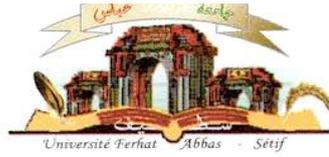


الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Université Ferhat Abbas Sétif 1
Faculté des Sciences de la
Nature et de la Vie



جامعة فرحات عباس، سطيف 1
كلية علوم الطبيعة و الحياة

DEPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE

N°/SNV/2018

THÈSE

Présentée par

RAAF Naïma

Pour l'obtention du diplôme de

DOCTORAT 3^{ÈME} CYCLE

Filière: BIOLOGIE

Spécialité: MICROBIOLOGIE GÉNÉRALE

THÈME

**Prévalence de l'infection à *Helicobacter pylori* et typage
moléculaire des souches isolées à Alger (Algérie)**

Soutenue publiquement le **02/05/2018**

DEVANT LE JURY

Président	Dr SILINI Allaoua	MCA Université de Setif 1
Directeur	Pr AMHIS Wahiba	Professeur Université d'Alger
Examineurs	Pr BERKANE Saadi	Professeur Université d'Alger
	Pr OUAR-KORICHI Mounira	Professeur Université d'Alger
	Dr AOUF Abdelhakim	MCA Université de Setif 1
	Dr CHERIF-SILINI Hafsa	MCA Université de Setif 1

*Laboratoire de Microbiologie
Hôpital Ibn Ziri Bologhine Alger*

RESUMES

Prévalence de l'infection à *Helicobacter pylori* et typage moléculaire des souches isolées à Alger (Algérie)

Résumé

Objectif : Actualisation des données épidémiologiques de l'infection à *H. pylori* à Alger.

Matériels et méthodes : C'est une étude prospective multicentrique réalisée entre 2012 et 2016. La culture et l'antibiogramme ont été réalisés ainsi qu'une PCR en temps réel de détection de *H. pylori* et les mutations de sa résistance à la clarithromycine. La recherche par PCRs des facteurs de virulence *cagPAI*, *vacAsmid*, *dupA* et *babA2* et des PCRs RAPD de comparaisons des souches ont été réalisées. Le typage phylogéographique a été effectué par MLST.

Résultats : Prévalence des patients adultes par PCR 56%. Culture positive 29%. Résistance primaire et secondaire à la clarithromycine 22% et 38% respectivement, mutation A2142/43G. Résistance primaire et secondaire au métronidazole 42% et 78% respectivement. Une seule résistance à la lévofloxacine, mutation Asn87Thr. Aucune résistance à l'amoxicilline, tétracycline et rifampicine. Double population de *H. pylori* chez 14% des patients. *cagPAI*+ 46 %, *cagA* P1P2P3 22%, *vacAs1m1* 19%, *vacA s1m2* 31%, *vacAs2m2* 47%, *dupA*+ 19%, *babA2*+ 19%. Génotype majoritaire *cagPAI*-,*vacAs2m2*,*dupA*-,*babA2*-26%. MLST de 49 souches isolées de 44 patients : 40 hpEurope et 9 hpNEAfrica.

Conclusion : La prévalence de l'infection reste élevée mais semble en diminution. La résistance élevée à la clarithromycine nécessite l'adaptation du traitement d'éradication. Les souches avec les génotypes les moins virulents représentent la plus grande partie des isolats. Les souches d'origine Européenne hpEurope sont majoritaires.

Prevalence of *Helicobacter pylori* infection and molecular typing of strains isolated in Algiers (Algeria)

Abstract

Objective: The aim of this study was to update the epidemiological data of *H. pylori* infection in Algiers.

Materials and methods: This is a prospective multicentre study carried out between 2012 and 2016. The culture and the antibiogram were realized as well as real-time PCR detection of *H. pylori* and the mutations of its resistance to clarithromycin. The PCRs analysis of the virulence factors *cagPAI*, *vacAsmid*, *dupA* and *babA2* and RAPD PCRs for comparison strains were performed. Phylogeographic typing was performed by MLST.

Results: Prevalence of adult patients by PCR 56%. Positive culture 29%. Primary and secondary resistance to clarithromycin 22% and 38% respectively, mutation A2142 / 43G. Primary and secondary resistance to metronidazole 42% and 78% respectively. A single resistance to levofloxacin, mutation Asn87Thr. No resistance to amoxicillin, tetracycline and rifampicin. Double population of *H. pylori* in 14% of patients. *cagPAI* + 46%, *cagA* P1P2P3 22%, *vacAs1m1* 19%, *vacA s1m2* 31%, *vacAs2m2* 47%, *dupA* + 19%, *babA2* + 19%. Majority genotype *cagPAI*-, *vacAs2m2*, *dupA*-, *babA2*- 26%. MLST of 49 strains isolated from 44 patients: 40 hpEurope and 9 hpNEAfrica.

Conclusion: The prevalence of infection remains high but appears to be decreasing. High resistance to clarithromycin requires adaptation of the eradication treatment. The strains with the least virulent genotypes represent the majority of the isolates. The strains of European origin hpEurope are in the majority.

معدل انتشار عدوى *Helicobacter pylori* والتصنيف الجزيئي للسلاطات المعزولة في الجزائر العاصمة (الجزائر).

الملخص

الهدف: تحديث المعلومات الوبائية لعدوى *Helicobacter pylori* في الجزائر العاصمة.

الطرق و الوسائل: أجريت هذه الدراسة الاستشراكية متعددة المراكز بين 2012 و 2016. تم إجراء الزرع و اختبار حساسية المضادات الحيوية و كذلك PCR en temps réel للكشف عن وجود *H. pylori* و طفرات مقاومتها لل clarithromycine. تم إجراء PCRs للبحث عن عوامل السمية *babA2*, *dupA*, *vacAsmid*, *cagPAI* و PCR RAPD لمقارنة السلاطات. اجري تصنيف النسب الجغرافي بواسطة MLST.

النتائج: معدل انتشار المرضى البالغين بواسطة PCR 56%. الزرع الموجب 29%. المقاومة الأولية والثانوية لل clarithromycine 22% و 38% على التوالي، الطفرة A2142/43G. المقاومة الأولية والثانوية للمétronidazole 42% و 78% على التوالي. طفرة واحدة لل levofloxacin، الطفرة Asn87Thr. لا وجود لأي طفرة لل rifampicine و tetracycline، amoxicilline. عينات مضاعفة لل *H. pylori* عند 14 مريض. *dupA+*، 47%، *vacAs2m2*، 31%، *vacA s1m2*، 19%، *vacAs1m1*، 22%، *cagA P1P2P3*، 46%، *cagPAI+*، 19%، *babA2+*، 19%، النمط الجيني الغالب -*cagPAI*، -*vacAs2m2*، -*dupA*، -*babA2*. 26% MLST. 49 سلالة معزولة من 44 مريض: hpNEAfrica 9 و hpEurope40.

الخاتمة: لا يزال معدل انتشار العدوى مرتفعا و لكن يبدو أنه تتناقص. يتطلب ارتفاع المقاومة لل clarithromycine تكيف علاج القضاء عليها. تمثل السلاطات ذات الأنماط الجينية الأقل سمية غالبية السلاطات المعزولة. اغلب السلاطات هي من اصل أوروبي hpEurope.

REMERCIEMENTS

Remerciements

Mes premiers remerciements s'adressent aux membres du jury, le Docteur Allaoua SILINI, le Professeur Saadi BERKANE, Le Professeur Mounira OUAR-KORICHI, le Docteur Abdelhakim AOUF et le Docteur CHERIF-SILINI Hafsa pour m'avoir fait l'honneur d'accepter d'évaluer ce travail. Soyez assurés de ma gratitude pour votre disponibilité.

J'exprime ma reconnaissance à ma directrice de thèse, le Professeur Wahiba AMHIS pour avoir accepté de diriger ce travail et de m'avoir ouvert les portes de son laboratoire. Merci de m'avoir permis de travailler dans les meilleures conditions.

Je tiens à remercier le Professeur Zahida BOUCHENE de m'avoir recommandée auprès du Professeur Wahiba AMHIS.

Je remercie le Professeur Mohammed CHIRIFI, Chef de Service du Laboratoire Central de Biologie Clinique de l'hôpital Ibn Ziri Bologhine (Alger, Algérie) pour son aide et la confiance qu'il m'a accordée.

Merci à tous les membres du Laboratoire Central de Biologie Clinique de l'hôpital Ibn Ziri Bologhine, particulièrement l'équipe de microbiologie : Mme Nadia SAHEL qui m'a initiée à la culture de *Helicobacter pylori*, Dr Mounia BENREDOUANE, Dr Ania BELOUI, Mme Samira BENMESBAH, Mme Lila BENBETKA, Mme Ghania AMMAR, Mme Massika BOULGHAB, Mme Selma BENMOURSLI et Mme Nassima TAHARBOUCHET. Merci pour votre aide, votre soutien et tous les moments que nous avons passés ensemble. Merci également au personnel des autres unités, à l'équipe de garde, à Mr Rachid BENKACI, à Mr Mourad MEZDAD et à Mr Karim RENANE pour sa bonne humeur tellement contagieuse !

Je remercie vivement le Professeur Francis MEGRAUD, Ancien Directeur du Centre Nationale Français de Référence des *Campylobacter* et *Helicobacter* (CNRCH, Bordeaux, France). Merci de m'avoir accueillie à deux reprises au sein de votre laboratoire et de m'avoir facilité les démarches administratives. Merci pour votre grande disponibilité et vos précieux conseils. Merci pour votre œil critique qui m'a aidé à mieux structurer et améliorer la qualité de mon travail. Merci également au Professeur Philippe LEHOURS, actuel Directeur du CNRCH.

Merci à toute l'équipe du CNRCH, à Mme Lucie BENEJAT, à Mme Astrid DUCOURNAU, à Mme Elodie SIFRE et à Mme Alice BUISSONIERE pour leur gentillesse, leur disponibilité et leur aide pour les manipulations. Un grand Merci pour Mme Ann CARTON DE WIART, une femme au grand cœur, l'une des plus belles rencontres durant ma thèse. Merci pour ton accueil chaleureux.

Je remercie le Professeur Mounira OUAR-KORICHI, ancienne Chef de Service du Laboratoire des Entérobactéries et des bactéries apparentées de l'Institut Pasteur (Alger, Algérie) de m'avoir accueillie au sein du laboratoire et de m'avoir soutenue et encouragée dans les moments difficiles. Merci à Mme Farida TALEB pour son aide durant les manipulations et ses conseils avisés qui resteront à jamais marqués en moi.

Résumés

Je remercie le Professeur Hocine ASSELAH, ancien Chef de Service de Médecine Interne de l'EPH Ibn Ziri Bologhine, le Professeur Fadila BENHASSINE, Chef de Service de Pédiatrie de l'EPH Ibn Ziri Bologhine, le Professeur Abdelmalek BALAMANE, Chef de Service de Gastro-entérologie du CHU Issaad Hassani Béni Messous (Alger, Algérie) et le Professeur Mhamed NEKMOUCHE, Chef de Service de Gastro-entérologie du CHU Lamine Debaghine Bab El Oued (Alger, Algérie) pour leur collaboration.

Je tiens également à remercier l'ensemble des cliniciens et gastroentérologues sans lesquels ce travail n'aurait pas pu être réalisé. Plus particulièrement le Pr CHIKHI, Dr ALI AROUS, Dr BENZAGHOU, Dr BAIOD, Dr SAOULA, Dr ABID, Dr HETIT, Dr MADANI et Dr AZZOUG. Merci également aux infirmières pour leur participation à ce travail.

Mes plus profonds remerciements vont à mes parents, mon père Boualem RAAF et ma mère Houria EL ROBRINI RAAF. Je vous dois l'aboutissement de ce travail. Vous avez cru en moi et m'avez soutenue tout au long de mon cursus. Votre soutien moral et matériel indéfectible m'ont donné la force d'aller jusqu'au bout. Maman, merci d'avoir fait en sorte que je ne pense à rien d'autre durant les derniers mois de rédaction. Merci pour les heures que tu as passé à relire et à corriger mon travail. Papa, Merci d'avoir fait en sorte que je ne manque de rien. Merci pour les journées passées sur la route et ta patience durant les longues heures d'attente à l'université. Merci infiniment d'avoir supporté mon caractère, je l'avoue, parfois grincheux dans mes moments de stress !

Un grand Merci à toute ma famille qui était présente pour moi durant ces années de thèse. Vous m'avez soutenue, vous m'avez encouragée dans les moments difficiles, vous m'avez transportée et accompagnée durant mes déplacements à l'université. Merci pour les discussions partagées pendant les milliers de kilomètres de trajets !

Merci du fond du cœur aux membres de la famille et aux amis qui ont eu la gentillesse de m'héberger lors de mes déplacements en Algérie et à l'étranger. Merci pour vos chaleureux accueils.

Merci à mes amis pour leur soutien et aux doctorants en particulier Zina, Oumaima et Samiha.

Un merci spécial pour Inès et Ferial. Plus que des amies, vous êtes mes sœurs. Merci d'avoir été présentes même quand la distance nous séparait et pour les longues conversations que nous avons eu qui finissait toujours par nous remonter le moral.

Merci à toutes les personnes qui ont contribué d'une manière ou d'une autre à la réalisation de ce travail.

Merci à vous qui avez su trouver les mots qu'il faut aux moments qu'il faut !

SOMMAIRE

Sommaire

I. Introduction	1
II. Synthèse bibliographique	Error! Bookmark not defined.
1. Historique	3
2. Taxonomie	4
3. Habitat	6
4. Epidémiologie.....	7
4.1. Transmission	7
4.2. Prévalence	8
5. Caractères microbiologiques	9
5.1. Caractères morphologiques.....	9
5.2. Caractères Cultureux.....	10
5.3. Caractères biochimiques	12
5.4. Caractères génétiques.....	12
6. Facteurs de virulence	14
6.1. L'îlot de pathogénicité <i>cag</i> (<i>cag PAI</i>).....	14
• Le système de sécrétion de type IV (SSTIV).....	15
• <i>CagA</i>	16
6.2. Vacuolating Cytotoxin (<i>VacA</i>).....	17
6.3. Uréase	20
6.4. Flagelles	20
6.5. Lipopolysaccharide (LPS).....	21
6.6. Induced Contact Epithelium (<i>iceA</i>).....	21
6.7. Peptidoglycane (PG)	22
6.8. Les Adhésines et protéines de la membrane externe	22
• Blood group antigen binding adhesin (<i>BabA</i>).....	22
• Sialic acid binding adhesion (<i>SabA</i>)	22
• Duodenal ulcer promoting gene (<i>DupA</i>)	23
• Outer inflammatory protein (<i>OipA</i>).....	23
• Adherence associated lipoproteins (<i>AlpA, AlpB</i>)	23
• <i>HopZ</i>	24
• <i>HomB</i>	24
7. Maladies associées.....	24

Sommaire

7.1. Gastrite aigue et chronique	25
7.2. Ulcère gastrique et duodéal.....	25
7.3. Cancer gastrique.....	25
7.4. Lymphome de MALT	26
7.5. Maladies extradigestives	27
8. Physiopathologie	28
• Facteurs bactériens	28
• Facteurs environnementaux.....	28
• Facteurs héréditaires de l’hôte.....	29
9. Méthodes de diagnostic	30
9.1. Méthodes invasives	30
• Examen anatomopathologique	30
• Test rapide à l’uréase.....	31
• Culture.....	32
• Méthodes moléculaires.....	33
9.2. Méthodes non invasives	33
• Sérologie.....	33
• Recherche des antigènes dans les selles	34
• Test respiratoire à l’urée marquée	35
10. Profil antibiotique	37
10.1. Clarithromycine	37
10.2. Métronidazole	38
10.3. Lévofloxacine	39
10.4. Amoxicilline	39
10.5. Tétracycline.....	40
10.6. Rifampicine.....	40
11. Traitement.....	40
11.1. Indication d’éradication	41
11.2. Schémas thérapeutiques disponibles.....	42
• Bithérapie	42
• Trithérapie	42
• Quadrithérapie séquentielle.....	42
• Quadrithérapie concomitante	43
• Quadrithérapie hybride.....	43

Sommaire

• Quadrithérapie bismuthé	43
11.3. Stratégie d'éradication recommandée	43
• Traitement de première ligne	43
• Traitement de deuxième ligne	44
• Traitement de troisième ligne.....	44
11.4. Causes d'échec du traitement d'éradication	44
11.5. Nouvelles approches de traitement de l'infection.....	44
• Probiotiques.....	45
• Plantes médicinales	45
• N-acétylcystéine	45
• SQ109.....	45
• Vaccin.....	46
III. Matériels et méthodes.....	47
1. Matériels	47
1.1. Population étudiée.....	47
1.2. Matériels biologiques	47
1.3. Milieux et réactifs	47
1.4. Equipements.....	47
2. Méthodes	48
2.1. Prélèvements	48
2.2. Culture et antibiogramme.....	48
2.3. Extraction d'ADN	50
2.4. Détection de <i>H. pylori</i> et des mutations associées à la résistance à la clarithromycine par PCR en temps réel.....	50
2.5. Contrôle de l'extraction d'ADN par la détection de la hGAPDH	52
2.6. Détermination des mutations associées à la résistance à la lévofloxacine.....	53
• PCR classique.....	53
• Purification d'ADN	54
• Séquençage.....	54
• Analyse des séquences	55
2.7. Comparaison des souches de <i>H. pylori</i> par RAPD	55
2.8. Détection des facteurs de virulence	56
• <i>cagPAI</i>	57
• Motifs de phosphorylation	58

Sommaire

• <i>vacA</i> régions <i>s</i> et <i>m</i>	60
• <i>vacA</i> régions <i>sla</i> , <i>slb</i> et <i>slc</i>	61
• <i>vacA</i> région <i>i</i>	62
• <i>vacA</i> région <i>d</i>	63
• <i>dupA</i>	64
• <i>babA2</i>	65
2.9. Typage phylogéographique par MLST	66
• PCR classique.....	66
• Purification d'ADN	69
• Séquençage.....	69
• Analyse des séquences	70
IV. Résultats	71
1. Caractéristique des patients	71
2. Prévalence de l'infection	72
3. Résistance aux antibiotiques.....	73
4. Distribution des facteurs de virulence	77
5. Typage phylogéographique	81
6. Colonisation par une double population de <i>H. pylori</i>	86
V. Discussion	87
VI. Conclusion.....	98
VII. Bibliographie.....	100
VIII. Annexes	

**LISTE
DES
TABLEAUX**

Liste des tableaux

Tableau 1: Principales espèces gastriques et entérohépatiques du genre <i>Helicobacter</i>	6
Tableau 2: Avantages et inconvénients des différentes méthodes de diagnostic de <i>H. pylori</i>	36
Tableau 3: Recommandations de recherche et d'éradication de <i>H. pylori</i>	41
Tableau 4: Protocole de la PCR en temps réel de détection de <i>H. pylori</i> et des mutations associées à la résistance à la clarithromycine.....	52
Tableau 5: Protocole de la PCR en temps réel de détection de la hGAPDH.....	53
Tableau 6: Protocole de la PCR de la région QRDR.....	54
Tableau 7: Protocole de la PCR RAPD 1254.....	55
Tableau 8: Protocole de la PCR RAPD 1290.....	56
Tableau 9: Protocole de la PCR <i>cagA</i> site vide.....	57
Tableau 10: Protocole de la PCR du motif de phosphorylation P1.....	58
Tableau 11: Protocole de la PCR du motif de phosphorylation P2.....	59
Tableau 12: Protocole de la PCR du motif de phosphorylation P3.....	59
Tableau 13: Protocole de la PCR du motif de phosphorylation P4.....	59
Tableau 14: Protocole de la PCR mutiplex <i>vacA s</i> et <i>m</i>	60
Tableau 15: Protocole de la PCR <i>vacA s1a</i>	61
Tableau 16: Protocole de la PCR <i>vacA s1b</i>	61
Tableau 17: Protocole de la PCR <i>vacA s1c</i>	62
Tableau 18: Protocole de la PCR <i>vacA i1</i>	62
Tableau 19: Protocole de la PCR <i>vacA i2</i>	63
Tableau 20: Protocole de la PCR <i>vacA d</i>	63
Tableau 21: Protocole de la PCR <i>jhp0917</i>	64
Tableau 22: Protocole de la PCR <i>jhp0918</i>	65
Tableau 23: Protocole de la PCR <i>dupA</i>	65
Tableau 24: Protocole de la PCR <i>babA2</i>	66
Tableau 25: Protocole de la PCR <i>atpA</i>	67
Tableau 26: Protocole de la PCR <i>efp</i>	67
Tableau 27: Protocole de la PCR <i>mutY</i>	68
Tableau 28: Protocole de la PCR <i>ppa</i>	68
Tableau 29: Protocole de la PCR <i>trpC</i>	68
Tableau 30: Protocole de la PCR <i>urel</i>	69
Tableau 31: Protocole de la PCR <i>yphC</i>	69
Tableau 32: Protocole des réactions de séquences des 7 gènes de la MLST.....	70

Liste des tableaux

Tableau 33: Répartition des patients adultes par tranches d'âge	71
Tableau 34: Caractéristiques et résultats des patients de pédiatrie	76
Tableau 35: Distribution des génotypes <i>vacA s/m/i/d</i>	80
Tableau 36: Combinaison des facteurs de virulence <i>cag PAI</i> , <i>vacA s/m</i> , <i>dupA</i> et <i>babA2</i>	82
Tableau 37: Analyse MLST et caractéristiques des patients et des souches.....	83

**LISTE
DES
FIGURES**

Liste des figures

Figure 1: Pr Barry J Marshall et au Dr J Robin Warren lors de la cérémonie de remise du prix Nobel de Médecine 2005.....	4
Figure 2: Dendrogramme de la phylogénie des espèces du genre <i>Helicobacter</i> par comparaison des séquences nucléotidiques du gène de l'ARNr 16S	5
Figure 3: Anatomie et histologie de l'estomac humain.....	7
Figure 4: Prévalence de l'infection à <i>H. pylori</i> dans le monde	9
Figure 5: Aspect de <i>H. pylori</i> . (a) coloration de Gram G×1000. (b) Microscopie électronique	9
Figure 6: Schéma de la transformatin de forme de <i>H. pylori</i>	10
Figure 7: Colonies de <i>H. pylori</i> en subculture.....	11
Figure 8: Arrangement génétique de l'ilot de pathogénicité <i>cag</i> de <i>H. pylori</i>	15
Figure 9: Schéma de l'architecture du SSTIV de <i>H. pylori</i>	16
Figure 10: Représentation schématique des allèles <i>vacA</i>	18
Figure 11: Evolution de l'infection à <i>H. pylori</i>	24
Figure 12: Photos endoscopiques des pathologies gastriques causées par <i>H. pylori</i>	27
Figure 13: Interaction des Facteurs bactériens, environnementaux et héréditaires de l'hôte dans l'évolution de l'infection à <i>H. pylori</i>	29
Figure 14: Classification de Sydney.....	31
Figure 15: Principe du test respiratoire	35
Figure 16: Primoculture de <i>H. pylori</i>	49
Figure 17: Subculture de <i>H. pylori</i>	49
Figure 18: Coloration de Gram de <i>H. pylori</i>	49
Figure 19: Principe de la PCR en temps réel FRET de détection de <i>H. pylori</i>	51
Figure 20: Principe de la détection de la résistance à la clarithromycine de <i>H. pylori</i>	51
Figure 21: Gels de migration des produits de PCR de la RAPD.....	56
Figure 22: Gel de migration des produits de PCR <i>cagA</i> site vide	57
Figure 23: Gel de migration des produits de la PCR multiples <i>vacA s/m</i>	60
Figure 24: Gel de migration des produits de PCR <i>vacA d</i>	64
Figure 25: Répartition des patients adultes selon l'aspect endoscopique	71
Figure 26: Prévalence de l'infection à <i>H. pylori</i> chez les adultes.....	72
Figure 27: Prévalence de l'infection à <i>H. pylori</i> en fonction du sexe.....	73
Figure 28: Prévalence de l'infection à <i>H. pylori</i> par tranches d'âge	73
Figure 29: Résistance primaires de <i>H. pylori</i> aux antibiotiques chez les adultes.....	74
Figure 30: Résistance secondaire de <i>H. pylori</i> aux antibiotiques chez les adultes.....	74

Liste des figures

Figure 31: Comparaison des résultats de résistance à la clarithromycine par PCR et antibiogramme.....	75
Figure 32: Distribution du statut <i>cagPAI</i>	77
Figure 33: Distribution des motifs de phosphorylation.....	77
Figure 34: Proportion des allèles <i>vacA s1</i> et <i>s2</i>	78
Figure 35: Proportion des allèles <i>vacA s1a</i> , <i>s1b</i> et <i>s1c</i>	78
Figure 36: Proportion des allèles <i>vacA m1</i> et <i>m2</i>	78
Figure 37: Proportion des allèles <i>vacA i1</i> et <i>i2</i>	79
Figure 38: Proportion des allèles <i>vacA d1</i> et <i>d2</i>	79
Figure 39: Répartition des combinaisons des allèles <i>vacA s</i> et <i>m</i>	79
Figure 40: Distribution de <i>dupA</i>	80
Figure 41: Distribution de <i>babA2</i>	81
Figure 42: Arbre phylogénétique de l'analyse MLST des souches de <i>H. pylori</i>	85
Figure 43: Mise en évidence de la double colonisation par <i>H. pylori</i> des patients	86
Figure 44: La reconstruction chronologique des événements majeurs de la population se produisant au cours de l'intime association Homme - <i>H. pylori</i>	97

**LISTE
DES
ABREVIATIONS**

Liste des abréviations

A: Adénine

ADN : Acide désoxyribonulcéique

AINS : Anti-Inflamatoires Non Stéroïdiens

AP1: Activator Protéine 1

ARN : Acide ribonucléique

ARNm : Acide ribonucléique messenger

ARNr: Acide ribonucléique ribosomal

Asn: Asparagine

ATTC: American Type Culture Collection

ATP: Adénosine triphosphate

BabA: Blood group Antigen Binding Adhesion

C: Cytosine

cagA: Cytotoxin associated gene A

cagPAI : *cag* Pathogenicity Island

CHU : Centre Hospitalo-Universitaire

CK18 : Cytokératine 18

CLSI : Clinical and Laboratory Standards Institute

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

ECL: Entero Chromaffin Like cell

ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

EPH: Etablissement Publique Hospitalier

EUCAST: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

Liste des abréviations

FISH: Fluorescent *in situ* Hybridization

FRET: Fluorescence Resonance Energy Transfer

G: Guanine

hGAPDH: Humain GlycérAldéhyde-Phospho-DésHydrogénase

GTP: Guanosine triphosphate

HCl : Acide chlorhydrique

iE-DAP : Acide D-glutamylmeso-diaminopimélique

IFN : Interferon

IgG : Immunoglobuline G

IL : Interleukine

IPA : Istitut Pasteur d'Algérie

IPP : Inhibiteurs de la Pompe à Proton

LARH : Laboratoire Algérien de Recherche sur Helicobacter

LPS : Lipopolysaccharide

Lys : Lysine

MALT : Mucosa-Associated Lymphoid Tissue

MAPK : Mitogen-Activating Protein Kinases

MLST: MultiLocus Sequence Typing

MUC1 : Mucine 1

MUC5AC : Mucine 5AC

NF-κB : Nuclear Factor κB

Nod : Nucleotide Oligomerization Domain

OipA : Outer Inflammatory Protein

OMP : Outer Membrane Protein

OMS: Organisation Mondiale de la Santé

PCR : Polymerase Chain Reaction

Liste des abréviations

PCR RELPF: PCR Restriction Fragment Length Polymorphism

PG : Peptidoglycane

pH: Potentiel Hydrogène

PTI : Purpura Thrombocytopénique Idiopathique

PTPN11: Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 11

QRDR : Quinolone Resistant Determination Region

RAPD: Random Amplified Polymorphic DNA

RPTP: Receptor-Like Protein Tyrosine Phosphatases

SabA : Sialic Acid Binding Adhesion

SSTIV : Système de Sécrétion de Type IV

T: Thymine

TGF : Transforming Growth Factor

TLR : Toll-Like receptor

TNF: Tumor Necrosis Factor

VacA : Vacuolating Cytotoxin A

INTRODUCTION

I. Introduction

Helicobacter pylori est la bactérie responsable de l'infection mondiale la plus fréquente et persistante. Depuis sa découverte en 1982 par Barry James Marshall et John Robin Warren (Warren and Marshall, 1983), qui leur a valu le prix Nobel de médecine en 2005, le rôle de la bactérie dans les pathologies gastriques est clairement établi. *H. pylori* colonise la muqueuse gastrique et s'est parfaitement adaptée à la survie dans les conditions hostiles de l'estomac. L'infection entraîne systématiquement une gastrite pouvant évoluer vers des pathologies plus graves comme l'ulcère gastroduodénale, le lymphome de MALT ou le cancer gastrique. *H. pylori* est la seule espèce bactérienne classée par l'Organisation Mondiale de la Santé parmi les agents cancérigènes de type I (Malfertheiner *et al.*, 2012).

Cependant, l'évolution vers les pathologies sévères n'est pas systématique. En effet, 10 à 20% des personnes infectées développent un ulcère gastrique ou duodénale et seulement 1 à 2% un cancer gastrique (De Korwin and Lehours, 2010). Plusieurs facteurs influent cette évolution comme le degré de la réponse inflammatoire de l'hôte vis-à-vis de l'infection, le régime alimentaire ainsi que les facteurs de virulence de *H. pylori* qui jouent un rôle central dans la pathogénèse. La présence ou l'expression de certains d'entre eux rendent la souche plus virulente. La bactérie dispose d'une multitude de facteurs de virulence qui lui permettent de coloniser, de survivre et de persister dans l'estomac tout en créant des dommages parfois irréversibles de la muqueuse gastrique. Le génotype *s1m1* de *VacA* et les souches *CagA* positives sont par exemple associés à un risque élevé d'ulcère duodénal et de cancer gastrique (Atherton *et al.*, 1995; Kuipers, 1999).

Le diagnostic de l'infection à *H. pylori* peut se faire par des méthodes dites invasives nécessitant une endoscopie digestive haute (culture, PCR, anatomopathologie) ou des méthodes non invasives sans biopsies gastriques (test respiratoire, recherche des antigènes dans les selles, sérologie). Le choix de la méthode se fait selon le contexte de la recherche, diagnostic primaire ou contrôle d'éradication de l'infection. La culture est le test le plus spécifique. C'est également la seule technique qui permet l'isolement de la bactérie permettant ainsi d'obtenir un profil antibiotique complet et aussi d'effectuer des examens de typage moléculaire et surtout la conservation des souches. Mais la sensibilité de la technique peut diminuer lors du transport des prélèvements à cause de la fragilité de la bactérie. De plus, la culture de *H. pylori* n'est pratiquée que dans certains laboratoires spécialisés. La PCR, en revanche, n'est pas impactée par les conditions de transport et reste très sensible et rapide mais ne permet d'obtenir qu'un profil antibiotique partiel de la bactérie en plus des équipements nécessaires à son application.

Le traitement de ces pathologies gastriques est devenu en théorie simple. Il repose principalement sur l'éradication de la bactérie. Différents schémas thérapeutiques ont été proposés basés sur l'utilisation de deux antibiotiques, amoxicilline et clarithromycine ou métronidazole couplés à un inhibiteur de la pompe à proton (Malfertheiner *et al.*, 2017). Mais en réalité, l'émergence de la résistance aux antibiotiques entraîne une augmentation du taux d'échec d'éradication de la bactérie et l'introduction d'autres molécules dans les schémas thérapeutiques comme la lévofloxacine, la tétracycline et les sels de bismuth, non sans effets

secondaires. Le choix du traitement d'éradication est crucial, il doit se faire en fonction des tests de sensibilité aux antibiotiques ou des données épidémiologiques spécifiques à chaque région. La surveillance accrue des niveaux de résistance, la clarithromycine notamment, est primordiale. Selon les dernières recommandations de Maastricht V, la triple thérapie à base de clarithromycine ne doit plus être utilisée en première intention comme traitement probabiliste au-delà de 15% de résistance (Malfertheiner *et al.*, 2017).

Par ailleurs, l'infection à *H. pylori* affecte presque la moitié de la population mondiale avec des taux de prévalence très variés d'un pays à un autre. Elle est très élevée dans les pays en voie de développement où elle peut atteindre 90% alors qu'elle ne peut pas dépasser 20% dans les pays industrialisés (Mentis *et al.*, 2015). En Algérie, il n'existe que très peu de données récentes sur l'infection à *H. pylori*. Une étude sérologique dans les années 80 rapportait une prévalence de 80% de la population algérienne (Megraud *et al.*, 1989). Une autre étude à plus petite échelle réalisée à Alger rapporte une prévalence de 62% en 2015 (Djennane-Hadibi *et al.*, 2016). L'Algérie ferait donc toujours partie des régions à forte prévalence de l'infection mais une actualisation des données s'impose. Le diagnostic de l'infection en Algérie repose principalement sur l'anatomopathologie. Peu de laboratoires proposent des techniques alternatives au diagnostic. La culture n'est proposée que par une poignée de laboratoire et la PCR en routine de *H. pylori* n'est, à quelques exceptions, pas disponible privant les cliniciens du profil antibiotique des bactéries. Ceci entraîne la prescription de traitements probabilistes dans un pays où les taux de résistance n'ont pas été réévalués récemment. L'étude de Djennane *et al.* en 2015 a décrit une résistance primaire à la clarithromycine élevée à 36% à Alger (Djennane-Hadibi *et al.*, 2016). Un taux qui impliquerait l'adaptation de la thérapie d'éradication. Malgré la forte prévalence de l'infection dans les pays africains, l'incidence du cancer gastrique est relativement faible par rapport à certains pays asiatiques notamment. L'origine géographique des souches et les facteurs de virulence expliquent en partie ce phénomène (Suzuki *et al.*, 2012). A notre connaissance, il n'existe à ce jour aucune publication sur le génotypage des souches algériennes.

Dans ce contexte, l'objectif de cette étude est de contribuer à l'actualisation des données épidémiologiques sur l'infection à *H. pylori* à Alger permettant une meilleure prise en charge des patients. L'étude est réalisée en collaboration avec plusieurs services de gastroentérologies et un service de pédiatrie, car l'infection est généralement acquise durant l'enfance. Ce travail a pour but :

- L'actualisation du taux de prévalence de l'infection chez les adultes et les enfants symptomatiques jamais traités et ayant subi un traitement d'éradication de *H. pylori* ;
- La mise en évidence de la colonisation mixte par *H. pylori* chez certains patients ;
- L'évaluation des résistances primaires et secondaires aux antibiotiques inclus dans les schémas thérapeutiques ;
- La détermination des facteurs de virulences *cagPAI*, motifs de phosphorylation de *CagA*, *vacA smid*, *dupA* et *babA2* ;
- La réalisation pour la première fois en Algérie du typage phylogéographique par MLST des souches de *H. pylori*.

**SYNTHESE
BIBLIOGRAPHIQUE**

II. Synthèse bibliographique

1. Historique

La découverte de *H. pylori* en 1982 par Warren et Marshall a provoqué un bouleversement des conceptions non seulement en gastroentérologie mais également en microbiologie.

En réalité, l'existence de cette bactérie a été suspectée depuis le début du XX siècle, mais son rôle dans les maladies gastroduodénales a été négligé jusque-là en raison de l'incapacité de sa culture.

- En 1883, Giulio Bizzozero observe des bactéries spiralées au niveau du tractus gastro-intestinal des chiens (Bizzozero, 1893).
- En 1886, Salomon confirme cette observation et démontre que ces bactéries pouvaient être transmises à des souris (Salomon, 1896).
- En 1899, Walery Jaworski suggère une relation possible entre ces bactéries qu'il nomma *Vibrio rugula* et les pathologies gastriques (Konturek, 2003).
- En 1906, Krienitz décrit pour la première fois des bactéries spiralées au niveau même de la muqueuse gastrique humaine (Krienitz, 1906).
- En 1938, Deonges trouve des spirochètes dans 43% d'estomacs humains en post-mortem. Ces résultats furent interprétés comme étant une contamination probable (Doenges, 1938).
- En 1940, Freedberg et Barron retrouvent ces spirochètes dans 37% des prélèvements chirurgicaux frais (Freedberg and Barron, 1940).
- En 1954, Palmer conclut que les spirochètes gastriques sont des contaminations orales, qui se multiplient dans des échantillons post-mortem ou à proximité des ulcères, puisqu'il n'a mis en évidence aucune de ces formes sur 1440 biopsies gastriques (Palmer, 1954).
- Depuis ce temps, les bactéries en spirales ont rarement été mentionnées, jusqu'en 1975, quand Steer et Colin Jones observent des bacilles Gram négatif chez 80% des patients avec un ulcère. En essayant de les isoler, ils se retrouvent avec une culture pure de *Pseudomonas*, contaminant probable (Steer, 1975).
- Le 14 Avril 1982, les deux chercheurs australiens Barry James Marshall et John Robin Warren de l'hôpital Royal de Perth parviennent enfin à cultiver la bactérie spiralée à partir d'une biopsie gastrique d'un patient souffrant d'un ulcère duodéal (Warren and Marshall, 1983).

Ce succès est en partie dû à de la chance, car après de nombreuses tentatives avortées pour cause d'incubation trop courte, ils isolent la bactérie après une incubation de 5 jours suite au week-end prolongé de Pâques. Ils pensent alors que c'est une nouvelle espèce du genre *Campylobacter* avant de la nommer finalement, en vue de ses caractéristiques spécifiques, *H. pylori*.

Malgré leurs travaux démontrant une forte association entre *H. pylori* et l'inflammation gastrique des patients souffrant de gastrites et de maladies ulcéreuses (Marshall and Warren, 1984), une partie de la communauté scientifique réfutait ces

observations. Marshall précéda alors à une auto-ingestion d'une solution concentrée de bactéries pour prouver les effets sur son propre estomac et la disparition des symptômes par administration d'un traitement incluant un antibiotique, le tinidazole, et des sels de Bismuth, remplissant ainsi les postulats de Koch pour la description d'un nouvel agent infectieux (Marshall *et al.*, 1985).

- Le 10 Décembre 2005, le prix Nobel de médecine et physiologie est décerné au Pr Barry J Marshall et au Dr J Robin Warren pour la « découverte de la bactérie *Helicobacter pylori* et son rôle dans la gastrite et la maladie ulcéreuse » (Fig. 1). Ce travail pionnier a stimulé une importante recherche dans le monde entier pour mieux comprendre le lien entre les infections chroniques et des maladies comme le cancer.



Figure 1: Pr Barry J Marshall (à gauche) et au Dr J Robin Warren (à droite) lors de la cérémonie de remise du prix Nobel de Médecine 2005

2. Taxonomie

A sa découverte *H. pylori* est apparentée au genre *Campylobacter* et est dénommée *Campylobacter pyloridis* (Marshall *et al.*, 1984) puis *Campylobacter pylori* (Marshall and Goodwin, 1987). Le genre *Helicobacter* a été créé en 1989, la bactérie est baptisée *Helicobacter pyloridis* puis finalement *Helicobacter Pylori* (GOODWIN *et al.*, 1989).

L'individualisation de ce genre a été établie sur la base de caractères génétiques (séquences des acides ribonucléiques ribosomiaux ARNr 16S, CG%) et phénotypiques (morphologie, structure composition des acides gras, caractères culturels et activités enzymatiques) (Goodwin *et al.*, 1989). Il appartient à la superfamille VI des bacilles Gram négatif et regroupe 35 espèces validées (Fig. 2).

La classification selon le manuel Bergey de systématique bactérienne est la suivante :

- **Domaine :** *Bacteria*
- **Phylum :** *Proteobacteria*
- **Classe :** *Epsilonproteobacteria*
- **Ordre :** *Campylobacterales*
- **Famille :** *Helicobacteraceae*
- **Genre :** *Helicobacter*
- **Espèce type :** *Helicobacter pylori*

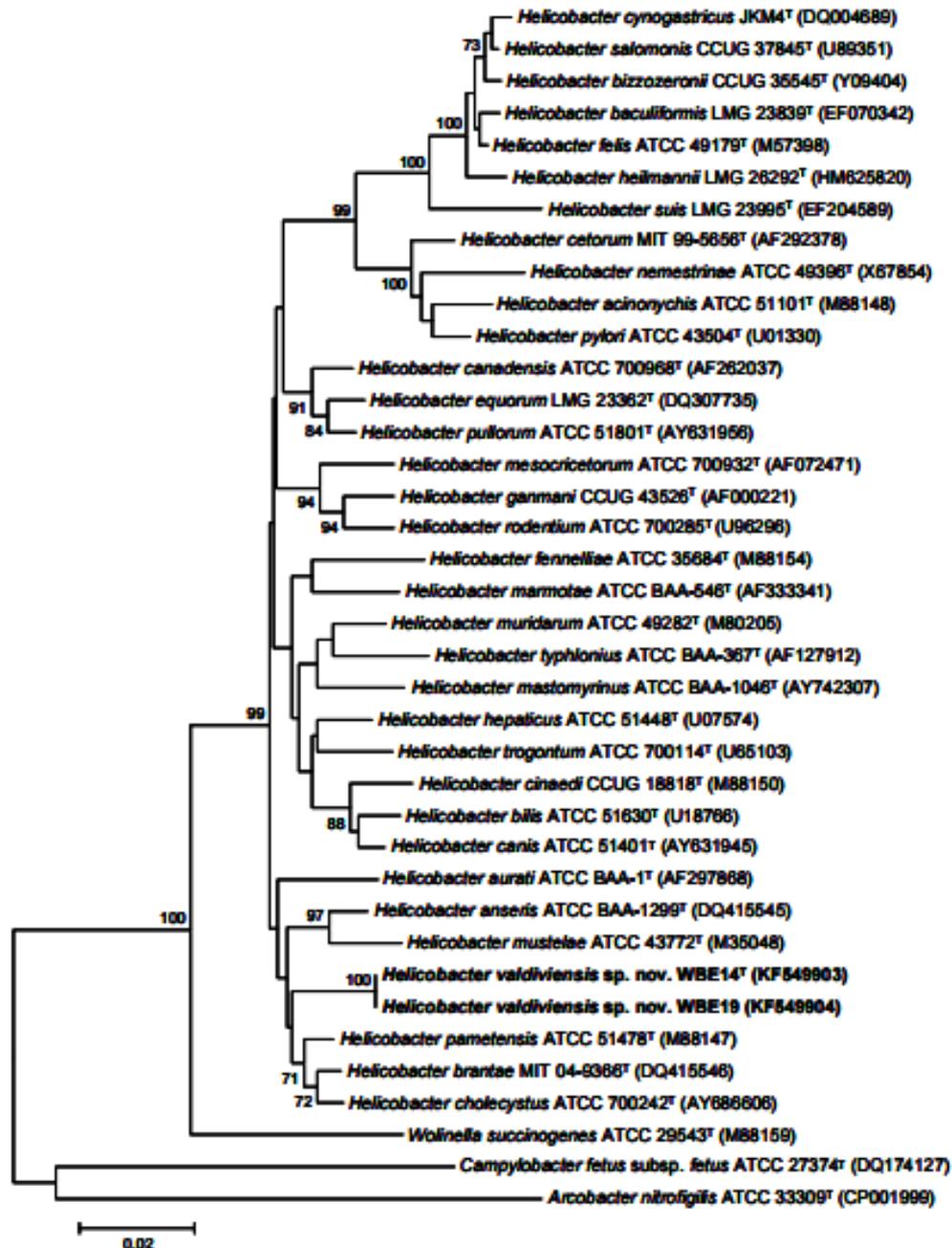


Figure 2: Dendrogramme de la phylogénie des espèces du genre *Helicobacter* par comparaison des séquences nucléotidiques du gène de l'ARNr 16S (Luis Collado *et al.*, 2014)

Synthèse bibliographique

Les espèces du genre *Helicobacter* sont aussi classées en fonction de leur niche écologique. On distingue 2 grands groupes (Lehours, 2003):

- Les espèces gastriques : Retrouvées dans l'estomac de l'homme et des animaux. *H. pylori* reste l'espèce principale isolée de l'estomac humain, les autres espèces ne sont retrouvées que chez de très rares patients (< 0,5%) (Tableau 1).
- Les espèces entérohépatiques ou extradiigestives : Retrouvées dans la muqueuse intestinale, le foie et les voies biliaires des mammifères et des oiseaux. Certaines espèces peuvent occasionner des inflammations chez des individus présentant un déficit immunitaire (Tableau 1).

Tableau 1: Principales espèces gastriques et entérohépatiques du genre *Helicobacter* (Boyanova *et al.*, 2011)

Espèces	Hôtes
Espèces gastriques	
<i>H. pylori</i>	Homme et primates
<i>H. helmanii</i>	Chiens, chats, homme, singes
<i>H. felis</i>	Chats, chiens, rats, hommes
<i>H. bovis</i>	Bétails
<i>H. cetorum</i>	Baleines, dauphins
Espèces entérohépatiques	
<i>H. aurati</i>	Hamsters
<i>H. cinedi</i>	Chiens, chats, oiseaux, macaques, homme
<i>H. fenneliae</i>	Homme, chiens, macaques
<i>H. hepaticus</i>	rongeurs
<i>H. bilis</i>	Rongeurs, chiens, chats
<i>H. pullorum</i>	Volailles, homme
<i>H. equorum</i>	Chevaux

3. Habitat

Le réservoir naturel de *H. pylori* est l'estomac humain, en particulier au niveau de l'antre (On *et al.*, 2002) (Fig. 3).

La barrière épithéliale digestive sert à séparer la lumière digestive du milieu intérieur de l'organisme. Son rôle consiste, d'une part, à maintenir un échange contrôlé de substances entre les deux compartiments, et d'autre part, à assurer la protection contre la pénétration de microorganismes et d'autres antigènes exogènes. La barrière épithéliale gastrique est constituée d'une couche de cellules épithéliales cylindriques et une couche de mucus couvrant ces cellules (Hollander, 1954; Matysiak-Budnik *et al.*, 2004).

L'examen de biopsies gastriques révèle que les bactéries sont localisées dans la couche muqueuse de l'épithélium gastrique. La bactérie peut être observée adhérer aux cellules épithéliales et nager librement dans la couche de mucus. Le mucus gastrique forme une barrière protectrice pour les cellules épithéliales sous-jacentes en limitant la diffusion de l'acide qui peut atteindre une concentration de près de 100 millimolaire dans la lumière de l'estomac (Lee and Mitchell, 1994). *H. pylori* est parfaitement adapté à cet environnement hostile grâce principalement à la production d'une uréase en très grande quantité.

Plusieurs espèces animales ont été suspectées d'héberger *H. pylori* et, par-là, de pouvoir constituer des réservoirs secondaires, mais dans tous les cas ces hypothèses se sont révélées non fondées (MÉGRAUD, 2003).

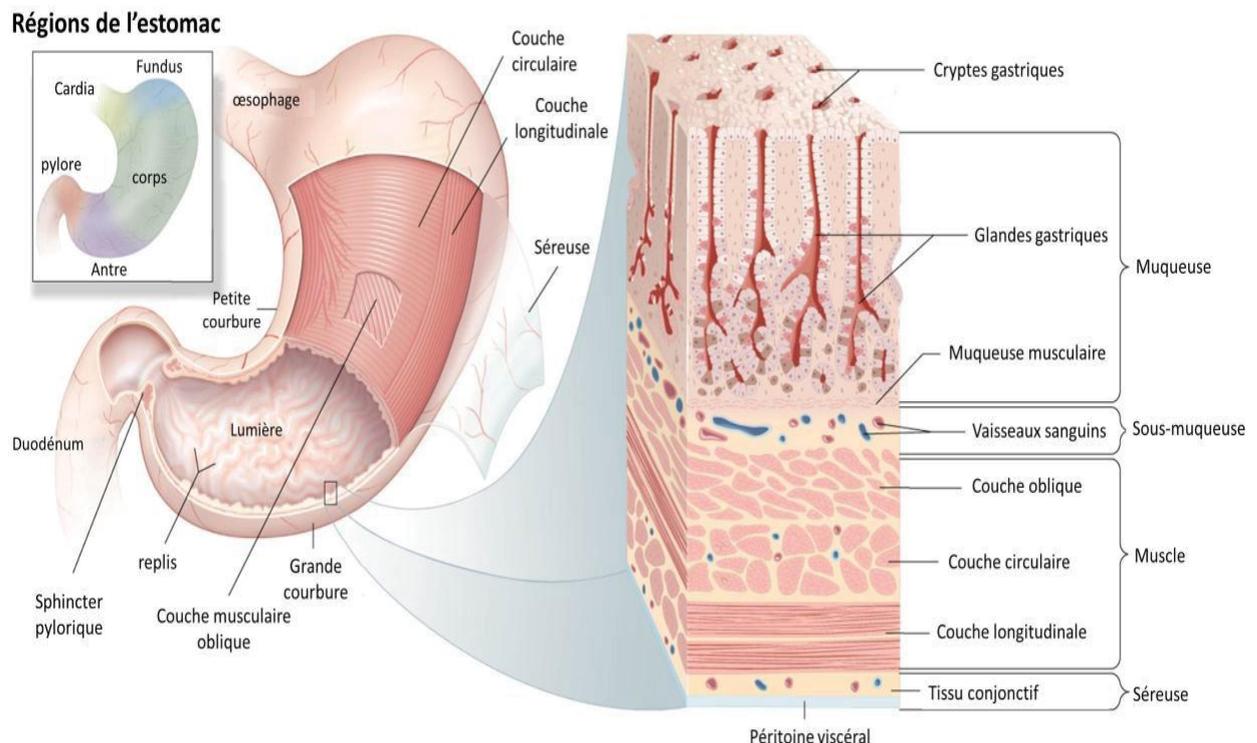


Figure 3: Anatomie et histologie de l'estomac humain

4. Epidémiologie

4.1. Transmission

À partir de l'estomac, *H. pylori* peut être éliminé par vomissement, se retrouver dans la bouche par régurgitation, et être éliminé dans les selles. Les vomissures contiennent du liquide gastrique où *H. pylori* peut être présent (Parsonnet *et al.*, 1999) et survivre quelques heures (Galal *et al.*, 1997). La présence de *H. pylori* dans les selles a pu être démontrée par plusieurs études (Makristathis *et al.*, 1998; Maria P. Dore *et al.*, 2000). La transmission de *H. pylori* est essentiellement interhumaine, avec la possibilité d'une transmission indirecte compte tenu de la survie limitée, mais possible de cette bactérie dans l'environnement. Elle a lieu essentiellement durant l'enfance et dans la famille (Wizla-Derambure *et al.*, 2001). La transmission peut être :

- Fécale-Orale : La transmission à un autre hôte à partir des selles pourrait se faire directement, en cas d'hygiène déficiente notamment, par les mains ou indirectement via l'eau et les aliments. Certaines diarrhées en diminuant le transit intestinal vont permettre l'élimination de formes viables de *H. pylori* et donc augmenter le risque de transmission. c'est la principale voie de transmission dans les pays en développement où les conditions d'hygiène sont déficientes (MÉGRAUD, 2003).
- Orale-Orale : La transmission pourrait se faire par les vomissements et/ou la salive des parents à l'enfant et entre enfants. C'est la principale voie de transmission dans les pays développés (Parsonnet *et al.*, 1999; MÉGRAUD, 2003).

4.2. Prévalence

L'infection à *H. pylori* est très répandue et touche environ 50% de la population mondiale. Sa prévalence varie d'un pays à l'autre et même au sein d'un même pays. Elle est très élevée dans les pays en voie de développement où elle peut atteindre 90% alors qu'elle peut ne pas dépasser 20% dans les pays industrialisés (Fig. 4). La prévalence est donc nettement plus élevée dans les populations défavorisées. L'augmentation du niveau de vie, l'amélioration des conditions d'hygiène et l'importante utilisation des antibiotiques sont parmi les facteurs qui contribuent vraisemblablement à la diminution de la prévalence de *H. pylori* dans les pays industrialisés (Suzuki *et al.*, 2012; Mentis *et al.*, 2015).

L'infection à *H. pylori* est en règle générale acquise très tôt dans l'enfance et perdue toute la vie du sujet en l'absence de traitement d'éradication. Dans les pays en développement, la prévalence maximale est atteinte rapidement parfois avant l'âge de 5 ans. Contrairement aux pays industrialisés où l'infection est relativement moins fréquente chez les jeunes et augmente graduellement avec l'âge (Fiedorek *et al.*, 1991; Rothenbacher and Brenner, 2003; Rowland *et al.*, 2006). Il est généralement accepté que les hommes et les femmes ont le même risque de s'infecter à tout âge (Megraud, 1993). Cependant, certains auteurs ont observé que la prévalence de l'infection à *H. pylori* était légèrement plus élevée chez le sexe masculin que chez le sexe féminin (Woodward *et al.*, 2000).

Il est important de mentionner qu'avec l'augmentation du niveau socioéconomique et l'amélioration des conditions d'hygiène, une diminution significative de la prévalence de l'infection à *H. pylori* est rapportée dans certains pays en développement (Ashtari *et al.*, 2015; Darko *et al.*, 2015; Frugis *et al.*, 2016). Aussi, l'augmentation des déplacements humains essentiellement des pays en développement (à forte prévalence) vers les pays industrialisés (à faibles prévalence) ces dernières années peut également influencer la prévalence localement (Morais *et al.*, 2017).

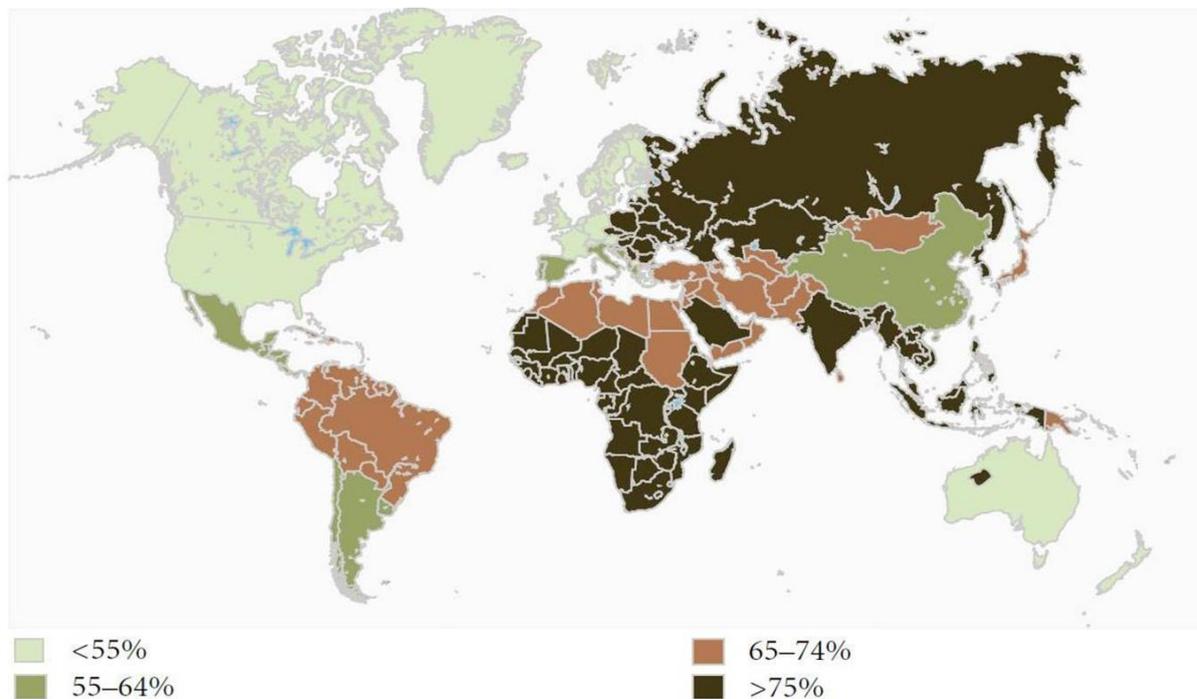


Figure 4: Prévalence d'infection à *H. pylori* dans le monde (<http://www.refluxcentar.com/en/oboljenja/helicobacter-pylori-gastritis/>)

5. Caractères microbiologiques

5.1. Caractères morphologiques

H. pylori est un bacille Gram négatif spiralé, non sporulé, mesurant 2.4 à 5 μm de long sur 0.5 à 1 μm de large (Fig. 5a) (Marshall and Warren, 1984).

La bactérie est très mobile grâce à une ciliature lophotriche de 4 à 8 flagelles qui lui permettent de se mouvoir dans le suc gastrique (Fig. 5b). Les flagelles sont gainés d'un revêtement qui est constitué avec des composants de la membrane externe de la paroi. Ils sont chacun d'environ 30 nm de diamètre et de 12 à 15 nm de long (Owen, 1998; Paul *et al.*, 2000).

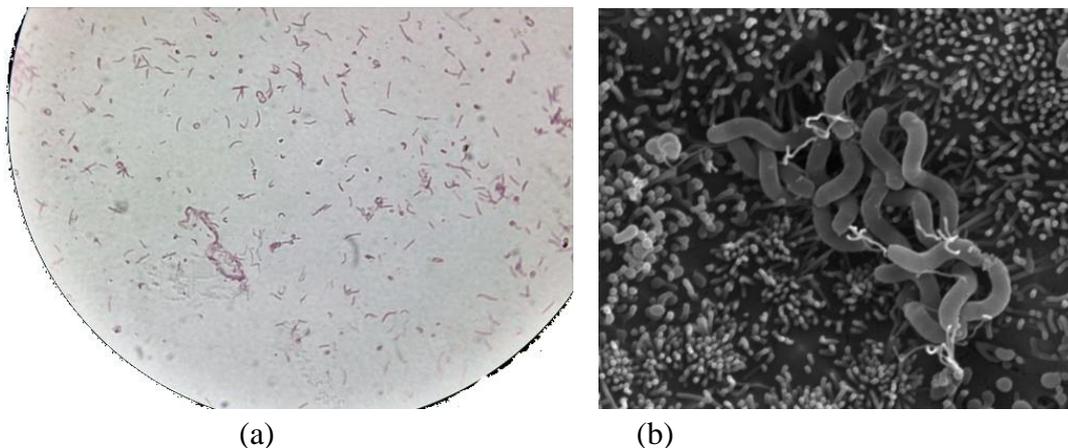


Figure 5: Aspect de *H. pylori*. (a) coloration de Gram G \times 1000 (Raaf N. et Amhis W., unité de microbiologie, hôpital Bologhine 2015). (b) Microscopie électronique (Tan *et al.*, 2009)

H. pylori est d'aspect polymorphe. Après une culture *in vitro* sur milieu solide, la bactérie apparaît comme un bacille incurvé, en V, en U, en C ou en O. Cependant, sur une culture vieille apparaissent des formes coccoïdes non cultivables (Enroth *et al.*, 1999). Ces formes coccoïdes peuvent être divisées en 2 type : viables mais non cultivables et une forme dégénératives. La transformation de la forme spiralée à la forme coccoïdes est induite dans les conditions de stress quand le milieu devient défavorable. Il n'existe aucune preuve de réversion de la forme coccoïdes à la forme spiralée cultivable (Fig. 6). Ces formes pourraient *in vivo* jouer un rôle dans la transmission de l'infection, mais aussi constituer une source d'ADN participant à la diversité génétique de la bactérie, voire à la transmission des gènes de résistance aux antibiotiques (Owen, 1998; Maillet *et al.*, 2005).

