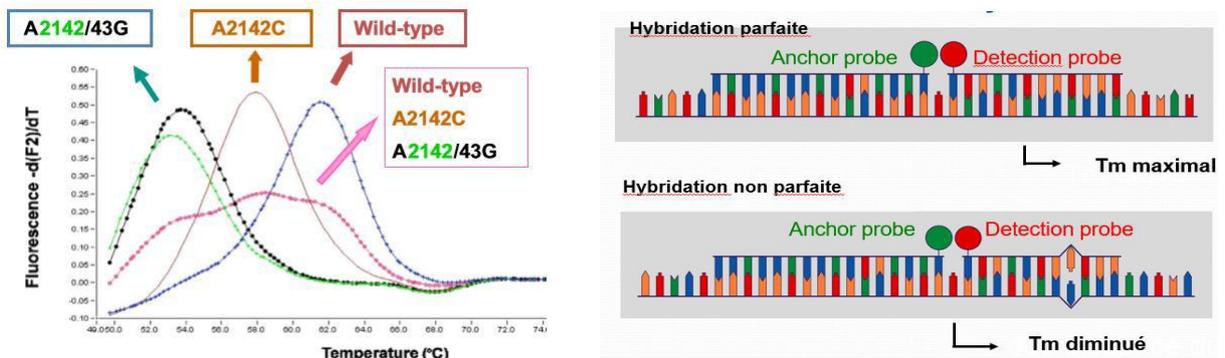


Figure 24 : Hybridation des sondes et détection de la résistance à la clarithromycine

-La PCR en temps réel est réalisée à l'aide du thermocycleur Light Cycler 1.5 (Roche), les amorces, sondes et protocole utilisés sont présentés dans les Tableaux 4 et 5.

Tableau 4: Séquences des amorces et sondes pour la détection de *H. pylori* et les mutations associées à la résistance à la clarithromycine par PCR en temps réel (Ménard *et al.*, 2002 ; Oleastro *et al.*, 2003)

Amorces et sondes	Séquences
Amorce HPY-S	5'-AGGTTAAGAGGATGCGTCAGTC-3'
Amorce HPY-A	5'-CGCATGATATTCCCATTAGCAGT-3'
Sonde HPY-RED	5'-GGCAAGACGGAAAGACC-3'
Sonde ANC-FL	5'-TGTAGTGGAGGTGAAAATTCCTCCTACCC-3'

Tableau 5 : Protocole de PCR en temps réel pour la détection de *H. pylori* et les mutations associées à la résistance à la clarithromycine

Réactifs	Volume (µl) pour un échantillon
Eau pure	4,98
MgCl ₂ 25 mM	0,66
HpyA (20 µM)	0,20
HpyS (20µM)	0,20
HpyRED (20µM)	0,08
Anc FL (20µM)	0,08
Enzyme tp10X	0,80
Matrice (ADN)	1,00
Volume final	8,00

5.3. Contrôle de l'extraction d'ADN par la détection de la hGAPDH

Un contrôle de l'extraction d'ADN a été réalisé pour tous les échantillons qui ont été négatif ou ayant un CT (cycle seuil) supérieur à 36 en PCR en temps réel. Le contrôle consiste à détecter le gène codant la Glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase humaine (hGAPDH) par PCR en temps réel de type Syber Green I. Le protocole de détection est présenté dans le Tableau 6.

Tableau 6: Protocole de PCR en temps réel de détection de la hGAPDH

Réactifs	Volume (µl) pour un échantillon
Eau pure	6,60
MgCl ₂ 25 mM	0,60
hGAPDH F1 (10 µM)	0,40
hGAPDH R1 (10 µM)	0,40
Mix Enzyme 10X	1,00
Matrice (ADN)	1,00
Volume final	10,00

5.4. Détermination des mutations associées à la résistance à la tétracycline

La détection de mutations au niveau du gène de l'ARNr 16S de *H. pylori* liées à la résistance à la tétracycline est effectuée en trois étapes :

- **PCR FRET**

La PCR se déroule selon le protocole décrit par Glocker (Glocker *et al.*, 2005), en utilisant 3 sondes:

- une sonde d'ancrage : 16S-Anc couplée à la fluorescéine (nt 975-946).
- deux sondes de détection couvrant les nucléotides 943 à 923 :
 - 16S-AGA-S couplée au Red640 et phosphorylée en 3' correspondant au génotype sauvage.
 - 16S-TTC-Sensor couplée au Red705 et phosphorylée en 3' correspondant au génotype muté.

-Les amorces et le protocole utilisés sont présentés dans les Tableaux 7 et 8.

Tableau 7 : Séquences des amorces du gène de l'ARNr 16S de *H. pylori*

Amorces	Séquences
16S-880fw	5'-ATAGACGGGGACCCGCACAAG-3'
16S-999rv	5'-TGGCAAGCCAGACTCCA-3'

Tableau 8 : Protocole de PCR FRET du gène de l'ARNr 16S de *H. pylori*

Réactifs	Volume (µl) pour un échantillon
Eau pure	3,20
MgCl ₂ 25 mM	0,825
16S-880fw (10 µM)	0,50
16S-999rv (10 µM)	0,50
16S-Anc 2µM	1,00
16S-TTC sensor 2µM	1,00
16S-AGA sensor 2µM	1,00
Enzyme tp 10X	1,00
Matrice (ADN)	1,00
Volume final	10,00

-La PCR FRET nous a permis la détection simultanée du produit de PCR et des courbes avec les températures de fusion qui sont soumis à l'analyse par le Lightcycler.

- **PCR classique**

Tableau 9 : Protocole de PCR classique du gène de l'ARNr 16S

Réactifs	Volume (µl) pour un échantillon
Eau pure	19,00
Tampon 5X	8,00
MgCl ₂ 25 mM	4,00
dNTP(10mM)	0,80
16S-880fw (25 µM)	2,00
16S-999rv (25 µM)	2,00
GoTaq	0,20
Matrice (ADN)	4,00
Volume final	40,00

Le programme

94 °C - 5min
94 °C - 30 sec
58 °C - 30 sec
72 °C - 20 sec
72 °C - 20 sec

x 35

-La migration du produit PCR est effectuée sur gel d'agarose à 2% pendant 25 minutes.

▪ **Purification d'ADN par chromatographie**

La purification d'ADN est réalisée par chromatographie d'exclusion en gel de séphacryl S300 selon les étapes suivantes :

- Homogénéiser le tube contenant le séphacryl de façon à avoir une seule phase.
- Déposer 700 µl de séphacryl dans une colonne propre adaptée sur un tube Eppendorf collecteur de 2 ml.
- Centrifuger 1 min à 3000 tr/min.
- Jeter l'éluat et déposer la colonne dans un nouveau tube Eppendorf 1.5 ml.
- Déposer le produit de PCR au milieu de la résine sans la toucher.
- Centrifuger 2 min à 3000 tr/min.
- Récupérer l'éluat.
- Jeter le séphacryl et recycler la colonne.
- Migration : ADN (5 µl) ; Gel à 2% ; durée 25 minutes pour vérifier la présence des bandes d'ADN.

▪ **Le séquençage du gène ARNr 16S**

Tableau 10 : Protocole de séquençage du gène ARNr 16S

		F1	R1
H₂O	qsp 20µl	13	13
BigDye® Terminator v3,1 Cycle sequencing kit (Applied Biosystem Réf : 4336774)	1	1	1
BigDye® Terminator v1,3 - 5X sequencing buffer (Applied Réf: 4336697)	4	4	4
Amorce (3,2 µM)	3,2 pmol	1	1
ADN S300* (A changer directement sur le fichier)	X µl	1	1
Volume final		20	20

Le programme

96 °C - 1 min
96 °C - 10 sec
50 °C - 5 sec
60 °C - 4 min
4 °C

x 25

-F1 (amorce sens) : 16S-880fw 25µM

-R1 (amorce antisens) : 16S-999rv 25Mm

5.5. Détermination des mutations associées à la résistance aux quinolones

La détection des mutations au niveau de la région QRDR (Quinolone Resistant Determination Region) du gène *gyrA* est réalisée en suivant la technique décrite par (Rimbara *et al.*, 2012).

- **Amplification par PCR**

Tableau 11 : Séquences des amorces de la région QRDR du gène *gyrA*

Amorces	séquences
F-QRDR	5-GCAAATTGTCATCTTGGCT-3'
R-QRDR	5-CTTCGCCCATCACTCTAGA-3'

Tableau 12 : Amplification de la région QRDR du gène *gyrA*

Réactifs	Volume (µl) pour un échantillon	Le programme	
Eau pure	19,00	95 °C - 2 min	x 40
Tampon 5X	8,00	95 °C - 30 sec	
MgCl ₂ 25 mM	4,00	58 °C - 30 sec	
dNTP(10mM)	0,80	72 °C - 30 sec	
F-QRDR (10 µM)	2,00	72 °C - 5 min	
R-QRDR (10 µM)	2,00		
GoTaq G2	0,20		
Matrice (ADN)	4,00	Taille attendue 300pb	
Volume final	40,00		

-L'amplification du produit de PCR est vérifiée par migration sur gel d'agarose à 2% pendant 25 min.

- **La purification d'ADN par chromatographie**

La purification de l'ADN est réalisée par chromatographie d'exclusion en gel de séphacryl S400 selon les étapes suivantes :

-Homogénéiser le tube contenant le séphacryl de façon à avoir une seule phase.

- Déposer 700µl de séphacryl dans une colonne propre adaptée sur un tube Eppendorf collecteur de 2ml.
- Centrifuger 1 min à 3000 tr/min .
- Jeter l'éluat et déposer la colonne dans un nouveau tube Eppendorf 1.5 ml.
- Déposer le produit de PCR au milieu de la résine sans la toucher.
- Centrifuger 2 min à 3000 tr/min.
- Récupérer l'éluat.
- Jeter le séphacryl et recycler la colonne.
- Migration : ADN (5 µl) ; Gel à 2% ; durée 25 minutes pour vérifier la présence des bandes d'ADN.

▪ **Le séquençage de la région QRDR**

Tableau 13 : Protocole de séquençage de la région QRDR du gène *gyrA*

		F1	R1
H ₂ O	qsp 20µl	13	13
BigDye® Terminator v3,1 Cycle sequencing kit (Applied Biosystem Réf : 4336774)	1	1	1
BigDye® Terminator v1,3 - 5X sequencing buffer (Applied Réf: 4336697)	4	4	4
Amorce (3,2 µM)	3,2 pmol	1	1
ADN S400* (A changer directement sur le fichier)	X µl	1	1
Volume final		20	20

Le programme

96 °C -1 min	x 25
96 °C -10 sec	
50 °C - 5 sec	
60 °C - 4 min	
4°C	

-F1 (amorce sens) : QRDR-Hpylo

-R1 (amorce antisens) : QRDR-Hpylo

➤ **L'analyse des séquences**

L'analyse des séquences est effectuée à l'aide du logiciel DNA Baser et l'obtention des séquences d'acides aminés par le logiciel Mult Aline.

Les séquences d'acides aminés obtenues ont été comparées avec une séquence de référence (...PYFQIAYKKSARIVGDVIGKYHPHGDNAVYDALVRMAQDFSMR LELVDGQGNGFSIDGDNAAMRYTEAR...).

La présence de l'asparagine N (en position 87) et de l'aspartate (D) en position 91 indique un génotype sauvage (souche sensible aux fluoroquinolones).

La substitution de l'asparagine par la lysine en position 87 correspond à un génotype muté, de même Le remplacement de l'asparagine (en position 87) et/ou l'aspartate (en position 91) correspond aussi à un génotype muté (souche résistante aux fluoroquinolones).

5.6. Détection des facteurs de pathogénicité

5.6.1. PCR *cagA* site vide

Une amplification par PCR est réalisée pour détecter la présence de l'îlot de pathogénicité *cag* de *H. pylori*.

Tableau 14 : Séquences des amorces du gène *cagA* site vide (Occhialini *et al.*, 2001)

Amorces	séquences
F1-468-HP519	5'-GCTTGCTTGTATTGGCCTTG-3'
R1-496-HP549	5'-GCATGCACATTCCCTAAAGTG-3'

Tableau 15 : Protocole de PCR *cagA* site vide

Réactifs	Volume (µl) pour un échantillon
Eau pure	13,125
Tampon 5X	5,00
MgCl ₂ 25 mM	2,00
dNTP(10mM)	0,25
F1-468-HP519 (10 µM)	1,00
R1-496-HP549 (10 µM)	1,00
GoTaq G2	0,125
Matrice (ADN)	2,5
Volume final	25

Le programme

95 °C - 2 min
95 °C - 30 sec
58 °C - 30 sec
72 °C - 30 sec
72 °C - 5 min

x40

-La migration est réalisée sur gel d'agarose à 2% pendant 25 minutes. La présence de l'îlot de pathogénicité est vérifiée par l'absence de bande d'ADN. L'apparition d'une bande d'ADN de 324pb indique l'absence du gène.

5.6.2. Motifs de phosphorylation

Les motifs de phosphorylation P1, P2, P3 ont été recherchés par PCR sur les échantillons *cagPAI* positifs. Les amorces et les protocoles utilisés sont présentés dans les tableaux 16-21 (Argent *et al.*, 2005).

➤ Motif de phosphorylation P1

Tableau 16 : Séquences des amorces du motif de phosphorylation P1

Amorces	séquences
cagA28F	5'-TTCTCAAAGGAGCAATTGGC-3'
cagA-P1C	5'-GTCCTGCTTTCTTTTTATTA ACTTKAGC-3'

Tableau 17: Protocole de la PCR du motif de phosphorylation P1

Réactifs	Volume (µl) pour un échantillon
Eau pure	12,375
Tampon 5X	5,00
MgCl ₂ 25 mM	2,00
dNTP(10mM)	0,50
cagA28F (10 µM)	1,25
cagA-P1C (10 µM)	1,25
GoTaq G2	0,125
Matrice (ADN)	2,5
Volume final	25

Le programme

95 °C - 2 min	X35
95 °C - 30 sec	
57 °C - 30 sec	
72 °C - 20 sec	
72 °C - 5 min	

Taille attendue : P1 = 264 pb

Gel 2%

➤ **Motif de phosphorylation P2**

Tableau 18 : Séquences des amorces du motif de phosphorylation P2

Amorces	séquences
cagA28F	5'-TTCTCAAAGGAGCAATTGGC-3'
cagA-P2CG	5'-TTTAGCAACTTGAGCGTAAATGGG-3'
cagA-P2TA	5'-TTTAGCAACTTGAGTATAAATGGG-3'

Tableau 19 : Protocole de la PCR du motif de phosphorylation P2

Réactifs	Volume (µl) pour un échantillon	Le programme							
Eau pure	11,125	<table border="1"> <tr> <td>95 °C - 2 min</td> <td rowspan="4">X35</td> </tr> <tr> <td>95 °C - 30 sec</td> </tr> <tr> <td>57 °C - 30 sec</td> </tr> <tr> <td>72 °C - 25 sec</td> </tr> <tr> <td>72 °C - 5 min</td> <td></td> </tr> </table>	95 °C - 2 min	X35	95 °C - 30 sec	57 °C - 30 sec	72 °C - 25 sec	72 °C - 5 min	
95 °C - 2 min	X35								
95 °C - 30 sec									
57 °C - 30 sec									
72 °C - 25 sec									
72 °C - 5 min									
Tampon 5X	5,00								
MgCl ₂ 25 mM	2,00								
dNTP(10mM)	0,50								
cagA28F (10 µM)	1,25								
cagA-P2CG (10 µM)	1,25								
cagA-P2TA (10 µM)	1,25								
GoTaq G2	0,125								
Matrice (ADN)	2,5								
Volume final	25								

Taille attendue : P2 = 309 pb
Gel 2%

➤ **Motif de phosphorylation P3**

Tableau 20 : Séquences des amorces du motif de phosphorylation P3

Amorces	séquences
cagA28F	5'-TTCTCAAAGGAGCAATTGGC-3'
cagA-P3E	5'-ATCAATTGTAGCGTAAATGGG-3'

Tableau 21: Protocole de la PCR du motif de phosphorylation P3

Réactifs	Volume (µl) pour un échantillon	Le programme							
Eau pure	12,375	<table border="1"> <tr> <td>95 °C - 2 min</td> <td rowspan="4">X45</td> </tr> <tr> <td>95 °C - 30 sec</td> </tr> <tr> <td>57 °C - 30 sec</td> </tr> <tr> <td>72 °C - 50 sec</td> </tr> <tr> <td>72 °C -5 min</td> <td></td> </tr> </table> <p>-Taille attendue : C= 468 pb, CC= 570 pb, CCC= 672 pb) - Gel 2%</p>	95 °C - 2 min	X45	95 °C - 30 sec	57 °C - 30 sec	72 °C - 50 sec	72 °C -5 min	
95 °C - 2 min	X45								
95 °C - 30 sec									
57 °C - 30 sec									
72 °C - 50 sec									
72 °C -5 min									
Tampon 5X	5,00								
MgCl ₂ 25 mM	2,00								
dNTP(10mM)	0,50								
cagA28F (10 µM)	1,25								
cagA-P3E (10 µM)	1,25								
GoTaq G2	0,125								
Matrice (ADN)	2,5								
Volume final	25								

5.6.3. PCR *vacA* régions *s* et *m*

Une PCR *vacA* régions *s* et *m* est réalisée pour détecter le gène *vacA* (*s1*, *s2* et *m1*, *m2*). Les amorces et le protocole utilisés sont présentés dans les Tableaux 22 et 23 (Atherton *et al.*, 1995 ; Atherton *et al.*, 1999).

Tableau 22 : Séquences des amorces du *vacA* régions *s* et *m*

	Amorces	séquences
Région s	VA1F	5'-ATGGAAATACAACAAACACAC-3'
	VA1R	5'-CTGCTTGAATGCGCCAAAC-3'
Région m	VAGF	5'-CAATCTGTCCAATCAAGCGAG-3'
	VAGR	5'-GCGTCAAATAATTCCAAGG-3'

Tableau 23 : Protocole de la PCR *vacA* régions *s* et *m*

Réactifs	Volume (µl) pour un échantillon	Le programme					
Eau pure	9,375		<table border="1"> <tr> <td>94 °C - 2 min</td> </tr> <tr> <td>94 °C - 30 sec</td> </tr> <tr> <td>60 °C - 30 sec</td> </tr> <tr> <td>72 °C - 50 sec</td> </tr> <tr> <td>72 °C - 5 min</td> </tr> </table> <p>X35</p> <p>-Taille attendue :</p> <p>-s1= 259 pb, s2= 286 pb</p> <p>-m1= 567 pb, m2= 642 pb</p>	94 °C - 2 min	94 °C - 30 sec	60 °C - 30 sec	72 °C - 50 sec
94 °C - 2 min							
94 °C - 30 sec							
60 °C - 30 sec							
72 °C - 50 sec							
72 °C - 5 min							
Tampon 5X	5,00						
MgCl ₂ 25 mM	2,00						
dNTP(10mM)	0,50						
VA1F (10 µM)	1,75						
VA1R (10 µM)	1,75						
VAGF (10 µM)	1,75						
VAGR (10 µM)	1,75						
GoTaq G2	0,125						
Matrice (ADN)	1,0						
Volume final	24						

5.6.4. *vacA* régions *sla*, *slb* et *slc*

La recherche des régions *sla*, *slb* et *slc* du gène *vacA* est effectuée par PCR sur les échantillons *vacA sl*. Les amorces et les protocoles utilisés sont présentés dans les Tableaux 24 -29 (Van Doorn *et al.*, 1998).

Tableau 24 : Séquences des amorces de *vacA* région *sla*

Amorces	séquences
Forward	5'-GTCAGCATCACACCGCAAC-3'
Reverse	5'-CTGCTTGAATGCGCCAAC-3'

Tableau 25: Protocole de la PCR du *vacA* région *s1a*

Réactifs	Volume (µl) pour un échantillon
Eau pure	14,85
Tampon 5X	5,00
MgCl ₂ 25 mM	2,00
dNTP(10mM)	0,50
<i>vacA</i> s1a F (10 µM)	1,75
<i>vacA</i> s1a R (10 µM)	1,75
GoTaq G2	0,125
Matrice (ADN)	1,0
Volume final	24

Le programme

94 °C - 2 min
94 °C - 30 sec
60 °C - 30 sec
72 °C - 30 sec
72 °C - 5 min

X35

-Taille attendue : 190 pb.

-Gel 2%

Tableau 26 : Séquences des amorces du *vacA* région *s1b*

Amorces	séquences
Forward	5'-AGCGCCATACGGCAAGAG-3'
Reverse	5'-CTGCTTGAATGCGCCAAAC-3'

Tableau 27: Protocole de la PCR *vacA* région *s1b*

Réactifs	Volume (µl) pour un échantillon
Eau pure	14,85
Tampon 5X	5,00
MgCl ₂ 25 mM	2,00
dNTP(10mM)	0,50
<i>vacA</i> s1b F (10 µM)	1,75
<i>vacA</i> s1b R (10 µM)	1,75
GoTaq G2	0,125
Matrice (ADN)	1,0
Volume final	24

Le programme

94 °C - 2 min
94 °C - 30 sec
60 °C - 30 sec
72 °C - 30 sec
72 °C - 5 min

X35

-Taille attendue : 187 pb

-Gel 2%

Tableau 28 : Séquences des amorces du *vacA* région *s1c*

Amorces	séquences
Forward	5'-TTAGTTTCTCTCGCTTTAGTRGGGYT-3'
Reverse	5'-CTGCTTGAATGCGCCAAAC-3'

Tableau 29: Protocole de la PCR *vacA* région *s1c*

Réactifs	Volume (µl) pour un échantillon	Le programme
Eau pure	14,85	94 °C - 2 min
Tampon 5X	5,00	94 °C - 30 sec
MgCl ₂ 25 mM	2,00	60 °C - 30 sec
dNTP(10mM)	0,50	72 °C - 30 sec
<i>vacA</i> s1c F (10 µM)	1,75	72 °C - 5 min
<i>vacA</i> s1c R (10 µM)	1,75	
GoTaq G2	0,125	
Matrice (ADN)	1,0	
Volume final	24	

-Taille attendue : 220 pb
-Gel 2%

5.6.5. *vacA* régions *i1*, *i2*

La recherche des allèles *i1* et *i2* du gène *vacA* est effectuée par PCR. Les amorces et les protocoles utilisés sont présentés dans les Tableaux 30-33 (Rhead *et al.*, 2007) :

Tableau 30 : Séquences des amorces du *vacA* *i1*

Amorces	séquences
VacF1	5'-GTTGGGATTGGGGGAATGCCG-3'
C1R	5'-TTAATTTAACGCTGTTTGAAG-3'

Tableau 31 : Protocole de la PCR *vacA i1*

Réactifs	Volume (µl) pour un échantillon	Le programme									
Eau pure	12,875	<table border="1"> <tr> <td>94 °C - 2 min</td> <td rowspan="3">X35</td> </tr> <tr> <td>94 °C - 30 sec</td> </tr> <tr> <td>58 °C - 30 sec</td> </tr> <tr> <td>72 °C - 40sec</td> <td></td> </tr> <tr> <td>72 °C - 5 min</td> <td></td> </tr> </table> <p>-Taille attendue : 426 pb</p> <p>-Gel 2%</p>		94 °C - 2 min	X35	94 °C - 30 sec	58 °C - 30 sec	72 °C - 40sec		72 °C - 5 min	
94 °C - 2 min	X35										
94 °C - 30 sec											
58 °C - 30 sec											
72 °C - 40sec											
72 °C - 5 min											
Tampon 5X	5,00										
MgCl ₂ 25 mM	2,00										
dNTP(10mM)	0,50										
vac F1 (10 µM)	1,75										
C1R (10 µM)	1,75										
GoTaq G2	0,125										
Matrice (ADN)	1,0										
Volume final	24										

Tableau 32 : Séquences des amorces du *vacA i2*

Amorces	séquences
VacF1	5'-GTTGGGATTGGGGGAATGCCG-3'
C2R	5'-GATCAACGCTCTGATTTGA-3'

Tableau 33: Protocole de la PCR *vacA i2*

Réactifs	Volume (µl) pour un échantillon	Le programme									
Eau pure	12,875	<table border="1"> <tr> <td>94 °C - 2 min</td> <td rowspan="3">X35</td> </tr> <tr> <td>95 °C - 30 sec</td> </tr> <tr> <td>57 °C - 30 sec</td> </tr> <tr> <td>72 °C - 40 sec</td> <td></td> </tr> <tr> <td>72 °C - 5 min</td> <td></td> </tr> </table> <p>-Taille attendue : 432 pb</p> <p>-Gel 2%</p>		94 °C - 2 min	X35	95 °C - 30 sec	57 °C - 30 sec	72 °C - 40 sec		72 °C - 5 min	
94 °C - 2 min	X35										
95 °C - 30 sec											
57 °C - 30 sec											
72 °C - 40 sec											
72 °C - 5 min											
Tampon 5X	5,00										
MgCl ₂ 25 mM	2,00										
dNTP(10mM)	0,50										
vac F1 (10 µM)	1,75										
C2R (10 µM)	1,75										
GoTaq G2	0,125										
Matrice (ADN)	1,0										
Volume final	24										



Résultats

1. Caractéristiques générales des patients

Dans cette étude, 135 biopsies ont été collectées auprès de 135 patients âgés de 16 à 84 ans, 69 étaient de sexe féminin (51,1%) et 66 de sexe masculin (48,8%), dont 116 soit (86%) étaient dirigés au service par les médecins externes et 19 (14%) étaient hospitalisés.

Le pyrosis et les douleurs épigastriques étaient les symptômes majeurs chez les patients qui nécessitent la demande de la fibroscopie. Les résultats de la fibroscopie sont présentés dans le Tableau 34.

Tableau 34 : Résultats de l'aspect endoscopique des patients

Aspect endoscopique	Nombre (N°)	Pourcentage (%)
Muqueuse normale	33	24,4
Gastrite chronique	90	66,6
Ulcère gastrique	4	2,9
Adénocarcinome gastrique	3	2,2
Bulbite (bulbo-duodénite érosive et hémorragique)	5	3,7
Total	135	100

2. La mise en évidence de la présence de *H. pylori*

2.1. Le frottis coloré et l'uréase test

L'observation de longs bacilles colorés en rose (Gram négatif) de forme hélicoïdale, indique la présence de *H. pylori* et rend donc le diagnostic sur frottis spécifique et de sensibilité proche de celle de la culture (Fig. 25).

Après incubation de 24 h, le virage colorimétrique du milieu vers le rose violacé, indique la présence de l'activité uréasique spécifique à *H. pylori* (Fig. 25).

