

<u>Chapitre. 1</u> : GENERALITES	4
<u>Chapitre. 2</u> : MATERIELS ET METHODES	19
2.1. Inclusion des patients et isolement des souches	20
2.2. Culture, Isolement et Identification des souches de <i>H. pylori</i>	22
2.3. Extraction de l'ADN génomique	22
2.4. Etude de l'îlot de pathogénicité <i>cag</i> (<i>cag</i> -PAI)	22
2.4.1. Procédure moléculaire	22
2.4.2. Recherche de <i>cagA</i> , marqueur de la présence de <i>cag</i> -PAI (PCR CagA)	23
2.4.3. Confirmation de l'absence de <i>cag</i> -PAI (PCR-ES)	25
2.4.4. Etude de la diversité de la région 3' du gène <i>cagA</i>	25
2.4.4.1. Amplification de la région 3' du gène <i>cagA</i>	25
2.4.4.2. Séquençage des amplicons	26
2.4.4.3. Identification des motifs EPIYA	26
2.4.4.4. Construction d'un arbre phylogénétique	26
2.5. Etude de la clonalité des souches de <i>H. pylori</i> isolées chez un même Patient par RAPD	27
2.5.1. Isolement et subculture de 5 colonies des primocultures antrale et Fundique	27
2.5.2. Mise au point du RAPD	27
2.6. Sensibilité des souches	27
<u>Chapitre. 3</u> : RESULTATS	29
3.1. Propriétés associées aux souches de <i>H. pylori</i> incluses dans l'étude	30
3.2. Amplification du gène <i>cagA</i>	31
3.3. Amplification de la région 3' du gène <i>cagA</i> codant pour les motifs EPIYA	31
3.3.1. Amplification de la région 3' du gène <i>cagA</i>	32
3.3.2. Diversité du gène <i>cagA</i> , nombre et type de motifs EPIYA	32
3.3.3. Analyse phylogénétique	35
3.4. Etude de la clonalité des souches de <i>H. pylori</i> chez un même patient	37
3.5. Sensibilité des souches aux antibiotiques	37
<u>Chapitre. 4</u> : DISCUSSION	38

Conclusion et Perspectives	46
Références bibliographiques	50
Annexes	57

ABREVIATIONS

ADN:	Acide désoxyribonucléique
AGS:	Human gastric adenocarcinoma epithelial cell line

AP 1:	Activator protein 1
ARN:	Acide ribonucléique
ATP:	Adenosine Tri-Phosphate
BabA:	Blood group antigen-binding adhesion A
BCC:	Bouillon coeur cerveau
BET :	Bromure d’Ethidium
CagA:	Cytotoxin- associated gene A
CagA-P:	Cytotoxine associated gene A- Phosphate
Cag-PAI:	Cytotoxin- associated gene Pathogenicity Island
CA-SFM:	Comité de l’antibiogramme de la société française de microbiologie
CHU :	Centre Hospitalier et Universitaire
CLO:	Campylobacter like organism
CMI:	Concentration minimale inhibitrice
EDTA:	Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid
ERK:	Extracellular signal-regulated protein kinase.
ESS:	Eastern CagA Specific Sequence
E-test:	Ellipsometer- test
GM- CSF:	Granulocyte monocyte-colony stimulating factor
IL-β:	Interleukine 1-béta
IL-8:	Interleukine 8
IPP:	Inhibiteur de pompe à protons
MALT:	Mucosa-associated Lymphoid Tissue
MEK:	Mitogen-activated protein kinase
MH:	Muller-Hinton
Pb:	Paire de bases
PCR:	Polymerase chain reaction
PCR CagA:	Polymerase chain reaction CagA
PCR ES:	Polymerase chain reaction Empty side
PCR EPIYA:	Polymerase chain reaction EPIYA
PFGE:	Pulse field gel electrophoresis
PZ:	Plasticity zone
RAPD:	Random amplified polymorphis DNA
RFLP:	Restriction fragment length polymorphic
SH-2:	Src homology 2 domain – containing protein-tyrosine phosphatase 2