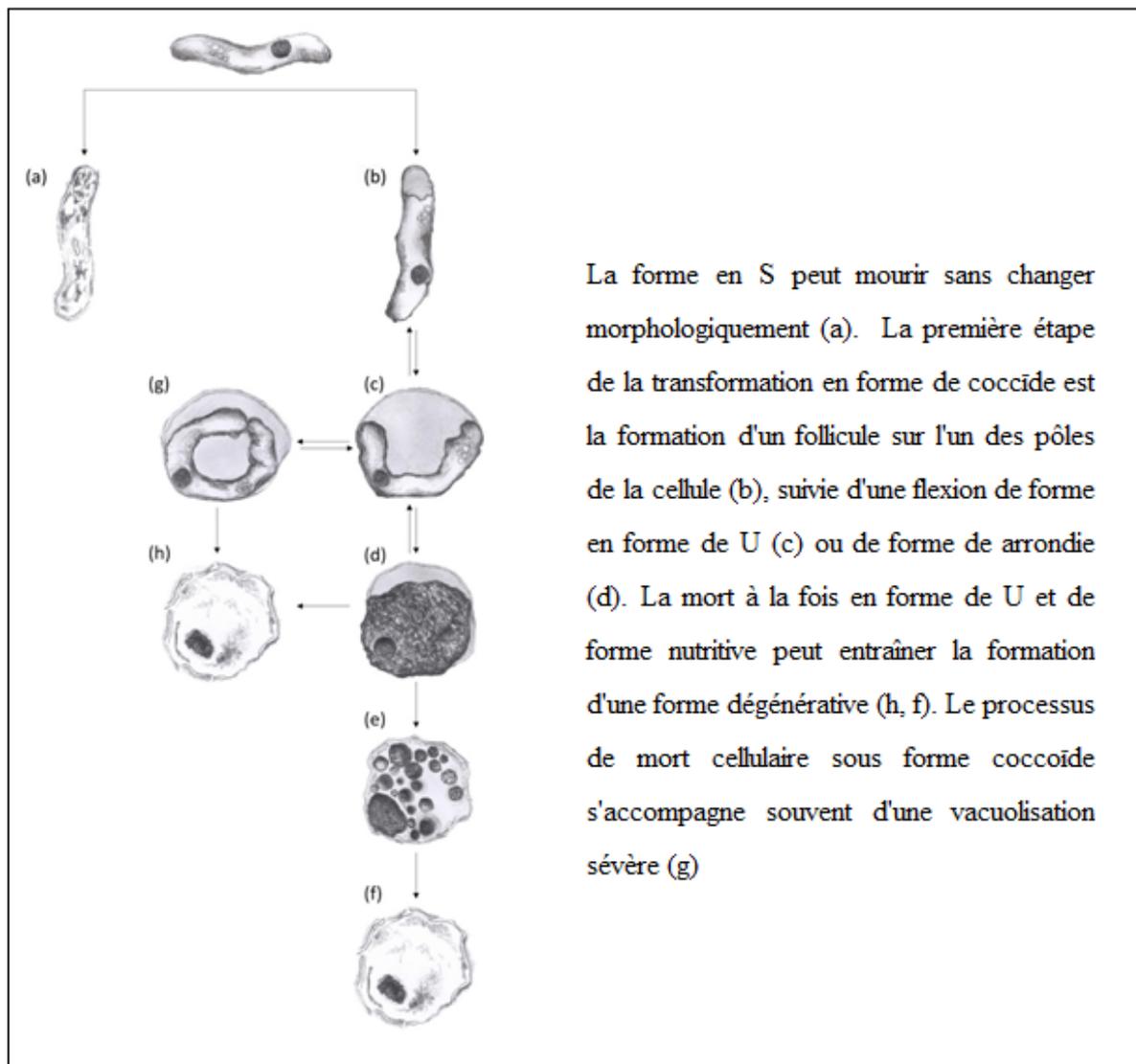


Figure 6: Schéma de la transformation de forme de *H. pylori* (Rudnicka *et al.*, 2014)

5.2. Caractères Cultureux

H. pylori est une bactérie très exigeante, extrêmement fragile et sensible à la dessiccation. C'est une bactérie à croissance lente. Les colonies d'une culture primaire apparaissent au bout de 3 à 5 jours d'incubation. Elles sont petites, circulaires de 1 à 2 mm de

Synthèse bibliographique

diamètre, non pigmentées et translucides (Marshall and Warren, 1984). En subculture la croissance est plus rapide (2 à 3 jours) (Fig. 7).

H. pylori croit sur différents milieux fraîchement préparés à base d'agar : gélose Columbia, cœur-cerveille et Wilkins Chalgren. Ces milieux sont additionnés de suppléments de culture afin d'apporter à la fois des facteurs de croissance indispensables et d'assurer la sélectivité du milieu. Le sang est un facteur de croissance idéal pour cette bactérie comme source de vitamines et d'oligoéléments. Le sang humain aurait un léger avantage, mais il est en pratique remplacé par l'ajout de 10% de sang de cheval ou de mouton. La vancomycine ou la téicoplanine assure la sélectivité vis-à-vis des bactéries Gram positif ; la polymixine, l'acide nalidixique, la colimycine, le triméthoprim ou la cefsulodine assurent la sélectivité vis -à-vis des bactéries Gram négatif et l'amphotéricine B contre les levures (Dent and McNulty, 1988; Owen, 1998; De Korwin and Lehours, 2010).

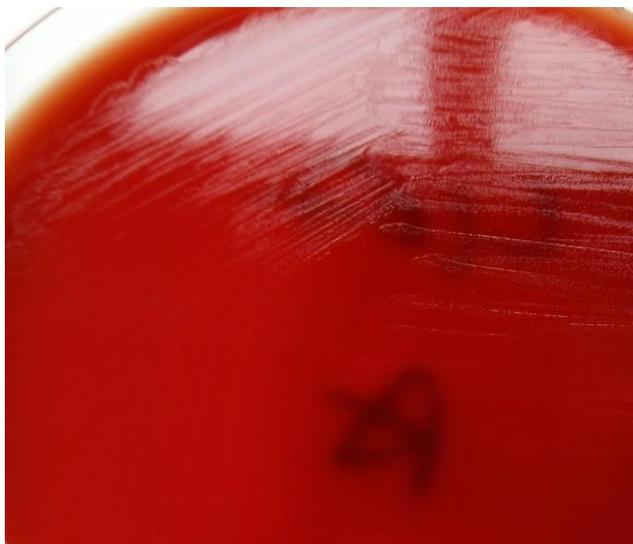


Figure 7: Colonies de *H. pylori* en subculture (Raaf N. et Amhis W., unité de microbiologie, hôpital Bologhine 2015)

H. pylori est microaérophile. Les cultures primaires requièrent une atmosphère appauvrie en oxygène, avec une concentration en O₂ de 3 à 6%, l'optimum est de 5%, une concentration en CO₂ de 6 à 10% et une concentration en H₂ de 0 à 10%. Les subcultures peuvent s'adapter et croître dans une atmosphère standard (18% O₂ et 10% CO₂). Les conditions de microaérophilie sont obtenues par l'utilisation de jarres hermétiques dont l'atmosphère est ajustée à l'aide d'un mélange gazeux ou des sachets générateurs d'une atmosphère enrichie en H₂ et CO₂. *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 croissance est de 37°C. Toutes les souches croissent entre 33 et 40°C, mais aucune souche ne survie à 25°C.

La croissance de *H. pylori in vitro* se situe dans un intervalle de pH de 5,5 à 8,5. Les études ont démontré que *H. pylori* n'est pas une bactérie acidophile malgré son adaptation à la survie dans l'extrême acidité gastrique. La bactérie ne tolère pas un pH inférieur à 5,5 *in vitro*.

5.3. Caractères biochimiques

H. pylori possède une catalase, une cytochrome oxydase et une superoxyde dismutase qui lui permettent de résister au stress oxydatif généré par la réponse immunitaire (Marshall and Warren, 1984; Hazell *et al.*, 1991; Spiegelhalder *et al.*, 1993).

H. pylori est chimioorganotrophe n'utilisant pas les sucres, mais les acides organiques et aminés. Le glucose représente le seul carbohydrate utilisé en le phosphorylant et en l'oxydant par la voie d'Entner-Doudoroff. Les acides aminés constituent une source de carbone, d'azote et d'énergie privilégiée. Dans la croissance *in vitro*, il est nécessaire d'ajouter un certain nombre d'acides aminés : arginine, histidine, isoleucine, leucine, méthionine, phénylalanine et valine. Les lipides sont aussi une source possible de carbone et d'énergie. La bactérie synthétise une γ glutamyl transférase, une leucine aminopeptidase, une phosphatase alcaline, une phosphatase acide, une estérase C4 (butyrate) et C8 (caprylate). Toutes les souches sont indole et nitrate négatives (Kelly, 1998; Owen, 1998).

L'activité enzymatique la plus caractéristique de *H. pylori* est son uréase qui lui permet de survivre dans l'estomac, en créant un environnement alcalin par hydrolyse de l'urée. L'ammoniac étant une base, il permet de diminuer la quantité d'ions H_3O^+ dans le milieu et donc augmenter le pH. L'uréase est une métalloenzyme qui représente 6 à 10% des protéines exprimées ; une partie est donc sécrétée par la bactérie, et une autre partie provient de la lyse des bactéries environnantes, par un phénomène dit de « lyse altruiste ». Cette enzyme permet aux bactéries d'utiliser l'urée comme source d'azote, elle transforme l'urée en ammoniac qui peut être assimilé via la glutamate déshydrogénase ou la glutamine synthétase, suivant la quantité d'énergie disponible dans le milieu (Marais *et al.*, 1999; Bury-Moné *et al.*, 2001). Les mutants non uréolytiques sont incapables de coloniser la muqueuse gastrique (Eaton *et al.*, 1991; Tsuda *et al.*, 1994).

5.4. Caractères génétiques

Le génome de *H. pylori* a été le troisième génome bactérien séquencé. La souche 26695 fut complètement séquencée en 1997 chez un patient anglais présentant une gastrite chronique (Tomb *et al.*, 1997). D'autres souches ont suivi : La J99 isolée chez un patient américain atteint d'un ulcère duodéal (Alm *et al.*, 1999), la HPAG1 isolée chez une patiente suédoise présentant une atrophie gastrique chronique (Oh *et al.*, 2006), La G27 isolée chez un patient italien atteint d'un ulcère duodéal (Baltrus *et al.*, 2009), la Shi470 isolée chez une femme péruvienne présentant une atrophie glandulaire modérée (Kersulyte *et al.*, 2010), la P12 isolée d'un patient souffrant d'un ulcère duodéal (Fischer *et al.*, 2010), la B38 issue d'un français souffrant d'un lymphome de MALT (Thiberge *et al.*, 2010), la souche HP908 isolée chez un patient africain atteint d'un ulcère duodéal récidivant (Devi *et al.*, 2010), la B128 provenant d'un ulcère gastrique et la 98-10 isolée à partir d'un adénocarcinome gastrique (McClain *et al.*, 2009).

Il ressort de la comparaison de ces génomes que *H. pylori* est composé d'un seul chromosome circulaire de petite taille (un tiers moins grand que celui de *E.coli*). Le nombre de paires de bases varie entre 1549666 et 1667867 avec un C+G% d'une moyenne de 39%.

Synthèse bibliographique

Le génome contient approximativement 1500 gènes soit environ 91% du chromosome bactérien. Le nombre de gènes communs entre les différentes souches séquencées est d'environ 1200. Il est fort probable que, grâce à de nouvelles techniques de séquençage rapides (type pyroséquençage), de nouveaux génomes soient rapidement publiés et par conséquent que la partie stable du génome diminue au profit de gènes distribués de manière hétérogène entre les isolats. Une des clés de la compréhension du génome réside dans la définition du pangénome de cette bactérie (Alm and Noonan, 2001; De Korwin and Lehours, 2010). Le génome de *H. pylori* contient 2 copies des gènes de l'ARNr 16S et 23S, une caractéristique inhabituelle par rapport à l'organisation vue dans la majorité des organismes dont les génomes ont été entièrement séquencés (Boyanova *et al.*, 2011).

Cinquante pour cent des isolats de *H. pylori* contiennent un ou plusieurs plasmides. Leur taille varie de 1.8 à 63kpb. La présence de deux mécanismes de répllication distincts divise les plasmides en deux groupes : le premier groupe rarement isolé qui porte des séquences homologues aux plasmides des bactéries Gram positif, se réplique par « rolling circle » ; le deuxième groupe se réplique par le mécanisme « thêta » (Höfler *et al.*, 2004).

H. pylori est l'espèce bactérienne présentant la plus grande hétérogénéité (Suerbaum, 2000). La diversité génétique doit être considérée sous l'angle d'une microdiversité et d'une macrodiversité.

En effet, le génome de *H. pylori* est composé d'une partie stable qui constitue le cœur fonctionnel du génome associé à une partie variable entre les souches. La macrodiversité se base sur la présence, l'absence ou l'existence à une position différente entre les souches de segments polymorphes. Ces gènes spécifiques de souches se localisent dans des régions à bas C+G%, comme la zone dite de plasticité, ou bien sont distribués de manière hétérogène à l'extérieur de cette zone au sein de 17 loci identifiés. L'une de ces régions correspond à l'îlot de pathogénicité dénommé *cag* dont le contenu en G+C est de 35% (Occhialini *et al.*, 2000; Chanto *et al.*, 2002;).

Il a été possible d'estimer que chaque souche de *H. pylori* possède environ 20% de gènes spécifiques. Le cœur fonctionnel du génome de *H. pylori* serait donc suffisamment stable pour assurer l'homogénéité de l'espèce et la partie variable du génome aurait, pour conséquence l'adaptabilité de la bactérie à son environnement ; adaptabilité potentiellement impliquée dans la capacité d'une souche à faire perdurer l'infection et surtout orienter le devenir de l'infection à *H. pylori* vers des pathologies gastriques particulières (Salama *et al.*, 2000).

Diverses méthodes de typage moléculaires ont été utilisées également afin d'analyser la microdiversité génétique de *H. pylori*. Toutes montrent que chaque souche possède son propre profil moléculaire (Kansau *et al.*, 1996). L'explication de ce phénomène tient dans le fait que des variations sont présentes le plus souvent au niveau du troisième codon. Cependant, si l'on considère le caractère redondant du code génétique, la divergence observée au niveau nucléotidique ne se retrouve pas au niveau protéique : aucun des orthologues des deux souches de référence J99 et 26695 ne partage 100% d'homologie nucléotidique alors, qu'en revanche, 41 protéines déduites (2.9%) sont à 100% identiques. Néanmoins, ces variations n'affectent le plus souvent pas le phénotype de la bactérie, elles sont dites alors silencieuses.

Cette variabilité observée au niveau du troisième codon est partagée avec le génome d'autres bactéries à C+G% bas (Alm and Noonan, 2001).

Divers mécanismes génétiques permettent d'expliquer cette grande hétérogénéité chez *H. pylori*. Le taux élevé de variations nucléotidiques retrouvé au sein des souches de *H. pylori* peut résulter de l'accumulation de mutations spontanées. Puisque la plupart d'entre elles n'affectent pas le phénotype (variations silencieuses); ces mutations ne subissent pas de sélections négatives.

La recombinaison jouerait un rôle prépondérant dans l'évolution de la fréquence de recombinaison par rapport à celle de la mutation indiquant que *H. pylori* est une espèce panmictique comparée à d'autres comme *E.coli* et que la fréquence de recombinaison y est nettement supérieure. Cela indique l'existence d'échanges génétiques entre souches, échanges par ailleurs possible *in vivo* entre souches coinfectantes d'un même hôte. L'analyse du contenu génétique des souches de référence J99 et 26695 suggère que *H. pylori* a intégré au cours de son évolution du matériel génétique d'autres genres bactériens comme en témoigne la présence des zones à bas C+G% ainsi que l'existence, dans le génome de *H. pylori*, de gènes homologues à des gènes présents dans des bactéries Gram positif (Wang *et al.*, 1999; Kraft, 2005).

Deux modèles génétiques ont été avancés pour expliquer les différences géographiques entre les souches : la dérive génétique et la sélection. Selon le modèle de la dérive génétique, les souches de *H. pylori*, ont été séparées selon les migrations humaines en deux groupes : les souches asiatiques et les souches environnementales qui ont évolué indépendamment. Il est ainsi possible de subdiviser *H. pylori* en populations et sous-populations ayant chacune une distribution géographique particulière qui permet de suivre les migrations humaines. Le modèle de la sélection repose sur l'hypothèse que, au cours du temps, chacune des souches de *H. pylori* a adapté son génotype à celui de l'hôte (Falush *et al.*, 2003b; Wirth *et al.*, 2004).

D'un point de vue clinique, la question d'actualité est la relation entre la diversité génétique et la physiopathologie des souches de *H. pylori*. Cette diversité pourrait avoir une influence sur la pathogénicité de certaines souches, ou avoir un rôle dans la capacité de survie de la bactérie au niveau de l'hôte.

6. Facteurs de virulence

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

L'îlot de pathogénicité *cag PAI* (cytotoxin associated gene pathogenicity island) est un fragment d'ADN d'environ 40 kb composé d'environ 30 gènes (Fig. 8), présent chez environ 60% des souches de *H. pylori*. Il aurait été incorporé dans le génome de *H. pylori* par transfert horizontal d'une source inconnue. Ce locus code pour un système de sécrétion de type IV (SSTIV) ainsi que des protéines de la famille *Cag* dont *CagA* (Censini *et al.*, 1996; Covacci *et al.*, 1999; Arnold *et al.*, 2011). *Cag PAI* est associé aux pathologies cliniques les plus sévères. *CagA* est l'un des principaux facteurs de virulence reconnu par *H. pylori* et un marqueur de la présence de *cag-PAI*. L'infection par des souches de *H. pylori* *CagA*-positive

augmente le risque d'ulcères gastroduodénaux et de carcinomes gastriques (Parsonnet *et al.*, 1997; Kuipers, 1999).

Lorsque l'analyse génétique du *cag PAI* a suggéré la présence d'un système de sécrétion de type IV, on prévoyait que cette structure devrait intervenir dans le contact avec la cellule hôte et éventuellement induire des voies de transduction du signal qui contribuent à la virulence de *H. pylori*. Au stade actuel, on distingue deux voies de signalisation de cellules hôtes médiées par *cag*, qui sont induites lors de l'attachement de *H. pylori*. L'une est induite par l'antigène immunodominant de *H. pylori*, la protéine *CagA*, alors que la seconde voie est indépendante de *CagA*. Des études de microscopie de déconvolution, d'analyse mutationnelle et de fractionnement biochimique ont montré que l'adhérence *H. pylori* transfère *CagA* dans les cellules hôtes, et que ce processus dépend d'un système fonctionnel de sécrétion IV. L'inactivation de tous les gènes *cag* testés, à l'exception de *cagN*, a supprimé la translocation *CagA* (Segal *et al.*, 1999; Asahi *et al.*, 2000; Backert *et al.*, 2000; Covacci and Rappuoli, 2000; Odenbreit *et al.*, 2000; Stein *et al.*, 2000).

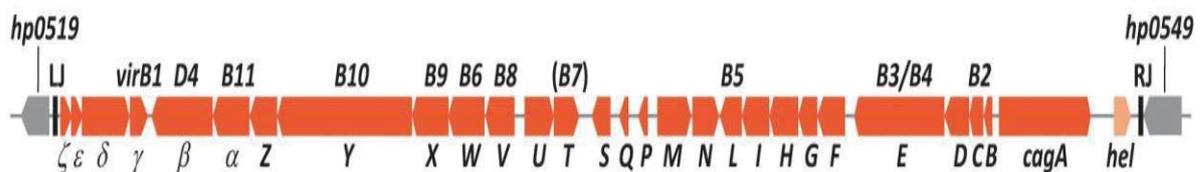


Figure 8: Arrangement génétique de l'îlot de pathogénicité *cag* de *H. pylori* (Fischer, 2011)

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

Le SSTIV est un grand groupe de transporteurs transmembranaires liés au transfert de diverses macromolécules (protéines, ADN, complexes protéiques) par conjugaison (Covacci *et al.*, 1999; Cascales and Christie, 2003; Backert and Meyer, 2006; Fernandez-Gonzalez and Backert, 2014).

Le SSTIV de *H. pylori* permet la translocation de la protéine *CagA*, du peptidoglycane ainsi que d'autres éléments à l'intérieur des cellules épithéliales gastriques (Covacci *et al.*, 1993; Censini *et al.*, 1996; Akopyants *et al.*, 1998; Asahi *et al.*, 2000; Christie and Vogel, 2000; Covacci and Rappuoli, 2000; Odenbreit *et al.*, 2000; Fischer, 2011). C'est un pili avec une structure similaire à une seringue, situé principalement à un pôle de la cellule, induit lors d'un contact avec des cellules hôtes (Rohde *et al.*, 2003; Tanaka *et al.*, 2003; Kwok *et al.*, 2007).

Ce transporteur est composé d'une douzaine de protéines, *VirB1* à *VirB11* et *VirD4*, assemblées pour former 3 sous-parties interconnectées : un complexe cytoplasmique intracellulaire, un canal couvrant la double membrane et un pili externe (Fig. 9). Les protéines constitutives du SSTIV peuvent former des complexes homo ou hétérotypiques dont plusieurs sont indispensables au bon fonctionnement de la machinerie du système. Le rôle de la plupart de ces constituants est inconnu mais la fonction de quelques un à été élucidée. Parmi ces protéines : *VirB4* (*CagE*) et *VirB11* dynamiserait le transport de *CagA* et d'autres substrats,

VirD4 peut avoir une fonction dans la reconnaissance du substrat, *VirB5* agit comme une adhésine à la cellule épithéliale, *CagD* peut être impliquée dans la sécrétion de *CagA* au niveau de la membrane interne et peut être localisée en dehors des bactéries et promouvoir des effets supplémentaires sur la cellule hôte, *CagM* stabiliserait *VirB7(CagT)* (Andrzejewska *et al.*, 2006, 2006; Busler *et al.*, 2006; Kutter *et al.*, 2008; Pinto-Santini and Salama, 2009; Fischer, 2011).

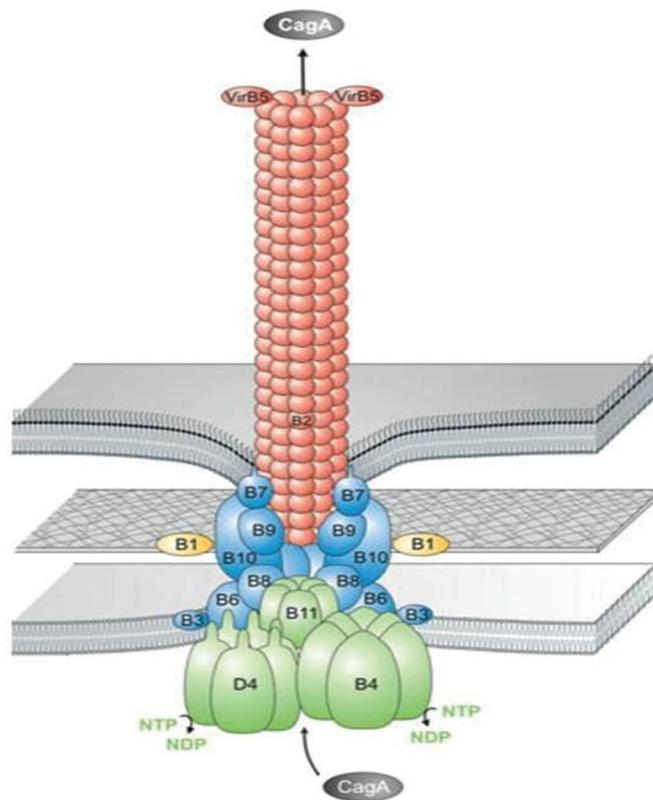


Figure 9: Schéma de l'architecture du SSTIV de *H. pylori* (Tegtmeyer, 2011)

- ***CagA***

CagA a été la première protéine de l'îlot *cag PAI* identifiée et apparentée à un facteur de virulence majeur (Parsonnet *et al.*, 1997). Elle est codée par le gène *cagA* présent à l'extrémité 3' de *cag PAI* (Covacci *et al.*, 1993). Le poids moléculaire varie de 128 à 144 KDa. Une fois injectée par le SSTIV dans la cellule épithéliale, *CagA* est phosphorylée par les kinases de la famille Abl et Src au niveau de la tyrosine des motifs glutamate-proline-isoleucine-tyrosine-alanine (EPIYA) situé à l'extrémité c terminal de *CagA* (Backert *et al.*, 2001; Stein *et al.*, 2002). On distingue 4 sites EPIYA différents : EPIYA-A, EPIYA-B, EPIYA-C et EPIYA-D. Alors que EPIYA-A et EPIYA-B sont présents dans des souches à travers le monde, EPIYA-C se retrouve principalement dans des souches provenant de pays occidentaux (Europe, Amérique du Nord et Australie), tandis que EPIYA-D se retrouve principalement dans des souches des pays de l'est (Japon, Corée et Chine). La protéine *CagA* avec les motifs EPIYA-D a plus d'affinité pour la tyrosine phosphatase *SHP-2*, ce qui pourrait expliquer en partie la plus grande incidence de cancer au Japon et dans une partie de la Chine (Higashi *et al.*, 2002; Aras *et al.*, 2003; Hatakeyama and Higashi, 2005; Kim *et al.*, 2006; Argent *et al.*, 2008; Hatakeyama, 2008).

Les kinases responsables de la phosphorylation de *CagA* sont des acteurs clés dans la carcinogenèse (Selbach *et al.*, 2002; Stein *et al.*, 2002; Tammer *et al.*, 2007; Poppe *et al.*, 2007). Le processus de carcinogénèse serait aussi lié à l'inhibition de *CagA* de la protéine *p53* (Wei *et al.*, 2015). L'éradication de *H. pylori* au stade d'atrophie gastrique ne réduit pas considérablement la proportion de personnes qui développent un cancer sur une période de 5 ans ; ce qui implique que *CagA* interviendrait très tôt dans le processus de cancérogenèse (Wong *et al.*, 2004).

La phosphorylation de *CagA* interfère avec un nombre élevé de facteurs cellulaires et cascades de signalisation pour induire : une altération morphologique cellulaire nommé « becs de colibris » provoquée par le réarrangement du cytosquelette (Segal *et al.*, 1999; Asahi *et al.*, 2000; Odenbreit *et al.*, 2000; Selbach *et al.*, 2002; Stein *et al.*, 2002; Tammer *et al.*, 2007), une perturbation du cycle des cellules épithéliales via l'activation de la voie de signalisation mitogénique qui peut aboutir à une prolifération incontrôlée et ou à la mort cellulaire (Selbach *et al.*, 2002; Amieva *et al.*, 2003; Bäckhed *et al.*, 2003; Brandt *et al.*, 2005; Boughan *et al.*, 2006; Tammer *et al.*, 2007) et la contribution avec le SSTIV et le peptidoglycane à la stimulation du NF- κ B (nuclear factor-kappa B) qui active la transcription de cytokines inflammatoires comme l'IL8 (Crabtree *et al.*, 1999; Viala *et al.*, 2004).

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 (Amieva *et al.*, 2003; Bagnoli *et al.*, 2005; Franco *et al.*, 2005; Suzuki *et al.*, 2005; Saadat *et al.*, 2007).

Une étude récente fournit des preuves de voies distinctes de phosphotyrosine induites par *CagA* et SSTIV et suggère que *CagA* pourrait activer des voies indépendamment du SSTIV (Glowinski *et al.*, 2014).

6.2. Vacuolating Cytotoxin (*VacA*)

La cytotoxine vacuolisante *VacA* est codée par le gène *vacA* présent chez toutes les souches de *H. pylori* mais seulement 40% d'entre elles expriment la forme active de la cytotoxine. La toxine *VacA* est sécrétée sous forme de monomère ou de complexe homo-oligomérique constitué de 6 à 7 copies de la même protéine d'environ 90KDa (Lupetti *et al.*, 1996; Cover *et al.*, 1997).

VacA est composée de 2 sous unités fonctionnelles *p33* et *p55*. La *p33* contient une séquence hydrophobe impliquée dans la formation de pores, tandis que la *p55* contient un ou plusieurs sites de liaison cellulaires (Reyrat *et al.*, 1999; Vinion-Dubiel *et al.*, 1999).

La séquence de *VacA* présente un polymorphisme qui conduit à des variations de l'activité vacuolisante des différentes souches de *H. pylori* (Atherton *et al.*, 1995) (Fig. 10):

- La région 5' s codant pour le peptide signal et la protéine mature N-terminal. Cette région peut correspondre à 2 allèles différents. *s1* (divisé en sous allèles *s1a*, *s1b* et *s1c*) qui est associé à la toxine complètement active, contrairement à *s2* qui produit

une extension N-terminal courte bloquant la formation de vacuoles (Atherton *et al.*, 1995).

- La région médiane *m* codant pour une partie de la sous unité *p55*. Cette région peut également correspondre à 2 allèles. *m1* qui provoque une activité vacuolisante plus forte que *m2* (divisé en sous allèles *m2a* et *m2b*) (Atherton *et al.*, 1995).
- La région intermédiaire *i* codant pour la sous unité *p33*. Cette région est divisée en 3 allèles *i1*, *i2* et *i3*. *i1* semble être le plus pathogène (Rhead *et al.*, 2007).
- La région de délétion *d* récemment découverte est divisée en 2 allèles. *d1* sans délétion et *d2* avec une délétion de 69 à 81 pb (Ogiwara *et al.*, 2009).

vacA s1/i1/d1/m1



vacA s2/i2/d2/m2



Figure 10 : Représentation schématique des allèles *vacA* (Suzuki *et al.*, 2012)

En général, le génotype *s1m1i1* est associé à un risque accru de cancer gastrique et d'ulcère duodéal, en raison de la forte activité cytotoxique contrairement au génotype *s2m2i2* qui est rarement associé aux évolutions graves. Le génotype *s1i1m2* est actif sur un plus petit nombre de lignées cellulaires que le génotype *s1m1i1*, car *m2* se lie plus difficilement aux cellules épithéliales. Le type *s2i2m2* est non vacuolisant (Achtman *et al.*, 1999; Argent *et al.*, 2004). L'allèle *m2* serait prédominant dans les lymphomes gastriques de MALT (Koehler *et al.*, 2003). Le rôle des régions *i* et *d* est encore controversé ; par conséquent la région *m* reste le meilleur marqueur pour le cancer gastrique (Ogiwara *et al.*, 2008).

VacA est une cytotoxine multifonctionnelle, elle induit principalement :

- Une cytotoxicité : *VacA* provoque la vacuolisation de cellules épithéliales *in vitro* entraînant une réduction de la production d'ATP mitochondrial et réduisant la consommation d'oxygène (Kimura *et al.*, 1999) ; mais cela ne conduit pas rapidement à la mort cellulaire (Smoot *et al.*, 1996). Le mécanisme par lequel *VacA* provoque la mort des cellules épithéliales *in vivo* chez l'homme est inconnu, mais chez les souris l'administration orale de *VacA* entraîne une érosion de l'épithélium gastrique, impliquant vraisemblablement une perte cellulaire (van Doorn *et al.*, 1998a).
- Une formation de canal ionique : *VacA* forme des canaux ioniques dans les membranes plasmiques des cellules. La perméabilisation épithéliale et la vacuolisation sont secondaire à la formation de canaux fonctionnels anioniques (Szabò *et al.*, 1999; Yahiro *et al.*, 1999).

- Une liaison aux récepteurs de la membrane cellulaire : Plusieurs lignes de preuves ont documenté que *VacA* se lie directement à deux types de RPTP (receptor-like protéine tyrosine phosphatase), et RPTPa et RPTPb sur la surface des cellules épithéliales gastriques (Yahiro *et al.*, 2003) ce qui est critique pour l'activation de la signalisation des voies cellulaires menant à la vacuolisation (Nakayama *et al.*, 2006). Les études suggèrent l'existence de multiples sites de liaison et la présence de récepteurs spécifiques de *VacA* exprimés sur différentes lignées cellulaires. Il a aussi été démontré que l'acidification du milieu améliore la liaison de la toxine avec certaines lignées cellulaires (Yahiro *et al.*, 1999). En effet, lorsque *vacA* est exposée à un pH acide, le complexe se dissocie en monomères qui se lient aux cellules épithéliales, la région C-terminal *p55* joue le rôle de ligand et forme un canal à anions (Ji *et al.*, 2000).
- Une internalisation de *VacA* : Les deux régions 55 kDa et 33 kDa sont nécessaires pour l'internalisation *VacA* (Reyrat *et al.*, 1999). Pour être internalisés, *VacA* doit être activé par exposition à un pH (McClain *et al.*, 2000). L'internalisation se ferait par endocytose, après les vésicules membranaires contenant *VacA* (Garner and Cover, 1996) sont transportées le long de la voie d'endocytose où elles s'accumulent et persistent pendant des jours avec peu de preuves de dégradation (Ricci *et al.*, 1997; Sommi *et al.*, 1998).
- Une vacuolisation cellulaire et une altération de la fonction endolysosomale : Les membranes vacuolaires contiennent des endosomes tardifs et des marqueurs lysosomes, (Papini *et al.*, 1994; Moll *et al.*, 1995). La formation de vacuoles *VacA* induites nécessite la pleine activité de V-ATPase et la présence de bases faibles (Cover *et al.*, 1993; Papini *et al.*, 1993; Ricci *et al.*, 1997). Deux petites protéines de liaison GTP se sont avérées être impliquées dans la biogenèse vacuole: le régulateur de trafic membranaire *Rab7* et l'actine du cytosquelette-associé *Rac1* (Papini *et al.*, 1997; Hotchin *et al.*, 2000). *VacA* entrave le transport des hydrolases acides pour les lysosomes, ce qui entraîne la libération de ces enzymes dans le milieu extracellulaire (Satin *et al.*, 1997).
- Une altération de la perméabilité de l'épithélium : La perméabilisation sélective des monocouches épithéliales par *VacA* entraîne la libération de ces molécules comme Fe^{3+} , Ni^{2+} , les sucres et les acides aminés, qui pourraient soutenir la croissance de *H. pylori* dans la couche de mucus gastrique (Papini *et al.*, 1998; Pelicic *et al.*, 1999). *VacA* augmente aussi le flux trans-épithélial de certaines molécules telles que l'urée (Tombola *et al.*, 2001).
- Une libération du cytochrome c des mitochondries menant à l'apoptose : Une fois dans le cytoplasme, *VacA* serait capable de pénétrer dans les mitochondries provoquant une libération de cytochrome C qui active une voie métabolique conduisant à l'apoptose cellulaire (Kusters *et al.*, 2006).

- Un effet suppresseur sur les cellules immunitaires : *VacA* peut inhiber le traitement et la présentation des peptides antigéniques aux lymphocytes T CD4 + (Molinari *et al.*, 1998a), supprimer la progression du cycle cellulaire induit par l'IL-2 et la prolifération de cellules T primaires sans affecter le facteur nucléaire des cellules T activées, Ainsi, *VacA* peut inhiber l'expansion clonale des cellules T qui ont été activées par des antigènes bactériens (Gebert *et al.*, 2003) ; et peut induire l'ARNm du facteur de croissance transformant b TGF- β 1 mucoales qui a un effet suppresseur sur les lymphocytes. Par tous ces mécanismes, *VacA* contribue à la persistance de *H. pylori* en interférant avec la réponse immunitaire entraînant une infection chronique.

6.3. Uréase

L'uréase est un déterminant crucial de la virulence de *H. pylori*, elle intervient à la fois dans les mécanismes de colonisation, de survie et de pathogénicité. L'ammoniac produit sous l'action de l'uréase est cytotoxique et peut aussi générer des dommages cellulaires (Kuwahara *et al.*, 2000). L'enzyme possède une double localisation intra et extracellulaire, mais la résistance à l'acidité est attribuée à la dégradation de l'urée au niveau cytosolique (Scott *et al.*, 1998).

Les gènes codant pour l'uréase de *H. pylori* sont situés en un seul groupe de gènes de 6,13 kb sur le chromosome de la bactérie. Sept gènes sont nécessaires pour la synthèse d'une enzyme active (Labigne *et al.*, 1991). Les gènes *ureA* et *ureB* codent pour les sous-unités structurales de l'enzyme, et les gènes *ureI*, *ureE*, *ureF*, *ureG*, *ureH* codent pour les protéines accessoires qui activent l'enzyme par incorporation des ions nickels (Suerbaum and Josenhans, 1999). L'activité de l'uréase a besoin d'être adapté aux variations de pH du milieu extracellulaire. Une particularité du groupe de gène uréasique de *H. pylori* est la présence en amont des gènes auxiliaires d'une phase ouverte de lecture *ureI* codant pour une protéine hydrophobe intégrée au niveau de la membrane cytoplasmique formant un canal dont l'ouverture est contrôlée par le pH externe (Weeks *et al.*, 2000). Un pH acide induit l'ouverture du canal permettant le passage de l'urée hydrolysée par l'uréase dans le cytoplasme bactérien. L'augmentation du pH provoque la fermeture du pore et empêche le passage de l'urée. En effet, dans un premier cas, un pH neutre serait maintenu en présence de la bactérie dont la production d'ammoniac serait faible, car l'urée serait présente à ce niveau à des concentrations inférieures à celles de la lumière gastrique. Dans un second cas, la bactérie produirait de l'ammoniac en quantité significative au niveau épithélial, et le maintien d'un environnement neutre pour la bactérie et les cellules nécessiterait l'apport de protons par diffusion à travers l'épithélium afin de compenser l'alcalinisation générée par la production d'ammoniac (Bury-Moné *et al.*, 2001).

6.4. Flagelles

La mobilité de *H. pylori* grâce à la rotation des flagelles qui lui assure la propulsion à travers le mucus gastrique visqueux lui confère la capacité de se mouvoir facilement dans la muqueuse gastrique, et ainsi d'abrégé son séjour dans le suc gastrique.

La machinerie flagellaire est fonctionnelle grâce à l'expression de plus de 50 protéines. (Tomb *et al.*, 1997) Ces flagelles sont composés de 3 éléments de structure : une base ancrée

dans la paroi de la cellule et qui contient les protéines nécessaires à la chimiotaxie et à la rotation, telle que la protéine flagellaire motrice *MotB* (Ottemann and Lowenthal, 2002); un filament externe en forme d'hélice constitué d'un copolymère de sous unités de flagellines majeures *FlaA* et de sous unités de flagellines mineures *FlaB* (Kostrzynska *et al.*, 1991; Leying *et al.*, 1992; Suerbaum *et al.*, 1993) ; et un crochet qui sert de joint entre les deux codé par les gènes *flgE* et *fliD*. La flagelline *FlaA* de *H. pylori* possède une très faible capacité pour activer le Toll-like receptor5 (TLR5), ce qui lui permet d'échapper à la réponse immunitaire et de persister dans la muqueuse gastrique (Lee *et al.*, 2003).

6.5. Lipopolysaccharide (LPS)

Le LPS de *H. pylori* est peu immunogène et lui permet d'échapper à la réponse immunitaire de l'hôte (1000 fois moins immunogène que *E.coli*) (Cullen *et al.*, 2011). D'une part, le LPS présente un mimétisme moléculaire avec les cellules de l'hôte. En effet, plus de 80% des souches de *H. pylori* expriment un antigène-O fucosylé similaire à l'antigène du groupe sanguin humain *Lewis* présent aussi sur les cellules épithéliales gastriques (Mackowiak, 1982; Heneghan *et al.*, 2000; Fujimoto *et al.*, 2013) ; D'autre part, un polymorphisme structurel du lipide A a été démontré lors des dernières étapes de sa biosynthèse dû à l'enzyme *Lpx J* qui conduit à une réduction considérable de l'activité immunologique (Suarez and Peek, 2014)

Malgré la faible activité immunologique du LPS de *H. pylori*, la colonisation par *H. pylori* de la muqueuse gastrique humaine est associée à l'inflammation par l'activation de cellules mononucléaires par des mécanismes aussi bien dépendants qu'indépendants du LPS. (Mai *et al.*, 1991). En raison de la dégradation enzymatique de LPS par les phagocytes, des structures partiellement modifiées du LPS et / ou du lipide A peuvent être excrétées par exocytose. Ces composés, en conservant une activité immunologique, pourraient jouer un rôle subliminal de bas grade, les stimuli persistants impliqués dans la pathogenèse de *H. pylori* au cours de l'infection chronique à long terme, contribuant à des lésions gastriques, et potentiellement à des séquelles extragastriques (Moran and Aspinall, 1997; Moran, 1999).

Une étude récente suggère que lors de la phagocytose de *H. pylori* par les macrophages, la structure du lipopolysaccharide empêche une réponse immunitaire innée efficace car certaines souches de *H. pylori* sont en mesure d'influencer CTSX (cathepsine X) qui importe des protéines permettant une fluidité suffisante de la membrane des cellules présentatrices d'antigènes essentielles pour le début d'une réponse immunitaire (Skvarc *et al.*, 2014).

6.6. Induced Contact Epithelium (*iceA*)

iceA est un gène induit par le contact avec l'épithélium. Le produit du gène est inconnu, mais il semble être une enzyme de restriction bactérienne. Il y a deux principales variantes alléliques du gène: *iceA1* et *iceA2*. La fonction de *iceA1* n'est pas encore claire, mais il ya une homologie significative à un endonucléase de restriction de type 11. L'expression de *iceA1* est régulée à la hausse avec le contact entre *H. pylori* et les cellules épithéliales humaines et peut-être associée à la maladie de l'ulcère duodénal et le renforcement de l'infiltration neutrophile aiguë (Qabandi *et al.*, 2005). Cependant, le couplage entre le génotype de *iceA1* et l'ulcère n'est pas universel (Andreson *et al.*, 2002).

6.7. Peptidoglycane (PG)

Au cours de l'infection par *H. pylori*, le PG, un composant majeur de la paroi cellulaire, est un acteur fort 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 gastrique *Nod-1* (Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 1), détectrice spécifique de l'iE-DAP (g-Dglutamyl-meso-diaminopimelic acid) métabolite du PG, induit l'activation du facteur nucléaire NF- κ B (Nuclear Factor- κ B) entraînant la sécrétion de l'IL-8 (Viala *et al.*, 2004), de la β -défensine 2 (Boughan *et al.*, 2006; Grubman *et al.*, 2010), du AP1 (activator protein 1), du MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinases) (Yoo *et al.*, 2002; Allison *et al.*, 2009). La liaison du PG avec NOD1 induit donc une réponse inflammatoire et l'apoptose cellulaire.

6.8. Les Adhésines et protéines de la membrane externe

Environ 4% du génome de *H. pylori* code pour des protéines de la membrane externe OMP, (Outer membrane proteins) dont l'expression est fortement associée aux pathologies gastroduodénales. L'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 (Alm *et al.*, 2000; Oleastro and Ménard, 2013).

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

BabA est la meilleure adhésine de *H. pylori*. L'adhésine de 78 kDa codé 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) et aussi MUC5AC et MUC1 dans le mucus gastrique. Ainsi, plutôt que d'être une barrière physique pour la muqueuse gastrique, les cellules épithéliales gastriques constituent un site préférentiel d'adhésion de *H. pylori*, lui fournissant un abri dans lequel la bactérie peut éviter la dispersion bactérienne et utiliser efficacement ses systèmes de sécrétion pour délivrer des molécules effectrices pour moduler la cellule hôte (He *et al.*, 2014)

Les souches *H. pylori BabA2+* adhèrent mieux que les autres aux cellules épithéliales et grâce à leur activité pro-inflammatoire, elles sont plus souvent associées à des pathologies gastriques sévères comme l'ulcère et l'adénocarcinome gastrique que les souches *BabA2-* (Gerhard *et al.*, 1999). L'adhésion de *BabA* à *Lewis b* est un potentialisateur de l'activité du SSTIV, déclenchant ainsi la transcription de gènes qui augmentent l'inflammation, le développement de la métaplasie intestinale, et les transformations précancéreuses associées (Ishijima *et al.*, 2011).

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

SabA est l'une des adhésines clé qui permet à *H. pylori* de s'adapter aux conditions dynamiques de l'estomac humain. C'est une protéine de 70kDa qui se lie à la structure sialylée de l'antigène *Lewis x* exprimé à la surface des cellules épithéliales et interagit avec MUC5B. L'expression de ces derniers est induite durant l'inflammation gastrique chronique, ce qui

indique que *H. pylori* peut moduler les motifs de glycosylation des cellules de l'hôte pour améliorer l'adhérence et la colonisation (Mahdavi *et al.*, 2002; Talarico *et al.*, 2012).

SabA est régulée par variation de phase de façon à ce que son expression soit rapidement induite ou désactivée pour s'adapter aux changements de la niche gastrique. Elle est associée au risque de développement de cancer gastrique mais pas au risque d'ulcère duodéal (Yamaoka *et al.*, 2006).

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

DupA est un facteur de virulence situé dans la zone de plasticité du génome de *H. pylori* (Lu *et al.*, 2005). La pathogénèse de *DupA* semble impliquer l'induction de la production d'IL-8 au niveau de l'antra, ce qui conduit à une gastrite antrale prédominante, qui est un caractère de l'ulcère duodéal. Les souches de *H. pylori* exprimant le gène *dupA* sont associées à des processus inflammatoires plus importants. Récemment, il a été rapporté que *H. pylori* contenant l'allèle *dupA1* induirait une activation de la sécrétion d'IL-12 par les leucocytes mononucléés, contrairement à l'allèle *dupA2* (Hussein *et al.*, 2010). L'association entre la présence de *dupA* et le risque élevé de développement d'ulcère duodéal et/ou cancer gastrique est très controversée dans les études. Bien que la relation de causalité entre le pôle *DupA* et le développement de l'ulcère duodéal n'a pas été prouvée, la présence d'un cluster complet *DupA* et non *DupA* seul est associée au développement de l'ulcère duodéal (Yamaoka, 2012).

- **Outer inflammatory protein (*OipA*)**

OipA est une protéine membranaire inflammatoire qui contribue à l'induction de l'IL-8 (Patel *et al.*, 2014), la métalloprotéase matricielle MMP-1 fortement associée au cancer gastrique (Yamaoka *et al.*, 2006) et induit l'inflammation et la dynamique de l'actine à travers la phosphorylation de multiples voies de signalisation qui interagissent habituellement avec les voies *cagPAI* (*CagA*) (Tabassam *et al.*, 2009). *OipA* interagirait donc de façon synergique avec les autres facteurs de virulence de *H. pylori* pour aboutir à de graves lésions gastriques (Yamaoka, 2012). Il existe un polymorphisme de *OipA*. La présence du gène *oipA* fonctionnel accroît le risque d'ulcère duodéal et de cancer gastrique (Liu *et al.*, 2013).

- **Adherence associated lipoproteins (*AlpA*, *AlpB*)**

Les lipoprotéines d'adhérence associée *AlpA* (adherence associated lipoproteins) 56 kDa et *AlpB* 57 kDa sont codées par des gènes adjacents hautement homologues, l'*ALPA* et *ALPB* (Alm *et al.*, 2000). Elles sont impliquées dans la colonisation gastrique (Odenbreit *et al.*, 1997). Elles sont essentielles dans l'adhésion de la bactérie au tissu gastrique humain dans un modèle différent que celui observée pour l'adhésion de *BabA*, ce qui suggère qu'un récepteur différent peut être impliqué (Odenbreit *et al.*, 1999). *ALPA* et *ALPB* induisent des lésions gastriques en modulant la cascade de signalisation pro-inflammatoires intracellulaires (Lu *et al.*, 2007). Le fait que ces deux protéines semblent être constitutivement exprimées par tous les isolats de *H. pylori* et sont reconnues spécifiquement par les sérums des patients infectés par *H. pylori* (Baik *et al.*, 2004; Xue *et al.*, 2005) les rend une cible attrayante pour la conception d'un vaccin (Bai *et al.*, 2002; Sun *et al.*, 2010).

- **HopZ**

Le gène *hopZ* code pour une protéine *HopZ* de 74 kDa située sur la surface des bactéries. Aucun récepteur n'a pu être identifié pour cette adhésine. *In vivo*, son rôle dans l'adhésion et la colonisation n'est pas clair (Peck *et al.*, 1999).

- **HomB**

Le gène *Homb* code pour la protéine de *HomB* de 75 kDa exprimée dans la membrane externe de *H. pylori*. La protéine est associée à la sécrétion de l'IL-8 *in vitro* et contribue à l'adhérence des bactéries (Oleastro *et al.*, 2008).

7. Maladies associées

L'infection à *H. pylori* est un bon modèle d'infection lente, dont le tableau clinico-pathologique se constitue avec un temps de latence variable, souvent de plusieurs décennies.

L'infection par *H. pylori* provoque systématiquement une gastrite aiguë majoritairement asymptomatique, puis chronique pouvant évoluer vers des pathologies plus sévères comme l'ulcère gastrique et duodénal dans 10 à 20% des cas, le cancer gastrique dans 1 à 2% des cas ou le lymphome de MALT (Fig. 11)

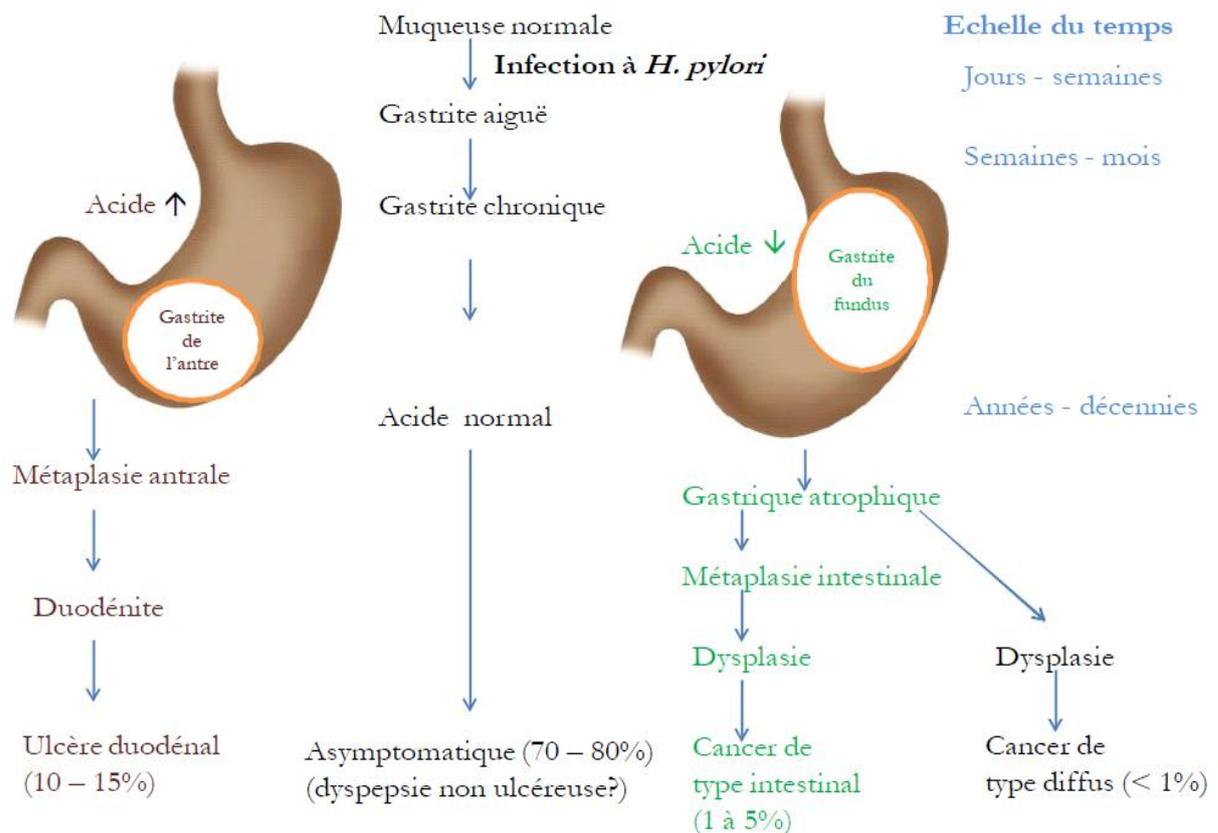


Figure 11: Evolution de l'infection à *H. pylori*

7.1. Gastrite aigue et chronique

La gastrite est une inflammation de la muqueuse gastrique (Fig. 12). L'infection par *H. pylori* provoque une infiltration massive de polynucléaires neutrophiles dans la muqueuse gastrique. La phagocytose des bactéries provoque une libération de substances toxiques induisant des lésions et la diminution de la hauteur des glandes gastrique (Graham *et al.*, 2004). La persistance de la bactérie et de l'inflammation conduisent au passage de la gastrite aigue à la gastrite chronique (Kusters *et al.*, 2006).

La distribution de la gastrite chronique modifie la physiologie gastrique principalement la sécrétion d'acide (McColl *et al.*, 2000). Ces phénomènes expliquent l'évolution variable et incomplètement élucidés de l'infection. Une gastrite à prédominance antrale est caractérisée par une hyperchlorhydrie, évoluant vers un risque accru d'ulcère duodénal (el-Omar *et al.*, 1995; Lai and Sung, 2007); alors qu'une gastrite fundique ou touchant l'ensemble de l'estomac est associée à une hypochlorhydrie, évoluant vers l'ulcère gastrique puis une atrophie avec un risque de cancer gastrique (Hansson *et al.*, 1996; Atherton, 2006).

7.2. Ulcère gastrique et duodénal

L'ulcère est une perte de substance localisée pénétrant jusqu'à la couche musculaire (Bouarioua *et al.*, 2007) (Fig. 12). *H. pylori* est retrouvé dans 80 à 90% des ulcères gastriques et duodénaux (Bouarioua *et al.*, 2007).

L'ulcère gastrique localisé vers l'antra est dû à une normo ou hypochlorhydrie. Le degré d'atrophie qui en résulte explique le lien entre l'ulcère gastrique et le cancer gastrique développé à partir de la gastrite atrophique (Lai and Sung, 2007).

L'ulcère duodénal localisé au niveau du bulbe duodénal résulte d'une hyperchlorhydrie, ayant comme conséquence le développement d'une duodénite chronique et la diminution de la résistance de la muqueuse duodénal à l'acidité (McColl *et al.*, 2000). Le développement de l'ulcère duodénal protège du risque de développement du cancer gastrique.

L'infection à *H. pylori* et la prise d'AINS (2^{ème} cause d'ulcère gastroduodénal) sont deux facteurs de risque indépendants mais leur interaction augmente le risque d'ulcère et de complication hémorragique (Bouarioua *et al.*, 2007).

L'éradication de la bactérie constitue la base du traitement antiulcéreux. Elle favorise la cicatrisation de l'ulcère et prévient la récurrence des ulcères gastriques et duodénaux et de leurs complications.

7.3. Cancer gastrique

Le cancer gastrique est classé 4^{ème} à l'échelon mondial. C'est la 2^{ème} cause de décès par cancer. Il a été clairement établi que l'infection par *H. pylori* est le facteur de risque principal du cancer gastrique non cardiaque. Dès 1994, *H. pylori* a été classé par l'OMS parmi les agents carcinogènes de classe I (Malfertheiner *et al.*, 2012).

Il existe 2 types de cancer, le cancer gastrique diffus composé de cellules néoplasiques individuelles infiltrantes qui ne forme pas de structure glandulaire (minoritaire) et l'adénocarcinome (qui représente 90% des cancers gastriques) (Fig. 12) de type intestinal qui évolue à travers une série d'étapes histologiques (Coleman *et al.*; Correa, 1996).

Le processus de carcinogénèse suit la cascade de Correa. La gastrite chronique suite de l'infection par *H. pylori* induit une inflammation chronique qui dans 50% des cas entraîne une destruction des glandes gastriques (atrophie) et la mise en place d'un épithélium de type intestinal (métaplasie intestinale), évoluant dans 8% des cas vers une dysplasie puis dans environ 2% des cas vers l'adénocarcinome (Correa, 1994; Kuipers, 1999).

L'évolution vers l'adénocarcinome semble sous la dépendance de facteurs bactériens, environnementaux et propres à l'hôte dont la nature exacte et valeurs respectives restent imprécises (De Korwin and Lehours, 2010).

La diminution de la concentration en vitamine C protectrice et le stress oxydatif généré au cours de l'infection peuvent induire des dommages au niveau de l'ADN (Obst *et al.*, 2000). La présence de certains facteurs de virulences tels que *cagA* et la réponse inflammatoire de l'hôte joueraient aussi un rôle important dans la carcinogénèse (Ding *et al.*, 2007). L'éradication de *H. pylori* fait disparaître l'inflammation de la muqueuse et ralentit voir stoppe la progression de l'atrophie mais pas de la métaplasie intestinale. C'est pour cette raison que l'éradication doit idéalement se situer le plus précocement possible avant l'apparition des lésions précancéreuses (Wang *et al.*, 2011).

7.4. Lymphome de MALT

Le lymphome de MALT est l'infiltration massive de cellules lymphoïdes dans la muqueuse gastrique qui en est habituellement dépourvue. *H. pylori* est retrouvé dans plus de 90% des lymphomes gastriques de MALT (Fig. 12).

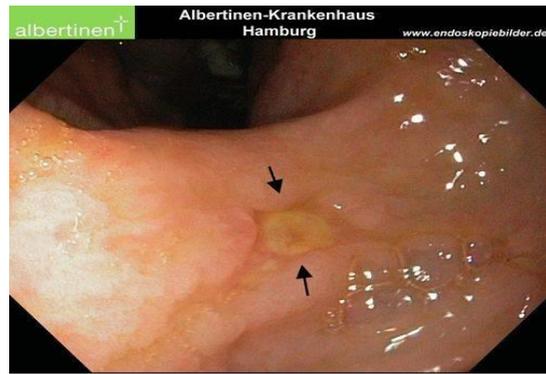
Des follicules lymphoïdes se développent après infection par *H. pylori*. La stimulation antigénique de *H. pylori* entraîne une activation de lymphocytes T spécifiques qui entraîne une prolifération de lymphocytes B monoclonaux. L'étude du réarrangement monoclonal de la chaîne lourde d'Ig de ces lymphocytes B a démontré la progression de la gastrite induite par *H. pylori* vers le lymphome de MALT (Zucca *et al.*, 1998).

Pour les lymphomes de bas grade localisés, l'éradication de *H. pylori* entraîne une régression tumorale dans 60 à 90% des cas (Montalban and Norman, 2006) mais des succès ont également été constatés dans des lymphomes de haut grade (Ruskoné-Fourmestreaux *et al.*, 2011).

Bien que leurs physiologie soit bien distinctes, le lymphome de MALT et l'adénocarcinome peuvent survenir chez un même malade (Lee *et al.*, 2005).



(a) Gastrite (hôpital Béni Messous 2016)



(b) Ulcère (<https://pictures.doccheck.com/fr/>)



(c) Lymphome (<https://pictures.doccheck.com/fr/>)



(d) Adénocarcinome (<https://pictures.doccheck.com/fr/>)

Figure 12: Photos endoscopiques des pathologies gastriques causées par *H. pylori*

7.5. Maladies extradigestives

Le développement tout au long de la vie de la gastrite chronique induite par *H. pylori* a fait chercher un lien avec des maladies extradigestives susceptibles d'être favorisées ou entretenues par l'inflammation. Une association entre *H. pylori* a pu être démontrée et des remissions obtenues par le traitement d'éradication dans certaines d'entre elles (de Korwin, 2008).

- L'anémie ferriprive inexpliquée : Le mécanisme serait une malabsorption du fer due à l'augmentation du pH gastrique (Nahon *et al.*, 2003) mais aussi à cause de la diminution de la concentration de la vitamine C dans le suc gastrique (Annibale *et al.*, 2003). L'éradication de *H. pylori* procure une nette amélioration clinique.
- Le purpura thrombopénique immunologique : La prévalence de *H. pylori* est élevée chez les patients atteints de PTI et son éradication entraîne une augmentation significative du taux de plaquette sans pour autant la mise en évidence des mécanismes impliqués (Stasi *et al.*, 2009).
- Un rôle de *H. pylori* a également été suggéré dans les maladies cardiovasculaires, les accidents vasculaires cérébraux ischémiques, la migraine, les troubles auto-immuns de la thyroïde, le diabète, la maladie de Parkinson...mais une grande hétérogénéité existe dans la qualité des études menées. De plus amples études sont nécessaires pour mettre en évidence un lien de causalité entre l'infection à *H. pylori* et le processus pathogène de ces maladies extra-digestives (RICHY and MÉGRAUD, 2003).

8. Physiopathologie

L'adhérence de *H. pylori* à l'épithélium gastrique constitue le point clé de la réaction immunitaire. Ce contact provoque la libération de facteurs chimiotactiques et de cytokines et la stimulation des lymphocytes. La colonisation de l'estomac provoque le recrutement des cellules inflammatoires par l'adhérence des bactéries à l'épithélium et la libération de facteurs de virulence soit au contact (*oipA*, *SabA*, *BabA*), soit dans la cellule par translocation (*CagA*). Il en résulte une expression d'interleukines 8 dans la cellule épithéliale qui attirent les lymphocytes et les monocytes dans le chorion. L'activation de ces cellules inflammatoires est favorisée par le LPS et l'uréase de la bactérie. Les lymphocytes du chorion produisent des cytokines pro-inflammatoires qui orientent la réponse vers la voie Th1 qui ne permet pas d'éliminer *H. pylori*. L'inflammation chronique provoque l'apoptose et l'atrophie des cellules épithéliales par l'action des cytokines pro-inflammatoires et des radicaux libres. La prolifération épithéliale est la conséquence de l'apoptose excessive provoquée par l'infection. Elle est stimulée par l'expression de la cyclo-oxygénase inductible et de la monoxyde d'azote synthétase inductible. L'évolution de la gastrite atrophique vers le cancer est favorisée par le monoxyde d'azote qui a un effet mutagène sur l'ADN, et inhibe la protéine *p53* et par la bactérie elle-même qui diminue l'activité de l'enzyme de réparation des désappariements de l'ADN. La gastrite induite par *H. pylori* perturbe la sécrétion acide. L'inflammation prédominante dans le corps gastrique provoque une hypochlorhydrie par diminution de la libération de l'histamine par les cellules ECL, et inhibition des cellules pariétales par le TNF et l'interleukine 1- β . L'inflammation à prédominance antrale provoque une hyperchlorhydrie induite par l'altération du rétrocontrôle sécrétoire par la somatostatine (LAMARQUE *et al.*, 2003).

L'expression clinique de l'infection par *H. pylori* résulte des influences convergentes des facteurs de virulence bactériens, de facteurs environnementaux et de la réponse immunitaire de l'hôte dont la variabilité pourrait expliquer la survenue de pathologies aussi diverses que la maladie ulcéreuse ou l'atrophie muqueuse pouvant aboutir au cancer gastrique (Fig. 13):

- **Facteurs bactériens**

Les facteurs de virulence de *H. pylori* jouent un rôle central dans la pathogénèse. La présence ou l'expression de certains d'entre eux rendent la souche plus virulente. Le génotype *s1m1* de *VacA* et les souches *CagA* positives sont associés à un risque élevé d'ulcère duodéal et de cancer gastrique.

- **Facteurs environnementaux**

Le régime alimentaire et le mode de vie contribuent de façon non négligeable à l'évolution de l'infection par *H. pylori*. Une alimentation pauvre en antioxydants, riche en sel ainsi que le tabagisme augmentent le risque de survenu de cancer gastrique (Wroblewski *et al.*, 2010). Des études récentes démontrent que la consommation excessive de sel induirait l'augmentation de l'expression de cytokines pro-inflammatoires entraînant l'altération de la

muqueuse (Sun *et al.*, 2006). L'augmentation de l'expression de *CagA* en fonction de la concentration du sel a aussi été démontrée (Gancz *et al.*, 2008).