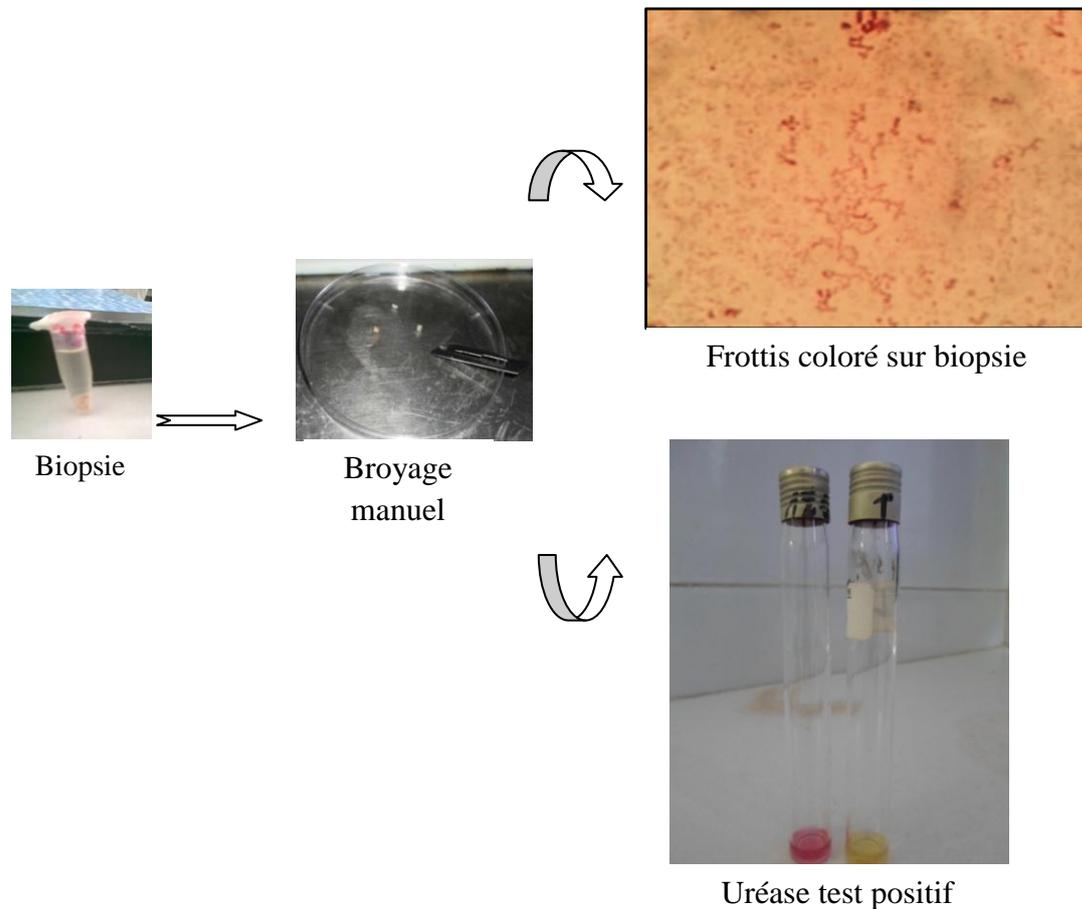


Figure 25 : Détection de *Helicobacter pylori* dans les biopsies gastriques (Photos de l'étude)

2.2. La culture

Après incubation à 37 °C pendant 3 à 7 jours en microaérophilie, les colonies apparaissent fines de coloration grisâtre ou transparente, luisante : elles sont discrètement bombées, rondes et ont un contour régulier. Ces caractères cultureux correspondent à *H. pylori* (Fig. 26).



Figure 26 : Aspect des colonies de *H. pylori* sur gélose Columbia au sang frais (Photo de l'étude)

2.3. Coloration de Gram

L'observation microscopique a révélé des bactéries bacillaires à Gram négatif, spiralées, en virgule, en forme de C, de V ou de S (Fig. 27). Les bactéries évoluent rapidement au cours des repiquages vers des formes d'aspect coccoïde.

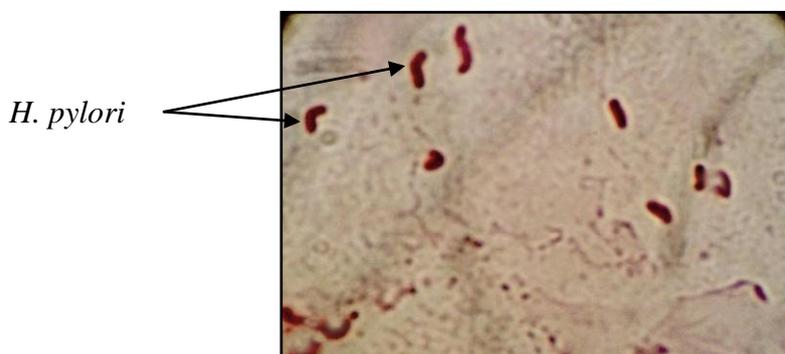


Figure 27 : Coloration de Gram à partir des isolats x100 (Photo de l'étude)

2.4. Tests biochimiques

Les résultats obtenus ont montré la présence d'une oxydase, d'une catalase et d'une uréase très actives (fortement positive) et aussi les enzymes γ -glutamyl transférase et la phosphatase alcaline (Fig. 28). La positivité de ces tests confirme l'appartenance des souches isolées à *H. pylori*. Dans cette étude, nous avons pu isoler et identifier 13 souches de *H. pylori*.



Uréase +++, - γ -Glutamyl Transférase ++, Phosphatase alcaline ++



Oxydase



Catalase

Figure 28 : Résultats des tests biochimiques (Photos de l'étude)

3. Résultats de l'antibiogramme

La résistance des 13 souches de *H. pylori* isolées aux antibiotiques a été testée par antibiogramme, les résultats obtenus ont montré la présence de 3 souches résistantes à la clarithromycine, 1 souche résistante à la ciprofloxacine et 8 souches résistantes au métronidazole, aucune résistance à l'amoxicilline n'a été détectée (Fig. 29).

Les résultats obtenus pour la ciprofloxacine sont valables pour la lévofloxacine. La résistance à la clarithromycine a été testée aussi par PCR en temps réel directement sur les biopsies gastriques, les résultats de la PCR ont confirmé les résultats de l'antibiogramme.

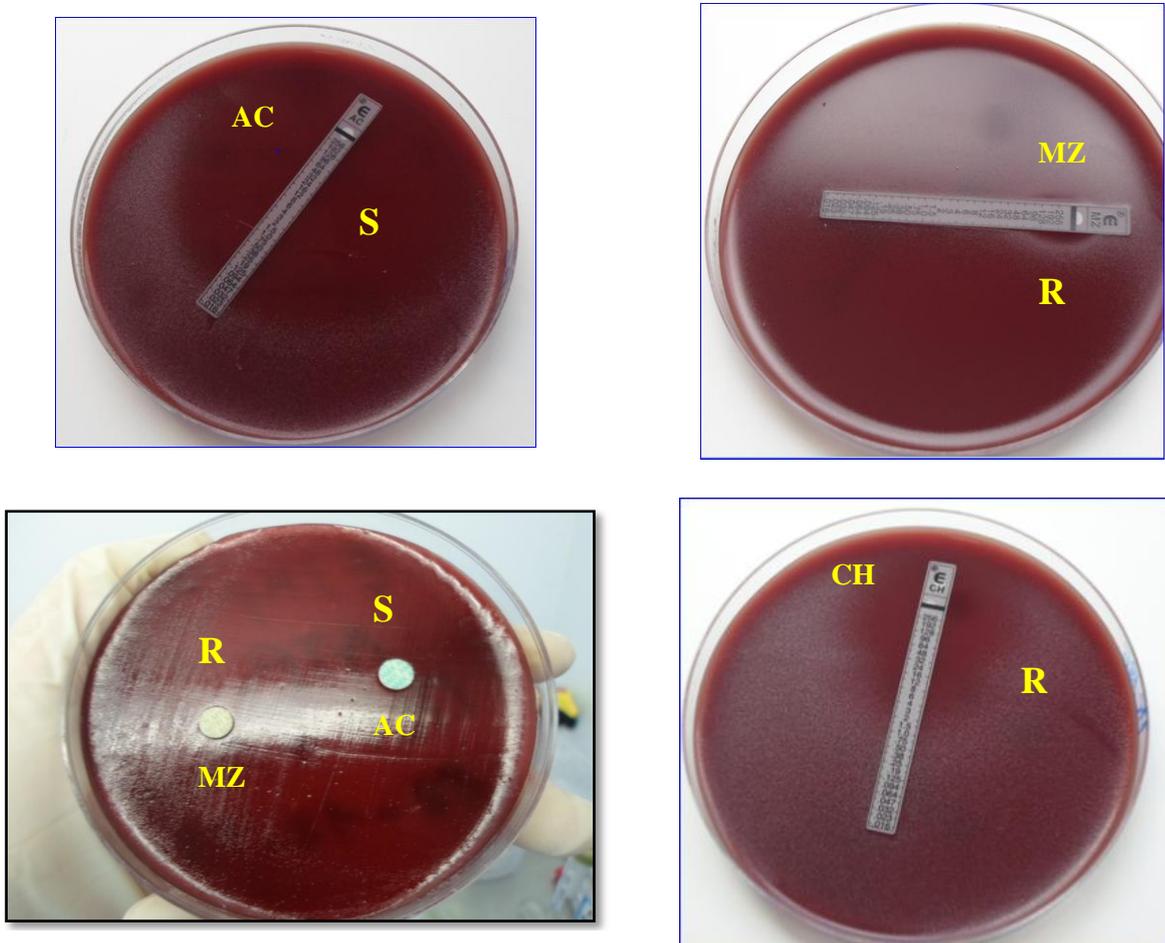


Figure 29 : Résultats de l'antibiogramme (E-test et disques) (Photos de l'étude)

R : Résistant **S** : Sensible

MZ : Métronidazole **CH** : Clarithromycine **AC** : Amoxicilline

4. Détermination de la prévalence de l'infection à *H. pylori*

La PCR en temps réel a été réalisée sur la totalité des biopsies gastriques des patients (135), cependant la culture a été effectuée uniquement sur 77 biopsies des 135 collectées. Elle n'était positive que chez 13 patients (13/77). La prévalence de l'infection à *H. pylori* par culture était donc de 17%. En parallèle avec les résultats de la PCR en temps réel pour les mêmes échantillons biopsiques, nous avons détecté 43 cas positifs (43/77) et donc une prévalence de 56%. Toutes les biopsies gastriques avec une culture positive avaient des résultats de PCR positifs.

La PCR sur la totalité des biopsies a révélé un taux de positivité de 63,7%, qui constitue la prévalence de l'infection à *H. pylori* à Constantine (Tableau 35).

Tableau 35 : Pourcentage des biopsies positives à *H. pylori* par PCR en temps réel

PCR	N°	%
Positif	86	63,7
Négatif	49	36,3
Total	135	100

-La prévalence de l'infection à *Helicobacter pylori* n'avait pas une différence significative entre les 2 sexes (le sexe féminin 48,8% et le sexe masculin 51,1%) (Fig. 30).

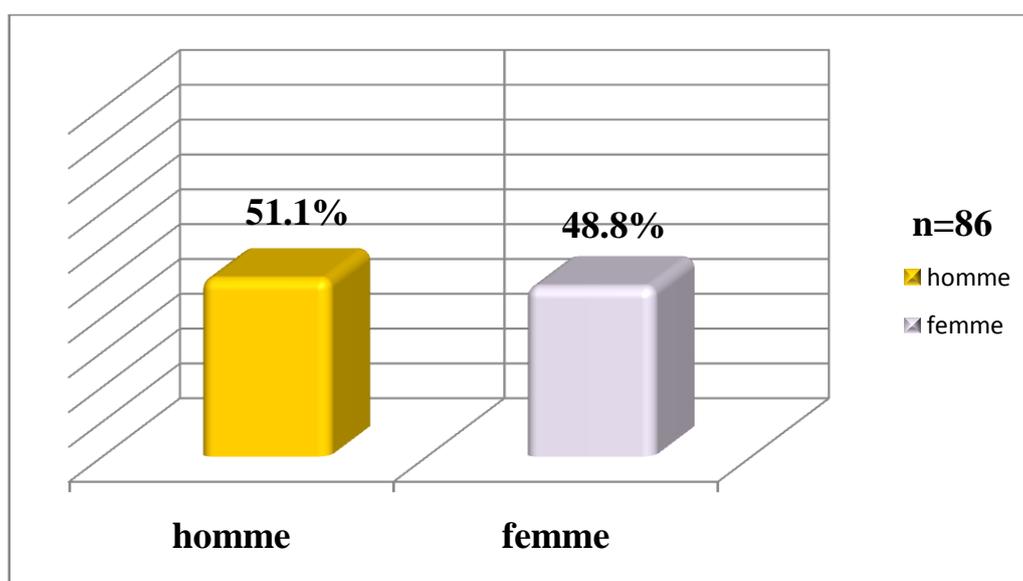


Figure 30 : Répartition de la prévalence de l'infection à *H. pylori* selon le sexe

-La répartition de la prévalence selon les tranches d'âge a révélé qu'elle est plus fréquente dans la tranche d'âge située entre 16-36 ans (54,48%) diminue d'environ la moitié dans la tranche d'âge située entre 37-57ans (29%), cette fréquence tend à régresser dans les tranches d'âge (58-78 ans) et (79-99 ans), elle est de 16,27% et 1,16% respectivement (Fig. 31).

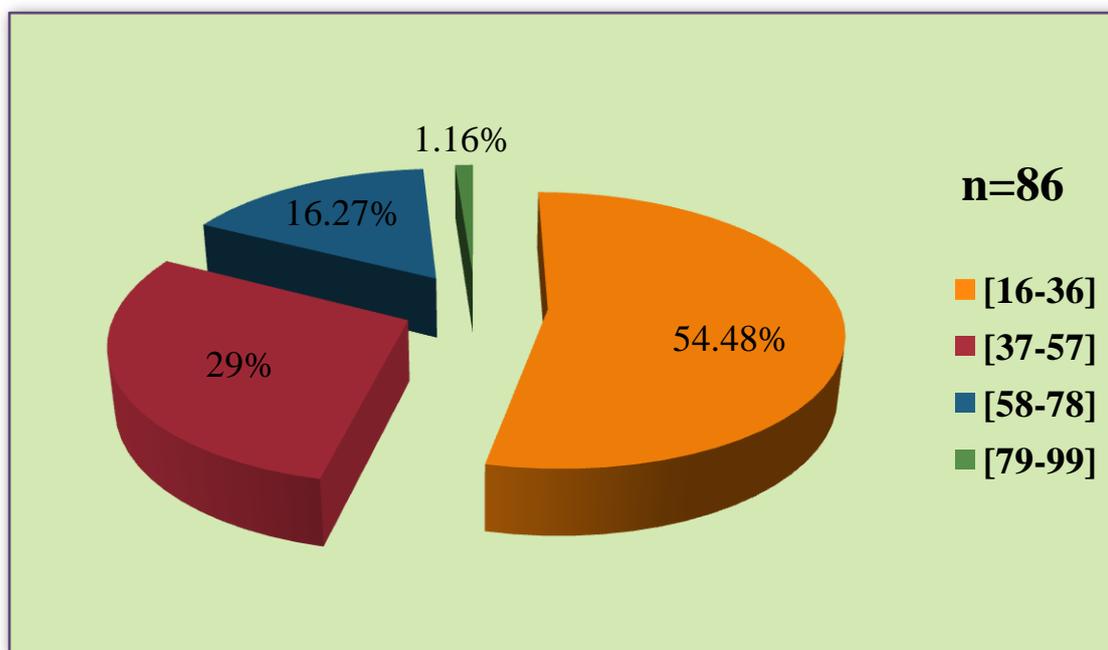


Figure 31 : Répartition de l'infection à *H. pylori* selon les tranches d'âge.

5. Détermination de la résistance primaire aux antibiotiques par PCR

5.1. Mutations conférant la résistance à la clarithromycine

La PCR en temps réel a détecté une mutation de génotype A2142/43G chez 16/86 patients, cette mutation est associée à la résistance primaire à la clarithromycine, elle était de 18,6 %. Aucune mutation A2142C n'a été détectée chez les patients.

La présence des doubles populations des souches de *H. pylori* sauvages (WT) sensibles et mutantes résistantes infectant le même patient a été aussi révélée par cette technique (Tableau 36).

Tableau 36 : Mutations conférant la résistance à la clarithromycine chez *H. pylori*

Mutations	N°	%
Sauvage (wild-type)	77	89,5
A(2142/43)G	16	18,6
A(2142)C	0	0
G/WT (double population)	7	8,1

5.2. Mutations conférant la résistance à la tétracycline

La résistance à la tétracycline a été recherchée au niveau d'ADN extrait à partir de biopsies gastriques de 81 patients positives à *H. pylori*.

La résistance de *H. pylori* de haut niveau à la tétracycline est due à la substitution d'une triple paire de base AGA-926 à 928TTC au niveau de l'ARNr 16S, site de liaison de la tétracycline (Gerrits *et al.*, 2002 ; Wu *et al.*, 2005).

Dans cette étude, une seule mutation TGA926-928 a été détectée avec une température de fusion de 56,5 °C, correspondant à une diminution de la sensibilité (résistance à la tétracycline de bas niveau). 80 souches ont été révélées sensibles (wild-type) avec une température de fusion de 61 °C, correspondant à la séquence AGA926-928 (Tableau 37).

Tableau 37 : Mutations conférant la résistance à la tétracycline chez *H. pylori*

Mutations	N°	%
Sauvage (wild-type)	80	98,8
Muté (mutation TGA)	01	1,2
Total	81	100

5.3. Mutations conférant la résistance aux fluoroquinolones (Lévofloxacine)

L'amplification par PCR et le séquençage de la région QRDR du gène *gyrA* de 84 ADN extrait à partir de biopsies gastriques positives à *H. pylori* ont révélé un taux de résistance à la lévofloxacine de 6% (Tableau 38). Cinq souches résistantes à la lévofloxacine ont été détectées, 4 souches avec une simple mutation et une souche

avec une double mutation (Fig. 32) (Tableau 39). Le polymorphisme (Asn → Thr) à la position d'acide aminé 87 qui ne conduit pas à la résistance a également été détecté 5 fois.

Tableau 38: Pourcentage des mutations conférant la résistance aux fluoroquinolones (Lévofoxacine)

Mutations	N°	%
Sauvage (wild-type)	79	94
Mutée	05	6
Total	84	100

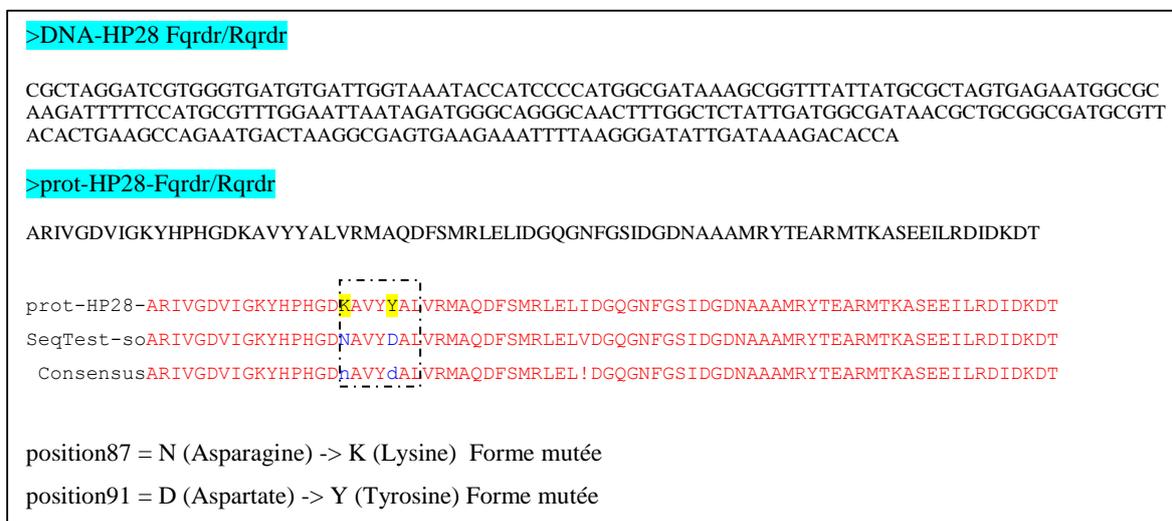


Figure 32 : Résultat d'analyse des séquences pour la détection des mutations au niveau de la région QRDR

Tableau 39: les mutations détectées au niveau de la région QRDR du gène *gyrA* de *H. pylori*.

Substitution de l'acide aminé	Position de mutation	N°
Asn → Lys	N87K	1
Asp → Gly	D91G	1
Asn → Ile	N87I	2
Asn → Lys Asp → Tyr	N87K D91Y } Double mutation	1

6. Détermination des facteurs de pathogénicité

6.1. *cagPAI* et motifs de phosphorylation

La présence de l'îlot de pathogénicité *cag* a été recherchée au niveau d'ADN extrait à partir de 77 biopsies gastriques positives à *H. pylori*. Le résultat de la migration sur gel d'agarose des produits de PCR *cagA* site vide est représenté dans la Figure 33. Trente six souches ont révélé un résultat positif (*cagPAI* +) et 41 souches avec un résultat négatif (*cagPAI* -) (Fig. 34).

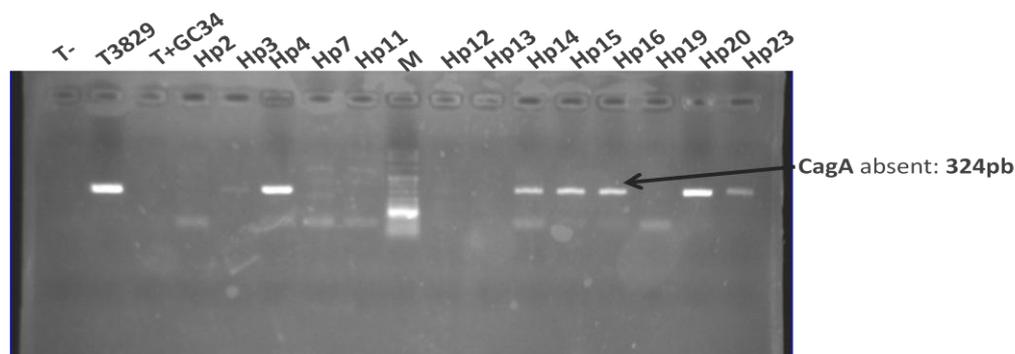


Figure 33 : Gel de migration des produits de PCR *cagA* site vide

T : Témoin 3829, GC34 : souches de référence de *H. pylori*,
 Hp : *Helicobacter pylori* M : Marqueur de taille

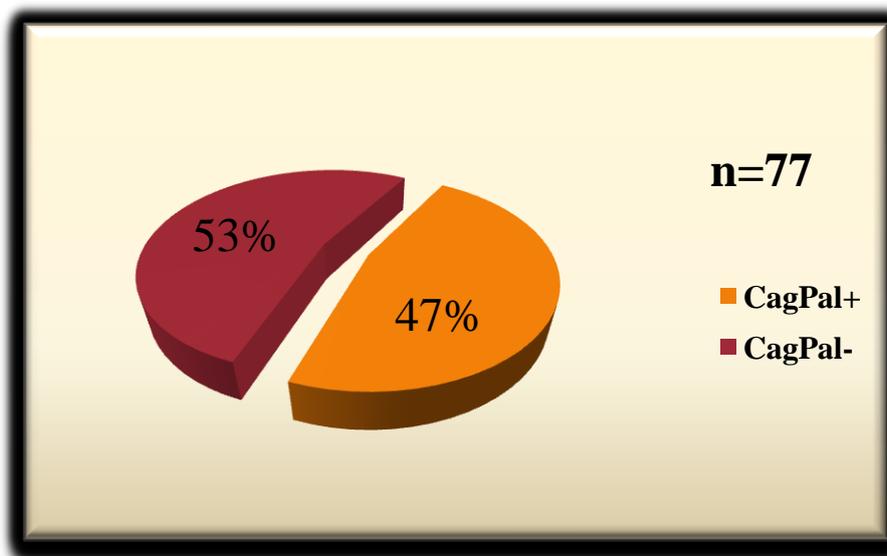


Figure 34: Répartition du statut *cagPAI*

-La détection des différents types de motifs de phosphorylation P1, P2 et P3 a été effectuée sur les 36 souches (*cagPAI+*). 21 souches possédant un motif dominant P1P2P3 (Fig. 35 et 36).

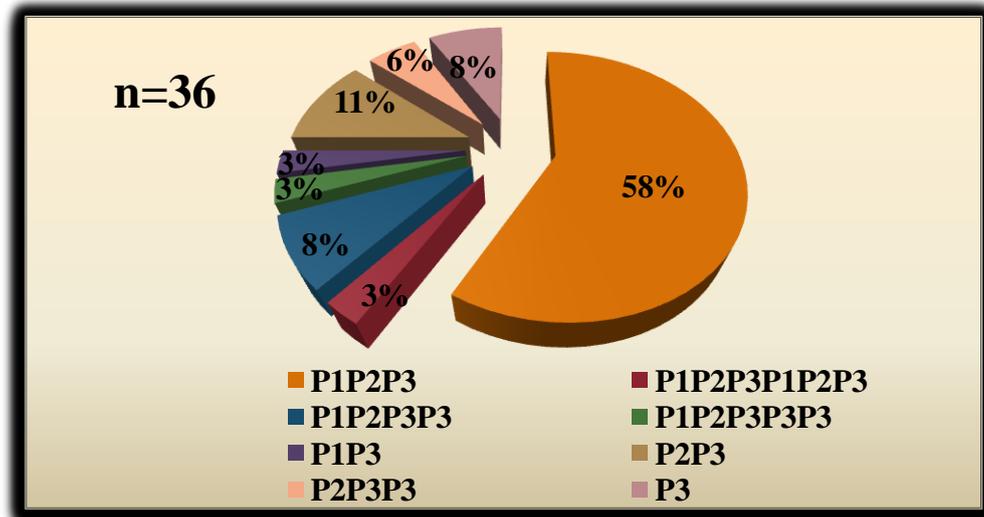


Figure 35 : Répartition des motifs de phosphorylation

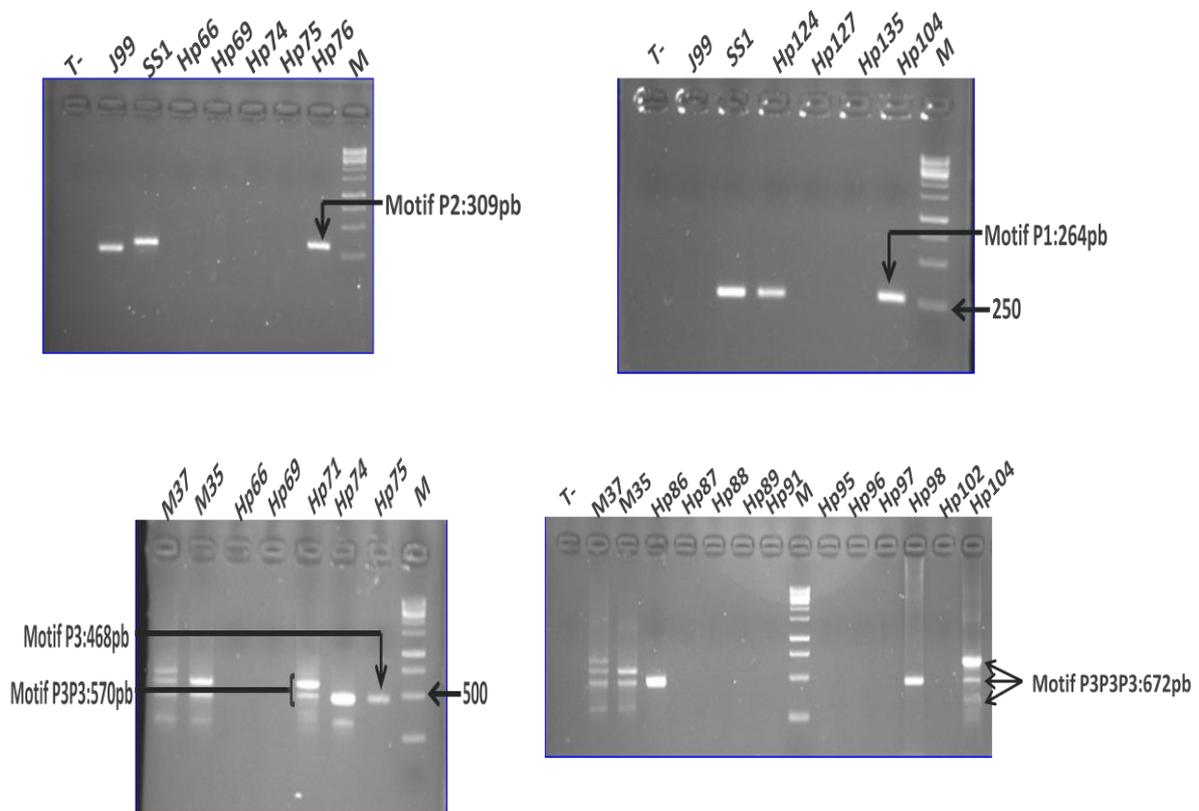


Figure 36 : Gel de migration des produits de PCR *cag A* phosphorylation
 T : Témoin J99, SS1, M35, M37: souches de référence de *H. pylori*,
 Hp : *Helicobacter pylori* M : Marqueur de taille

6.2. *vacA* régions *s*, *m* et *i* et sous types *sI*

Le gène *vacA* a été détecté dans 76 ADN extrait à partir de biopsies, toutes les souches de *H. pylori* isolées sont *vacA* positif.