SabA:	Sialic-acid-binding adhesion A
TBE:	Tris Borique EDTA
TFSS:	Type four secretion system
TNF α :	Tumor necrosis factor alpha
UV:	Ultra violet
VacA:	Vacuolating cytotoxin A
WSS:	Wertern CagA Specific Sequence

LISTE DES FIGURES

Figure 1 :	Morphologie de <i>Helicobacter pylori</i>	6
Figure 2 :	Prévalence de l'infection à <i>H. pylori</i> dans le monde	8
Figure 3 :	Pathogénèse du cancer gastrique	11
Figure 4 :	Activité biologique de l'îlot de pathogénicité <i>cag</i> (<i>cag</i> -PAI)	16
Figure 5 :	Procédure moléculaire des différentes étapes dans l'étude de L'îlot de pathogénicité <i>cag</i> (<i>cag</i> -PAI)	23
Figure 6 :	Profil électrophorétique d'une PCR <i>cagA</i>	31
Figure 7 :	Profil électrophorétique d'une PCR ES	31
Figure 8 :	Profil électrophorétique d'une PCR EPIYA	32
Figure 9 :	Arbre phylogénétique de souches de <i>H. pylori</i> isolées de patients d'origine géographiques diverses	36
Figure 10 :	Profil électrophorétique d'une PCR RAPD	37

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I :	Différentes espèces du genre <i>Helicobacter</i> et leur hôtes	7
Tableau II :	Pays dont l'incidence annuelle estimée du cancer gastrique est la plus élevée sur chaque continent, pour 100 000 hommes et femmes	12
Tableau III :	Incidence annuelle estimée pour 100 000 hommes ou femmes du cancer gastrique et son ordre de fréquence sur quelques pays en Afrique	13
Tableau IV :	Répartition des pathologies gastro-duodénales associées à la présence de <i>H. pylori</i> selon les ethnies	21
Tableau V :	Liste des amorces utilisées	24
Tableau VI :	Répartition des pathologies gastro-duodénales associées à la présence de <i>H. pylori</i>	30
Tableau VII :	Alignement des séquences peptidiques des souches de <i>H. pylori</i> isolées chez 16 patients avec les 3 souches de référence	33- 34
Tableau VIII :	Différents type de motifs de phosphorylation de la région 3' du gène <i>cagA</i> et pathologies associées chez les souches isolées.	35
Tableau IX :	Sensibilité des souches aux antibiotiques	37

Introduction

La découverte de *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) et de son lien avec les pathologies gastro-duodénales ont valu à Marshall et à Warren de recevoir le prix Nobel de médecine 2005 (Mégraud and Lamouliatte, 1996; Frenck and Clemens, 2003). La prévalence de l'infection est beaucoup plus importante dans les pays en voie de développement (80-95 %) que dans les pays industrialisés (15-30 %) (Kaiser, *et al.*, 2004). Chez la plupart des individus infectés, la gastrite chronique évolue sans autre conséquence et reste asymptomatique. Une proportion faible de ces patients (environ 10% des personnes infectées) développera au cours

du temps une maladie ulcéreuse (Parsonnet, 1995b), et 1 % une néoplasie gastrique (Kuipers, 1999). Les incidences de cancer gastrique les plus élevées dans le monde sont observées en Asie (particulièrement en Chine, au Japon et en Corée) et en Amérique du sud (particulièrement au Chili, en Equateur et au Pérou)*.