• **Facteurs héréditaires de l'hôte**

Le polymorphisme génétique de l'hôte a un rôle extrêmement important dans la progression de l'infection à *H. pylori*. La variabilité de la réponse inflammatoire dépend des facteurs héréditaires de l'hôte. La progression vers la carcinogénèse dépend de la réponse inflammatoire et de la sécrétion d'acide par l'hôte. Les sujets ayant un polymorphisme d'expression élevé de l'IL1- β ont un risque élevé de développer une hypochlorhydrie liée au cancer gastrique. Le polymorphisme touchant les gènes régulant l'expression de l'IL8, l'IL10 et le TNF α sont aussi associés au risque de cancer gastrique (El-Omar *et al.*, 2003). Ce génotypage peut varier considérablement entre les populations humaines. Ainsi, le polymorphisme de l'IL1- β semble plus important dans les populations caucasiennes. Celui de l'IL8 l'est plus chez les populations asiatiques (El-Omar *et al.*, 2000).

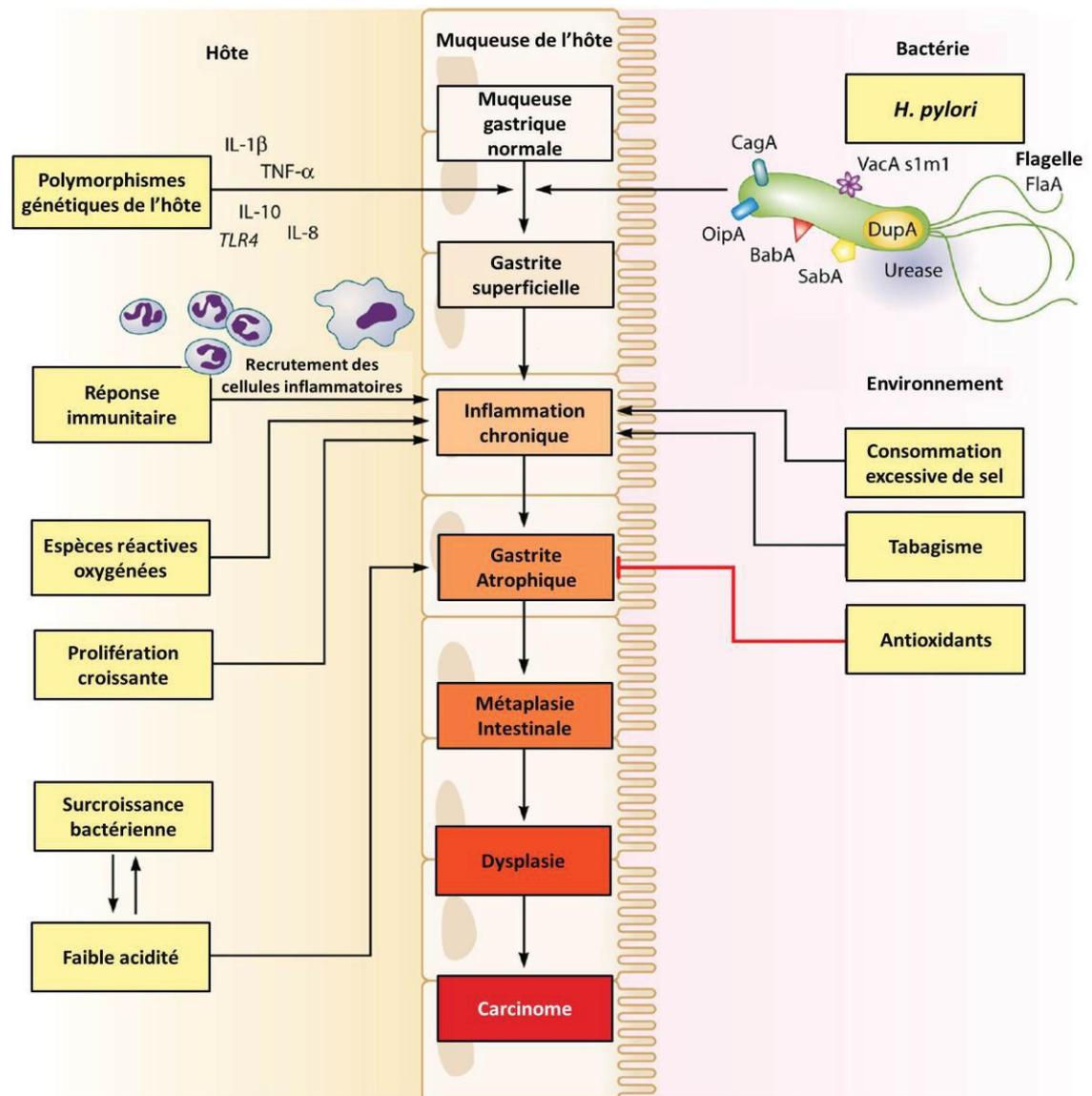


Figure 13: Interaction des Facteurs bactériens, environnementaux et héréditaires de l'hôte dans l'évolution de l'infection à *H. pylori* (Mustapha, 2011)

9. Méthodes de diagnostic

Plusieurs méthodes sont utilisées pour diagnostiquer une infection à *H. pylori*. Elles comprennent des techniques microbiologiques, anatomopathologiques, immunologiques et biochimiques. Ces méthodes sont habituellement divisées en deux groupes : Des méthodes invasives nécessitant une endoscopie, et des méthodes non invasives. Le choix du test dépend de la disponibilité et du coût de ce dernier, des avantages et des inconvénients qu'ils présentent, de la situation clinique et du contexte de la recherche (diagnostic initial ou contrôle d'éradication) (Tableau 2).

9.1. Méthodes invasives

Le principal inconvénient des méthodes invasives est le recours à une endoscopie digestive haute. Il s'agit en effet de tests réalisés sur des biopsies gastriques. Ces test sont sujets au biais d'échantillonnage car n'explorant qu'une partie de la muqueuse gastrique et que la répartition de la bactérie ne peut être homogène. Ils présentent par contre l'avantage d'allier la recherche de l'infection à *H. pylori* à l'identification précise des lésions endoscopiques associées.

- **Examen anatomopathologique**

C'est la méthode de diagnostic la plus couramment utilisée, et l'une des plus fiables si elle est bien réalisée. Sa sensibilité et sa spécificité sont supérieures à 90%. Sa disponibilité et sa sensibilité élevée en font l'examen de référence pour le diagnostic invasif de l'infection à *H. pylori*, le couple histologie-culture étant considéré comme le gold standard (De Korwin, 2003).

Les biopsies gastriques (deux antrales, deux fundiques et une dans l'angulus) doivent être fixées dans le formol. La préparation et la coloration des lames histologiques est critique (El-Zimaity, 2000). Les colorations de Giemsa modifiée ou de crésyl violet permettent de mieux visualiser la bactérie que la coloration à l'hématéine-éosine utilisée pour le diagnostic lésionnel (Price, 1996). Les bactéries spiralées sont observées à la surface de l'épithélium, dans le mucus et dans les cryptes. En pratique courante, le recours à des techniques plus sophistiquées telle que le marquage immuno-histologique n'est pas nécessaire.

La valeur ajoutée de l'histopathologie est de permettre de classer les lésions gastriques, à l'aide du système de Sydney, suivant leur topographie et leur intensité comme l'atrophie, la métaplasie intestinale ou la dysplasie précédant le cancer gastrique (Fig. 14). La performance du test pour le contrôle d'éradication est acceptable à condition d'un délai de 4 semaines après le traitement d'éradication. Elle permet aussi une évolution rétrospective des lames à partir des blocs de paraffines (Yamamoto *et al.*, 2002).

Les principales limites de l'histologie dépendent de l'expérience de l'observateur car la reproductibilité inter observateur n'est pas très bonne (Kolts *et al.*, 1993); du site, du nombre et de la taille des biopsies. En effet, une hypochlorhydrie entraîne une diminution de la charge bactérienne ainsi que la métaplasie intestinale qui limite l'observation de la bactérie.

Outre l'infection à *H. pylori*, l'histopathologie permet aussi l'identification de *H. heilmannii*, espèce non cultivable et responsable d'environ 2% des gastrites chroniques et parfois d'ulcérations gastroduodénales (Flejou *et al.*, 1990; De Korwin, 2003).

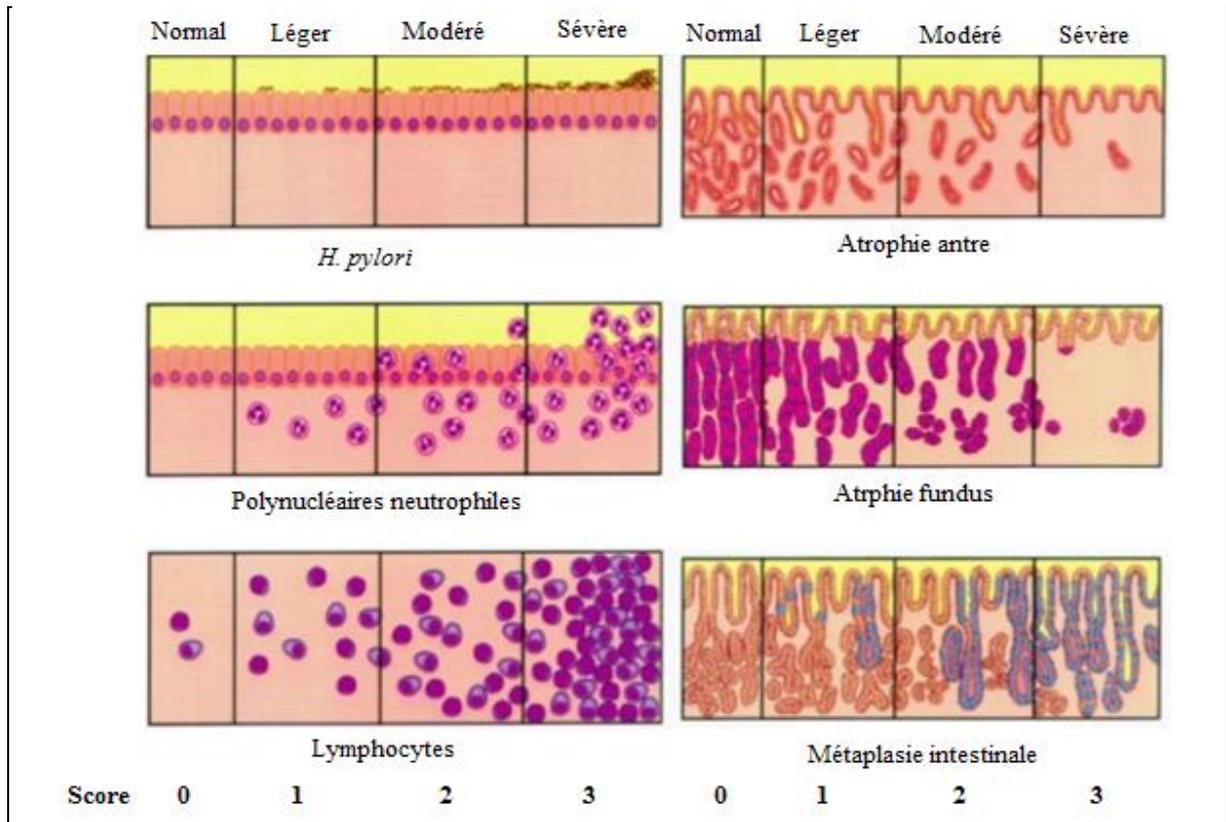


Figure 14: Classification de Sydney (Dixon *et al.*, 1996)

- **Test rapide à l'uréase**

Le principe de ce test est l'importante activité uréasique de *H. pylori*. Une biopsie gastrique est déposée dans un milieu riche en urée. La présence de *H. pylori* entraîne une libération d'ammoniac, une élévation du pH et le virage de l'indicateur coloré du jaune au rose.

Il existe plusieurs kits commercialisés : CLOtest[®], Pyloritek[®], ProtonDry[®] (Uotani and Graham, 2015) dont la sensibilité et la spécificité sont de l'ordre de 90% chez les patients non traités (Lamarque *et al.*, 2012).

L'avantage de ce test est qu'un résultat positif rapide permet de conclure à la présence de *H. pylori* de fait de son excellente spécificité. En cas de densité microbienne élevée, le test peut se positiver en quelques minutes, ce qui permet de débiter sans délai le traitement d'éradication (Malfertheiner *et al.*, 2002; Uotani and Graham, 2015). Par contre sa négativité n'exclue pas une infection en raison de sa sensibilité qui peut être réduite si la densité bactérienne est faible à cause des antibiotiques ou des IPP (Midolo and Marshall, 2000). Les résultats dépendent aussi fortement du site et du nombre de biopsies. (Seo *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2015). Ce test a donc la particularité d'une sensibilité et d'une spécificité variables selon le délai de lecture : plus le délai est important plus la sensibilité augmente au détriment de la spécificité. C'est pour cette raison que certains test incorporent des agents bactériostatiques

des bactéries faiblement uréasiques comme *Proteus* (Maroye, 1999; Uotani and Graham, 2015).

Le test rapide à l'uréase doit être couplé à un autre examen comme l'histologie surtout en cas de négativité et n'est pas recommandé pour le contrôle d'éradication (Lamarque *et al.*, 2012).

• Culture

La culture est la méthode de référence pour identifier *H. pylori* (Lamarque *et al.*, 2012). C'est la technique ayant la meilleure spécificité, 100%. Sa sensibilité est beaucoup plus variable et dépend des conditions de transport et de la performance du laboratoire. Dans les laboratoires de référence, la sensibilité est voisine de celle de l'histologie et du test respiratoire (Lehours *et al.*, 2003; Makristathis *et al.*, 2004).

Les biopsies gastriques destinées à être mises en culture doivent être prélevées en premier pour éviter les traces de formol restant sur les pinces à biopsies. La bactérie est fragile et doit être maintenue viable 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 de transport de type Portagerm Pylori est indispensable. Après 24h, la congélation à -80°C ou dans de l'azote liquide est nécessaire (Markus Heep *et al.*, 1999). La culture nécessite un personnel qualifié, des milieux spécifiques et une atmosphère de microaérophilie. La croissance bactérienne est lente nécessitant d'attendre en primo-culture jusqu'à 12 jours. Ces contraintes de transport, la difficulté et le coût de la culture sont des obstacles à la diffusion de la méthode en pratique courante.

Le principal intérêt de la culture est la réalisation d'un antibiogramme qui permet d'adapter le traitement notamment chez les patients en échec d'éradication ; situation de plus en plus fréquente avec l'augmentation de la résistance aux antibiotiques (Lamarque *et al.*, 2012). La culture reste la seule méthode permettant de déterminer la sensibilité à tous les antibiotiques par des tests de diffusion de disques sur gélose ou avec des E-test. Seule la recherche de la résistance au métronidazole n'est pas standardisée (Megraud and Lehours, 2007).

Pour augmenter la sensibilité de la méthode, il est recommandé d'arrêter le traitement anti- sécrétoire 7 jours avant et le traitement antibiotique 1 mois auparavant (El-Zimaity, 2000).

L'autre avantage de la culture est la conservation des souches indéfiniment à -80°C ou dans de l'azote liquide et la possibilité de faire des études complémentaires comme la mise en évidence des facteurs de virulence de la bactérie (De Korwin, 2003).

Récemment de nouvelles techniques de cultures de *H. pylori* ont été décrites : une culture en milieu biphasique avec une gélose inclinée à l'urée et le bouillon Bolton et qui obtient de meilleurs résultats que le test rapide à l'uréase (Wisessombat *et al.*, 2014); et une technique basée sur la culture microcapillaire qui assure la microaérophilie à la bactérie par la nature des tubes utilisés avec une sensibilité supérieure au test rapide à l'uréase, à l'histologie et à la culture classique (Allahverdiyev *et al.*, 2015).

• Méthodes moléculaires

Les méthodes de biologie moléculaires sont de plus en plus utilisées pour la détection et le typage de *H. pylori* et d'autres espèces *Helicobacter* ainsi que la sensibilité aux antibiotiques (Mentis *et al.*, 2015). La sensibilité et la spécificité de ces techniques sont de l'ordre de 95%. Les performances de diagnostic sont supérieures à l'histologie, la culture et le test rapide à l'uréase et ceux sans nécessiter des conditions de transports particulières car il n'est pas indispensable que la bactérie soit viable pour être détectée par les méthodes de biologie moléculaire (Tankovic *et al.*, 2007; Kalach *et al.*, 2015).

Plusieurs techniques de biologie moléculaire sont utilisées :

- La PCR standard qui permet la détection de *H. pylori* en utilisant des amorces ciblant des gènes spécifiques de la bactérie : ARNr 16S, ARNr 23S, *ureA*.... La PCR simplex ou multiplex standard permet aussi de mettre en évidence la présence de facteurs de virulence: *cagA*, *vacA*.... Les produits de PCR peuvent être séquencés et servir de moyen de typage moléculaire.
- La PCR en temps réel qui permet une détection quantitative de *H. pylori* plus rapidement et avec moins d'étapes que la PCR standard couplée à la détection des mutations à l'origine de la résistance à la clarithromycine (Tankovic *et al.*, 2007).
- La PCR multiplex couplée à l'hybridation sur bandelette avec le kit GenoType HelicoDR® qui permet la détection de *H. pylori* et la résistance à la clarithromycine et à la lévofloxacine simultanément (Miendje Deyi *et al.*, 2011).

Ces méthodes peuvent s'appliquer sur les souches isolées ou directement sur les biopsies gastriques (Park *et al.*, 2003).

La PCR ne permet pas d'obtenir des informations sur la viabilité de la bactérie. Elle permet de détecter des segments d'ADN d'une bactérie morte dans la muqueuse gastrique des patients après le traitement; par conséquent, le risque de faux positif n'est pas négligeable. Mais du fait de sa bonne sensibilité avec une limite de détection de 10 à 100 bactéries, La PCR paraît adaptée à l'évaluation du succès du traitement en raison de la diminution habituelle de nombre de bactéries après traitement, à condition que le contrôle d'éradication ne soit pas réalisé trop précocement sous peine d'amplifier des fragments d'ADN de bactéries lysées (Ho and Windsor, 2000; Garza-González, 2014).

9.2. Méthodes non invasives

Les méthodes non invasives sont principalement utilisées lorsque l'endoscopie n'est pas indispensable ou en supplément des méthodes sur biopsies. Ce sont des méthodes globales de diagnostic éliminant les problèmes d'échantillonnages.

• Sérologie

La sérologie détecte les anticorps IgG spécifiques de *H. pylori* dans le sérum principalement par des méthodes ELISA. La sensibilité et la spécificité varient entre 60 et 95% selon les différents tests commercialisés. Certains kits dépassent les 97% de spécificité et

de sensibilité (Fauchère *et al.*, 2011). Les tests utilisant la salive et les urines ont des performances limitées (Lamarque *et al.*, 2012).

Sa simplicité, son faible coût et sa rapidité de réalisation en font une méthode très utile pour le dépistage primaire ou particulièrement pour confirmer la négativité des autres tests dans les situations où ils pourraient être faussement négatifs (ulcère hémorragique, métaplasie intestinale, prise d'IPP). Elle reste la seule méthode non affectée par un traitement récent ou en court d'IPP (Kokkola *et al.*, 2000; Lehours *et al.*, 2003; Mégraud, 2008; Lamarque *et al.*, 2012).

En revanche, la sérologie ne peut être utilisée pour le contrôle d'éradication, la décroissance significative du taux d'anticorps ne survenant que 4 à 6 mois voire un an après le fin du traitement (Mégraud, 2010).

Différents facteurs influent sur la qualité des tests sérologiques comprenant la prévalence de l'infection, les variations géographiques et les caractérisations des populations étudiées. La validation locale du kit est impérative (Garza-González, 2014). De plus, la sensibilité de la sérologie a été mise en défaut chez l'enfant de moins de 10 ans (Okuda *et al.*, 2002).

• Recherche des antigènes dans les selles

Cette méthode repose sur un dosage immuno-enzymatique pour détecter la présence d'antigènes de *H. pylori* dans les selles, la bactérie étant éliminée naturellement dans les selles. C'est une technique fiable pour diagnostiquer une infection et peut être utilisée pour le contrôle d'éradication en respectant un délai de 4 semaines après l'arrêt du traitement.

Les selles peuvent être conservées pendant 24h à température ambiante, 72 à 4°C ou congelées à -20°C avant d'être analysées.

Différents kits sont commercialisés, ceux utilisant des anticorps monoclonaux (HpStar) présentent de meilleurs résultats que les premiers kits utilisant des anticorps polyclonaux (Premier platinum HpSA) (Zhou *et al.*, 2014).

L'excellente spécificité et sensibilité, d'une moyenne de 94%, des tests monoclonaux, et les valeurs prédictives positives et négatives en diagnostic préthérapeutique et en contrôle d'éradication font de la méthode une alternative au test respiratoire notamment en pédiatrie (Zhou *et al.*, 2014). Il existe aussi une méthode immuno-chromatographique (immunocard Stat) réalisable en 10 mn en cabinet médical mais présentant des performances nettement inférieures (De Korwin, 2003).

Selon les directives européennes, le test monoclonal et le test respiratoire sont les seules méthodes non invasives recommandées pour le contrôle d'éradication.

La simplicité du recueil du prélèvement et l'efficacité du test chez l'enfant indépendamment de l'âge en font un test de choix en pédiatrie. Cependant, les résultats de la recherche des antigènes dans les selles peuvent être affectés par les troubles de l'appareil digestifs, la présence d'ulcère hémorragique ou la prise d'IPP.

• Test respiratoire à l'urée marquée

Le principe de la méthode est basé sur la puissante activité de l'uréase de *H. pylori* qui dégrade dans l'estomac l'urée marquée en CO_2 éliminé et détecté par voie respiratoire (Fig. 15). Le test consiste à faire ingérer au patient de l'urée marquée au C^{13} ou au C^{14} . Si la bactérie est présente, l'urée est métabolisée en CO_2 et ammonium. Le CO_2 expiré est recueilli dans un tube étanche à l'air 30mn après l'ingestion de l'urée marquée. Il est ensuite comparé à un tube préalablement recueilli. Si le ratio C marqué/ C^{12} est supérieur à celui du tube témoin, le test est positif (De Korwin, 2003).

Le C^{13} est un isotope non radioactif de carbone, il peut être utilisé en toute sécurité chez les enfants et les femmes en âge de procréer. Un spectromètre de masse, assez coûteux, est nécessaire pour le traitement des échantillons. Le C^{14} est moins coûteux mais nécessite l'utilisation d'un service de médecine nucléaire agréé pour le stockage et l'élimination des déchets radioactifs (Graham *et al.*, 1987; Goddard and Logan, 1997).

La sensibilité et la spécificité du test dépassent largement les 90% dans la plupart des études (Gisbert and Pajares, 2004; Ferwana *et al.*, 2015). Le stockage et le transport des échantillons ne nécessitent pas de conditions particulières (Perets *et al.*, 2016).

Le test respiratoire est considéré comme la meilleure méthode de diagnostic et de contrôle lorsque l'endoscopie digestive n'est pas nécessaire (Isomoto *et al.*, 2002). Il est très performant chez l'enfant âgé de plus de 4 ans (Bazzoli *et al.*, 2000) et dès l'âge de 2 ans selon certaines études (Kawakami *et al.*, 2002).

Le contrôle d'éradication doit respecter une fenêtre thérapeutique de 4 à 6 semaines (Shirin *et al.*, 2005) afin d'éviter les résultats faussement négatifs.

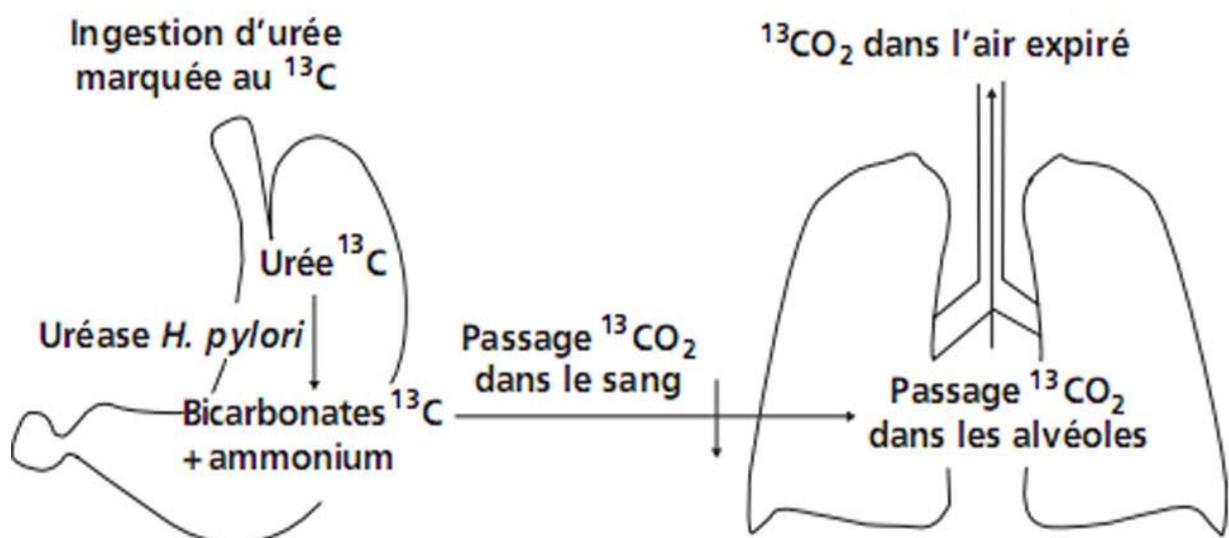


Figure 15: Principe du test respiratoire

Tableau 2: Avantages et inconvénients des différentes méthodes de diagnostic de *H. pylori*

Tests	Avantages	Inconvénients
Tests sur biopsies gastriques (invasifs)		
Anatomopathologie	Test habituel. Bonne sensibilité, spécificité et disponibilité, diagnostic de la gastrite sans surcout	Relativement coûteux, personnel entraîné, sensibilité diminuée si : IPP, antibiotiques, hémorragie gastrique, atrophie muqueuse
Test rapide de l'uréase	Peu coûteux, résultats rapide (1h), très bonne spécificité	Sensibilité insuffisante surtout en post-éradication et si : IPP, antibiotiques, hémorragie gastrique, atrophie muqueuse
Culture	Test de référence (spécificité 100%), possibilité d'antibiogramme et de recherche génotypique	Coûteux, centre spécialisé, milieu de transport des biopsies (délai 24h), sensibilité variable et diminuée si : IPP, antibiotiques, hémorragie gastrique, atrophie muqueuse
PCR	Pas de conditions de transport, conservation des échantillons, excellente sensibilité et spécificité, évaluation de la sensibilité aux antibiotiques	Coûteux, centre spécialisé, méthodologie non standardisée
Tests sans endoscopie (non invasifs)		
Sérologie	Peu coûteux, disponibilité, très bonne valeurs prédictives négatives, sensibilité conservée si : IPP, antibiotique, hémorragie digestive, atrophie muqueuse	Valeurs prédictives positives dépendantes de la prévalence de <i>H. pylori</i> , non utilisable en post-éradication à court terme
Test respiratoire à l'urée C13	Identifie infection active, excellente valeurs prédictives négatives et positives avant et après traitement d'éradication	Sensibilité diminuée si : IPP, antibiotiques, hémorragie gastrique, estomac opéré
Détection des antigènes dans les selles	Identifie infection active, excellente valeurs prédictives négatives et positives avant et après traitement d'éradication	Disponibilité réduite, tests polyclonaux moins performants que les tests monoclonaux (post-éradication), conservation des échantillons à -20°C, sensibilité diminuée si : IPP, antibiotique

10. Profil antibiotique

H. pylori est sensible *in vitro* à de nombreux antibiotiques, mais très peu d'entre eux sont efficaces *in vivo*. Ceci s'explique en partie par la localisation gastrique de la bactérie en milieu acide et dans le mucus, site protégé créant des conditions néfastes à la diffusion et à l'efficacité des antibiotiques (de Korwin, 2004). *H. pylori* est naturellement résistant aux glycopeptides, cefsulodin, Les polymyxines, l'acide nalidixique, le triméthoprim, les sulfonamides, la nystatine, L'amphotéricine B et le cycloheximide. Certains d'entre eux sont utilisés comme agents sélectifs dans des milieux de cultures. Les souches de type sauvage sont sensibles 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, comme quelques autres bactéries telles que *Mycobacterium Tuberculosis*, acquiert une résistance par mutations ponctuelles. Tous Les antibiotiques qui ont été proposés dans les schémas d'éradication sont concernés. Le mécanisme n'implique pas de plasmides qui pourraient être transmis horizontalement, mais des mutations ponctuelles qui sont transmises verticalement, tandis que la transformation peut être possible si deux souches sont présentes simultanément dans l'estomac. Il en résulte une augmentation progressive de la résistance due à la pression de sélection (Megraud and Lehours, 2007).

10.1. Clarithromycine

La clarithromycine appartient à la famille des macrolides. Elle agit en empêchant l'élongation de la chaîne peptidique en se liant à la sous unité 50S du ribosome. La résistance croisée des macrolides est la conséquence de mutations ponctuelles au niveau de deux positions nucléotidiques A2142G/C et A2143G de l'ARNr 23S (Occhialini *et al.*, 1997; Stone *et al.*, 1997; Versalovic *et al.*, 1996). D'autres mutations plus rares ont aussi été associées à une résistance : A2515G, T2717C, A2116G, G2141A, A2144T, T2182C, G2224A, C2245T et T2289C (Hultén *et al.*, 1997; Hsieh *et al.*, 1998; Fontana *et al.*, 2002; Toracchio *et al.*, 2004).

La détection de la résistance à la clarithromycine se fait soit par des méthodes phénotypiques bien standardisées en réalisant un antibiogramme avec un disque de clarithromycine ou d'érythromycine (diamètres critiques : 17 et 22mm respectivement) ou un Etest de clarithromycine (valeur critique 0.5mg/l) ; soit par des méthodes moléculaires. Plusieurs techniques ont été proposées vu l'importance de cet antibiotique dans le traitement d'éradication de *H. pylori* et le nombre limité de mutations induisant la résistance (Owen, 2002). Les plus importantes sont :

- La PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) : Le principe est basé sur l'amplification de l'ADNr 23S puis sa digestion par des enzymes de restrictions spécifiques des 3 mutations A2142G/C et A2143G. Les tailles des fragments résultants indiquent la présence ou l'absence d'une mutation (Alarcón *et al.*, 2000; Versalovic *et al.*, 1996).
- La PCR en temps réel : Cette méthode combine la détection de *H. pylori* à partir d'échantillons de biopsies gastriques ou de selles avec le FRET (Fluorescence

Resonance Energy Transfer) et sa résistance à la clarithromycine en utilisant une courbe de fusion. La comparaison des températures de dissociation de la sonde Cy5 indique la présence et le type de mutation (Gibson *et al.*, 1999; Chisholm *et al.*, 2001; Schabereiter-Gurtner *et al.*, 2004). Par contre le faible écart de température entre les points de mutation A2143G Et A2142G n'a pas permis la séparation des deux génotypes (Oleastro *et al.*, 2003).

- FISH (Fluorescence *In Situ* Hybridation) : C'est une méthode de détection de *H. pylori* et sa résistance à la clarithromycine sans PCR. Le principe est basé sur l'hybridation *in situ* d'un ARNr en un ensemble de sondes fluorescentes. La lecture se fait avec un microscope à fluorescence (Trebesius *et al.*, 2000). Elle permet la visualisation de bactérie en forme coccoïde et peut être utilisée sur des biopsies enrobées de paraffine (Jüttner *et al.*, 2004).
- Multiplex PCR suivi d'une hybridation sur bande : L'amplification par PCR est suivi d'une étape d'hybridation sur une bande enduite de différentes sondes. Le kit commercial HelicoDR® utilisant cette technique permet la détection de *H. pylori* et la résistance à la clarithromycine (les trois points de mutation) et à la lévofloxacine à la fois (Miendje Deyi *et al.*, 2011).

10.2. Métronidazole

Le métronidazole appartient à la famille des 5-nitroimidazole. Il est prescrit comme un pro-antibiotique qui doit être réduit dans la cellule. La formation de radicaux nitro-anion et d'intermédiaires imidazole causent des lésions de l'ADN bactérien. Contrairement aux mécanismes de résistance de *H. pylori* aux autres antibiotiques, le mécanisme de résistance au métronidazole n'est pas évident. Des altérations du gène *rdxA*, codant pour une nitroréductase insensible à l'oxygène, confère une résistance au métronidazole (Hoffman *et al.*, 1996; Goodwin *et al.*, 1998; Han *et al.*, 2007) mais ne sont pas toujours associées aux souches résistantes (Tankovic *et al.*, 2000). D'autres gènes sont aussi impliqués notamment *frxA* (Marais *et al.*, 2003; Han *et al.*, 2007), *fdxB*, *ribF*, *mdaB* (Jeong *et al.*, 2000; Albert *et al.*, 2005). Une pompe à efflux y jouerait aussi un rôle (van Amsterdam *et al.*, 2005).

La détection de la résistance au métronidazole est un cas particulier, car il existe une mauvaise corrélation entre les différentes méthodes utilisées allant jusqu'à 20% d'écart. De plus, la reproductibilité inter et intra laboratoire pour la même méthode n'est pas excellente (Mégraud *et al.*, 1999; Glupczynski *et al.*, 2002). La raison n'a pas été mise en évidence mais l'hypothèse avancée est liée au potentiel redox intracellulaire de *H. pylori* qui ne serait pas contrôlé *in vitro* (Cederbrant *et al.*, 1992). En vue de ces données, les CMI par Etest ne sont pas recommandées en routine d'autant plus que des souches avec des CMI élevées (valeur critique 8mg/l) peuvent être éradiquées en utilisant cet antibiotique éventuellement en raison d'un potentiel redox variable au niveau de l'estomac. Le nombre important de mutations du gène *rdxA*, certaines étant indépendantes de la résistance de *H. pylori* à cet antibiotique, n'a pas permis le développement de méthodes moléculaires de détection de la résistance à métronidazole (Mégraud and Lehours, 2007).

10.3. Lévofoxacine

La lévofoxacine est une fluoroquinolone qui inhibe le sous unité A de l'ADN gyrase. La résistance est liée à une mutation ponctuelle de l'un des gènes codant pour l'ADN gyrase *gyrA* aux niveaux des positions d'acides aminés 87, 88, 91 et 97 (Moore *et al.*, 1995; Tankovic *et al.*, 2003). La majorité des *H. pylori* sont sensibles à la lévofoxacine, mais l'incidence de la résistance semble en augmentation et peut atteindre 20% dans certains pays (Cabrita *et al.*, 2000; Boyanova *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2005). De plus, la résistance croisée entre les différentes fluoroquinolones (Debets-Ossenkopp *et al.*, 1999) augmente le risque de sélection de souches résistantes à de nouvelles molécules prometteuses (Megraud, 2004).

La détection de la résistance à la lévofoxacine se fait par la réalisation d'un test de CMI avec un Etest de lévofoxacine ou de ciprofloxacine. La valeur de la CMI critique est de 1 mg/l ; soit par des méthodes moléculaires dont les principales sont :

- La PCR en temps réel : La méthode d'analyse de la courbe de fusion FRET a également été appliquée. Toutes les mutations éventuellement présentes dans la région déterminant la résistance aux quinolones ne se traduisent pas en résistance. Néanmoins, il est possible de détecter les mutations principales à la position d'acide aminé 87 ou 91 (Glocker and Kist, 2004).
- Le séquençage de la région QRDR de *gyrA* : La région QRDR est séquencée après son amplification par PCR. La méthode détecte les mutations au niveau des 4 positions d'acides aminées (Moore *et al.*, 1995).
- Multiplex PCR suivi d'une hybridation sur bande : Le kit commercial HelicoDR® détecte les mutations liées à la résistance à lévofoxacine (Miendje Deyi *et al.*, 2011).

10.4. Amoxicilline

L'amoxicilline est une aminopénicilline de la famille des β -lactamines qui interfère sur la synthèse du peptidoglycane en se liant aux PLP. La résistance de *H. pylori* à l'amoxicilline est très rare. Sur les quelques cas décrits, elle est due à des mutations sur le gène *plp-1a* (Kwon *et al.*, 2003; Gerrits *et al.*, 2006) notamment par la substitution d'acide aminé Ser-4143Arg conduisant au blocage du transport des pénicillines (M. M. Gerrits *et al.*, 2002). Quant à la sensibilité diminuée à l'amoxicilline, elle serait due à l'absence de *plp-D* (Dore *et al.*, 1999). La possible résistance par le mécanisme d'efflux a été éliminée et aucune souche productrice de β -lactamase n'a été rapportée (M. M. Gerrits *et al.*, 2002).

La détection de la résistance à l'amoxicilline se fait par la réalisation d'un test de CMI avec un Etest d'amoxicilline. La valeur de la CMI critique est de 0.12 mg/l. Une connaissance plus approfondie des mutations du gène *pbp1* devrait permettre le développement d'un test moléculaire pour l'amoxicilline (Megraud and Lehours, 2007; Mégraud *et al.*, 2015).

10.5. Tétracycline

La tétracycline appartient à la famille des cyclines qui entraîne l'inhibition de la traduction protéique en se fixant sur la sous unité 30S des ribosomes empêchant ainsi la fixation des ARNt. 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 (Monique M. Gerrits *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2005). La résistance à la tétracycline de bas niveau avec des CMI intermédiaires est liée à une simple ou double mutation dans la même région (Wu *et al.*, 2005). La nécessité d'avoir trois mutations simultanées peut expliquer la rareté de la résistance à la tétracycline. Des souches de *H. pylori* résistantes à la tétracycline et sans mutations en positions 926 à 928 ont été décrites. Une diminution de l'accumulation de la tétracycline dans la cellule a été observée. Une perméabilité diminuée de la membrane ou un mécanisme d'efflux sont susceptibles d'être impliqués dans cette résistance (Wu *et al.*, 2005).

La détection de la résistance à la tétracycline se fait par la réalisation d'un test de CMI avec un Etest de tétracycline. La valeur de la CMI critique est de 1 mg/l. Une PCR-RFLP a été développée. Le principe est basé sur l'amplification d'une partie du gène 16S rRNA. L'amplicon est ensuite soumis à une restriction enzymatique. Les souches avec une triple mutation conduisant à un niveau élevé de résistance à la tétracycline donnent Trois bandes, alors que seulement deux sont présentes pour les souches à faible niveau de résistance (Ribeiro *et al.*, 2004). La PCR en temps réel FRET peut aussi être appliquée (Glocker *et al.*, 2005) ainsi que le séquençage d'une partie de l'ARNr 16S.

10.6. Rifampicine

La rifampicine agit en bloquant la transcription 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* en position 149, 524, 525 ou 585 (M. Heep *et al.*, 1999; Heep *et al.*, 2002). La résistance à la rifampicine reste très rare, mais son utilisation pour traiter d'autres infections que la tuberculose pourrait conduire à l'émergence de souches résistantes (Heep *et al.*, 2000).

La détection de la résistance à la rifampicine se fait également par la réalisation d'un test de CMI avec un Etest de rifampicine. La valeur de la CMI critique est de 1 mg/l. Aucune méthode moléculaire n'a été proposée pour détecter la résistance de *H. pylori* à la rifampicine (Kist and Glocker, 2004; Megraud and Lehours, 2007) hormis le séquençage du gène *rpoB* (Mégraud *et al.*, 2015).

11. Traitement

L'implication de *H. pylori* dans différentes pathologies gastriques est bien établie. Son éradication est fortement recommandée dans certaines d'entre elles. Il existe plusieurs schémas thérapeutiques d'éradication de la bactérie ; cependant, il n'existe pas de traitement optimal universel. Le choix de ce dernier doit se faire en fonction des résultats de sensibilité aux antibiotiques de la souche de *H. pylori* et ou des données épidémiologiques propres au pays.

11.1. Indication d'éradication

H. pylori est considérée comme une maladie infectieuse quels que soient les symptômes et le degré de la maladie (Malfertheiner *et al.*, 2017). La recherche de *H. pylori* et son éradication sont actuellement réservées aux patients présentant des troubles significativement améliorés, ou des risques graves prévenus, par la guérison de la gastrite infectieuse (De Korwin, 2016.). La recherche systématique et l'éradication de *H. pylori* sont fortement recommandées en cas d'ulcère gastrique ou duodéal associé ou non à la prise d'AINS, de lymphome gastrique du MALT et chez les patients avec un risque élevé de cancer gastrique. Par contre, la conduite à tenir face aux maladies extradiigestives est plus controversée. Le tableau 3 résume les recommandations d'éradication actuelles de *H. pylori*.

Tableau 3: 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	Elevée
Lymphome de MALT	Elevée
Prise d'AINS ou d'aspirine faible dose chez les patients ayant eu un ulcère compliqué ou non	Elevée
Traitement au long court par aspirine chez des patients ayant eu un ulcère gastroduodéal hémorragique	Elevée
Prévention d'un ulcère 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	Elevée
Patients ayant une endoscopie pour dyspepsie	Elevée
Traitement au long cours (au moins 6 mois) par IPP	Elevée
Antécédents familiaux de cancer gastrique au premier degré	Moyen
Mutation 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

11.2. Schémas thérapeutiques disponibles

Les traitements d'éradication de *H. pylori* comprennent un IPP associé à un ou plusieurs antibiotiques (amoxicilline, clarithromycine, métronidazole, tétracycline, lévofloxacine, rifampicine) et/ou des sels de bismuth. Diverses combinaisons sont possibles avec différents taux de réussite d'éradications et de tolérance (Mentis *et al.*, 2015).

- **Bithérapie**

La bithérapie repose sur l'association d'un IPP et de l'amoxicilline. Abandonnée durant les années 90, son efficacité ces dernières années est liée à l'optimisation du traitement par 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). Plusieurs études démontrent que la bithérapie à forte dose a une efficacité équivalente voire supérieure au traitement séquentiel de 10 jours, à la trithérapie standards de 7 jours et à la quadrithérapie bismuthé et ceux avec moins d'effet secondaires. La bithérapie pourrait constituer une troisième ligne probabiliste intéressante en raison du faible taux de résistance de l'amoxicilline (Ren *et al.*, 2014; Sapmaz *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2015).

- **Trithérapie**

La trithérapie standard est composée d'un IPP, d'amoxicilline, remplacée par du métronidazole en cas de résistance aux β -lactamines, et de clarithromycine pendant 7 jours initialement puis allongé à 14 jours pour une meilleure efficacité (Fennerty *et al.*, 1998; Bochenek *et al.*, 2003). La résistance à la clarithromycine diminue considérablement l'efficacité de cette thérapie (De Francesco *et al.*, 2006). Dans les régions à forte prévalence de résistance à la clarithromycine (résistance >15), elle ne doit être utilisée qu'après vérification de la sensibilité de la bactérie.

Différentes autres combinaisons d'antibiotiques existent aussi pour la trithérapie: La trithérapie associant IPP, amoxicilline et métronidazole dont l'efficacité décroît régulièrement à cause de la résistance au métronidazole (Lamouliatte *et al.*, 2003; De Korwin and Lehours, 2010); La trithérapie à base d'IPP, d'amoxicilline et de lévofloxacine a une efficacité variable selon la résistance aux quinolones (O'Connor *et al.*, 2015); Celle utilisant la rifampicine avec un IPP et amoxicilline n'est pas indiquée comme traitement probabiliste de première ou deuxième ligne, son utilisation doit être réservée à des indications formelles et sur la base des résultats de l'antibiogramme (Borody *et al.*, 2006).

- **Quadrithérapie séquentielle**

C'est une combinaison entre IPP et amoxicilline pendant 5 jours puis IPP, clarithromycine et métronidazole pendant 5 jours. Les études montrent une efficacité équivalente à la quadrithérapie bismuthé et équivalente ou supérieure à la trithérapie standard en première ligne (Lloyd and McCLELLAN, 2011; Feng *et al.*, 2016).

- **Quadrithérapie concomitante**

Ce traitement implique l'administration simultanée d'IPP, d'amoxicilline, de clarithromycine et de métronidazole pendant 10 à 14 jours. Cette thérapie est utilisée à la place de la trithérapie dans les zones où la résistance à la clarithromycine est supérieure à 20% et la quadrithérapie bismuthé n'est pas disponible. Elle s'est révélée plus efficace que les autres quadrithérapies non bismuthés pour contrer les résistances et plus simple d'utilisation pour le patient (Stenström *et al.*, 2008; Tay *et al.*, 2012; McNicholl *et al.*, 2014; Feng *et al.*, 2016).

- **Quadrithérapie hybride**

Elle consiste en l'administration d'IPP et d'amoxicilline pendant 7 jours suivis d'IPP, amoxicilline, clarithromycine et métronidazole pendant 7 jours. Certaines études démontrent une meilleure efficacité par rapport au traitement séquentielle de 10 jours avec de bon résultats en cas de résistance à la clarithromycine (Sardarian *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2015).

- **Quadrithérapie bismuthé**

La quadrithérapie bismuthé est basé sur la combinaison d'un IPP et de sel de bismuth avec du métronidazole et de la tétracycline à de différentes concentrations selon les pays pendant 10 à 14 jours. Elle donne de meilleurs résultats que la trithérapie mais avec plus d'effets secondaires. De plus, les thérapies à base de sels de bismuth ne sont pas disponibles dans tous les pays.

11.3. Stratégie d'éradication recommandée

Le taux de résistance aux antibiotiques de *H. pylori* est en augmentation dans la plupart des régions du monde. Le choix du traitement d'éradication de première et deuxième ligne est basé sur la prévalence de la résistance aux antibiotiques dans la région. Le seuil de 15% a été fixé pour différencier les zones de faible et haute prévalence de résistance à la clarithromycine. Par contre, le choix du traitement de troisième ligne doit être basé sur les résultats des tests de sensibilité de la souche (Malfertheiner *et al.*, 2017).

Les différentes combinaisons de traitements de première, deuxième et troisième ligne sont présentées selon les recommandations du dernier consensus de Maastricht V :

- **Traitement de première ligne**

- Dans les zones à faible résistance à la clarithromycine : IPP, amoxicilline et clarithromycine pendant 14 jours (amoxicilline remplacé par le métronidazole en cas d'allergie aux β -lactamines).
- Dans les zones à forte résistance à la clarithromycine : quadruple thérapie bismuthée pendant 14 jours ou quadruple thérapie concomitante pendant 14 jours.
- Dans les zones à faible résistance aux métronidazole : IPP, amoxicilline et métronidazole pendant 14 jours peut être une option.

• **Traitement de deuxième ligne**

- Dans les zones à faible résistance à la clarithromycine : Quadruple thérapie bismuthée pendant 14 jours ou IPP, amoxicilline et lévofloxacine pendant 14 jours en prenant en compte le taux de résistance à la lévofloxacine dans la région.
- Dans les zones à forte résistance à la clarithromycine : En cas d'échec en première ligne de la quadruple thérapie bismuthée, administrer IPP, amoxicilline et lévofloxacine pendant 14 jours en prenant en compte le taux de résistance à la lévofloxacine dans la région.

• **Traitement de troisième ligne**

- Il doit être guidé dans la mesure du possible par les tests de sensibilité aux antibiotiques après biopsies (Culture, PCR).
- Après échec de la triple thérapie à base de clarithromycine en première ligne et de la quadruple thérapie bismuthée en deuxième ligne : IPP, amoxicilline, lévofloxacine ou utilisation d'une thérapie avec de la rifampicine.
- Après échec de la quadruple thérapie non bismuthée en première ligne et de la triple thérapie avec lévofloxacine en deuxième ligne : Quadruple thérapie bismuthée.
- Après échec de la quadrithérapie bismuthée en première ligne et de la trithérapie avec lévofloxacine en deuxième ligne : triple ou quadruple thérapie à base de clarithromycine, ou quadruple thérapie bismuthée avec une autre association d'antibiotique.

11.4. Causes d'échec du traitement d'éradication

Les principales causes de l'échec du traitement d'éradication de *H. pylori* sont :

- L'inadaptabilité du traitement : Une thérapie de durée trop courte ou contenant des antibiotiques dont la souche est résistante conduit à une forte diminution du taux d'éradication.
- La mauvaise observance de traitement : A cause des effets secondaires des antibiotiques entraînant l'inefficacité de la thérapie et l'émergence de résistances aux antibiotiques.
- Le polymorphisme du métabolisme des IPP : Les IPP sont métabolisés différemment chez les patients. Les métaboliseurs rapides des IPP (de génotype CYP2C16 ou MDR T/T) présentent des taux d'éradication inférieurs indépendamment de la dose d'IPP utilisé (Furuta *et al.*, 2007).

11.5. Nouvelles approches de traitement de l'infection

Les échecs d'éradication de *H. pylori*, l'augmentation croissante de sa résistance aux antibiotiques et les effets indésirables entraînés par ces derniers a incité au développement de nouvelles approches thérapeutiques. Certaines ont déjà apporté les preuves de leur efficacité, d'autres sont encore au début des tests.

- **Probiotiques**

Il a été suggéré il ya plusieurs années que les probiotiques pourraient jouer un rôle dans le traitement de l'infection à *H. pylori* en interférant avec l'adhérence de la bactérie ou en produisant des molécules antibactériennes (Malfertheiner *et al.*, 2012; Mentis *et al.*, 2015). Plusieurs études ont été menées dans ce sens ces dernières années permettant d'enrichir la documentation sur les effets des probiotiques sur *H. pylori*. Les probiotiques les plus souvent étudiés sont des bactéries des genres *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* et *Bacillus* et des levures *Saccharomyces*. Ces études concluent que l'utilisation d'un probiotique ou la combinaison de plusieurs en complément du traitement d'éradication de *H. pylori* permet d'améliorer le taux d'éradication et de diminuer les effets secondaires des antibiotiques (Nista *et al.*, 2004; Tong *et al.*, 2007; Sachdeva and Nagpal, 2009; Szajewska *et al.*, 2010; Khodadad *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2013; Zheng *et al.*, 2014). Aussi, la consommation à long terme de produits contenant des souches probiotiques peut avoir un effet favorable sur l'infection à *H. pylori* chez l'homme, en particulier en réduisant l'inflammation gastrique induite par l'infection. Cependant, aucune étude n'a pu démontrer l'éradication complète de l'infection à *H. pylori* par un traitement avec des probiotiques uniquement (Patel *et al.*, 2014).

Malgré ces données encourageantes sur les effets bénéfiques des probiotiques, plusieurs questions persistent, notamment sur l'efficacité spécifique de chaque souche utilisé, les doses et la durée de traitement, les différences géographiques et l'influence du mode de vie (régime alimentaire, consommation d'alcool et de tabac...). Celles-ci devraient être abordées par les futures recherches (Malfertheiner *et al.*, 2017).

- **Plantes médicinales**

Plusieurs études rapportent que des centaines de plantes médicinales ont un effet *in vitro* sur *H. pylori*. Certaines de ces plantes pourraient représenter une source potentielle de nouveaux agents antibactériens. Mais ces résultats doivent encore être approfondis sur les mécanismes d'actions et des tests *in vivo* (Yamamoto, 2002; Zaidi *et al.*, 2009; Asha *et al.*, 2013).

- **N-acétylcystéine**

Le N-acétylcystéine est un dérivé synthétique de la cystéine. Il a des propriétés mucolytiques et antioxydantes. Il pourrait dissoudre le biofilm formée par *H. pylori* et rendre ainsi la bactérie plus sensible aux antibiotiques. Les études suggèrent qu'un prétraitement par le N-acétylcystéine ou son ajout au traitement d'éradication augmenterait les taux d'éradication de *H. pylori* (Huynh *et al.*, 2004; Cammarota *et al.*, 2010; Yoon *et al.*, 2015).

- **SQ109**

Le N-geranyl-N'-(2-adamantyl) ethane-1, 2-diamine (SQ109) est un antituberculeux actuellement en phase d'essais clinique. L'étude de Makobongo (Makobongo *et al.*, 2013) démontre une bonne efficacité *in vitro* du SQ109 sur des souches sensibles et multirésistantes de *H. pylori*.

- **Vaccin**

Le développement d'un vaccin anti *H. pylori* reste la meilleure alternative pour améliorer considérablement les options de traitement. La pathogenèse complexe et les nombreux facteurs de virulence différents de la bactérie ont fait du développement de vaccins une tâche difficile. Néanmoins, plusieurs tentatives à des stades plus ou moins avancés sont en cours d'essai dans le monde (Raghavan and Quiding-Järbrink, 2016). L'une de ces études rapporte qu'une immunisation orale avec un vaccin recombinant de *Lactobacillus acidophilus* exprimant l'adhésine Hp0410 de *H. pylori* est susceptible de constituer un vaccin efficace et peu coûteux contre *H. pylori* (Hongying *et al.*, 2014). Une autre étude propose une approche originale avec un vaccin comestible constitué de carottes transgéniques exprimant le gène *ureB* de *H. pylori* (Zhang *et al.*, 2010). Mais l'étude la plus aboutie est celle menée en Chine qui rentre dans la troisième phase de test sur des enfants. C'est un vaccin oral recombinant *H. pylori* utilisant la Sous-unité de l'uréase B fusionnée avec la sous-unité thermostable de l'entérotoxine B (Zeng *et al.*, 2015).

MATERIEL
ET
METHODES

III. Matériel et méthodes

Il s'agit d'une étude prospective réalisée entre Novembre 2012 et Décembre 2016 incluant des patients adressés pour une endoscopie digestive haute au niveau de 4 services de 3 centres hospitaliers d'Alger : Service de médecine interne et service de pédiatrie de l'EPH Ibn Ziri Bologhine et les services de gastroentérologie du CHU Lamine Debaghine Bab El Oued et du CHU Issaad Hassani Béni Messous.

L'étude a été menée aux niveaux :

- De l'unité de microbiologie du service de biologie clinique de l'EPH Bologhine (Alger, Algérie)
- Du laboratoire des Entérobactéries et des bactéries apparentées de l'Institut Pasteur D'Algérie (Alger, Algérie)
- Du Centre National de référence Français des Campylobacter et Helicobacter (CNRCH) (Bordeaux, France)

1. Matériels

1.1. Population étudiée

La population étudiée inclue les patients symptomatiques adultes et de pédiatrie adressés pour une endoscopie digestive haute ayant donné leur accord pour cette étude (l'accord des parents a été demandé pour les patients mineurs). Les patients de l'EPH Bologhine ont été recrutés entre Novembre 2012 et Août 2016. Ceux des CHU Bab El Oued et Béni Messous entre Mars 2016 et Août 2016.

1.2. Matériels biologiques

En plus des biopsies gastriques des patients inclus dans l'étude et des souches de *H. pylori* isolées à partir de ces dernières, plusieurs souches de référence de *H. pylori* ont été utilisées comme contrôle de qualité et témoins afin de valider les techniques et analyses réalisées (ATCC 26695, ATCC J99, ATCC SS1, Souches témoins internes au CNRCH).

1.3. Milieux et réactifs

Gélose Colombia, gélose Muller Hinton, bouillon cœur-cerveau, selective supplement Helicobacter® Oxoid, sachets générateurs d'atmosphère microaérobie, eau physiologique et eau distillée stériles, glycérol, milieu urée indol, galerie Api Campy, sang humain, disques d'antibiotiques et Etest, violet de gentiane, lugol, alcool 90°, fuschine, eau oxygénée, disques d'oxydase, tampon de lyse, protéinase K, eau pure, Tampon X5, MgCl₂, dNTP, Taq polymérase, sondes HPY-RED et ANC-FL, différentes amorces, BigDye® Terminator v3.1 Cycle sequencing kit, BigDye® Terminator v1,3 - 5X sequencing buffer, sépahacryl, agarose.

1.4. Equipements

Il s'agit du matériel de laboratoire courant utilisé pour la culture et les techniques de biologie moléculaire.

2. Méthodes

2.1. Prélèvements

Le prélèvement des biopsies gastriques était effectué lors de la réalisation de l'endoscopie digestive haute. En fonction de la tolérance du patient à l'examen, une à deux biopsies antrales et une à deux biopsies fundiques étaient prélevées. Les biopsies antrales et fundiques sont mises séparément dans des tubes stériles contenant du bouillon cœur-cerveau. Les biopsies destinées à notre étude étaient prélevées avant celles destinées à l'anatomopathologie afin d'éviter les traces de formol, inhibiteur de la culture et de la PCR. A noter que pour le service de Pédiatrie seules les biopsies antrales étaient prélevées afin de limiter au maximum la durée de l'examen.

Les prélèvements des services de l'hôpital Bologhine étaient adressés immédiatement au laboratoire de l'hôpital. Les autres prélèvements étaient conservés à +4°C puis acheminés le jour même dans une glacière au service de bactériologie de l'hôpital de Bologhine. Tous les prélèvements étaient accompagnés d'une fiche de renseignement (Annexe 1).

2.2. Culture et antibiogramme

H. pylori étant une bactérie extrêmement fragile, la culture était réalisée immédiatement après la réception des prélèvements. Dans les rares cas où cela n'a pas été possible, les biopsies étaient congelées à -80°C. Les biopsies antrales et fundiques étaient considérées comme deux prélèvements distincts et mises en culture séparément.

Les biopsies étaient broyées au début de l'étude à l'aide d'une lame de bistouri stérile puis avec un broyeur manuel dans un tube Eppendorf avec 1ml de bouillon cœur-cerveau. Une partie du broyat était congelée à -80°C afin d'effectuer les tests de biologie moléculaire. L'autre partie était mise en culture sur milieu Colombia fraîchement préparé additionné de 10% de sang humain et du supplément sélectif commercialisé par Oxoid contenant de la vancomycine, du trimethoprime, de la cefsulodine et de l'amphotéricine pour inhiber la croissance de contaminants notamment la flore buccale. Les cultures étaient incubées à 37°C dans des jarres hermétiques avec des sachets générateurs d'atmosphère microaérobie. Les lectures étaient effectuées les 3, 5, 7 et 10^{ème} jours. Les colonies suspectes d'environ 1mm de diamètre, bombées, translucides (Fig. 16) étaient réisolées ou étalées sur la même boîte en cas de faible croissance pour éviter la formation de formes coccoïdes non cultivables. La lecture des réisolements était effectuée 48h après car la croissance est plus rapide qu'en primoculture (Fig. 17). L'identification de *H. pylori*, contrairement à sa culture, est simple, elle est basée sur la forme spécifique des bactéries en coloration de Gram (Fig. 18) et la production d'oxydase, de catalase et d'uréase instantanée. Des galeries d'identification biochimiques Api Campy[®] (BioMérieux) ont été utilisées pour confirmer l'identification de certaines souches. Les souches identifiées étaient conservées à -80°C dans du bouillon cœur-cerveau additionné de 20% de glycérol.



Figure 16: Primoculture de *H. pylori* (Raaf N. et Amhis W., unité de microbiologie, hôpital Bologhine 2015).

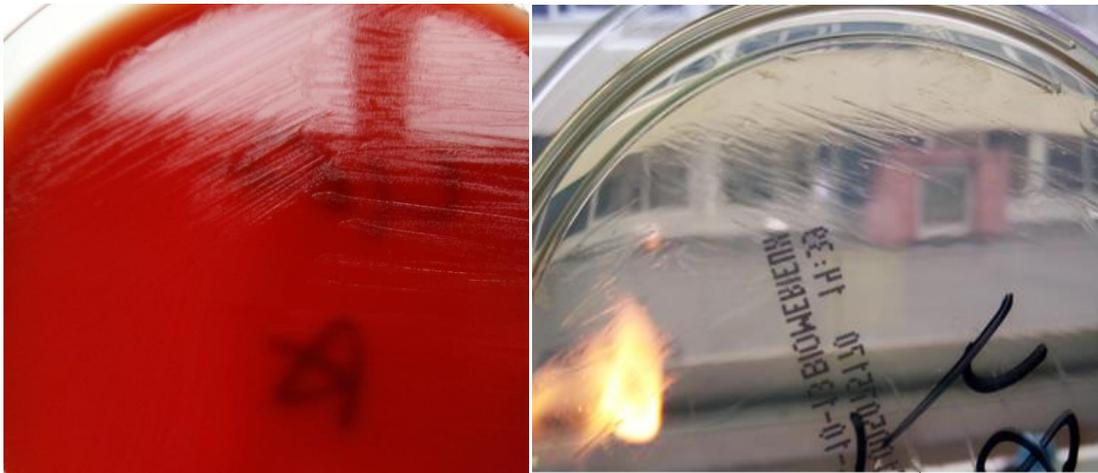


Figure 17: Subculture de *H. pylori* sur milieux Colombia au sang frais (à droite) (Raaf N. et Amhis W., unité de microbiologie, hôpital Bologhine 2015) et milieux *H. pylori* Biomérieux (à gauche) (Raaf N., CNRCH 2016).