Les allèles *s2*, *m2* et *i2* (Fig. 36) ont été les plus prédominants avec 58%, 79% et 71% respectivement (Fig. 38). Les sous types de l'allèle *sI* ont été également détecté avec un taux élevé pour le *sIb* (78%) et un taux inférieur pour le *sIa* (22%), le *sIc* n'a pas été détecté (0%) (Fig. 37 et 39).

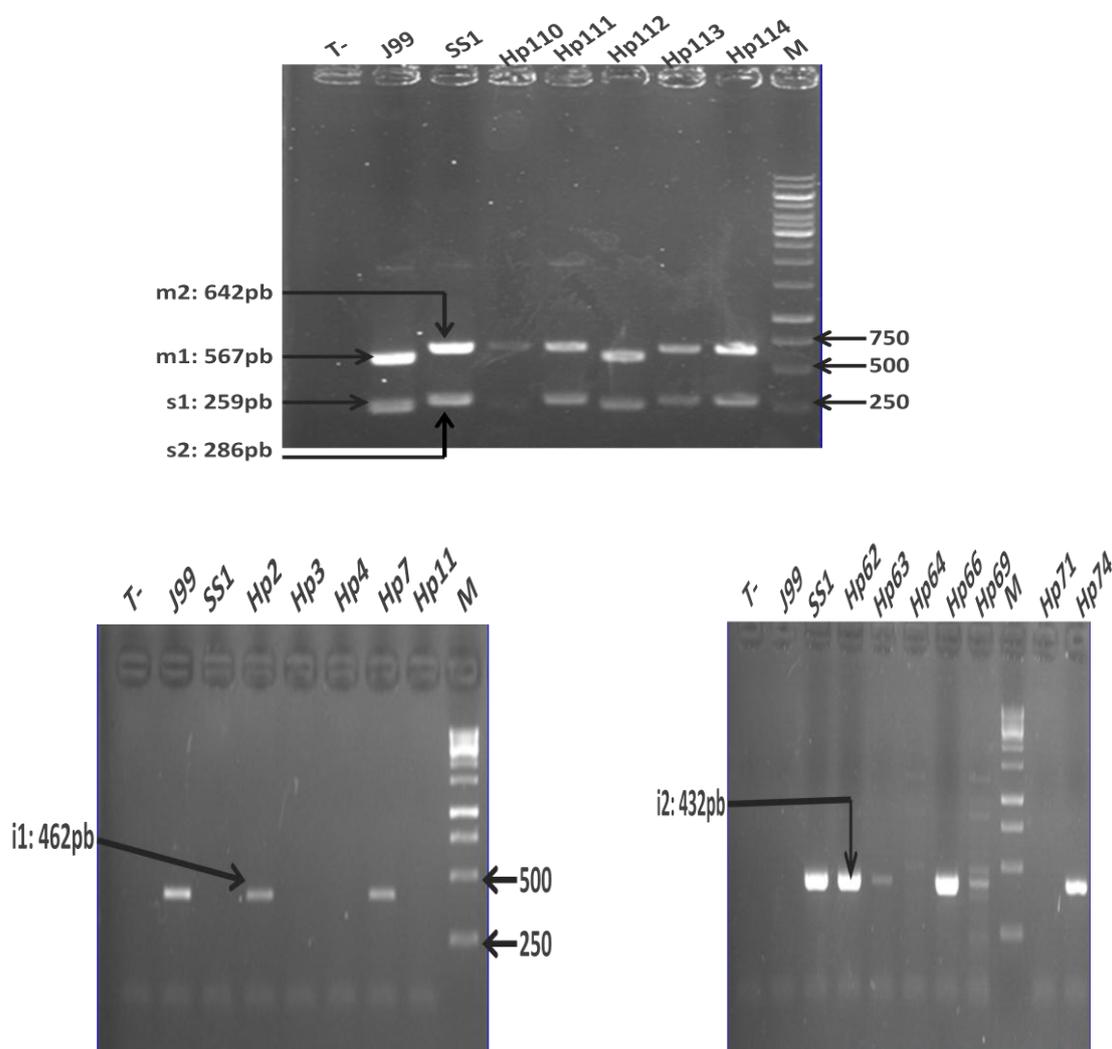


Figure 37: Gel de migration des produits de PCR *vacA*

T : Témoin J99, SS1 : souches de référence de *H. pylori*,
 Hp : *Helicobacter pylori* M : Marqueur de taille

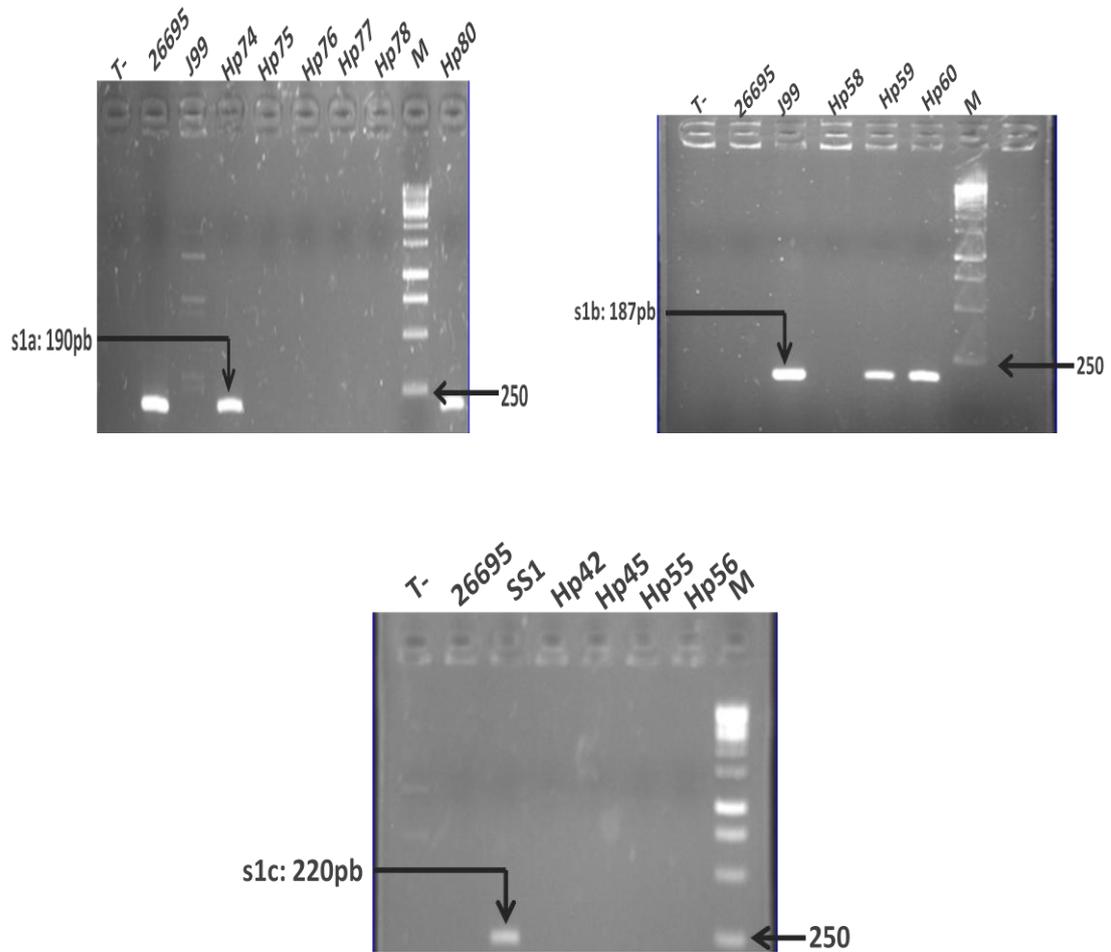


Figure 38 : Gel de migration des produits de PCR *vacA* (s1a,s1b,s1c)

T : Témoin 26695, SS1, J99: souches de référence de *H. pylori*,
 Hp : *Helicobacter pylori* M : Marqueur de taille

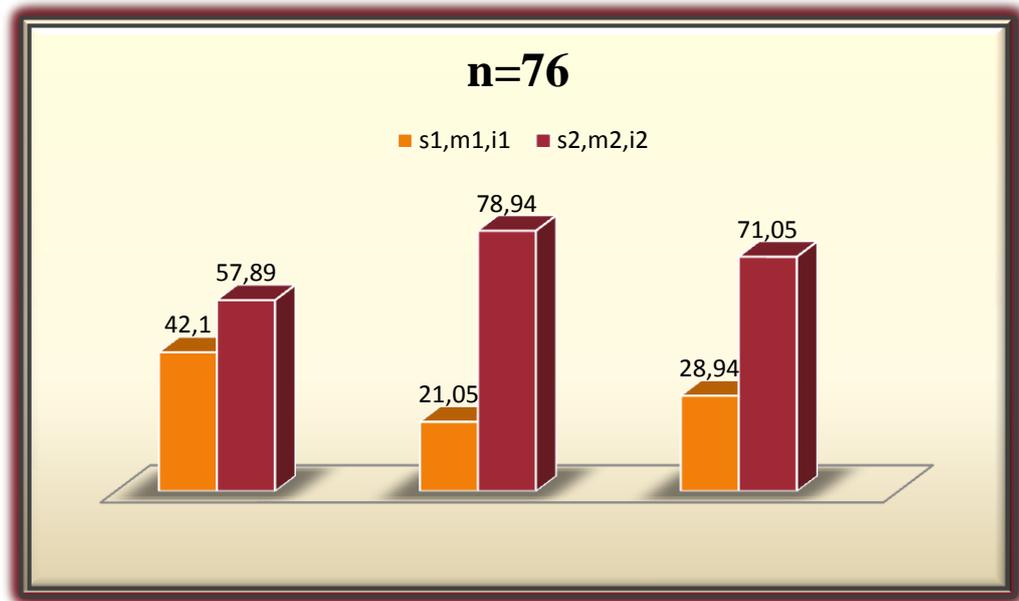


Figure 39 : Répartition des allèles du gène *vacA* s/m/i

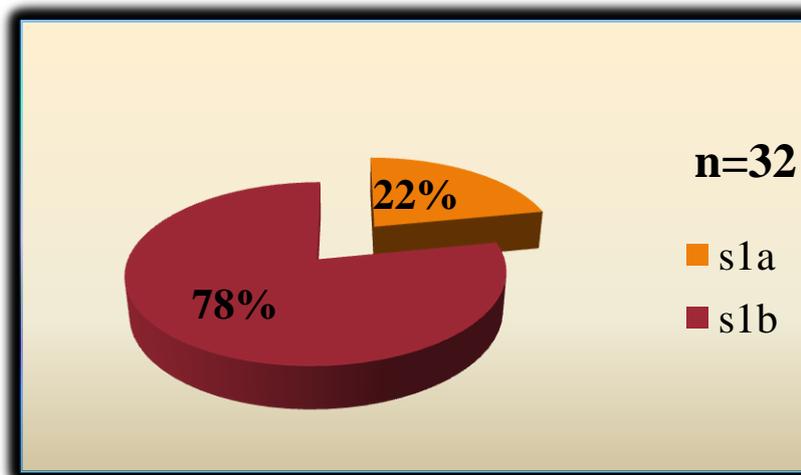


Figure 40 : Répartition des sous allèles du gène *vacA* (s1a, s1b)

-Le génotype *s2m2* du gène *vacA* est majoritaire (55%) en comparaison avec le génotype *s1m1* (20%) suivi par les génotypes *s1m2* et *s2m1* (Fig. 40).

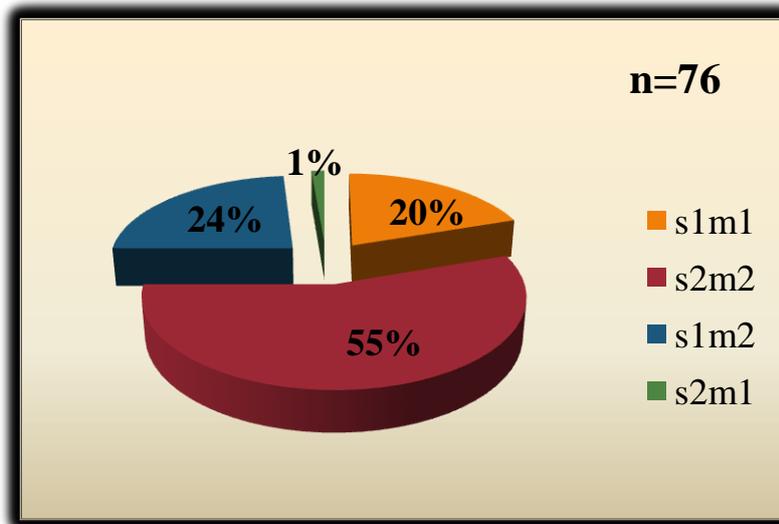


Figure 41: Répartition des génotypes des allèles *vacA* s et m

-L'ensemble des combinaisons des allèles *vacA* détectés sont présentées dans la (Fig. 41) avec une prédominance du génotype *s2m2i2* (55%).

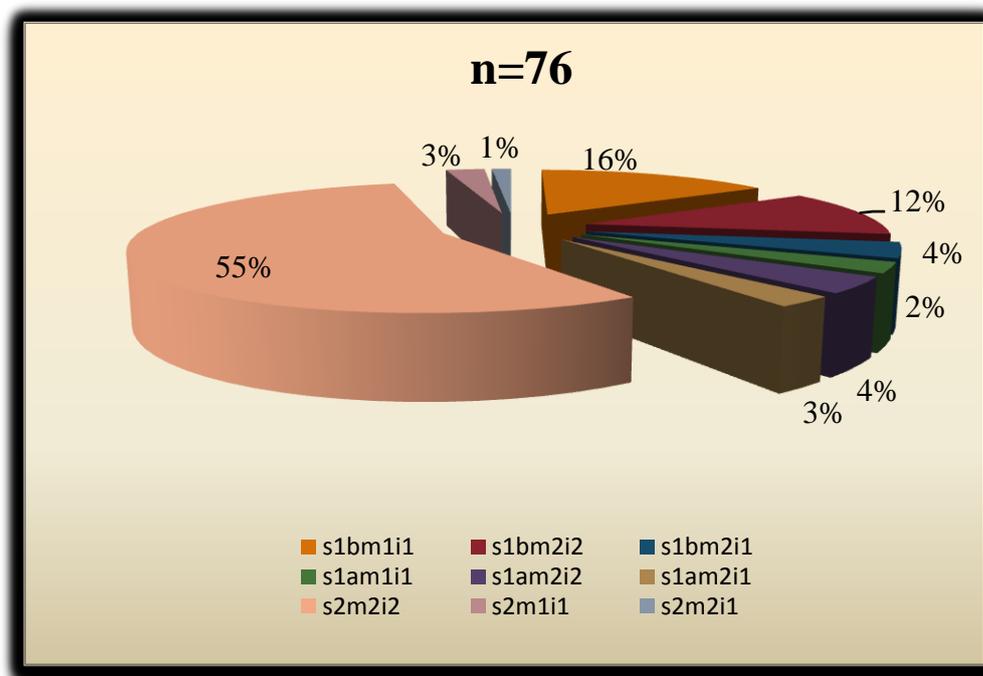


Figure 42: Distribution des génotypes *vacA* s/m/i

6.3. La combinaison des facteurs de pathogénicité

Les résultats obtenus de différentes combinaisons des facteurs de pathogénicité ont montré que le génotype *cagPAI*⁻, *vacAs2m2* est le plus fréquent (37 souches), il a une tendance à se lier à la muqueuse normale et à la gastrite érythémateuse, les deux génotypes *cagPAI*⁺, *vacAs1m1* et *cagPAI*⁺, *vacAs1m2* avec 15 et 16 souches respectivement ont été aussi détecté, ils se caractérisent par des génotypes les plus virulents de *H. pylori* (Tableau 40).

Tableau 40: Combinaison des facteurs de pathogénicité *cag PAI*, *vacA s/m* et le profil endoscopique

Génotype	Profil endoscopique
<i>cagPAI</i> ⁺ , <i>vacAs1m1</i>	15 (3N-10G-1L-1B)
<i>cagPAI</i> ⁺ , <i>vacAs1m2</i>	16 (3N-13G)
<i>cagPAI</i> ⁺ , <i>vacAs2m2</i>	04 (G)
<i>cagPAI</i> ⁺ , <i>vacAs2m1</i>	01 (UG)
<i>cagPAI</i> ⁻ , <i>vacAs1m1</i>	0
<i>cagPAI</i> ⁻ , <i>vacAs1m2</i>	02 (01N-01G)
<i>cagPAI</i> ⁻ , <i>vacAs2m2</i>	37 (28G-08N-01L)
<i>cagPAI</i> ⁻ , <i>vacAs2m1</i>	0

+ : Positif, - : Négatif, N : Normal, G : Gastrite, UG : Ulcère gastrique, L : Lymphome, B : Bulbite (bulbo-duodénite érosive et hémorragique).

-La détection des facteurs de pathogénicité par PCR a révélé la présence de 10 échantillons d'ADN avec des doubles populations, différentes formes alléliques du même gène d'un facteur de pathogénicité ont été détecté chez le même patient.



Discussion

Helicobacter pylori est un agent pathogène, qui colonise la muqueuse gastrique de la moitié de la population mondiale. Cette bactérie est responsable de la plupart des maladies gastroduodénales telles que la gastrite, l'ulcère peptique, l'adénocarcinome et le lymphome gastrique MALT (Kusters *et al.*, 2006).

La détection de l'infection à *H. pylori* repose sur des méthodes bactériologiques et moléculaires qui permettent l'identification des souches et leurs appartenances à l'espèce *H. pylori*.

En raison des données limitées sur la prévalence de l'infection à *H. pylori* et sa résistance aux antibiotiques en Algérie, l'objectif de cette étude consiste à l'identification des souches de *H. pylori* par l'utilisation des marqueurs génétiques qui permet la détermination de la prévalence de l'infection à *H. pylori* pour la première fois à Constantine, ainsi que d'apporter des données importantes sur l'état de la résistance primaire aux antibiotiques et les facteurs de virulence incriminés dans l'infection à *H. pylori*.

Ainsi, dans cette étude, nous avons procédé, en premier lieu, à la mise en évidence de *H. pylori* chez des patients adultes, n'ayant jamais reçu un traitement d'éradication contre *H. pylori* ; en utilisant les méthodes invasives nécessitant la réalisation des biopsies gastriques lors de la fibroscopie.

La culture est la méthode diagnostic la plus spécifique et constitue le test de référence le plus fiable pour affirmer la présence de *H. pylori* et tester la sensibilité aux antibiotiques, mais elle nécessite des conditions particulières (De Korwin, 2003). Cependant, la mise en culture des biopsies gastriques antrales nous a permis la détection d'un taux faible de prévalence de l'infection à *H. pylori* (17%). Plusieurs facteurs ont contribué à l'échec de la culture telle que la sensibilité de la technique extrêmement dépendante des conditions de transport, de stockage et de culture fournies au laboratoire (mode de culture des prélèvements, milieux spéciaux, atmosphère microaérobie). En effet, la croissance de *H. pylori* semble limitée par la température, le contact avec l'oxygène, la dessiccation, le milieu de transport et le laps de temps avant le traitement des biopsies (Mégraud, 1994 ; Yousfi *et al.*, 1997).

De plus, la distribution irrégulière de la bactérie dans la muqueuse gastrique peut influencer l'apparition des colonies dans les milieux de culture et peut donc contribuer à des résultats faussement négatifs (Yousfi *et al.*, 1997).

Pour cela, certains auteurs ont recommandé la réalisation de plusieurs biopsies à des sites différents de la muqueuse gastrique, améliorant ainsi le rendement de la culture (Megraud, 1994 ; Yousfi *et al.*, 1997).

Après isolement, les souches ont subi une identification, qui a été fondée sur des caractères morphologiques (macroscopique, microscopique) et biochimiques.

Les échantillons biopsiques mises en culture ont été testés aussi par PCR en temps réel, ce qui permet d'avoir un taux de prévalence plus élevé (56%) (17 vs 56%).

L'écart entre les résultats de la culture et de la PCR est expliqué par l'excellente sensibilité et spécificité de la PCR qui n'est pas impactée par les contraintes de la culture. Elle a l'avantage d'être une méthode rapide réalisable sur des bactéries non viables, ce qui fait de la PCR une technique plus précise et plus fiable pour le diagnostic de l'infection à *H. pylori*. Les résultats obtenus ont été comparés avec deux études Algériennes récentes qui ont rapporté un écart légèrement inférieur entre les résultats de la culture et de la PCR (29% vs 56%), (25% vs 62%) respectivement (Raaf *et al.*, 2017 ; Djennane-Hadibi *et al.*, 2016). Ainsi, dans notre étude, la prévalence de l'infection est interprétée selon les résultats obtenus par PCR.

L'infection à *H. pylori* est présente dans toutes les régions du monde avec une prévalence plus élevée dans les pays en voie de développement et quelque pays développés.

Notre étude a rapporté pour la première fois, la prévalence de l'infection à *H. pylori*, à Constantine, elle est assez élevée (63,7%). Les études sérologiques de Mégraud *et al.*, 1989 ont rapporté une prévalence de l'infection supérieure à 80% dans la population algérienne, un taux aussi élevé de 89% a été démontré dans une étude récente au Congo (Ontsira Ngoyi *et al.*, 2015).

En plus, une étude très récente impliquant plusieurs wilayas (Alger, Chlef, Oran et Sidi Belabess) a rapporté une prévalence nettement plus élevée de 83,5% (Bachir *et al.*, 2018).

La forte prévalence de l'infection à *H. pylori* est peut être associée avec le bas niveau socioéconomique, les mauvaises conditions d'hygiène qui favorise la transmission, la population jeune et la vie en communauté. Des taux inférieurs ont été rapportés par d'autres études Algériennes, estimés par 47% et 57% à Alger (Djennane-Hadibi *et al.*, 2016 ; Raaf *et al.*, 2017). Cette différence de prévalence entre les régions du même pays peut être expliquée par le bas niveau socioéconomique à Constantine en

comparaison à la capitale et le manque des données concernant l'infection à *H. pylori* dans notre région. Contrairement aux pays en voie de développement, plusieurs études ont rapporté une prévalence faible de l'infection à *H. pylori* dans les pays occidentaux. 30% en Amérique du Nord, 20% en Australie et 26,6% en Suisse (Hunt *et al.*, 2011).

La répartition de la prévalence selon les tranches d'âge a révélé qu'elle est plus fréquente dans la tranche d'âge des sujets jeunes et elle est en diminution avec l'âge.

Nos résultats concordent avec les données retrouvées par (Raaf *et al.*, 2017).

Ces résultats sont expliqués par l'acquisition de l'infection tôt dans l'enfance (Kikuchi, 2002 ; Bartnik, 2008), qui entraînerait une expression clinique précoce de l'infection. Cette dernière commence à diminuer avec l'âge, du fait de la survenue d'autres symptômes provoqués par d'autres pathologies que l'infection à *H. pylori* (Sahi, 1998).

En Algérie, la trithérapie combinant un inhibiteur de la pompe à protons (IPP) et 2 antibiotiques (clarithromycine ou métronidazole et amoxicilline) est recommandée en première intention pour l'éradication de l'infection à *H. pylori*.

Les échecs thérapeutiques d'éradication de l'infection à *H. pylori* ont augmenté, ils sont principalement liés au développement des résistances aux macrolides (De Korwin, 2004).

La clarithromycine est le principal antibiotique utilisé dans le traitement d'éradication de *H. pylori*. Notre étude est la première de son genre qui a rapporté la résistance primaire à la clarithromycine à Constantine, elle est estimée à 18,6%. Selon les recommandations de Maastricht V, au-delà de 15% de résistance, la trithérapie à base de clarithromycine n'est plus recommandée (Malfertheiner *et al.*, 2017). Cela, suggère d'abandonner la trithérapie à base de clarithromycine comme un schéma thérapeutique d'éradication de première ligne.

Notre résultat est similaire à ce qui a été observé au Pakistan et en Espagne (18,2%), (17,9%) respectivement (Cagdas *et al.*, 2012 ; Navarro-Jarabo *et al.*, 2015).

Par ailleurs, trois études Algériennes très récentes ont rapporté un taux très élevé de cette résistance estimée à (23%, 29,7% et 33%) (Raaf *et al.*, 2017 ; Bachir *et al.*, 2018 ; Djennane-Hadibi *et al.*, 2016). En plus, le taux de résistance à la clarithromycine est aussi élevé au Maroc (28,8%) (Bouihat *et al.*, 2016), En Egypte

(57,7%) (Ghaith *et al.*, 2016) et en France (22,2%) (Ducournau *et al.*, 2016). Une étude européenne a établie une corrélation positive entre la consommation de la clarithromycine et la forte prévalence de la résistance de *H. pylori* (Mégraud *et al.*, 2013).

Cependant, d'autres études ont démontré des taux inférieurs ; (14,6%) en Tunisie (Ben Mansour *et al.*, 2016) et (1,7%) au Congo (Ontsira Ngoyi *et al.*, 2015).

A la suite des résultats de l'étude moléculaire que nous avons réalisée, la résistance à la clarithromycine est due principalement à la mutation de génotype A2142/43G, la technique utilisée ne permettant pas de les différencier. Plusieurs études ont démontré que la mutation A2143G est celle qui prédomine suivie de la mutation A2142G et la mutation A2142C (ne représente que 2% des isolats) (Owen, 2002 ; Seck *et al.*, 2013). L'émergence de la résistance à la clarithromycine en Algérie pourrait s'expliquer par l'utilisation abusive de cet antibiotique même en dehors de l'éradication de *H. pylori* pour le traitement d'autres infections bactériennes. En plus, la résistance croisée entre la famille des macrolides pourrait contribuer à cette émergence.

Concernant la résistance à la tétracycline, notre étude a rapporté qu'une seule souche présentant une mutation ponctuelle TGA responsable d'une diminution de la sensibilité. Nous n'avons observé aucune triple mutation (TTC) menant à un haut niveau de résistance.

D'autres mécanismes tels que les efflux qui peuvent être également responsables, en particulier à la résistance à la tétracycline ont été décrit, ils entraînent une diminution de l'accumulation de tétracycline dans les cellules bactériennes (mégraud *et al.*, 2015). Deux souches avec une autre mutation ponctuelle AGC ont été détectés dans l'étude de Bachir *et al.*, 2018. Un taux faible de résistance à la tétracycline a été rapporté au Nigeria (4,5%) (Harrison *et al.*, 2017), et aucune résistance n'a été trouvée au Maroc et au Sénégal (Bouihat *et al.*, 2016 ; Seck *et al.*, 2013). Une étude récente en Chine de Xi *et al.*, 2018 a démontré que la quadrithérapie à base de bismuth contenant une faible dose de rabeprazole, l'amoxicilline et la tétracycline est très efficace comme première ligne de traitement d'éradication de l'infection à *H. pylori* surtout pour les populations présentant un taux élevé de résistance aux antibiotiques.

La résistance à la lévofloxacine est généralement faible (<19%) à l'échelle mondiale, le taux de prévalence est plus élevé en Asie (25,28%) et en Amérique du Sud (21,23%) en comparaison avec l'Afrique et l'Europe (moins de 15%). Cependant, le

taux universel de la résistance à la lévofloxacine semble en augmentation, il est passé de 4,25% en 2009 à 17,55% en 2014 (Ghotaslou *et al.*, 2015).

En effet, la lévofloxacine n'est pas utilisée dans le traitement d'éradication de l'infection à *H. pylori* en Algérie. Cependant, un taux de résistance de 6% a été rapporté dans notre étude. Un taux plus élevé a été démontré récemment en Algérie (17,9%) (Bachir *et al.*, 2018), 15,4% en France (Ducournau *et al.*, 2016) et 50% au Congo (Ontsira Ngoyi *et al.*, 2015). Un niveau extrêmement faible (2%) a été signalé par une autre étude Algérienne (Raaf *et al.*, 2017).

L'augmentation du taux de résistance vis-à-vis les fluoroquinolones est en corrélation avec l'utilisation accrue de ces antibiotiques dans le traitement de certaines infections urogénitales et respiratoires (Malfertheiner *et al.*, 2002). Cette croissance est particulièrement inquiétante puisque la lévofloxacine est utilisée lors des traitements de recours dans les stratégies d'éradication.