Les facteurs de pathogénicité ne sont pas encore totalement connus mais l'îlot de pathogénicité *cag* (*cag*-PAI) semble jouer un rôle primordial. Cet îlot est impliqué dans plusieurs processus majeurs, notamment la sécrétion et la translocation de la protéine CagA dans la cellule gastrique (Argent, *et al.*, 2004). La protéine CagA est ensuite phosphorylée sur les motifs de phosphorylation EPIYA (classés en EPIYA -A, -B, -C et -D) présents dans la région 3' du gène *cagA* (Panayatopoulou, *et al.*, 2007). Elle est à l'origine de réarrangements du cytosquelette via des mécanismes de signalisation non totalement élucidés (Mégraud and Lamouliatte, 1996). En occident, de nombreuses données montrent une corrélation entre une infection par des bactéries possédant un *cag*-PAI fonctionnel et la survenue d'ulcères peptiques ou de cancers gastriques. Chez les souches sécrétant une protéine CagA de type EPIYA -A, -B, -C, l'augmentation du nombre de motifs EPIYA a été associée au degré de phosphorylation de la protéine CagA et à une activité biologique augmentée en terme d'élongation de cellules AGS (Argent, *et al.*, 2004). En Asie de l'Est, les souches sécrétant une protéine CagA de type EPIYA -A, -B, -D sont associées de façon significative à une gastrite chronique active sévère et à une atrophie gastrique (Azuma, *et al.*, 2002).

Très peu d'études ont été réalisées au Sénégal, et de façon plus générale en Afrique, sur *H. pylori*. Des travaux réalisés au CHU Le Dantec entre 1995 et 2001 ont étudié la prévalence de l'infection à *H. pylori* chez des patients présentant des troubles dyspeptiques, les lésions histologiques associés à l'infection et la sensibilité de la bactérie aux antibiotiques couramment utilisés pour l'éradiquer (Mbengue *et al.*, 1997 ; Seck, 2001). Aucun travail n'a en revanche étudié l'infection à *H. pylori* dans sa globalité et ne s'est intéressé aux facteurs de virulence de la bactérie. Pourtant, la probabilité de survenue de manifestations gastro-duodénales cliniques graves associées à la présence de *H. pylori* chez des patients africains est similaire à celle observée dans les pays industrialisés, où le cancer gastrique est considéré comme un problème majeur de santé publique.

L'objectif de ce travail mené au Sénégal est d'élargir nos connaissances sur la diversité de la pathologie gastro-duodénale humaine induite par *H. pylori*, sur la sensibilité des souches aux antibiotiques mais aussi sur la polyclonalité de l'infection chez un même

* Globocan 2002, <http://dep-iarc.fr>

patient et sur le lien entre la diversité de la région 3' du gène *cagA* et la pathologie gastro-duodénale associée.

Le plan du mémoire sera le suivant :

- Un premier chapitre nommé « Généralités » consacré à u n état des connaissances sur le sujet,
- Un deuxième chapitre intitulé « Matériels et Méthodes » où sera exposé le protocole suivi,
- Un troisième chapitre nommé « Résultats »
- Un quatrième chapitre nommé « Discussion » où, nos résultats seront comparés aux données de la littérature,
- et enfin une conclusion suivie de perspectives pour cette étude.

Chapitre I :

Généralités

Au début du 20^{ème} siècle, de nombreuses observations ont rapporté la présence de bactéries spiralées dans l'estomac de l'Homme et de nombreux autres mammifères. La paternité de ces premières observations est discutée, mais elle semble être attribuée à Krienitz qui, dès 1906 observa la présence de telles bactéries dans l'estomac d'un patient souffrant de cancer gastrique (Mégraud and Lamouliatte, 1996). Pendant plus d'un siècle, la présence de bactéries dans la muqueuse gastrique a fait l'objet de débats au sein de la communauté