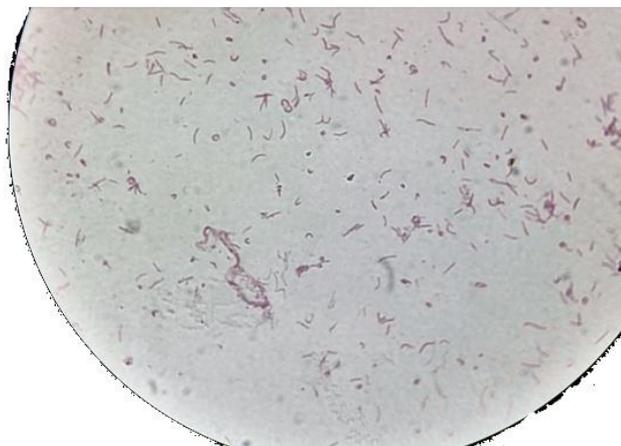


Figure 18: Coloration de Gram de *H. pylori* Gx1000. (Raaf N. et Amhis W., unité de microbiologie, hôpital Bologhine 2015).

Un antibiogramme était réalisé sur milieu Muller-Hinton fraîchement préparé additionné de 10% de sang humain avec une suspension bactérienne de 3 Mc Farland minimum. La sensibilité à l'amoxicilline, la tétracycline, la rifampicine, les fluoroquinolones (lévofloxacine et ciprofloxacine), les macrolides (clarithromycine et érythromycine) et le métronidazole était testés avec la méthode de diffusion sur gélose. La quantité des bandelettes E-test étant limitée dans notre laboratoire, nous avons utilisé les disques d'antibiotiques sauf pour le métronidazole, pour confirmer une résistance à un antibiotique et en cas de diamètre intermédiaire ne permettant pas de trancher. Les diamètres d'inhibition de *H. pylori* sont élevés, un maximum de 3 disques d'antibiotique ou un E-test étaient placés dans la même boîte de Petri pour permettre l'interprétation des résultats.

L'antibiogramme de *H. pylori* n'est pas standardisé pour tous les antibiotiques. Les concentrations critiques étaient interprétées selon les recommandations de l'EUCAST :

- Clarithromycine : résistant > 0.5 µg/ml, sensible ≤ 0.25 µg/ml;
- Lévofloxacine : résistant > 1 µg/ml, sensible ≤ 1 µg/ml;
- Métronidazole : résistant > 8 µg/ml, sensible ≤ 8 µg/ml;
- Rifampicine : résistant > 1 µg/ml, sensible ≤ 1 µg/ml;
- Tétracycline : résistant > 1 µg/ml, sensible ≤ 1 µg/ml;
- Amoxicilline : résistant > 0.125 µg/ml, sensible ≤ 0.125 µg/ml.

Les diamètres d'inhibition étaient interprétés selon les valeurs suivantes :

- Clarithromycine: résistant < 17 mm, sensible > 22 mm ;
- Tétracycline: résistant < 17 mm, sensible >19 mm;
- Rifampicine: résistant < 14 mm, sensible > 19 mm,
- Lévofloxacin: résistant < 17 mm, sensible > 20 mm;
- Amoxicilline: résistant < 17 mm, sensible >20 mm.

2.3. Extraction d'ADN

Pour la digestion enzymatique des biopsies gastriques un petit fragment de biopsie était placé dans un tube stérile avec 180 µl de tampon de lyse (Roche) et 20 µl de protéinase K (Roche). Les tubes étaient incubés à 56°C sous agitation toute la nuit. Concernant les souches de *H. pylori* le même protocole était utilisé sur les culots des suspensions bactériennes centrifugés 5 mn à 1500 t/mn. L'extraction d'ADN des biopsies gastriques a été réalisée avec l'automate d'extraction MagNA Pure LC DNA isolation kit I (Qiagen). L'ADN des souches de *H. pylori* a été extrait à l'aide du kit d'extraction sur colonnes Qiagen suivant les instructions du manuel de chaque kit.

2.4. Détection de *H. pylori* et des mutations associées à la résistance à la clarithromycine par PCR en temps réel

Une PCR en temps réel de détection de *H. pylori* utilisant le principe FRET, suivie d'une courbe de fusion pour la détermination des mutations ponctuelles associées à la résistance à la clarithromycine (Oleastro *et al.*, 2003), a été appliquée directement sur les biopsies gastriques et sur les souches de *H. pylori*.

Matériel et méthodes

Le principe de cette PCR est divisé en deux étapes. La première étape de détection de la présence de *H. pylori* est basée sur l'amplification d'un fragment du gène de l'ARNr 23S de *H. pylori*. Lorsque la sonde d'encrage se fixe, il y'a transfert d'énergie sur la sonde de détection avec émission d'un signal ce qui permet la détection simultanée de l'amplicon (Fig. 19). La seconde étape consiste en l'analyse de la courbe de fusion permettant la détection des mutations liées à la résistance à la clarithromycine localisées dans le domaine V du gène de l'ARNr 23S. L'hybridation des sondes est parfaite et leur température de fusion est maximale en l'absence de mutation (génotype sauvage ou Wild type). En présence de mutation, l'hybridation n'est pas parfaite, le mésappariement fait que la température de fusion soit plus faible (mutation A242G, A2142C ou A2143G) (Fig. 20).

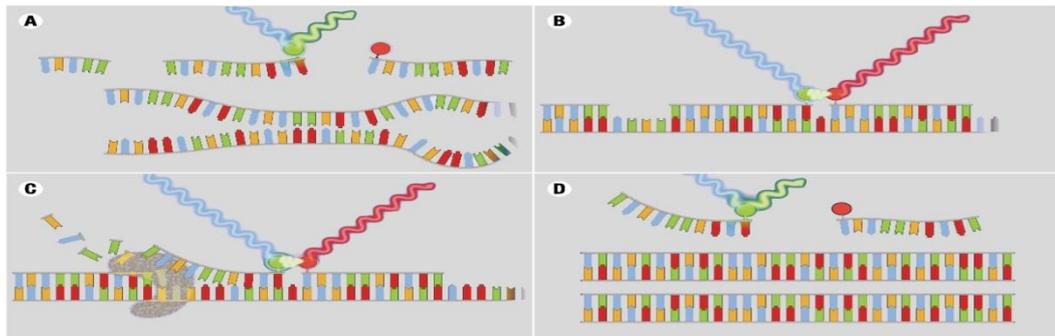


Figure 19: Principe de la PCR en temps réel FRET de détection de *H. pylori*

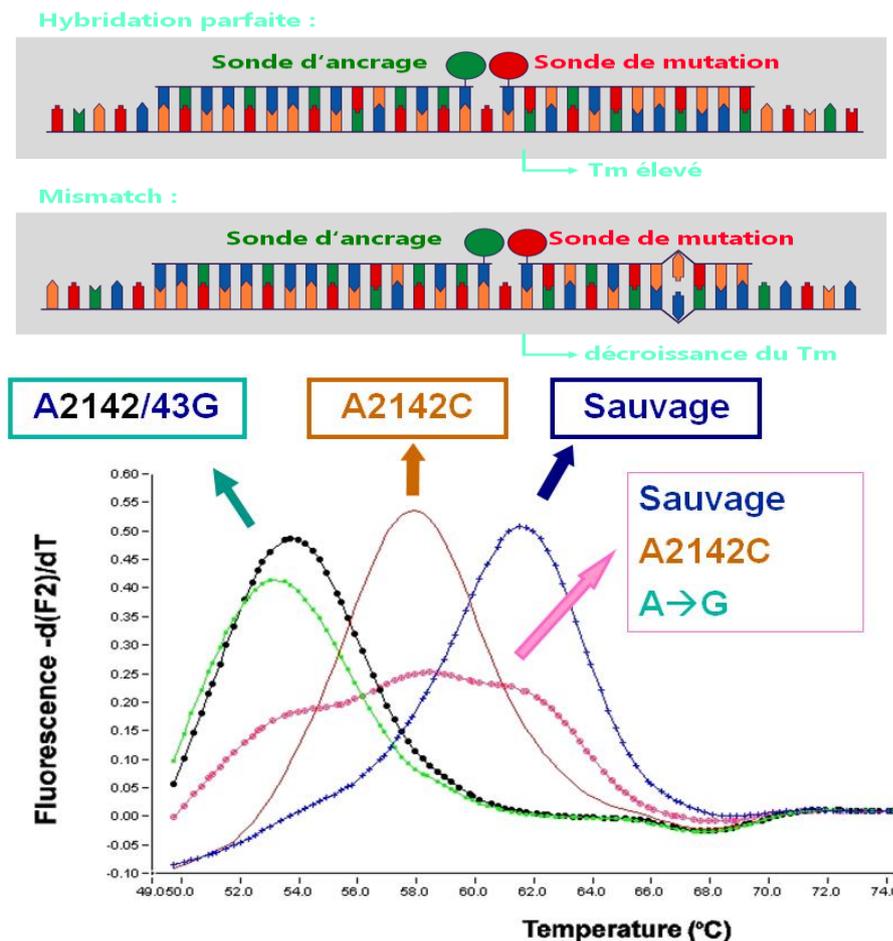


Figure 20: Principe de la détection de la résistance à la clarithromycine de *H. pylori*

Matériel et méthodes

La PCR était effectuée avec l'appareil LightCycler 1.5 (Roche) selon le protocole décrit dans le tableau 4. Les amorces et sondes utilisées sont :

- 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 4: Protocole de la PCR en temps réel de détection de *H. pylori* et des mutations associées à la résistance à la clarithromycine

Réactif	Volume(µl) n=1	Programme				
		°C	Temps	°C/sec	Mode d'acquisition	Analysis mode
Eau pure	4.98	95	10min	20	NONE	NONE
MgCl ₂ 25 mM	0.66	95	0	20	NONE	Quantification
HpyA (20 µM)	0.2	60	20sec	20	SINGLE	
HpyS (20µM)	0.2	72	12sec	20	NONE	
HpyRED (20µM)	0.08	95	0	20	NONE	Melting curves
Anc FL (20µM)	0.08	38	50sec	20	NONE	
MasterHyb. 10X	0.8	80	0	0.1	CONT	
ADN	1	40	30sec	20	NONE	None
Volume final	8					

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

Une PCR en temps réel de type Syber Green I de détection de la Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase humaine (hGAPDH) était appliquée sur les biopsies négatives à *H. pylori* pour contrôler l'extraction d'ADN. Le LightCycler 1.5 (Roche) a été également utilisée pour cette PCR selon le protocole figurant dans le tableau 5.

Tableau 5: Protocole de la PCR en temps réel de détection de la hGAPDH

Réactif	Volume(µl) n=1	Programme				Analysis mode
		°C	Temps	°C/sec	Mode d'acquisition	
Eau pure	6.6	95	10min	20	NONE	NONE
MgCl ₂ 25 mM	0.6	95	5sec	20	NONE	Quantification
hGAPDH F1 (10µM)	0.4	60	10sec	20	NONE	
hGAPDH R1 (10µM)	0.4	72	15sec	20	SINGLE	
Mix enzymes 10X	1	95	0	20	NONE	Melting curves
		38	50sec	20	NONE	
ADN	1	80	0	0.1	CONT	
Volume final	10	40	30sec	20	NONE	None

2.6. Détermination des mutations associées à la résistance à la lévofloxacine

La détermination des mutations associées à la résistance à la lévofloxacine a été effectuée par le séquençage de la région QRDR (Quinolone Resistant Determination Region) du gène *gyrA* suivant les étapes suivantes :

- **PCR classique**

Le protocole d'amplification de la région QRDR de *gyrA* est décrit dans le tableau 6. Les amorces utilisées sont (Rimbara *et al.*, 2013) :

- F-QRDR : 5-GCAAATTGTCATCTTGGCT-3'
- R-QRDR : 5-CTTCGCCCATCACTCTAGA-3'

La migration du produit de PCR était réalisée sur un gel d'agarose 2% pour vérifier l'amplification du gène. La taille attendue du gène amplifié est de 300pb.

Tableau 6: Protocole de la PCR de la région QRDR

Réactif	Volume (µl) n=1
Eau pure	19.0
Tampon colorless X5	8
MgCl ₂ 25 mM	4
dNTP (10 mM)	0.8
F-QRDR (10 µM)	2
R-QRDR (10 µM)	2
Taq polymérase	0.2
ADN	4
Volume final	40

Programme
95°C – 2 min
95°C – 30 sec
58°C – 30 sec
72°C – 30 sec
72°C – 5 min

X 40

- **Purification d'ADN**

Le produit de PCR obtenue subit une purification d'ADN par chromatographie d'exclusion sur gel de séphacryl S300 en suivant ces étapes :

- Homogénéiser le séphacryl conservé à +4°C par agitation manuelle de façon à avoir une seule phase.
- Déposer 700 µl de séphacryl dans une colonne propre adaptée sur un tube collecteur de 2 ml.
- Centrifuger 1 mn à 3000 tr/mn.
- Jeter l'éluat et déposer la colonne sur un tube nouveau tube Eppendorf étiqueté.
- Déposer le produit de PCR au milieu de la résine sans la toucher.
- Centrifuger 2 mn à 3000 tr/mn.
- Récupérer l'éluat contenant l'ADN purifié et le conserver à +4°C.
- Jeter le séphacryl et recycler la colonne.
- Faire migrer 3 µl de l'éluat pour vérifier la présence d'ADN.

- **Séquençage**

Le séquençage de la région QRDR a été effectué par le laboratoire Eurofin Genomics. Les échantillons étaient préparés et mis dans des tubes spécifiques fournis par le laboratoire avec le protocole à suivre. Le volume final de chaque tube devait être de 17 µl contenant 15 µl de l'ADN purifié dilué à 1 ng/µl et 2 µl de l'amorce précédemment utilisée pour

l'amplification à une concentration de 3.2 μM . Des tubes différents étaient utilisés pour chaque amorce (Forward et reverse). Les tubes étaient ensuite envoyés à Eurofin Genomics à température ambiante.

• Analyse des séquences

L'analyse des séquences et l'obtention des séquences consensus ont été réalisées à l'aide du logiciel DNA Baser. La séquence d'acides aminés obtenue avec le logiciel MultAlin était comparée à une séquence de référence (...PYFQIAYKKSARIVGDVIGKYHPHGDNAVYDALVRMAQDFSMRLELVDGQGNFGSIDGDNAAMRYTEAR...). Les souches sauvages présentent l'asparagine en position 87 et l'aspartate en position 91. Le remplacement de l'asparagine en position 87 par la lysine correspond au génotype muté résistant au fluoroquinolone, ainsi que le remplacement de l'asparagine en position 87 et ou de l'aspartate en position 91 correspond à la forme mutée.

2.7. Comparaison des souches de *H. pylori* par RAPD

Afin de comparer les souches antrales et les souches fundiques de *H. pylori* isolées chez un même patient entre elles, ainsi que les souches isolées chez le même patient lors de prélèvements différents, deux PCR RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) avaient été effectuées. Le principe de la RAPD est basé sur une amplification aléatoire. La technique consiste à utiliser une amorce courte d'une dizaine de nucléotides. L'amorce s'hybride au hasard sur l'ADN et la l'électrophorèse des fragments amplifiés donnera un profil particulier à chaque souche.

Les protocoles utilisés pour les deux PCR sont décrits dans les tableaux 7 et 8. Les concentrations des ADN des souches à comparer doivent être identiques.

Les amorces utilisées sont (Akopyanz *et al.*, 1992) :

- Amorce 1254 : 5' - CCGCAGCCAA-3'
- Amorce 1290 : 5' - GTGGATGCGA-3'

La migration des produits de PCR était réalisée sur un gel d'agarose 1% (Fig. 21).

Tableau 7: Protocole de la PCR RAPD 1254

Réactif	Volume (μl) n=1
Eau pure	14.75
Tampon X5	5
MgCl ₂ 25 mM	2
dNTP (10 mM)	0.5
1254 (100 μM)	0.5
Taq polymérase	0.25
ADN (10 ng/ μl)	2
Volume final	25

Programme
94°C – 5 min
94°C – 30 sec
36°C – 30 sec
72°C – 1 min 30 sec
72°C – 7 min

X 40

Tableau 8: Protocole de la PCR RAPD 1290

Réactif	Volume (µl) n=1	Programme	
Eau pure	14.75	94°C – 5 min	X 40
Tampon X5	5	94°C – 30 sec	
MgCl ₂ 25 mM	2	36°C – 30 sec	
dNTP (10 mM)	0.5	72°C – 1 min 30 sec	
1290 (100 µM)	0.5	72°C – 7 min	
Taq polymérase	0.25		
ADN (10 ng/µl)	2		
Volume final	25		

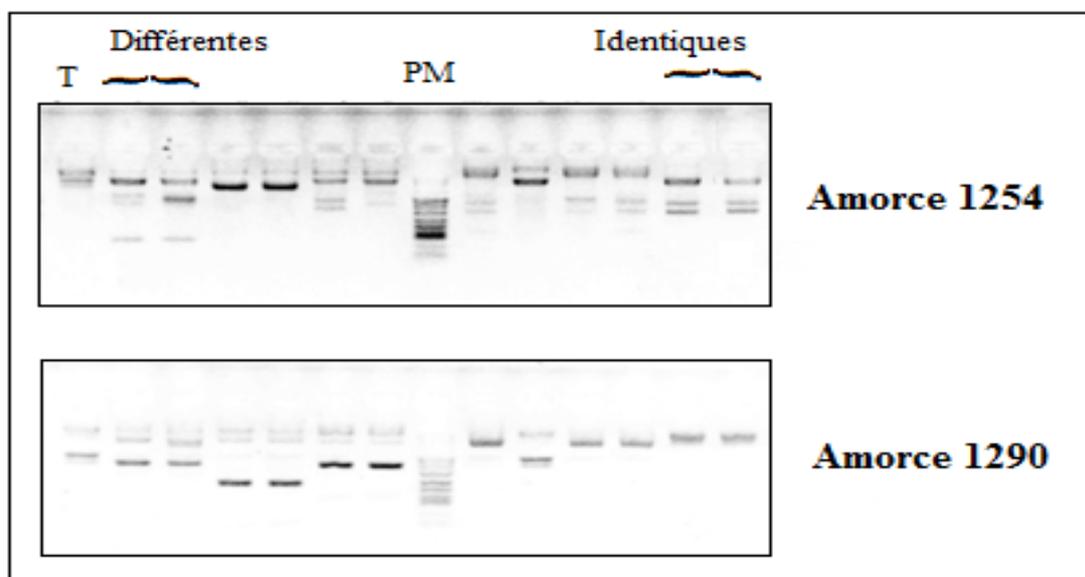


Figure 21: Gels de migration des produits de PCR de la RAPD

2.8. Détection des facteurs de virulence

La recherche des gènes de facteurs de virulence de *H. pylori* a été effectuée par différentes PCR classiques appliquées sur les souches de *H. pylori*, et sur les biopsies gastriques positives à *H. pylori* par la PCR en temps réel et de culture négative. Tous les produits de PCR étaient révélés par migration sur gel d'agarose, dont la concentration sera précisée pour chaque PCR, contenant du Syber Green comme révélateur d'ADN. Un marqueur de taille adéquat était utilisé pour chaque gel.

• *cagPAI*

Pour la mise en évidence de la présence de l'îlot de pathogénicité *cag*, une PCR *cagA* site vide a été réalisée. Le protocole de la PCR est décrit dans le tableau 9. Les amorces utilisées sont (Occhialini *et al.*, 2001):

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

La migration était effectuée sur un gel d'agarose 2%. Contrairement aux autres PCR, la présence d'une bande d'ADN de 324 pb indique l'absence de l'îlot de pathogénicité. La présence de *cagPAI* se traduit par l'absence d'amplification (Fig. 22).

Tableau 9: Protocole de la PCR *cagA* site vide

Réactif	Volume (µl) n=1	Programme	
Eau pure	13.0	95°C – 2 min	X 40
Tampon X5	5.0	95°C – 30 sec	
MgCl ₂ 25 mM	2.0	58°C – 30 sec	
dNTP (10 mM)	0.25	72°C – 30 sec	
F1-468-HP519 (10 µM)	1.0	72°C – 5 min	
R1-496-HP549 (10 µM)	1.0		
Taq polymérase	0.25		
ADN	2.5		
Volume final	25		

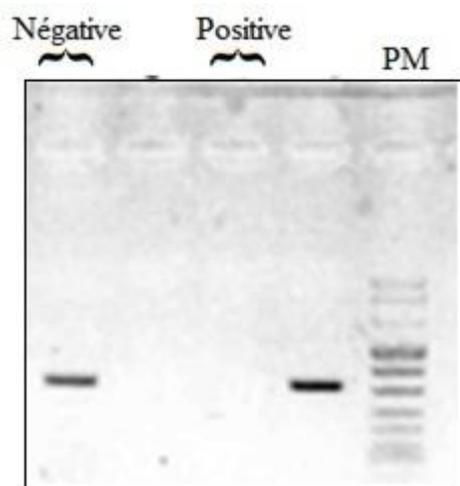


Figure 22: Gel de migration des produits de PCR *cagA* site vide

• **Motifs de phosphorylation**

Quatre PCR de *cagA* motifs de phosphorylation correspondant aux motifs P1, P2, P3 et P4 étaient réalisées sur les échantillons *cagPAI* positifs. Les protocoles des PCR sont détaillés dans les tableaux 10 à 13.

Les amorces utilisées sont (Argent *et al.*, 2005) :

- Motif de phosphorylation P1 (Taille attendue 264 pb)
cagA28Fb : 5'-TTCTCAAAGGAGCAATTGGC-3'
cagA-P1Cb : 5'-GTCCTGCTTTCTTTTATTAACCTKAGC-3'
- Motif de phosphorylation P2 (Taille attendue 309 pb)
cagA-P2CGb : 5'-TTTAGCAACTTGAGCGTAAATGGG-3'
cagA-P2Tab : 5'-TTTAGCAACTTGAGTATAAATGGG-3'
- Motif de phosphorylation P3 (Taille attendue C= 468 pb, CC= 570 pb, CCC= 672 pb)
cagA28Fb : 5'-TTCTCAAAGGAGCAATTGGC-3'
cagA-P3Eb : 5'-ATCAATTGTAGCGTAAATGGG-3'
- Motif de phosphorylation P4 (Taille attendue 485 pb)
cagA28Fb : 5'-TTCTCAAAGGAGCAATTGGC-3'
cagA-pD : 5'TTGATTTGCCTCATCAAATC-3' (Jones *et al.*, 2009)

La migration était effectuée sur un gel d'agarose 2%.

Tableau 10: Protocole de la PCR du motif de phosphorylation P1

Réactif	Volume (µl) n=1	Programme
Eau pure	13.875	95°C – 2 min
Tampon X5	5	95°C – 30 sec 57°C – 30 sec 72°C – 20 sec 72°C – 5 min
MgCl ₂ 25 mM	2	
dNTP (10 mM)	0.5	
<i>cagA28Fb</i> (25 µM)	0.5	
<i>cagA-P1Cb</i> (25 µM)	0.5	X 35
Taq polymérase	0.125	
ADN	2.5	
Volume final	25	

Matériel et méthodes

Tableau 11: Protocole de la PCR du motif de phosphorylation P2

Réactif	Volume (µl) n=1	Programme	
Eau pure	13.875	95°C – 2 min	
Tampon X5	5	95°C – 30 sec	X 35
MgCl ₂ 25 mM	2	57°C – 30 sec	
dNTP (10 mM)	0.5	72°C – 25 sec	
cagA-P2CGb (25 µM)	0.5	72°C – 5 min	
cagA-P2Tab (25 µM)	0.5		
Taq polymérase	0.125		
ADN	2.5		
Volume final	25		

Tableau 12: Protocole de la PCR du motif de phosphorylation P3

Réactif	Volume (µl) n=1	Programme	
Eau pure	18.875	95°C – 2 min	
Tampon X5	5	95°C – 30 sec	X 45
MgCl ₂ 25 mM	2	57°C – 30 sec	
dNTP (10 mM)	0.5	72°C – 50 sec	
cagA28Fb (25 µM)	0.5	72°C – 5 min	
cagA-P3Eb (25 µM)	0.5		
Taq polymérase	0.125		
ADN	2.5		
Volume final	25		

Tableau 13: Protocole de la PCR du motif de phosphorylation P4

Réactif	Volume (µl) n=1	Programme	
Eau pure	18.875	94°C – 2 min	
Tampon X5	5	94°C – 30 sec	X 35
MgCl ₂ 25 mM	2	57°C – 30 sec	
dNTP (10 mM)	0.5	72°C – 35 sec	
cagA28Fb (25 µM)	0.5	72°C – 5 min	
cagA-pD (25 µM)	0.5		
Taq polymérase	0.125		
ADN	2.5		
Volume final	25		

• ***vacA* régions *s* et *m***

Afin de différencier les allèles *vacA s1*, *s2* et *m1*, *m2*, une PCR multiplex *vacA s* et *m* a été réalisée selon le protocole mentionné dans le tableau 14.

Les amorces utilisées sont:

- Région *s* (Taille attendue *s1*= 259 pb, *s2*= 286 pb) (Atherton *et al.*, 1995)
 VA1F : 5'-ATGGAAATACAACAAACACAC-3'
 VA1R : 5'-CTGCTTGAATGCGCCAAAC-3'
- Région *m* (Taille attendue *m1*= 567 pb, *m2*= 642 pb) (Atherton *et al.*, 1999)
 VAGF : 5'-CAATCTGTCCAATCAAGCGAG-3'
 VAGR : 5'-GCGTCAAATAATTCCAAGG-3'

La migration était réalisée sur un gel d'agarose 1% (Fig. 23).

Tableau 14: Protocole de la PCR mutiplex *vacA s* et *m*

Réactif	Volume (µl) n=1
Eau pure	9.35
Tampon X5	5
MgCl ₂ 25 mM	2
dNTP (10 mM)	0.5
VA1F (10 µM)	1.75
VA1R (10 µM)	1.75
VAGF	1.75
VAGR	1.75
Taq polymérase	0.15
ADN	1
Volume final	25

Programme
94°C – 2 min
94°C – 30 sec
60°C – 30 sec
72°C – 30 sec
72°C – 5 min

X 35

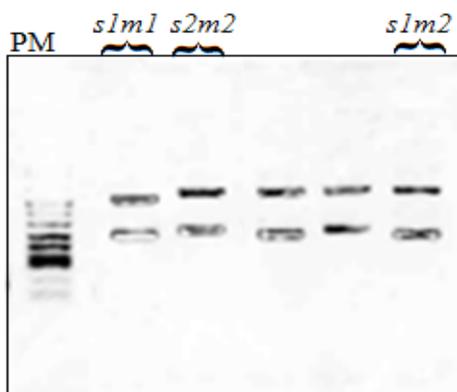


Figure 23: Gel de migration des produits de la PCR multiples *vacA s/m*

• ***vacA* régions *s1a*, *s1b* et *s1c***

Trois PCR *vacA s1a*, *vacA s1b* et *vacA s1c* étaient réalisées sur les échantillons possédant la région *vacA s1* d'après le protocole décrit dans les tableaux 15 à 17.

Les amorces utilisées pour les 3 PCR sont (Van Doorn *et al.*, 1998) :

- Région *s1a* (Taille attendue 190 pb)
Forward : 5'-GTCAGCATCACACCGCAAC-3'
Reverse : 5'-CTGCTTGAATGCGCCAAC-3'
- Région *s1b* (Taille attendue 187 pb)
Forward : 5'-AGCGCCATACGGCAAGAG-3'
Reverse : 5'-CTGCTTGAATGCGCCAAC-3'
- Région *s1c* (Taille attendue 220 pb)
Forward : 5'-TTAGTTTCTCTCGCTTTAGTRGGGYT-3'
Reverse : 5'-CTGCTTGAATGCGCCAAC-3'

Les migrations étaient réalisées sur un gel d'agarose 2%.

Tableau 15: Protocole de la PCR *vacA s1a*

Réactif	Volume (µl) n=1	Programme	
Eau pure	12.85	94°C – 2 min	
Tampon X5	5	94°C – 30 sec	X 35
MgCl ₂ 25 mM	2	60°C – 30 sec	
dNTP (10 mM)	0.5	72°C – 30 sec	
Forward (10 µM)	1.75	72°C – 5 min	
Reverse (10 µM)	1.75		
Taq polymérase	0.15		
ADN	1		
Volume final	25		

Tableau 16: Protocole de la PCR *vacA s1b*

Réactif	Volume (µl) n=1	Programme	
Eau pure	12.85	94°C – 2 min	
Tampon X5	5	94°C – 30 sec	X 35
MgCl ₂ 25 mM	2	60°C – 30 sec	
dNTP (10 mM)	0.5	72°C – 30 sec	
Forward (10 µM)	1.75	72°C – 5 min	
Reverse (10 µM)	1.75		
Taq polymérase	0.15		
ADN	1		
Volume final	25		

Tableau 17: Protocole de la PCR *vacA s1c*

Réactif	Volume (µl) n=1	Programme	
Eau pure	12.85	94°C – 2 min	X 35
Tampon X5	5	94°C – 30 sec	
MgCl ₂ 25 mM	2	60°C – 30 sec	
dNTP (10 mM)	0.5	72°C – 30 sec	
Forward (10 µM)	1.75	72°C – 5 min	
Reverse (10 µM)	1.75		
Taq polymérase	0.15		
ADN	1		
Volume final	25		

• ***vacA* région *i***

Une PCR *vacA i1* et une PCR *vacA i2* pour différencier l'allèle *i* de *vacA* ont été réalisées selon les protocoles des tableaux 18 et 19.

Les amorces utilisées sont (Rhead *et al.*, 2007) :

- Région *i1* (Taille attendue 426 pb)
 VacF1 : 5'-GTTGGGATTGGGGGAATGCCG-3'
 C1R : 5'-TTAATTTAACGCTGTTTGAAG-3'
- Région *i2* (Taille attendue 432 pb)
 VacF1 : 5'-GTTGGGATTGGGGGAATGCCG-3'
 C2R : 5'-GATCAACGCTCTGATTTGA-3'

Les migrations étaient effectuées sur un gel 2%.

Tableau 18: Protocole de la PCR *vacA i1*

Réactif	Volume (µl) n=1	Programme	
Eau pure	12.85	94°C – 2 min	X 35
Tampon X5	5	94°C – 30 sec	
MgCl ₂ 25 mM	2	58°C – 30 sec	
dNTP (10 mM)	0.5	72°C – 45 sec	
VacF1 (10 µM)	1.75	72°C – 5 min	
C1R (10 µM)	1.75		
Taq polymérase	0.15		
ADN	1		
Volume final	25		

Tableau 19: Protocole de la PCR *vacA i2*

Réactif	Volume (µl) n=1	Programme	
Eau pure	12.85	95°C – 2 min	X 35
Tampon X5	5	95°C – 30 sec	
MgCl ₂ 25 mM	2	5°C – 30 sec	
dNTP (10 mM)	0.5	72°C – 30 sec	
VacF1 (10 µM)	1.75	72°C – 5 min	
C2R (10 µM)	1.75		
Taq polymérase	0.15		
ADN	1		
Volume final	25		

• ***vacA* région *d***

La PCR *vacA d* a été réalisée selon le protocole décrit dans le tableau 20.

Les amorces utilisées sont (Ogiwara *et al.*, 2009) :

- VAS-5F : 5'-ACTAATATTGGCACACTGGATTTG-3'
- VAGF-R : 5'-CTCGCTTGATTGGACAGATTG-3'

La migration était effectuée sur un gel d'agarose 1%. Le génotype *d1* correspond à une taille d'environ 367 à 379 pb. Le génotype *d2* correspond à une taille d'environ 298 pb due à une délétion de 81 pb (Fig. 24).

Tableau 20: Protocole de la PCR *vacA d*

Réactif	Volume (µl) n=1	Programme	
Eau pure	12.85	94°C – 2 min	X 35
Tampon X5	5	94°C – 30 sec	
MgCl ₂ 25 mM	2	60°C – 30 sec	
dNTP (10 mM)	0.5	72°C – 50 sec	
VAS-5F (10 µM)	1.75	72°C – 5 min	
VAGF-R (10 µM)	1.75		
Taq polymérase	0.15		
ADN	1		
Volume final	25		

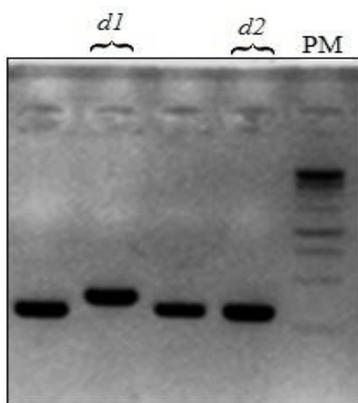


Figure 24: Gel de migration des produits de PCR *vacA d*

• *dupA*

La détermination du statut *dupA* avait été déterminée selon la méthode décrite par Nguyen et al (Nguyen *et al.*, 2010). La présence des gènes *jhp0917* et *Jhp0918* et l'insertion de 1bp après la position 1385 sont tous requis pour la formation de *dupA*. Pour cela, 3 PCR ont été réalisées selon les protocoles décrits dans les tableaux 21 à 23.

Les amorces utilisées pour déterminer le statut *dupA* sont :

- Gène *jhp0917* (Taille attendue 307 pb) (Lu *et al.*, 2005)
jhp0917-F : 5'- TGGTTTCTACTGACAGAGCGC-3'
jhp0917-R : 5'- AACACGCTGACAGGACAATCTCCC-3'
- Gène *jhp0918* (Taille attendue 276 pb) (Lu *et al.*, 2005)
jhp0918-F : 5'- CCTATATCGCTAACGCGCGCTC-3'
jhp0918-R : 5'- AAGCTGAAGCGTTTGTAAACG-3'
- Gène *dupA* (Taille attendue 350 pb) (Nguyen *et al.*, 2010)
dupA-F : 5'- TAAGCGTGATCAATATGGAT-3'
dupA-R : 5'- TGGAACGCCGCATTCTATTA-3'

Les migrations étaient effectuées sur un gel d'agarose 2%. *dupA* est considéré comme positif dans le cas où les 3 PCR sont positives.

Tableau 21: Protocole de la PCR *jhp0917*

Réactif	Volume (µl) n=1
Eau pure	10.65
Tampon X5	4
MgCl ₂ 25 mM	1.2
dNTP (10 mM)	0.5
<i>jhp0917-F</i> (25 µM)	0.5
<i>jhp0917-R</i> (25 µM)	0.5
Taq polymérase	0.15
ADN	2.5
Volume final	20

Programme
94°C – 5 min
94°C – 50 sec
60°C – 50 sec
72°C – 50 sec
72°C – 5 min

X 35

Matériel et méthodes

Tableau 22: Protocole de la PCR *jhp0918*

Réactif	Volume (µl) n=1	Programme	
Eau pure	10.65	94°C – 5 min	X 35
Tampon X5	4	94°C – 50 sec	
MgCl ₂ 25 mM	1.2	60°C – 50 sec	
dNTP (10 mM)	0.5	72°C – 50 sec	
jhp0918-F (25 µM)	0.5	72°C – 5 min	
jhp0918-R (25 µM)	0.5		
Taq polymérase	0.15		
ADN	2.5		
Volume final	20		

Tableau 23: Protocole de la PCR *dupA*

Réactif	Volume (µl) n=1	Programme	
Eau pure	10.65	94°C – 5 min	X 35
Tampon X5	4	94°C – 50 sec	
MgCl ₂ 25 mM	1.2	60°C – 50 sec	
dNTP (10 mM)	0.5	72°C – 50 sec	
dupA-F (25 µM)	0.5	72°C – 5 min	
dupA-R (25 µM)	0.5		
Taq polymérase	0.15		
ADN	2.5		
Volume final	20		

- ***babA2***

La recherche du gène *babA2* a été effectuée par PCR selon la méthode décrite dans le tableau 24.

Les amorces utilisées pour cette PCR sont (Mizushima *et al.*, 2001)

- Forward : AATCCAAAAGGAGAAAAGTATGAAA
- Reverse : TGTTAGTGATTTCGGTGTAGGACA

La migration était réalisée sur un gel d'agarose 2%. La taille attendue du gène est de 832 pb.

Tableau 24: Protocole de la PCR *babA2*

Réactif	Volume (µl) n=1	
Eau pure	13	
Tampon X5	5	
MgCl ₂ 25 mM	2	
dNTP (10 mM)	0.25	
Forward (25 µM)	1	
Reverse (25 µM)	1	
Taq polymérase	0.25	
ADN	2.5	
Volume final	25	

Programme	
95°C – 4 min	
95°C – 30 sec	X 35
60°C – 30 sec	
72°C – 30 sec	
72°C – 5 min	

2.9. Typage phylogéographique par MLST

Afin de déterminer l'origine géographique des souches de *H. pylori* isolées à Alger, nous avons procédé à un typage par MLST (MultiLocus Sequence Typing). Le principe de cette technique est basé sur le séquençage de 7 gènes de ménages de *H. pylori* et de les comparer à une base de données de souches types. Les 7 gènes séquencés sont :

- *atpA* : protéine ATP synthase alpha chain.
- *efp* : protéine Efp, facteur de l'activité de l'allongement de la traduction.
- *mutY* : protéine MutY, activité catalytique et liaisons de l'ADN.
- *ppa* : protéine Inorganic pyrophosphatase, activité inorganique de diphosphatase et liaison aux ions magnésium.
- *trpC* : protéine Tryptophan biosynthesis, catalyse deux étapes séquentielles de la voie de la biosynthèse du tryptophane.
- *urel* : protéine Urel, protection acide et régulation de l'activité de l'uréase cytoplasmique
- *yphC* : protéine YphC, rôle dans la liaison à la GTP

Les étapes suivies étaient les suivantes :

- **PCR classique**

Les protocoles des PCR d'amplification des 7 gènes sont rapportés dans les tableaux 25 à 31. Les amorces utilisées sont (<https://pubmlst.org/helicobacter/info/primers.shtml>):

- Gène *atpA* (Taille attendue 626 à 627 pb)
atpA_for2: 5'- GGACTAGCGTTAAACGCACG-3'
atpA_rev2: 5'- CTTGAAACCGACAAGCCCAC-3'
- Gène *efp* (Taille attendue 410 pb)
efp_for1: 5'- GGCAATTTGGATGAGCGAGCTC-3'
efr_rev1: 5'- CTTCACCTTTTCAAGATACTC-3'
- Gène *mutY* (Taille attendue 419 à 420 pb)
mutY_for2: 5'- GTGGTTGTAGYTGGAACTTTACAC-3'

Matériel et méthodes

- mutY_rev3: 5'-CTTAAGCGTGTGTYTTTCTAGG-3'
- Gène *ppa* (Taille attendue 398 pb)
ppa_for5: 5'-GGAGATTGCAATGAATTTAGA-3'
ppa_rev5: 5'-GTGGGGTTAARATCGTTAAATTG-3'
 - Gène *trpC* (Taille attendue 456 pb)
HptrpC6_for : 5'-TAGAATGCAAAAAGCATCGCCCTC-3'
HptrpC7_rev : 5'-TAAGCCCCGCACACTTTATTTTCGCC-3'
 - Gène *urel* (Taille attendue 535 à 385 pb)
urelfor : 5'-AGGTTATTCGTAAGGTGCG-3'
urel_rev2 : 5'-GTTTAAATCCCTTAGATTGCC-3'
 - Gène *yphC* (Taille attendue 504 à 531 pb)
yphC_for2: 5'-CACGCCTATTTTTTTGACTAAAAAC-3'
yphC_rev3: 5'-CATTYACCCTCCCAATGATGC-3'

Les migrations étaient réalisées sur un gel d'agarose 2%.

Tableau 25: Protocole de la PCR *atpA*

Réactif	Volume (µl) n=1	Programme	
Eau pure	14.1	94°C – 2 min	X 35
Tampon colorless X5	5	94°C – 30 sec	
MgCl ₂ 25 mM	2	56°C – 30 sec	
dNTP (10 mM)	0.5	72°C – 45 sec	
atpA_for2 (25 µM)	0.4	72°C – 7 min	
atpA_rev2 (25 µM)	0.4		
Taq polymérase	0.1		
ADN (20ng/µl)	2.5		
Volume final	25		

Tableau 26: Protocole de la PCR *efp*

Réactif	Volume (µl) n=1	Programme	
Eau pure	14.1	94°C – 2 min	X 35
Tampon colorless X5	5	94°C – 30 sec	
MgCl ₂ 25 mM	2	54°C – 30 sec	
dNTP (10 mM)	0.5	72°C – 45 sec	
efp_for1 (25 µM)	0.4	72°C – 7 min	
efp_rev1 (25 µM)	0.4		
Taq polymérase	0.1		
ADN (20ng/µl)	2.5		
Volume final	25		

Tableau 27: Protocole de la PCR *mutY*

Réactif	Volume (µl) n=1
Eau pure	14.1
Tampon colorless X5	5
MgCl ₂ 25 mM	2
dNTP (10 mM)	0.5
mutY_for2 (25 µM)	0.4
mutY_rev3 (25 µM)	0.4
Taq polymérase	0.1
ADN (20ng/µl)	2.5
Volume final	25

Programme
94°C – 2 min
94°C – 30 sec
54°C – 30 sec
72°C – 45 sec
72°C – 7 min

X 35

Tableau 28: Protocole de la PCR *ppa*

Réactif	Volume (µl) n=1
Eau pure	14.1
Tampon colorless X5	5
MgCl ₂ 25 mM	2
dNTP (10 mM)	0.5
ppa_for5 (25 µM)	0.4
ppa_rev5 (25 µM)	0.4
Taq polymérase	0.1
ADN (20ng/µl)	2.5
Volume final	25

Programme
94°C – 2 min
94°C – 30 sec
54°C – 30 sec
72°C – 45 sec
72°C – 7 min

X 35

Tableau 29: Protocole de la PCR *trpC*

Réactif	Volume (µl) n=1
Eau pure	14.1
Tampon colorless X5	5
MgCl ₂ 25 mM	2
dNTP (10 mM)	0.5
HptrpC6_for (25 µM)	0.4
HptrpC7_rev (25 µM)	0.4
Taq polymérase	0.1
ADN (20ng/µl)	2.5
Volume final	25

Programme
94°C – 2 min
94°C – 30 sec
56°C – 30 sec
72°C – 45 sec
72°C – 7 min

X 35

Tableau 30: Protocole de la PCR *ureI*

Réactif	Volume (µl) n=1	Programme	
Eau pure	14.1	94°C – 2 min	X 35
Tampon colorless X5	5	94°C – 30 sec	
MgCl ₂ 25 mM	2	54°C – 30 sec	
dNTP (10 mM)	0.5	72°C – 45 sec	
ureI _{for} (25 µM)	0.4	72°C – 7 min	
ureI _{rev2} (25 µM)	0.4		
Taq polymérase	0.1		
ADN (20ng/µl)	2.5		
Volume final	25		

Tableau 31: Protocole de la PCR *yphC*

Réactif	Volume (µl) n=1	Programme	
Eau pure	14.1	94°C – 2 min	X 35
Tampon colorless X5	5	94°C – 30 sec	
MgCl ₂ 25 mM	2	54°C – 30 sec	
dNTP (10 mM)	0.5	72°C – 45 sec	
yphC _{for2} (25 µM)	0.4	72°C – 7 min	
yphC _{rev3} (25 µM)	0.4		
Taq polymérase	0.1		
ADN (20ng/µl)	2.5		
Volume final	25		

- **Purification d'ADN**

Les produits de PCR obtenus pour chaque gène ont subi une purification d'ADN par chromatographie d'exclusion sur gel de séphacryl S400 suivant les étapes précédemment décrites dans la partie résistance à la lévofloxacine.

- **Séquençage**

Le séquençage des gènes d'une partie des souches a été effectué par les laboratoires Eurofin Genomic. L'autre partie était réalisée avec le séquenceur disponible au niveau du laboratoire de biologie moléculaire de l'hôpital Pellegrin. Concernant cette partie, après l'étape de purification de l'ADN des réactions de séquences avec du BigDye® pour chaque gène avaient été réalisées selon le protocole rapporté dans le tableau 32. Les mêmes amorces utilisées pour les PCR ont été utilisées pour les réactions de séquences pour tous les gènes à l'exception du gène *atpA* dont voici les amorces utilisées pour le séquençage :

Matériel et méthodes

- atpA_{internal-for} : 5'-GCTATTGGGCAAAAAGAATC-3'
- atpA_{internal-rev}: 5'-ACGACGCTGTATTCCATCGC-3'

Les réactions de séquences étaient conservées à +4°C en attendant leurs traitement par le séquenceur.

Tableau 32: Protocole des réactions de séquences des 7 gènes de la MLST

Réactif	Forward (μ l) n=1	Reverse (μ l) n=1	Programme
Eau pure	13	13	96°C – 1 min
BigDye® Terminator v3,1 Cycle sequencing kit	1	1	96°C – 10 sec
BigDye® Terminator v1,3 - 5X sequencing buffer	4	4	50°C – 5 sec X 25
Amorce (3,2 μ M) (Forward ou Reverse)	1	1	60°C – 4 min
ADN S400	1	1	4°C
Volume final	20	20	

- **Analyse des séquences**

Le logiciel DNA Baser a été utilisé pour l'obtention des séquences consensus. Les extrémités supplémentaires des gènes étaient coupées en alignant nos séquences avec des séquences types sur MultAlin. Les séquences des 7 gènes traités étaient ensuite assemblées en une seule séquence selon cet ordre : *atpA*, *efp*, *mutY*, *ppa*, *trpC*, *urel*, *yphC* puis comparées à des souches références de différentes origines géographiques disponible dans la database pubmlst. Le typage phylogéographique a été effectué en utilisant le " no admixture model " de STRUCTURE (Falush *et al.*, 2003a), comme décrit précédemment (Oleastro *et al.*, 2017). En utilisant les mêmes conditions, le " admixture model " a également été appliqué pour vérifier l'existence d'un mélange de populations distinctes. Un arbre phylogénétique a été réalisé avec le logiciel MEGA 6.

RESULATS

IV. Résultats

1. Caractéristique des patients

Au total 358 patients ont été inclus dans cette étude : 327 patients adultes et 31 patients du service de pédiatrie.

La moyenne d'âge des 327 patients adultes était de 48 ans (extrêmes 17 à 90 ans). La répartition des patients par tranches d'âge est présentée dans le tableau 33. Le sexe ratio H/F était de 0.8, 145 hommes (44%) et 182 femmes (56%). Cent cinquante-trois patients (47%) n'avaient pas été traités contre *H. pylori* et 174 (53%) avaient déjà reçu un traitement d'éradication de *H. pylori*. La moyenne d'âge (48 ans) et le sexe ration (0.8) sont identiques pour les deux groupes de patients. Les résultats de l'endoscopie digestive montre que la majorité des patients (68%) souffraient d'une gastrite, suivi des ulcères duodénaux (14%), des lymphomes (13%) et des ulcères gastriques (2.5%) alors que 2.5% d'entre eux avaient une muqueuse gastrique normale. La figure 25 répartit les patients traités et non traités selon l'aspect endoscopique.

Tableau 33: Répartition des patients adultes par tranches d'âge

Age	17 - 37 ans	38 - 58 ans	59 - 79 ans	80 - 90 ans	ND	Total
Total patients n (%)	93 (28)	136 (42)	83 (25)	6 (2)	9 (3)	327 (100)
Patients non traités n(%)	46 (30)	61(40)	40 (26)	5 (3)	1 (1)	153 (100)
Patients traités n (%)	47 (27)	75 (43)	43 (25)	1 (0.5)	8 (4.5)	174 (100)

ND : Non Déterminé

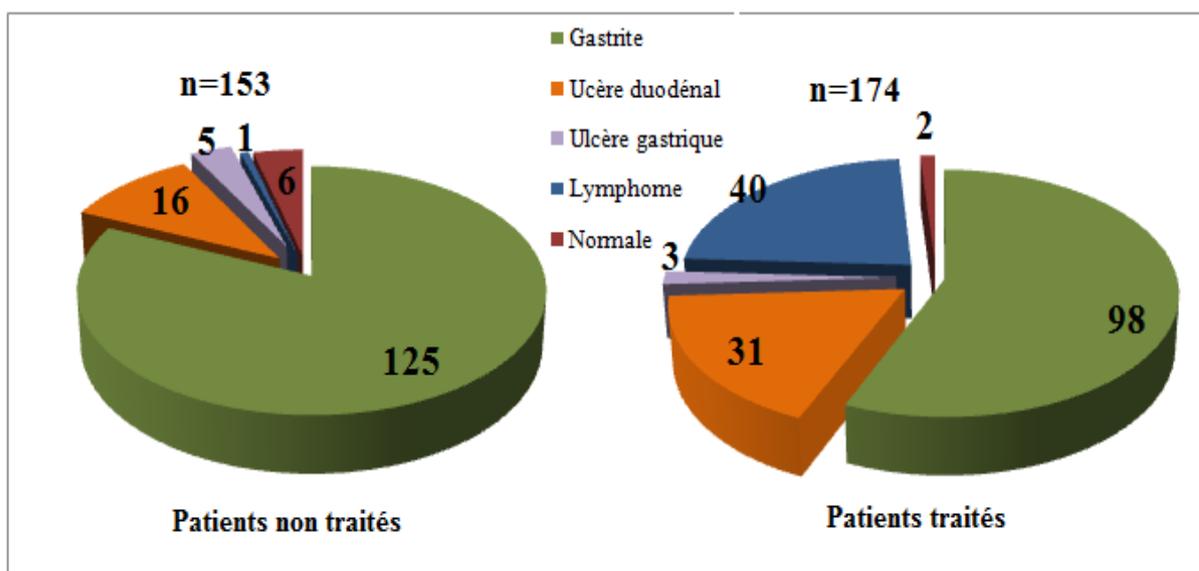


Figure 25: Répartition des patients adultes selon l'aspect endoscopique

La moyenne d'âge des 31 patients du service de pédiatrie était de 12 ans (extrêmes 5 à 16 ans). Le sexe ratio garçon fille était de 0.47, 10 garçons et 21 filles. L'endoscopie digestive a révélé que 26 patients avaient une gastrite et 5 une muqueuse gastrique normale. Neuf (29%) patients avaient reçu un traitement d'éradication contre *H. pylori* (tableau 34)

2. Prévalence de l'infection

La culture de *H. pylori* a été réalisée sur la totalité des biopsies gastriques des 327 patients adultes inclus dans cette étude. La PCR en temps réel de détection de *H. pylori* et sa résistance à la clarithromycine n'a pu être réalisée que pour 147 patients. Un problème technique au niveau du congélateur -80°C de notre laboratoire avait causé la détérioration d'une grande partie des échantillons conservés en attendant leur traitement par biologie moléculaire. Concernant les prélèvements de pédiatrie, seule la culture a été réalisée sur la totalité des biopsies gastriques. La PCR n'a pu être effectuée sur les biopsies gastriques.

La culture était positive chez 12 enfants (38.7%). Huit d'entre eux n'avaient pas reçu de traitement d'éradication et quatre avaient déjà été traités contre *H. pylori*. Le tableau 34 rapporte les caractéristiques de ces patients.

La culture était positive pour 25% des patients adultes (80/327) et la PCR s'est révélée positive chez 56% des patients adultes (82/147). A noter que pour ce groupe de 147 patients pour lesquelles la PCR a été réalisée, la culture était positive à 29% (43/147). Toutes les biopsies gastriques avec une culture positive avaient des résultats de PCR positifs.

Les résultats de la culture et de la PCR des patients n'ayant pas été traités contre *H. pylori* et ceux ayant auparavant reçu un traitement d'éradication de *H. pylori* sont décrits dans la figure 26. Pour la culture, la prévalence chez les patients traités était inférieure à la prévalence des patients non traités (20% et 30% respectivement). Par contre la PCR, technique plus sensible, avait révélé un taux quasiment identique dans les deux groupes (55% et 56% respectivement).

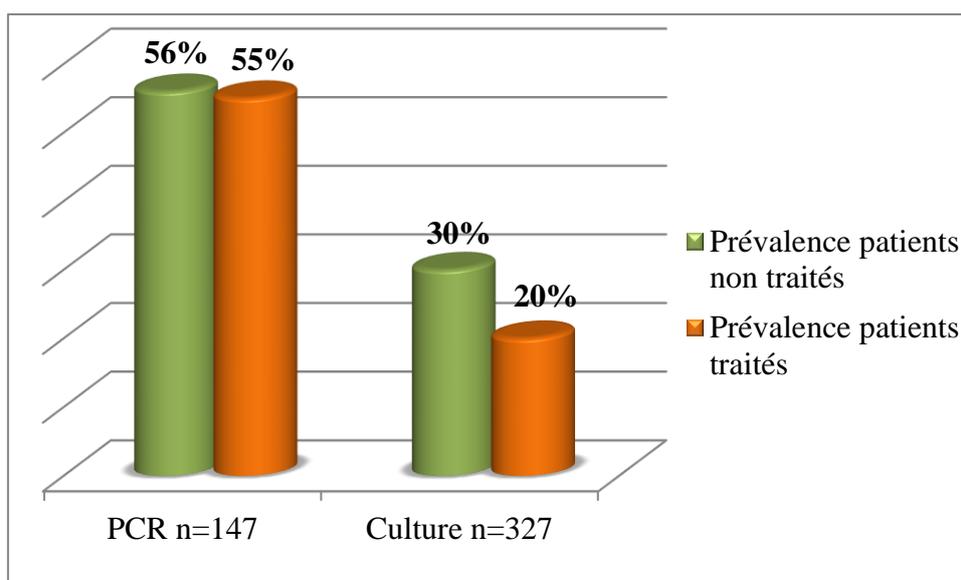


Figure 26: Prévalence de l'infection à *H. pylori* chez les adultes

Résultats

Le sexe féminin avait une prévalence plus élevée que le sexe masculin, 41 et 31% respectivement (Fig. 27).

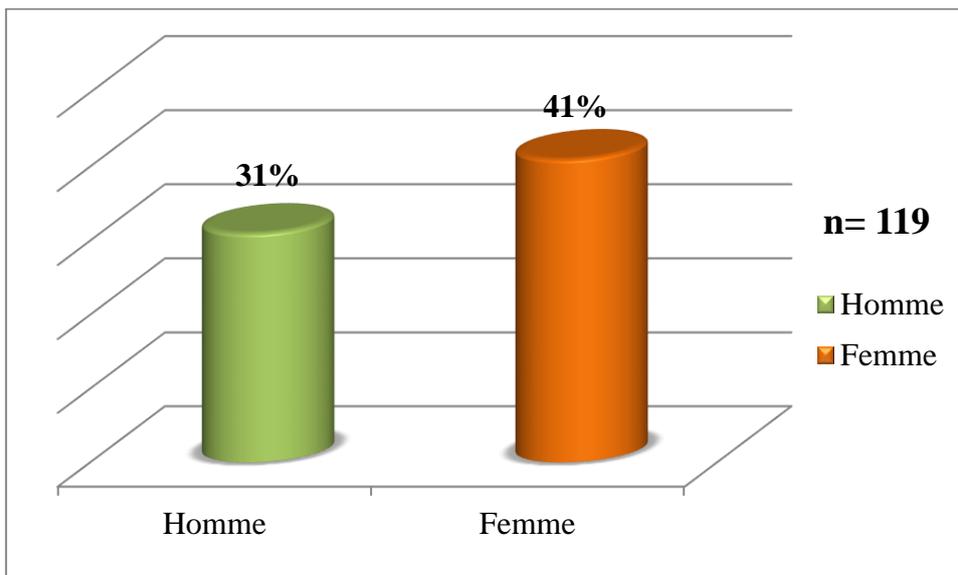


Figure 27: Prévalence de l'infection à *H. pylori* en fonction du sexe

La distribution de la prévalence par tranches d'âge représentée dans la figure 28 montre qu'elle était élevée chez les plus jeunes (63% chez les patients non traités et 28% chez les patients traités) et diminue avec l'âge. La tranche d'âge des 80- 90 ans n'était représentée que par 6 patients, le taux de 0% de prévalence ne peut donc pas être représentatif de cette tranche d'âge. L'infection selon l'âge suit la même courbe chez les groupes des patients ayant et n'ayant pas reçu de traitement d'éradication.

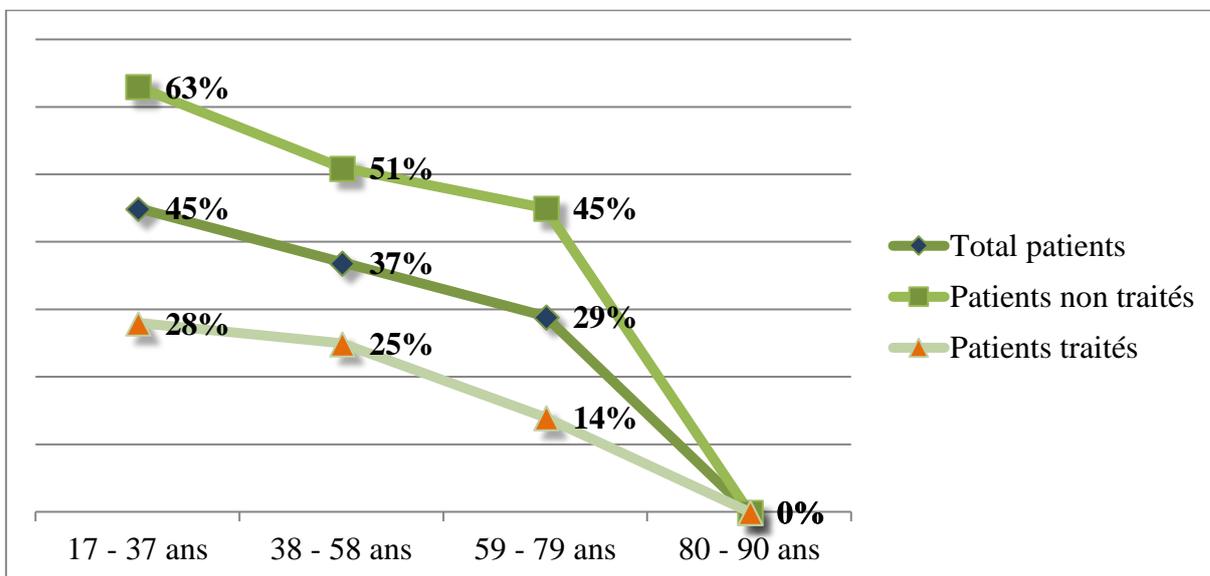


Figure 28: Prévalence de l'infection à *H. pylori* par tranches d'âge

3. Résistance aux antibiotiques

La résistance à l'amoxiciline, la tétracycline, la lévofloxacine, la rifampicine et le métronidazole avait été testée par antibiogramme. Celle de la clarithromycine avait été testée

Résultats

par antibiogramme sur les souches isolées et par PCR sur les souches isolées et directement à partir des biopsies gastriques. Aucune discordance entre les résultats de la PCR et de l'antibiogramme n'a été retrouvée.

Les résultats de la résistance primaire et secondaire aux antibiotiques sont représentés dans les figures 29 et 30 respectivement. La résistance à la clarithromycine englobe la totalité des échantillons testés par antibiogramme et par PCR. La PCR a révélée l'une des mutations A2142/43G pour la totalité des résistances à la clarithromycine, aucune mutation A2142C n'avait été détectée. La résistance à la clarithromycine et au métridazole étaient élevées. Aucune résistance à l'amoxicilline, à la tétracycline et à la rifampicine n'avait été détectée. Une seule souche résistante à la lévofloxacine avait été retrouvée. Le séquençage de la région QRDR a permis de démontrer que c'est une mutation Asn87Lys qui est à l'origine de la résistance.

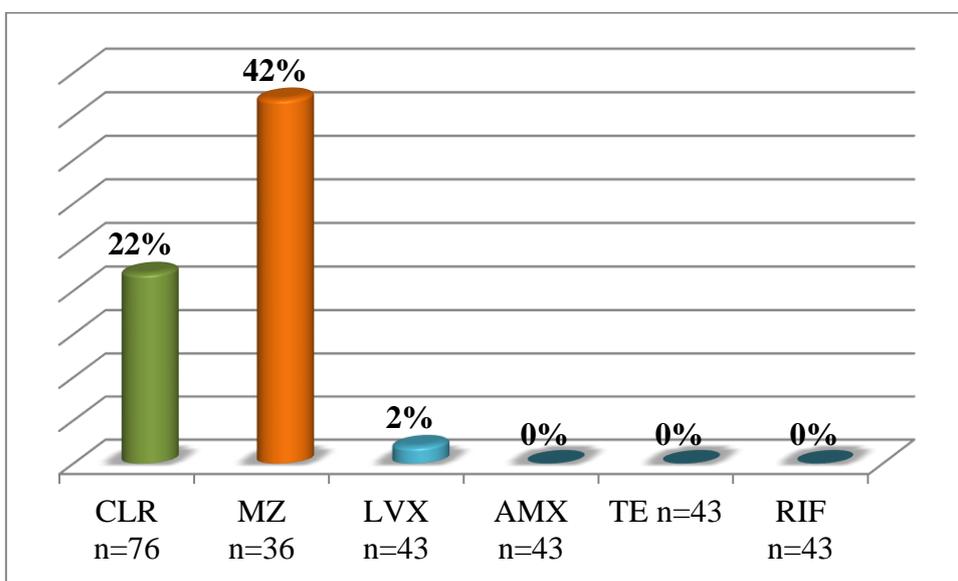


Figure 29: Résistance primaires de *H. pylori* aux antibiotiques chez les adultes

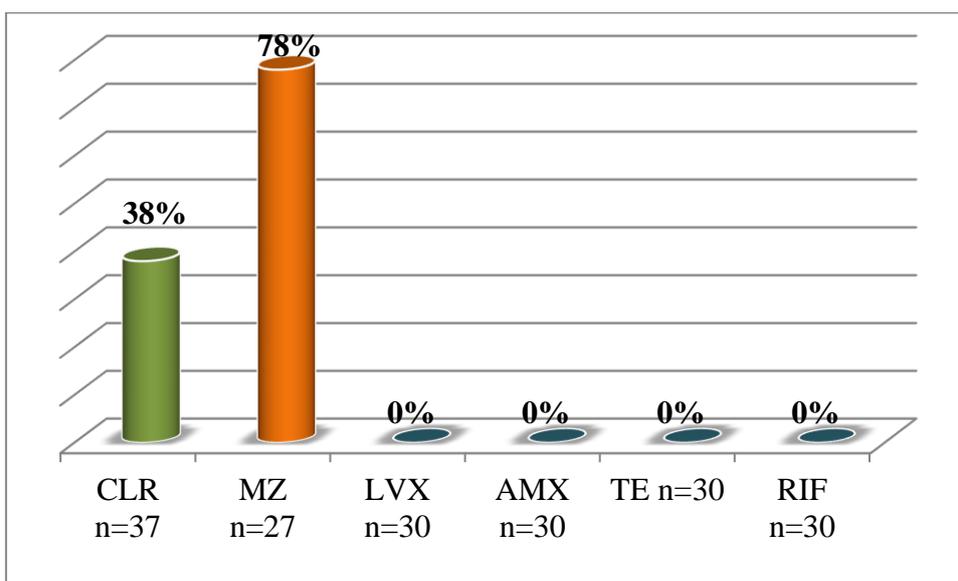


Figure 30: Résistance secondaire de *H. pylori* aux antibiotiques chez les adultes

Résultats

La comparaison des résultats de la résistance à la clarithromycine obtenues par antibiogramme et par PCR est présentée dans la figure 31. Nous notons une différence de 5% dans la résistance primaire et de 6% dans la résistance secondaire.