Dans notre étude, La mutation Asn87Ile est la plus fréquente (2 cas), la même mutation a été détectée au Congo et au Sénégal (Ontsira Ngoyi *et al.*, 2015 ; Seck *et al.*, 2013). D'autres mutations ont été détectées telle que : Asn87Lys, Asp91Gly et la double mutation Asn87Lys et Asp91Tyr. Ces mutations sont à l'origine de la résistance à la lévofloxacine. Un polymorphisme pourrait être trouvé également au niveau de la région QRDR, ce qui complique la détection moléculaire de la résistance aux fluoroquinolones (Mégraud *et al.*, 2015).

Ces dernières années, la lévofloxacine est utilisée comme un antibiotique alternatif suite à la résistance très élevée à la clarithromycine. Plusieurs études ont démontré leur efficacité dans la trithérapie, la thérapie séquentielle et la quadrithérapie.

Dans cette étude, la résistance à l'amoxicilline et à la rifampicine n'a pas été étudiée parce que plusieurs études ont démontré que les résistances à ces antibiotiques sont extrêmement rares et peuvent s'expliquer par le fait que plusieurs mutations sont nécessaires pour conférer une résistance à ces antibiotiques (Mégraud, 2004).

Nous n'avons pas fourni des informations dans ce présent travail concernant le taux de résistance au métronidazole, du fait qu'il est bien prévisible très élevé en Algérie, comme étant dans plusieurs d'autres pays africains (Ben Mansour *et al.*, 2010 ; Seck *et al.*, 2013). La mise en évidence de la résistance au métronidazole est moins fiable vu que la faible reproductibilité des résultats *in vitro* et la non corrélation avec les

résultats *in vivo*. Elle diminue le taux d'éradication d'environ 25% (Mégraud et Lehours, 2007). De plus, cette résistance peut être surmontée par l'utilisation de fortes doses de métronidazole ou l'allongement de la durée de traitement (Malfertheiner *et al.*, 2017).

La résistance de *H. pylori* aux antibiotiques est le principal facteur d'échec du traitement d'éradication. Le choix de la méthode de diagnostic appropriée pour la détection de la résistance peut entraîner une réduction des échecs de traitement et une résistance moindre aux antibiotiques.

En Algérie, il existe très peu de laboratoires qui pratiquent le diagnostic de l'infection à *H. pylori* par culture et par PCR de détection de mutations associées à la résistance aux antibiotiques. Ce qui incite les cliniciens à prescrire un traitement probabiliste qui n'est pas actualisé sur la résistance aux antibiotiques.

Récemment, les résultats obtenus par plusieurs études Algériennes et nos résultats et selon les dernières recommandations de Maastricht V nous incite à proposer aux cliniciens d'abandonner le traitement de première ligne à base de clarithromycine. Deux possibilités peuvent être proposées pour l'adaptation du traitement des patients infectés par *H. pylori* : soit un nouveau schéma impliquant une combinaison de plus d'antibiotiques en incluant d'autres antibiotiques tels que la lévofloxacine et la tétracycline pour le traitement empirique de première ligne ou une nouvelle stratégie thérapeutique guidée par des tests de sensibilité aux antibiotiques.

Actuellement, dans les régions où la résistance à la clarithromycine est élevée, des quadrithérapies contenant du bismuth sont recommandés pour le traitement empirique de première ligne (Malfertheiner *et al.*, 2017).

En Algérie, le bismuth n'est pas disponible. En conséquence, des traitements concomitants ou séquentiels sont recommandés en dépit des conséquences écologiques et des effets indésirables.

L'identification génotypique des souches de *H. pylori* est basée sur la détermination du génotype de gènes de pathogénicité *vacA* avec ses trois régions et le statut *cagPAI*. L'infection à *H. pylori* liée aux pathologies gastroduodénales est due principalement à la présence et l'expression des gènes de virulence.

La présence de l'îlot de pathogénicité *cagPAI* permet de déterminer le degré de virulence de la bactérie. Les souches *cagA* positives sont associées aux pathologies les plus sévères comme l'ulcère gastroduodéal et le cancer gastrique (Marshall et Windsor, 2005). Les pays du continent Africain ont une incidence faible du cancer gastrique malgré de forts taux de prévalence de l'infection à *H. pylori*, contrairement à certains pays d'Asie de l'Est où la prévalence de l'infection peut être inférieure mais qui enregistrent une forte incidence de cancer gastrique (Kuipers, 1999).

Dans cette étude, nous avons rapporté 47% des échantillons ont un statut *cagPAI* positif, un résultat similaire à ceux rapportés dans les pays du Maghreb : 58% et 46% dans les études Algériennes récentes de Bachir *et al.*, 2018 et Raaf, 2018 respectivement, 42,3% au Maroc (Boukhris *et al.*, 2012) et 61,6% en Tunisie (Ben Mansour *et al.*, 2010b). Notre prévalence est supérieure à celles obtenus au Pakistan (24,2%) mais inférieur aux taux rapportés en Iran (76%), en Irak (71%) (Hussein *et al.*, 2008) et 86% dans une étude mexicaine (Gonzalez-Vazquez *et al.*, 2012). Au Japon, le taux de *cagA* est très élevé (90%) (Ito *et al.*, 1997), ce qui est en corrélation avec le cancer gastrique couramment rencontré dans ce pays.

De plus, il a été démontré que les protéines CagA possédant plusieurs répétitions EPIYA sont plus susceptibles d'être associés au développement du cancer gastrique (Argent *et al.*, 2004 ; Azuma *et al.*, 2002 ; Yamaoka *et al.*, 1998). Nos résultats ont démontré 58% des souches avec le type EPIYA-C (P1P2P3), un taux similaire a été rapporté par l'étude de Raaf, 2018 (55%).

Le gène *vacA* représente un autre marqueur impliqué dans la pathologie. La virulence des isolats est étroitement liée à la combinaison en mosaïque des différents types alléliques des régions *s*, *m* et *i*.

Dans notre étude toutes les souches de *H. pylori* expriment *vacA*. La répartition des allèles *s2* a été légèrement supérieure des allèles *s1* 58% vs 42% avec une prédominance à 78% de *s1b*. Les allèles *m2* et *i2* ont été les plus prédominants avec 79% et 71% respectivement. De nombreuses études ont démontré des résultats similaires, en Algérie *s1* à 50%, *s1b* à 82% et une prédominance de *s2* et *m2* avec 50% et 78% respectivement (Raaf, 2018), au Maroc prédominance de *s2* et *m2* avec 50,2% et 57,6% respectivement (Boukhris *et al.*, 2012) et en Tunisie *s1b* à 77% et

prédominance de *s2* et *m2* avec 45,6% et 58% respectivement (Ben Mansour *et al.*, 2010b).

Les combinaisons des allèles *vacA* les plus prédominantes dans notre étude sont *s2/m2* 55%. Un taux similaire a été rapporté par les études de Raaf, Boukhris *et al* et Ben Mansour *et al* 47%, 51% et 45,6% respectivement. Alors que, l'étude Algérienne récente de Bachir *et al.*, 2018 a démontré que les combinaisons *s1/m1* sont les plus prédominantes avec 59,88%.

Il a été démontré que les souches de *H. pylori* présentant les allèles *s1/m1/i1* de *vacA* sont associées à un risque accru de développer une maladie sévère, comparé aux souches *vacA s2/m2/i2* positifs (Peek *et al.*, 2010 ; Read *et al.*, 2007).

Les souches *s1m1* sont les plus cytotoxiques, suivies de souches de *s1m2*, tandis que les souches de *s2m2* n'ont aucune activité cytotoxique, les souches *s2m1* sont rares (Atherton *et al.*, 1995 ; González *et al.*, 2011; Shiota *et al.*, 2013).

Dans ce présent travail, la combinaison des facteurs de virulence étudiés a été effectuée. Les résultats obtenus ont montré un génotype majoritaire *cagPAI-*, *vacAs2m2* avec 37 souches 49%, correspondant à un génotype moins virulent. Un résultat inférieur a été trouvé par Raaf 27%. Ce résultat pourrait être expliqué par le taux élevé de gastrite 66% chez les patients inclus dans cette étude et le faible taux de pathologie sévères notamment le cancer gastrique en Algérie par rapport aux taux de prévalence assez élevé de l'infection à *H. pylori*.

D'autres génotypes plus virulents ont été trouvés aussi avec des taux inférieurs tel que *cagPAI+*, *vacAs1m2* 16 souches 21% et *cagPAI+*, *vacAs1m1* 15 souches 20%. Ces résultats sont élevés en comparaison avec ceux rapportés par Raaf 16% et 2,5% respectivement.

La prévalence de ces génotypes chez les patients atteints d'un ulcère peptique et de cancer gastrique est nettement supérieure à celle des patients souffrant de gastrite uniquement (Faundez *et al.*, 2002).

Plusieurs études ont démontré que l'association des facteurs de virulence comme *cagA* et *vacA s1* est associée à l'ulcère duodénale et au cancer gastrique (Gerhard *et al.*, 1999 ; Arents *et al.*, 2001) .

Conclusion et Perspectives

L'infection à *Helicobacter pylori* constitue un problème majeur de santé public en Algérie. L'objectif de cette étude était d'apporter des données concernant l'épidémiologie locale de l'infection à *H. pylori* pour la première fois à Constantine et de contribuer à l'amélioration de la prise en charge des infections à *H. pylori*.

Ce travail a permis d'une part la mise en place des techniques d'isolements et d'identifications de *H. pylori* et la réalisation de l'antibiogramme au niveau du laboratoire de Bactériologie du CHU Benbadis Constantine.

D'autre part, l'étude a permis de déterminer pour la première fois une forte prévalence (63,7% par PCR) de l'infection à *H. pylori* chez l'adulte à Constantine et une fréquence assez élevée de la résistance à la clarithromycine (18,6%). Selon les dernières recommandations de Maastricht V, ce résultat nous incite à proposer aux cliniciens à abandonner le traitement de première ligne à base de clarithromycine.

Le traitement d'éradication de l'infection à *H. pylori* en Algérie doit être adapté par l'élaboration de nouveaux schémas thérapeutiques impliquant une combinaison de plus d'antibiotiques en incluant d'autres antibiotiques tels que la lévofloxacine et la tétracycline (en raison du faible taux de résistance obtenu à ces antibiotiques) pour le traitement empirique de première ligne. En plus, les stratégies thérapeutiques doivent être guidées par des tests de sensibilité aux antibiotiques.

L'étude génotypique des facteurs de pathogénicité a montré une prédominance des génotypes les moins virulents *vacA s2m2i2* et *cagPAI -*. En raison de l'absence des résultats d'anatomopathologie pour l'ensemble des patients, nous n'avons pas pu analyser la corrélation entre les facteurs de pathogénicité et les pathologies gastriques.

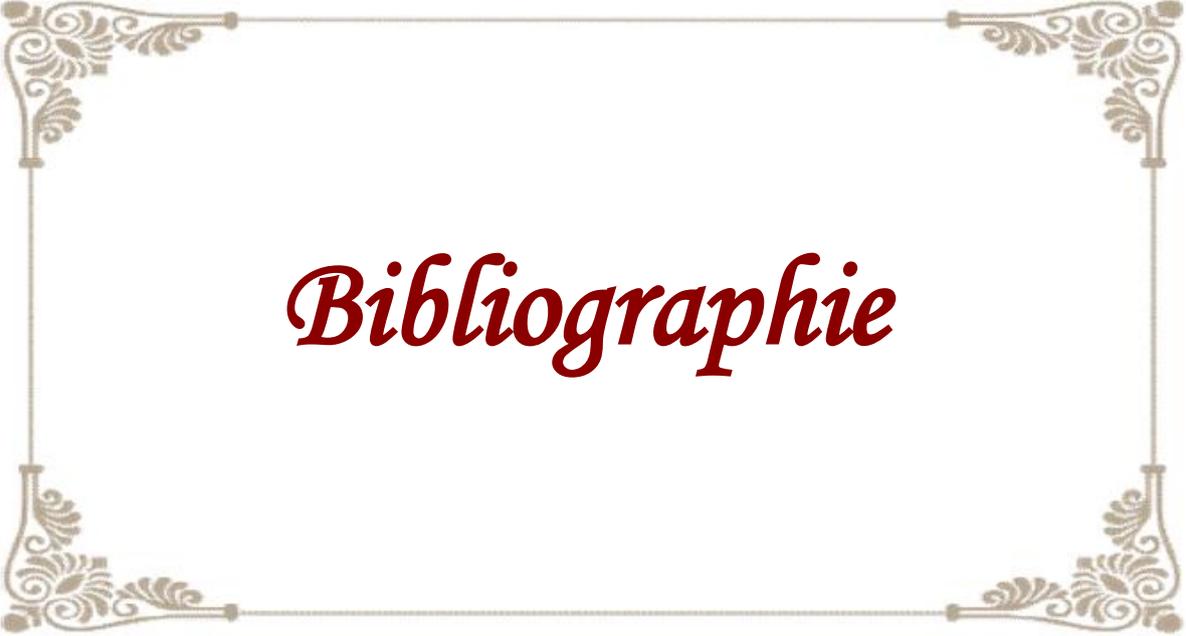
Cette étude a démontré également l'intérêt des méthodes de génétique et biologie moléculaire dans la détection de l'infection à *H. pylori* directement dans les biopsies gastriques et la détermination de la sensibilité aux antibiotiques. Ces techniques nous a permis de surmonter l'échec de la culture. Elles sont aussi faciles à standardiser en comparaison aux méthodes phénotypiques. Cependant, la culture reste la méthode de

référence qui permet la conservation des souches isolées de *H. pylori* pour d'autres études plus approfondies.

La prévalence de l'infection à *H. pylori* obtenu dans notre étude concerne uniquement des patients symptomatiques et ne représente pas la prévalence de la population générale.

Il serait judicieux de mettre en place les méthodes de recherche bactériologique et moléculaire de cet agent hautement pathogène au niveau des différents laboratoires à travers le pays dans le but de traiter efficacement l'infection en éradiquant *H. pylori* afin de prévenir la survenue des pathologies sévères tel que le cancer gastrique et assurer une bonne coopération entre les cliniciens et les biologistes.

A l'issue de cette étude, nous voudrions participer à la création d'une unité de recherche de *Helicobacter pylori* au laboratoire de Bactériologie CHU Benbadis avec la collaboration des microbiologistes et y apporter toute notre expérience, en mettant en place les méthodes d'isolement, d'identification et d'étude de la sensibilité aux antibiotiques de *H. pylori* à partir de biopsies de patients concernant les pathologies gastroduodénales et secondairement rechercher *H. pylori* dans les selles. Ce qui peut mener à l'apport certain pour le diagnostic et la mise en place d'un traitement ciblé, cela contribuera à l'amélioration de la qualité des soins et pour promouvoir la médecine curative ou préventive pour la population de toute la région Constantinoise.



Bibliographie

1. Akopyants, N.S., Clifton, S.W., Kersulyte, D., Crabtree, J.E., Youree, B.E., Reece, C.A., Bukanov, N.O., Drazek, E.S., Roe, B.A., Berg, D.E., 1998. Analyses of the cag pathogenicity island of *Helicobacter pylori*. *Mol. Microbiol.* 28, 37–53.
2. Alm, R.A., Ling, L.-S.L., Moir, D.T., King, B.L., Brown, E.D., Doig, P.C., Smith, D.R., Noonan, B., Guild, B.C., deJonge, B.L., Carmel, G., Tummino, P.J., Caruso, A., Uria-Nickelsen, M., Mills, D.M., Ives, C., Gibson, R., Merberg, D., Mills, S.D., Jiang, Q., Taylor, D.E., Vovis, G.F., Trust, T.J., 1999. Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* 397, 176–180. <https://doi.org/10.1038/16495>.
3. Al Sayed, A., Anand, P.S., Kamath, K.P., Patil, S., Preethanath, R.S., Anil, S., 2014. Oral Cavity as an Extragastric Reservoir of *Helicobacter pylori*. *ISRN Gastroenterol.* 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/261369>.
4. Amjad, N., Osman, H.A., Razak, N.A., Kassian, J., Din, J., Abdullah, N. bin, 2010. Clinical significance of *Helicobacter pylori* cagA and iceA genotype status. *World J. Gastroenterol.* 16, 4443–4447. <https://doi.org/10.3748/wjg.v16.i35.4443>.
5. Annibale, B., 2003. Concomitant alterations in intragastric pH and ascorbic acid concentration in patients with *Helicobacter pylori* gastritis and associated iron deficiency anaemia. *Gut* 52, 496–501. <https://doi.org/10.1136/gut.52.4.496>.
6. Appelmelk, B.J., Simoons-Smit, I., Negrini, R., Moran, A.P., Aspinall, G.O., Forte, J.G., Maaskant, J.J., Ghiara, P., Kuipers, E.J., Bloemena, E., Tadema, T.M., Townsend, R.R., Tyagarajan, K., Crothers, J.M., Monteiro, M.A., Savio, A., 1996. Potential Role of Molecular Mimicry between *Helicobacter pylori* Lipopolysaccharide and Host Lewis Blood Group Antigens in Autoimmunity. *Infect Immun.* 64: 2031-2040.
7. Appelmelk, B.J., Monteiro, M.A., Martin, S.L., Moran, A.P., Vandenbroucke-Grauls, C.M.J.E., 2000. Why *Helicobacter pylori* has Lewis antigens. *Trends Microbiol.* 8, 565–570. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(00\)01875-8](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(00)01875-8).
8. Aras, R.A., Fischer, W., Perez-Perez, G.I., Crosatti, M., Ando, T., Haas, R., Blaser, M.J., 2003. Plasticity of Repetitive DNA Sequences within a Bacterial (Type IV)

Secretion System Component. *J. Exp. Med.* 198, 1349–1360.
<https://doi.org/10.1084/jem.20030381>.

9. Arents, N.L., Van Zwet, A.A., Thijs, J.C., Kooistra-Smid, A.M., Van Slochteren, K.R., Degener, J.E., Kleibeuker, J.H., Van Doorn, L.-J., 2001. The importance of *vacA*, *cagA*, and *iceA* genotypes of *Helicobacter pylori* infection in peptic ulcer disease and gastroesophageal reflux disease. *Am. J. Gastroenterol.* 96, 2603–2608.

10. Argent, R.H., Kidd, M., Owen, R.J., Thomas, R.J., Limb, M.C., Atherton, J.C., 2004. Determinants and consequences of different levels of CagA phosphorylation for clinical isolates of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* .127, 514–523.

11. Argent, R.H., Zhang, Y., Atherton, J.C., 2005. Simple method for determination of the number of *Helicobacter pylori* CagA variable-region EPIYA tyrosine phosphorylation motifs by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 43, 791–795.

12. Asha, M.K., Debraj, D., Prashanth, D. 'souza, Edwin, J.R., Srikanth, H.S., Muruganantham, N., Dethe, S.M., Anirban, B., Jaya, B., Deepak, M., Agarwal, A., 2013. In vitro anti-*Helicobacter pylori* activity of a flavonoid rich extract of *Glycyrrhiza glabra* and its probable mechanisms of action. *J. Ethnopharmacol.* 145, 581–586. doi:10.1016/j.jep.2012.11.033.

13. Ashtari, S., Pourhoseingholi, M.A., Molaei, M., Taslimi, H., Zali, M.R., 2015. The prevalence of *Helicobacter pylori* is decreasing in Iranian patients. *Gastroenterol. Hepatol. Bed Bench* 8, S23.

14. Aspholm, M., Olfat, F.O., Nordén, J., Sondén, B., Lundberg, C., Sjöström, R., Altraja, S., Odenbreit, S., Haas, R., Wadström, T., 2006. SabA is the *H. pylori* hemagglutinin and is polymorphic in binding to sialylated glycans. *PLoS Pathog.* 2, e110.

15. Atherton, J.C., Cao, P., Peek, R.M., Tummuru, M.K., Blaser, M.J., Cover, T.L., 1995. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori* association of specific *vacA* types with cytotoxin production and peptic ulceration. *J. Biol. Chem.* 270, 17771–17777.

16. Atherton, J.C., 1997. The clinical relevance of strain types of *Helicobacter pylori*. *Gut* 40, 701–703.

17. Atherton, J.C., Cover, T.L., Twells, R.J., Morales, M.R., Hawkey, C.J., Blaser, M.J., 1999. Simple and accurate PCR-based system for typing vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. *J. Clin. Microbiol.* 37, 2979–2982.
18. Atherton, J.C., 2006. The Pathogenesis of *Helicobacter Pylori*-Induced Gastro-Duodenal Diseases. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 1, 63–96. <https://doi.org/10.1146/annurev.pathol.1.110304.100125>.
19. Atherton, J.C., Blaser, M.J., 2009. Coadaptation of *Helicobacter pylori* and humans: ancient history, modern implications. *J. Clin. Invest.* 119, 2475–2487. <https://doi.org/10.1172/JCI38605>.
20. Audia, S., Lorcerie, B., Godeau, B., Bonnotte, B., 2011. Physiopathologie du purpura thrombopénique immunologique. *Rev. Médecine Interne* 32, 350–357. <https://doi.org/10.1016/j.revmed.2009.05.017>.
21. Ayala, G., Escobedo-Hinojosa, W.I, de la Cruz-Herrer, C.F.,Romero,I., 2014. Exploring alternative treatments for *Helicobacter pylori* infection. *World J Gastroenterol.* 20, 1450-1469.
22. Azuma, T., Yamakawa, A., Yamazaki, S., Fukuta, K., Ohtani, M., Ito, Y., Dojo, M., Yamazaki, Y., Kuriyama, M., 2002. Correlation between Variation of the 3' Region of the *cagA* Gene in *Helicobacter pylori* and Disease Outcome in Japan. *J. Infect. Dis.* 186, 1621–1630. <https://doi.org/10.1086/345374>.
23. Bachir, M., Allem, R., Tifrit, A., Medjekane, M., Drici, A.E.-M., Diaf, M., Douidi, K.T., 2018. Primary antibiotic resistance and its relationship with *cagA* and *vacA* genes in *Helicobacter pylori* isolates from Algerian patients. *Braz. J. Microbiol.* 49, 544–551. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.11.003>.
24. Bachir, M., Allem, R., Benejat, L., Tifrit, A., Medjekane, M., Drici, A.E.-M., Megraud, F., Douidi, K.T., 2018. Molecular detection of mutations involved in *Helicobacter pylori* antibiotic resistance in Algeria. *J. Antimicrob. Chemother.* 73, 2034–2038. <https://doi.org/10.1093/jac/dky167>.
25. Backert, S., Selbach, M., 2008. Role of type IV secretion in *Helicobacter pylori* pathogenesis. *Cell. Microbiol.* 10, 1573–1581. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2008.01156.x>.

26. Baik, S.-C., Youn, H.-S., Chung, M.-H., Lee, W.-K., Cho, M.-J., Park, C.-K., Kasai, H., Rhee, K.-H., 1996. Increased Oxidative DNA Damage in *Helicobacter pylori* -infected Human Gastric Mucosa . " Cancer Res. 56, 1279-1282.
27. Bartnik, W., 2008. Clinical aspects of *Helicobacter pylori* infection. Pol. Arch. Intern. Med. 118, 426–430. <https://doi.org/10.20452/pamw.440>.
28. Basso, D., Zambon, C., Letley, D.P., Stranges, A., Marchet, A., Rhead, J.L., Schiavon, S., Guariso, G., Ceroti, M., Nitti, D., Rugge, M., Plebani, M., Atherton, J.C., 2008. Clinical Relevance of *Helicobacter pylori* cagA and vacA Gene Polymorphisms. Gastroenterology. 135, 91-99. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.03.041>.
29. Ben Mansour, K., Burucoa, C., Zribi, M., Masmoudi, A., Karoui, S., Kallel, L., Chouaib, S., Matri, S., Fekih, M., Zarrouk, S., Labbene, M., Boubaker, J., Cheikh, I., Hriz, M.B., Siala, N., Ayadi, A., Filali, A., Mami, N.B., Najjar, T., Maherzi, A., Sfar, M.T., Fendri, C., 2010. Primary resistance to clarithromycin, metronidazole and amoxicillin of *Helicobacter pylori* isolated from Tunisian patients with peptic ulcers and gastritis: a prospective multicentre study. Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob. 9, 22. <https://doi.org/10.1186/1476-0711-9-22>.
30. Ben Mansour, K., Fendri, C., Zribi, M., Masmoudi, A., Labbene, M., Fillali, A., Ben Mami, N., Najjar, T., Meherzi, A., Sfar, T., Burucoa, C., 2010. Prevalence of *Helicobacter pylori* vacA, cagA, iceA and oipA genotypes in Tunisian patients. Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob. 9, 1–7. <https://doi.org/10.1186/1476-0711-9-10>.
31. Ben Mansour, K., Fendri, C., Battikh, H., Garnier, M., Zribi, M., Jlizi, A., Burucoa, C., 2016. Multiple and mixed *Helicobacter pylori* infections: Comparison of two epidemiological situations in Tunisia and France. Infect. Genet. Evol. 37, 43–48. doi:10.1016/j.meegid.2015.10.028.
32. Bergonzelli, G.E., Blum, S., Brüssow, H., Corthésy-Theulaz, I., 2005. Probiotics as a Treatment Strategy for Gastrointestinal Diseases? Digestion 72, 57–68. <https://doi.org/10.1159/000087638>.

33. Bigard ,M.A et Colin R., 1996.Conférence de consensus, ulcère et gastrite à l'heure de *Helicobacter pylori*, pourquoi et comment? Gastroenferol. Clin. Biol. 20, 51-54.
34. Bizzozero, G., 1893. Ueber die schlauchförmigen Drüsen des Magendarmkanals und die Beziehungen ihres Epithels zu dem Oberflächenepithel der Schleimhaut Dritte Mittheilung.Arch.FürMikrosk.Anat. 42, 82–152. <https://doi.org/10.1007/BF02975307>
35. Blaser, M.J., Atherton, J.C., 2004. *Helicobacter pylori* persistence: biology and disease. J. Clin. Invest. 113, 321-333. doi:10.1172/JCI200420925.
36. Boughan, P.K., Argent, R.H., Body-Malapel, M., Park, J.-H., Ewings, K.E., Bowie, A.G., Ong, S.J., Cook, S.J., Sorensen, O.E., Manzo, B.A., Inohara, N., Klein, N.J., Nuñez, G., Atherton, J.C., Bajaj-Elliott, M., 2006. Nucleotide-binding Oligomerization Domain-1 and Epidermal Growth Factor Receptor: critical regulators of beta-defensins during *Helicobacter pylori* infection." J Biol Chem. 281, 11637-11648. <https://doi.org/10.1074/jbc.M510275200>.
37. Bouihat, N., Burucoa, C., Benkirane, A., Seddik, H., Sentissi, S., Al Bouzidi, A., Elouennas, M., Benouda, A., 2016. *Helicobacter pylori* Primary Antibiotic Resistance in 2015 in Morocco: A Phenotypic and Genotypic Prospective and Multicenter Study. Microb. Drug Resist. doi:10.1089/mdr.2016.0264.
38. Boukhris, S.A., Benajah, D. -a., El Rhazi, K., Ibrahimi, S.A., Nejari, C., Amarti, A., Mahmoud, M., El Abkari, M., Souleimani, A., Bennani, B., 2012. Prevalence and distribution of *Helicobacter pylori* cagA and vacA genotypes in the Moroccan population with gastric disease. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 31, 1775–1781. <https://doi.org/10.1007/s10096-011-1501-x>.
39. Breurec, S., 2011. *Helicobacter pylori* : migrations humaines et cancer gastrique. Thèse en ligne: Université Paris-Sud.
40. Brown, L.M., 2000. *Helicobacter pylori*: epidemiology and routes of transmission. Epidemiol. Rev. 22, 283–297. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.epirev.a018040>.