scientifique (Fukuda, *et al.*, 2001). En parallèle, certains éléments convergeaient vers une étiologie bactérienne des pathologies gastriques : (i) l'existence d'épidémies de gastrite rapportées lors de la transmission apparente d'une hypochlorhydrie associée à une gastrite entre plusieurs volontaires ayant subis une endoscopie lors d'une même étude (Mégraud and Lamouliatte, 1996), (ii) les propriétés thérapeutiques du bismuth vis à vis de l'ulcère, et (iii) la présence d'une activité uréasique d'origine bactérienne dans de nombreux estomacs humains. Aucun rapprochement n'a été fait entre ces différentes observations jusqu'au début des années 1980, où la motivation de deux médecins australiens, Barry Marshall et Robin Warren, permet la « redécouverte » d'une bactérie à tropisme stomacal. En 1982, après de nombreux essais infructueux, Marshall et Warren parviennent enfin à isoler cette bactérie à partir d'une boîte de pétri oubliée pendant 5 jours dans l'étuve durant le long week-end de Pâque d'avril 1982. C'est un bacille Gram négatif, incurvé et mobile, microaérophile. Au début, en raison de sa morphologie et des conditions de culture utilisées pour son isolement, cette bactérie a été considérée comme proche des Campylobacters (Campylobacter like organism, CLO). Par la suite, son premier nom officiel a été *Campylobacter pyloridis*. Comme cette nomenclature n'était pas en accord avec les règles officielles, le nom a été modifié en *Campylobacter pylori*. (Mégraud and Lamouliatte., 1996). Sur la base de la séquence des ARN 5S et 16S, de la composition en acide gras, de la morphologie des flagelles, de sa croissance et de ses capacités enzymatiques, ainsi que de la nature de ses quinones respiratoires, cette bactérie a été renommée en 1989 *Helicobacter pylori* (voir figure 1) (Goodwin, *et al.*, 1989), représentant ainsi le chef de file d'un nouveau genre bactérien (Kaiser, *et al.*, 2004).

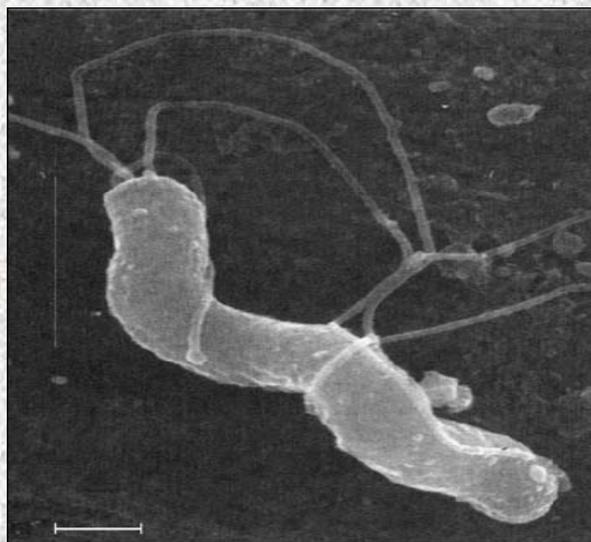


Figure 1. Morphologie de *Helicobacter pylori* vu au microscope électronique à l'échelle de 0,5 µm. (La photo a été prise au département de microbiologie et d'immunologie de l'Université de New South Wales, NSW, Australie et offerte par Lucinda J. Thompson du département de microbiologie et d'immunologie de Stanford, CA, USA).

Le genre *Helicobacter* appartient à la famille des Helicobacteriaceae (Campylobactériales, division epsilon de la classe des Proteobacteria) comprenant aussi les genres *Flexispira*, *Sulfurimonas*, *Thiovulum*, *Wolinella* et la bactérie *Thiomicrospora denitrificans* (Kusters *et al.*, 2006).

Classification du genre *Helicobacter*¹

<u>Règne:</u>	Bacteria
<u>Phylum:</u>	Proteobacteria
<u>Classe:</u>	Epsilon Proteobacteria
<u>Ordre:</u>	Campylobacterales
<u>Famille:</u>	Helicobacteraceae
<u>Genre:</u>	<i>Helicobacter</i>
<u>Nom binominal:</u>	<i>Helicobacter pylori</i>

Le genre *Helicobacter* est en pleine expansion et regroupe actuellement une trentaine d'espèces identifiées et plus de 50 souches en cours de classification. Elles sont variées et parasitent des hôtes différents (voir Tableau I).

Tableau I. Les différentes espèces du genre *Helicobacter* et leurs hôtes.