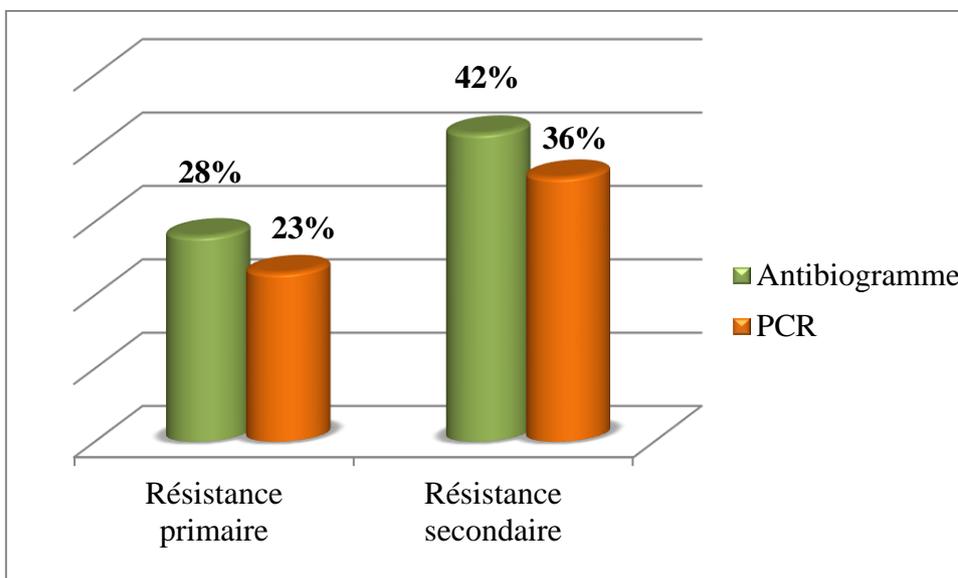


Figure 31: Comparaison des résultats de résistance à la clarithromycine par PCR et antibiogramme

Concernant les patients de pédiatrie (tableau 34), aucune résistance à l'amoxicilline, la tétracycline, la rifampicine et la lévofloxacine n'avait été détectée par antibiogramme sur les 12 souches testées. Une souche était résistante au métronidazole (résistance primaire). Une seule souche était résistante à la clarithromycine ; il s'agit d'une résistance secondaire. L'antibiogramme de cette patiente avant le traitement d'éradication révélait une souche sensible à la clarithromycine. La PCR en temps réel réalisée sur 7 des 12 souches isolées a confirmé la sensibilité des souches à la clarithromycine.

Résultats

Tableau 34: Caractéristiques et résultats des patients de pédiatrie

N°	Sexe	Age	Aspect endoscopique	TRT	Culture	CLR	MZ	CagPAI	VacA	DupA	BabA2
1	M	13	Gastrite	Non	+	S	S	+	s2m2i2d2	-	-
2	F	9	Gastrite	Non	+	S	S	-	s2m2i2d2	+	+
3	F	10	Gastrite	Non	+	S	S	+	s2m2i2d2	+	+
4	M	14	Gastrite	Non	+	S	S	+	s2m2i2d2	-	/
5	M	10	Gastrite	Oui	+	S	S	+	s1bm2i2d2	-	/
6	F	13	Gastrite	Non	+	S	S	-	s2m2i2d2	-	/
7	F	15	Normal	Non	-				/	/	/
8	F	15	Gastrite	Non	-				/	/	/
9	F	14	Gastrite	Oui	+	R	S		/	/	/
10	F	14	Gastrite	Non	-				/	/	/
11	F	14	Gastrite	Non	+	S	S		/	/	/
12	F	16	Gastrite	Non	-				/	/	/
13	F	16	Normal	Non	-				/	/	/
14	M	11	Gastrite	Non	+	S	R		/	/	/
15	F	11	Gastrite	Non	-				/	/	/
16	F	16	Gastrite	Oui	+	S	S		/	/	/
17	F	13	Gastrite	Non	+	S	S		/	/	/
18	F	14	Gastrite	Oui	-				/	/	/
19	M	5	Gastrite	Non	-				/	/	/
20	M	16	Gastrite	Non	-				/	/	/
21	F	12	Gastrite	Non	-				/	/	/
22	M	7	Normal	Oui	-				/	/	/
23	M	11	Gastrite	Non	-				/	/	/
24	F	12	Gastrite	Oui	-				/	/	/
25	F	16	Gastrite	Non	-				/	/	/
26	F	9	Gastrite	Non	-				/	/	/
27	F	5	Gastrite	Non	-				/	/	/
28	M	11	Normal	Oui	-				/	/	/
29	F	9	Normal	Non	-				/	/	/
30	F	12	Gastrite	Oui	-				/	/	/
31	M	11	Gastrite	Oui	+	S	S		/	/	/

TRT : Traitement antérieur, CLR : Clarithromycine, MZ, Métronidazole, M : Masculin, F : Féminin, + : Positif, - : Négatif, / : Non testé.

4. Distribution des facteurs de virulence

La détection des gènes des facteurs de virulence a été réalisée à partir des extraits d'ADN des souches de *H. pylori* et directement à partir des extraits d'ADN des biopsies gastriques positives à *H. pylori* quand la souche n'a pu être isolée. Les résultats des patients adultes et des 6 souches isolées des biopsies gastriques d'enfants testées sont présentés ensemble.

Quarante six pour cent (46%) des échantillons ont un statut *cagPAI* positif (Fig. 32) et 22 échantillons soit 55% ont un motif de phosphorylation P1P2P3 (Fig. 33).

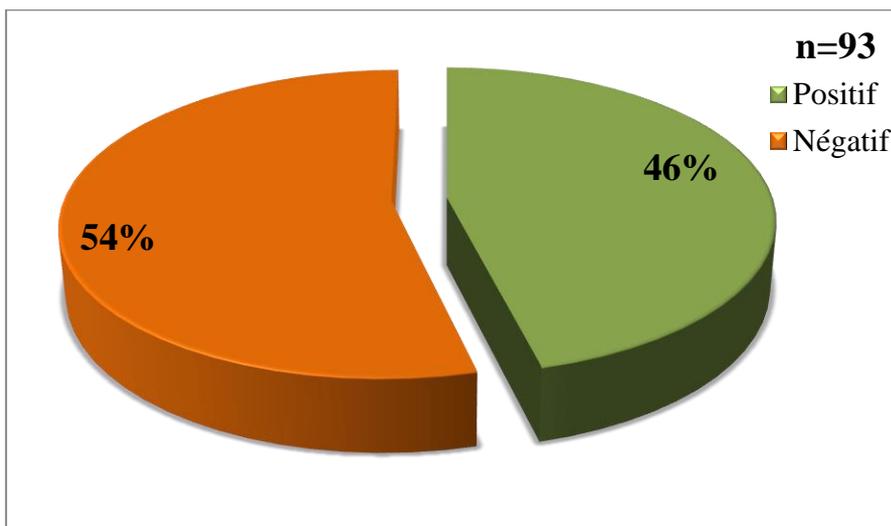


Figure 32: Distribution du statut *cagPAI*

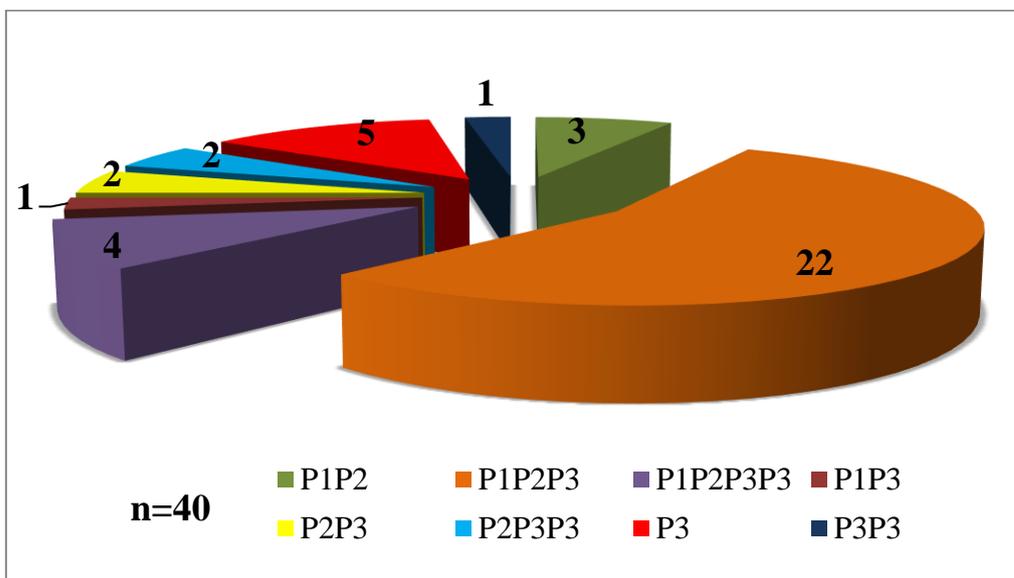


Figure 33: Distribution des motifs de phosphorylation

La proportion des allèles *s1* et *s2* de *vacA* était égale (Fig. 34). Le sous allèle *s1b* était le plus prédominant avec 82% des échantillons (Fig. 35). L'allèle *m2* était plus représenté que l'allèle *m1*, 78% et 22% respectivement (Fig. 36). Les allèles *i2* et *d2* étaient présents dans 69% des échantillons contre 31% pour les allèles *i1* et *d1* (Fig. 37 et 38).

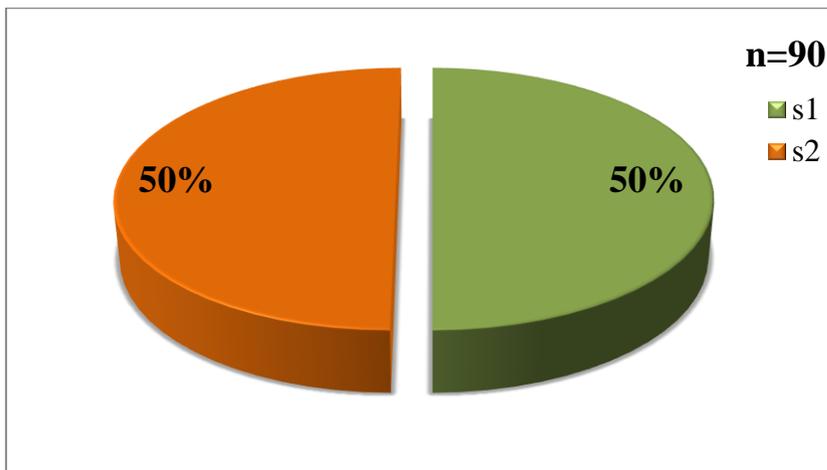


Figure 34: Proportion des allèles *vacA s1* et *s2*

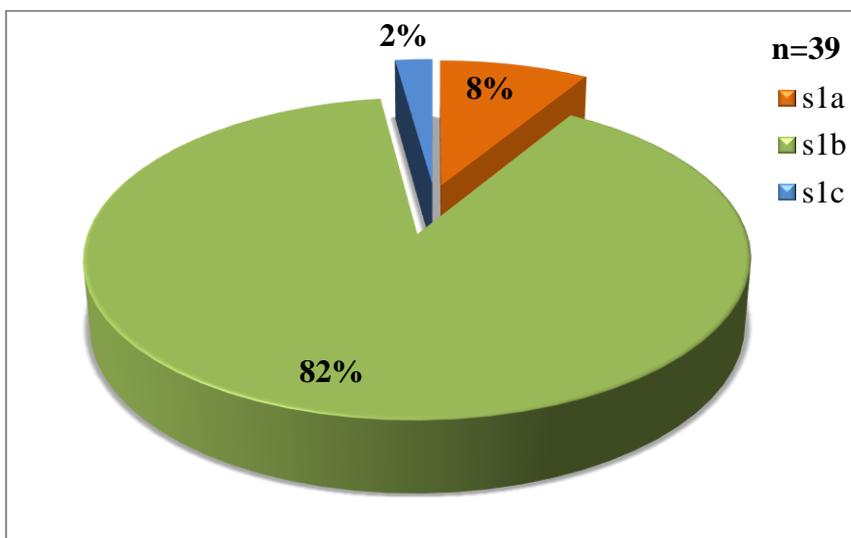


Figure 35: Proportion des allèles *vacA s1a*, *s1b* et *s1c*

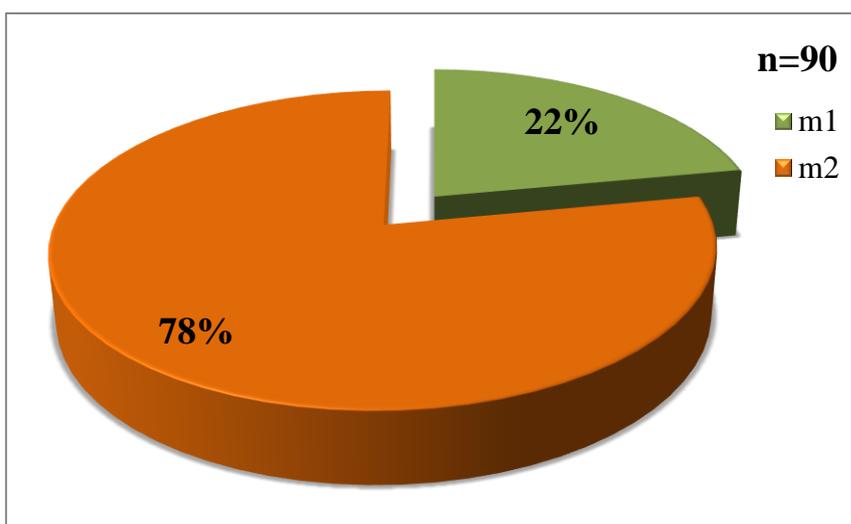


Figure 36: Proportion des allèles *vacA m1* et *m2*

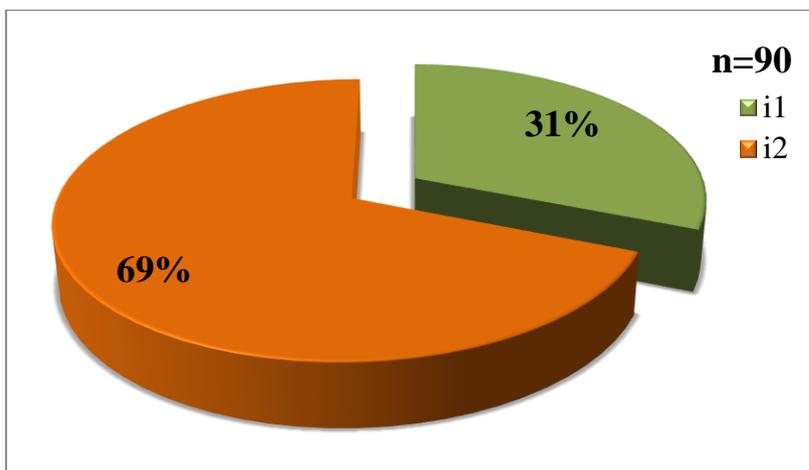


Figure 37: Proportion des allèles *vacA i1* et *i2*

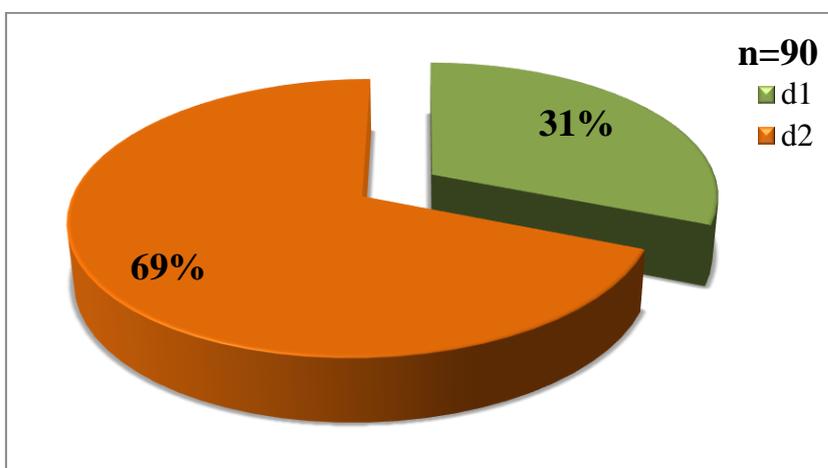


Figure 38: Proportion des allèles *vacA d1* et *d2*

Les combinaisons des allèles *s* et *m*, ceux dont le rôle est le plus incriminé dans l'évolution des pathologies gastriques, sont décrites dans la figure 39. Le génotype *vacA s2m2* était le plus fréquent 47% suivi du génotype *vacA s1m2* 31%.

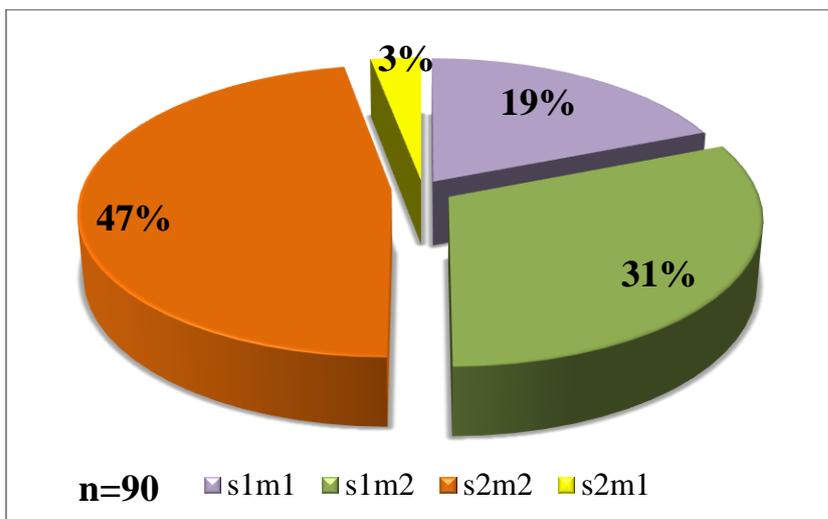


Figure 39: Répartition des combinaisons des allèles *vacA s* et *m*

Résultats

Les différentes combinaisons de tous les allèles *vacA* testés sont détaillées dans le tableau 35. On note une prédominance du génotype *s2m2i2d2* avec 38 échantillons soit 42%.

Tableau 35: Distribution des génotypes *vacA* s/m/i/d

Génotype	Nombre (%)
<i>s2m2i2d2</i>	38 (42.2)
<i>s1bm1i1d1</i>	12 (13.3)
<i>s1bm2i1d1</i>	10 (11.1)
<i>s1bm2i2d2</i>	8 (8.9)
<i>s1m2i2d2</i>	5 (5.6)
<i>s1am2i2d2</i>	3 (3.3)
<i>s1bm1i2d2</i>	3 (3.3)
<i>s2m1i1d1</i>	3 (3.3)
<i>s2m1i2d2</i>	2 (2.2)
<i>s1m1i1d1</i>	1 (1.1)
<i>s1am1i2d2</i>	1 (1.1)
<i>s1am2i1d1</i>	1 (1.1)
<i>s1cm2i2d2</i>	1 (1.1)
<i>S2m1i1d2</i>	1 (1.1)
<i>s2m2i2d1</i>	1 (1.1)
Total	90 (100)

Seul 19% des échantillons sont chacun positif à *dupA* et *babA2* (Fig. 40 et 41).

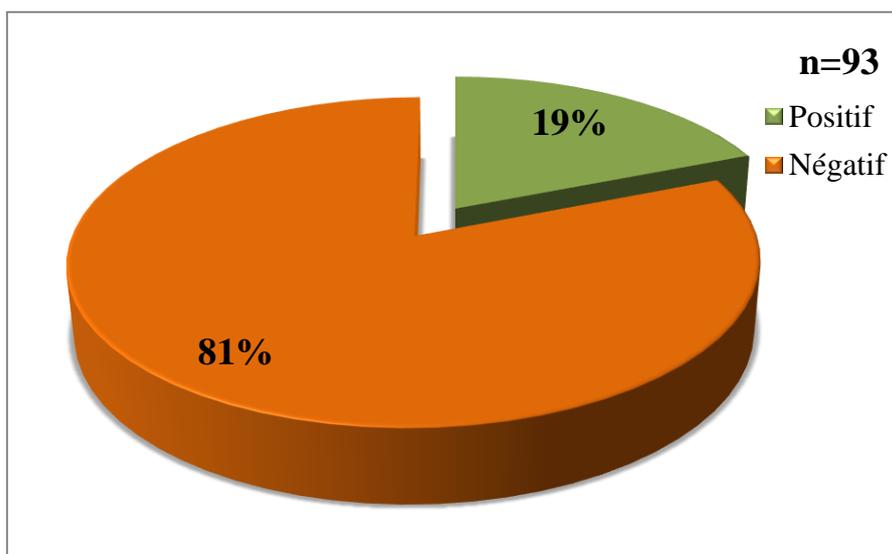


Figure 40: Distribution de *dupA*

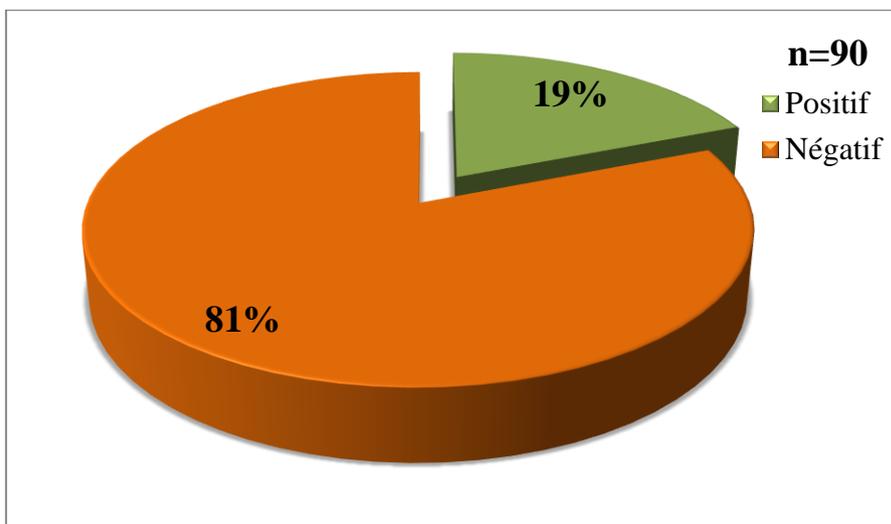


Figure 41: Distribution de *babA2*

Le tableau 36 résume les différentes combinaisons des facteurs de virulences *cagPAI*, *vacA s/m*, *dupA* et *babA2*. Le génotype le plus fréquent est le moins virulent *cagPAI*-, *vacAs2m2*, *dupA*-, *babA2*- avec 22 souches, suivi du génotype *cagPAI*+, *vacAs1m2*, *dupA*-, *babA2*- avec 13 souches, seules 2 souches combinaient les facteurs les plus virulents *cagPAI*+, *vacAs1m1*, *dupA*+, *babA2*+

5. Typage phylogéographique

Le typage géographique par MLST, en utilisant "no admixture model" du logiciel STRUCTURE, de 49 souches issues de 44 patients (38 adultes et 6 enfants), tous d'origine Nord-Africaine, avait permis de les classer en 2 groupes : 40 souches (82%) hpEurope et 9 souches (18%) hpNEAfrica. L'analyse par "admixture model" révélait que 14 souches hpEurope (28%) étaient en réalité une mosaïque entre hpEurope, hpNEAfrica et hpAfrica1. Les résultats de l'analyse MLST ainsi que les caractéristiques des souches et des patients sont décrits dans le tableau 37. La figure 42 représente l'arbre phylogénétique obtenu pour ces 49 souches. Il est à noter que les souches 273A et 237F ainsi que les souches 306A et 326A (chaque couple est isolé chez le même patients) sont identiques par MLST ; les souches 384A et 384F (isolées chez le même patients) ainsi que les souches 295A et 297F (isolées chez deux patients différents sans aucun lien entre eux) sont proches dans l'arbre phylogénétique.

Résultats

Tableau 36: Combinaison des facteurs de virulence *cag PAI*, *vacA s/m*, *dupA* et *babA2*

Génotype	Nombre (Pathologie)
<i>cagPAI+</i> , <i>vacAs1m1</i> , <i>dupA+</i> , <i>babA2+</i>	2 (1 G + 1 UD)
<i>cagPAI+</i> , <i>vacAs1m1</i> , <i>dupA+</i> , <i>babA2-</i>	3 (3 G)
<i>cagPAI+</i> , <i>vacAs1m1</i> , <i>dupA-</i> , <i>babA2+</i>	4 (3 G + 1 L)
<i>cagPAI+</i> , <i>vacAs1m1</i> , <i>dupA-</i> , <i>babA2-</i>	3 (3 G)
<i>cagPAI+</i> , <i>vacAs1m2</i> , <i>dupA+</i> , <i>babA2+</i>	1 (1 G)
<i>cagPAI+</i> , <i>vacAs1m2</i> , <i>dupA+</i> , <i>babA2-</i>	0
<i>cagPAI+</i> , <i>vacAs1m2</i> , <i>dupA-</i> , <i>babA2+</i>	3 (2 G + 1 L)
<i>cagPAI+</i> , <i>vacAs1m2</i> , <i>dupA-</i> , <i>babA2-</i>	13 (10 G + 2 UD + 1 UG)
<i>cagPAI+</i> , <i>vacAs2m2</i> , <i>dupA+</i> , <i>babA2+</i>	1 (1 G)
<i>cagPAI+</i> , <i>vacAs2m2</i> , <i>dupA+</i> , <i>babA2-</i>	1 (1 G)
<i>cagPAI+</i> , <i>vacAs2m2</i> , <i>dupA-</i> , <i>babA2+</i>	0
<i>cagPAI+</i> , <i>vacAs2m2</i> , <i>dupA-</i> , <i>babA2-</i>	8 (8 G)
<i>cagPAI-</i> , <i>vacAs1m1</i> , <i>dupA+</i> , <i>babA2+</i>	0
<i>cagPAI-</i> , <i>vacAs1m1</i> , <i>dupA+</i> , <i>babA2-</i>	2 (1 G + 1 UD)
<i>cagPAI-</i> , <i>vacAs1m1</i> , <i>dupA-</i> , <i>babA2+</i>	0
<i>cagPAI-</i> , <i>vacAs1m1</i> , <i>dupA-</i> , <i>babA2-</i>	3 (3 G)
<i>cagPAI-</i> , <i>vacAs1m2</i> , <i>dupA+</i> , <i>babA2+</i>	1 (1 UD)
<i>cagPAI-</i> , <i>vacAs1m2</i> , <i>dupA+</i> , <i>babA2-</i>	2 (2 G)
<i>cagPAI-</i> , <i>vacAs1m2</i> , <i>dupA-</i> , <i>babA2+</i>	0
<i>cagPAI-</i> , <i>vacAs1m2</i> , <i>dupA-</i> , <i>babA2-</i>	7 (6 G + 1 UG)
<i>cagPAI-</i> , <i>vacAs2m2</i> , <i>dupA+</i> , <i>babA2+</i>	1 (1 G)
<i>cagPAI-</i> , <i>vacAs2m2</i> , <i>dupA+</i> , <i>babA2-</i>	3 (3 G)
<i>cagPAI-</i> , <i>vacAs2m2</i> , <i>dupA-</i> , <i>babA2+</i>	4 (2 G + 1 UD + 1 L)
<i>cagPAI-</i> , <i>vacAs2m2</i> , <i>dupA-</i> , <i>babA2-</i>	22 (19 G + 2 UD + 1 N)

+ : Positif, - : Négatif, N : Normal, G : Gastrite, UD : Ulcère duodéal, UG : Ulcère gastrique, L : Lymphome.

Résultats

Tableau 37 : Analyse MLST et caractéristiques des patients et des souches

N° souche	Pathologie	Age	Haplotype	Facteurs de virulence
242A	Gastrite	14	hpEurope*	<i>cagPAI+</i> , <i>vacAs2m2i2d2</i> , <i>dupA-</i>
254A	Gastrite	10	hpEurope	<i>cagPA+-</i> , <i>vacAs1bm2i2d2</i> , <i>dupA-</i>
272A	Gastrite	13	hpEurope	<i>cagPAI-</i> , <i>vacAs2m2i2d2</i> , <i>dupA-</i>
273A ^a	Lymphome MALT	72	hpNEAfrica	<i>cagPAI+</i> , <i>vacAs1bm2i1d2</i> , <i>dupA-</i> , <i>babA2+</i>
273F ^a			hpNEAfrica	<i>cagPAI+</i> , <i>vacAs2m2i1d2</i> , <i>dupA-</i> , <i>babA2+</i>
279A	Gastrite	13	hpEurope	<i>cagPAI+</i> , <i>vacAs2m2i2d2</i> , <i>dupA-</i> , <i>babA2-</i>
285A	Gastrite	70	hpEurope	<i>cagPAI-</i> , <i>vacAs2m2i2d2</i> , <i>dupA-</i> , <i>babA2-</i>
288F	Lymphome MALT	21	hpEurope	<i>cagPAI-</i> , <i>vacAs2m2i2d2</i> , <i>dupA-</i> , <i>babA2+</i>
293F	Gastrite	35	hpEurope*	<i>cagPAI+</i> , <i>vacAs2m2i2d2</i> , <i>dupA-</i> , <i>babA2-</i>
295A ^b	Gastrite	50	hpNEAfrica	<i>cagPAI+</i> , <i>vacAs1bm2i1d1</i> , <i>dupA-</i> , <i>babA2-</i>
295F ^b			hpEurope*	<i>cagPAI+</i> , <i>vacAs2m2i2d2</i> , <i>dupA-</i> , <i>babA2-</i>
297F	Ulcère duodenal	45	hpNEAfrica	<i>cagPAI+</i> , <i>vacAs1bm2i1d1</i> , <i>dupA-</i> , <i>babA2-</i>
310A	Gastrite	9	hpEurope	<i>cagPAI-</i> , <i>vacAs2m2i2d2</i> , <i>dupA+</i> , <i>babA2+</i>
317A	Gastrite	10	hpEurope	<i>cagPAI+</i> , <i>vacAs2m2i2d2</i> , <i>dupA+</i> , <i>babA2+</i>
306A ^c	Lymphome MALT	45	hpEurope	<i>cagPAI+</i> , <i>vacAs1bm1i1d1</i> , <i>dupA-</i> , <i>babA2+</i>
326A ^c				<i>cagPAI+</i> , <i>vacAs1bm1i1d1</i> , <i>dupA-</i> , <i>babA2+</i>
335A	Gastrite	35	hpEurope	<i>cagPAI-</i> , <i>vacAs1am1i2d2</i> , <i>dupA+</i> , <i>babA2-</i>
338A	Gastrite	30	hpEurope	<i>cagPAI-</i> , <i>vacAs1am2i2d2</i> , <i>dupA+</i> , <i>babA2-</i>
358F	Ulcère duodenal	40	hpEurope	<i>cagPAI-</i> , <i>vacAs2m1i2d2</i> , <i>dupA-</i> , <i>babA2-</i>
359A	Ulcère duodenal	59	hpNEAfrica	<i>cagPAI+</i> , <i>vacAs1bm1i1d1</i> , <i>dupA+</i> , <i>babA2+</i>
362A	Gastrite	30	hpEurope*	<i>cagPAI+</i> , <i>vacAs1bm1i1d1</i> , <i>dupA-</i> , <i>babA2+</i>
369A	Gastrite	37	hpEurope	<i>cagPAI-</i> , <i>vacAs1bm2i2d2</i> , <i>dupA-</i> , <i>babA2-</i>
374A	Gastrite	50	hpEurope*	<i>cagPAI-</i> , <i>vacAs2m2i2d2</i> , <i>dupA-</i> , <i>babA2-</i>
375A	Gastrite	53	hpEurope*	<i>cagPAI+</i> , <i>vacAs1bm2i1d1</i> , <i>dupA-</i> , <i>babA2+</i>
376A ^d	Ulcère duodenal	65	hpEurope*	<i>cagPAI-</i> , <i>vacAs1bm2i2d2</i> , <i>dupA+</i> , <i>babA2+</i>
376F ^d			hpEurope	<i>cagPAI-</i> , <i>vacAs2m2i2d2</i> , <i>dupA-</i> , <i>babA2+</i>

Tableau 37 (suite)

N° souche	Pathologie	Age	Haplotype	Facteurs de virulence
379F	Gastrite	37	hpEurope	<i>cagPAI-</i> , <i>vacAs2m2i2d2</i> , <i>dupA+</i> , <i>babA2-</i>
382A	Ulcère duodenal	49	hpEurope*	<i>cagPAI+</i> , <i>vacAs1bm2i2d2</i> , <i>dupA-</i> , <i>babA2-</i>
383F	Gastrite	46	hpNEAfrica	<i>cagPAI+</i> , <i>vacAs1bm1i1d1</i> , <i>dupA-</i> , <i>babA2+</i>
384A ^e	Gastrite	35	hpEurope*	<i>cagPAI+</i> , <i>vacAs1bm2i1di</i> , <i>dupA-</i> , <i>babA2-</i>
384F ^e			hpEurope	<i>cagPAI-</i> , <i>vacAs1am2i1d1</i> , <i>dupA-</i> , <i>babA2-</i>
385F	Ulcère duodenal	44	hpEurope*	<i>cagPAI+</i> , <i>vacAs2m1i1d1</i> , <i>dupA-</i> , <i>babA2-</i>
392A	Gastrite	45	hpNEAfrica	<i>cagPAI-</i> , <i>vacAs1bm2i1d1</i> , <i>dupA-</i> , <i>babA2-</i>
397F	Gastrite	54	hpEurope	<i>cagPAI-</i> , <i>vacAs2m2i2d2</i> , <i>dupA-</i> , <i>babA2+</i>
401A	Gastrite	19	hpNEAfrica	<i>cagPAI+</i> , <i>vacAs1bm2i1d1</i> , <i>dupA-</i> , <i>babA2+</i>
402F	Gastrite	35	hpEurope	<i>cagPAI-</i> , <i>vacAs1am2i2d2</i> , <i>dupA-</i> , <i>babA2-</i>
407A	Gastrite	42	hpEurope	<i>cagPAI-</i> , <i>vacAs2m2i2d2</i> , <i>dupA-</i> , <i>babA2-</i>
408F	Gastrite	48	hpEurope*	<i>cagPAI-</i> , <i>vacAs2m2i2d2</i> , <i>dupA-</i> , <i>babA2-</i>
409A	Gastrite	59	hpEurope	<i>cagPAI-</i> , <i>vacAs2m2i2d2</i> , <i>dupA-</i> , <i>babA2-</i>
411A	Gastrite	56	hpNEAfrica	<i>cagPAI-</i> , <i>vacAs1bm1i1d1</i> , <i>dupA-</i> , <i>babA2-</i>
413A	Ulcère duodenal	58	hpEurope*	<i>cagPAI-</i> , <i>vacAs2m1i2d2</i> , <i>dupA-</i> , <i>babA2-</i>
415A	Gastrite	58	hpEurope	<i>cagPAI+</i> , <i>vacAs1bm2i2d2</i> , <i>dupA-</i> , <i>babA2-</i>
420F	Gastrite	57	hpEurope*	<i>cagPAI-</i> , <i>vacAs2m2i2d2</i> , <i>dupA-</i> , <i>babA2-</i>
426A	Ulcère duodenal	48	hpEurope	<i>cagPAI-</i> , <i>vacAs2m2i2d2</i> , <i>dupA-</i> , <i>babA2-</i>
427A	Gastrite	26	hpEurope	<i>cagPAI-</i> , <i>vacAs2m2i2d2</i> , <i>dupA-</i> , <i>babA2-</i>
449A	Gastrite	72	hpEurope	<i>cagPAI-</i> , <i>vacAs2m2i2d2</i> , <i>dupA-</i> , <i>babA2-</i>
453A	Gastrite	66	hpEurope	<i>cagPAI-</i> , <i>vacAs2m2i2d2</i> , <i>dupA-</i> , <i>babA2+</i>
458F	Gastrite	63	hpEurope	<i>cagPAI+</i> , <i>vacAs1bm2i2d2</i> , <i>dupA-</i> , <i>babA2-</i>
460A	Gastrite	47	hpEurope*	<i>cagPAI-</i> , <i>vacAs2m2i2d2</i> , <i>dupA+</i> , <i>babA2-</i>

A: souche antrale ; F: souche fundique ; + : Positif, - : Négatif ;

*: Mosaïque: hpEurope, hpNEAfrica, hpAfrica1 (admixture model) ;

^a, ^b, et ^d: Chaque couple a été isolé chez le même patient lors d'une seule endoscopie, les souches étaient différentes par RAPD ; ^e: Le couple a été isolé chez la même patiente à quelques mois d'interval, les souches étaient identiques par RAPD.

6. Colonisation par une double population de *H. pylori*

La colonisation par une double population de *H. pylori* a été mise en évidence par différentes méthodes (Fig. 43) :

- La RAPD testée sur 18 couples de souches antrales et fundiques isolées chacun chez le même patient avait permis d'en différencier 4. En effet, 4 patients sur les 18 testés étaient infectés par une souche antrale différente de la souche fundique. Ces résultats nous avaient incité à appliquer les PCR des facteurs de virulence et la MLST sur les souches antrales et fundiques pour ces patients. La RAPD a aussi permis de comparer les 2 souches antrales et 2 souches fundiques d'une même patiente isolées à quelques mois d'intervalle après avoir reçu un traitement d'éradication de *H. pylori*. Les résultats avaient démontré que la patiente était infectée par la même souche, identique au niveau de l'antra et de fundus, lors des différents prélèvements.
- La PCR en temps réel de détection des mutations associées à la résistance à la clarithromycine avait permis de détecter une double population sensible et résistante à la clarithromycine chez 8 patients soit 10%.
- L'antibiogramme avait détecté une double population antrale et fundique sensible et résistante au métronidazole chez un patient.
- Les PCR de détection des facteurs de virulence avaient également permis de détecter soit la différence des génotypes de l'un des facteurs de virulence entre les souches antrales et fundiques d'un même patient; soit de détecter des doubles populations directement à partir des extraits d'ADN des biopsies gastriques par la présence de différents allèles du même gène d'un facteur de virulence dans l'échantillon.
- La MLST avait confirmé la différence des souches antrales et fundiques chez 3 patients.

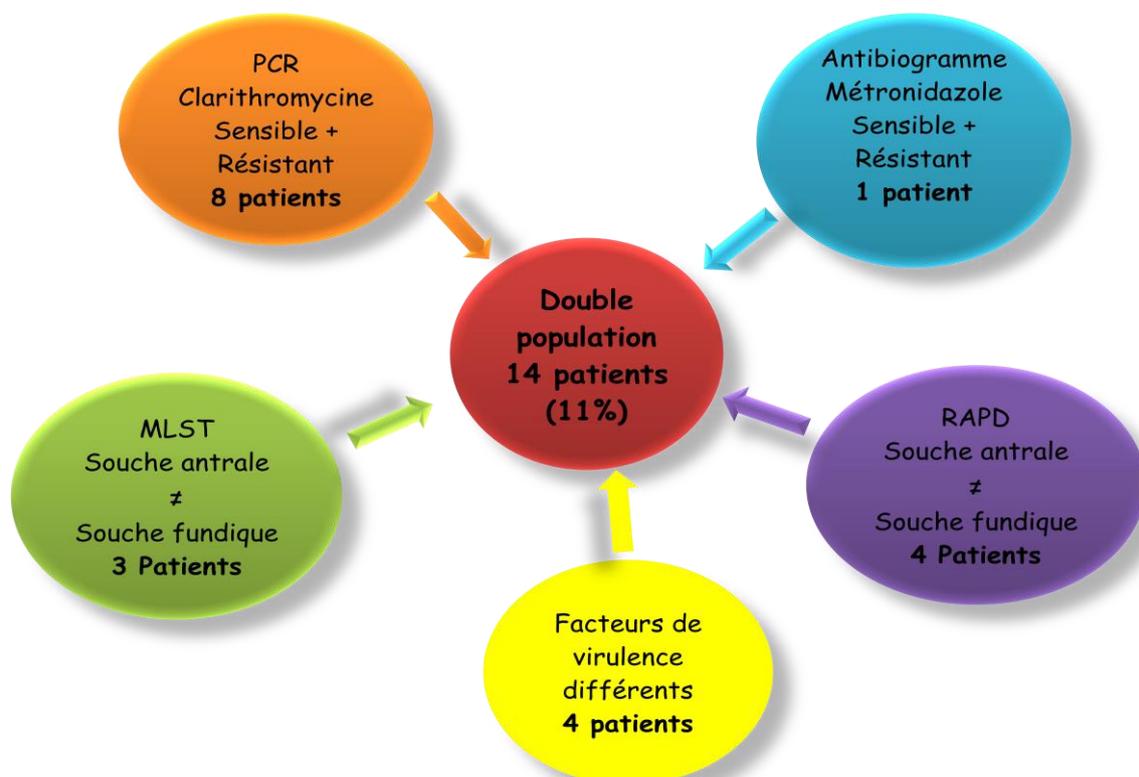


Figure 43: Mise en évidence de la double colonisation par *H. pylori* des patients

DISCUSSION

V. Discussion

L'épidémiologie de l'infection à *H. pylori* diffère considérablement d'une région à une autre dans le monde, et la prise en charge des patients dépend de la connaissance des caractéristiques locales de l'infection. Cette étude contribue à l'actualisation des données sur l'infection à *H. pylori* à Alger en incluant les patients de 3 hôpitaux. Nous avons fait le choix d'inclure dans cette étude les patients adultes ayant et n'ayant pas reçu de traitement d'éradication de *H. pylori*, ainsi que les patients de pédiatrie, et ce dans le but de comparer les résultats obtenues dans ces différents groupes en particulier la résistance aux antibiotiques.

La moyenne d'âge des patients adultes était de 48 ans avec une prédominance de patients appartenant à la tranche d'âge 38 – 58 ans. La consultation en gastroentérologie de sujets jeunes peut s'expliquer en partie par la forte prévalence de l'infection à *H. pylori* en Algérie et son acquisition tôt dans l'enfance qui entrainerait une expression clinique précoce de l'infection. L'effectif réduit des patients de pédiatrie est dû à notre collaboration avec seulement un seul service de pédiatrie et à la difficulté de prélèvement des biopsies gastriques chez les enfants.

Le seuil de détection de *H. pylori* par culture était nettement inférieur à la PCR (29% vs 56% chez les patients adultes pour lesquels les deux techniques avaient été réalisées). *H. pylori* est une bactérie très fragile et extrêmement sensible aux conditions de transport. En effet, cette dernière développe rapidement une forme coccoïde non cultivable lorsque les conditions sont défavorables entraînant des résultats faussement négatifs en culture. Les résultats de la PCR ne sont pas impactés par ce facteur car la technique détecte l'ADN de *H. pylori* que la bactérie soit viable ou non. Ces éléments font de la PCR une technique plus précise et plus fiable pour la mise en évidence de l'infection à *H. pylori*. L'étude Algérienne récente de Djennane *et al.* avec un échantillon proche de celui de notre étude et menée dans des conditions similaires rapporte également un tel écart entre les résultats de la culture et de la PCR (25 % vs 62%). Pour ces raisons, la prévalence de l'infection chez les adultes dans cette étude est interprétée selon les résultats obtenus par PCR. La non disponibilité des techniques de biologie moléculaire au niveau du laboratoire de l'hôpital de Bologhine, fait de la culture la seule alternative de diagnostic et de test de sensibilité aux antibiotiques de *H. pylori* particulièrement pour les patients en échec thérapeutique. Mais l'intérêt principal de la culture est la conservation des souches pour des études moléculaires de typage par la suite.

La prévalence de l'infection à *H. pylori*, par PCR, chez les patients adultes n'ayant pas reçu de traitement d'éradication dans cette étude était de 56 %. Elle reste élevée comme c'est le cas dans la majorité des pays en développement mais enregistre une importante diminution ces dernières années. Les études sérologiques dans les années 80 rapportaient une prévalence de *H. pylori* supérieure à 80% dans la population algérienne (Megraud *et al.*, 1989) alors que les études plus récentes rapportent des taux inférieurs. Une étude multicentrique rapporte une prévalence de 62% de la population algéroise (Djennane-Hadibi *et al.*, 2016). Une étude de

Mehasni *et al.* retrouve une prévalence de 63% à Constantine (Résultats en cours de publication). Cette diminution peut être expliquée par l'amélioration des conditions d'hygiène qui minimisent la transmission, une meilleure prise en charge thérapeutique des malades et l'éradication non intentionnelle de la bactérie par l'augmentation de l'utilisation des antibiotiques pour le traitement d'autres infections. Les résultats de cette étude ne reflètent que la prévalence de l'infection à *H. pylori* dans la capitale algérienne où le niveau de vie reste plus élevé que dans certaines régions du pays. Une grande étude Belge a démontré une importante variabilité de l'épidémiologie de l'infection à *H. pylori* parmi les personnes vivants dans un même pays et même au sein d'une même agglomération en fonction des origines et du mode de vie de la population (Deyi *et al.*, 2011). Une diminution de la prévalence de l'infection à *H. pylori* a été observée dans plusieurs pays en développement : Elle était passée de 69.7% en 1999 à 45.2% en 2012 au Ghana (Darko *et al.*, 2015), Une étude brésilienne a noté une diminution de 5.2% de la prévalence entre 2004 et 2014 (Frugis *et al.*, 2016), En Iran aussi une importante baisse de prévalence est décrite dans plusieurs études (Farshad *et al.*, 2010; Ashtari *et al.*, 2015). Il est à noter aussi que la prévalence dans notre étude concerne uniquement des patients symptomatiques et ne représente pas la prévalence de la population générale. Une étude tunisienne a démontré une prévalence nettement plus élevée chez un groupe de patients symptomatique par rapport à un groupe de donneurs de sang asymptomatique, 99% vs 64% (K.B. Mansour *et al.*, 2010).

Dans notre étude, la prévalence est similaire chez les patients non traités et les patients ayant, au préalable, reçu un traitement d'éradication de *H. pylori*, 56 et 55% respectivement. Cela signifie que pratiquement la moitié des patients traités sont toujours infectés par la bactérie. Cette situation pose la question sur l'efficacité de la thérapie d'éradication prescrite et l'observance du traitement par les patients d'une part et la possibilité d'une réinfection d'autre part. En effet plusieurs études rapportent un risque élevé de réinfection après éradication dans les pays à forte prévalence. Le taux de réinfection est relativement faible un an après l'éradication (Benajah *et al.*, 2013) mais augmente significativement trois ans après l'éradication dans les pays à forte prévalence (Rollan *et al.*, 2000; Zendehdel *et al.*, 2005). L'absence de données précises pour tous les patients sur la thérapie d'éradication suivie et le temps écoulé entre le traitement et le prélèvement des biopsies pour notre étude ne nous permet pas de privilégier une hypothèse par rapport à l'autre.

L'infection à *H. pylori* est généralement acquise durant l'enfance (Rowland *et al.*, 2006) et dépend fortement des conditions socioéconomiques (Fiedorek *et al.*, 1991). Les taux d'infection en pédiatrie varient considérablement d'un pays à un autre. Ils sont faibles dans les pays industrialisés, 15% en Espagne (Liberato *et al.*, 2005), 10% en Suède (Granquist *et al.*, 2002), et élevés dans les pays en développement, 30% en Tunisie (Maherzi *et al.*, 2003), 82% en Iran (Alborzi *et al.*, 2006). Ces taux varient aussi en fonction des techniques de diagnostic utilisées (Frenck *et al.*, 2006). A notre connaissance, il n'existe pas, à ce jour, d'études publiées sur la prévalence actuelle de l'infection à *H. pylori* en Algérie. Dans cette étude, où seule la culture a pu être réalisée sur les biopsies gastriques de pédiatrie, 38.7% des enfants avaient une culture positive à *H. pylori*. Les résultats de la culture sont très spécifiques, l'identification des isolats a été confirmée par PCR, mais ce n'est pas la technique la plus sensible comme mentionné précédemment. Ce taux aurait probablement été supérieur par PCR. Nous avons constaté que 4 enfants étaient encore infectés par *H. pylori* après traitement

d'éradication bien que les souches soient sensibles aux antibiotiques. Des études démontrent que, en plus de la résistance aux antibiotiques, la non observance du traitement d'éradication fréquente en pédiatrie, est un facteur important de l'échec d'éradication (Gottrand, 2003). La culture reste un test invasif nécessitant une endoscopie digestive mal tolérée par les enfants. Les cliniciens n'ont recours à ces tests qu'en cas de nécessité ; ce qui explique le faible effectif de nos patients.

La distribution de la prévalence par tranches d'âge démontre qu'elle est acquise très tôt et persiste longtemps avant de commencer à diminuer vers la soixantaine. La proportion de diminution de l'infection selon l'âge est équivalente chez les patients ayant et n'ayant pas reçu de traitement d'éradication. Ces résultats sont parfaitement concordants avec la courbe de l'infection à *H. pylori* selon l'âge dans les pays à forte prévalence de l'infection (Joutei *et al.*, 2010) contrairement aux pays à faible prévalence où la courbe suit une légère progression linéaire avec l'âge (Deyi *et al.*, 2011).

Le choix du traitement d'éradication de *H. pylori* repose essentiellement sur la connaissance du taux de résistance à la clarithromycine dans la région. C'est en effet le principal antibiotique de la thérapie d'éradication de la bactérie. Selon les recommandations de Maastricht V, au-delà de 15% de résistance, la triple thérapie à base de clarithromycine n'est plus recommandée (Malfertheiner *et al.*, 2017). En Algérie, en l'absence de données actualisées sur la résistance de *H. pylori* aux antibiotiques, la triple thérapie à base de clarithromycine ou de métronidazole est largement utilisée. Or, dans cette étude nous rapportons une résistance primaire à la clarithromycine chez les adultes de 22%. Une autre étude algérienne avait récemment rapporté un taux encore plus élevé à 36% (Djennane-Hadibi *et al.*, 2016) alors qu'en 2008, le LARH décrivait une résistance primaire à la clarithromycine de 12%. Une étude européenne a mis en évidence la relation entre la consommation de la clarithromycine et la forte prévalence de la résistance de *H. pylori* (Megraud *et al.*, 2013). Une autre étude belge menée sur une vingtaine d'année avait constaté une très forte augmentation de la résistance de *H. pylori* à la clarithromycine, de 4% en 1990 à 19.2% en 2003, avec la forte utilisation de cet antibiotique pour le traitement de diverses infections. L'équipe a ensuite constaté une diminution de la résistance à environ 10% suite à la réduction de la consommation des macrolides (Deyi *et al.*, 2011). En absence de publications sur la consommation de macrolides en Algérie, cette raison ne peut être que suggérée pour expliquer ce taux élevé de résistance. De nombreux autres pays enregistrent une résistance élevée à la clarithromycine : elle a augmenté de 1.8% en 1996 à 27.1% en 2008 au Japon (Horiki *et al.*, 2009) et de 12,8% à 23,8% en Chine, elle est de 29% au Maroc (Bouihat *et al.*, 2016), 15.4% en Tunisie (Khansa Ben Mansour *et al.*, 2010a), 22.2% en France (Ducournau *et al.*, 2016), 17.9% en Espagne (Navarro-Jarabo *et al.*, 2015) contrairement à d'autres où ce taux reste relativement bas et stable : inférieur à 5% en Suède (Thung *et al.*, 2016) et presque inexistante au Congo (Ontsira Ngoyi *et al.*, 2015). La résistance secondaire à la clarithromycine dans notre étude est également très élevée 38%. La résistance à la clarithromycine peut diminuer le taux d'éradication de 70% (Megraud, 2004). Selon ces données, la triple thérapie utilisant la clarithromycine ne serait plus adéquate en Algérie en première intention et sans les résultats de sensibilité aux antibiotiques. Dans notre étude, toutes les résistances correspondaient à

l'une des mutations A2142/43G, la technique utilisée ne permettant pas de les différencier. Selon la littérature, la mutation A2143G est la plus prédominante 45%, suivie de la mutation A2142G 33%, la mutation A2142C ne représente que 2% des isolats. Il n'y aurait pas de différences significatives entre les souches de différents endroits géographiques (Owen, 2002).

La résistance primaire et secondaire chez les adultes aux métronidazole dans cette étude est aussi très élevée 42% et 78% respectivement. La résistance au métronidazole est la résistance la plus fréquente de *H. pylori* aux antibiotiques. Les taux de résistance les plus élevés sont retrouvés en Afrique avec en moyenne 75% suivi de l'Amérique du sud, de l'Asie, de l'Europe et de l'Amérique du nord avec une moyenne de résistance d'environ 53%, 46%, 31% et 30% respectivement (Thung *et al.*, 2016). 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 d'infections dentaires et parasitaires (Glupczynski *et al.*, 2001; Frenck and Clemens, 2003; McMahon *et al.*, 2003). Le problème qui se pose avec le métronidazole est la faible reproductibilité des résultats *in vitro* et la non corrélation avec les résultats *in vivo*. L'interprétation de l'antibiogramme est donc à nuancer pour cet antibiotique, raison pour laquelle il n'est plus recommandé de tester la sensibilité des souches de *H. pylori* au métronidazole en routine (Malfertheiner *et al.*, 2017). En effet, contrairement aux macrolides on n'observe pas de corrélation clinico-bactériologique avec le métronidazole et malgré des taux de résistance élevés, cette dernière n'entraînerait qu'une diminution d'environ 25% de l'éradication (Maria Pina Dore *et al.*, 2000; Megraud and 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).

Par contre, la résistance à la lévofloxacine est extrêmement faible, une seule souche avec une mutation Asn87Thr a été retrouvée. Généralement la résistance à la lévofloxacine est faible à l'échelle mondiale (Ghotaslou, 2015) à l'exception de certaines régions: 15.4% en France (Ducournau *et al.*, 2016), 22.1% en Italie, 50% au Congo (Ontsiira Ngoyi *et al.*, 2015) et 34.5% en Chine (Thung *et al.*, 2016). La hausse de la résistance à la lévofloxacine décrite ces dernières années peut être expliquée par l'augmentation de l'utilisation des quinolones pour l'éradication de *H. pylori* suite à l'explosion de la résistance à la clarithromycine ainsi que leur utilisation pour le traitement des infections urinaires notamment (De Francesco *et al.*, 2010). Encore une fois, la résistance aux fluoroquinolones reflète leur utilisation. Malgré un taux de résistance élevé chez les adultes au Portugal, les enfants qui n'ont pas été traités avec des quinolones n'abritent pas de souches résistantes (Cabrita *et al.*, 2000). Aux Pays-Bas, un taux de résistance de 4,7% était rapporté avec la trovafloxacine, un antibiotique pas encore présent sur le marché néerlandais. Cette constatation suggère une résistance croisée entre les différentes molécules de cette famille d'antibiotique et indique également le risque élevé de sélection de souches résistantes susceptibles de compromettre les nouvelles fluoroquinolones prometteuses (Megraud, 2004; Thung *et al.*, 2016). Bien que la lévofloxacine ne soit pas disponible en Algérie et que les autres quinolones ne soient que très rarement incluses dans l'éradication de *H. pylori*, leur utilisation dans le traitement d'autres infections implique la surveillance d'une possible émergence de cette résistance.

Discussion

Aucune résistance à l'amoxicilline, à la tétracycline ou à la rifampicine n'a été détectée dans cette étude. 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 (Megraud, 2004)

L'obtention du profil antibiotique d'une souche de *H. pylori* en Algérie est difficile car, peu de laboratoires effectuent la culture de la bactérie ou la PCR de détection des mutations conférant la résistance aux antibiotiques. Les cliniciens se réfèrent majoritairement aux résultats d'anatomopathologie pour la mise en évidence de l'infection à *H. pylori* et prescrivent un traitement probabiliste sur la base des peu de données disponibles et pas souvent actualisées sur la résistance aux antibiotiques. Dans le cadre de cette étude et de la collaboration avec les services de gastroentérologie des hôpitaux de Bab El Oued et de Beni Messous, les cliniciens de ces deux services, qui n'ont pas accès à la culture de *H. pylori* au niveau des laboratoires de leurs hôpitaux, ont pu recevoir les résultats de la culture et le profil antibiotiques des souches de *H. pylori* des patients recrutés complétés ultérieurement par les résultats de la PCR.

Vue les données des études algériennes antérieures et des résultats de notre étude et selon les dernières recommandations de Maastricht V, le traitement d'éradication de *H. pylori* doit être adapté en Algérie. Le bismuth n'étant pas disponible, la quadruple thérapie concomitante serait le traitement d'éradication à privilégier en première intention.

Concernant les patients de pédiatrie, la résistance aux antibiotiques est faible mais il est important de souligner que le nombre de patients n'est pas très important et peut être pas représentatif de la population générale. Aucune résistance primaire et une seule résistance secondaire à la clarithromycine a été détectée. Avec l'augmentation de la résistance chez les adultes, le taux de résistance à la clarithromycine est à surveiller en pédiatrie avec des études incluant plus de patients. Peu d'études à grande échelle sur la résistance aux antibiotiques chez les enfants sont disponibles. Une étude pédiatrique multicentrique européenne rapporte une résistance primaire et secondaire à la clarithromycine de 20 et 42% respectivement (Koletzko *et al.*, 2006). Comme pour les adultes, le facteur de risque essentiel pour la résistance à la clarithromycine est la consommation précédente de macrolides de plus en plus prescrits chez les enfants pour le traitement des infections respiratoires (Megraud, 2004). Une étude dans les familles japonaises a démontré que malgré le fait que les souches des enfants étaient habituellement identiques par tests moléculaires à celles des parents, les souches des enfants sont souvent devenues résistantes à la clarithromycine après un traitement par clarithromycine (Taneike *et al.*, 2002).

La présence et l'expression des facteurs de virulence de *H. pylori* jouent un rôle central dans l'évolution des pathologies gastroduodénales liées à l'infection. 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. Les souches *cagA* positives sont associées aux pathologies les plus sévères comme le cancer gastrique (Kuipers, 1999). Dans cette étude, 46% des échantillons ont un statut *cagPAI*

positif, un taux similaire à ceux rapportés dans les pays du pourtour méditerranéen : 44% dans l'étude algérienne de Djennane *et al.* (résultats non publiés), 42.3% au Maroc (Boukhris *et al.*, 2012), 61.6% en Tunisie (Khansa Ben Mansour *et al.*, 2010b) et 47.7% en Espagne (González *et al.*, 2011). Mais la prévalence de *CagA* varie selon les régions géographiques. Elle varie en moyenne entre 60 à 70% en Europe et aux USA et dépasse les 90% en Asie de l'Est (Japon, Corée et Chine) (Matsunari *et al.*, 2012). Dans les pays occidentaux, les individus infectés avec les souches *cagA* positives de *H. pylori* ont à un risque plus élevé d'ulcère ou de cancer gastrique que ceux infectés par des souches *cagA* négatives (van Doorn *et al.*, 1998b ; Matos *et al.*, 2013; Hatakeyama, 2014). Une étude a rapporté que le cancer gastrique et d'autres néoplasmes malins ont eu lieu dans certaines des souris transgéniques qui avaient une protéine *CagA* artificiellement introduite démontrant le pouvoir carcinogène de la protéine *CagA* (Ohnishi *et al.*, 2008). Cependant en Asie de l'est, la plupart des souches de *H. pylori* possèdent le gène *cagA* indépendamment de maladie, la différence pathogène en Asie de l'Est est, par conséquent, difficile à expliquer simplement en ce qui concerne la présence ou l'absence du gène *cagA* seul (Azuma, 2004; Yamaoka, 2010). Egalement, les personnes infectées par des souches *H. pylori cagA* positives n'induisent pas toujours la production d'anticorps sériques *CagA* et dans la population *H. pylori* négative, la présence d'anticorps sérique *CagA* augmente le risque de cancer gastrique. L'anticorps *CagA* peut rester positif pendant une période de temps plus longue que l'anticorps anti *H. pylori* et a été lié au cancer gastrique chez les populations positives et négatives à *H. pylori* dans les pays d'Asie de l'Est (Shimoyama *et al.*, 1998; Yamaoka *et al.*, 1999; Shiota *et al.*, 2010b). En plus de l'expression de *cagA*, les individus infectés par des souches exprimant *cagA* de type Est-asiatique (EPIYA-D) présentent un risque accru d'ulcère ou de cancer gastrique par rapport à ceux infectés par des souches exprimant *cagA* de type occidental (EPIYA-A, EPIYA-B et EPIYA-C) (Jones *et al.*, 2009). De plus, dans les pays occidentaux, l'incidence du cancer gastrique est plus élevée chez les patients infectés par des souches portant plusieurs répétitions EPIYA-C par rapport à celles infectées par des souches avec une seule répétition (Argent *et al.*, 2004; ; Xia *et al.*, 2010; Batista *et al.*, 2011). Dans notre étude, 55% des souches étaient de type EPIYA-C.