41. Burucoa, C., Delchier, J.C., Courillon-Mallet, A., Korwin, J.D. de, Mégraud, F., Zerbib, F., Raymond, J., Fauchère, J.L., 2013. Comparative Evaluation of 29 Commercial *Helicobacter pylori* Serological Kits. *Helicobacter*. <https://doi.org/10.1111/hel.12030>.
42. Cagdas, U., Otag, F., Tezcan, S., Sezgin, O., Aslan, G. and Emekdas, G. 2012. Detection of *Helicobacter pylori* and antimicrobial resistance in gastric biopsy specimens. *Microbiol Bul.* 46, 398-409.
43. Calvet, X., Ramírez Lázaro, M.-J., Lehours, P., Mégraud, F., 2013. Diagnosis and Epidemiology of *Helicobacter pylori* Infection. *Helicobacter* 18, 5–11. <https://doi.org/10.1111/hel.12071>.
44. Camargo, M.C., Piazuolo, M.B., Mera, R.M., Fonham, E.T., Delgado, A.G., Yepez, M.C., Ceron, C., Bravo, L.E., Bravo, J.C., Correa, P., 2007. Effect of smoking on failure of *H. pylori* therapy and gastric histology in a high gastric cancer risk area of Colombia. *Acta Gastroenterol. Latinoam.* 37, 238–245.
45. Cambau, E., Allerheiligen, V., Coulon, C., Corbel, C., Lascols, C., Deforges, L., Soussy, C.-J., Delchier, J.-C., Megraud, F., 2009. Evaluation of a New Test, GenoType HelicoDR, for Molecular Detection of Antibiotic Resistance in *Helicobacter pylori*. *J. Clin. Microbiol.* 47, 3600–3607. <https://doi.org/10.1128/JCM.00744-09>.
46. Cammarota, G., Cianci, R., Cannizzaro, O., Martino, A., Fedeli, P., Lecca, P.G., di Caro, S., Cesaro, P., Branca, G., Gasbarrini, G., 2004. High-dose versus low-dose clarithromycin in 1-week triple therapy, including rabeprazole and levofloxacin, for *Helicobacter pylori* eradication. *J. Clin. Gastroenterol.* 38, 110–114.
47. Capelle, L.G., Vries, A.C. de, Looman, C.W.N., Casparie, M.K., Boot, H., Meijer, G.A., Kuipers, E.J., 2008. Gastric MALT lymphoma: Epidemiology and high adenocarcinoma risk in a nation-wide study. *Eur. J. Cancer* 44, 2470–2476. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2008.07.005>.
48. Cattoir, V., Nectoux, J., Lascols, C., Deforges, L., Delchier, J.-C., Megraud, F., Soussy, C.-J., Cambau, E., 2007. Update on fluoroquinolone resistance in *Helicobacter pylori*: new mutations leading to resistance and first description of a

gyrA polymorphism associated with hypersusceptibility. *Int. J. Antimicrob. Agents* 29, 389–396. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2006.11.007>.

49. Censini, S., Lange, C., Xiang, Z., Crabtree, J.E., Ghiara, P., Borodovsky, M., Rappuoli, R., Covacci, A., 1996. cag, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93, 14648–14653. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.25.14648>.

50. Chaput, C., Ecobichon, C., Cayet, N., Girardin, S.E., Werts, C., Guadagnini, S., Prévost, M.-C., Mengin-Lecreulx, D., Labigne, A., Boneca, I.G., 2006. Role of AmiA in the Morphological Transition of *Helicobacter pylori* and in Immune Escape. *PLoS Pathog.* 2, e97. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0020097>.

51. Chen, K.-Y., Lin, T.-J., Lin, C.-L., Lee, H.-C., Wang, C.-K., Wu, D.-C., 2015. Hybrid vs sequential therapy for eradication of *Helicobacter pylori* in Taiwan: A prospective randomized trial. *World J. Gastroenterol.* 21, 10435–10442. doi:10.3748/wjg.v21.i36.10435.

52. Conroy, M.C., Antoine, C., Lozniewski, A., De Korwin, J., Weber, M., 1994. Apport de la culture dans le cadre du diagnostic d'infection gastro-duodénale à *Helicobacter pylori*. Expérience nancéienne de 1985 à 1992, in: *Annales Médicales de Nancy et de l'Est. Annales Médicales*, 95–96.

53. Contreras, M., Labigne, A., 2003. Virulence factors of *Helicobacter pylori*: what are they?. *Gastroenterol. Clin. Biol.* 27, 401–408.

54. Correa, P., 1996. *Helicobacter pylori* and gastric cancer: state of the art. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 5, 477–481.

55. Covacci, A., Censini, S., Bugnoli, M., Petracca, R., Burroni, D., Macchia, G., Massone, A., Papini, E., Xiang, Z., Figura, N., 1993. Molecular characterization of the 128-kDa immunodominant antigen of *Helicobacter pylori* associated with cytotoxicity and duodenal ulcer. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90, 5791–5795. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.12.5791>.

56. Covacci, A., Telford, J.L., Del Giudice, G., Parsonnet, J., Rappuoli, R., 1999. *Helicobacter pylori* virulence and genetic geography. *Science* 284, 1328–1333.

57. Cover, T.L., 1996. The vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori*. Mol. Microbiol. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1996.tb02612>.
58. Cover, T.L., Krishna, U.S., Israel, D.A., Peek, R.M., 2003 .Induction of Gastric Epithelial Cell Apoptosis by *Helicobacter pylori* Vacuolating Cytotoxin .Cancer Research. 63, 951–957.
59. Cover, T.L., Blanke, S.R., 2005. *Helicobacter pylori* VacA, a paradigm for toxin multifunctionality. Nat. Rev. Microbiol. 3, 320–332. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1095>.
60. Cover, T.L., Blaser, M.J., 2009. *Helicobacter pylori* in Health and Disease. Gastroenterology, Intestinal Microbes in Health and Disease 136, 1863–1873. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.01.073>.
61. Dailidienė, D., Bertoli, M.T., Miciuleviciene, J., Mukhopadhyay, A.K., Dailide, G., Pascasio, M.A., Kupcinskis, L., Berg, D.E., 2002. Emergence of Tetracycline Resistance in *Helicobacter pylori*: Multiple Mutational Changes in 16S Ribosomal DNA and Other Genetic Loci. Antimicrob. Agents Chemother. 46, 3940–3946. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.12.3940-3946.2002>.
62. Darko, R., Yawson, A., Osei, V., Owusu-Ansah, J., Aluze-Ele, S., 2015. Changing patterns of the prevalence of *Helicobacter pylori* among patients at a corporate hospital in Ghana. Ghana Med. J. 49, 147-153. doi:10.4314/gmj.v49i3.4
63. De Francesco, V., Giorgio, F., Hassan, C., Manes, G., Vannella, L., Panella, C., Zullo, A., 2010. Worldwide *H. pylori* antibiotic resistance: a systematic review. J Gastrointest Liver Dis .19, 409-14.
64. Debets-Ossenkopp, Y.J., Herscheid, A.J., Pot, R.G.J., Kuipers, E.J., Kusters, J.G., Vandenbroucke-Grauls, C.M.J.E., 1999. Prevalence of *Helicobacter pylori* resistance to metronidazole, clarithromycin, amoxicillin, tetracycline and trovafloxacin in The Netherlands. J. Antimicrob. Chemother. 43, 511–515. <https://doi.org/10.1093/jac/43.4.511>.
65. De Korwin, J.D., 2002. Les échecs de l'éradication de *Helicobacter pylori* : facteurs en cause et traitements de seconde ligne. Gastroenterol Clin Biol . 26 , 207-209.

66. De Korwin, J.-D., 2003. Avantages et inconvénients des différentes méthodes diagnostiques de l'infection à *H. pylori*. *Gastroentérologie Clin. Biol.* 27, 380–390.
67. De Korwin, J.-D., 2004. Infection à *Helicobacter pylori* et résistance aux antibiotiques. *Rev. Médecine Interne* 25, 54–64. doi:10.1016/S0248-8663(03)00187-5.
68. De Korwin, J.D., 2007. *Helicobacter pylori*. *Gastroenterol Clin Biol.* 31, 1110-1117.
69. De Korwin, J.D., Lehours, P., 2010. *Helicobacter pylori*: notions fondamentales, épidémiologie, méthodes diagnostiques. *Encycl Med Chir* 1–16.
70. De Korwin, J.D., Kalach, N., Raymond, J.,Burucoa,C., 2014. Prise en charge diagnostique et thérapeutique en cas d'infection à *Helicobacter pylori*. *EMC-gastroentérologie*.93,1-11.
71. De Korwin, J.-D., 2016. Nouvelles recommandations sur la prise en charge des patients infectés par *Helicobacter pylori*.
72. De Vries, A.C.,Kuipers, E.J.,2007. Epidemiology of premalignant gastric lesions: implications for the development of screening and surveillance strategies. *Helicobacter* .2, 22-31.
73. Delchier, J.C., Malfertheiner, P., Thieroff-Ekerdt, R., 2014. Use of a combination formulation of bismuth, metronidazole and tetracycline with omeprazole as a rescue therapy for eradication of *Helicobacter pylori*. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 40, 171–177. <https://doi.org/10.1111/apt.12808>.
74. Ding, S.-Z., Minohara, Y., Fan, X.J., Wang, J., Reyes, V.E., Patel, J., Dirden-Kramer, B., Boldogh, I., Ernst, P.B., Crowe, S.E., 2007. *Helicobacter pylori* Infection Induces Oxidative Stress and Programmed Cell Death in Human Gastric Epithelial Cells. *Infect. Immun.* 75, 4030–4039. <https://doi.org/10.1128/IAI.00172-07>.
75. Dixon, M.F., Genta, R.M., Yardley, J.H., Correa, P., the Participants in the International Workshop on the Histopathology of Gastritis, H. 1994, 1996. Classification and Grading of Gastritis: The Updated Sydney System. *Am. J. Surg. Pathol.* 20, 1161.

76. Djennane-Hadibi, F., Bachtarzi, M., Layaida, K., Ali Arous, N., Nakmouche, M., Saadi, B., Tazir, M., Ramdani-Bouguessa, N., Burucoa, C., 2016. High-Level Primary Clarithromycin Resistance of *Helicobacter pylori* in Algiers, Algeria: A Prospective Multicenter Molecular Study. *Microb. Drug Resist.* 22, 223–226. doi:10.1089/mdr.2015.0209.
77. Ducournau, A., Bénéjat, L., Sifré, E., Bessède, E., Lehours, P., Mégraud, F., 2016. *Helicobacter pylori* resistance to antibiotics in 2014 in France detected by phenotypic and genotypic methods. *Clin. Microbiol. Infect.* 22, 715–718. doi:10.1016/j.cmi.2016.06.003.
78. Eaton, K.A., Brooks, C.L., Morgan, D.R., Krakowka, S., 1991. Essential role of urease in pathogenesis of gastritis induced by *Helicobacter pylori* in gnotobiotic piglets. *Infect. Immun.* 59, 2470–2475.
79. Eaton, K.A., Suerbaum, S., Josenhans, C., Krakowka, S., 1996. Colonization of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori* deficient in two flagellin genes. *Infect Immun.* 64, 2445–2448.
80. El-Omar, E.M., Carrington, M., Chow, W.-H., McColl, K.E.L., Bream, J.H., Young, H.A., Herrera, J., Lissowska, J., Yuan, C.-C., Rothman, N., Lanyon, G., Martin, M., Fraumeni, J.F., Rabkin, C.S., 2000. Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer. *Nature* 404, 398–402. <https://doi.org/10.1038/35006081>.
81. El-Omar, E.M., Rabkin, C.S., Gammon, M.D., Vaughan, T.L., Risch, H.A., Schoenberg, J.B., Stanford, J.L., Mayne, S.T., Goedert, J., Blot, W.J., others, 2003. Increased risk of noncardia gastric cancer associated with proinflammatory cytokine gene polymorphisms. *Gastroenterology* 124, 1193–1201.
82. Falush, D., Al, E., Falush, D., Wirth, T., Linz, B., Pritchard, J.K., Stephens, M., Kidd, M., Perez-perez, G.I., Yamaoka, Y., Mégraud, F., Otto, K., Reichard, U., Katzowitsch, E., Wang, X., Achtman, M., Suerbaum, S., 2003. Traces of human migrations in *Helicobacter pylori* populations. *Science* 299, 1582–1585.

- 83.** Farinati, F., Cardin, R., Degan, P., Rugge, M., Di Mario, F., Bonvicini, P., Naccarato, R., 1998. Oxidative DNA damage accumulation in gastric carcinogenesis. *Gut* 42, 351–356. <https://doi.org/10.1136/gut.42.3.351>.
- 84.** Faundez, G., Troncoso, M., Figueroa, G., 2002. *cagA* and *vacA* in strains of *Helicobacter pylori* from ulcer and non-ulcerative dyspepsia patients. *BMC Gastroenterol.* 2, 20. <https://doi.org/10.1186/1471-230X-2-20>.
- 85.** Feng, L., Wen, M.-Y., Zhu, Y.-J., Men, R.-T., Yang, L., 2016. Sequential Therapy or Standard Triple Therapy for *Helicobacter pylori* Infection: An Updated Systematic Review. *Am. J. Ther.* 23, e880-893. <https://doi.org/10.1097/MJT.0000000000000191>.
- 86.** Franco, A.T., Johnston, E., Krishna, U., Yamaoka, Y., Israel, D.A., Nagy, T.A., Wroblewski, L.E., Piazuelo, M.B., Correa, P., Peek, R.M., 2008. Regulation of Gastric Carcinogenesis by *Helicobacter pylori* Virulence Factors. *Cancer Res.* 68, 379–387. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-0824>.
- 87.** Frenck, R.W., Clemens, J., 2003. *Helicobacter* in the developing world. *Microbes Infect., Helicobacter pylori: epidemiology, virulence, immune responses, and vaccine approaches* 5, 705–713. [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(03\)00112-6](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(03)00112-6).
- 88.** Frugis, S., Czczeko, N.G., Malafaia, O., Parada, A.A., Poletti, P.B., Secchi, T.F., Degiovani, M., Rampanazzo-Neto, A., 2016. Prevalence of *Helicobacter pylori* ten years ago compared to the current prevalence in patients undergoing upper endoscopy. *ABCD Arq. Bras. Cir. Dig. São Paulo* 29, 151–154.
- 89.** Galmiche, A., 2000. The N-terminal 34 kDa fragment of *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin targets mitochondria and induces cytochrome c release. *EMBO J.* 19, 6361–6370. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.23.6361>.
- 90.** Gancz, H., Jones, K.R., Merrell, D.S., 2008. Sodium Chloride Affects *Helicobacter pylori* Growth and Gene Expression. *J. Bacteriol.* 190, 4100–4105. <https://doi.org/10.1128/JB.01728-07>.
- 91.** Garner, J.A., Cover, T.L., 1996. Binding and Internalization of the *Helicobacter pylori* Vacuolating Cytotoxin by Epithelial Cells. *Infect Immun.* 64, 4197-4203.

92. Garrity, G.M., Bell, J.A., Lilburn, T., 2005. Family I. *Rhodobacteraceae* fam. nov. Bergeys Man. Syst. Bacteriol. 2, 161.
93. Gatta, L., Vakil, N., Vaira, D., Scarpignato, C., 2013. Global eradication rates for *Helicobacter pylori* infection: systematic review and meta-analysis of sequential therapy. *BMJ* 347, f4587–f4587. <https://doi.org/10.1136/bmj.f4587>.
94. Gerhard, M., Lehn, N., Neumayer, N., Borén, T., Rad, R., Schepp, W., Miehke, S., Classen, M., Prinz, C., 1999. Clinical relevance of the *Helicobacter pylori* gene for blood-group antigen-binding adhesin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96, 12778–12783. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.22.12778>.
95. Gerrits, M.M., de Zoete, M.R., Arents, N.L.A., Kuipers, E.J., Kusters, J.G., 2002. 16S rRNA mutation-mediated tetracycline resistance in *Helicobacter pylori*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 2996–3000.
96. Gerrits, M.M., Schuijffel, D., van Zwet, A.A., Kuipers, E.J., Vandenbroucke-Grauls, C.M.J.E., Kusters, J.G., 2002. Alterations in penicillin-binding protein 1A confer resistance to beta-lactam antibiotics in *Helicobacter pylori*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 2229–2233.
97. Gerrits, M.M., Berning, M., Van Vliet, A.H.M., Kuipers, E.J., Kusters, J.G., 2003. Effects of 16S rRNA Gene Mutations on Tetracycline Resistance in *Helicobacter pylori*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 2984–2986. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.9.2984-2986.2003>.
98. Gerrits, M.M., Godoy, A.P.O., Kuipers, E.J., Ribeiro, M.L., Stoof, J., Mendonça, S., van Vliet, A.H.M., Pedrazzoli, J., Kusters, J.G., 2006. Multiple mutations in or adjacent to the conserved penicillin-binding protein motifs of the penicillin-binding protein 1A confer amoxicillin resistance to *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* 11, 181–187. doi:10.1111/j.1523-5378.2006.00398.x.
99. Ghaith, D., Elzahry, M., Mostafa, G., Mostafa, S., Elsherif, R., Ramzy, I., 2016. Mutations affecting domain V of the 23S rRNA gene in *Helicobacter pylori* from Cairo, Egypt. *J. Chemother.* 28, 367–370. <https://doi.org/10.1179/1973947815Y.0000000067>.

- 100.** Ghotaslou, R., Leylabadlo, H.E., Asl, Y.M., 2015. Prevalence of antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*: A recent literature review. *World J. Methodol.* 5, 164–174. <https://doi.org/10.5662/wjm.v5.i3.164>.
- 101.** Giannakis, M., Chen, S.L., Karam, S.M., Engstrand, L., Gordon, J.I., 2008. *Helicobacter pylori* evolution during progression from chronic atrophic gastritis to gastric cancer and its impact on gastric stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 4358–4363. <https://doi.org/10.1073/pnas.0800668105>.
- 102.** Glocker, E., Berning, M., Gerrits, M.M., Kusters, J.G., Kist, M., 2005. Real-time PCR screening for 16S rRNA mutations associated with resistance to tetracycline in *Helicobacter pylori*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 3166–3170.
- 103.** Glupczynski, Y., Mégraud, F., Lopez-Brea, M., Andersen, L.P., 2001. European multicentre survey of in vitro antimicrobial resistance in *Helicobacter pylori*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol.* 20, 820–823.
- 104.** Goddard, A.F., James, M.W., McIntyre, A.S., Scott, B.B., on behalf of the British Society of Gastroenterology., 2011. Guidelines for the management of iron deficiency anaemia. *Gut.* 60, 1309-16. doi:10.1136/gut.2010.228874.
- 105.** González, C.A., Figueiredo, C., Lic, C.B., Ferreira, R.M., Pardo, M.L., Ruiz Liso, J.M., Alonso, P., Sala, N., Capella, G., Sanz-Anquela, J.M., 2011. *Helicobacter pylori*. *cagA* and *vacA* genotypes as predictors of progression of gastric preneoplastic lesions: a long-term follow-up in a high-risk area in Spain. *Am. J. Gastroenterol.* 106, 867–874. <https://doi.org/10.1038/ajg.2011.1>.
- 106.** González-Vázquez, R., Herrera-González, S., Cordova-Espinoza, M.G., Zúñiga, G., Giono-Cerezo, S., Hernández-Hernández, J.M., León-Ávila, G., 2012. *Helicobacter pylori*: Detection of *iceA1* and *iceA2* Genes in the Same Strain in Mexican Isolates. *Arch. Med. Res.* 43, 339–346. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2012.07.009>.
- 107.** Goodwin, C.S., Armstrong, J.A., Chilvers, T., Peters, M., Collins, M.D., Sly, L., McConnell, W., Harper, W.E., 1989. Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen. nov. as *Helicobacter pylori*. comb.

nov. and *Helicobacter mustelae* comb. nov., respectively. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 39, 397–405.

108. Gotteland, M., Brunser, O., Cruchet, S., 2006. Systematic review: are probiotics useful in controlling gastric colonization by *Helicobacter pylori*? Aliment Pharmacol Ther. 23, 1077-1186.

109. Graham, D.Y., 2004. Challenge model for *Helicobacter pylori* infection in human volunteers. Gut 53, 1235–1243. <https://doi.org/10.1136/gut.2003.037499>

110. Granstrom, M., Tindberg, Y., Blennow, M., 1997. Seroepidemiology of *Helicobacter pylori* infection in a cohort of children monitored from 6 months to 11 years of age. J Clin Microbiol., 35, 468-70.

111. Gressmann, H., Linz, B., Ghai, R., Pleissner, K.-P., Schlapbach, R., Yamaoka, Y., Kraft, C., Suerbaum, S., Meyer, T.F., Achtman, M., 2005. Gain and Loss of Multiple Genes During the Evolution of *Helicobacter pylori*. PLoS Genet. 1, e43. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0010043>.

112. Glupczynski, Y., 1997. Sensibilité des *Helicobacter pylori* aux agents antimicrobiens. Helicobacter Pylori 2, 317–340.

113. Grubman, A., Kaparakis, M., Viala, J., Allison, C., Badea, L., Karrar, A., Boneca, I.G., Le Bourhis, L., Reeve, S., Smith, I.A., Hartland, E.L., Philpott, D.J., Ferrero, R.L., 2010. The innate immune molecule, NOD1, regulates direct killing of *Helicobacter pylori* by antimicrobial peptides. Cell. Microbiol. 12, 626–639. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2009.01421.x>.

114. Guarner, F., Aamir, G., Khan, A.G., Garisch, J., Eliakim, R., Gangl, A., Thomson, A., Krabshuis, J., Le Mair, T., 2008. Recommandation Pratique : Probiotiques et Prébiotiques. Organisation World Gastroenterologie.

115. Harris, P.R., Ernst, P.B., Kawabata, S., Kiyono, H., Graham, M.F., Smith, P.D., 1998. Recombinant *Helicobacter pylori* Urease Activates Primary Mucosal Macrophages. J. Infect. Dis. 178, 1516–1520. <https://doi.org/10.1086/314426>.

116. Harrison, U., Fowora, M.A., Seriki, A.T., Loell, E., Mueller, S., Ugo-Ijeh, M., Onyekwere, C.A., Lesi, O.A., Otegbayo, J.A., Akere, A., Ndububa, D.A., Adekanle,

O., Anomneze, E., Abdulkareem, F.B., Adeleye, I.A., Crispin, A., Rieder, G., Fischer, W., Smith, S.I., Haas, R., 2017. *Helicobacter pylori*. strains from a Nigerian cohort show divergent antibiotic resistance rates and a uniform pathogenicity profile. PLoS ONE 12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176454>.

117. Hatakeyama, M., 2009. *Helicobacter pylori*. and gastric carcinogenesis. J. Gastroenterol. 44, 239–248. <https://doi.org/10.1007/s00535-009-0014-1>.

118. Hazell, S.L., Evans Jr, D.J., Graham, D.Y., 1991. *Helicobacter pylori*. catalase. Microbiology 137, 57–61.

119. Heep, M., Beck, D., Bayerdörffer, E., Lehn, N., 1999. Rifampin and Rifabutin Resistance Mechanism in *Helicobacter pylori*.. Antimicrob. Agents Chemother. 43, 1497–1499. <https://doi.org/10.1128/AAC.43.6.1497>.

120. Heep, M., Rieger, U., Beck, D., Lehn, N., 2000. Mutations in the Beginning of the rpoB Gene Can Induce Resistance to Rifamycins in both *Helicobacter pylori*. and Mycobacterium tuberculosis. Antimicrob. Agents Chemother. 44, 1075–1077. <https://doi.org/10.1128/AAC.44.4.1075-1077.2000>.

121. Higashi, H., Tsutsumi, R., Muto, S., Sugiyama, T., Azuma, T., Asaka, M., Hatakeyama, M., 2002. SHP-2 tyrosine phosphatase as an intracellular target of *Helicobacter pylori*. CagA protein. Science 295, 683–686. doi:10.1126/science.1067147.

122. Hunt, R.H., Xiao, S.D. Megraud, F., Leon-Barua, R.,Bazzoli, F., Van der Merwe, S., VazCoelho, L.G., Fock,M., Fedail, S., Cohen, H., Malfertheiner, P., Vakil, N.,Hamid, S., Goh, K.L., Wong, B.C.Y., Krabshuis, J. and Le Mair, A. 2011. *Helicobacter pylori*. in developing countries. World Gastroenterology Organisation. J Gastrointestin Liver Dis. 20 ,299-304.

123. Hussein, N.R., Mohammadi, M., Talebkhan, Y., Doraghi, M., Letley, D.P., Muhammad, M.K., Argent, R.H., Atherton, J.C., 2008. Differences in Virulence Markers between *Helicobacter pylori*. Strains from Iraq and Those from Iran: Potential Importance of Regional Differences in *H. pylori*-Associated Disease. J. Clin. Microbiol. 46, 1774–1779. <https://doi.org/10.1128/JCM.01737-07>.

- 124.** Isomoto, H., Inoue, K., Shikuwa, S., Furusu, H., Nishiyama, T., Omagari, K., Mizuta, Y., Murase, K., Murata, I., Enjoji, A., Kanematsu, T., Kohno, S., 2002. Five minute endoscopic urea breath test with 25 mg of ^{13}C -urea in the management of *Helicobacter pylori*. infection. Eur. J. Gastroenterol. Hepatol. 14, 1093.
- 125.** Israel, D.A., Salama, N., Krishna, U., Rieger, U.M., Atherton, J.C., Falkow, S., Peek, R.M., 2001. *Helicobacter pylori*. genetic diversity within the gastric niche of a single human host. Proc. Natl. Acad. Sci. 98, 14625–14630. <https://doi.org/10.1073/pnas.251551698>.
- 126.** Ito, Y., Azuma, T., Ito, S., Miyaji, H., Hirai, M., Yamazaki, Y., Sato, F., Kato, T., Kohli, Y., Kuriyama, M., 1997. Analysis and typing of the vacA gene from cagA-positive strains of *Helicobacter pylori*. isolated in Japan. J. Clin. Microbiol. 35, 1710–1714.
- 127.** Jakszyn, P., González, C.A., 2006. Nitrosamine and related food intake and gastric and oesophageal cancer risk: a systematic review of the epidemiological evidence. World J. Gastroenterol. WJG 12, 4296.
- 128.** Jang, S., Jones, K.R., Olsen, C.H., Joo, Y.M., Yoo, Y.-J., Chung, I.-S., Cha, J.-H., Merrell, D.S., 2010. Epidemiological Link between Gastric Disease and Polymorphisms in VacA and CagA. J. Clin. Microbiol. 48, 559–567. <https://doi.org/10.1128/JCM.01501-09>
- 129.** Jaworski, W., 1899. Podrecznik chorób żo³dka (Handbook of Gastric Diseases). Wydawnictwa Dzie Lekarskich Polskich. 30-47.
- 130.** Josenhans, C., Labigne, A., Suerbaum, S., 1995. Comparative ultrastructural and functional studies of *Helicobacter pylori*. and *Helicobacter pylori*. flagellin mutants: both flagellin subunits, FlaA and FlaB, are necessary for full motility in *Helicobacter* species. J. Bacteriol. 177, 3010–3020. <https://doi.org/10.1128/jb.177.11.3010-3020.1995>.
- 131.** Jung, S.W., Sugimoto, M., Graham, D.Y., Yamaoka, Y., 2009. homB Status of *Helicobacter pylori*. as a Novel Marker To Distinguish Gastric Cancer from Duodenal Ulcer. J. Clin. Microbiol. 47, 3241–3245. <https://doi.org/10.1128/JCM.00293-09>.