Espèce	Hôte naturel	Hôte occasionnel
Helicobacter gastriques		
<i>H. acinonychis</i>	Guépard	
<i>H. bizzozeroni</i>	Chien	
<i>H. bovis</i>	Bovins	
<i>H. felis</i>	Chat, chien	
<i>H. heilmannii</i>	Homme, primates, chien, chat, porc	
<i>H. suis</i>	Cochon	
<i>H. mustelae</i>	Furet	
<i>H. nemestrinae</i>	Macaque	
<i>H. pylori</i>	Homme	Primates
<i>H. salomonis</i>	Chien	
<i>H. suncus</i>	Musaraigne	
Helicobacter entérohépatiques		

¹ Voir le site www.wikipedia.org/wiki/Helicobacterpylori

<i>H. bilis</i>	Chien, Souris	Homme
<i>H. canis</i>	Chien	Homme
<i>H. cinaedi</i>	Hamster	Homme
<i>H. cholecystus</i>	Hamster	
<i>H. fennelliae</i>	Hamster	Homme
<i>H. hepaticus</i>	Souris	
<i>H. muradirum</i>	Souris, rat	
<i>H. canadensis</i>	Oiseaux	
<i>H. rodentum</i>	Souris	
<i>H. trogontum</i>	Rat	
<i>H. typhlonicus</i>	Souris	
<i>H. rappini</i>	Chien, mouton	Homme

Les membres du genre *Helicobacter* évoluent tous en atmosphère microaérophile et dans la majorité des cas, ils sont à catalase, oxydase et uréase positives (Kusters *et al.*, 2006). Le tropisme tissulaire permet de séparer les espèces du genre *Helicobacter* en deux groupes : les Helicobacters gastriques (tous uréase positifs) et les Helicobacters entéro-hépatiques (Solnick and Schauer, 2001; Gueneau and Loiseaux-De Goër, 2002). Cette division est confirmée au niveau phylogénétique sur la base de l'analyse des séquences de l'ARN 16S (Frenck and Clemens, 2003, Solnick, *et al.*, 2001).

L'habitat de *H. pylori* est l'estomac de l'homme où en général, il n'a pas de bactéries concurrentes. Parmi les Helicobacters gastriques autres que *H. pylori*, seul *H. helmannii* peut infecter l'homme mais également le chien, le chat, le porc et les primates qui, par ailleurs sont ses hôtes habituels. C'est une zoonose qui atteint donc l'homme de façon accidentelle. *H. helmannii* est facilement identifiable à l'examen direct par son aspect fortement spiralé, en "tire-bouchon". La prévalence de l'infection humaine à *H. helmannii* est très faible, de l'ordre de 0,5%. (Burrocoa, non publié).

Au moins, plus de la moitié de la population mondiale est infectée par *H. pylori* avec une prévalence comprise entre 15 et 30 % dans les pays industrialisés et 80 à 95 % dans les pays en voie de développement (Kaiser, *et al.*, 2004) (voir figure 2). Les raisons avancées pour expliquer cette différence de prévalence sont des facteurs ethniques et socio-économiques tels que la promiscuité, la vie en collectivité, le manque d'hygiène, l'eau souillée, le partage de lit pendant l'enfance (Frenck and Clemens, 2003). Cette prévalence varie aussi suivant les populations et les groupes d'une même population (Kaiser, *et al.*, 2004). Aucune différence de prévalence suivant le sexe n'a été retrouvée chez des enfants tunisiens infectés par *H. pylori* (Maherzi, *et al.*, 2003). En Afrique, la prévalence de l'infection a été évaluée au Sénégal à 82% (avec 90,9% pour la tranche d'âge de 11-20 ans),

au Nigeria à 91% (avec 82% pour la tranche d'âge de 5- 9 ans). Elle est supérieure à 95% en Gambie (avec 95% chez les enfants de 5 ans) ; supérieure aussi à 95% en Ethiopie (avec 48% pour la tranche d'âge de 5-9 ans). Cette prévalence est de 90% en Egypte (avec 50% chez les enfants de 3 ans) et 94% en Lybie (avec 50% pour la tranche d'âge de 1-9 ans et 84% pour celle de 10 à 19 ans) (Mbengue, *et al.*, 1997; Frenck and Clemens, 2003). L'infection par *H. pylori* a lieu essentiellement durant l'enfance (Glynn, *et al.*, 2002) avec une incidence allant de 3 à 10 % par an chez les enfants des pays en voie de développement et de 1% par an dans les pays industrialisés (Ernst and Gold, 2000). Cette infection persiste toute la vie en l'absence de traitement d'éradication (Atherton, 2006).