Toutes les souches de *H. pylori* expriment *vacA*. La toxicité dépend de la structure des différentes régions *s*, *m*, *i* et *d*. La distribution des allèles *s1* et *s2* était équivalente, 50% pour chaque allèle avec une prédominance à 82% de *s1b*. Les allèles *m2*, *i2* et *d2* étaient majoritaires avec 78%, 69% et 69% respectivement. Ces résultats sont proches des résultats retrouvés dans l'étude Algérienne de Djennane *et al.* (*s1* et *m2* à 53% et 60% respectivement), au Maroc (prédominance de *s2* et *m2* avec 50.2% et 57.6% respectivement) (Boukhris *et al.*, 2012) et en Tunisie (prédominance de *s2* et *m2* avec 45.6% et 58% respectivement, *s1b* représentait 77%) (Khansa Ben Mansour *et al.*, 2010b). De nombreuses études ont démontré que les personnes infectées par les souches *vacA s1* ou *m1* présentent un risque accru d'ulcère gastroduodénale ou de cancer gastrique par rapport aux souches *s2* ou *m2* (Atherton *et al.*, 1995; Sugimoto and Yamaoka, 2009; González *et al.*, 2011). Le sous-type *s1b* est le plus prédominant en Afrique (Sugimoto and Yamaoka, 2009) mais l'association des sous-types *s1a*, *s1b* et *s1c* avec les pathologies gastriques n'est pas cohérente dans différents pays. Le rôle du statut de la région *i* ou de la région *d* est aussi controversé (Rhead *et al.*, 2007; Ogiwara *et al.*, 2009). À l'heure actuelle, l'allèle *m* peut être le meilleur marqueur général du cancer gastrique (Shiota *et al.*, 2013). Si l'on considère les allèles *s* et *m* combinés, 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). Cette étude rapporte que les souches *vacA s2m2*, les moins virulentes, étaient les plus prédominantes 47%, un résultat également similaire aux autres études Algériennes, Marocaines et Tunisiennes précédemment citées : 44, 51 et 45.6% respectivement (Khansa Ben Mansour *et al.*, 2010b ; Boukhris *et al.*, 2012).

Dans cette étude, 19% des échantillons étaient *dupA* positif. Un statut *dupA* positif se traduisait par des PCR positives pour les trois gènes *jhp0917*, *jhp0918*, et *dupA*. En effet, différents travaux ont indiqué que certaines souches présentent une mutation dans *dupA*, qui a créé un codon d'arrêt prématuré. Dans la souche J99, *jhp0917* et *jhp0918* sont des gènes distincts. *jhp0917* est homologue à la fin de 5' de *virB4* mais n'a pas la fin de 3', alors que *jhp0918* est homologue à la fin de 3' de *virB4* mais n'a pas la fin de 5'. Cependant, dans de nombreuses souches de *H. pylori* possédant à la fois *jhp0917* et *jhp0918*, il existe une insertion de 1 pb (C ou T) après la position 1385, ce qui entraîne un changement de cadre conduisant à un gène continu, nommé *dupA*, homologue à la *virB4* complète. Par conséquent, la présence de *jhp0917*, *jhp0918* et l'insertion de 1bp après la position 1385 sont toutes requises pour la formation de *dupA* (Lu *et al.*, 2005; Hussein *et al.*, 2010; Queiroz *et al.*, 2011). *dupA* est le premier facteur génétique de *H. pylori* qui était suggéré pour être associé à une susceptibilité différentielle à l'ulcère duodéal et au cancer gastrique, et peut donc être considéré comme un marqueur de virulence spécifique à l'ulcère duodéal (Lu *et al.*, 2005). Plusieurs études dans différentes zones géographiques vont dans ce sens (Gomes *et al.*, 2008; Hussein, 2010; Hussein *et al.*, 2010; Shiota *et al.*, 2010a). Cependant, d'autres études notamment au Japon ne retrouvent pas la même relation entre *dupA* et pathologies gastroduodénales (Nguyen *et al.*, 2010).

Le dernier facteur de virulence recherché dans cette étude est *babA2* pour lequel 19% des échantillons étaient positifs. La distribution géographique de *babA2* est variable (Mizushima *et al.*, 2001; Gatti *et al.*, 2006). Les analyses récentes de *babA2* comme marqueur de virulence ont montré des données conflictuelles sur l'utilité de l'expression de *babA2* dans la prédiction des résultats cliniques, ce qui dépend très probablement de l'origine géographique des souches de *H. pylori*. Dans les pays occidentaux, l'expression de *BabA2* contribue à l'augmentation du risque d'ulcères peptiques et de cancer gastrique (Azevedo *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2013). Toutefois, l'existence de *BabA* n'est pas corrélée aux maladies gastriques chez les Asiatiques (Chomvarin *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2013). De plus, certaines souches ne portent pas de *babA2* dans leur génome ou sont déficientes en *BabA* résultant de la mutation, mais la bactérie exprime encore une *BabB/A* chimérique, qui a la capacité de se lier à l'antigène Lewis b, par recombinaison génétique de *babA1* et de *babB* dans certains conditions (Bäckström *et al.*, 2004; Sheu *et al.*, 2012).

En plus des facteurs environnementaux et de la réponse immunitaire de l'hôte, c'est bien la combinaison de plusieurs facteurs de virulence qui peuvent induire à des pathologies encore plus sévères. Nos résultats indiquent que le génotype le plus fréquent est le moins virulent *cagPAI-*, *vacAs2m2*, *dupA-*, *babA2-* avec 22 souches (27%) suivi du génotype *cagPAI+*, *vacAs1m2*, *dupA-*, *babA2-* avec 13 souches (16%) et seule 2 (2.5%) souches combinaient les facteurs les plus virulents *cagPAI+*, *vacAs1m1*, *dupA+*, *babA2+*. L'étude de Djennane *et al.* qui n'avait considéré que *cagA* et *vacA* a retrouvé majoritairement le génotype

cagA-, *vacAs2m2* avec 14 échantillons sur 43 testés. Ces résultats peuvent expliquer, en partie, 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*. Plusieurs études ont démontré que l'association des facteurs de virulence comme *cagA* et *vacA s1* (Arents *et al.*, 2001) ou *babA2* associée à qui est associé à l'ulcère duodénale et au cancer gastrique, et lorsqu'il est associée à *cagA* et *vacA s1*, il est associé à un risque encore plus élevé de développer une pathologie plus sévère (Gerhard *et al.*, 1999).

En raison de la forte prédominance dans notre effectif de patients des cas de gastrite (70%) par rapport aux autres pathologies (ulcère, lymphome...) et de l'absence des résultats d'anatomopathologie pour l'ensemble des patients, nous n'avons pu correctement analyser et discuter la corrélation entre les facteurs de virulence et les manifestations pathologiques.

L'analyse phylogénétique par MLST des 49 souches issues de 44 patients (38 adultes et 6 enfants) a révélé la présence de 2 haplotypes : hpEurope et hpNEAfrica avec une forte prédominance de l'haplotype hpEurope (40 souches). Ces résultats sont en accord avec la localisation nord-africaine de l'Algérie. Cette distribution est le résultat des migrations humaines depuis le paléolithique illustrée par les étude de Falush et Moodley (Fig. 44) (Falush *et al.*, 2003b; Moodley *et al.*, 2012) et le brassage plus récent des populations nord africaines et sud européennes avec l'histoire commune de ces deux régions. En effet, les souches de *H. pylori* peuvent être divisées en sept populations sur la base d'associations géographiques et désignées comme suit: hpEurope, hpEastAsia, hpAfrica1, hpAfrica2, hpAsia2, hpNEAfrica et hpSahul. hpEurope comprend presque toutes les souches de *H. pylori* isolées chez des Européens, et également des personnes de pays colonisés par des Européens. HpAfrica1 comprend deux sous-populations, hspWAfrica (Afrique de l'Ouest, Sud-Africains et Afro-Américains) et hspSAfrica (Sud-Africains). HpAfrica2 est très distinct et n'a été isolé qu'en Afrique du sud. hpNEAfrica est prédominante dans les isolats de l'Afrique du Nord-est. hpEastAsia est fréquent dans les isolats de *H. pylori* d'Asie de l'Est et comprend trois sous-populations, hspMaori (Polynésiens, Mélanésiens et Tadjiks Indigènes), hspAmerind (Amerindiens) et hspEAsia (East Asiatiques). Les souches hpAsia2 ont été isolées dans le sud, le sud-est et l'Asie centrale (Falush *et al.*, 2003b; Linz *et al.*, 2007; Moodley *et al.*, 2012). Des auteurs rapportent que l'analyse MLST donne des informations plus détaillées sur la structure de la population humaine et des migrations que d'autres méthodes génétiques comme celles utilisant l'ADN mitochondrial ou les microsatellites humain (Wirth *et al.*, 2004). Parmi les 40 souches hpEurope, 14 (28%) étaient une mosaïque entre hpEurope, hpNEAfrica et hpAfrica1 témoignant de la recombinaison entre hpEurope et les populations africaines de *H. pylori*. Plusieurs études ont mis en évidence la recombinaison génétique de *H. pylori* surtout lors des infections mixtes (Kennemann *et al.*, 2011; Krebes *et al.*, 2014; Farzi *et al.*, 2015) . Une étude de Kennemann *et al.* menée sur 4 Colombiens infectés par *H. pylori* et un volontaires volontairement infecté par la bactérie avec un intervalle d'isolement allant jusqu'à 16 ans, a suggéré que *H. pylori* prend d'abord de longs fragments d'ADN, qui deviennent par la suite partiellement intégrés dans de multiples pièces plus courtes, puis a également indiqué que le génome de *H. pylori* est stable en l'absence d'infection mixte (Kennemann *et al.*, 2011). Le nombre important de souches mosaïques retrouvées dans notre

étude n'est pas étonnant dans un pays ayant subi un brassage de population important durant son histoire, et où les infections mixtes sont fréquentes.

En plus du typage géographique, la MLST nous avait permis de privilégier la thèse de l'échec du traitement d'éradication de *H. pylori* plutôt que la réinfection chez une patiente atteinte d'un lymphome. Cette patiente avait subi plusieurs thérapies d'éradication, et la culture s'est révélée positive lors de deux contrôles d'éradication. Ces souches étaient de même profil antibiotique et résistantes à la clarithromycine et au métronidazole lors des deux fibroscopies. Les 4 souches (une souche antrale et une souche fundique isolée à chaque fibroscopie) étaient identiques par RAPD. L'analyse MLST d'une souche isolée de chaque fibroscopie a confirmé que la patiente était toujours infectée par la même souche de *H. pylori* malgré plusieurs tentatives d'éradication de la bactérie.

Des relations entre la phylogénie des gènes de ménage et *cagPAI* ou la phylogénie de *VacA* ont été rapportées (Gangwer *et al.*, 2010; Olbermann *et al.*, 2010). La phylogénie de la plupart des gènes *cagPAI* était similaire à celle de la MLST, ce qui indique que *cagPAI* a probablement été acquis une seule fois par *H. pylori* et sa diversité génétique reflète l'isolement par la distance qui a façonné cette espèce bactérienne quand l'homme modernes a migré hors d'Afrique (Olbermann *et al.*, 2010). D'autre part, la topologie globale de l'arbre *VacA* ne correspondait pas toujours à celle de la MLST (Gangwer *et al.*, 2010). En outre, l'enracinement de l'arbre *VacA* avec des séquences de hors-groupe de *Helicobacter acinonychis* étroitement lié a révélé que l'ascendance de *VacA* est différente de l'origine africaine. Plus intéressant, la distribution de l'incidence du cancer gastrique est étroitement liée à ces groupes de *H. pylori* par MLST (Suzuki *et al.*, 2012). Une forte incidence de cancer gastrique a été observée dans les régions dominées par les souches hpEastAsia, en particulier hspEAsia. D'autre part, l'incidence du cancer gastrique est très faible en Afrique, où la plupart des souches sont hpNEAfrica, hpAfrica1 ou hpAfrica2, et en Asie du Sud, où la plupart des souches sont hpAsia2. Dans l'ensemble, les énigmes africaines et asiatiques pourraient être expliquées, au moins en partie, par les différents génotypes de *H. pylori* circulant dans différentes zones géographiques (Suzuki *et al.*, 2012). Une étude sur les souches *cagA* positives en Colombie a montré que toutes les souches des régions à risque élevé de cancer gastrique sont hpEurope alors que hpEurope et hpAfrica1 coexistent dans les régions à faible risque (de Sablet *et al.*, 2011). En outre, les sujets infectés par les souches hpEurope de *H. pylori* ont montré des scores histopathologiques plus élevés que ceux infectés par les souches hpAfrica1. Ils ont conclu que l'origine phylogéographique par MLST peut être utilisée comme prédicteur du risque de cancer gastrique. Néanmoins, toutes les souches *cagA* négatives appartenaient à hpEurope dans leur étude. Les souches hpEurope sans présence de *cagA* peuvent être moins virulentes. Ainsi, le génotype *cagA* plutôt que l'origine phylogéographique est un meilleur facteur prédictif du cancer gastrique (Shiota *et al.*, 2011).

Dans cette étude, nous avons mis en évidence la double colonisation de *H. pylori* d'un même patient de différentes façons. Pour des raisons non seulement techniques mais aussi financières, les différentes méthodes n'ont pas pu être réalisées sur la totalité des échantillons.

Le résultat total de 14% de patients infectés par une double population de *H. pylori* est certainement inférieur à la réalité. En effet, Certaines techniques comme la RAPD n'a été effectuée que sur 18 patients, sa réalisation sur un nombre plus important aurait probablement permis de détecter plus de double colonisations. La PCR en temps réel a détecté une double colonisation sensible et résistante à la clarithromycine chez 10% des patients ce qui peut avoir une incidence sur l'éradication. L'antibiogramme a également contribué à différencier des souches sensibles et résistantes au métronidazole. La RAPD a révélé que la souche de *H. pylori* colonisant l'antra était différente de la souche colonisant le fundus chez 4 patients. Les souches de trois de ces patients avaient le même profil antibiotique, la différence n'aurait pu être détectée par l'antibiogramme seul. L'application de plusieurs techniques est parfois nécessaire pour mettre en évidence les infections par de multiples souches de *H. pylori*. Le résultat obtenu pour ces 4 patients a été comparé avec les résultats obtenus par MLST. La différence a été confirmée pour 3 patients : Deux était co-infecté avec 2 souches différentes hpEurope et un autre était co-infecté avec une souche hpNEAffrica et une souche hpEurope. Pour le 4^{ème} patient, les souches antrales et fundiques étaient identiques par MLST. La différence génétique entre elles concernait probablement d'autres parties du génome bactérien que les 7 gènes de ménages séquencés pour la MLST. Enfin, les différentes PCR de détection des facteurs de virulences à partir des souches de *H. pylori* et directement à partir des biopsies gastriques ont aussi révélé ou confirmé la co-infection par des souches différentes. Les cas d'infections multiples sont très fréquents et serait plus importants dans les pays à forte prévalence (Kibria *et al.*, 2015; Ben Mansour *et al.*, 2016). Une étude franco-tunisienne rapporte un taux d'infection multiple de 48% en Tunisie, pays à forte prévalence, contre 5% en France, pays à faible prévalence (Ben Mansour *et al.*, 2016). Ces infections multiples facilitent les transferts génétiques entre les souches et contribuent à la diversité génétique de la bactérie (Farzi *et al.*, 2015; Kennemann *et al.*, 2011; Krebs *et al.*, 2014). Plusieurs auteurs estiment que la diminution de la prévalence de *H. pylori* dans certains pays et par conséquent la diminution du taux d'infections multiples entrainerait un déclin de la diversité génétique dans ces régions (Kennemann *et al.*, 2011; Krebs *et al.*, 2014; Ben Mansour *et al.*, 2016). Une étude au Bangladesh suggère que la colonisation chronique par plusieurs souches de *H. pylori* facilite le transfert de gènes de la virulence à l'horizontale et contribue au développement des symptômes des maladies gastriques (Kibria *et al.*, 2015).

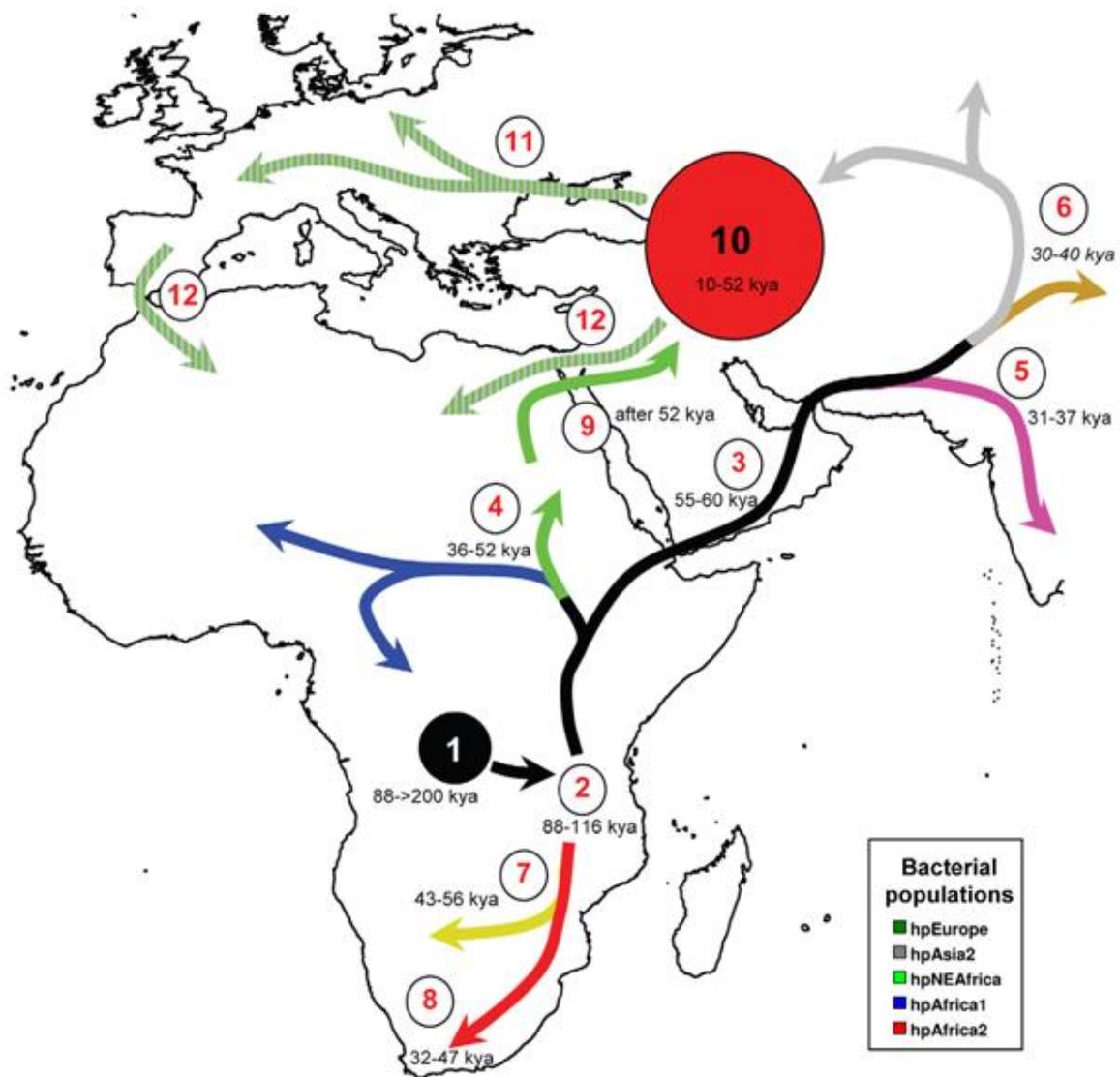


Figure 44: La reconstruction chronologique des événements majeurs de la population se produisant au cours de l'intime association Homme - *H. pylori*

Les lignes noires indiquent des populations indifférenciées et toutes les autres lignes sont codées par couleur selon la population comme indiqué en bas à droite. La séquence des événements est la suivante: 1) acquisition initiale de *H. pylori* par un ancêtre humain; 2) Divergence de *H. pylori* en deux super-lignées; 3) Première migration réussie des humains modernes en dehors de l'Afrique [7,42] via la route du sud [57]; 4) divergence de *H. pylori* en hpAfrica1 et hpNEAfrica avec migration vers l'est (hpNEAfrica) et vers l'ouest (hpAfrica1); 5) Divergence de *H. pylori* hors d'Afrique en hpSahul [8] et 6) hpAsia2 et hpEastAsia; 7) Saut d'hôte de San à grands félins donnant naissance à *H. acinonychis*. 8) Migration vers le sud de San [16] portant l'ancêtre de hpAfrica2; 9) Deuxième migration réussie hors d'Afrique par le Levant; 10) L'hybridation de l'AE1 du centre et du sud-ouest de l'Asie et de l'AE2 du nord-est de l'Afrique [7] au Moyen-Orient ou en Asie de l'Ouest, ce qui a donné lieu à hpEurope; 11) Répartition des bactéries hpEurope en Europe; 12) Retour de la migration du Moyen-Orient [75,76] et de l'Espagne [74] diffusant hpEurope vers l'Afrique du Nord. Les dates en italique représentent les estimations obtenues à partir de sources autres que *H. pylori*.

CONCLUSION

VI. Conclusion

Plus de 35 ans après sa découverte, *H. Pylori* reste un problème de santé publique surtout chez les populations à risque. L'objectif de ce travail était de faire un état des lieux de l'infection à *H. pylori* à Alger pour permettre une meilleure connaissance de l'épidémiologie locale de l'infection et une meilleure prise en charge des patients.

Cette étude a permis dans un premier temps d'optimiser les conditions de la culture de *H. pylori* qui n'était que depuis peu pratiquée au niveau de l'unité de microbiologie de l'hôpital Bologhine, et d'établir un diagnostic microbiologique permettant aux cliniciens des services collaborateurs de bénéficier des résultats de la culture avec antibiogramme de *H. pylori*. Dans un deuxième temps, l'étude a retrouvé, comme envisagé au début, une forte prévalence de l'infection dans la population algéroise (56% par PCR) mais qui semble en diminution ces dernières années. Chose étonnante, La prévalence de l'infection dans le groupe des patients ayant déjà suivi un traitement d'éradication de *H. pylori* est élevée et surtout équivalente à celle des patients non traités. La résistance importante retrouvée pour la clarithromycine et le métronidazole (22 et 42% de résistance primaire respectivement) peut en partie expliquer cette situation. Ces taux de résistance élevés aux antibiotiques nécessitent d'adapter le schéma thérapeutique d'éradication de *H. pylori* selon les dernières recommandations de Maastricht V. La recherche d'alternatives aux thérapies classiques est le défi actuel, et la mise au point d'un vaccin contre *H. pylori* est une voie prometteuse ; mais en attendant, la rationalisation et le bon usage des antibiotiques disponibles restent le meilleur rempart aux échecs thérapeutiques.

Le génotypage des facteurs de virulence montre que les souches avec les génotypes les moins virulents sont majoritaires mais l'une des limites de cette étude a été d'établir l'impact des facteurs de virulence sur les lésions de la muqueuse gastrique. Le typage phylogéographique par MLST effectué pour la première fois en Algérie, retrouve une prédominance de souches d'origine Européenne : 40 souches hpEurope contre 9 souches hpNEAfrica. Par ailleurs, 14 souches hpEurope sont de type mosaïque, le résultat d'une recombinaison génétique de souches Européennes (hpEurope) et de souches Africaines (hpNEAfrica et hpAfrica1). Des résultats qui sont en accord avec l'histoire et la localisation géographique de l'Algérie.

Les résultats de pédiatrie avec un effectif réduit ne permettent pas de tirer des conclusions représentatives de l'infection à *H. pylori* chez l'enfant. Néanmoins, les souches isolées chez les enfants sont plus sensibles aux antibiotiques que celles isolées chez les adultes. La connaissance de l'infection à *H. pylori* en pédiatrie est importante pour le suivi de l'évolution de l'infection qui est acquise généralement durant l'enfance.

L'étude a également mis en évidence l'importance des techniques de biologie moléculaires pour leur sensibilité et pour la détection des infections mixtes (chez 14% des patients). Des techniques qu'il serait intéressant de mettre en place dans un pays à prévalence élevée de l'infection à *H. pylori* ; sans pour autant abandonner la culture qui est la seule

Conclusion

technique qui permet l'isolement et la conservation des souches pour des études plus approfondies dans le futur.

Les résultats de cette étude doivent être complétés par d'autres études avec des effectifs plus importants et dans différentes régions du pays afin d'établir un bilan plus global sur l'infection à *H. pylori* et sa résistance aux antibiotiques en Algérie. Un travail qui doit être réalisé en collaboration étroite entre microbiologistes, gastroentérologues et anatomopathologistes.

BIBLIOGRAPHIE

VII. Bibliographie

1. Achtman, M., Azuma, T., Berg, D.E., Ito, Y., Morelli, G., Pan, Z.-J., Suerbaum, S., Thompson, S.A., Van Der Ende, A., Van Doorn, L.-J., 1999. Recombination and clonal groupings within *Helicobacter pylori* from different geographical regions. *Mol. Microbiol.* 32, 459–470.
2. 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.
3. Akopyanz, N., Bukanov, N.O., Westblom, T.U., Kresovich, S., Berg, D.E., 1992. DNA diversity among clinical isolates of *Helicobacter pylori* detected by PCR-based RAPD fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 20, 5137–5142.
4. Al Qabandi, A., Mustafa, A.S., Siddique, I., Khajah, A.K., Mada, J.P., Junaid, T.A., 2005. Distribution of *vacA* and *cagA* genotypes of *Helicobacter pylori* in Kuwait. *Acta Trop.* 93, 283–288.
5. Alarcón, T., Domingo, D., Prieto, N., López-Brea, M., 2000. PCR using 3'-mismatched primers to detect A2142C mutation in 23S rRNA conferring resistance to clarithromycin in *Helicobacter pylori* clinical isolates. *J. Clin. Microbiol.* 38, 923–925.
6. Albert, T.J., Dailidienė, D., Dailidė, G., Norton, J.E., Kalia, A., Richmond, T.A., Molla, M., Singh, J., Green, R.D., Berg, D.E., 2005. Mutation discovery in bacterial genomes: metronidazole resistance in *Helicobacter pylori*. *Nat. Methods* 2, 951–953.
7. Alborzi, A., Soltani, J., Pourabbas, B., Oboodi, B., Haghghat, M., Hayati, M., Rashidi, M., 2006. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection in children (south of Iran). *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 54, 259–261. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2005.10.012
8. Allahverdiyev, A.M., Bagirova, M., Caliskan, R., Tokman, H.B., Aliyeva, H., Unal, G., Oztel, O.N., Abamor, E.S., Toptas, H., Yuksel, P., Kalayci, F., Aslan, M., Erzin, Y., Bal, K., Kocazeybek, B.S., 2015. Isolation and diagnosis of *Helicobacter pylori* by a new method: Microcapillary culture. *World J. Gastroenterol. WJG* 21, 2622–2628. doi:10.3748/wjg.v21.i9.2622
9. Allison, C.C., Kufer, T.A., Kremmer, E., Kaparakis, M., Ferrero, R.L., 2009. *Helicobacter pylori* induces MAPK phosphorylation and AP-1 activation via a NOD1-dependent mechanism. *J. Immunol.* 183, 8099–8109.
10. Alm, R.A., Bina, J., Andrews, B.M., Doig, P., Hancock, R.E., others, 2000. Comparative genomics of *Helicobacter pylori*: analysis of the outer membrane protein families. *Infect. Immun.* 68, 4155–4168.
11. 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., Carmel, G., others, 1999. Correction: Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* 397, 719–719.
12. Alm, R.A., Noonan, B., 2001. *The Genome*. ASM Press.

Bibliographie

13. Amieva, M.R., Vogelmann, R., Covacci, A., Tompkins, L.S., Nelson, W.J., Falkow, S., 2003. Disruption of the epithelial apical-junctional complex by *Helicobacter pylori* CagA. *Science* 300, 1430–1434. doi:10.1126/science.1081919
14. Andreson, H., Loivukene, K., Sillakivi, T., Maaros, H.-I., Ustav, M., Peetsalu, A., Mikelsaar, M., 2002. Association of *cagA* and *vacA* genotypes of *Helicobacter pylori* with gastric diseases in Estonia. *J. Clin. Microbiol.* 40, 298–300.
15. Andrzejewska, J., Lee, S.K., Olbermann, P., Lotzing, N., Katzowitsch, E., Linz, B., Achtman, M., Kado, C.I., Suerbaum, S., Josenhans, C., 2006. Characterization of the pilin ortholog of the *Helicobacter pylori* type IV *cag* pathogenicity apparatus, a surface-associated protein expressed during infection. *J. Bacteriol.* 188, 5865–5877. doi:10.1128/JB.00060-06
16. Annibale, B., Capurso, G., Lahner, E., Passi, S., Ricci, R., Maggio, F., Delle Fave, G., 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.
17. 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. doi:10.1084/jem.20030381
18. 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.
19. 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.
20. Argent, R.H., Thomas, R.J., Letley, D.P., Rittig, M.G., Hardie, K.R., Atherton, J.C., 2008. Functional association between the *Helicobacter pylori* virulence factors *VacA* and *CagA*. *J. Med. Microbiol.* 57, 145–150. doi:10.1099/jmm.0.47465-0
21. 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.
22. Arnold, I.C., Zigova, Z., Holden, M., Lawley, T.D., Rad, R., Dougan, G., Falkow, S., Bentley, S.D., Müller, A., 2011. Comparative whole genome sequence analysis of the carcinogenic bacterial model pathogen *Helicobacter felis*. *Genome Biol. Evol.* 3, 302–308.
23. Asahi, M., Azuma, T., Ito, S., Ito, Y., Suto, H., Nagai, Y., Tsubokawa, M., Tohyama, Y., Maeda, S., Omata, M., Suzuki, T., Sasakawa, C., 2000. *Helicobacter pylori* CagA protein can be tyrosine phosphorylated in gastric epithelial cells. *J. Exp. Med.* 191, 593–602.
24. 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
25. 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.
 26. Atherton, J.C., 2006. The pathogenesis of *Helicobacter pylori*-induced gastro-duodenal diseases. *Annu. Rev. Pathol.* 1, 63–96. doi:10.1146/annurev.pathol.1.110304.100125
 27. 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.
 28. 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.
 29. Azevedo, M., Eriksson, S., Mendes, N., Serpa, J., Figueiredo, C., Resende, L.P., Ruvoën-Clouet, N., Haas, R., Borén, T., Le Pendu, J., others, 2008. Infection by *Helicobacter pylori* expressing the BabA adhesin is influenced by the secretor phenotype. *J. Pathol.* 215, 308–316.
 30. Azuma, T., 2004. *Helicobacter pylori* CagA protein variation associated with gastric cancer in Asia. *J. Gastroenterol.* 39, 97–103.
 31. Backert, S., Meyer, T.F., 2006. Type IV secretion systems and their effectors in bacterial pathogenesis. *Curr. Opin. Microbiol.* 9, 207–217. doi:10.1016/j.mib.2006.02.008
 32. Backert, S., Moese, S., Selbach, M., Brinkmann, V., Meyer, T.F., 2001. Phosphorylation of tyrosine 972 of the *Helicobacter pylori* CagA protein is essential for induction of a scattering phenotype in gastric epithelial cells. *Mol. Microbiol.* 42, 631–644.
 33. Backert, S., Ziska, E., Brinkmann, V., Zimny-Arndt, U., Fauconnier, A., Jungblut, P.R., Naumann, M., Meyer, T.F., 2000. Translocation of the *Helicobacter pylori* CagA protein in gastric epithelial cells by a type IV secretion apparatus. *Cell. Microbiol.* 2, 155–164.
 34. Bäckhed, F., Rokbi, B., Torstensson, E., Zhao, Y., Nilsson, C., Seguin, D., Normark, S., Buchan, A.M.J., Richter-Dahlfors, A., 2003. Gastric mucosal recognition of *Helicobacter pylori* is independent of Toll-like receptor 4. *J. Infect. Dis.* 187, 829–836. doi:10.1086/367896
 35. Bäckström, A., Lundberg, C., Kersulyte, D., Berg, D.E., Borén, T., Arnqvist, A., 2004. Metastability of *Helicobacter pylori* bab adhesin genes and dynamics in Lewis b antigen binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 16923–16928.
 36. Bagnoli, F., Buti, L., Tompkins, L., Covacci, A., Amieva, M.R., 2005. *Helicobacter pylori* CagA induces a transition from polarized to invasive phenotypes in MDCK cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 16339–16344. doi:10.1073/pnas.0502598102

37. Bai, Y., Zhang, Y.L., Wang, J.D., Lin, H.J., Zhang, Z.S., Zhou, D.Y., 2002. Conservative region of the genes encoding four adhesins of *Helicobacter pylori*: cloning, sequence analysis and biological information analysis. *J. First Med. Coll. PLA* 22, 869–871.
38. Baik, S.-C., Kim, K.-M., Song, S.-M., Kim, D.-S., Jun, J.-S., Lee, S.-G., Song, J.-Y., Park, J.-U., Kang, H.-L., Lee, W.-K., others, 2004. Proteomic analysis of the sarcosine-insoluble outer membrane fraction of *Helicobacter pylori* strain 26695. *J. Bacteriol.* 186, 949–955.
39. Baltus, D.A., Amieva, M.R., Covacci, A., Lowe, T.M., Merrell, D.S., Ottemann, K.M., Stein, M., Salama, N.R., Guillemin, K., 2009. The complete genome sequence of *Helicobacter pylori* strain G27. *J. Bacteriol.* 191, 447–448.
40. Batista, S.A., Rocha, G.A., Rocha, A.M., Saraiva, I.E., Cabral, M.M., Oliveira, R.C., Queiroz, D.M., 2011. Higher number of *Helicobacter pylori* CagA EPIYA C phosphorylation sites increases the risk of gastric cancer, but not duodenal ulcer. *BMC Microbiol.* 11, 61.
41. Bazzoli, F., Cecchini, L., Corvaglia, L., Dall’Antonia, M., De Giacomo, C., Fossi, S., Casali, L.G., Gullini, S., Lazzari, R., Leggeri, G., others, 2000. Validation of the ¹³C-urea breath test for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in children: a multicenter study. *Am. J. Gastroenterol.* 95, 646–650.
42. Benajah, D.A., Lahbabi, M., Alaoui, S., El Rhazi, K., El Abkari, M., Nejari, C., Amarti, A., Bennani, B., Mahmoud, M., Ibrahim, S.A., 2013. Prevalence of *Helicobacter pylori* and its recurrence after successful eradication in a developing nation (Morocco). *Clin. Res. Hepatol. Gastroenterol.* 37, 519–526. doi:10.1016/j.clinre.2013.02.003
43. Ben Mansour, K., Fendri, C., Battikh, H., Garnier, M., Zribi, M., Jilzi, 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
44. Bizzozero, G., 1893. Ueber die schlauchförmigen Drüsen des Magendarmkanals und die Beziehungen ihres Epithels zu dem Oberflächenepithel der Schleimhaut Dritte Mittheilung. *Arch. Für Mikrosk. Anat.* 42, 82–152.
45. Bochenek, W.J., Peters, S., Fraga, P.D., Wang, W., Mack, M.E., Osato, M.S., El-Zimaity, H.M.T., Davis, K.D., Graham, D.Y., *Helicobacter pylori* Pantoprazole Eradication (HELPPE) Study Group, 2003. Eradication of *Helicobacter pylori* by 7-day triple-therapy regimens combining pantoprazole with clarithromycin, metronidazole, or amoxicillin in patients with peptic ulcer disease: results of two double-blind, randomized studies. *Helicobacter* 8, 626–642.
46. Borody, T.J., Pang, G., Wettstein, A.R., Clancy, R., Herdman, K., Surace, R., Llorente, R., Ng, C., 2006. Efficacy and safety of rifabutin-containing “rescue therapy” for resistant *Helicobacter pylori* infection. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 23, 481–488.
47. Bouarioua, N., Merrouche, M., Pospai, D., Mignon, M., 2007. Physiopathologie de la maladie ulcéreuse gastroduodénale à l’ère d’«*Helicobacter pylori*». *EMC-Gastro-Entérologie* Janv 2, 1–12.

Bibliographie

48. 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. doi:10.1074/jbc.M510275200
49. 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
50. Boukhris, S.A., Benajah, D. -a., Rhazi, K., Ibrahim, S.A., Nejjari, C., Amarti, A., Mahmoud, M., 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. doi:10.1007/s10096-011-1501-x
51. Boyanova, L., Mentis, A., Gubina, M., Rozynek, E., Gosciniak, G., Kalenic, S., Göral, V., Kupcinkas, L., Kantarçeken, B., Aydin, A., Archimandritis, A., Dzierzanowska, D., Vcev, A., Ivanova, K., Marina, M., Mitov, I., Petrov, P., Ozden, A., Popova, M., 2002. The status of antimicrobial resistance of *Helicobacter pylori* in eastern Europe. *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 8, 388–396.
52. Boyanova, L., Mitov, I., Vladimirov, B., 2011. *Helicobacter Pylori*. Horizon Scientific Press.
53. Brandt, S., Kwok, T., Hartig, R., König, W., Backert, S., 2005. NF-kappaB activation and potentiation of proinflammatory responses by the *Helicobacter pylori* CagA protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 9300–9305. doi:10.1073/pnas.0409873102
54. Bury-Moné, S., Skouloubris, S., Labigne, A., De Reuse, H., 2001. UreI: une protéine de *Helicobacter pylori* essentielle à la résistance à l'acidité et aux étapes précoces de l'infection de la muqueuse gastrique murine. *Gastroentérologie Clin. Biol.* 25, 659–663.
55. Busler, V.J., Torres, V.J., McClain, M.S., Tirado, O., Friedman, D.B., Cover, T.L., 2006. Protein-protein interactions among *Helicobacter pylori* cag proteins. *J. Bacteriol.* 188, 4787–4800. doi:10.1128/JB.00066-06
56. Cabrita, J., Oleastro, M., Matos, R., Manhente, A., Cabral, J., Barros, R., Lopes, A.I., Ramalho, P., Neves, B.C., Guerreiro, A.S., 2000. Features and trends in *Helicobacter pylori* antibiotic resistance in Lisbon area, Portugal (1990-1999). *J. Antimicrob. Chemother.* 46, 1029–1031.
57. Cammarota, G., Branca, G., Ardito, F., Sanguinetti, M., Ianiro, G., Cianci, R., Torelli, R., Masala, G., Gasbarrini, A., Fadda, G., others, 2010. Biofilm demolition and antibiotic treatment to eradicate resistant *Helicobacter pylori*: a clinical trial. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 8, 817–820.
58. Cascales, E., Christie, P.J., 2003. The versatile bacterial type IV secretion systems. *Nat. Rev. Microbiol.* 1, 137–149. doi:10.1038/nrmicro753

Bibliographie

59. Cederbrant, G., Kahlmeter, G., Ljungh, A., 1992. Proposed mechanism for metronidazole resistance in *Helicobacter pylori*. *J. Antimicrob. Chemother.* 29, 115–120.
60. 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. U. S. A.* 93, 14648–14653.
61. Chanto, G., Occhialini, A., Gras, N., Alm, R.A., Mégraud, F., Marais, A., 2002. Identification of strain-specific genes located outside the plasticity zone in nine clinical isolates of *Helicobacter pylori*. *Microbiology* 148, 3671–3680.
62. 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.
63. 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
64. Chen, M.-Y., He, C.-Y., Meng, X., Yuan, Y., 2013. Association of *Helicobacter pylori* *babA2* with peptic ulcer disease and gastric cancer. *World J. Gastroenterol.* WJG 19, 4242.
65. Chisholm, S.A., Owen, R.J., Teare, E.L., Saverymuttu, S., 2001. PCR-based diagnosis of *Helicobacter pylori* infection and real-time determination of clarithromycin resistance directly from human gastric biopsy samples. *J. Clin. Microbiol.* 39, 1217–1220.
66. Chomvarin, C., Namwat, W., Chaicumpar, K., Mairiang, P., Sangchan, A., Sripa, B., Tor-Udom, S., Vilaichone, R.-K., 2008. Prevalence of *Helicobacter pylori* *vacA*, *cagA*, *cagE*, *iceA* and *babA2* genotypes in Thai dyspeptic patients. *Int. J. Infect. Dis.* 12, 30–36.
67. Christie, P.J., Vogel, J.P., 2000. Bacterial type IV secretion: conjugation systems adapted to deliver effector molecules to host cells. *Trends Microbiol.* 8, 354–360.
68. Coleman, M.P., Estève, J., Damiecki, P., Arslan, A., Renard, H., n.d. Trends in cancer incidence and mortality. Lyons: International Agency for Research on Cancer, 1993. IARC scientific publications.
69. Correa, P., 1996. *Helicobacter pylori* and gastric cancer: state of the art. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 5, 477–481.
70. Correa, P., 1994. *Helicobacter pylori* and gastric carcinogenesis. *Am. J. Surg. Pathol.* 19, S37–43.
71. 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. U. S. A.* 90, 5791–5795.

Bibliographie

72. Covacci, A., Rappuoli, R., 2000. Tyrosine-phosphorylated bacterial proteins: Trojan horses for the host cell. *J. Exp. Med.* 191, 587–592.
73. Covacci, A., Telford, J.L., Del Giudice, G., Parsonnet, J., Rappuoli, R., 1999. *Helicobacter pylori* virulence and genetic geography. *Science* 284, 1328–1333.
74. Cover, T.L., Hanson, P.I., Heuser, J.E., 1997. Acid-induced dissociation of VacA, the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin, reveals its pattern of assembly. *J. Cell Biol.* 138, 759–769.
75. Cover, T.L., Reddy, L.Y., Blaser, M.J., 1993. Effects of ATPase inhibitors on the response of HeLa cells to *Helicobacter pylori* vacuolating toxin. *Infect. Immun.* 61, 1427–1431.
76. Cover, T.L., Vaughn, S.G., Cao, P., Blaser, M.J., 1992. Potentiation of *Helicobacter pylori* vacuolating toxin activity by nicotine and other weak bases. *J. Infect. Dis.* 166, 1073–1078.
77. Crabtree, J.E., Kersulyte, D., Li, S.D., Lindley, I.J., Berg, D.E., 1999. Modulation of *Helicobacter pylori* induced interleukin-8 synthesis in gastric epithelial cells mediated by cag PAI encoded VirD4 homologue. *J. Clin. Pathol.* 52, 653–657.
78. Cullen, T.W., Giles, D.K., Wolf, L.N., Ecobichon, C., Boneca, I.G., Trent, M.S., 2011. *Helicobacter pylori* versus the host: remodeling of the bacterial outer membrane is required for survival in the gastric mucosa. *PLoS Pathog* 7, e1002454.
79. 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
80. De Francesco, V., Giorgio, F., Hassan, C., Manes, G., Vannella, L., Panella, C., Ierardi, E., Zullo, A., 2010. Worldwide H. pylori antibiotic resistance: a systematic. *J Gastrointestin Liver Dis* 19, 409–414.
81. De Francesco, V., Margiotta, M., Zullo, A., Hassan, C., Troiani, L., Burattini, O., Stella, F., Di Leo, A., Russo, F., Marangi, S., Monno, R., Stoppino, V., Morini, S., Panella, C., Ierardi, E., 2006. Clarithromycin-resistant genotypes and eradication of *Helicobacter pylori*. *Ann. Intern. Med.* 144, 94–100.
82. De Korwin, J.-D., 2008. Does *Helicobacter pylori* infection play a role in extragastric diseases?. *Presse Medicale (Paris Fr.* 1983) 37, 525–534.
83. 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
84. de Korwin, J.-D., 2003. Avantages et inconvénients des différentes méthodes diagnostiques de l'infection à H. pylori. *Gastroentérologie Clin. Biol.* 27, 380–390.
85. De Korwin, J.-D., n.d. Nouvelles recommandations sur la prise en charge des patients infectés par *Helicobacter pylori*.
86. De Korwin, J.D., Lehours, P., 2010. *Helicobacter pylori*: notions fondamentales, épidémiologie, méthodes diagnostiques. *EMC-Gastro-Entérologie Janv* 5, 1–16.

Bibliographie

87. de Sablet, T., Piazuolo, M.B., Shaffer, C.L., Schneider, B.G., Asim, M., Chaturvedi, R., Bravo, L.E., Sicinski, L.A., Delgado, A.G., Mera, R.M., others, 2011. Phylogeographic origin of *Helicobacter pylori* is a determinant of gastric cancer risk. *Gut* 2010.
88. Debets-Ossenkopp, Y.J., Herscheid, A.J., Pot, R.G., Kuipers, E.J., Kusters, J.G., Vandenbroucke-Grauls, C.M., 1999. Prevalence of *Helicobacter pylori* resistance to metronidazole, clarithromycin, amoxicillin, tetracycline and trovafloxacin in The Netherlands. *J. Antimicrob. Chemother.* 43, 511–515.
89. Dent, J.C., McNulty, C.A.M., 1988. Evaluation of a new selective medium for *Campylobacter pylori*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 7, 555–558.
90. Devi, S.H., Taylor, T.D., Avasthi, T.S., Kondo, S., Suzuki, Y., Megraud, F., Ahmed, N., 2010. Genome of *Helicobacter pylori* strain 908. *J. Bacteriol.* 192, 6488–6489.
91. Deyi, M., Yvette, V., Fontaine, V., 2011. Contribution au management de l'infection à *Helicobacter pylori* en Belgique.
92. 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.
93. Dixon, M.F., Genta, R.M., Yardley, J.H., Correa, P., others, 1996. Classification and grading of gastritis: the updated Sydney system. *Am. J. Surg. Pathol.* 20, 1161–1181.
94. 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
95. Doenges, J.L., 1938. Spirochetes in gastric glands of *Macacus rhesus* and humans without definite history of related disease. *Exp. Biol. Med.* 38, 536–538.
96. Dore, M.P., Graham, D.Y., Sepulveda, A.R., 1999. Different penicillin-binding protein profiles in amoxicillin-resistant *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* 4, 154–161.
97. Dore, M.P., Leandro, G., Realdi, G., Sepulveda, A.R., Graham, D.Y., 2000. Effect of pretreatment antibiotic resistance to metronidazole and clarithromycin on outcome of *Helicobacter pylori* therapy. *Dig. Dis. Sci.* 45, 68–76.
98. Dore, M.P., Osato, M.S., Malaty, H.M., Graham, D.Y., 2000. Characterization of a culture method to recover *Helicobacter pylori* from the feces of infected patients. *Helicobacter* 5, 165–168.
99. 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

Bibliographie

100. 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.
101. el-Omar, E.M., Penman, I.D., Ardill, J.E., Chittajallu, R.S., Howie, C., McColl, K.E., 1995. *Helicobacter pylori* infection and abnormalities of acid secretion in patients with duodenal ulcer disease. *Gastroenterology* 109, 681–691.
102. El-Omar, E.M., Carrington, M., Chow, W.-H., McColl, K.E., Bream, J.H., Young, H.A., Herrera, J., Lissowska, J., Yuan, C.-C., Rothman, N., others, 2000. Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer. *Nature* 404, 398–402.
103. 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.
104. El-Zimaity, H.M., 2000. Accurate diagnosis of *Helicobacter pylori* with biopsy. *Gastroenterol. Clin. North Am.* 29, 863–869.
105. Enroth, H., Wreiber, K., Rigo, R., Risberg, D., Uribe, A., Engstrand, L., 1999. In vitro aging of *Helicobacter pylori*: changes in morphology, intracellular composition and surface properties. *Helicobacter* 4, 7–16.
106. Falush, D., Stephens, M., Pritchard, J.K., 2003a. Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics* 164, 1567–1587.
107. Falush, D., Wirth, T., Linz, B., Pritchard, J.K., Stephens, M., Kidd, M., Blaser, M.J., Graham, D.Y., Vacher, S., Perez-Perez, G.I., others, 2003b. Traces of human migrations in *Helicobacter pylori* populations. *science* 299, 1582–1585.
108. Farshad, S., Japoni, A., Alborzi, A., Zarenezhad, M., Ranjbar, R., 2010. Changing prevalence of *Helicobacter pylori* in south of Iran. *Arch. Clin. Infect. Dis.* 5, 65–69.
109. Farzi, N., Malekian, T., Alebouyeh, M., Vaziri, F., Zali, M.R., 2015. Genotype Diversity and Quasispecies Development of *Helicobacter pylori* in a Single Host. *Jpn. J. Infect. Dis.* 68, 176–180. doi:10.7883/yoken.JJID.2014.165
110. Fauchère, J.L., Charlier-Bret, N., Courillon-Mallet, A., de Korwin, J.D., Raymond, J., Burucoa, C., Boucher, B., Ly, T.D., Zerbib, F., Mégraud, F., others, 2011. Évaluation comparative de 29 troussees commercialisées pour le diagnostic sérologique de l'infection par *Helicobacter pylori*: étude multicentrique du Groupe d'Étude Français des *Helicobacter*. *Feuill. Biol.* 298–307.
111. 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. doi:10.1097/MJT.000000000000191
112. Fennerty, M.B., Kovacs, T.O., Krause, R., Haber, M., Weissfeld, A., Siepman, N., Rose, P., 1998. A comparison of 10 and 14 days of lansoprazole triple therapy for eradication of *Helicobacter pylori*. *Arch. Intern. Med.* 158, 1651–1656.

Bibliographie

113. Fernandez-Gonzalez, E. and Backert, S., 2014. DNA transfer in the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Journal of gastroenterology*, 49(4), 594-604
114. Ferwana, M., Abdulmajeed, I., Alhajiahmed, A., Madani, W., Firwana, B., Hasan, R., Altayar, O., Limburg, P.J., Murad, M.H., Knawy, B., 2015. Accuracy of urea breath test in *Helicobacter pylori* infection: meta-analysis. *World J Gastroenterol* 21, 1305–1314.
115. Fiedorek, S.C., Malaty, H.M., Evans, D.L., Pumphrey, C.L., Casteel, H.B., Evans, D.J., Graham, D.Y., 1991. Factors Influencing the Epidemiology of *Helicobacter pylori* Infection in Children. *Pediatrics* 88, 578–582.
116. Fischer, W., 2011. Assembly and molecular mode of action of the *Helicobacter pylori* Cag type IV secretion apparatus. *FEBS J.* 278, 1203–1212. doi:10.1111/j.1742-4658.2011.08036.x
117. Fischer, W., Windhager, L., Rohrer, S., Zeiller, M., Karnholz, A., Hoffmann, R., Zimmer, R., Haas, R., 2010. Strain-specific genes of *Helicobacter pylori*: genome evolution driven by a novel type IV secretion system and genomic island transfer. *Nucleic Acids Res.* 38, 6089–6101.
118. Flejou, J.-F., Diomande, I., Molas, G., Goldfain, D., Rotenberg, A., Florent, M., Potet, F., 1990. Gastrite chronique associée chez l’homme à la présence de germes spiralés non-*Helicobacter pylori* (*Gastrospirillum hominis*): présentation de 4 cas avec revue de la littérature. *Gastroentérologie Clin. Biol.* 14, 806–810.
119. Fontana, C., Favaro, M., Minelli, S., Criscuolo, A.A., Pietroiusti, A., Galante, A., Favalli, C., 2002. New site of modification of 23S rRNA associated with clarithromycin resistance of *Helicobacter pylori* clinical isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 3765–3769.
120. Franco, A.T., Israel, D.A., Washington, M.K., Krishna, U., Fox, J.G., Rogers, A.B., Neish, A.S., Collier-Hyams, L., Perez-Perez, G.I., Hatakeyama, M., Whitehead, R., Gaus, K., O’Brien, D.P., Romero-Gallo, J., Peek, R.M., 2005. Activation of beta-catenin by carcinogenic *Helicobacter pylori*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 10646–10651. doi:10.1073/pnas.0504927102
121. Freedberg, A.S., Barron, L.E., 1940. The presence of spirochetes in human gastric mucosa. *Am. J. Dig. Dis.* 7, 443–445.
122. Frenck, R.W., Clemens, J., 2003. *Helicobacter* in the developing world. *Microbes Infect.* 5, 705–713.
123. Frenck, R.W., Fathy, H.M., Sherif, M., Mohran, Z., El Mohammedy, H., Francis, W., Rockabrand, D., Mounir, B.I., Rozmajzl, P., Frierson, H.F., 2006. Sensitivity and Specificity of Various Tests for the Diagnosis of *Helicobacter pylori* in Egyptian Children. *PEDIATRICS* 118, e1195–e1202. doi:10.1542/peds.2005-2925
124. Frugis, S., Czczeko, N.G., Malafaia, O., Parada, A.A., Poletti, P.B., Secchi, T.F., Degiovani, M., Rampanazzo-Neto, A., D’Agostino, M.D., 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. doi:10.1590/0102-6720201600030006

Bibliographie

125. Fujimoto, Y., Shimoyama, A., Saeki, A., Kitayama, N., Kasamatsu, C., Tsutsui, H., Fukase, K., 2013. Innate immunomodulation by lipophilic termini of lipopolysaccharide; synthesis of lipid As from *Porphyromonas gingivalis* and other bacteria and their immunomodulative responses. *Mol. Biosyst.* 9, 987–996.
126. Furuta, T., Sugimoto, M., Shirai, N., Matsushita, F., Nakajima, H., Kumagai, J., Senoo, K., Kodaira, C., Nishino, M., Yamade, M., others, 2007. Effect of MDR1 C3435T polymorphism on cure rates of *Helicobacter pylori* infection by triple therapy with lansoprazole, amoxicillin and clarithromycin in relation to CYP 2C19 genotypes and 23S rRNA genotypes of *H. pylori*. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 26, 693–703.
127. Galal, G., Wharburton, V., West, A., Mapstone, N., Axon, A.T.R., Hawkey, P., Moayyedi, P., 1997. Isolation of *H. pylori* from gastric juice 03/150. *Gut* 41, 40A–41A.
128. Gancz, H., Jones, K.R., Merrell, D.S., 2008. Sodium chloride affects *Helicobacter pylori* growth and gene expression. *J. Bacteriol.* 190, 4100–4105.
129. Gangwer, K.A., Shaffer, C.L., Suerbaum, S., Lacy, D.B., Cover, T.L., Bordenstein, S.R., 2010. Molecular evolution of the *Helicobacter pylori* vacuolating toxin gene *vacA*. *J. Bacteriol.* 192, 6126–6135.
130. Garner, J.A., Cover, T.L., 1996. Binding and internalization of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin by epithelial cells. *Infect. Immun.* 64, 4197–4203.
131. Garza-González, E., 2014. A review of *Helicobacter pylori* diagnosis, treatment, and methods to detect eradication. *World J. Gastroenterol.* 20, 1438. doi:10.3748/wjg.v20.i6.1438
132. Gatti, L.L., Módena, J.L.P., Payão, S.L.M., Smith, M. de A.C., Fukuhara, Y., Módena, J.L.P., de Oliveira, R.B., Brocchi, M., 2006. Prevalence of *Helicobacter pylori* *cagA*, *iceA* and *babA2* alleles in Brazilian patients with upper gastrointestinal diseases. *Acta Trop.* 100, 232–240. doi:10.1016/j.actatropica.2006.08.014
133. Gerhard, M., Lehn, N., Neumayer, N., Borén, T., Rad, R., Schepp, W., Miehle, 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.
134. 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.
135. 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
136. 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.

Bibliographie

137. Ghotaslou, R., 2015. Prevalence of antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*: A recent literature review. *World J. Methodol.* 5, 164. doi:10.5662/wjm.v5.i3.164
138. Gibson, J.R., Saunders, N.A., Burke, B., Owen, R.J., 1999. Novel method for rapid determination of clarithromycin sensitivity in *Helicobacter pylori*. *J. Clin. Microbiol.* 37, 3746–3748.
139. Gisbert, J.P., Pajares, J.M., 2004. Review article: 13C-urea breath test in the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection—a critical review. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 20, 1001–1017.
140. 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.
141. Glocker, E., 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.
142. Glowinski, F., Holland, C., Thiede, B., Jungblut, P.R., Meyer, T.F., 2014. Analysis of T4SS-induced signaling by *H. pylori* using quantitative phosphoproteomics. *Front. Microbiol.* 5.
143. Glupczynski, Y., Broutet, N., Cantagrel, A., Andersen, L., Alarcon, T., Lopez-Brea, M., Megraud, F., 2002. Comparison of the E test and agar dilution method for antimicrobial susceptibility testing of *Helicobacter pylori*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 21, 549–552.
144. Glupczynski, Y., Megraud, F., Lopez-Brea, M., Andersen, L., 2001. European multicentre survey of in vitro antimicrobial resistance in *Helicobacter pylori*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 20, 820–823.
145. Goddard, A.F., Logan, R.P.H., 1997. Urea breath tests for detecting *Helicobacter pylori*. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 11, 641–649.
146. Gomes, L.I., Rocha, G.A., Rocha, A.M., Soares, T.F., Oliveira, C.A., Bittencourt, P.F., Queiroz, D.M., 2008. Lack of association between *Helicobacter pylori* infection with *dupA*-positive strains and gastroduodenal diseases in Brazilian patients. *Int. J. Med. Microbiol.* 298, 223–230.
147. González, C.A., Figueiredo, C., Lic, C.B., Ferreira, R.M., Pardo, M.L., Liso, J.R., 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.
148. Goodwin, A., Kersulyte, D., Sisson, G., Veldhuyzen van Zanten, S.J., Berg, D.E., Hoffman, P.S., 1998. Metronidazole resistance in *Helicobacter pylori* is due to null mutations in a gene (*rdxA*) that encodes an oxygen-insensitive NADPH nitroreductase. *Mol. Microbiol.* 28, 383–393.
149. 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*

Bibliographie

- comb. nov. and *Helicobacter mustelae* comb. nov., respectively. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 39, 397–405.
150. Goodwin, C.S., Collins, M.D., Blincow, E., 1986. The absence of thermoplasmaquinones in *Campylobacter pyloridis*, and its temperature and pH growth range. *Microbios Lett.* 32, 137–140.
151. Goodwin, C.S., McConnell, W., McCulloch, R.K., McCullough, C., Hill, R., Bronsdon, M.A., Kasper, G., 1989. Cellular fatty acid composition of *Campylobacter pylori* from primates and ferrets compared with those of other campylobacters. *J. Clin. Microbiol.* 27, 938–943.
152. Gottrand, F., 2003. Quels sont les problèmes spécifiques posés chez l'enfant? *Gastroentérologie Clin. Biol.* 27, 484–487.
153. Graham, D., Evans, D., Alpert, L., Klein, P., Evans, D., Opekun, A., Boutton, T., 1987. *Campylobacter pylori* detected noninvasively by the 13 C-urea breath test. *The Lancet* 329, 1174–1177.
154. Graham, D.Y., Opekun, A.R., Osato, M.S., El-Zimaity, H.M.T., Lee, C.K., Yamaoka, Y., Qureshi, W.A., Cadoz, M., Monath, T.P., 2004. Challenge model for *Helicobacter pylori* infection in human volunteers. *Gut* 53, 1235–1243. doi:10.1136/gut.2003.037499
155. Granquist, Å., Bredberg, A., Sveger, T., Axelsson, I., 2002. A longitudinal cohort study on the prevalence of *Helicobacter pylori* antibodies in Swedish children and adolescents. *Acta Pædiatrica* 91, 636–640. doi:10.1111/j.1651-2227.2002.tb03293.x
156. Grubman, A., Kaparakis, M., Viala, J., Allison, C., Badea, L., Karrar, A., Boneca, I.G., Le Bourhis, L., Reeve, S., Smith, I.A., others, 2010. The innate immune molecule, NOD1, regulates direct killing of *Helicobacter pylori* by antimicrobial peptides. *Cell. Microbiol.* 12, 626–639.
157. Han, F., Liu, S., Ho, B., Yan, Z., Yan, X., 2007. Alterations in *rdxA* and *frxA* genes and their upstream regions in metronidazole-resistant *Helicobacter pylori* isolates. *Res. Microbiol.* 158, 38–44. doi:10.1016/j.resmic.2006.10.001
158. Hansson, L.E., Nyrén, O., Hsing, A.W., Bergström, R., Josefsson, S., Chow, W.H., Fraumeni, J.F., Adami, H.O., 1996. The risk of stomach cancer in patients with gastric or duodenal ulcer disease. *N. Engl. J. Med.* 335, 242–249. doi:10.1056/NEJM199607253350404
159. Hatakeyama, M., 2014. *Helicobacter pylori* CagA and gastric cancer: a paradigm for hit-and-run carcinogenesis. *Cell Host Microbe* 15, 306–316.
160. Hatakeyama, M., 2008. SagA of CagA in *Helicobacter pylori* pathogenesis. *Curr. Opin. Microbiol.* 11, 30–37. doi:10.1016/j.mib.2007.12.003
161. Hatakeyama, M., Higashi, H., 2005. *Helicobacter pylori* CagA: a new paradigm for bacterial carcinogenesis. *Cancer Sci.* 96, 835–843. doi:10.1111/j.1349-7006.2005.00130.x
162. Hazell, S.L., Evans Jr, D.J., Graham, D.Y., 1991. *Helicobacter pylori* catalase. *Microbiology* 137, 57–61.