- 132.** Kelly, D.J., 1998. The physiology and metabolism of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. Adv. Microb. Physiol. 40, 137–189.
- 133.** Kikuchi, S., 2002. Epidemiology of *Helicobacter pylori* and gastric cancer. Gastric Cancer 5, 6–15. <https://doi.org/10.1007/s101200200001>
- 134.** Kim, S.-Y., Lee, Y.-C., Kim, H.K., Blaser, M.J., 2006. *Helicobacter pylori*. CagA transfection of gastric epithelial cells induces interleukin-8. Cell. Microbiol. 8, 97–106. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2005.00603.x>.
- 135.** Kobayashi, M., Tsubono, Y., Sasazuki, S., Sasaki, S., Tsugane, S., JPHC Study Group, 2002. Vegetables, fruit and risk of gastric cancer in Japan: A 10-year follow-up of the JPHC study Cohort I. Int. J. Cancer 102, 39–44. <https://doi.org/10.1002/ijc.10659>.
- 136.** Koivisto, T.T., Voutilainen, M.E., Färkkilä, M.A., 2008. Effect of smoking on gastric histology in *Helicobacter pylori*-positive gastritis. Scand. J. Gastroenterol. 43, 1177–1183. <https://doi.org/10.1080/00365520802116430>.
- 137.** Krienitz, W., 1906. Ueber das Auftreten von Spirochäten verschiedener Form in Mageninhalt bei Carcinoma ventriculi. DMW-Dtsch. Med. Wochenschr. 32, 872–872.
- 138.** Kuipers, E.J., 1999. Review article: exploring the link between *Helicobacter pylori* and gastric cancer. Aliment. Pharmacol. Ther. 13, 3–11.
- 139.** Kusters, J.G., Gerrits, M.M., Van Strijp, J.A., Vandenbroucke-Grauls, C. M., 1997. Coccoid forms of *Helicobacter pylori* are the morphologic manifestation of cell death. Infect Immun. 65, 3672–9.
- 140.** Kusters, J.G., van Vliet, A.H.M., Kuipers, E.J., 2006. Pathogenesis of *Helicobacter pylori*. Infection. Clin. Microbiol. Rev. 19, 449–490. <https://doi.org/10.1128/CMR.00054-05>.
- 141.** Kuwahara, H., Miyamoto, Y., Akaike, T., Kubota, T., Sawa, T., Okamoto, S., Maeda, H., 2000. *Helicobacter pylori*. Urease Suppresses Bactericidal Activity of Peroxynitrite via Carbon Dioxide Production. Infect. Immun. 68, 4378–4383. <https://doi.org/10.1128/IAI.68.8.4378-4383.2000>.

- 142.** Kwon, D.H., Dore, M.P., Kim, J.J., Kato, M., Lee, M., Wu, J.Y., Graham, D.Y., 2003. High-Level β -Lactam Resistance Associated with Acquired Multidrug Resistance in *Helicobacter pylori*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 2169–2178. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.7.2169-2178.2003>.
- 143.** Labigne, A., 1994. Existe t-il différentes souches pathogènes de *Helicobacter pylori*. *Gastrographies.* 6-7.
- 144.** Labigne, A., 2003 . Gastroentérologie Clinique et Biologique : Quels sont les facteurs de virulence de *Helicobacter pylori*. 27, 401-408.
- 145.** Lahbabi, M., Alaoui, S., El Rhazi, K., El Abkari, M., Nejjari, C., Amarti, A., Bennani, B., Mahmoud, M., Ibrahim, A., Benajah, D.A., 2013. Sequential therapy versus standard triple-drug therapy for *Helicobacter pylori*. eradication: Result of the HPFEZ randomised study. *Clin. Res. Hepatol. Gastroenterol.* 37, 416–421. <https://doi.org/10.1016/j.clinre.2012.10.002>
- 146.** Lamarque, D., Nhieu, J.T.V., Bréban, M., Delchier, J.C., 2002. La réponse inflammatoire gastrique dans l'infection par *Helicobacter pylori*. EMC (Elsevier Masson SAS, Paris).*Gastroenterol Clin Biol.*26, 162-170.
- 147.** Lamarque, D., Nhieu, J.T.V., Bréban, M., 2003. Quelles sont les modifications gastriques induites par l'infection aiguë et chronique par *Helicobacter pylori*? *Gastroentérologie Clin. Biol.* 27, 391–400.
- 148.** Lamarque, D., Burucoa, C., Courillon-Mallet, A., de Korwin, J.-D., Delchier, J.-C., Fauchère, J.-L., Kalach, N., Labigne, A., Lehours, P., Mégraud, F., 2012. Révision des recommandations françaises sur la prise en charge de l'infection par *Helicobacter pylori*. *Hépatogastro Oncol. Dig.* 19, 475–494.
- 149.** Lambert, T., Mégraud, F., Gerbaud, G., Courvalin, P., 1986. Susceptibility of *Campylobacter pyloridis* to 20 antimicrobial agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* 30, 510–511.
- 150.** Lamoutiatte, H., Mégraud, F., Cayla, R., 1992. *Helicobacter pylori* et pathologies gastroduodénale. Editions techniques,encyclo-Med. *Gastroentérologie.* 9021E:1-12.

- 151.** Lamouliatte, H., Megraud, F., Delchier, J.-C., Bretagne, J.-F., Courillon-Mallet, A., De Korwin, J.-D., Fauchere, J.-L., Labigne, A., Flejou, J.-F., Barthelemy, P., FOR A MULTICENTRE STUDY GROUP*, 2003. Second-line treatment for failure to eradicate *Helicobacter pylori*: a randomized trial comparing four treatment strategies. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 18, 791–797. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2036.2003.01759.x>.
- 152.** Lee, S.K., Stack, A., Katzowitsch, E., Aizawa, S.I., Suerbaum, S., Josenhans, C., 2003. *Helicobacter pylori* flagellins have very low intrinsic activity to stimulate human gastric epithelial cells via TLR5. *Microbes Infect.* 5, 1345–1356. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2003.09.018>.
- 153.** Lehours, P., 2003. *Helicobacter pylori*. et les autres. *Gastroentérologie Clin. Biol.* 27, 367–373.
- 154.** Leying, H., Suerbaum, S., Geis, G., Haas, R., 1992. Cloning and genetic characterization of a *Helicobacter pylori* flagellin gene. *Mol. Microbiol.* 6, 2863–2874.
- 155.** Li, B.-Z., Threapleton, D.E., Wang, J.-Y., Xu, J.-M., Yuan, J.-Q., Zhang, C., Li, P., Ye, Q.-L., Guo, B., Mao, C., Ye, D.-Q., 2015. Comparative effectiveness and tolerance of treatments for *Helicobacter pylori*: systematic review and network meta-analysis. *BMJ* h4052. <https://doi.org/10.1136/bmj.h4052>
- 156.** Linz, B., Balloux, F., Moodley, Y., Manica, A., Liu, H., Roumagnac, P., Falush, D., Stamer, C., Prugnolle, F., van der Merwe, S.W., Yamaoka, Y., Graham, D.Y., Perez-Trallero, E., Wadstrom, T., Suerbaum, S., Achtman, M., 2007. An African origin for the intimate association between humans and *Helicobacter pylori*. *Nature* 445, 915–918. <https://doi.org/10.1038/nature05562>.
- 157.** Loh, J.T., Torres, V.J., Cover, T.L., 2007. Regulation of *Helicobacter pylori* cagA Expression in Response to Salt. *Cancer Res.* 67, 4709–4715. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-4746>.
- 158.** Lu, H., Wu, J.Y., Kudo, T., Ohno, T., Graham, D.Y., Yamaoka, Y., 2005. Regulation of Interleukin-6 Promoter Activation in Gastric Epithelial Cells Infected

with *Helicobacter pylori*. Mol. Biol. Cell 16, 4954–4966. <https://doi.org/10.1091/mbc.e05-05-0426>.

159. Lu, H., Wu, J.Y., Beswick, E.J., Ohno, T., Odenbreit, S., Haas, R., Reyes, V.E., Kita, M., Graham, D.Y., Yamaoka, Y., 2007. Functional and Intracellular Signaling Differences Associated with the *Helicobacter pylori* AlpAB Adhesin from Western and East Asian Strains. J. Biol. Chem. 282, 6242–6254. <https://doi.org/10.1074/jbc.M611178200>.

160. Malfertheiner, P., Megraud, F., O’Morain, C., Bazzoli, F., El-Omar, E., Graham, D., Hunt, R., Rokkas, T., Vakil, N., Kuipers, E.J., 2007. Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection: the Maastricht III Consensus Report. Gut 56, 772–781. <https://doi.org/10.1136/gut.2006.101634>.

161. Malfertheiner, P., Megraud, F., O’Morain, C.A., Atherton, J., Axon, A.T., Bazzoli, F., Gensini, G.F., Gisbert, J.P., Graham, D.Y., Rokkas, T., 2012. Management of *Helicobacter pylori* infection—the Maastricht IV/Florence consensus report. Gut 61, 646–664.

162. Malfertheiner, P., Megraud, F., O’Morain, C.A., Gisbert, J.P., Kuipers, E.J., Axon, A.T., Bazzoli, F., Gasbarrini, A., Atherton, J., Graham, D.Y., Hunt, R., Moayyedi, P., Rokkas, T., Rugge, M., Selgrad, M., Suerbaum, S., Sugano, K., El-Omar, E.M., 2017. Management of *Helicobacter pylori* infection—the Maastricht V/Florence Consensus Report. Gut 66, 6–30. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2016-312288>.

163. Manente, L., Perna, A., Buommino, E., Altucci, L., Lucariello, A., Citro, G., Baldi, A., Iaquinto, G., Tufano, M.A., De Luca, A., 2008. The *Helicobacter pylori*’s protein VacA has direct effects on the regulation of cell cycle and apoptosis in gastric epithelial cells. J. Cell. Physiol. 214, 582–587. <https://doi.org/10.1002/jcp.21242>

164. Marais, A., Bilardi, C., Cantet, F., Mendz, G.L., Mégraud, F., 2003. Characterization of the genes *rdxA* and *frxA* involved in metronidazole resistance in *Helicobacter pylori*. Res. Microbiol. 154, 137–144. [https://doi.org/10.1016/S0923-2508\(03\)00030-5](https://doi.org/10.1016/S0923-2508(03)00030-5).

165. Marshall, B., Warren, J.R., 1984. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *The Lancet* 323, 1311–1315.
166. Marshall, B.J., Armstrong, J.A., McGeachie, D.B., Glancy, R.J., 1985. Attempt to fulfil Koch's postulates for pyloric *Campylobacter*. *Med. J. Aust.* 142, 436–439.
167. Marshall, B.J., Goodwin, C.S., Warren, J.R., Murray, R., Blincow, E.D., Blackbourn, S.J., Phillips, M., Waters, T.E., Sanderson, C.R., 1988. Prospective double-blind trial of ulcer relapse after eradication of *Campylobacter pylori*. *Lancet*. 2, 1437-1442.
168. Marshall, B.J., Windsor, H.M., 2005. "The relation of *Helicobacter pylori* to gastric adenocarcinoma and lymphoma: pathophysiology, epidemiology, screening, clinical presentation, treatment, and prevention," *Medical Clinics of North America*. 89, 313–344.
169. McClain, M.S., Shaffer, C.L., Israel, D.A., Peek, R.M., Cover, T.L., 2009. Genome sequence analysis of *Helicobacter pylori* strains associated with gastric ulceration and gastric cancer. *BMC Genomics* 10, 3. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-3>.
170. Mégraud, F., Brassens-Rabbe, M.P., Denis, F., Belbouri, A., Hoa, D.Q., 1989. Seroepidemiology of *Campylobacter pylori* infection in various populations. *J. Clin. Microbiol.* 27, 1870–1873.
171. Mégraud, F., Lamouliatte, H., 1992. *Helicobacter pylori* and duodenal ulcer. Evidence suggesting causation. *Dig. Dis. Sci.* 37, 769–772.
172. Mégraud F. 1993. "Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection." *Gastroenterol Clin North Am* .22, 73-88.
173. Mégraud, F., 1993. *Helicobacter pylori*, chef de file des bactéries du mucus. *Lett. Infect.* 8, 151–159.
174. Mégraud, F., 1994. Quelles sont les particularités de *H. pylori* ? *Gastrographies*. 6.
175. Mégraud, F., 1994. Difficultés pratiques de l'éradication de *Helicobacter pylori*. dans la maladie ulcéreuse duodénale. *Med et hyg.* 52, 1813-1816.

176. Mégraud, F., 1996. Diagnostic bactériologique standard de l'infection à *Helicobacter pylori*. *Helicobacter Pylori* 1, 249–266.
177. Mégraud, F., 1998. Epidemiology and mechanism of antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 115, 1278–1282. [https://doi.org/10.1016/S0016-5085\(98\)70101-5](https://doi.org/10.1016/S0016-5085(98)70101-5).
178. Mégraud, F., Broutet, N., 2000. Epidemiology, acquisition and transmission of *Helicobacter pylori*. *Rev. Prat.* 50, 1414–1417.
179. Mégraud, F., 2003. Quand et comment s'infecte-t-on par *Helicobacter pylori*? *Gastroentérologie Clin. Biol.* 27, 374–379.
180. Mégraud, F., 2004. *H pylori* antibiotic resistance: prevalence, importance, and advances in testing. *Gut.* 53, 1374–1384.
181. Mégraud, F., 2007. Etat de la résistance de *Helicobacter pylori* aux antibiotiques. *La Lettre de l'Hépatogastroentérologue* .X, 5-6.
182. Mégraud, F., Lehours, P., 2007. *Helicobacter pylori* Detection and Antimicrobial Susceptibility Testing. *Clin. Microbiol. Rev.* 20, 280–322. doi:10.1128/CMR.00033-06.
183. Mégraud, F., 2008. *Helicobacter pylori* : caractères bactériologiques, méthodes diagnostiques et sensibilité aux antibiotiques. *Presse Médicale* 37, 507–512. doi:10.1016/j.lpm.2007.07.033.
184. Mégraud, F., 2010. Infection à *Helicobacter pylori* : bonnes pratiques. *Presse Médicale.* 39, 815–822. doi:10.1016/j.lpm.2010.04.004.
185. Mégraud, F., Coenen, S., Versporten, A., 2013. *Helicobacter pylori*. resistance to antibiotics in Europe and its relationship to antibiotic consumption. *Gut.* 62, 34-42.
186. Mégraud, F., Bessède, E., Lehours, P., 2014. Diagnosis of *Helicobacter pylori*. *Infection. Helicobacter* 19, 6–10. <https://doi.org/10.1111/hel.12161>
187. Mégraud, F., Bénéjat, L., Ngoyi, E.N.O., Lehours, P., 2015. Molecular Approaches to Identify *Helicobacter pylori*. *Antimicrobial Resistance. Gastroenterol. Clin.* 44, 577–596. <https://doi.org/10.1016/j.gtc.2015.05.002>.

- 188.** Ménard, A., Santos, A., Mégraud, F., Oleastro, M., 2002. PCR-restriction fragment length polymorphism can also detect point mutation A2142C in the 23S rRNA gene, associated with *Helicobacter pylori* resistance to clarithromycin. *Antimicrob Agents Chemother.* 46, 1156–7.
- 189.** Ménard, A., Buissonnière, A., Prouzet-Mauléon, V., Sifré, E., Mégraud, F., 2016. The GyrA encoded gene: A pertinent marker for the phylogenetic revision of *Helicobacter*. *Syst. Appl. Microbiol.* 39, 77–87. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2015.09.008>.
- 190.** Mentis, A., Lehours, P., Mégraud, F., 2015. Epidemiology and Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 20, 1–7. <https://doi.org/10.1111/hel.12250>
- 191.** Michael, D.B., Carrie, A.D, Jonathan, M.W., Pritchard, D.M., 2017. *Helicobacter pylori* -induced gastric pathology: insights from in vivo and ex vivo models. *Disease Models & Mechanisms.* 10, 89- 104. doi:10.1242/dmm.027649.
- 192.** Midolo, P., Marshall, B.J., 2000. Accurate Diagnosis of *Helicobacter pylori*: Urease Tests. *Gastroenterol. Clin. North Am.* 29, 871–878. [https://doi.org/10.1016/S0889-8553\(05\)70154-0](https://doi.org/10.1016/S0889-8553(05)70154-0).
- 193.** Miendje Deyi, V.Y.,2011. Contribution au management de l'infection à *Helicobacter pylori*. en Belgique. Thèse en ligne. Université Libre de Bruxelles.
- 194.** Minnis, J.A., Taylor, T.E., Knesek, J.E., Peterson, W.L., McIntire, S.A., 1995. Characterization of a 3.5-kbp Plasmid from *Helicobacter pylori*. *Plasmid* 34, 22–36. <https://doi.org/10.1006/plas.1995.1030>.
- 195.** Mitry, E., Lepage, C., Lambert, R., 2011. Épidémiologie du cancer gastrique et rôle de *Helicobacter pylori*. *Cancéro Dig.* <https://doi.org/10.4267/2042/41557>.
- 196.** Molina–Infante, J., Romano, M., Fernandez–Bermejo, M., Federico, A., Gravina, A.G., Pozzati, L., Garcia–Abadia, E., Vinagre–Rodriguez, G., Martinez–Alcala, C., Hernandez–Alonso, M., Miranda, A., Iovene, M.R., Pazos–Pacheco, C., Gisbert, J.P., 2013. Optimized Nonbismuth Quadruple Therapies Cure Most Patients With *Helicobacter pylori* Infection in Populations With High Rates of Antibiotic Resistance. *Gastroenterology* 145, 121-128.e1. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.03.050>.

- 197.** Momtaz, H., Souod, N., Dabiri, H., Sarshar, M., 2012. Study of *Helicobacter pylori* genotype status in saliva, dental plaques, stool and gastric biopsy samples. *World J. Gastroenterol. WJG* 18, 2105–2111. <https://doi.org/10.3748/wjg.v18.i17.2105>.
- 198.** Moore, R.A., Beckthold, B., Wong, S., Kureishi, A., Bryan, L.E., 1995. Nucleotide sequence of the *gyrA* gene and characterization of ciprofloxacin-resistant mutants of *Helicobacter pylori*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39, 107–111. <https://doi.org/10.1128/AAC.39.1.107>.
- 199.** Moran, A.P., 1996. The role of lipopolysaccharide in *Helicobacter pylori* pathogenesis. *Aliment Pharmacol Ther.* 10, 39-50. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2036.1996.22164004.x>.
- 200.** Moran, A.P., Aspinall, G.O., 1997. Unique structural and biological features of *Helicobacter pylori* lipopolysaccharides. *Prog. Clin. Biol. Res.* 397, 37–49.
- 201.** Mustapha, P., 2011. Etude des interactions entre *Helicobacter pylori* et les cellules épithéliales gastriques .Thèse en ligne .Université de Poitiers.
- 202.** Naumann, M., Wessler, S., Bartsch, C., Wieland, B., Covacci, A., Haas, R., Meyer, T.F., 1999. Activation of Activator Protein 1 and Stress Response Kinases in Epithelial Cells Colonized by *Helicobacter pylori* Encoding the *cag* Pathogenicity Island. *J. Biol. Chem.* 274, 31655–31662. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.44.31655>.
- 203.** Navarro-Jarabo, J.M., Fernandez-Sanchez, F., Fernandez-Moreno, N., Hervas-Molina, A.J., Casado-Caballero, F., Puente-Gutierrez, J.J., Pallares-Manrique, H., Rodriguez-Ramos, C., Fernandez-Gutierrez, C., Perez-Aisa, A., Rivas-Ruiz, F., Montiel Quezel-Guerraz, N., 2015. Prevalence of Primary Resistance of *Helicobacter pylori* to Clarithromycin and Levofloxacin in Southern Spain. *Digestion* 92, 78–82. [doi:10.1159/000435949](https://doi.org/10.1159/000435949).
- 204.** Obst, B., Wagner, S., Sewing, K.F., Beil, W., 2000. *Helicobacter pylori* causes DNA damage in gastric epithelial cells. *Carcinogenesis* 21, 1111–1115.
- 205.** Occhialini, A., Urdaci, M., Doucet-Populaire, F., Bébéar, C.M., Lamouliatte, H., Mégraud, F., 1997. Macrolide resistance in *Helicobacter pylori* : rapid detection of

point mutations and assays of macrolide binding to ribosomes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41, 2724–2728.

206. Occhialini, A., Marais, A., Urdaci, M., Sierra, R., Muñoz, N., Covacci, A., Mégraud, F., 2001. Composition and Gene Expression of the *cag* Pathogenicity Island in *Helicobacter pylori* Strains Isolated from Gastric Carcinoma and Gastritis Patients in Costa Rica. *Infect. Immun.* 69, 1902–1908.

207. O'Connor, A., Gisbert, J.P., O'Morain, C., Ladas, S., 2015. Treatment of *Helicobacter pylori* Infection 2015. *Helicobacter* 20, 54–61. <https://doi.org/10.1111/hel.12258>.

208. Odenbreit, S., Till, M., Hofreuter, D., Faller, G., Haas, R., 1999. Genetic and functional characterization of the *alpAB* gene locus essential for the adhesion of *Helicobacter pylori* to human gastric tissue. *Mol. Microbiol.* 31, 1537–1548. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01300.x>.

209. Odenbreit, S., Püls, J., Sedlmaier, B., Gerland, E., Fischer, W., Haas, R., 2000. Translocation of *Helicobacter pylori* CagA into Gastric Epithelial Cells by Type IV Secretion. *Science* 287, 1497–1500. <https://doi.org/10.1126/science.287.5457.1497>

210. Ogiwara, H., Sugimoto, M., Ohno, T., Vilaichone, R.-K., Mahachai, V., Graham, D.Y., Yamaoka, Y., 2009. Role of Deletion Located between the Intermediate and Middle Regions of the *Helicobacter pylori* *vacA* Gene in Cases of Gastrointestinal Diseases. *J. Clin. Microbiol.* 47, 3493–3500. <https://doi.org/10.1128/JCM.00887-09>.

211. Olbermann, P., Josenhans, C., Moodley, Y., Uhr, M., Stamer, C., Vauterin, M., Suerbaum, S., Achtman, M., Linz, B., 2010. A global overview of the genetic and functional diversity in the *Helicobacter pylori* *cag* pathogenicity island. *PLoS Genet.* 6, e1001069.

212. Oleastro, M., Ménard, A., Santos, A., Lamouliatte, H., Monteiro, L., Barthélémy, P., Mégraud, F., 2003. Real-Time PCR Assay for Rapid and Accurate Detection of Point Mutations Conferring Resistance to Clarithromycin in *Helicobacter pylori*. *J. Clin. Microbiol.* 41, 397–402. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.1.397-402.2003>.

- 213.** Ontsira Ngoyi, E.N., Atipo Ibara, B.I., Moyen, R., Ahoui Apendi, P.C., Ibara, J.R., Obengui, O., Ossibi Ibara, R.B., Nguimbi, E., Niama, R.F., Ouamba, J.M., Yala, F., Abena, A.A., Vadivelu, J., Goh, K.L., Ménard, A., Benejat, L., Sifre, E., Lehours, P., Mégraud, F., 2015. Molecular Detection of *Helicobacter pylori* and its Antimicrobial Resistance in Brazzaville, Congo. *Helicobacter*. 20, 316–320. doi:10.1111/hel.12204.
- 214.** Ottemann, K.M., Lowenthal, A.C., 2002. *Helicobacter pylori* uses motility for initial colonization and to attain robust infection. *Infect. Immun.* 70, 1984–1990.
- 215.** Owen, R.J., 1998. *Helicobacter*-species classification and identification. *Br. Med. Bull.* 54, 17–30.
- 216.** Owen, R.J., 2002. Molecular testing for antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*. *Gut* 50, 285–289.
- 217.** Parsonnet, J., Friedman, G.D., Orentreich, N., Vogelman, H., 1997. Risk for gastric cancer in people with CagA positive or CagA negative *Helicobacter pylori* infection. *Gut*. 40, 297–301. <https://doi.org/10.1136/gut.40.3.297>
- 218.** Patel, A., Shah, N., Prajapati, J.B., 2014. Clinical application of probiotics in the treatment of *Helicobacter pylori* infection—A brief review. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 47, 429–437. doi:10.1016/j.jmii.2013.03.010
- 219.** Peek, R.M., Blaser, M.J., Mays, D.J., Forsyth, M.H., Cover, T.L., Song, S.Y., Krishna, U., Pietenpol, J.A., 1999. *Helicobacter pylori* Strain-specific Genotypes and Modulation of the Gastric Epithelial Cell Cycle. *Cancer Res.* 59, 6124–6131.
- 220.** Peek, R.M., Fiske, C., Wilson, K.T., 2010. Role of Innate Immunity in *Helicobacter pylori*-Induced Gastric Malignancy. *Physiol. Rev.* 90, 831–858. <https://doi.org/10.1152/physrev.00039.2009>.
- 221.** Pelayo Correa, M.D., Piazuolo, M.D., 2011. *Helicobacter pylori* Infection and Gastric Adenocarcinoma. *US Gastroenterol Hepatol Rev.* 7, 59–64.
- 222.** Penfold, S.S., Lastovica, A.J., Elisha, B.G., 1988. Demonstration of Plasmids in *Campylobacter pylori*. *J. Infect. Dis.* 157, 850–851. <https://doi.org/10.1093/infdis/157.4.850>.

- 223.** Petitgars, C., 2015. *Helicobacter pylori* : implications pathologiques et actualisations thérapeutiques face aux résistances aux antibiotiques. Thèse en ligne : Université de Nantes UFR sciences pharmaceutiques et biologiques.
- 224.** Raaf, N., Amhis, W., Saoula, H., Abid, A., Nakmouche, M., Balamane, A., Arous, N.A., Ouar-Korichi, M., Vale, F.F., Bénéjat, L., Mégraud, F., 2017. Prevalence, antibiotic resistance, and MLST typing of *Helicobacter pylori* in Algiers, Algeria. *Helicobacter* 22, e12446. <https://doi.org/10.1111/hel.12446>.
- 225.** Raaf, N., 2018. Prévalence de l'infection à *Helicobacter pylori* et typage moléculaire des souches isolées à Alger (Algérie) : Thèse en ligne. Université Ferhat Abbas Sétif 1.
- 226.** Ren, S., Higashi, H., Lu, H., Azuma, T., Hatakeyama, M., 2006. Structural Basis and Functional Consequence of *Helicobacter pylori* CagA Multimerization in Cells. *J. Biol. Chem.* 281, 32344–32352. <https://doi.org/10.1074/jbc.M606172200>.
- 227.** Ren, L., Lu, H., Li, H.Y., Zhu, L.Y., Xu, X.Q., Gu, L.Y., Ge, Z.Z., Li, X.B., 2014. New dual therapy for primary treatment of *Helicobacter pylori* infection: A prospective randomized study in Shanghai, China [WWW Document]. *J. Dig. Dis.* <https://doi.org/10.1111/1751-2980.12186>.
- 228.** Rhead, J.L., Letley, D.P., Mohammadi, M., Hussein, N., Mohagheghi, M.A., Hosseini, M.E., Atherton, J.C., 2007. A New *Helicobacter pylori* Vacuolating Cytotoxin Determinant, the Intermediate Region, Is Associated With Gastric Cancer. *Gastroenterology* 133, 926–936. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.06.056>.
- 229.** Rieder, G., Fischer, W., Haas, R., 2005. Interaction of *Helicobacter pylori* with host cells: function of secreted and translocated molecules. *Curr. Opin. Microbiol., Host--microbe interactions: bacteria* 8, 67–73. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2004.12.004>.
- 230.** Rimbara, E., Noguchi, N., Kawai, T., Sasatsu, M., 2012. Fluoroquinolone Resistance in *Helicobacter pylori* : Role of Mutations at Position 87 and 91 of GyrA on the Level of Resistance and Identification of a Resistance Conferring Mutation in GyrB. *Helicobacter*. <https://doi.org/10.1111/j.1523-5378.2011.00912.x>.

- 231.** Rimbara, E., Sasatsu, M., Graham, D.Y., 2013. PCR Detection of *Helicobacter pylori* in Clinical Samples, in: Wilks, M. (Ed.), PCR Detection of Microbial Pathogens, Methods in Molecular Biology. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 279–287. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-353-4_19.
- 232.** Robinson, K., Argent, R.H., Atherton, J.C., 2007. The inflammatory and immune response to *Helicobacter pylori* infection. Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol., *Helicobacter pylori* 21, 237–259. <https://doi.org/10.1016/j.bpg.2007.01.001>.
- 233.** Roesler, B.M., Rabelo-Gonçalves, E.M.A., Zeitune, J.M.R., 2014. Virulence Factors of *Helicobacter pylori* : A Review. Clin. Med. Insights Gastroenterol. 7, CGast.S13760. <https://doi.org/10.4137/CGast.S13760>.
- 234.** Romo-Gonzalez, C., Salama, N.R., Burgeno-Ferreira, J., Ponce-Castaneda, V., Lazcano-Ponce, E., Camorlinga-Ponce, M., Torres, J., 2009. Differences in Genome Content among *Helicobacter pylori* Isolates from Patients with Gastritis, Duodenal Ulcer, or Gastric Cancer Reveal Novel Disease-Associated Genes. Infect. Immun. 77, 2201–2211. <https://doi.org/10.1128/IAI.01284-08>.
- 235.** Sahi, M., 1998 . *Helicobacter pylori* : son incrimination dans la Genèse de la pathologie ulcéreuse Gastrodudenal et le Cancer Gastrique : Thèse en ligne. Université Aboubekr Belkaid-Tlemcen.
- 236.** Salama, N., Guillemin, K., McDaniel, T.K., Sherlock, G., Tompkins, L., Falkow, S., 2000. A whole-genome microarray reveals genetic diversity among *Helicobacter pylori* strains. Proc. Natl. Acad. Sci. 97, 14668–14673.
- 237.** Salles, N., Mégraud, F., 2007. Current Management of *Helicobacter pylori* Infections in the Elderly. Expert Rev Anti Infect Ther. 5, 845-856.
- 238.** Sardarian, H., Fakheri, H., Hosseini, V., Taghvaei, T., Maleki, I., Mokhtare, M., 2013. Comparison of Hybrid and Sequential Therapies for *Helicobacter pylori* Eradication in Iran: A Prospective Randomized Trial. Helicobacter. <https://doi.org/10.1111/hel.12017>.

- 239.** Schubert, M.L., Peura, D.A., 2008. Control of Gastric Acid Secretion in Health and Disease. *Gastroenterology* 134, 1842–1860. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.05.021>.
- 240.** Seck, A., Burucoa, C., Dia, D., Mbengue, M., Onambele, M., Raymond, J., Breurec, S., 2013. Primary antibiotic resistance and associated mechanisms in *Helicobacter pylori* isolates from Senegalese patients. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 12, 3. <https://doi.org/10.1186/1476-0711-12-3>.
- 241.** Selbach, M., Moese, S., Backert, S., Jungblut, P.R., Meyer, T.F., 2004. The *Helicobacter pylori* CagA protein induces tyrosine dephosphorylation of ezrin. *Proteomics* 4, 2961–2968.
- 242.** Shiota, S., Suzuki, R., Yamaoka, Y., 2013. The significance of virulence factors in *Helicobacter pylori*: Virulence factors in *H. pylori*. *J. Dig. Dis.* 14, 341–349. <https://doi.org/10.1111/1751-2980.12054>.
- 243.** Simoons-Smit, I.M., Appelmelk, B.J., Verboom, T., Negrini, R., Penner, J.L., Aspinall, G.O., Moran, A.P., Fei, S.F., Bi-Shan, S., Rudnica, W., Savio, A., 1996. Typing of *Helicobacter pylori* with Monoclonal Antibodies against Lewis Antigens in Lipopolysaccharide. *J CLIN MICROBIOL* 34, 5.
- 244.** Sipponen, P., Marshall, B.J., 2000. Gastritis and gastric cancer. Western countries. *Gastroenterol Clin North Am.* 29, 579-592. [https://doi.org/10.1016/S0889-8553\(05\)70131-X](https://doi.org/10.1016/S0889-8553(05)70131-X).
- 245.** Smith, S.M., Moran, A.P., Duggan, S.P., Ahmed, S.E., Mohamed, A.S., Windle, H.J., O'Neill, L.A., Kelleher, D.P., 2011. Tribbles 3: A Novel Regulator of TLR2-Mediated Signaling in Response to *Helicobacter pylori* Lipopolysaccharide. *J. Immunol.* 186, 2462–2471. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1000864>
- 246.** Smoot, D.T., Mobley, H.L.T., Chippendale, G.R., Lewison, J.F., Resau, J.H., 1990. *Helicobacter pylori* Urease Activity Is Toxic to Human Gastric Epithelial Cells. *Infect Immun* 58, 1992-1994.
- 247.** Sobhani, I., Pospai, I., Mignon, M., Fléjou, J.F., 2000. *Helicobacter pylori* : épidémiologie, mécanisme d'altération de la muqueuse gastrique et diagnostic bactériologique. *Traité Gastroentérologie* 25, 329–343.

- 248.** Spiegelhalder, C., Gerstenecker, B., Kersten, A., Schiltz, E., Kist, M., 1993. Purification of *Helicobacter pylori* superoxide dismutase and cloning and sequencing of the gene. *Infect. Immun.* 61, 5315–5325.
- 249.** Stasi, R., Sarpatwari, A., Segal, J.B., Osborn, J., Evangelista, M.L., Cooper, N., Provan, D., Newland, A., Amadori, S., Bussel, J.B., 2009. Effects of eradication of *Helicobacter pylori* infection in patients with immune thrombocytopenic purpura: a systematic review. *Blood* 113, 1231–1240. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-07-167155>.
- 250.** Steer, H.W., 1975. Ultrastructure of cell migration through the gastric epithelium and its relationship to bacteria. *J. Clin. Pathol.* 28, 639–646.
- 251.** Stein, M., Bagnoli, F., Halenbeck, R., Rappuoli, R., Fantl, W.J., Covacci, A., 2002. c-Src/Lyn kinases activate *Helicobacter pylori* CagA through tyrosine phosphorylation of the EPIYA motifs. *Mol. Microbiol.* 43, 971–980.
- 252.** Stone, G.G., Shortridge, D., Versalovic, J., Beyer, J., Flamm, R.K., Graham, D.Y., Ghoneim, A.T., Tanaka, S.K., 1997. A PCR-oligonucleotide ligation assay to determine the prevalence of 23S rRNA gene mutations in clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41, 712–714.
- 253.** Suerbaum, S., Josenhans, C., Labigne, A., 1993. Cloning and genetic characterization of the *Helicobacter pylori* and *Helicobacter mustelae* flaB flagellin genes and construction of *H. pylori* flaA- and flaB-negative mutants by electroporation-mediated allelic exchange. *J. Bacteriol.* 175, 3278–3288.
- 254.** Suerbaum, S., Michetti, P., 2002. *Helicobacter pylori* infection. *N Engl J Med* 347, 1175–86.
- 255.** Suzuki, M., Mimuro, H., Suzuki, T., Park, M., Yamamoto, T., Sasakawa, C., 2005. Interaction of CagA with Crk plays an important role in *Helicobacter pylori* – induced loss of gastric epithelial cell adhesion. *J. Exp. Med.* 202, 1235–1247. <https://doi.org/10.1084/jem.20051027>.
- 256.** Suzuki, H., Saito, Y., Hibi, T., 2009. *Helicobacter pylori* and Gastric Mucosa-associated Lymphoid Tissue (MALT) Lymphoma: Updated Review of Clinical Outcomes and the Molecular Pathogenesis. *Gut Liver.* 3, 81–87.

- 257.** Suzuki, R., Shiota, S., Yamaoka, Y., 2012. Molecular epidemiology, population genetics, and pathogenic role of *Helicobacter pylori*. *Infect. Genet. Evol.* 12, 203–213. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.12.002>.
- 258.** Tan, S., Tompkins, L.S., Amieva, M.R., 2009. *Helicobacter pylori* Usurps Cell Polarity to Turn the Cell Surface into a Replicative Niche. *PLOS Pathog.* 5, e1000407. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000407>.
- 259.** Tankovic, J., Lascols, C., Sculo, Q., Petit, J.-C., Soussy, C.-J., 2003. Single and Double Mutations in *gyrA* but Not in *gyrB* Are Associated with Low- and High-Level Fluoroquinolone Resistance in *Helicobacter pylori*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 3942–3944. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.12.3942-3944.2003>.
- 260.** Tankovic, J., Chaumette-Planckaert, M.-T., Deforges, L., Launay, N., Le Glaunec, J.-M., Soussy, C.-J., Delchier, J.-C., 2007. Routine use of real-time PCR for detection of *Helicobacter pylori* and of clarithromycin resistance mutations. *Gastroentérologie Clin. Biol.* 31, 792–795.
- 261.** Taylor, D.E., Eaton, M., Chang, N., Salama, S.M., 1992. Construction of a *Helicobacter pylori* genome map and demonstration of diversity at the genome level. *J. Bacteriol.* 174, 6800–6806. <https://doi.org/10.1128/jb.174.21.6800-6806.1992>.
- 262.** Thiberge, J.-M., Boursaux-Eude, C., Lehours, P., Dillies, M.-A., Creno, S., Coppée, J.-Y., Rouy, Z., Lajus, A., Ma, L., Burucoa, C., Ruskoné-Foumestaux, A., Courillon-Mallet, A., De Reuse, H., Boneca, I.G., Lamarque, D., Mégraud, F., Delchier, J.-C., Médigue, C., Bouchier, C., Labigne, A., Raymond, J., 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. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-368>.
- 263.** Toledo, H., Valenzuela, M., Rivas, A., Jerez, C.A., 2002. Acid stress response in *Helicobacter pylori*. *FEMS Microbiol. Lett.* <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2002.tb11287>.
- 264.** Tomb, J.-F., White, O., Kerlavage, A.R., Clayton, R.A., Sutton, G.G., Fleischmann, R.D., Ketchum, K.A., Klenk, H.P., Gill, S., Dougherty, B.A., others,

1997. Corrections: The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* 389, 412–412.

265. Tompkins, D.S., Dave, J., Mapstone, N.P., 1994. Adaptation of *Helicobacter pylori* to aerobic growth. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 13, 409–412.

266. Toracchio, S., Aceto, G.M., Mariani-Costantini, R., Battista, P., Marzio, L., 2004. Identification of a novel mutation affecting domain V of the 23S rRNA gene in *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* 9, 396–399. doi:10.1111/j.1083-4389.2004.00267.x

267. Treiber, G., Wittig, J., Ammon, S., Walker, S., Van Doorn, L.J., Klotz, U., 2002. Clinical outcome and influencing factors of a new short-term quadruple therapy for *Helicobacter pylori* eradication: a randomized controlled trial (MACLOR study). *Arch Intern Med.* 162, 153–60.

268. Trieber, C.A., Taylor, D.E., 2002. Mutations in the 16S rRNA Genes of *Helicobacter pylori* Mediate Resistance to Tetracycline. *J. Bacteriol.* 184, 2131–2140. <https://doi.org/10.1128/JB.184.8.2131-2140.2002>.

269. Tsuda, M., Karita, M., Morshed, M.G., Okita, K., Nakazawa, T., 1994. A urease-negative mutant of *Helicobacter pylori* constructed by allelic exchange mutagenesis lacks the ability to colonize the nude mouse stomach. *Infect. Immun.* 62, 3586–3589.

270. Tsugane, S., Sasazuki, S., 2007. Diet and the risk of gastric cancer: review of epidemiological evidence. *Gastric Cancer* 10, 75–83. <https://doi.org/10.1007/s10120-007-0420-0>.

271. Unemo, M., Aspholm-Hurtig, M., Ilver, D., Bergström, J., Borén, T., Danielsson, D., Teneberg, S., 2005. The Sialic Acid Binding SabA Adhesin of *Helicobacter pylori* Is Essential for Nonopsonic Activation of Human Neutrophils. *J. Biol. Chem.* 280, 15390–15397. <https://doi.org/10.1074/jbc.M412725200>.

272. Uotani, T., Graham, D.Y., 2015. Diagnosis of *Helicobacter pylori* using the rapid urease test. *Ann. Transl. Med.* 3, 7.

273. Vakil, N., Mégraud, F., 2007. Eradication Therapy for *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 133, 985–1001. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.07.008>

- 274.** Vale, F.F., Oleastro, M., 2014 .Overview of the phytomedicine approaches against *Helicobacter pylori*. *World J Gastroenterol* .20, 5594-5609.
- 275.** Vandenbroucke-Grauls, C.M., Appelmelk, B.J., 1998. *Helicobacter pylori* LPS: molecular mimicry with the host and role in autoimmunity. *Ital. J. Gastroenterol. Hepatol.* 30 Suppl 3, S259-60.
- 276.** Van Doorn, L.J., Figueiredo, C., Rossau, R., Jannes, G., Van Asbroeck, M., Sousa, J.C., Carneiro, F., Quint, W.G.V., 1998. Typing of *Helicobacter pylori* vacA gene and detection of cagA gene by PCR and reverse hybridization. *J. Clin. Microbiol.* 36, 1271–1276.
- 277.** Van Doorn, N.E.M., Namavar, F., Sparrius, M., Stoof, J., van Rees, E.P., van Doorn, L.-J., Vandenbroucke-Grauls, C.M.J.E., 1999. *Helicobacter pylori*-Associated Gastritis in Mice is Host and Strain Specific. *Infect. Immun.* 67, 3040–3046.
- 278.** Van Vliet, A.H.M., Kuipers, E.J., Waidner, B., Davies, B.J., de Vries, N., Penn, C.W., Vandenbroucke-Grauls, C.M.J.E., Kist, M., Bereswill, S., Kusters, J.G., 2001. Nickel-Responsive Induction of Urease Expression in *Helicobacter pylori* Is Mediated at the Transcriptional Level. *Infect Immun* 69, 4891–4897. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.8.4891-4897.2001>.
- 279.** Varon, C., Mégraud, F., 2013. Infection à *Helicobacter pylori* et cancer gastrique. *Rev. Francoph. Lab.* 2013, 67–76. [https://doi.org/10.1016/S1773-035X\(13\)72225-1](https://doi.org/10.1016/S1773-035X(13)72225-1).
- 280.** Versalovic, J., Shortridge, D., Kibler, K., Griffy, M.V., Beyer, J., Flamm, R.K., Tanaka, S.K., Graham, D.Y., Go, M.F., 1996. Mutations in 23S rRNA are associated with clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40, 477–480.
- 281.** Viala, J., Chaput, C., Boneca, I.G., Cardona, A., Girardin, S.E., Moran, A.P., Athman, R., Mémet, S., Huerre, M.R., Coyle, A.J., DiStefano, P.S., Sansonetti, P.J., Labigne, A., Bertin, J., Philpott, D.J., Ferrero, R.L., 2004. Nod1 responds to peptidoglycan delivered by the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island. *Nat. Immunol.* 5, 1166–1174. <https://doi.org/10.1038/ni1131>.

- 282.** Vincent, P., 1996. Acquisition et transmission de l'infection à *Helicobacter pylori*. *Helicobacter pylori* .1,101–117.
- 283.** Wang, B., Wang, Y.-H., Lv, Z.-F., Xiong, H.-F., Wang, H., Yang, Y., Xie, Y., 2015. Review: Efficacy and Safety of Hybrid Therapy for *Helicobacter pylori* Infection: A Systematic Review and Meta-analysis. *Helicobacter*. <https://doi.org/10.1111/hel.12180>.
- 284.** Weeks, D.L., Eskandari, S., Scott, D.R.I., Sachs, G. b, 2000. A H⁺-gated urea channel: the link between *Helicobacter pylori* urease and gastric colonization. *Science* 287, 482–485. <https://doi.org/10.1126/science.287.5452.482>.
- 285.** Weisblum, B., 1995. Erythromycin resistance by ribosome modification. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39, 577–585.
- 286.** Willhite, D.C., Cover, T.L., Blanke, S.R., 2003. Cellular Vacuolation and Mitochondrial Cytochrome c Release Are Independent Outcomes of *Helicobacter pylori* Vacuolating Cytotoxin Activity That Are Each Dependent on Membrane Channel Formation. *J. Biol. Chem.* 278, 48204–48209. <https://doi.org/10.1074/jbc.M304131200>.
- 287.** Wirth, H.-P., Yang, M., Karita, M., Blaser, M.J., 1996. Expression of the Human Cell Surface Glycoconjugates Lewis X and Lewis Y by *Helicobacter pylori* Isolates Is Related to cagA Status. *INFECT IMMUN* 64, 8.
- 288.** Woodward, M., Morrison, C., McColl, K., 2000. An investigation into factors associated with *Helicobacter pylori* infection. *J. Clin. Epidemiol.* 53, 175–181. [https://doi.org/10.1016/S0895-4356\(99\)00171-7](https://doi.org/10.1016/S0895-4356(99)00171-7).
- 289.** Wroblewski, L.E., Peek, R.M., Wilson, K.T., 2010. *Helicobacter pylori* and Gastric Cancer: Factors That Modulate Disease Risk. *Clin. Microbiol. Rev.* 23, 713–739. <https://doi.org/10.1128/CMR.00011-10>.
- 290.** Wu, J.Y., Kim, J.J., Reddy, R., Wang, W.M., Graham, D.Y., Kwon, D.H., 2005. Tetracycline-resistant clinical *Helicobacter pylori* isolates with and without mutations in 16S rRNA-encoding genes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 578–583. [doi:10.1128/AAC.49.2.578-583.2005](https://doi.org/10.1128/AAC.49.2.578-583.2005).

- 291.** Wu, J.Y., Lu, H., Sun, Y., Graham, D.Y., Cheung, H.S., Yamaoka, Y., 2006. Balance between Polyoma Enhancing Activator 3 and Activator Protein 1 Regulates *Helicobacter pylori* –Stimulated Matrix Metalloproteinase 1 Expression. *Cancer Res.* 66, 5111–5120. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-0383>.
- 292.** Xie, Y., Zhu, Z., Wang, J., Zhang, L., Zhang, Z., Lu, H., Zeng, Z., Chen, S., Liu, D., Lv, N., 2018. Ten-Day Quadruple Therapy Comprising Low-Dose Rabeprazole, Bismuth, Amoxicillin, and Tetracycline Is an Effective and Safe First-Line Treatment for *Helicobacter pylori* Infection in a Population with High Antibiotic Resistance: a Prospective, Multicenter, Randomized, Parallel-Controlled Clinical Trial in China. *Antimicrob. Agents Chemother.* 62. <https://doi.org/10.1128/AAC.00432-18>.
- 293.** Yaghoobi, M., Bijarchi, R., Narod, S.A., 2010. Family history and the risk of gastric cancer. *Br. J. Cancer* 102, 237–242. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605380>.
- 294.** Yakoob, J., Abbas, Z., Khan, R., Salim, S.A., Abrar, A., Awan, S., Ahmad, Z., 2015. *Helicobacter pylori*: correlation of the virulence marker iceA allele with clinical outcome in a high prevalence area. *Br. J. Biomed. Sci.* 72, 67–73. <https://doi.org/10.1080/09674845.2015.11666799>.
- 295.** Yamaoka, Y., Kodama, T., Kashima, K., Graham, D.Y., Sepulveda, A.R., 1998. Variants of the 3J Region of the cagA Gene in *Helicobacter pylori* Isolates from Patients with Different H. pylori-Associated Diseases. *J CLIN MICROBIOL* 36, 2258-2263.
- 296.** Yamaoka, Y., Kwon, D.H., Graham, D.Y., 2000. A Mr 34,000 proinflammatory outer membrane protein (oipA) of *Helicobacter pylori*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 7533–7538. <https://doi.org/10.1073/pnas.130079797>.
- 297.** Yamaoka, Y., Ojo, O., Fujimoto, S., Odenbreit, S., Haas, R., Gutierrez, O., El-Zimaity, H.M., Reddy, R., Arnqvist, A., Graham, D.Y., 2006. *Helicobacter pylori* outer membrane proteins and gastroduodenal disease. *Gut* 55, 775–781.
- 298.** Yamaoka, Y., 2010. Mechanisms of disease: *Helicobacter pylori* virulence factors. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 7, 629–641. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2010.154>

- 299.** Yang, J.-C., Lin, C.-J., Wang, H.-L., Chen, J.-D., Kao, J.Y., Shun, C.-T., Lu, C.-W., Lin, B.-R., Shieh, M.-J., Chang, M.-C., Chang, Y.-T., Wei, S.-C., Lin, L.-C., Yeh, W.-C., Kuo, J.-S., Tung, C.-C., Leong, Y.-L., Wang, T.-H., Wong, J.-M., 2015. High-dose Dual Therapy is Superior to Standard First-line or Rescue Therapy for *Helicobacter pylori* Infection. Clin. Gastroenterol. Hepatol. Off. Clin. Pract. J. Am. Gastroenterol. Assoc. 13, 895-905.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2014.10.036>
- 300.** Yoshikawa, T., Naito, Y., 2000. The role of neutrophils and inflammation in gastric mucosal injury. Free Radic. Res. 33, 785–794.
- 301.** Yousfi, M.M., Reddy, R., Osato, M., Graham, D., 1997. Antre ou corps gastrique: quel est le meilleur site biopsique pour mettre en culture *Helicobacter pylori*? Revue Helicobacter pylori .2, 25-27.
- 302.** Zabaleta, J., 2012. Multifactorial etiology of gastric cancer, in: Cancer Epigenetics. Springer. 411–435.
- 303.** Zeng, M., Mao, X.-H., Li, J.-X., Tong, W.-D., Wang, B., Zhang, Y.-J., Guo, G., Zhao, Z.-J., Li, L., Wu, D.-L., Lu, D.-S., Tan, Z.-M., Liang, H.-Y., Wu, C., Li, D.-H., Luo, P., Zeng, H., Zhang, W.-J., Zhang, J.-Y., Guo, B.-T., Zhu, F.-C., Zou, Q.-M., 2015. Efficacy, safety, and immunogenicity of an oral recombinant *Helicobacter pylori* vaccine in children in China: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. The Lancet 386, 1457–1464. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)60310-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)60310-5).
- 304.** Zheng, P.X., Fang, H.Y., Yang, H.B., Tien, N.Y., Wang, M.C., Wu, J.J., 2014. *Lactobacillus pentosus* strain LPS16 produces lactic acid, inhibiting multidrug-resistant *Helicobacter pylori*. J. Microbiol. Immunol. Infect. doi:10.1016/j.jmii.2014.04.014.
- 305.** Zhou, X., Su, J., Xu, G., Zhang, G., 2014. Accuracy of stool antigen test for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in children: A meta-analysis. Clin. Res. Hepatol. Gastroenterol. 38, 629–638. <https://doi.org/10.1016/j.clinre.2014.02.001>.
- 306.** Zucca, E., Bertoni, F., Roggero, E., Bosshard, G., Cazzaniga, G., Pedrinis, E., Biondi, A., Cavalli, F., 1998. Molecular Analysis of the Progression from *Helicobacter pylori* –Associated Chronic Gastritis to Mucosa-Associated Lymphoid-

Tissue Lymphoma of the Stomach. N. Engl. J. Med. 338, 804–810.
<https://doi.org/10.1056/NEJM199803193381205>.

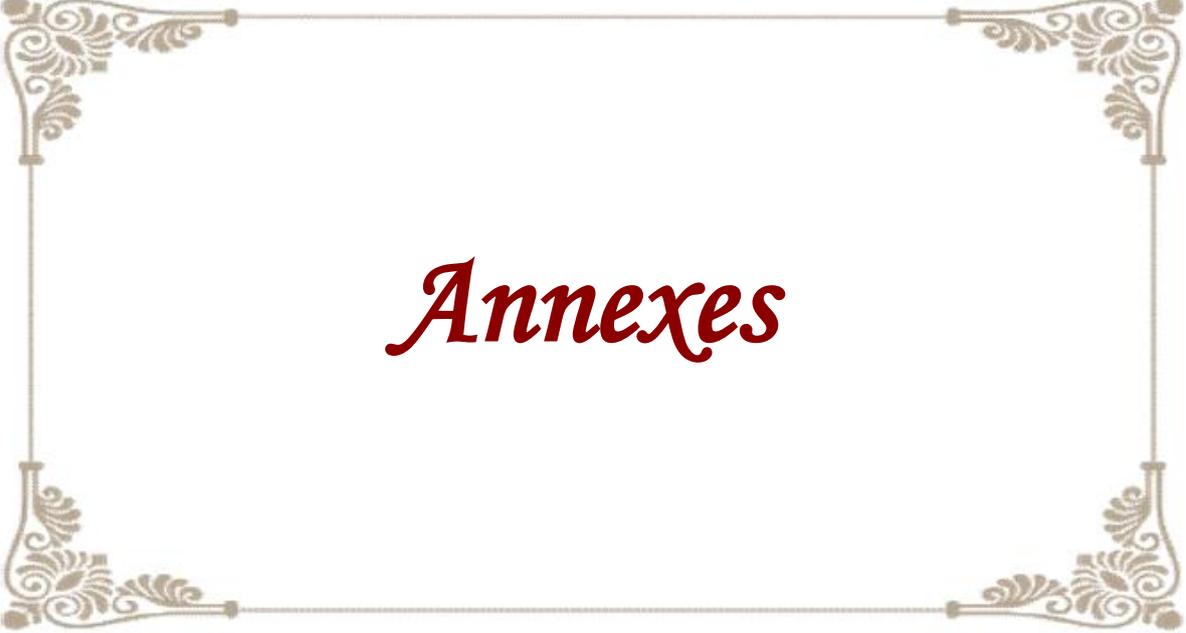
http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2005/index.html

<https://lecorpshumain.fr/categories/anatomie/lestomac>

<http://allodocteur.blogspot.com/2013/10/gastrite-estomac.html>

<http://umvf.univ-nantes.fr/hepato-gastro>

[enterologie/enseignement/item290/site/html/iconographie.html](http://umvf.univ-nantes.fr/hepato-gastro/enterologie/enseignement/item290/site/html/iconographie.html)



Annexes

Annexe 01 : Questionnaire

CHU Constantine

Service Hépatogastroentérologie-Service Médecine interne-Service Endoscopie (Anatomie)

Le questionnaire : Fiche de renseignement

Etude sur l'*Helicobacter pylori*

Etude faite par : Doctorante Mehasni Samiha

Prélèvement N° :

Numéro de dossier :

Date de prélèvement :

Nom de malade :

Prénom de malade :

Date de naissance ou Age :

Sexe :

Niveau socio-économique :

Tél/Adresse :

-Pathologie :	-Hospitalisé	<input type="checkbox"/>
	-Tabagisme	<input type="checkbox"/>
	-Alcoolisme	<input type="checkbox"/>
	-Amaigrissement	<input type="checkbox"/>
	-Epigastralgies	<input type="checkbox"/>
	-Pyrosis	<input type="checkbox"/>
	-Gastrite connue	<input type="checkbox"/>
	-Lymphome gastrique connue	<input type="checkbox"/>
	-Adénocarcinome gastrique connue	<input type="checkbox"/>
	-Prise d'IPP ou antiacides	<input type="checkbox"/>
	-Prise d'ATB (antiulcéreux ou autres)	<input type="checkbox"/>
	-Si ATB quel type :	
	-Flagyl	
	-Amoxicilline	
	-Clarithromycine	

Annexe 02 : Communications

- Mehasni samiha, Bénejet L, Mégraud F, Bentchouala C, Slimani S, Satta D, Benhizia Y. <Prevalence and resistance to antibiotics of *Helicobacter pylori* strains in Constantine, Algeria> Communication affichée lors du 1^{ère} nationale Congrès de SAI et du 5^{ème} Congrès de FASCMID. Hôtel El Aurassi, Alger. 27 et 28 Octobre 2018.
- Mehasni samiha, Djennane F, Bektache S, Bentchouala C, Satta D, Benhizia Y, Ziad A, Bouhouche H, Abadi N, Belabed K, Hammada T, Boussafsaf B, Hannache K, Tazir M. <Isolement et caractérisation des souches de *Helicobacter pylori* impliquées dans la pathogenèse gastroduodénale> Communication affichée lors du 1^{ère} rencontre Maghrébine de biologie et de génétique moléculaire et du 3^{ème} journées nationales de génétique et de biologie moléculaire. Université constantine 3. Novembre 2014.
- Mehasni samiha, Bénejet L, Mégraud F, Bentchouala C, Benhizia Y, Belabed K, Hammada T, Satta D, chehad MN. <Detection of *Helicobacter pylori* and resistance to clarithromycin in gastric biopsy > Communication affichée lors du Journées Internationale de Biotechnologie (JIB2016). Sousse, Tunisie. 18 au 22 décembre 2016.



Annexe 03 : Publication

MOLECULAR STUDY OF THE PREVALENCE OF HELICOBACTER PYLORI INFECTION AND ITS RESISTANCE TO ANTIBIOTICS IN CONSTANTINE, ALGERIA

SAMIHA MEHASNI^{*1,2}, YACINE BENHIZIA¹, CHAFIA BENTCHOUALA², MUSTAPHA BOUMENDJEL³, BADREDDINE BOUSSAFSAF⁴, KAMEL HANNACHE⁵ AND DALILA SATTI¹

¹Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Université des Frères Mentouri Constantine I. Algeria.

²Laboratoire Central de Microbiologie CHU de Constantine, Algeria.

³Service d'Hépatogastroentérologie et d'Endoscopie Digestive, CHU de Constantine, Algeria.

⁴Service des Explorations Endoscopiques, CHU de Constantine, Algeria.