Bibliographie

163. He, C., Chen, M., Liu, J., Yuan, Y., 2014. Host genetic factors respond to pathogenic step-specific virulence factors of *Helicobacter pylori* in gastric carcinogenesis. *Mutat. Res. Mutat. Res.* 759, 14–26. doi:10.1016/j.mrrev.2013.09.002
164. Heep, M., Beck, D., Bayerdörffer, E., Lehn, N., 1999. Rifampin and rifabutin resistance mechanism in *Helicobacter pylori*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43, 1497–1499.
165. Heep, M., Lehn, N., Brandstätter, B., Rieger, U., Senzenberger, S., Wehrl, W., 2002. Detection of rifabutin resistance and association of *rpoB* mutations with resistance to four rifamycin derivatives in *Helicobacter pylori*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol.* 21, 143–145.
166. 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.
167. Heep, M., Scheibl, K., Degrell, A., Lehn, N., 1999. Transport and storage of fresh and frozen gastric biopsy specimens for optimal recovery of *Helicobacter pylori*. *J. Clin. Microbiol.* 37, 3764–3766.
168. Heneghan, M.A., McCarthy, C.F., Moran, A.P., 2000. Relationship of blood group determinants on *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide with host Lewis phenotype and inflammatory response. *Infect. Immun.* 68, 937–941.
169. 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
170. Ho, G.Y., Windsor, H.M., 2000. Accurate diagnosis of *Helicobacter pylori*: polymerase chain reaction tests. *Gastroenterol. Clin. North Am.* 29, 903–915.
171. Hoffman, P.S., Goodwin, A., Johnsen, J., Magee, K., van Zanten, S.V., 1996. Metabolic activities of metronidazole-sensitive and-resistant strains of *Helicobacter pylori*: repression of pyruvate oxidoreductase and expression of isocitrate lyase activity correlate with resistance. *J. Bacteriol.* 178, 4822–4829.
172. Höfler, C., Fischer, W., Hofreuter, D., Haas, R., 2004. Cryptic plasmids in *Helicobacter pylori*: putative functions in conjugative transfer and microcin production. *Int. J. Med. Microbiol.* 294, 141–148. doi:10.1016/j.ijmm.2004.06.021
173. Hollander, F., 1954. The two-component mucous barrier: its activity in protecting the gastroduodenal mucosa against peptic ulceration. *AMA Arch. Intern. Med.* 93, 107–120.
174. Hongying, F., Xianbo, W., Fang, Y., Yang, B., Beiguo, L., 2014. Oral Immunization with Recombinant *Lactobacillus acidophilus* Expressing the Adhesin Hp0410 of *Helicobacter pylori* Induces Mucosal and Systemic Immune Responses. *Clin. Vaccine Immunol.* 21, 126–132. doi:10.1128/CVI.00434-13
175. Horiki, N., Omata, F., Uemura, M., Suzuki, S., Ishii, N., Iizuka, Y., Fukuda, K., Fujita, Y., Katsurahara, M., Ito, T., others, 2009. Annual change of primary resistance to clarithromycin among *Helicobacter pylori* isolates from 1996 through 2008 in Japan. *Helicobacter* 14, 438–442.

Bibliographie

176. Hotchin, N.A., Cover, T.L., Akhtar, N., 2000. Cell Vacuolation Induced by the VacA Cytotoxin of *Helicobacter pylori* Is Regulated by the Rac1 GTPase. *J. Biol. Chem.* 275, 14009–14012.
177. Hsieh, P.F., Yang, J.C., Lin, J.T., Wang, J.T., 1998. Molecular mechanisms of clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori*. *J. Formos. Med. Assoc. Taiwan Yi Zhi* 97, 445–452.
178. Hultén, K., Gibreel, A., Sköld, O., Engstrand, L., 1997. Macrolide resistance in *Helicobacter pylori*: mechanism and stability in strains from clarithromycin-treated patients. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41, 2550–2553.
179. Hussein, N.R., 2010. The association of dupA and *Helicobacter pylori*-related gastroduodenal diseases. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 29, 817–821.
180. Hussein, N.R., Argent, R.H., Marx, C.K., Patel, S.R., Robinson, K., Atherton, J.C., 2010. *Helicobacter pylori* dupA is polymorphic, and its active form induces proinflammatory cytokine secretion by mononuclear cells. *J. Infect. Dis.* 202, 261–269.
181. Huynh, H.Q., Couper, R.T.L., Tran, C.D., Moore, L., Kelso, R., Butler, R.N., 2004. N-Acetylcysteine, a Novel Treatment for *Helicobacter pylori* Infection. *Dig. Dis. Sci.* 49, 1853–1861. doi:10.1007/s10620-004-9583-2
182. Ishijima, N., Suzuki, M., Ashida, H., Ichikawa, Y., Kanegae, Y., Saito, I., Borén, T., Haas, R., Sasakawa, C., Mimuro, H., 2011. BabA-mediated adherence is a potentiator of the *Helicobacter pylori* type IV secretion system activity. *J. Biol. Chem.* 286, 25256–25264.
183. Isomoto, H., Inoue, K., Shikuwa, S., Furusu, H., Nishiyama, T., Omagari, K., Mizuta, Y., Murase, K., Murata, I., Enjoji, A., others, 2002. Five minute endoscopic urea breath test with 25 mg of ¹³C-urea in the management of *Helicobacter pylori* infection. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 14, 1093–1100.
184. Jeong, J.-Y., Mukhopadhyay, A.K., Dailidienė, D., Wang, Y., Velapatiño, B., Gilman, R.H., Parkinson, A.J., Nair, G.B., Wong, B.C., Lam, S.K., others, 2000. Sequential inactivation of rdxA (HP0954) and frxA (HP0642) nitroreductase genes causes moderate and high-level metronidazole resistance in *Helicobacter pylori*. *J. Bacteriol.* 182, 5082–5090.
185. Ji, X., Fernandez, T., Burrioni, D., Pagliaccia, C., Atherton, J.C., Reyrat, J.-M., Rappuoli, R., Telford, J.L., 2000. Cell Specificity of *Helicobacter pylori* Cytotoxin Is Determined by a Short Region in the Polymorphic Midregion. *Infect. Immun.* 68, 3754–3757.
186. Jones, K.R., Joo, Y.M., Jang, S., Yoo, Y.-J., Lee, H.S., Chung, I.-S., Olsen, C.H., Whitmire, J.M., Merrell, D.S., Cha, J.-H., 2009. Polymorphism in the CagA EPIYA Motif Impacts Development of Gastric Cancer. *J. Clin. Microbiol.* 47, 959–968. doi:10.1128/JCM.02330-08
187. Joutei, H.A.H., Hilali, A., Fechtali, T., Rhallabi, N., Benomar, H., 2010. *Helicobacter pylori* infection in 755 patients with digestive complaints: Pasteur Institute, Morocco, 1998-2007.

Bibliographie

188. Jüttner, S., Vieth, M., Miehle, S., Schneider-Brachert, W., Kirsch, C., Pfeuffer, T., Lehn, N., Stolte, M., 2004. Reliable detection of macrolide-resistant *Helicobacter pylori* via fluorescence in situ hybridization in formalin-fixed tissue. *Mod. Pathol.* 17, 684–689.
189. Kalach, N., Gosset, P., Dehecq, E., Decoster, A., Spyckerelle, C., Papadopolos, S., Dupont, C., Raymond, J., 2015. Usefulness of Gastric Biopsy-Based Real-Time Polymerase Chain Reaction for the Diagnosis of *Helicobacter pylori* Infection in Children. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 61, 307–312.
190. Kansau, I., Raymond, J., Bingen, E., Courcoux, P., Kalach, N., Bergeret, M., Braimi, N., Dupont, C., Labigne, A., 1996. Genotyping of *Helicobacter pylori* isolates by sequencing of PCR products and comparison with the RAPD technique. *Res. Microbiol.* 147, 661–669.
191. Kawakami, E., Machado, R.S., Reber, M., Patrício, F.R.S., 2002. ¹³C-urea breath test with infrared spectroscopy for diagnosing *Helicobacter pylori* infection in children and adolescents. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 35, 39–43.
192. Kelly, D.J., 1998. The physiology and metabolism of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Adv. Microb. Physiol.* 40, 137–189.
193. Kennemann, L., Didelot, X., Aebischer, T., Kuhn, S., Drescher, B., Droege, M., Reinhardt, R., Correa, P., Meyer, T.F., Josenhans, C., others, 2011. *Helicobacter pylori* genome evolution during human infection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 5033–5038.
194. Kersulyte, D., Kalia, A., Gilman, R.H., Mendez, M., Herrera, P., Cabrera, L., Velapatiño, B., Balqui, J., de la Vega, F.P.P., Ulloa, C.A.R., others, 2010. *Helicobacter pylori* from Peruvian amerindians: traces of human migrations in strains from remote Amazon, and genome sequence of an Amerind strain. *PLoS One* 5, e15076.
195. Khodadad, A., Farahmand, F., Najafi, M., Shoaran, M., 2013. Probiotics for the treatment of pediatric *Helicobacter pylori* infection: a randomized double blind clinical trial.
196. Kibria, K.M.K., Hossain, M.E., Sultana, J., Sarker, S.A., Bardhan, P.K., Rahman, M., Nahar, S., 2015. The Prevalence of Mixed *Helicobacter pylori* Infections in Symptomatic and Asymptomatic Subjects in Dhaka, Bangladesh. *Helicobacter* 20, 397–404. doi:10.1111/hel.12213
197. Kim, J.M., Kim, J.S., Kim, N., Jung, H.C., Song, I.S., 2005. Distribution of fluoroquinolone MICs in *Helicobacter pylori* strains from Korean patients. *J. Antimicrob. Chemother.* 56, 965–967. doi:10.1093/jac/dki334
198. 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. doi:10.1111/j.1462-5822.2005.00603.x
199. Kimura, M., Goto, S., Wada, A., Yahiro, K., Niidome, T., Hatakeyama, T., Aoyagi, H., Hirayama, T., Kondo, T., 1999. Vacuolating cytotoxin purified from *Helicobacter pylori* causes mitochondrial damage in human gastric cells. *Microb. Pathog.* 26, 45–52.

Bibliographie

200. Kist, M., Glocker, E., 2004. ResiNet: a nationwide German sentinel study for surveillance and analysis of antimicrobial resistance in *Helicobacter pylori*. *Euro Surveill.* 9, 44–46.
201. Koehler, C.I., Mues, M.B., Dienes, H.P., Kriegsmann, J., Schirmacher, P., Odenthal, M., 2003. *Helicobacter pylori* genotyping in gastric adenocarcinoma and MALT lymphoma by multiplex PCR analyses of paraffin wax embedded tissues. *Mol. Pathol.* 56, 36–42.
202. Kokkola, A., Rautelin, H., Puolakkainen, P., Sipponen, P., Färkkilä, M., Haapiainen, R., Kosunen, T.U., 2000. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in patients with atrophic gastritis: comparison of histology, ¹³C-urea breath test, and serology. *Scand. J. Gastroenterol.* 35, 138–141.
203. Koletzko, S., Richy, F., Bontems, P., Crone, J., Kalach, N., Monteiro, M.L., Gottrand, F., Celinska-Cedro, D., Roma-Giannikou, E., Orderda, G., Kolacek, S., Urruzuno, P., Martinez-Gomez, M.J., Casswall, T., Ashorn, M., Bodanszky, H., Megraud, F., on behalf of the European Paediatric Task Force on *Helicobacter pylori*, 2006. Prospective multicentre study on antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* strains obtained from children living in Europe. *Gut* 55, 1711–1716. doi:10.1136/gut.2006.091272
204. Kolts, B.E., Joseph, B., Achem, S.R., Bianchi, T., Monteiro, C., 1993. *Helicobacter pylori* detection: a quality and cost analysis. *Am. J. Gastroenterol.* 88.
205. Konturek, J.W., 2003. DISCOVERY BY JAWORSKI OF *HELICOBACTER PYLORI*. *J. Physiol. Pharmacol.* 54, 23–41.
206. Kostrzynska, M., Betts, J.D., Austin, J.W., others, 1991. Identification, characterization, and spatial localization of two flagellin species in *Helicobacter pylori* flagella. *J. Bacteriol.* 173, 937–946.
207. Kraft, C., 2005. Mutation and recombination in: Mechanisms and role in generating strain diversity. *Int. J. Med. Microbiol.* 295, 299–305. doi:10.1016/j.ijmm.2005.06.002
208. Krebs, J., Didelot, X., Kennemann, L., Suerbaum, S., 2014. Bidirectional genomic exchange between *Helicobacter pylori* strains from a family in Coventry, United Kingdom. *Int. J. Med. Microbiol.* 304, 1135–1146. doi:10.1016/j.ijmm.2014.08.007
209. Krienitz, W., 1906. Ueber das Auftreten von Spirochäten verschiedener Form im Mageninhalt bei Carcinoma ventriculi. *DMW-Dtsch. Med. Wochenschr.* 32, 872–872.
210. Kuipers, E.J., 1999. Review article: exploring the link between *Helicobacter pylori* and gastric cancer. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 13, 3–11.
211. Kusters, J.G., van Vliet, A.H.M., Kuipers, E.J., 2006. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Clin. Microbiol. Rev.* 19, 449–490. doi:10.1128/CMR.00054-05
212. Kutter, S., Buhrdorf, R., Haas, J., Schneider-Brachert, W., Haas, R., Fischer, W., 2008. Protein subassemblies of the *Helicobacter pylori* Cag type IV secretion system revealed by localization and interaction studies. *J. Bacteriol.* 190, 2161–2171. doi:10.1128/JB.01341-07

Bibliographie

213. Kuwahara, H., Miyamoto, Y., Akaike, T., Kubota, T., Sawa, T., Okamoto, S., Maeda, H., 2000. Helicobacter pylori urease suppresses bactericidal activity of peroxydinitrite via carbon dioxide production. *Infect. Immun.* 68, 4378–4383.
214. Kwok, T., Zabler, D., Urman, S., Rohde, M., Hartig, R., Wessler, S., Misselwitz, R., Berger, J., Sewald, N., König, W., Backert, S., 2007. Helicobacter exploits integrin for type IV secretion and kinase activation. *Nature* 449, 862–866. doi:10.1038/nature06187
215. Kwon, D.H., Dore, M.P., Kim, J.J., Kato, M., Lee, M., Wu, J.Y., Graham, D.Y., 2003. High-level beta-lactam resistance associated with acquired multidrug resistance in Helicobacter pylori. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 2169–2178.
216. Labigne, A., Cussac, V., Courcoux, P., 1991. Shuttle cloning and nucleotide sequences of Helicobacter pylori genes responsible for urease activity. *J. Bacteriol.* 173, 1920–1931.
217. Lai, L.H., Sung, J.J., 2007. Helicobacter pylori and benign upper digestive disease. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 21, 261–279.
218. 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., others, 2012. Révision des recommandations françaises sur la prise en charge de l'infection par Helicobacter pylori (sans références bibliographiques). *Hépatogastro Oncol. Dig.* 19, 475–494.
219. LAMARQUE, D., VAN NHIEU, J.T., BREBAN, M., 2003. Quelles sont les modifications gastriques induites par l'infection aiguë et chronique par Helicobacter pylori? *Gastroentérologie Clin. Biol.* 27, 391–400.
220. Lambert, T., Mégraud, F., Gerbaud, G., Courvalin, P., 1986. Susceptibility of Campylobacter pyloridis to 20 antimicrobial agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* 30, 510–511.
221. Lamouliatte, H., Mégraud, F., Delchier, J.-C., Bretagne, J.-F., Courillon-Mallet, A., De Korwin, J.-D., Fauchère, J.-L., Labigne, A., Fléjou, J.-F., Barthelemy, P., 2003. Second-line treatment for failure to eradicate Helicobacter pylori: a randomized trial comparing four treatment strategies. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 18, 791–797.
222. Lee, A., Mitchell, H., 1994. Basic bacteriology of H. pylori: H. pylori colonization factors, in: *Helicobacter Pylori*. Springer, pp. 59–72.
223. 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.
224. Lee, S.-Y., Kim, J.J., Lee, J.H., Kim, Y.-H., Rhee, P.-L., Paik, S.W., Rhee, J.C., Ko, Y.H., 2005. Synchronous adenocarcinoma and mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma in a single stomach. *Jpn. J. Clin. Oncol.* 35, 591–594.
225. Lee, T.-H., Lin, C.-C., Chung, C.-S., Lin, C.-K., Liang, C.-C., Tsai, K.-C., 2015. Increasing biopsy number and sampling from gastric body improve the sensitivity of rapid urease test in patients with peptic ulcer bleeding. *Dig. Dis. Sci.* 60, 454–457.

Bibliographie

226. Lehours, P., 2003. *Helicobacter pylori* et les autres. *Gastroentérologie Clin. Biol.* 27, 367–373.
227. Lehours, P., Ruskone-Fourmestreaux, A., Lavergne, A., Cantet, F., Mégraud, F., Groupe d'Etude des Lymphomes Digestifs (GELD) for the Fédération Française de Cancérologie Digestive (FFCD), 2003. Which test to use to detect *Helicobacter pylori* infection in patients with low-grade gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma? *Am. J. Gastroenterol.* 98, 291–295. doi:10.1111/j.1572-0241.2003.t011-1-07264.x
228. Leying, H., Suerbaum, S., Geis, G., Haas, R., 1992. Cloning and genetic characterization of a *Helicobacter pylori* flagellin gene. *Mol. Microbiol.* 6, 2863–2874.
229. Liberato, S.L., Galindo, M.H., Álvarez, L.T., Miramón, F.S., Ciriza, S.L., Abadía, A.G., Rodríguez, P.C., 2005. Infección por *Helicobacter pylori* en población infantil: prevalencia, factores asociados e influencia sobre el crecimiento, in: *Anales de Pediatría*. Elsevier, pp. 489–494.
230. Linz, B., Balloux, F., Moodley, Y., Manica, A., Liu, H., Roumagnac, P., Falush, D., Stamer, C., Prugnolle, F., van der Merwe, S.W., others, 2007. An African origin for the intimate association between humans and *Helicobacter pylori*. *Nature* 445, 915–918.
231. Liu, J., He, C., Chen, M., Wang, Z., Xing, C., Yuan, Y., 2013. Association of presence/absence and on/off patterns of *Helicobacter pylori* *oipA* gene with peptic ulcer disease and gastric cancer risks: a meta-analysis. *BMC Infect. Dis.* 13, 1.
232. Loyd, R.A., McCLELLAN, D.A., 2011. Update on the evaluation and management of functional dyspepsia. *Am. Fam. Physician* 83, 547.
233. Lu, H., Hsu, P.-I., Graham, D.Y., Yamaoka, Y., 2005. Duodenal ulcer promoting gene of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 128, 833–848.
234. 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.
235. Lupetti, P., Heuser, J.E., Manetti, R., Massari, P., Lanzavecchia, S., Bellon, P.L., Dallai, R., Rappuoli, R., Telford, J.L., 1996. Oligomeric and subunit structure of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin. *J. Cell Biol.* 133, 801–807.
236. Mackowiak, P.A., 1982. The normal microbial flora. *N. Engl. J. Med.* 307, 83–93.
237. Mahdavi, J., Sondén, B., Hurtig, M., Olfat, F.O., Forsberg, L., Roche, N., Ångström, J., Larsson, T., Teneberg, S., Karlsson, K.-A., others, 2002. *Helicobacter pylori* SabA adhesin in persistent infection and chronic inflammation. *Science* 297, 573–578.
238. Maherzi, A., Bouaziz Abed, A., Fendri, C., Oubich, F., Koubaa, C., Fauchere, J., Bousnina, S., 2003. Infection à *Helicobacter pylori* : étude prospective chez les enfants tunisiens asymptomatiques. *Arch. Pédiatrie* 10, 204–207. doi:10.1016/S0929-693X(03)00322-1

Bibliographie

239. Mai, U.E., Perez-Perez, G.I., Wahl, L.M., Wahl, S.M., Blaser, M.J., Smith, P.D., 1991. Soluble surface proteins from *Helicobacter pylori* activate monocytes/macrophages by lipopolysaccharide-independent mechanism. *J. Clin. Invest.* 87, 894.
240. Maillet, A., Garnier, M., Quellard, N., Fernandez, B., Fauchère, J., Burucoa, C., 2005. DNA transfer from coccoid to bacillary forms of *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* 10, 458.
241. Makobongo, M.O., Einck, L., Peek, R.M., Merrell, D.S., 2013. In Vitro Characterization of the Anti-Bacterial Activity of SQ109 against *Helicobacter pylori*. *PLoS ONE* 8, e68917. doi:10.1371/journal.pone.0068917
242. Makristathis, A., Hirschl, A.M., Lehours, P., Mégraud, F., 2004. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 9 Suppl 1, 7–14. doi:10.1111/j.1083-4389.2004.00254.x
243. Makristathis, A., Pasching, E., Schütze, K., Wimmer, M., Rotter, M.L., Hirschl, A.M., 1998. Detection of *Helicobacter pylori* in stool specimens by PCR and antigen enzyme immunoassay. *J. Clin. Microbiol.* 36, 2772–2774.
244. 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., others, 2012. Management of *Helicobacter pylori* infection—the Maastricht IV/Florence consensus report. *Gut* 61, 646–664.
245. 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. doi:10.1136/gutjnl-2016-312288
246. Malfertheiner, P., Mégraud, F., O’Morain, C., Hungin, A.P.S., Jones, R., Axon, A., Graham, D.Y., Tytgat, G., 2002. Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection—The Maastricht 2-2000 Consensus Report. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 16, 167–180.
247. Mansour, K.B., Burucoa, C., Zribi, M., Masmoudi, A., Karoui, S., Kallel, L., Chouaib, S., Matri, S., Fekih, M., Zarrouk, S., others, 2010a. 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.
248. Mansour, K.B., Fendri, C., Zribi, M., Masmoudi, A., Labbene, M., Fillali, A., Mami, N.B., Najjar, T., Meherzi, A., Sfar, T., others, 2010b. Prevalence of *Helicobacter pylori* vacA, cagA, iceA and oipA genotypes in Tunisian patients. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 9, 10.
249. Mansour, K.B., 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., Najjar, T., Fendri, C., 2010. Seroprevalence of *Helicobacter pylori* among Tunisian blood donors (outpatients), symptomatic patients and control subjects. *Gastroentérologie Clin. Biol.* 34, 75–82. doi:10.1016/j.gcb.2009.06.015

Bibliographie

250. 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. doi:10.1016/S0923-2508(03)00030-5
251. Marais, A., Mendz, G.L., Hazell, S.L., Mégraud, F., 1999. Metabolism and genetics of *Helicobacter pylori*: the genome era. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63, 642–674.
252. Maroye, P., 1999. Diagnostic biologique de l'infection à *Helicobacter pylori*. *Rev. Fr. Lab.* 1999, 47–54.
253. Marshall, B., Warren, J.R., 1984. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *The Lancet* 323, 1311–1315.
254. 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.
255. Marshall, B.J., Goodwin, C.S., 1987. Notes: Revised Nomenclature of *Campylobacter pyloridis*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 37, 68–68.
256. Marshall, B.J., Royce, H., Annear, D.I., Goodwin, C.S., Pearman, J.W., Warren, J.R., Armstrong, J.A., 1984. Original isolation of *Campylobacter pyloridis* from human gastric mucosa. *Microbios Lett.* 25, 83–88.
257. Matos, J.I., de Sousa, H.A., Marcos-Pinto, R., Dinis-Ribeiro, M., 2013. *Helicobacter pylori* CagA and VacA genotypes and gastric phenotype: a meta-analysis. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 25, 1431–1441.
258. Matsunari, O., Shiota, S., Suzuki, R., Watada, M., Kinjo, N., Murakami, K., Fujioka, T., Kinjo, F., Yamaoka, Y., 2012. Association between *Helicobacter pylori* Virulence Factors and Gastroduodenal Diseases in Okinawa, Japan. *J. Clin. Microbiol.* 50, 876–883. doi:10.1128/JCM.05562-11
259. Matysiak-Budnik, T., Heyman, M., Mégraud, F., 2004. Perméabilité gastrique et *Helicobacter pylori*. *Gastroentérologie Clin. Biol.* 28, 444–454.
260. McClain, M.S., Schraw, W., Ricci, V., Boquet, P., Cover, T.L., 2000. Acid activation of *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin (VacA) results in toxin internalization by eukaryotic cells. *Mol. Microbiol.* 37, 433–442.
261. 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. doi:10.1186/1471-2164-10-3
262. McColl, K.E., El-Omar, E., Gillen, D., 2000. *Helicobacter pylori* gastritis and gastric physiology. *Gastroenterol. Clin. North Am.* 29, 687–703.
263. McMahon, B.J., Hennessy, T.W., Bensler, J.M., Bruden, D.L., Parkinson, A.J., Morris, J.M., Reasonover, A.L., Hurlburt, D.A., Bruce, M.G., Sacco, F., others, 2003. The relationship among previous antimicrobial use, antimicrobial resistance, and treatment outcomes for *Helicobacter pylori* infections. *Ann. Intern. Med.* 139, 463–469.
264. McNicholl, A.G., Marin, A.C., Molina-Infante, J., Castro, M., Barrio, J., Ducons, J., Calvet, X., de la Coba, C., Montoro, M., Bory, F., Perez-Aisa, A., Forné, M., Gisbert, J.P., Participant Centres, 2014. Randomised clinical trial comparing sequential and

- concomitant therapies for *Helicobacter pylori* eradication in routine clinical practice. *Gut* 63, 244–249. doi:10.1136/gutjnl-2013-304820
265. Mégraud, F., 2010. Infection à *Helicobacter pylori* : bonnes pratiques. *Presse Médicale* 39, 815–822. doi:10.1016/j.lpm.2010.04.004
266. 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
267. Megraud, F., 2004. *H pylori* antibiotic resistance: prevalence, importance, and advances in testing. *Gut* 53, 1374–1384.
268. MÉGRAUD, F., 2003. Quand et comment s' infecte-t-on par *Helicobacter pylori*? *Gastroentérologie Clin. Biol.* 27, 374–379.
269. Mégraud, F., Bénéjat, L., Ngoyi, E.N.O., Lehours, P., 2015. Molecular approaches to identify *Helicobacter pylori* antimicrobial resistance. *Gastroenterol. Clin. North Am.* 44, 577–596.
270. Megraud, 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.
271. Megraud, F., Coenen, S., Versporten, A., Kist, M., Lopez-Brea, M., Hirschl, A.M., Andersen, L.P., Goossens, H., Glupczynski, Y., Alarcon, T., others, 2013. *Helicobacter pylori* resistance to antibiotics in Europe and its relationship to antibiotic consumption. *Gut* 62, 34–42.
272. Mégraud, F., Lehn, N., Lind, T., Bayerdörffer, E., O'Morain, C., Spiller, R., Unge, P., van Zanten, S.V., Wrangstadh, M., Burman, C.F., 1999. Antimicrobial Susceptibility Testing of *Helicobacter pylori* in a Large Multicenter Trial: the MACH 2 Study. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43, 2747–2752.
273. Megraud, F., Lehours, P., 2007. *Helicobacter pylori* Detection and Antimicrobial Susceptibility Testing. *Clin. Microbiol. Rev.* 20, 280–322. doi:10.1128/CMR.00033-06
274. Mentis, A., Lehours, P., Mégraud, F., 2015. Epidemiology and Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 20, 1–7. doi:10.1111/hel.12250
275. Midolo, P., Marshall, B.J., 2000. Accurate diagnosis of *Helicobacter pylori*: urease tests. *Gastroenterol. Clin. North Am.* 29, 871–878.
276. Miendje Deyi, V.Y., Burette, A., Bentatou, Z., Maaroufi, Y., Bontems, P., Lepage, P., Reynders, M., 2011. Practical use of GenoType® HelicoDR, a molecular test for *Helicobacter pylori* detection and susceptibility testing. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 70, 557–560. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2011.05.002
277. Mizushima, T., Sugiyama, T., Komatsu, Y., Ishizuka, J., Kato, M., Asaka, M., 2001. Clinical relevance of the babA2 genotype of *Helicobacter pylori* in Japanese clinical isolates. *J. Clin. Microbiol.* 39, 2463–2465.

Bibliographie

278. Moll, G., Papini, E., Colonna, R., Burroni, D., Telford, J., Rappuoli, R., Montecucco, C., 1995. Lipid Interaction of the 37-kDa and 58-kDa Fragments of the *Helicobacter Pylori* Cytotoxin. *Eur. J. Biochem.* 234, 947–952.
279. Montalban, C., Norman, F., 2006. Treatment of gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma: *Helicobacter pylori* eradication and beyond. *Expert Rev. Anticancer Ther.* 6, 361–371.
280. Moodley, Y., Linz, B., Bond, R.P., Nieuwoudt, M., Soodyall, H., Schlebusch, C.M., Bernhöft, S., Hale, J., Suerbaum, S., Mugisha, L., van der Merwe, S.W., Achtman, M., 2012. Age of the Association between *Helicobacter pylori* and Man. *PLoS Pathog.* 8, e1002693. doi:10.1371/journal.ppat.1002693
281. 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.
282. Morais, S., Costa, A.R., Ferro, A., Lunet, N., Peleteiro, B., 2017. Contemporary migration patterns in the prevalence of *Helicobacter pylori* infection: A systematic review. *Helicobacter* 22, e12372. doi:10.1111/hel.12372
283. Moran, A.P., 1999. *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide-mediated gastric and extragastric pathology. *J. Physiol. Pharmacol. Off. J. Pol. Physiol. Soc.* 50, 787–805.
284. Moran, A.P., Aspinall, G.O., 1997. Unique structural and biological features of *Helicobacter pylori* lipopolysaccharides. *Prog. Clin. Biol. Res.* 397, 37–49.
285. Mustapha, P., 2011. Etude des interactions entre *Helicobacter pylori* et les cellules épithéliales gastriques (phdthesis). Université de Poitiers. Available from: <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00742960/document>
286. Nahon, S., Lahmek, P., Massard, J., Lesgourgues, B., Serre, D., Mariaud, N., Traissac, L., Bodiguel, V., Adotti, F., Delas, N., 2003. *Helicobacter pylori*-Associated Chronic Gastritis and Unexplained Iron Deficiency Anemia: a Reliable Association? *Helicobacter* 8, 573–577.
287. Nakayama, M., Hisatsune, J., Yamasaki, E., Nishi, Y., Wada, A., Kurazono, H., Sap, J., Yahiro, K., Moss, J., Hirayama, T., 2006. Clustering of *Helicobacter pylori* VacA in lipid rafts, mediated by its receptor, receptor-like protein tyrosine phosphatase β , is required for intoxication in AZ-521 cells. *Infect. Immun.* 74, 6571–6580.
288. 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
289. Nguyen, L.T., Uchida, T., Tsukamoto, Y., Kuroda, A., Okimoto, T., Kodama, M., Murakami, K., Fujioka, T., Moriyama, M., 2010. *Helicobacter pylori* dupA gene is not associated with clinical outcomes in the Japanese population. *Clin. Microbiol. Infect.* 16, 1264–1269. doi:10.1111/j.1469-0691.2009.03081.x

Bibliographie

290. Nista, E.C., Candelli, M., Cremonini, F., Cazzato, I.A., Zocco, M.A., Franceschi, F., Cammarota, G., Gasbarrini, G., Gasbarrini, A., 2004. Bacillus clausii therapy to reduce side-effects of anti-Helicobacter pylori treatment: randomized, double-blind, placebo controlled trial. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 20, 1181–1188.
291. Obst, B., Wagner, S., Sewing, K.F., Beil, W., 2000. Helicobacter pylori causes DNA damage in gastric epithelial cells. *Carcinogenesis* 21, 1111–1115.
292. Occhialini, A., Marais, A., Alm, R., Garcia, F., Sierra, R., Mégraud, F., 2000. Distribution of open reading frames of plasticity region of strain J99 in Helicobacter pylori strains isolated from gastric carcinoma and gastritis patients in Costa Rica. *Infect. Immun.* 68, 6240–6249.
293. 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.
294. 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.
295. O'Connor, A., Gisbert, J.P., O'Morain, C., Ladas, S., 2015. Treatment of Helicobacter pylori Infection 2015. *Helicobacter* 20 Suppl 1, 54–61. doi:10.1111/hel.12258
296. 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.
297. 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.
298. Odenbreit, S., Till, M., Hofreuter, D., Haas, R., 1997. Outer membrane proteins alpha and alpb are involved in H. pylori binding to gastric epithelial cells 10/391. *Gut* 41, 107A.
299. Ogiwara, H., Graham, D.Y., Yamaoka, Y., 2008. vacA i-region subtyping. *Gastroenterology* 134, 1267.
300. 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 gastroduodenal diseases. *J. Clin. Microbiol.* 47, 3493–3500.
301. Oh, J.D., Kling-Bäckhed, H., Giannakis, M., Xu, J., Fulton, R.S., Fulton, L.A., Cordum, H.S., Wang, C., Elliott, G., Edwards, J., others, 2006. The complete genome sequence of a chronic atrophic gastritis Helicobacter pylori strain: evolution during disease progression. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 9999–10004.
302. Ohnishi, N., Yuasa, H., Tanaka, S., Sawa, H., Miura, M., Matsui, A., Higashi, H., Musashi, M., Iwabuchi, K., Suzuki, M., others, 2008. Transgenic expression of

Bibliographie

- Helicobacter pylori* CagA induces gastrointestinal and hematopoietic neoplasms in mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 1003–1008.
303. Okuda, M., Miyashiro, E., Koike, M., Tanaka, T., Bouoka, M., Okuda, S., Yoshikawa, N., 2002. Serodiagnosis of *Helicobacter pylori* infection is not accurate for children aged below 10. *Pediatr. Int.* 44, 387–390.
304. 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.
305. Oleastro, M., Cordeiro, R., Ferrand, J., Nunes, B., Lehours, P., Carvalho-Oliveira, I., Mendes, A.I., Penque, D., Monteiro, L., Mégraud, F., others, 2008. Evaluation of the Clinical Significance of homB a Novel Candidate Marker of *Helicobacter pylori* Strains Associated with Peptic Ulcer Disease. *J. Infect. Dis.* 198, 1379–1387.
306. Oleastro, M., Ménard, A., 2013. The Role of *Helicobacter pylori* Outer Membrane Proteins in Adherence and Pathogenesis. *Biology* 2, 1110–1134. doi:10.3390/biology2031110
307. Oleastro, M., Menard, A., Santos, A., Lamouliatte, H., Monteiro, L., Barthelemy, P., 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. doi:10.1128/JCM.41.1.397-402.2003
308. Oleastro, M., Rocha, R., Vale, F.F., 2017. Population genetic structure of *Helicobacter pylori* strains from Portuguese-speaking countries. *Helicobacter*.
309. On, S.L., Hynes, S., Wadström, T., 2002. Extragastric *Helicobacter* species. *Helicobacter* 7, 63–67.
310. 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., Megraud, F., 2015. Molecular Detection of *Helicobacter pylori* and its Antimicrobial Resistance in Brazzaville, Congo. *Helicobacter* 20, 316–320. doi:10.1111/hel.12204
311. Ottemann, K.M., Lowenthal, A.C., 2002. *Helicobacter pylori* uses motility for initial colonization and to attain robust infection. *Infect. Immun.* 70, 1984–1990.
312. Owen, R.J., 2002. Molecular testing for antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*. *Gut* 50, 285–289.
313. Owen, R.J., 1998. *Helicobacter*-species classification and identification. *Br. Med. Bull.* 54, 17–30.
314. Palmer, E.D., 1954. Investigation of the gastric mucosa spirochetes of the human. *Gastroenterology* 27, 218.
315. Papini, E., Bugnoli, M., Bernard, M., Figura, N., Rappuoli, R., Montecucco, C., 1993. Bafilomycin A1 inhibits *Helicobacter pylori*-induced vacuolization of HeLa cells. *Mol. Microbiol.* 7, 323–327.

Bibliographie

316. Papini, E., De Bernard, M., Milia, E., Bugnoli, M., Zerial, M., Rappuoli, R., Montecucco, C., 1994. Cellular vacuoles induced by *Helicobacter pylori* originate from late endosomal compartments. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91, 9720–9724.
317. Papini, E., Satin, B., Bucci, C., de Bernard, M., Telford, J.L., Manetti, R., Rappuoli, R., Zerial, M., Montecucco, C., 1997. The small GTP binding protein rab7 is essential for cellular vacuolation induced by *Helicobacter pylori* cytotoxin. *EMBO J.* 16, 15–24.
318. Papini, E., Satin, B., Norais, N., de Bernard, M., Telford, J.L., Rappuoli, R., Montecucco, C., 1998. Selective increase of the permeability of polarized epithelial cell monolayers by *Helicobacter pylori* vacuolating toxin. *J. Clin. Invest.* 102, 813.
319. Park, C.-Y., Kwak, M., Gutierrez, O., Graham, D.Y., Yamaoka, Y., 2003. Comparison of Genotyping *Helicobacter pylori* Directly from Biopsy Specimens and Genotyping from Bacterial Cultures. *J. Clin. Microbiol.* 41, 3336–3338. doi:10.1128/JCM.41.7.3336-3338.2003
320. Parsonnet, J., Friedman, G.D., Orentreich, N., Vogelmann, H., 1997. Risk for gastric cancer in people with CagA positive or CagA negative *Helicobacter pylori* infection. *Gut* 40, 297–301.
321. Parsonnet, J., Shmueli, H., Haggerty, T., 1999. Fecal and oral shedding of *Helicobacter pylori* from healthy infected adults. *Jama* 282, 2240–2245.
322. 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
323. Paul, W.O., Lane, M.C., Porwollik, S., others, 2000. *Helicobacter pylori* motility. *Microbes Infect.* 2, 1207–1214.
324. Peck, B., Ortkamp, M., Diehl, K.D., Hundt, E., Knapp, B., 1999. Conservation, localization and expression of HopZ, a protein involved in adhesion of *Helicobacter pylori*. *Nucleic Acids Res.* 27, 3325–3333.
325. Pelicic, V., Reytrat, J.-M., Sartori, L., Pagliaccia, C., Rappuoli, R., Telford, J.L., Montecucco, C., Papini, E., 1999. *Helicobacter pylori* VacA cytotoxin associated with the bacteria increases epithelial permeability independently of its vacuolating activity. *Microbiology* 145, 2043–2050.
326. Perets, T.T., Shporn, E., Boltin, D., Dickman, R., Niv, Y., 2016. Stability of (13) C-Urea Breath Test Samples Over Time in the Diagnosis of *Helicobacter pylori*. *J. Clin. Lab. Anal.* 30, 231–234.
327. Pinto-Santini, D.M., Salama, N.R., 2009. Cag3 is a novel essential component of the *Helicobacter pylori* Cag type IV secretion system outer membrane subcomplex. *J. Bacteriol.* 191, 7343–7352. doi:10.1128/JB.00946-09
328. Poppe, M., Feller, S.M., Römer, G., Wessler, S., 2007. Phosphorylation of *Helicobacter pylori* CagA by c-Abl leads to cell motility. *Oncogene* 26, 3462–3472. doi:10.1038/sj.onc.1210139

Bibliographie

329. Price, A.B., 1996. The histological recognition of *Helicobacter pylori*. *Helicobacter Pylori-Tech. Clin. Diagn. Basic Res. Lond. Saunders* 33–49.
330. Queiroz, D.M., Rocha, G.A., Rocha, A.M., Moura, S.B., Saraiva, I.E., Gomes, L.I., Soares, T.F., Melo, F.F., Cabral, M.M., Oliveira, C.A., 2011. *dupA* polymorphisms and risk of *Helicobacter pylori*-associated diseases. *Int. J. Med. Microbiol.* 301, 225–228.
331. Raghavan, S., Quiding-Järbrink, M., 2016. Vaccination Against *Helicobacter pylori* Infection, in: Backert, S., Yamaoka, Y. (Eds.), *Helicobacter Pylori Research*. Springer Japan, Tokyo, pp. 575–601.
332. 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. *J. Dig. Dis.* 15, 622–627. doi:10.1111/1751-2980.12186
333. Reyrat, J.-M., Lanzavecchia, S., Lupetti, P., de Bernard, M., Pagliaccia, C., Pelicic, V., Charrel, M., Ulivieri, C., Norais, N., Ji, X., others, 1999. 3D imaging of the 58 kDa cell binding subunit of the *Helicobacter pylori* cytotoxin. *J. Mol. Biol.* 290, 459–470.
334. 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.
335. Ribeiro, M.L., Gerrits, M.M., Benvengo, Y.H., Berning, M., Godoy, A.P., Kuipers, E.J., Mendonça, S., van Vliet, A.H., Pedrazzoli, J., Kusters, J.G., 2004. Detection of high-level tetracycline resistance in clinical isolates of *Helicobacter pylori* using PCR-RFLP. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 40, 57–61.
336. Ricci, V., Sommi, P., Fiocca, R., Romano, M., Solcia, E., Ventura, U., 1997. *Helicobacter pylori* vacuolating toxin accumulates within the endosomal-vacuolar compartment of cultured gastric cells and potentiates the vacuolating activity of ammonia. *J. Pathol.* 183, 453–459.
337. RICHY, F., MÉGRAUD, F., 2003. L'infection par *Helicobacter pylori* responsable d'affection extra-digestives: mythe ou réalité? *Gastroentérologie Clin. Biol.* 27, 459–466.
338. 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*. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 279–287.
339. Rohde, M., Püls, J., Buhrdorf, R., Fischer, W., Haas, R., 2003. A novel sheathed surface organelle of the *Helicobacter pylori* cag type IV secretion system. *Mol. Microbiol.* 49, 219–234.
340. Rollan, A., Giancaspero, R., Fuster, F., Acevedo, C., Figueroa, C., Hola, K., Schulz, M., Duarte, I., 2000. The long-term reinfection rate and the course of duodenal ulcer disease after eradication of *Helicobacter pylori* in a developing country. *Am. J. Gastroenterol.* 95, 50–56.

Bibliographie

341. Rothenbacher, D., Brenner, H., 2003. Burden of *Helicobacter pylori* and *H. pylori*-related diseases in developed countries: recent developments and future implications. *Microbes Infect.* 5, 693–703.
342. Rowland, M., Daly, L., Vaughan, M., Higgins, A., Bourke, B., Drumm, B., 2006. Age-Specific Incidence of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 130, 65–72. doi:10.1053/j.gastro.2005.11.004
343. Ruskoné-Fourmestraux, A., Fischbach, W., Aleman, B.M.P., Boot, H., Du, M.Q., Megraud, F., Montalban, C., Raderer, M., Savio, A., Wotherspoon, A., others, 2011. EGILS consensus report. Gastric extranodal marginal zone B-cell lymphoma of MALT. *Gut* 60, 747–758.
344. Saadat, I., Higashi, H., Obuse, C., Umeda, M., Murata-Kamiya, N., Saito, Y., Lu, H., Ohnishi, N., Azuma, T., Suzuki, A., Ohno, S., Hatakeyama, M., 2007. *Helicobacter pylori* CagA targets PAR1/MARK kinase to disrupt epithelial cell polarity. *Nature* 447, 330–333. doi:10.1038/nature05765
345. Sachdeva, A., Nagpal, J., 2009. Effect of fermented milk-based probiotic preparations on *Helicobacter pylori* eradication: a systematic review and meta-analysis of randomized-controlled trials. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 21, 45–53.
346. 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.
347. Salomon, H., 1896. Über das Spirillum des Säugetiermagens und sein Verhalten zu den Belegzellen. G. Fischer.
348. Sapmaz, F., Kalkan, I.H., Atasoy, P., Basyigit, S., Guliter, S., 2015. A Non-Inferiority Study: Modified Dual Therapy Consisting Higher Doses of Rabeprazole Is as Successful as Standard Quadruple Therapy in Eradication of *Helicobacter pylori*. *Am. J. Ther.*
349. 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* 18, 129–134. doi:10.1111/hel.12017
350. Satin, B., Norais, N., Rappuoli, R., Telford, J., Murgia, M., Montecucco, C., Papini, E., 1997. Effect of *Helicobacter pylori* vacuolating toxin on maturation and extracellular release of procathepsin D and on epidermal growth factor degradation. *J. Biol. Chem.* 272, 25022–25028.
351. Schabereiter-Gurtner, C., Hirschl, A.M., Dragosics, B., Hufnagl, P., Puz, S., Kovách, Z., Rotter, M., Makristathis, A., 2004. Novel real-time PCR assay for detection of *Helicobacter pylori* infection and simultaneous clarithromycin susceptibility testing of stool and biopsy specimens. *J. Clin. Microbiol.* 42, 4512–4518.
352. Scott, D.R., Weeks, D., Hong, C., Postius, S., Melchers, K., Sachs, G., 1998. The role of internal urease in acid resistance of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 114, 58–70.

Bibliographie

353. Segal, E.D., Cha, J., Lo, J., Falkow, S., Tompkins, L.S., 1999. Altered states: involvement of phosphorylated CagA in the induction of host cellular growth changes by *Helicobacter pylori*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 14559–14564.
354. Selbach, M., Moese, S., Hauck, C.R., Meyer, T.F., Backert, S., 2002. Src is the kinase of the *Helicobacter pylori* CagA protein in vitro and in vivo. *J. Biol. Chem.* 277, 6775–6778. doi:10.1074/jbc.C100754200
355. Seo, J.-H., Park, J.S., Yeom, J.S., Lim, J.-Y., Park, C.-H., Woo, H.-O., Baik, S.-C., Lee, W.-K., Cho, M.-J., Rhee, K.-H., others, 2014. Correlation between positive rate and number of biopsy samples on urease test in childhood *Helicobacter pylori* infection. *J. Korean Med. Sci.* 29, 106–109.
356. Sheu, S.-M., Sheu, B.-S., Chiang, W.-C., Kao, C.-Y., Wu, H.-M., Yang, H.-B., Wu, J.-J., 2012. *H. pylori* clinical isolates have diverse babAB genotype distributions over different topographic sites of stomach with correlation to clinical disease outcomes. *BMC Microbiol.* 12, 89.
357. Shimoyama, T., Fukuda, S., Tanaka, M., Mikami, T., Munakata, A., Crabtree, J.E., 1998. CagA seropositivity associated with development of gastric cancer in a Japanese population. *J. Clin. Pathol.* 51, 225–228.
358. Shiota, S., Matsunari, O., Watada, M., Hanada, K., Yamaoka, Y., 2010a. Systematic review and meta-analysis: the relationship between the *Helicobacter pylori* dupA gene and clinical outcomes. *Gut Pathog.* 2, 13.
359. Shiota, S., Matsunari, O., Watada, M., Yamaoka, Y., 2011. Virulence factors or ancestral origin of *Helicobacter pylori*: which is a better predictor of gastric cancer risk? *Gut gutjnl*–2011.
360. Shiota, S., Matsunari, O., Watada, M., Yamaoka, Y., 2010b. Serum *Helicobacter pylori* CagA antibody as a biomarker for gastric cancer in east-Asian countries. *Future Microbiol.* 5, 1885–1893.
361. 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. doi:10.1111/1751-2980.12054
362. Shirin, H., Levine, A., Shevah, O., Shabat-Sehayek, V., Aeed, H., Wardi, J., Birkenfeld, S., Eliakim, R., Avni, Y., 2005. Eradication of *Helicobacter pylori* can be accurately confirmed 14 days after termination of triple therapy using a high-dose citric acid-based 13C urea breath test. *Digestion* 71, 208–212.
363. Skvarc, M., Kopitar, A.N., Kos, J., Obermajer, N., Tepes, B., 2014. Differences in the Antigens of *Helicobacter pylori* Strains Influence on the Innate Immune Response in the *In Vitro* Experiments. *Mediators Inflamm.* 2014, 1–6. doi:10.1155/2014/287531
364. Smoot, D.T., Resau, J.H., Earlington, M.H., Simpson, M., Cover, T.L., 1996. Effects of *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin on primary cultures of human gastric epithelial cells. *Gut* 39, 795–799.
365. Sommi, P., Ricci, V., Fiocca, R., Necchi, V., Romano, M., Telford, J.L., Solcia, E., Ventura, U., 1998. Persistence of *Helicobacter pylori* VacA toxin and vacuolating

- potential in cultured gastric epithelial cells. *Am. J. Physiol.-Gastrointest. Liver Physiol.* 275, G681–G688.
366. 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.
367. 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.
368. Steer, H.W., 1975. Ultrastructure of cell migration through the gastric epithelium and its relationship to bacteria. *J. Clin. Pathol.* 28, 639–646.
369. 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.
370. Stein, M., Rappuoli, R., Covacci, A., 2000. Tyrosine phosphorylation of the *Helicobacter pylori* CagA antigen after cag-driven host cell translocation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 1263–1268.
371. Stenström, B., Mendis, A., Marshall, B., 2008. *Helicobacter pylori*--the latest in diagnosis and treatment. *Aust. Fam. Physician* 37, 608–612.
372. 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.
373. Suarez, G., Peek, R.M., 2014. *Helicobacter pylori* : expect the unexpected: *Helicobacter pylori* : expect the unexpected. *Mol. Microbiol.* 91, 858–861. doi:10.1111/mmi.12532
374. Suerbaum, S., 2000. Genetic variability within *Helicobacter pylori*. *Int. J. Med. Microbiol.* 290, 175–181.
375. Suerbaum, S., Josenhans, C., 1999. Virulence factors of *Helicobacter pylori*: implications for vaccine development. *Mol. Med. Today* 5, 32–39.
376. 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.
377. Sugimoto, M., Yamaoka, Y., 2009. The association of vacA genotype and *Helicobacter pylori*-related disease in Latin American and African populations. *Clin. Microbiol. Infect.* 15, 835–842.
378. Sun, J., Aoki, K., Zheng, J.-X., Su, B.-Z., Ouyang, X.-H., Misumi, J., 2006. Effect of NaCl and *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin on cytokine expression and viability. *World J. Gastroenterol.* WJG 12, 2174–2180.

Bibliographie

379. Sun, Z.L., Bi, Y.W., Bai, C.M., Gao, D.D., Li, Z.H., Dai, Z.X., Li, J.F., Xu, W.M., 2010. [Expression of helicobacter pylori alpA gene in lactococcus lactis and its immunogenicity analysis]. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi Chin. J. Cell. Mol. Immunol.* 26, 203–206.
380. 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. doi:10.1084/jem.20051027
381. Suzuki, R., Shiota, S., Yamaoka, Y., 2012. Molecular epidemiology, population genetics, and pathogenic role of *Helicobacter pylori*. *Infect. Genet. Evol.* 12, 203–213. doi:10.1016/j.meegid.2011.12.002
382. Szabò, I., Brutsche, S., Tombola, F., Moschioni, M., Satin, B., Telford, J.L., Rappuoli, R., Montecucco, C., Papini, E., Zoratti, M., 1999. Formation of anion-selective channels in the cell plasma membrane by the toxin VacA of *Helicobacter pylori* is required for its biological activity. *EMBO J.* 18, 5517–5527.
383. Szajewska, H., Horvath, A., Piwowarczyk, A., 2010. Meta-analysis: the effects of *Saccharomyces boulardii* supplementation on *Helicobacter pylori* eradication rates and side effects during treatment. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 32, 1069–1079.
384. Tabassam, F.H., Graham, D.Y., Yamaoka, Y., 2009. *Helicobacter pylori* activate epidermal growth factor receptor-and phosphatidylinositol 3-OH kinase-dependent Akt and glycogen synthase kinase 3 β phosphorylation. *Cell. Microbiol.* 11, 70–82.
385. Talarico, S., Whitefield, S.E., Fero, J., Haas, R., Salama, N.R., 2012. Regulation of *Helicobacter pylori* adherence by gene conversion. *Mol. Microbiol.* 84, 1050–1061.
386. Tammer, I., Brandt, S., Hartig, R., König, W., Backert, S., 2007. Activation of Abl by *Helicobacter pylori*: a novel kinase for CagA and crucial mediator of host cell scattering. *Gastroenterology* 132, 1309–1319. doi:10.1053/j.gastro.2007.01.050
387. Tanaka, J., Suzuki, T., Mimuro, H., Sasakawa, C., 2003. Structural definition on the surface of *Helicobacter pylori* type IV secretion apparatus. *Cell. Microbiol.* 5, 395–404.
388. Taneike, I., Goshi, S., Tamura, Y., Wakisaka-Saito, N., Matsumori, N., Yanase, A., Shimizu, T., Yamashiro, Y., Toyoda, S., Yamamoto, T., 2002. Emergence of Clarithromycin-Resistant *Helicobacter pylori* (CRHP) with a High Prevalence in Children Compared with Their Parents. *Helicobacter* 7, 297–305.
389. 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.
390. Tankovic, J., Lamarque, D., Delchier, J.-C., Soussy, C.-J., Labigne, A., Jenks, P.J., 2000. Frequent Association between Alteration of the rdxA Gene and Metronidazole Resistance in French and North African Isolates of *Helicobacter pylori*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44, 608–613. doi:10.1128/AAC.44.3.608-613.2000

Bibliographie

- 391.** 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.
- 392.** Tay, C.Y., Windsor, H.M., Thirriot, F., Lu, W., Conway, C., Perkins, T.T., Marshall, B.J., 2012. *Helicobacter pylori* eradication in Western Australia using novel quadruple therapy combinations. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 36, 1076–1083. doi:10.1111/apt.12089
- 393.** Thiberge, J.-M., Boursaux-Eude, C., Lehours, P., Dillies, M.-A., Creno, S., Coppée, J.-Y., Rouy, Z., Lajus, A., Ma, L., Burucoa, C., others, 2010. From array-based hybridization of *Helicobacter pylori* isolates to the complete genome sequence of an isolate associated with MALT lymphoma. *BMC Genomics* 11, 1.
- 394.** Thung, I., Aramin, H., Vavinskaya, V., Gupta, S., Park, J.Y., Crowe, S.E., Valasek, M.A., 2016. Review article: the global emergence of *Helicobacter pylori* antibiotic resistance. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 43, 514–533. doi:10.1111/apt.13497
- 395.** 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.
- 396.** Tombola, F., Morbiato, L., Del Giudice, G., Rappuoli, R., Zoratti, M., Papini, E., 2001. The *Helicobacter pylori* VacA toxin is a urea permease that promotes urea diffusion across epithelia. *J. Clin. Invest.* 108, 929–937.
- 397.** 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.
- 398.** Tong, J.L., Ran, Z.H., Shen, J., Zhang, C.X., Xiao, S.D., 2007. Meta-analysis: the effect of supplementation with probiotics on eradication rates and adverse events during *Helicobacter pylori* eradication therapy. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 25, 155–168.
- 399.** 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
- 400.** Trebesius, K., Panthel, K., Strobel, S., Vogt, K., Faller, G., Kirchner, T., Kist, M., Heesemann, J., Haas, R., 2000. Rapid and specific detection of *Helicobacter pylori* macrolide resistance in gastric tissue by fluorescent in situ hybridisation. *Gut* 46, 608–614.
- 401.** 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.
- 402.** Uotani, T., Graham, D.Y., 2015. Diagnosis of *Helicobacter pylori* using the rapid urease test. *Ann. Transl. Med.* 3.

Bibliographie

403. van Amsterdam, K., Bart, A., van der Ende, A., 2005. A *Helicobacter pylori* TolC efflux pump confers resistance to metronidazole. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 1477–1482.
404. 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.
405. van Doorn, L.-J., Figueiredo, C., Sanna, R., Pena, S., Midolo, P., Ng, E.K., Atherton, J.C., Blaser, M.J., Quint, W.G., 1998a. Expanding allelic diversity of *Helicobacter pylori* vacA. *J. Clin. Microbiol.* 36, 2597–2603.
406. van Doorn, L.-J., Figueiredo, C., Sanna, R., Plaisier, A., Schneeberger, P., de Boer, W., Quint, W., 1998b. Clinical relevance of the cagA, vacA, and iceA status of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 115, 58–66.
407. 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.
408. 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. doi:10.1038/ni1131
409. Vinion-Dubiel, A.D., McClain, M.S., Czajkowsky, D.M., Iwamoto, H., Ye, D., Cao, P., Schraw, W., Szabo, G., Blanke, S.R., Shao, Z., others, 1999. A Dominant Negative Mutant of *Helicobacter pylori* Vacuolating Toxin (VacA) Inhibits VacA-induced Cell Vacuolation. *J. Biol. Chem.* 274, 37736–37742.
410. 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* 20, 79–88. doi:10.1111/hel.12180
411. Wang, G.E., Humayun, M.Z., Taylor, D.E., 1999. Mutation as an origin of genetic variability in *Helicobacter pylori*. *Trends Microbiol.* 7, 488–493.
412. Wang, J., Xu, L., Shi, R., Huang, X., Li, S.W.H., Huang, Z., Zhang, G., 2011. Gastric atrophy and intestinal metaplasia before and after *Helicobacter pylori* eradication: a meta-analysis. *Digestion* 83, 253–260.
413. Wang, Z.-H., Gao, Q.-Y., Fang, J.-Y., 2013. Meta-analysis of the efficacy and safety of Lactobacillus-containing and Bifidobacterium-containing probiotic compound preparation in *Helicobacter pylori* eradication therapy. *J. Clin. Gastroenterol.* 47, 25–32.
414. Warren, J.R., Marshall, B., 1983. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *The Lancet* 321, 1273–1275.
415. Weeks, D.L., Eskandari, S., Scott, D.R., Sachs, G., 2000. A H⁺-gated urea channel: the link between *Helicobacter pylori* urease and gastric colonization. *Science* 287, 482–485.

Bibliographie

416. Wei, J., Noto, J.M., Zaika, E., Romero-Gallo, J., Piazzuelo, M.B., Schneider, B., El-Rifai, W., Correa, P., Peek, R.M., Zaika, A.I., 2015. Bacterial CagA protein induces degradation of p53 protein in a p14ARF-dependent manner. *Gut* 64, 1040–1048.
417. Wirth, T., Wang, X., Linz, B., Novick, R.P., Lum, J.K., Blaser, M., Morelli, G., Falush, D., Achtman, M., 2004. Distinguishing human ethnic groups by means of sequences from *Helicobacter pylori*: lessons from Ladakh. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 4746–4751.
418. Wisessombat, S., Meethai, C., Hamgo, S., 2014. A new biphasic test for the detection of *Helicobacter pylori* in gastric biopsies. *J. Microbiol. Methods* 96, 19–24. doi:10.1016/j.mimet.2013.10.010
419. Wizla-Derambure, N., Michaud, L., Ategbo, S., Vincent, P., Ganga-Zandzou, S., Turck, D., Gottrand, F., 2001. Familial and community environmental risk factors for *Helicobacter pylori* infection in children and adolescents. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 33, 58–63.
420. Wong, B.C.-Y., Lam, S.K., Wong, W.M., Chen, J.S., Zheng, T.T., Feng, R.E., Lai, K.C., Hu, W.H.C., Yuen, S.T., Leung, S.Y., others, 2004. *Helicobacter pylori* eradication to prevent gastric cancer in a high-risk region of China: a randomized controlled trial. *Jama* 291, 187–194.
421. Woodward, M., Morrison, C., McColl, K., 2000. An investigation into factors associated with *Helicobacter pylori* infection. *J. Clin. Epidemiol.* 53, 175–181.
422. 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.
423. 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
424. Xia, Y., Yamaoka, Y., Zhu, Q., Matha, I., Gao, X., 2010. Correction: A Comprehensive Sequence and Disease Correlation Analyses for the C-Terminal Region of CagA Protein of *Helicobacter pylori*. *PLoS ONE* 5.
425. Xue, J., Bai, Y., Chen, Y., Wang, J.-D., Zhang, Z.-S., Zhang, Y.-L., Zhou, D.-Y., 2005. Expression of *Helicobacter pylori* AlpA protein and its immunogenicity. *World J. Gastroenterol.* 11, 2260–2263.
426. Yahiro, K., Niidome, T., Kimura, M., Hatakeyama, T., Aoyagi, H., Kurazono, H., Imagawa, K., Wada, A., Moss, J., Hirayama, T., 1999. Activation of *Helicobacter pylori* VacA toxin by alkaline or acid conditions increases its binding to a 250-kDa receptor protein-tyrosine phosphatase β . *J. Biol. Chem.* 274, 36693–36699.
427. Yahiro, K., Wada, A., Nakayama, M., Kimura, T., Ogushi, K., Niidome, T., Aoyagi, H., Yoshino, K., Yonezawa, K., Moss, J., others, 2003. Protein-tyrosine phosphatase α , RPTP α , is a *Helicobacter pylori* VacA receptor. *J. Biol. Chem.* 278, 19183–19189.
428. Yamamoto, Y., 2002. Anti-*Helicobacter pylori* Activity of Natural Substances, in: *Helicobacter Pylori Infection and Immunity*. Springer, pp. 105–119.