⁵Service de Médecine Interne, CHU de Constantine, Algeria.

(Received 19 July, 2018; accepted 10 September, 2018)

Key words: Real-time PCR, Clarithromycin, Fluoroquinolones, Primary resistance.

Abstract – Infection with *Helicobacter pylori* is common worldwide and a significant cause of gastroduodenal diseases. Resistance to antibiotics is the main reason for failure of *H. pylori* eradication. The objectives of this study were to evaluate the prevalence of *H. pylori* infection and determine the strains' resistance to clarithromycin and fluoroquinolones by using molecular methods for the first time in Constantine, Eastern Algeria. A prospective study was carried out between April 2013 and December 2015. Gastric biopsy samples were obtained from adult patients submitted to upper gastrointestinal endoscopy. Biopsies were sent to the French National Reference Center for Campylobacters and Helicobacters in Bordeaux, France, where they were tested by real-time PCR for detection of *H. pylori* infection and resistance to clarithromycin using a fluorescence resonance energy transfer-melting curve analysis (FRET-MCA) protocol. For detection of point mutations associated with resistance to fluoroquinolones, PCR and sequencing were performed. Prevalence of *H. pylori* infection was 63.7%, primary resistance to clarithromycin: 18.6%, and primary resistance to fluoroquinolones: 6%. Based on these results of primary resistance to clarithromycin, the recommendation is to abandon the standard clarithromycin-based triple therapy as a first-line treatment. Instead, new therapeutic strategies, including other antibiotics such as levofloxacin, are now being suggested as an alternative treatment.

INTRODUCTION

Helicobacter pylori is an important human pathogen that colonizes the gastric mucosa of half of the world's population. This bacterium is responsible for most gastroduodenal diseases such as gastritis, peptic ulcer, adenocarcinoma and gastric MALT lymphoma (Kusters *et al.*, 2006).

The first-line therapy for *H. pylori* eradication used worldwide for more than 20 years is a triple therapy named standard therapy, which includes a proton pump inhibitor (PPI), amoxicillin, and clarithromycin (Megraud, 2004). However, this treatment may fail for several reasons, most importantly *H. pylori* resistance to clarithromycin (Malfertheiner *et al.*, 2012). Resistance to this antibiotic has been associated with point mutations

in the peptidyltransferase-encoding region of the 23S ribosomal RNA (rRNA) gene of *H. pylori* (Versalovic *et al.*, 1996). Three major point mutations in this gene have been described at two nucleotide positions: 2142 (A2142G and A2142C) and 2143 (A2143G) (Megraud and Lehours, 2007).

Increasing resistance against clarithromycin causes treatment failure (Megraud, 2004). For this reason, the development and use of other antibacterial drugs, such as fluoroquinolones, must be considered as an alternative for *H. pylori* therapy (Glocker and Kist, 2004). Fluoroquinolones exert their antimicrobial effect by inhibiting the A-subunit of the DNA gyrase of *H. pylori*, encoded by the *gyrA* gene. Mutations in the so-called quinolone resistance-determining region (QRDR) of the *gyrA* gene are found in *H. pylori* as well as in other

*Corresponding author's email: mehasnisamiha@yahoo.fr

bacteria. The main amino acid positions concerned are 87 and 91 (Moore *et al.*, 1995; Tankovic *et al.*, 2003).

The objectives of this study were to evaluate the prevalence of *H. pylori* infection and to detect the mutations associated with resistance to clarithromycin and fluoroquinolones by using molecular methods for the first time in Constantine, Eastern Algeria.

MATERIALS AND METHODS

Collection of gastric biopsy samples

A prospective study was carried out between April 2013 and December 2015. Gastric biopsy samples were obtained from the antrum of adult patients with various abdominal symptoms who were submitted to upper gastrointestinal endoscopy at the University Hospital of Constantine in Eastern Algeria, and had never received *H. pylori* eradication therapy. Informed consent was obtained from all patients. One piece of each sample was stored at -80 °C and sent to the National Reference Center for Campylobacters and Helicobacters in Bordeaux, France, for molecular study.

Molecular Methods

DNA extraction

Each gastric biopsy sample was digested in 180 µL of lysis buffer (Qiagen SA, Courtaboeuf, France) and 20 µL of proteinase K (Qiagen) and incubated at 56°C for 5 hours. Genomic DNA was isolated using a MagNA Pure LC DNA isolation kit I (Qiagen).

Real-time PCR

Detection of *H. pylori* infection, and determination of point mutations associated with clarithromycin resistance in the 23S rRNA gene were performed by real-time PCR according to (Oleastro *et al.*, 2003).

This method is based on the amplification of a fragment of the 23S rRNA gene of *H. pylori*, followed by simultaneous detection of the product by probe hybridization using fluorescence resonance energy transfer (FRET) technology and analysis of the melting curve with a Light Cycler thermocycler (Roche, Meylan, France) (Wittwer *et al.*, 1997).

Sequencing

The QRDR of the *H. pylori gyrA* gene was detected by standard PCR. The PCR products were

sequenced on both strands using the same primers, as previously described by (Rimbara *et al.*, 2012).

RESULTS

General characteristics of patients

One hundred thirty-five Algerian patients aged 16 to 84 years were included. There were 69 females (51.1%) and 66 males (48.8%). Nineteen patients (14%) were hospitalized, and 116 (86%) were outpatients.

Endoscopic examination detected 33 (24.4%) patients with normal mucosa, 90 (66.6%) with chronic gastritis only, 4 (2.9%) with a gastric ulcer, 3 (2.2%) with gastric adenocarcinoma and 5 (3.7%) with duodenitis (erosive and hemorrhagic bulboduodenitis). The most frequent symptoms for these patients were epigastralgia and pyrosis.

Detection of *Helicobacter pylori* infection and determination of clarithromycin resistance

H. pylori DNA was detected in 86 gastric biopsies from 135 patients (63.7%), 44 (51.1%) from males and 42 (48.8%) from females.

A mutation conferring resistance to clarithromycin was detected in 16 out of the 86 *H. pylori* positive patients including seven with a double population of resistant and susceptible genotypes (Table 1). The mutation corresponded to the genotype A2142/43G. The A2142C mutation was not found in the present study, and 77 strains had a wild-type profile (susceptible).

Table 1. Point mutations conferring resistance to clarithromycin in *Helicobacter pylori* according to results of a 23S rRNA mutation assay.

Point mutations	No. of strains	%
Wild-type	77	89.5
A(2142/43)G	16	18.6
A(2142)C	0	0

Detection of point mutations associated with quinolone resistance

PCR amplification and sequence analysis of the QRDR of *gyrA* from 84 DNA samples revealed that the resistance rate of *H. pylori* to quinolones was 6%. Among the 5 resistant strains, 1 carried a double mutation and 4 had single mutations (Table 2). The substitution (Asn → Thr) at amino acid 87 which does not lead to resistance was also detected 5 times.

Table 2. Point mutations in the QRDR of *gyrA* in *Helicobacter pylori*.

Amino acid change	<i>gyrA</i> mutation and position	No.
Asn → Lys	N87K	1
Asp → Gly	D91G	1
Asn → Ile	N87I	2
Asn → Lys	N87K	} double mutation 1
Asp → Tyr	D91Y	

DISCUSSION

The present study reports for the first time the prevalence of *H. pylori* infection in Constantine, Eastern Algeria. It is estimated to be 63.7%, a result that is similar to the 64% rate reported in the Tunisian population by seroprevalence (Ben Mansour *et al.*, 2010). This prevalence appears to be relatively lower than in developing countries, for example a prevalence of 89% was recently reported in Congo (Ontsira Ngoyi *et al.*, 2015), and decreased from 80% as it was reported in a serological study carried out in 1980 in the Algerian population (Megraud *et al.*, 1989). However, it is higher than that found in more recent Algerian studies, with estimates 47% and 57% in Algiers (Djennane-Hadibi *et al.*, 2016; Raaf *et al.*, 2017), this slight difference may be due to the low socioeconomic conditions in our region compared to Algiers, and no data were found about the status of *H. pylori* infection. Many developed countries have a low prevalence, with reports of 30% in the USA and Canada, 20% in Australia and 26.6% in Switzerland (Hunt *et al.*, 2011).

Algeria is among the countries where the clarithromycin based empirical triple therapy is widely used as a first-line treatment of *H. pylori* infection.

The most recent Maastricht V consensus recommended that PPI-clarithromycin-containing triple therapy without prior susceptibility testing should be abandoned when the clarithromycin resistance rate in the region is more than 15% (Malfertheiner *et al.*, 2017).

The present study is the first to report a primary resistance rate reaching 18.6% in Constantine, Eastern Algeria, a result that is above the 15% threshold put forward by the Maastricht V consensus report as a reason to abandon the clarithromycin-based first-line treatment.

This rate of resistance to clarithromycin was related especially to the genotype A2142/43G. The

same rate was observed in Pakistan (18.2%) (Cagdas *et al.*, 2012) and in Bulgaria (17.9%) (Boyanova *et al.*, 2012). However, it was lower than other data obtained in Maghreb, from recently published studies in Morocco and Algeria where the prevalence of primary resistance to clarithromycin reached 28.8%, 23% and 33%, respectively (Bouihat *et al.*, 2016; Raaf *et al.*, 2017; Djennane-Hadibi *et al.*, 2016). In contrast, this rate is much higher than that found in the Congo (1.7%) (Ontsira Ngoyi *et al.*, 2015), and in Germany (7.5%) (Selgrad *et al.*, 2013).

Although fluoroquinolones are not used in the treatment regimen to eradicate *H. pylori* infection in Algeria, a 6% rate of resistance was reported against this antibiotic. This level of resistance was higher compared to a recent study in Algeria where a very low rate of resistance to fluoroquinolones (2%) was detected (Raaf *et al.*, 2017), similar to other data found in Malaysia (6.8%) (Teh *et al.*, 2014), and significantly lower than what was found in Congo (50%) (Ontsira Ngoyi *et al.*, 2015).

In our investigation, fluoroquinolone resistance might be due to the prescription and administration of these antibiotics, especially ciprofloxacin, to treat bacterial infection in other organ systems.

CONCLUSION

In conclusion, the main interest of this study is to provide important data on the status of *H. pylori* prevalence and local antibiotic resistance rates in Constantine, Eastern Algeria. In the present study, we reported an increasing rate of primary resistance to clarithromycin (18.6%) which leads to the recommendation of abandoning standard clarithromycin based triple therapy as a first-line treatment. Instead, new therapeutic strategies, including other antibiotics such as levofloxacin, are now suggested as an alternative treatment.

Our results revealed the efficiency of genotypic susceptibility testing which showed how molecular genetic techniques can be used if culture is not available. The molecular genetic testing detecting *H. pylori* and mutations that confer resistance to antibiotics is faster and easier to standardize than phenotypic testing.

ACKNOWLEDGEMENTS

We gratefully acknowledge Professor Francis Mégraud, Lucie Bénéjat, and the members of the

French National Center for Campylobacter and Helicobacter for their assistance. A special thank to Lindsay Megraud for the English revision of the manuscript.

REFERENCES

- Ben Mansour, K., Keita, A., Zribi, M., Masmoudi, A., Zarrouk, S., Labbene, M., Kallel, L., Karoui, S., Fekih, M., Matri, S., Boubaker, J., Cheikh, I., Chouaib, S., Filali, A., Mami, N.B., Najar, T. and Fendri, C. 2010. Seroprevalence of *Helicobacter pylori* among Tunisian blood donors (outpatients), symptomatic patient and control subjects. *Gastroentérol Clin Biol.* 34 : 75-82.
- Bouihat, N., Burucoa, C., Benkirane, A., Seddik, H., Sentissi, S., Al Bouzidi, A., Elouennas, M. and Benouda, A. 2016. *Helicobacter pylori* Primary Antibiotic Resistance in 2015 in Morocco: A Phenotypic and Genotypic Prospective and Multicenter Study. *Microb Drug Resist.* 23 : 727-732.
- Boyanova, L., Ilieva, J., Gergova, G., Davidkov, L., Spassova, Z., Kamburov, V., Katsarov, N. and Mitov, I. 2012. Numerous risk factors for *Helicobacter pylori* antibiotic resistance revealed by extended anamnesis: a Bulgarian study. *J Med Microbiol.* 61: 85-93.
- Cagdas, U., Otag, F., Tezcan, S., Sezgin, O., Aslan, G. and Emekdas, G. 2012. Detection of *Helicobacter pylori* and antimicrobial resistance in gastric biopsy specimens. *Microbiol Bul.* 46: 398-409.
- Djennane-Hadibi, F., Bachtarzi, M., Layaida, K., Ali Arous, N., Nakmouche, M., Saadi, B., Tazir, M., Ramdani-Bouguessa, N. and Burucoa, C. 2016. High-level primary clarithromycin resistance of *Helicobacter pylori* in Algiers, Algeria: a prospective multicenter molecular study. *Microb Drug Resist.* 22 : 223-226.
- Glocker, E. and Kist, M. 2004. Rapid Detection of Point Mutations in the *gyrA* Gene of *Helicobacter pylori* Conferring Resistance to Ciprofloxacin by a Fluorescence Resonance Energy Transfer-Based Real-Time PCR Approach. *J Clin Microbiol.* 42 : 2241-2246.
- Hunt, R.H., Xiao, S.D. Megraud, F., Leon-Barua, R., Bazzoli, F., Van der Merwe, S., VazCoelho, L.G., Fock, M., Fedail, S., Cohen, H., Malfertheiner, P., Vakil, N., Hamid, S., Goh, K.L., Wong, B.C.Y., Krabshuis, J. and Le Mair, A. 2011. *Helicobacter pylori* in developing countries. World Gastroenterology Organisation. *J Gastrointestin Liver Dis.* 20(3) : 299-304.
- Kusters, J.G., Van Vliet, A.H. and Kuipers, E.J. 2006. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Clin Microbiol Rev.* 19 : 449-490.
- Malfertheiner, P., Megraud, F., O'Morain, C.A., Atherton, J., Axon, A.T., Bazzoli, F., Gensini, G.F., Gisbert, J.P., Graham, D.Y., Rokkas, T., ElOmar, E.M. and Kuipers, E.J. 2012. Management of *Helicobacter pylori* infection—The Maastricht IV/Florence Consensus Report. *Gut.* 61 : 646-664.
- Malfertheiner, P., Megraud, F., O'Morain, C.A., Gisbert, J.P., Kuipers, E.J., Axon, A.T., Bazzoli, F., Gasbarrini, A., Atherton, J., Graham, D.Y., Hunt, R., Moayyedi, P., Rokkas, T., Rugge, M., Selgrad, M., Suerbaum, S., Sugano, K. and El-Omar, E.M. 2017. Management of *Helicobacter pylori* infection—the Maastricht V/Florence Consensus Report. *Gut.* 66 : 6-30.
- Megraud, F., Brassens-Rabbe, M.P., Denis, F., Belbouri, A. and Hoa, D.Q. 1989. Seroepidemiology of *Campylobacter pylori* infection in various populations. *J Clin Microbiol.* 27 : 1870-1873.
- Megraud, F. 2004. *H. pylori* antibiotic resistance: prevalence, importance, and advances in testing. *Gut.* 53 : 1374-1384.
- Megraud, F. and Lehours, P. 2007. *Helicobacter pylori* detection and antimicrobial susceptibility testing. *Clin Microbiol Rev.* 20 : 280-322.
- Moore, R.A., Beckthold, B., Wong, S., Kureishi, A. and Bryan, L.E. 1995. Nucleotide sequence of the *gyrA* gene and characterization of ciprofloxacin resistant mutants of *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother.* 39 : 107-111.
- Oleastro, M., Menard, A., Santos, A., Lamouliatte, H., Monteiro, L., Barthelemy, P. and Megraud, F. 2003. Real-time PCR assay for rapid and accurate detection of point mutations conferring resistance to clarithromycin in *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol.* 41 : 397-402.
- Ontsira Ngoyi, E.N., Atipo Ibara, B.I., Moyen, R., Ahoui Apendi, P.C., Ibara, J.R., Obengui, O., Ossibi Ibara, R.B., Nguimbi, E., Niama, R.F., Ouamba, J.M., Yala, F., Abena, A.A., Vadivelu, J., Goh, K.L., Menard, A., Benejat, L., Sifre, E., Lehours, P. and Megraud, F. 2015. Molecular detection of *Helicobacter pylori* and its antimicrobial resistance in Brazzaville, Congo. *Helicobacter.* 20 : 316-320.
- Raaf, N., Amhis, W., Saoula, H., Abid, A., Nakmouche, M., Balamane, A., Ali Arous, N., Ouar-Korichi, M., Vale, F.F., Bénéjat, L. and Mégraud, F. 2017. Prevalence, antibiotic resistance and MLST typing of *Helicobacter pylori* in Algiers, Algeria. *Helicobacter.* e12446.
- Rimbara, E., Noguchi, N., Kawai, T. and Sasatsu, M. 2012. Fluoroquinolone resistance in *Helicobacter pylori*: role of mutations at position 87 and 91 of *GyrA* on the level of resistance and identification of a resistance conferring mutation in *GyrB*. *Helicobacter.* 17 : 36-42.
- Selgrad, M., Meissle, J., Bornschein, J., Kandulski, A., Langner, C., Varbanova, M., Wex, T., Tammer, I., Schluter, D. and Malfertheiner, P. 2013. Antibiotic susceptibility of *Helicobacter pylori* in central Germany and its relationship with the number of eradication therapies. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 25 : 1257-1260.
- Tankovic, J.C., Lascols, Q., Sculo, J., Petit, C. and Soussy, C.J. 2003. Single and double mutations in *gyrA* but not in *gyrB* are associated with low- and high-level fluoroquinolone resistance in *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother.* 47 : 3942-3944.
- Teh, X., Khosravi, Y., Lee, W.C., Leow, A.H., Loke, M.F.,

- Vadivelu, J. and Goh, K.L. 2014. Functional and molecular surveillance of *Helicobacter pylori* antibiotic resistance in Kuala Lumpur. *PLoS One*. 9:e101481 [PMID: 25003707 DOI: 10.1371/journal.pone.0101481].
- Versalovic, J., Shortridge, D., Kibler, K., Griffy, M.V., Beyer, J., Flamm, R.K., Tanaka, S.K., Graham, D.Y. and Go, M.F. 1996. Mutations in 23S rRNA are associated with clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother*. 40 : 477–480.
- Wittwer, C.T., Ririe, K.M., Andrew, R.V., David, D.A., Gundry, R.A. and Balis, U.J. 1997. The Lightcycler TM: a microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control. *Bio Techniques*. 22 : 176–181.





Résumés

Résumé

Helicobacter pylori est un agent pathogène qui colonise la muqueuse gastrique de la moitié de la population mondiale. Cette bactérie est responsable de la plupart des maladies gastroduodénales telles que la gastrite, l'ulcère peptique, l'adénocarcinome et le lymphome gastrique MALT.

Objectifs : Apporter des données concernant l'épidémiologie locale de l'infection à *H. pylori* pour la première fois à Constantine et contribuer à l'amélioration de la prise en charge de ces infections.

Matériels et Méthodes : Nous avons mené une étude prospective réalisée entre 2013 et 2015, elle a compris 135 patients adultes adressés pour endoscopie digestive et non traités auparavant pour l'infection à *H. pylori*. L'identification des souches a été réalisée par culture et PCR en temps réel de détection de *H. pylori* et les mutations de sa résistance à la clarithromycine. La détection des mutations liées à la résistance à la tétracycline et à la lévofloxacine a été effectuée par séquençage. Le génotypage des facteurs de pathogénicité *cagPAI*, *vacAs/m/i* a été réalisé par PCR classique.

Résultats : La prévalence de l'infection à *H. pylori* évaluée par PCR est de 63,7%, culture positive 17%, la résistance primaire à la clarithromycine due à la mutation de type A2142/43G est détectée avec un taux de 18.6%, la résistance à la lévofloxacine est due aux mutations simples Asn87Lys-Asp91Gly- Asn87Ile et à la double mutation Asn 87Lys et Asp91Tyr avec un taux de 6%. Une seule résistance à la tétracycline (1,2%) mutation (TGA) a été détectée. La mise en évidence des gènes de pathogénicité a révélé : *cagPAI+* 47 %, *cagA* P1P2P3 58%, *vacAs1m1* 20%, *vacAs1m2* 24%, *vacAs2m2* 55%, prédominance de génotype *cagPAI-*, *vacAs2m2*.

Conclusion : Une forte prévalence de l'infection à *H. pylori* a été détectée à Constantine, une adaptation de traitement d'éradication est nécessaire suite à l'augmentation du taux de résistance à la clarithromycine en incluant d'autres antibiotiques. Une prédominance de génotype moins virulent a été détectée chez les souches isolées.

Mots clés : *H. pylori*, génotypage, clarithromycine, résistance primaire.

Abstract

Helicobacter pylori is a pathogen that colonizes the gastric mucosa of half of the world's population. This bacterium is responsible for most gastroduodenal diseases such as gastritis, peptic ulcer, adenocarcinoma and gastric MALT lymphoma.

The objectives: To provide data about the local epidemiology of *H. pylori* infection for the first time in Constantine and to contribute ameliorating the management of *H. pylori* infections.

Materials and Methods: We conducted a prospective study achieved between 2013 and 2015, it included 135 adult patients addresses for digestive endoscopy and previously untreated for *H. pylori* infection. Strains identification was performed by culture and real-time PCR for detection of *H. pylori* and mutations of its resistance to clarithromycin. The detection of mutations related to resistance to tetracycline and levofloxacin was performed by sequencing. Genotyping of *cagPAI*, *vacAs/m/i* pathogenicity factors was achieved by standard PCR.

Results: Prevalence of *H. pylori* infection evaluated by PCR 63.7%, positive culture 17%, primary resistance to clarithromycin due to mutation type A2142/43G is detected with a rate of 18.6%, the Resistance to levofloxacin is due to single mutations Asn87Lys-Asp91Gly-Asn87Ile and the double mutation Asn87Lys and Asp91Tyr with a rate of 6%. A single resistance to tetracycline mutation (TGA)(1.2%) was detected. The detection of the pathogenicity genes revealed: *cagPAI*+ 47%, *cagAIP2P3* 58%, *vacAs1m1* 20%, *vacA s1m2* 24%, *vacAs2m2* 55%. Génotype predominance *cagPAI*-, *vacAs2m2*.

Conclusion: A high prevalence of *H. pylori* infection has been detected in Constantine, an adaptation of eradication treatment is necessary following the increase in the rate of resistance to clarithromycin by including other antibiotics. A predominance of less virulent genotype was detected in isolated strains.

Key words: *H. pylori*, genotyping, clarithromycin, primary resistance.

الملخص

Helicobacter pylori عامل ممرض يستعمر الغشاء المخاطي للمعدة لنصف سكان العالم. هذه البكتيريا هي المسؤولة عن معظم الأمراض المعدية و المعوية مثل التهاب المعدة والقرحة المعدية ، وسرطان المعدة وسرطان الغدة اللعابية في المعدة MALT .

الأهداف : تقديم معلومات حول الوباء المحلي لعدوى *H. pylori* لأول مرة في قسنطينة والمساهمة في تحسين التكفل بهذه العدوى .

الوسائل والطرق: أجرينا دراسة استشرافية ما بين 2013 و 2015 ، شملت 135 مريضاً بالغاً أحيلوا للتظهير الهضمي ولم يعالجوا سابقاً من عدوى *H. pylori*. تم تحديد السلالات البكتيرية عن طريق الزرع و PCR en temps réel للكشفة لـ *H. pylori* وطفرات مقاومتها للـ clarithromycine. تم إجراء الكشف عن الطفرات المتعلقة بمقاومة tetracycline و lévofloxacin عن طريق séquençage. تم تحديد الأنماط الجينية للعوامل الممرضة *cagPAI, vacAs/m/i* عن طريق PCR الكلاسيكية.

النتائج : نسبة انتشار عدوى *H. pylori* التي تم تقييمها بواسطة PCR هي 63.7% ، نسبة الزراعة الإيجابية هي 17% ، وتم الكشف عن المقاومة الأولية للـ clarithromycine الناتجة عن طفرة من نوع A2142 / 43G بنسبة 18.6% ، مقاومة lévofloxacin راجعة إلى الطفرات البسيطة -Asp91Gly- Asn87Lys و Asn87Ile والطفرة المزدوجة Asn 87Lys و Asp91Tyr بنسبة 6%. تم الكشف عن مقاومة واحدة للـ tetracycline (1.2%) طفرة (TGA). كشف تحديد الجينات الممرضة عن : + cagPAI 47% ، vacAs2m2 55% ، vacA s1m2 24% ، vacAs1m1 20% ، cagAP1P2P3 58% ، الجيني -cagPAI, vacAs2m2.

الخلاصة : تم الكشف عن معدل مرتفع لانتشار عدوى *H. pylori* في قسنطينة ، فمن الضروري تكييف علاج القضاء عليها نتيجة زيادة معدل المقاومة للـ clarithromycin مع إشراك مضادات حيوية أخرى. تم الكشف على أن النمط الوراثي الغالب هو الأقل سمية في السلالات المعزولة.

الكلمات المفتاحية : *H. pylori* , clarithromycin , الأنماط الجينية , المقاومة الأولية.

Année universitaire : 2018 - 2019

Présentée par : MEHASNI Samiha

Identification des souches de *Helicobacter pylori* par l'utilisation des marqueurs génétiques

Thèse pour l'obtention du diplôme de Docteur 3ème cycle LMD en Génétique Moléculaire

Helicobacter pylori est un agent pathogène qui colonise la muqueuse gastrique de la moitié de la population mondiale. Cette bactérie est responsable de la plupart des maladies gastroduodénales telles que la gastrite, l'ulcère peptique, l'adénocarcinome et le lymphome gastrique MALT.

Objectifs : Apporter des données concernant l'épidémiologie locale de l'infection à *H. pylori* pour la première fois à Constantine et contribuer à l'amélioration de la prise en charge de ces infections.

Matériels et Méthodes : Nous avons mené une étude prospective réalisée entre 2013 et 2015, elle a compris 135 patients adultes adressés pour endoscopie digestive et non traités auparavant pour l'infection à *H. pylori*. L'identification des souches a été réalisée par culture et PCR en temps réel de détection de *H. pylori* et les mutations de sa résistance à la clarithromycine. La détection des mutations liées à la résistance à la tétracycline et à la lévofloxacine a été effectuée par séquençage. Le génotypage des facteurs de pathogénicité *cagPAI*, *vacAs/m/i* a été réalisé par PCR classique.

Résultats : La prévalence de l'infection à *H. pylori* évaluée par PCR est de 63,7%, culture positive 17 %, la résistance primaire à la clarithromycine due à la mutation de type A2142/43G est détectée avec un taux de 18,6%, la résistance à la lévofloxacine est due aux mutations simples Asn87Lys-Asp91Gly- Asn87Ile et à la double mutation Asn 87Lys et Asp91Tyr avec un taux de 6%. Une seule résistance à la tétracycline (1.2%) mutation (TGA) a été détectée. La mise en évidence des gènes de pathogénicité a révélé : *cagPAI+* 47 %, *cagA P1P2P3* 58%, *vacAs1m1* 20%, *vacA s1m2* 24%, *vacAs2m2* 55%, prédominance de génotype *cagPAI-*,*vacAs2m2*.

Conclusion : Une forte prévalence de l'infection à *H. pylori* a été détectée à Constantine, une adaptation de traitement d'éradication est nécessaire suite à l'augmentation du taux de résistance à la clarithromycine en incluant d'autres antibiotiques. Une prédominance de génotype moins virulent a été détectée chez les souches isolées.

Mots-clés : *Helicobacter pylori*, génotypage, clarithromycine, résistance primaire.

Laboratoires de recherche :

Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire (Université des Frères Mentouri, Constantine 1).
Laboratoire de Microbiologie (Université Constantine 3).

Président : KITOUNI Mahmoud- Prof. Université Frères Mentouri, Constantine 1

Directeurs : BENHIZIA Yacine- Prof. Université Frères Mentouri, Constantine 1
BENTCHOUALA Chafia- Prof. Université Salah Boubnider, Constantine 3

Examineurs : KITOUNI Yacine- Prof. Université Salah Boubnider, Constantine 3
GHARZOULI Razika- MCA. Université Frères Mentouri, Constantine 1