Bibliographie

429. Yamamoto, Y., Friedman, H., Hoffman, P.S. (Eds.), 2002. *Helicobacter pylori* Infection and Immunity, Infectious Agents and Pathogenesis. Springer US, Boston, MA.
430. Yamaoka, Y., 2012. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* -Related Gastrointestinal Diseases from Molecular Epidemiological Studies. *Gastroenterol. Res. Pract.* 2012, 1–9. doi:10.1155/2012/371503
431. Yamaoka, Y., 2010. Mechanisms of disease: *Helicobacter pylori* virulence factors. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* doi:10.1038/nrgastro.2010.154
432. Yamaoka, Y., Kodama, T., Kashima, K., Graham, D.Y., 1999. Antibody against *Helicobacter pylori* CagA and VacA and the risk for gastric cancer. *J. Clin. Pathol.* 52, 215–218.
433. 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 gastrointestinal disease. *Gut* 55, 775–781.
434. 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. doi:10.1016/j.cgh.2014.10.036
435. Yoo, N.J., Park, W.S., Kim, S.Y., Reed, J.C., Son, S.G., Lee, J.Y., Lee, S.H., 2002. Nod1, a CARD protein, enhances pro-interleukin-1 β processing through the interaction with pro-caspase-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 299, 652–658.
436. Yoon, H., Lee, D.H., Lee, A.-R., Hwang, J.J., Shin, C.M., Soo, Y., Park, N.K., Jung, H.C., Song, I.S., 2015. The Effects of N-Acetylcysteine on First-Line Sequential Therapy for *Helicobacter pylori* Infection: A Randomized Controlled Pilot Trial. *Gut Liver.*
437. Zabaleta, J., 2012. Multifactorial etiology of gastric cancer. *Cancer Epigenetics Methods Protoc.* 411–435.
438. Zaidi, S.F.H., Yamada, K., Kadowaki, M., Usmanhani, K., Sugiyama, T., 2009. Bactericidal activity of medicinal plants, employed for the treatment of gastrointestinal ailments, against *Helicobacter pylori*. *J. Ethnopharmacol.* 121, 286–291. doi:10.1016/j.jep.2008.11.001
439. Zendejdel, N., NASSERI-MOGHADDAM, S., Malekzadeh, R., Massarrat, S., Sotoudeh, M., Siavoshi, F., 2005. *Helicobacter pylori* reinfection rate 3 years after successful eradication. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 20, 401–404.
440. 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., others, 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.
441. Zhang, H., Liu, M., Li, Y., Zhao, Y., He, H., Yang, G., Zheng, C., 2010. Oral immunogenicity and protective efficacy in mice of a carrot-derived vaccine candidate

- expressing UreB subunit against *Helicobacter pylori*. *Protein Expr. Purif.* 69, 127–131. doi:10.1016/j.pep.2009.07.016
442. 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
443. 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.
444. 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.

ANNEXES

Annexe 1 : Fiche de renseignements des patients recrutés pour l'étude

HOPITAL DE BOLOGHINE
LABORATOIRE CENTRAL DE BIOLOGIE
UNITE DE MICROBIOLOGIE
Pr W. AMHIS

RECHERCHE DE *Helicobacter pylori*

N° d'ordre :

Nom : Prénom : Age : Sexe :

Service : Date de Prélèvement : **N° de tel** :

Pathologie :

Ulçère	<input type="checkbox"/>	▶	Gastrique	<input type="checkbox"/>
Gastrites	<input type="checkbox"/>	▶	Duodénal	<input type="checkbox"/>
Lymphome	<input type="checkbox"/>			
Carcinome	<input type="checkbox"/>			
Maladie cœliaque	<input type="checkbox"/>			
Contrôle d'éradication	<input type="checkbox"/>			
Autres	<input type="checkbox"/>		

Sites de prélèvement :

Antre	<input type="checkbox"/>
Fundus	<input type="checkbox"/>

Traitement antérieur : Oui Non

Amoxicilline	<input type="checkbox"/>	Arrêt ATB > 1 mois	<input type="checkbox"/>
Clarithromicine	<input type="checkbox"/>		
Métromidazole	<input type="checkbox"/>		
IPP	<input type="checkbox"/>	Arrêt IPP > 2 semaines	<input type="checkbox"/>
Autres		

Annexe 2 : Communications

- **Raaf Naïma**, Amhis W, Benejat L, Megraud F. « Intérêt de la biologie moléculaire dans la détection des colonisations mixtes de *Helicobacter pylori* ». **Communication affichée** lors du 7^{ème} Congrès de la biologie médicale et médecine de laboratoire de la Société Algérienne de Biologie Clinique (SABC). Mai 2017.
- **Raaf Naïma**, Amhis W, Nakmouche M, Saoula H, Balamane A, Abid A, Benejat L, Megraud F. « Augmentation de la résistance à la clarithromycine de *Helicobacter pylori* à Alger (Algérie) ». **Communication affichée** lors du 7^{ème} Congrès de la biologie médicale et médecine de laboratoire de la Société Algérienne de Biologie Clinique (SABC). Mai 2017.
- **Raaf Naïma**, Amhis W, Benejat L, Megraud F. « Prévalence et distribution des facteurs de virulence de *Helicobacter pylori* dans la population Algérienne ». **Communication orale** lors de la réunion annuelle du Groupe d'Etude Français des *Helicobacter* (GEFH). Janvier 2018.
- **Raaf Naïma**, Amhis W, Nakmouche M, Saoula H, Balamane A, Abid A, Benejat L, Megraud F. « Forte prévalence de l'infection à *Helicobacter pylori* et résistance élevée à la clarithromycine des souches isolées à Alger ». **Communication affichée** lors des 13^{ème} Journées Nationales et 3^{ème} Congrès Maghrébin d'Hépatogastroentérologie et d'Endoscopie Digestive. Décembre 2017.
- **Raaf Naïma**, Amhis W, Nakmouche M, Saoula H, Balamane A, Abid A, Benejat L, Megraud F. « Etat des lieux de l'infection à *Helicobacter pylori* et typage phylogéographique des souches isolées à Alger ». **Communication affichée** lors de la 13^{ème} réunion de la Société Tunisienne de Microbiologie (STM). Novembre 2017.
- **Raaf Naïma**, Amhis W, Nakmouche M, Saoula H, Balamane A, Abid A, Benejat L, Megraud F. « Etat des lieux de l'infection à *Helicobacter pylori* et typage phylogéographique des souches isolées à Alger ». **Communication affichée** lors de la 1^{ère} Conférence Internationale d'Infectiologie de Annaba (CIIA). Octobre 2017.
- **Raaf Naïma**, Amhis W, Nakmouche M, Saoula H, Balamane A, Abid A, Benejat L, Megraud F. « Résistance élevée à la clarithromycine de *Helicobacter pylori* à Alger ». **Communication affichée** lors de la 10^{ème} journée nationale d'hygiène hospitalière et de lutte contre les infections associées aux soins. Mai 2017.
- **Raaf Naïma**, Amhis W, Nakmouche M, Saoula H, Balamane A, Abid A, Benejat L, Megraud F. « L'infection à *Helicobacter pylori* à Alger (Algérie). Prévalence et sensibilité aux antibiotiques ». **Communication affichée** lors du 1^{er} Congrès Maghrébin de Biologie Clinique et de la 27^{ème} réunion de la Société Tunisienne de Biologie Clinique (STBC). Mai 2017.
- **Raaf Naïma**, Amhis W, Nakmouche M, Saoula H, Balamane A, Abid A, Benejat L, Megraud F. « L'infection à *Helicobacter pylori* à Alger (Algérie). Prévalence et sensibilité aux antibiotiques ». **Communication orale** lors de la réunion annuelle du Groupe d'Etude Français des *Helicobacter* (GEFH). Janvier 2017.
- **Raaf Naïma**, Amhis Wahiba « *Helicobacter pylori*: isolement, profil antibiotique et étude moléculaire ». **Communication affichée** lors des Doctoriales de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Ferhat Abbas Sétif. Mai 2016.

Annexe 3 : Publications

- **Naïma Raaf**, Wahiba Amhis, Houria Saoula, Ahmed Abid, Mhamed Nakmouche, Abdelmalek Balamane, Nassima Ali Arous, Mounira Ouar-Korichi, Filipa F. Vale, Lucie Bénéjat and Francis Mégraud. « Prevalence, antibiotic resistance and MLST typing of *Helicobacter pylori* in Algiers, Algeria». HELICOBACTER. 2017;22:e12446. <https://doi.org/10.1111/hel.12446>.
- **Raaf N.**, Amhis W., Benhassine F., Baiod-Chorfi S., Ouar-Korichi M. « *Helicobacter Pylori* in Children: Molecular Characterization, Antibiotics Resistance and MLST of Isolated Strains in an Algerian Hospital ». Infection, Epidemiology and Medicine. 2017; 3(3): 73-77.

Prevalence, antibiotic resistance, and MLST typing of *Helicobacter pylori* in Algiers, Algeria

Naïma Raaf^{1,2}  | Wahiba Amhis² | Houria Saoula³ | Ahmed Abid⁴ |
 Mhamed Nakmouche³ | Abdelmalek Balamane⁴ | Nassima Ali Arous⁵ |
 Mounira Ouar-Korichi⁶ | Filipa F. Vale⁷  | Lucie Bénéjat⁸ | Francis Mégraud⁸

¹Département de Microbiologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Ferhat Abbas, Setif, Algeria

²Laboratoire Central de Biologie Clinique, EPH Ibn Ziri Bologhine, Algiers, Algeria

³Service de Gastroentérologie, CHU Lamine Debaghine Bab El Oued, Algiers, Algeria

⁴Service de Gastroentérologie, CHU Isaad Hassani Beni Messous, Algiers, Algeria

⁵Service de Médecine interne, EPH Ibn Ziri Bologhine, Algiers, Algeria

⁶Laboratoire des Entérobactéries et autres bactéries apparentées, Institut Pasteur d'Algérie, Algiers, Algeria

⁷Host-Pathogen Interactions Unit, Research Institute for Medicines (iMed-ULisboa), Faculty of Pharmacy, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal

⁸French National Reference Center for Campylobacters and Helicobacters, Laboratoire de Bactériologie, Hôpital Pellegrin, & INSERM U 1053, Université de Bordeaux, Bordeaux, France

Correspondence

Naïma Raaf, Département de Microbiologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Ferhat Abbas, Setif, Algeria.
 Email: raaf.naïma@gmail.com

Abstract

Background: *Helicobacter pylori* infection is common in Algeria, but there are few data on the characterization of isolated strains. The aim of this study was to update data on the prevalence of *H. pylori* in patients submitted to endoscopy, antibiotic resistance, and phylogeography of *H. pylori* strains isolated in Algiers.

Materials and Methods: This is a prospective study carried out between November 2015 and August 2016. The culture of *H. pylori* was performed on antral and fundic gastric biopsies of adult patients from 3 hospitals. A real-time PCR using the fluorescence resonance energy transfer (FRET) principle for the detection of *H. pylori* followed by a melting curve analysis for the detection of mutations associated with resistance to clarithromycin was applied. Differentiation between antral and fundic isolates of the same patient was also determined by RAPD, and an MLST typing was performed for characterization of the phylogeographic group of *H. pylori*.

Results: By real-time PCR, the prevalence of *H. pylori* infection among the 147 patients included was 57%. Culture was positive in only 29% of the cases. Twenty-seven percent of patients had received *H. pylori* eradication treatment. The primary and secondary resistance rates to clarithromycin were 23% and 36%, respectively, and to metronidazole, 45% and 71%, respectively. Only one isolate was resistant to levofloxacin, and no resistance to amoxicillin, tetracycline, and rifampicin was detected. A double population was present in 14 patients. The MLST analysis classified the 42 *H. pylori* strains from 38 patients in 2 haplotypes: hpEurope (33) and hpNEAfrica (9).

Conclusion: The prevalence of *H. pylori* remains high in Algeria but appears to be decreasing in recent years. High resistance to clarithromycin requires increased monitoring of the evolution of antibiotic resistance and adaptation of eradication therapy.

KEYWORDS

culture, macrolide, multiple infection, random amplified polymorphic DNA, real-time PCR

1 | INTRODUCTION

Since the discovery of *Helicobacter pylori* in 1982,¹ its role in gastroduodenal pathologies such as gastritis, peptic ulcer, MALT lymphoma

and gastric cancer has been clearly established.² Although *H. pylori* infection is the most frequent chronic bacterial infection in the world with approximately 50% of the world population infected, prevalence varies considerably from one country to another depending on the

socioeconomic level. It is very high in developing countries where it can reach 90%, whereas it may be <20% in industrialized countries.³

The choice of the appropriate eradication therapy is based mainly on the resistance rate of the bacterium to antibiotics in the region, especially to clarithromycin, an antibiotic which has an increasing resistance rate in many countries² leading to eradication failures.

Algeria is one of the countries with a high prevalence of *H. pylori* infection,⁴ but there are very few recent data on trends of prevalence and on characterization of the strains. The aim of this study was to update the data on the prevalence and resistance of *H. pylori* to antibiotics and for the first time to perform a phylogeographic characterization of the strains isolated in Algiers by multilocus sequence typing (MLST).

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Patients/biopsies

This multicentric study included adult patients who were referred for gastroduodenal endoscopy at 3 hospitals in Algiers (Bab El Oued and Béni Messous Gastroenterology departments and Bologhine Internal Medicine department) over the period November 2015 to August 2016. One antral and one body biopsy were transported in a brain-heart infusion (BHI) broth (Institut Pasteur d'Algérie, Algiers, Algeria) at +4°C accompanied by a patient information sheet to the clinical biology laboratory of the Bologhine Hospital on the same day.

2.2 | Culture and antibiogram

The antral and the body biopsies were ground separately in 1 ml of BHI. A portion of the suspension was frozen at -80°C to carry out molecular biology tests at the French National Reference Center for Campylobacter and Helicobacter (Bordeaux, France). The other part was cultured on Colombia agar medium supplemented with 10% human blood and a selective supplement (*Helicobacter pylori* selective supplement, Oxoid, England). The cultures were incubated at 37°C in a microaerobic atmosphere (CampyGen, Oxoid, Basingstoke, UK) for 3 to 10 days. The identification of suspicious colonies was based on the typical morphology on Gram stain preparations and the production of oxidase, catalase, and urease. The identified strains were stored at -80°C in BHI supplemented with 20% glycerol. The antimicrobial susceptibility testing (AST) was performed by the agar diffusion method on Mueller-Hinton medium supplemented with 10% human blood with a bacterial suspension equivalent to a McFarland 3 opacity standard. Amoxicillin, tetracycline, rifampicin, levofloxacin, and clarithromycin were tested using ATB disks (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France); Etest was used for metronidazole and to confirm resistance to clarithromycin and levofloxacin. Critical concentrations were interpreted according to EUCAST guidelines, clarithromycin: resistant <17 mm, susceptible > 22 mm; tetracycline: resistant < 17 mm, susceptible > 19 mm; rifampicin: resistant < 14 mm, susceptible > 19 mm; levofloxacin: resistant < 17 mm, susceptible > 20 mm; amoxicillin: resistant < 17 mm, susceptible > 20 mm.

2.3 | DNA extraction

The fragments of each biopsy or the suspensions of each strain were digested in 20 µl of proteinase K and 180 ml of lysis buffer. DNA extraction from biopsy specimens was performed with MagnaPur 96 (Roche Diagnostics, Meylan, France) and from strains using the DNA extraction kit QIAampDNAmini-kit (Qiagen, France) according to the manufacturer's instructions.

2.4 | Real-time PCR detection of *H. pylori* and its resistance to clarithromycin

The detection of *H. pylori* from gastric biopsies and confirmation of the identification of strains obtained by culture, as well as the determination of point mutations in the 23S rRNA gene associated with clarithromycin resistance, were performed by real-time PCR as previously described.⁵ Real-time PCR detection of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was performed on negative biopsy specimens to control for DNA extraction.

2.5 | Differentiation of strains using random amplified polymorphic DNA (RAPD) genotyping

Genomic differences between the antral and the body strains isolated from the same patient were investigated by RAPD PCRs with 2 primers 1254 and 1290.⁶ The PCR products were analyzed on a 1% agarose gel.

2.6 | Detection of quinolone resistance

A PCR of the quinolone resistance determining region (QRDR) of the *H. pylori gyrA* gene followed by sequencing of the PCR product was performed for the detection of quinolone resistance as previously described.⁷

2.7 | Genotyping by MLST

Phylogeographic typing was performed by MLST. PCR amplification and sequencing of 7 *H. pylori* housekeeping genes (*atpA*, *efp*, *trpC*, *ppa*, *mutY*, *yphC* and *ureI*) were performed as previously described.⁸ Strain population assignment was performed using the "no admixture model" of STRUCTURE,⁹ as previously described.¹⁰ Using the same conditions, the "admixture model" was also applied to verify the existence of admixture of distinct populations. Phylogenetic tree reconstruction was made using the neighbor-joining algorithm implemented in MEGA 6.0 software.

3 | RESULTS

3.1 | Characteristics of the patients

A total of 147 patients were included in this study. Endoscopy was performed for 100 patients (68%) for epigastralgia, 29 patients (20%)

for eradication control, 11 patients (7%) for gastroesophageal reflux, 4 (3%) for Biermer anemia, and 3 patients (2%) for vomiting. One hundred and seven patients (73%) had never received *H. pylori* eradication therapy; 43% of them were male with a mean age of 49 years (extremes 17-90 years). Forty patients (27%) had received *H. pylori* eradication therapy; 50% were male with a mean age of 49 years (extremes 18-72 years). Thirty-two patients (80%) had received a first-line therapy with proton-pump inhibitor (PPI), amoxicillin and metronidazole, 6 (15%) with PPI, amoxicillin, and clarithromycin, and for 2 patients (5%), the treatment prescribed was not determined.

The gastric lesions revealed by endoscopy are presented in Table 1.

3.2 | *H. pylori* prevalence and antibiotic resistance

Among the 107 patients who did not receive an *H. pylori* treatment, 60 (56%) were positive by real-time PCR and 27 (25%) by culture. Prevalence varied between 47% and 65% by age group. Mutations A2142/43G associated with clarithromycin resistance were detected in 14 patients (23%). A double population, both susceptible and resistant to clarithromycin, was detected in 6 patients (10%). The AST for the strains which grew revealed that 9 strains (33%) were resistant to clarithromycin and 11 strains (41%) were resistant to metronidazole with a MIC > 256 µg/ml. No resistance to amoxicillin, tetracycline, levofloxacin, and rifampicin was detected among the 27 strains tested (Table 2). A double population of *H. pylori* strains in the antrum and body was revealed by RAPD in 3 of the 8 patients tested.

Among the 40 patients who had previously received an *H. pylori* treatment, 22 (55%) were positive by PCR and 16 (40%) by culture.

TABLE 1 Distribution of patients according to endoscopy results

Endoscopy diagnosis	Patients not previously treated N (%)	Patients previously treated N (%)
Normal	5 (5)	1 (2.5)
Gastritis only	91 (85)	28 (70)
Duodenal ulcer	8 (7)	7 (17.5)
Gastric ulcer	3 (3)	1 (2.5)
MALT lymphoma	0 (0)	3 (7.5)
Total	107 (100)	40 (100)

TABLE 2 *Helicobacter pylori* primary and secondary antibiotic resistance

Antibiotic	Primary resistance		Secondary resistance	
	Tested N	Resistant N (%)	Tested N	Resistant N (%)
Clarithromycin ^a	60	14 (23)	22	8 (36)
Clarithromycin ^b	27	9 (33)	16	7 (44)
Metronidazole ^b	27	11 (41)	16	12 (75)
Levofloxacin ^b	27	0 (0)	16	1 (6)
Amoxicillin ^b	27	0 (0)	16	0 (0)
Tetracycline ^b	27	0 (0)	16	0 (0)
Rifampicin ^b	27	0 (0)	16	0 (0)

^aPCR.

^bAntibiogram.

Prevalence varied between 36% and 67% by age group. Using real-time PCR, secondary resistance to clarithromycin was detected in 8 patients (36%) (mutation A2142/43G). Two patients (9%) were infected by a double population, both susceptible and resistant to clarithromycin. Using AST, 7 strains (44%) were resistant to clarithromycin, 12 (75%) to metronidazole with a MIC > 256 µg/ml, and only one strain was found to be resistant to levofloxacin (MIC > 256 µg/ml). Sequencing of the QRDR region revealed an *Asn87Thr* mutation. No resistance to amoxicillin, tetracycline, and rifampicin was detected among the 16 strains tested (Table 2). RAPD revealed antral and body co-infection by a double population of *H. pylori* in 1 of the 10 patients tested.

No discordance between AST results and real-time PCR detection of clarithromycin resistance was found.

3.3 | Phylogeographic typing

The “no admixture model” of STRUCTURE of the 42 strains isolated from 38 patients of North African origin, based on the sequences of the 7 housekeeping genes included in the MLST scheme for *H. pylori*, grouped the Algerian strains into 2 haplotypes: 33 hpEurope strains and 9 hpNEAfrica strains. The “admixture model” revealed that 13 hpEurope strains were a mosaic between hpEurope, hpNEAfrica, and hpAfrica1 (Table 3). The phylogenetic tree of the 42 strains is represented in Figure 1. It should be noted that the strains ALG6 and ALG8 isolated in different patients without any link between them are surprisingly very close in the phylogenetic tree.

4 | DISCUSSION

The prevalence rate of *H. pylori* infection in this study (56%) remains high as is the case in the majority of developing countries. However, there has been a significant decrease in recent years. Serologic studies in the 1980s reported a prevalence of *H. pylori* infection in the Algerian population >80%,⁴ while more recent studies report lower rates.¹¹ This reduction can be explained by the improvement in hygiene conditions which minimizes transmission, better therapeutic management of the patients, and the unintentional eradication of the bacteria by

<i>H. pylori</i> strains	Patients endoscopy diagnosis	Age	Sex	Patient previously treated	Population structure (no admixture model)
ALG 1 ^a	MALT lymphoma	72	Male	Yes	hpNEAfrica
ALG 2 ^a					hpNEAfrica
ALG 3	Gastritis	70	Male	Yes	hpEurope
ALG 4	MALT lymphoma	21	Male	Yes	hpEurope
ALG 5	Gastritis	35	Female	Yes	hpEurope ^e
ALG 6 ^b	Gastritis	50	Female	No	hpNEAfrica
ALG 7 ^b					hpEurope ^e
ALG 8	Duodenal ulcer	45	Female	Yes	hpNEAfrica
ALG 9	MALT lymphoma	45	Female	Yes	hpEurope
ALG 10	Gastritis	35	Female	Yes	hpEurope
ALG 11	Gastritis	30	Male	Yes	hpEurope
ALG 12	Duodenal ulcer	40	Male	No	hpEurope
ALG 13	Duodenal ulcer	59	Male	No	hpNEAfrica
ALG 14	Gastritis	30	Male	Yes	hpEurope ^e
ALG 15	Gastritis	37	Male	No	hpEurope
ALG 16	Gastritis	50	Female	No	hpEurope ^e
ALG 17	Gastritis	53	Female	Yes	hpEurope ^e
ALG 18 ^c	Duodenal ulcer	65	Female	No	hpEurope ^e
ALG 19 ^c					hpEurope
ALG 20	Gastritis	37	Male	No	hpEurope
ALG 21	Duodenal ulcer	49	Female	No	hpEurope ^e
ALG 22	Gastritis	46	Female	No	hpNEAfrica
ALG 23 ^d	Gastritis	35	Female	No	hpEurope ^e
ALG 24 ^d					hpEurope
ALG 25	Duodenal ulcer	44	Male	No	hpEurope ^e
ALG 26	Gastritis	45	Female	No	hpNEAfrica
ALG 27	Gastritis	54	Female	No	hpEurope
ALG 28	Gastritis	19	Female	No	hpNEAfrica
ALG 29	Gastritis	35	Male	No	hpEurope
ALG 30	Gastritis	42	Female	Yes	hpEurope
ALG 31	Gastritis	48	Female	No	hpEurope ^e
ALG 32	Gastritis	59	Female	Yes	hpEurope
ALG 33	Gastritis	56	Male	Yes	hpNEAfrica
ALG 34	Duodenal ulcer	58	Male	Yes	hpEurope ^e
ALG 35	Gastritis	58	Male	Yes	hpEurope
ALG 36	Gastritis	57	Female	No	hpEurope ^e
ALG 37	Duodenal ulcer	48	Female	No	hpEurope
ALG 38	Gastritis	26	Female	No	hpEurope
ALG 39	Gastritis	72	Female	No	hpEurope
ALG 40	Gastritis	66	Female	No	hpEurope
ALG 41	Gastritis	63	Male	No	hpEurope
ALG 42	Gastritis	47	Female	Yes	hpEurope ^e

TABLE 3 Population structure of 42 Algerian *Helicobacter pylori* strains

(a-d) Each couple of strain was isolated from a same patient; strains were different with RAPD.

^eMosaic: hpEurope, hpNEAfrica, hpAfrica1 (admixture model).

between macrolide use in the community and the high prevalence of *H. pylori* resistance to clarithromycin.²⁴ Due to a lack of data on macrolide consumption in Algeria, this can only be a supposition to explain the high rate. All of the resistances corresponded to one of the mutations A2142/43G; unfortunately, the technique used is unable to differentiate them. According to these data, triple therapy using clarithromycin is no longer adequate in Algeria without first carrying out AST. The primary resistance to metronidazole in this study is also very high (45%). However, unlike clarithromycin, the impact of metronidazole resistance can be overcome by increasing the duration of treatment. On the other hand, levofloxacin resistance is extremely low, a single strain with an *Asn87Thr* mutation was found, contrary to the increase observed in several regions: 15.4% in France,²¹ 22.1% in Italy, and 34.5% in China.²³ Our results suggest that levofloxacin can be introduced into the *H. pylori* eradication treatment in Algeria. Obtaining the antibiotic profile of an *H. pylori* strain is difficult in Algeria because few laboratories carry out the bacterial culture or the PCR for detecting mutations conferring resistance to antibiotics. In view of the previous Algerian studies as well as our results, and according to the latest recommendations of Maastricht V,² it is mandatory to adapt the *H. pylori* eradication treatment in Algeria. Quadruple concomitant therapy (amoxicillin 1000 mg, clarithromycin 500 mg, metronidazole 500 mg, and omeprazole 40 mg twice a day for 14 days) would be the first-line eradication treatment given that bismuth is not available.

The MLST phylogenetic analysis of the 42 strains from 38 patients revealed that the most predominant haplotype was hpEurope with a large share of mosaic strains, which is in agreement with the North African location of Algeria. This distribution is the result of human migrations since the Paleolithic period illustrated in studies conducted by Falush et al²⁵ and Moodley et al,²⁶ as well as the more recent mixing of North African and South European populations with the common history of these 2 regions.

In this study, we demonstrated the double colonization of *H. pylori* in the same patient in different ways. Real-time PCR detected clarithromycin susceptible and resistant variants of the same strain in 10% of patients, which may have an impact on eradication. RAPD revealed that the *H. pylori* strain colonizing the antrum was different from the one colonizing the body in 4 patients. The strains of 3 of these patients had the same antibiotic profile so the difference could not be detected by AST. The results were confirmed by MLST for 3 patients (Figure 1): One patient was co-infected with one strain of hpNEAfrica haplotype (ALG6) and one strain of hpEurope haplotype (ALG7), and 2 patients were co-infected with 2 different strains of hpEurope haplotype (ALG18 and ALG19, ALG23 and ALG24). Interestingly, strains ALG23 and ALG24, isolated in the same patient, are quite near in the phylogenetic tree. Concerning the 4th patient, the antral and the body strains (ALG1 and ALG2) were identical by MLST (Figure 1). The genetic difference between them probably involved other parts of the bacterial genome than the 7 housekeeping genes sequenced by MLST. The application of several techniques is sometimes necessary to demonstrate infections by multiple strains of *H. pylori*. Cases of

multiple infections are very common and are more prevalent in high-prevalence countries.^{27,28} In this respect, a French–Tunisian study reported a 48% multiple infection rate in Tunisia, a country with a high prevalence, compared to 5% in France, a country with a low prevalence.²⁷ These multiple infections facilitate gene transfer between strains and contribute to the genetic diversity of the bacteria.^{29–31}

5 | CONCLUSION

According to the results of this study, the prevalence of *H. pylori* infection remains high in Algeria but appears to have decreased in recent years. High clarithromycin resistance requires increased monitoring of the evolution of antibiotic resistance and adaptation of eradication therapy according to current data. Obviously, these results should be confirmed and supplemented by other studies with larger numbers of patients and covering several regions of the country.

ACKNOWLEDGEMENTS AND DISCLOSURES

The authors have no competing interests.

ORCID

Naïma Raaf  <http://orcid.org/0000-0002-7243-3134>

Filipa F. Vale  <http://orcid.org/0000-0003-4635-0105>

REFERENCES

- Warren JR, Marshall B. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet*. 1983;321:1273-1275.
- Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain CA, et al. Management of *Helicobacter pylori* infection—the Maastricht V/Florence consensus report. *Gut*. 2017;66:6-30.
- Mentis A, Lehours P, Mégraud F. Epidemiology and diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*. 2015;20:1-7.
- Megraud F, Brassens-Rabbe MP, Denis F, Belbouri A, Hoa DQ. Seroepidemiology of *Campylobacter pylori* infection in various populations. *J Clin Microbiol*. 1989;27:1870-1873.
- Oleastro M, Menard A, Santos A, et al. Real-time PCR assay for rapid and accurate detection of point mutations conferring resistance to clarithromycin in *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol*. 2003;41:397-402.
- Akopyanz N, Bukanov NO, Westblom TU, Kresovich S, Berg DE. DNA diversity among clinical isolates of *Helicobacter pylori* detected by PCR-based RAPD fingerprinting. *Nucleic Acids Res*. 1992;20:5137-5142.
- Rimbara E, Noguchi N, Kawai T, Sasatsu M. 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*. 2012;17:36-42.
- Achtman M, Azuma T, Berg DE, et al. Recombination and clonal groupings within *Helicobacter pylori* from different geographical regions. *Mol Microbiol*. 1999;32:459-470.
- Falush D, Stephens M, Pritchard JK. Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics*. 2003;164:1567-1587.

10. Oleastro M, Rocha R, Vale FF. Population genetic structure of *Helicobacter pylori* strains from Portuguese-speaking countries. *Helicobacter*. 2017;22:e12382.
11. Djennane-Hadibi F, Bachtarzi M, Layaida K, et al. High-level primary clarithromycin resistance of *Helicobacter pylori* in Algiers, Algeria: a prospective multicenter molecular study. *Microb Drug Resist*. 2016;22:223-226.
12. Darko R, Yawson A, Osei V, Owusu-Ansah J, Aluze-Ele S. Changing patterns of the prevalence of *Helicobacter pylori* among patients at a corporate hospital in Ghana. *Ghana Med J*. 2015;49:147.
13. Frugis S, Czczeko NG, Malafaia O, et al. Prevalence of *Helicobacter pylori* ten years ago compared to the current prevalence in patients undergoing upper endoscopy. *Arq Bras Cir Dig*. 2016;29:151-154.
14. Farshad S, Japoni A, Alborzi A, Zarenezhad M, Ranjbar R. Changing prevalence of *Helicobacter pylori* in south of Iran. *Arch Clin Infect Dis*. 2010;5:65-69.
15. Ashtari S, Pourhoseingholi MA, Molaei M, Taslimi H, Zali MR. The prevalence of *Helicobacter pylori* is decreasing in Iranian patients. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench*. 2015;8(Suppl 1):S23.
16. Mansour KB, Keita A, Zribi M, et al. Seroprevalence of *Helicobacter pylori* among Tunisian blood donors (outpatients), symptomatic patients and control subjects. *Gastroentérol Clin Biol*. 2010;34:75-82.
17. Benajah DA, Lahbabi M, Alaoui S, et al. Prevalence of *Helicobacter pylori* and its recurrence after successful eradication in a developing nation (Morocco). *Clin Res Hepatol Gastroenterol*. 2013;37:519-526.
18. Zendeheel N, Nasserri-Moghaddam S, Malekzadeh R, Massarrat S, Sotoudeh M, Siavoshi F. *Helicobacter pylori* reinfection rate 3 years after successful eradication. *J Gastroenterol Hepatol*. 2005;20:401-404.
19. Rollan A, Giancaspero R, Fuster F, et al. The long-term reinfection rate and the course of duodenal ulcer disease after eradication of *Helicobacter pylori* in a developing country. *Am J Gastroenterol*. 2000;95:50-56.
20. Bouihat N, Burucoa C, Benkirane A, et al. *Helicobacter pylori* primary antibiotic resistance in 2015 in Morocco: a phenotypic and genotypic prospective and multicenter study. *Microb Drug Resist*. 2016;23:727-732.
21. Ducourneau A, Bénégat L, Sifré E, Bessède E, Lehours P, Mégraud F. *Helicobacter pylori* resistance to antibiotics in 2014 in France detected by phenotypic and genotypic methods. *Clin Microbiol Infect*. 2016;22:715-718.
22. Navarro-Jarabo JM, Fernandez-Sanchez F, Fernandez-Moreno N, et al. Prevalence of primary resistance of *Helicobacter pylori* to Clarithromycin and levofloxacin in Southern Spain. *Digestion*. 2015;92:78-82.
23. Thung I, Aramin H, Vavinskaya V, et al. Review article: the global emergence of *Helicobacter pylori* antibiotic resistance. *Aliment Pharmacol Ther*. 2016;43:514-533.
24. Megraud F, Coenen S, Versporten A, et al. *Helicobacter pylori* resistance to antibiotics in Europe and its relationship to antibiotic consumption. *Gut*. 2013;62:34-42.
25. Falush D, Wirth T, Linz B, et al. Traces of human migrations in *Helicobacter pylori* populations. *Science*. 2003;299:1582-1585.
26. Moodley Y, Linz B, Bond RP, et al. Age of the association between *Helicobacter pylori* and man. *PLoS Pathog*. 2012;8:e1002693.
27. Ben Mansour K, Fendri C, Battikh H, et al. Multiple and mixed *Helicobacter pylori* infections: comparison of two epidemiological situations in Tunisia and France. *Infect Genet Evol*. 2016;37:43-48.
28. Kibria KMK, Hossain ME, Sultana J, et al. The prevalence of mixed *Helicobacter pylori* infections in symptomatic and asymptomatic subjects in Dhaka, Bangladesh. *Helicobacter*. 2015;20:397-404.
29. Farzi N, Malekian T, Alebouyeh M, Vaziri F, Zali MR. Genotype diversity and quasispecies development of *Helicobacter pylori* in a single host. *Jpn J Infect Dis*. 2015;68:176-180.
30. Kennemann L, Didelot X, Aebischer T, et al. *Helicobacter pylori* genome evolution during human infection. *Proc Natl Acad Sci*. 2011;108:5033-5038.
31. Krebes J, Didelot X, Kennemann L, Suerbaum S. Bidirectional genomic exchange between *Helicobacter pylori* strains from a family in Coventry, United Kingdom. *Int J Med Microbiol*. 2014;304:1135-1146.

How to cite this article: Raaf N, Amhis W, Saoula H, et al. Prevalence, antibiotic resistance, and MLST typing of *Helicobacter pylori* in Algiers, Algeria. *Helicobacter*. 2017;22:e12446. <https://doi.org/10.1111/hel.12446>

Helicobacter Pylori in Children: Molecular Characterization, Antibiotics Resistance, and MLST of Isolated Strains in an Algerian Hospital

Naïma Raaf^{1, 2*}, Wahiba Amhis², Fadhila Benhassine³, Safa Baiod-Chorfi³, Mounira Ouar-Korichi⁴

¹ Department of Microbiology, Faculty of Nature and Life Sciences, University Ferhat Abbas, Setif, Algeria

² Central Laboratory of Clinical Biology, Ibn Ziri Bologhine Hospital, Algiers, Algeria

³ Pediatrics service, Ibn Ziri Bologhine Hospital, Algiers, Algeria

⁴ Laboratory of Enterobacteriaceae and Related Bacteria, Institut Pasteur, Algiers Algeria

*Corresponding author: Naïma Raaf, Faculty of Nature and Life Sciences, University Ferhat Abbas, Setif, Algeria, E-mail: raaf.naima@gmail.com, Tel: +213366240

Submitted: June 06, 2017; Revised: July 13, 2017; Accepted: July 22, 2017

Abstract

Background: *Helicobacter pylori* infection is generally acquired in childhood. Algeria is a country with a high prevalence of *H. pylori* infection. The aim of this work was to take stock of *H. pylori* infection in Algerian children.

Materials and Methods: About 31 antral biopsies were cultured, and then antibiotic susceptibility testing was performed. The statuses of *cagPAI* and *vacA s, m, I, and d* regions were determined as well as geographical typing was done by Multi Locus Sequence Typing (MLST) method.

Results: Culture was *H. pylori* positive in 12 children. Only one resistance to clarithromycin and one to metronidazole were detected. Four out of six strains possessed *cagPAI*, and five out of six strains were identified as *vacA s2m2i2d2*. The five strains tested by MLST were of the hpEurope type.

Conclusion: This study revealed high prevalence of *H. pylori* infection and low resistance to antibiotics and reported for the first time in Algeria a genetic typing of *H. pylori* strains isolated from Pediatrics.

Keywords: Culture, Gastric biopsies, Antibiotics resistance, *cagPAI*, *vacA*

1. Background

Helicobacter pylori infection is usually acquired in childhood and can remain as asymptomatic for several years(1). In children, the prevalence rate of *H. pylori* infection is low in industrialized countries and high in developing countries(2). Chronic gastritis associated with *H. pylori* infection may evolve into peptic ulcer, MALT lymphoma, or gastric cancer over time. The expression of the virulence factors and the geographical origin of the strains are among the factors most influencing the evolution towards the most severe pathologies (3). The choice of an *H. pylori* eradication therapy is based primarily on the rate of clarithromycin resistance in the region. In cases with more than 15% resistance, triple therapy based on clarithromycin is not recommended (3).

2. Objective

The aim of this study was to take stock of *H. pylori* infection in children and to study its antibiotic resistance, the proportion of its major virulence factors, and its phylogeographic typing by MLST method in the strains isolated at a hospital in Algiers, a country with a high prevalence of *H. pylori* infection.

3. Materials and Methods

This study included patients who were referred to the pediatric department of Ibn Ziri Bologhine hospital (Algiers, Algeria) for a digestive endoscopy from January 2013 to March 2016. An antral biopsy was sampled and placed into a brain heart infusion (BHI) broth (Institut Pasteur d'Algérie, Algiers, Algeria) at 4°C, and accompanied with patient's information sheet transported to the clinical biology laboratory of the Bologhine hospital at the same day.

The biopsy was grounded in 1 mL of BHI then cultured on Colombia agar medium supplemented with 10% of human

blood and selective supplement (*H. pylori* Selective Supplement, Oxoid, England). The cultures were incubated at 37°C in microaerophilic conditions (CampyGen, Oxoid, Basingstoke, UK) for 3 to 10 days. The identification of suspected colonies was based on the specific form of Gram staining and the production of oxidase, catalase, and urease. The identified strains were stored at -80°C in BHI supplemented with 20% glycerol in order to be used in molecular biology tests at the French National Reference Center for Campylobacter and Helicobacter (Bordaux, France). An antibiogram was identified on Mueller-Hinton medium supplemented with 10% human blood by a bacterial suspension of 3 McFarland. Amoxicillin (10µg), tetracycline (30µg), rifampicin (5µg), levofloxacin (5µg), and clarithromycin (15µg) were tested using ATB disks (bioMérieux, Marcy-l'Etoile, France). E-test was used for metronidazole and to confirm resistance to clarithromycin. Critical concentrations were interpreted according to EUCAST guidelines (<http://www.eucast.org/>). Critical diameters used for interpretation were as follows: clarithromycin: resistant < 17mm, sensible > 22mm; tetracycline: resistant < 17mm, sensible > 19mm; rifampicin: resistant < 14mm, sensible > 19mm; levofloxacin: resistant < 17mm, sensible > 20mm; amoxicillin: resistant < 17, sensible > 20mm.

The DNA extraction was performed with DNA extraction kit (QIAamp DNA mini-kit, Qiagen, France) according to the manufacturer's instructions.

The molecular identification of *H. pylori* isolates and the determination of the mutation points of 23S rRNA gene associated with clarithromycin resistance were carried out by real-time PCR method using the fluorescence resonance energy transfer (FRET) principle for the detection of *H. pylori* and an amplicon fusion curve for the detection of clarithromycin resistance, as previously described (4).

The *cagPAI* and the *vacA* allelic status (*s*, *m*, *i*, and *d* regions) were evaluated by PCR (Table 1). PCR amplifications of the *cagPAI* empty site was carried out in a 25 µL volume containing 2.5 µL of 10X PCR buffer, 1.5 mM MgCl₂, 200 µM (each) of dNTPs, 2 U of Taq DNA polymerase, 1 µM (each) of primers, and 10 ng of *H. pylori* DNA. After 2 min of denaturation at 95°C, reaction mixture was amplified for 40 cycles as follows: 30 s at 95°C, 30 s of annealing at 58°C; and 30 s at 72°C. After the last cycle, extension was continued for another 5 min at 72°C. PCR amplifications of the *vacA* allelic status were carried out in a 25 µL volume containing 2.5 µL of 10X PCR buffer, 1.5 mM MgCl₂, 400 µM of the dNTPs each, 1.2 U of Taq DNA polymerase, 1.75 µM of primers each, and 10 ng of *H. pylori* DNA. After 2 min of denaturation at 94°C, each reaction mixture was amplified for 40 cycles (35 cycles for *i1* and *i2*) as follows: 30 s at 94°C, 30 s of annealing at 60°C (58°C for *i1* and 27°C for *i2*); and 30 s (45 s for *i2*) at 72°C. After the last cycle, extension was continued for another 5 min at 72°C.

Phylogeographic typing was performed by MLST. PCR amplification and sequencing of 7 *H. pylori* housekeeping genes (*atpA*, *efp*, *trpC*, *ppa*, *mutY*, *yphC* and *ureI*) were performed, as previously described (5). The sequences obtained were aligned and compared to 25 reference strains of the PubMLST database (<https://pubmlst.org/helicobacter/>). Phylogenetic tree was reconstructed based on the sequences obtained and those available in the PubMLST database, using the Neighbor-Joining algorithm implemented in MEGA 6.0 software.

4. Results

Thirty-one patients included in this study aged from 5 to 16 years (medium age was 12 years) with a boy/girl ratio of 0.47. Digestive endoscopy revealed that 26 patients (84%) had gastritis, and 5 cases (16%) had normal gastric mucosa. Nine patients (29%) had already received an eradication treatment against *H. pylori*.

Culture was *H. pylori* positive in 12 patients (38.7%). Eight of whom had not received eradication treatment, and four had already been treated against *H. pylori*.

No resistance was detected to amoxicillin, tetracycline, rifampicin, and levofloxacin by antibiogram. One strain was resistant to metronidazole with MIC >256 µg/mL (primary resistance). A single strain was resistant to clarithromycin with MIC >256 µg/mL (secondary resistance); this strain belonged to a patient identified with gastritis; the antibiogram of this patient revealed a strain sensitive to clarithromycin before the eradication treatment. Real-time PCR performed on 7 out of 12 isolated strains confirmed the identification and strains clarithromycin susceptibility.

The distribution of the virulence factors of 6 tested strains is shown in Table 2.

The phylogeographic typing by MLST, which was performed on 6 strains shows that all the strains were of hpEurope type (Fig.1).

5. Discussion

The prevalence of *H. pylori* infection in Algeria is high (6-7). *H. pylori* infection is usually acquired during childhood (1) and highly dependent on socioeconomic conditions (2). The prevalence rate of pediatric *H. pylori* infection varies considerably from one country to another. It is low in industrialized countries, for example, 15% in Spain (8), 10% in Sweden (9), and 1.8% in Japan (10) and high in developing

countries, for example, 30% in Tunisia (11) and 82% in Iran (12). These rates also vary according to the diagnostic techniques used (13). There is no published study investigating the current prevalence rate of *H. pylori* infection in Algeria. In this study, 38.7% of the children had *H. pylori* positive culture. As the only *H. pylori* diagnostic technique available in our hospital, culturing produces very specific results. The identification of the isolates was confirmed by PCR which is not the most sensitive technique due to the fragility of the bacterium. Although culturing makes it possible to obtain the results of antibiotic resistance, it remains as an invasive test requiring a digestive endoscopy which is poorly tolerated by children. Clinicians use these tests only when necessary, indicating the low number of patients.

Antibiotic resistance in this study was low. Few large-scale studies conducted on antibiotic resistance in children are available. An European multi-center pediatric study reported primary and secondary clarithromycin resistance as 20 and 42%, respectively (14). In our case, no primary clarithromycin resistance was detected; there was only one secondary resistance. The use of clarithromycin in the eradication treatment depends on the resistance level in the region (3). The rate of clarithromycin resistance needs to be monitored in pediatrics by conducting more studies with more sample size because resistance in adults seems to be increasing in Algeria (7). A single strain was found to be resistant to metronidazole. In contrast to clarithromycin, resistance to metronidazole in vitro has little impact on the efficacy of in vivo eradication therapy (14). Although the strains were susceptible to antibiotics, it was found that 4 children were still infected with *H. pylori* after eradication treatment. Studies show that in addition to antibiotic resistance, the non-adherence to eradication therapy, common in pediatrics, is an important factor in eradication failure (15).

One of the factors influencing the evolution of the disease in the long term is the presence of certain bacterial virulence factors. Thus, the presence of *cagPAI* pathogenicity island in the bacterial genome, which expresses the *cagA* protein, increases the risk of developing duodenal ulcers and gastric carcinomas (16). In contrast to the non-cytotoxic *s2m2* genotype, the *s1m1* genotype of *vacA* is associated with the most severe pathologies (17). In our study, 4 out of 6 strains possessed the pathogenicity island (*cagPAI*), which can potentially lead to serious lesions, and 5 out of 6 strains expressed non-cytotoxic *vacA*, and one strain had a combination of *cagPAI* and the *vacAs1b* allele.

Phylogenetic analysis of 6 strains by MLST revealed that they were all of hpEurope type, this finding is not unexpected due to the location of Algeria in North African and the human migrations since the Palaeolithic period, as illustrated by Faluch and Moodley (18-19). Population genetic studies based on MLST analysis help predict prehistoric human migration accompanied by *H. pylori*. Also, the relationships between the phylogeny of housekeeping genes and *cagPAI* or *VacA* phylogeny were reported (20-21). The incidence of different gastric cancers can be partly attributed to the different genotypes of *H. pylori* circulating in different geographical areas (22).

6. Conclusions

This study reported a high prevalence rate of *H. pylori* infection in Algerian children and *H. pylori* low resistance to antibiotics. It also reports for the first time in Algeria a genetic typing of *H. pylori* strains isolated from pediatrics. These results must be supplemented by the results of other studies involving more patients.

Conflict of Interest

The authors have no competing interests.

Authors' Contributions

All of authors contribute to this study.

Acknowledgements

We gratefully acknowledge Professor Francis Mégraud, Lucie Bénégat, and the members of the French National Center for Campylobacter and Helicobacter for their assistance.

Funding/Support

No fund was received for this research.

Table 1. Primers used for the amplification of *cagPAI*, and *vacA*.

Gene / Region amplified	Primer designation	Primer sequence (5' to 3')	PCR Product size	References
<i>cagPAI</i>	F1-468-HP519 R1-496-HP549	GCTTGCTTGTATTGGCCTTG GCATGCACATTCCTCAAAGTG	324	(23)
<i>vacA</i> s1/s2	VA1F VA1R	ATGGAAATACAACAAACACAC CTGCTTGAATGCGCCAAAC	s1: 259 s2: 286	(24)
<i>vacAs1a</i>	Forward Reverse	GTCAGCATCACACCGCAAC CTGCTTGAATGCGCCAAAC	190	(25)
<i>vacAs1b</i>	Forward Reverse	AGCGCCATACCGCAAGAG CTGCTTGAATGCGCCAAAC	187	(25)
<i>vacAs1c</i>	Forward Reverse	TTAGTTTCTCTCGCTTTAGTRGGGYT CTGCTTGAATGCGCCAAAC	220	(26)
<i>vacAm1/m2</i>	VAGF VAGR	CAATCTGTCCAATCAAGCGAG GCGTCAAAATAATTCCAAGG	m1: 567 m2: 642	(27)
<i>vacAi1</i>	VacF1 C1R	GTTGGGATTGGGGGAATGCCG TTAATTTAACGCTGTTTGAAG	426	(28)
<i>vacAi2</i>	VacF1 C2R	GTTGGGATTGGGGGAATGCCG GATCAACGCTCTGATTGA	432	(28)
<i>vacAd</i>	VAS5F VAGFR	ACTAATATTGGCACACTGGATTG CTCGCTTGATTGGACAGATTG	d1: 367 to 379 d2: 298	(29)

Table 2. Characteristics of 12 *H. pylori* strains.

Patients	Age	Pathology	Antibiotics resistance						<i>cagPAI</i>	<i>vacA</i>	MLST
			CLR	MZ	AMX	TE	RA	LVX			
1	14	Gastritis	S	S	S	S	S	S	NT	NT	NT
2	14	Gastritis	R	S	S	S	S	S	NT	NT	NT
3	14	Gastritis	S	S	S	S	S	S	NT	NT	NT
4	11	Gastritis	S	R	S	S	S	S	NT	NT	NT
5	16	Gastritis	S	S	S	S	S	S	NT	NT	NT
6	13	Gastritis	S	S	S	S	S	S	NT	NT	NT
7	14	Gastritis	S	S	S	S	S	S	Pos	s2m2i2d2	hpEurope
8	10	Gastritis	S	S	S	S	S	S	Pos	S1bm2i2d2	hpEurope
9	13	Gastritis	S	S	S	S	S	S	Neg	s2m2i2d2	hpEurope
10	13	Gastritis	S	S	S	S	S	S	Pos	s2m2i2d2	hpEurope
11	9	Gastritis	S	S	S	S	S	S	Neg	s2m2i2d2	hpEurope
12	10	Gastritis	S	S	S	S	S	S	Pos	s2m2i2d2	NT

CLR: Clarithromycin, MZ: Metronidazole, AMX: Amoxicillin, TE: Tetracycline, RA: rifampicin, LVX :levofloxacin, S: Sensible, R: Resistant, Pos: Positive, Neg : Negative, NT: No tested.

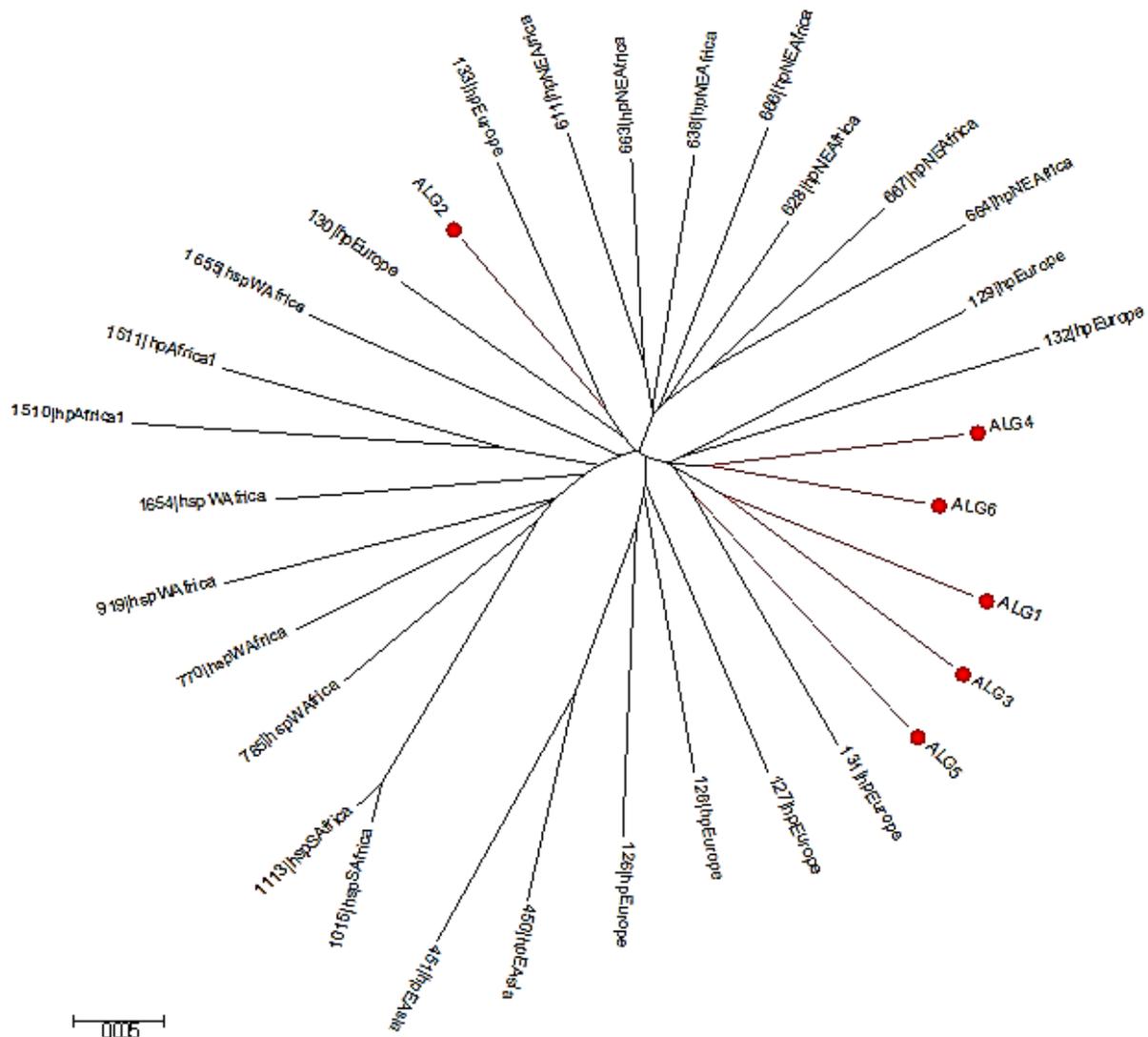


Figure 1. MLST analysis of 6 Algerian strains of *H. pylori* (ALG) with 25 reference strains. Phylogenetic tree constructed using neighbor-joining-tree with MEGA v6.

References

- Rowland M, Daly L, Vaughan M, Higgins A, Bourke B, Drumm B. Age-specific incidence of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology*. 2006;130(1):65–72.
- Fiedorek SC, Malaty HM, Evans DL, Pumphrey CL, Casteel HB, Evans DJ, et al. Factors influencing the epidemiology of *Helicobacter pylori* infection in children. *Pediatrics*. 1991;88(3):578–82.
- Malferteiner P, Megraud F, O'Morain CA, Gisbert JP, Kuipers EJ, Axon AT, et al. Management of *Helicobacter pylori* infection—the Maastricht V/Florence consensus report. *Gut*. 2017;66(1):6–30.
- Oleastro M, Menard A, Santos A, Lamouliatte H, Monteiro L, Barthelemy P, et al. Real-time PCR assay for rapid and accurate detection of point mutations conferring resistance to clarithromycin in *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol*. 2003;41(1):397–402.
- Achtman M, Azuma T, Berg DE, Ito Y, Morelli G, Pan Z-J, et al. Recombination and clonal groupings within *Helicobacter pylori* from different geographical regions. *Mol Microbiol*. 1999;32(3):459–70.
- Megraud F, Brassens-Rabbe MP, Denis F, Belbourni A, Hoa DQ. Seroepidemiology of *Campylobacter pylori* infection in various populations. *J Clin Microbiol*. 1989;27(8):1870–3.
- Djennane-Hadibi F, Bachtarzi M, Layaida K, Ali Arous N, Nakmouche M, Saadi B, et al. High-level primary clarithromycin resistance of *Helicobacter pylori* in Algiers, Algeria: A prospective multicenter molecular study. *Microb Drug Resist*. 2016;22(3):223–6.
- Liberato SL, Galindo MH, Álvarez LT, Miramón FS, Ciriza SL, Abadía AG, et al. Infección por *Helicobacter pylori* en población infantil: Prevalencia, factores asociados e influencia sobre el crecimiento. In: *Anales de Pediatría*. Elsevier; 2005 [cited 2017]. pp. 489–94.
- Granquist Å, Bredberg A, Sveger T, Axelsson I. A longitudinal cohort study on the prevalence of *Helicobacter pylori* antibodies in Swedish children and adolescents. *Acta Paediatr*. 2002;91(6):636–40.
- Okuda M, Osaki T, Lin Y, Yonezawa H, Maekawa K, Kamiya S, et al. Low prevalence and incidence of *Helicobacter pylori* infection in children: A population-based study in Japan. *Helicobacter*. 2015;20(2):133–8.
- Maherzi A, Bouaziz Abed A, Fendri C, Oubich F, Koubaa C, Fauchere J., et al. Infection à *Helicobacter pylori*: étude prospective chez les enfants tunisiens asymptomatiques. *Arch Pédiatr*. 2003;10(3):204–7.
- Alborzi A, Soltani J, Pourabbas B, Oboodi B, Haghghat M, Hayati M, et al. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection in children (south of Iran). *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2006;54(4):259–61.
- Frenck RW, Fathy HM, Sherif M, Mohran Z, El Mohammady H, Francis W, et al. Sensitivity and specificity of various tests for the diagnosis of *Helicobacter pylori* in Egyptian children. *Pediatrics*. 2006;118(4):e1195–202.
- Koletzko S, Richey F, Bontems P, Crone J, Kalach N, Monteiro ML, et al. Prospective multicentre study on antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* strains obtained from children living in Europe. *Gut*. 2006;55(12):1711–6.
- Gottrand F. Quels sont les problèmes spécifiques posés chez l'enfant? *Gastroentérol Clin Biol*. 2003;27(3):484–7.
- Kuipers EJ. Review article: Exploring the link between *Helicobacter pylori* and gastric cancer. *Aliment Pharmacol Ther*. 1999;13(s1):3–11.
- Yamaoka Y. Pathogenesis of *Helicobacter pylori*-related gastroduodenal diseases from molecular epidemiological studies. *Gastroenterology Research and Practice*. 2012;2012:1–9.
- Moodley Y, Linz B, Bond RP, Nieuwoudt M, Soodyall H, Schlegelbusch CM, et al. Age of the association between *Helicobacter pylori* and man. *PLoS Pathog*. 2012;8(5):e1002693.

19. Falush D, Wirth T, Linz B, Pritchard JK, Stephens M, Kidd M, et al. Traces of human migrations in *Helicobacter pylori* populations. *Science*. 2003;299(5612):1582–5.
20. Gangwer KA, Shaffer CL, Suerbaum S, Lacy DB, Cover TL, Bordenstein SR. Molecular evolution of the *Helicobacter pylori* vacuolating toxin gene *vacA*. *J Bacteriol*. 2010;192(23):6126–35.
21. Olbermann P, Josenhans C, Moodley Y, Uhr M, Stamer C, Vauterin M, et al. A global overview of the genetic and functional diversity in the *Helicobacter pylori* *cag* pathogenicity island. *PLoS Genet*. 2010;6(8):e1001069.
22. Suzuki R, Shiota S, Yamaoka Y. Molecular epidemiology, population genetics, and pathogenic role of *Helicobacter pylori*. *Infect Genet Evol*. 2012;12(2):203–13.
23. Occhialini A, Marais A, Urdaci M, Sierra R, Muñoz N, Covacci A, et al. 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*. 2001;69(3):1902–8.
24. Atherton JC, Cao P, Peek RM, Tummuru MK, Blaser MJ, Cover TL. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*: association of specific *vacA* types with cytotoxin production and peptic ulceration. *J Biol Chem*. 1995;270(30):17771–7.
25. Van Doorn LJ, Figueiredo C, Rossau R, Jannes G, Van Asbroeck M, Sousa JC, et al. Typing of *Helicobacter pylori vacA* gene and detection of *cagA* gene by PCR and reverse hybridization. *J Clin Microbiol*. 1998;36(5):1271–6.
26. Erzin Y, Koksall V, Altun S, Dobrucali A, Aslan M, Erdamar S, et al. Prevalence of *Helicobacter pylori vacA*, *cagA*, *cagE*, *iceA*, *babA2* genotypes and correlation with clinical outcome in Turkish patients with dyspepsia. *Helicobacter*. 2006;11(6):574–80.
27. Atherton JC, Cover TL, Twells RJ, Morales MR, Hawkey CJ, Blaser MJ. Simple and accurate PCR-based system for typing vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol*. 1999;37(9):2979–82.
28. Rhead JL, Letley DP, Mohammadi M, Hussein N, Mohagheghi MA, Hosseini ME, et al. A new *Helicobacter pylori vacuolating cytotoxin* determinant, the intermediate region, is associated with gastric cancer. *Gastroenterology*. 2007;133(3):926–36.
29. Ogiwara H, Sugimoto M, Ohno T, Vilaichone R-K, Mahachai V, Graham DY, et al. Role of deletion located between the intermediate and middle regions of the *Helicobacter pylori vacA* gene in cases of gastroduodenal diseases. *J Clin Microbiol*. 2009;47(11):3493–500.

How to cite this article: Raaf N., Amhis W., Benhassine F., Baiod-Chorfi S., Ouar-Korichi M. *Helicobacter Pylori* in Children: Molecular Characterization, Antibiotics Resistance and MLST of Isolated Strains in an Algerian Hospital. *Infection, Epidemiology and Microbiology*. 2017; 3(3): 73-77.