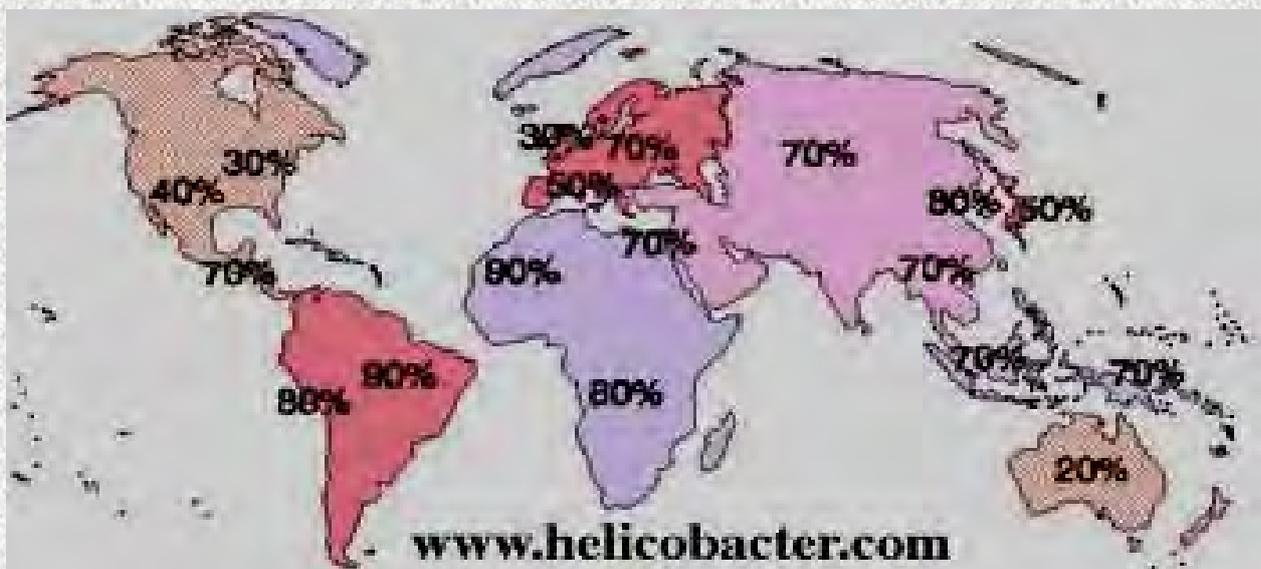


Figure 2. Prévalence mondiale de l'infection à *H. pylori*²

La présence de cas groupés familiaux (Dominici, *et al.*, 1999), la similitude du génome de souches isolées chez des patients au sein d'une même famille (Wang, *et al.*, 1993) et l'impossibilité de mettre en évidence un réservoir environnemental pour cette bactérie permettent maintenant d'affirmer que la transmission de *H. pylori* est essentiellement interhumaine (Kivi, *et al.*, 2007). Le mode de transmission de *H. pylori* reste cependant mal compris. Certains arguments sont en faveur d'une contamination par voie oro-orale (Clemens, *et al.*, 1996), alors qu'une infection par voie oro-fécale pourrait dans certains cas intervenir (Makristathis, *et al.*, 1998). Plusieurs études de typage génétique ont montré que l'acquisition de la souche peut survenir à la fois à l'intérieur et à l'extérieur de la famille (Vincent, *et al.*, 1994; Gottrand and Turck, 1995; Burucoa, *et al.*, 1999). Ainsi, une étude

² Carte extraite du site www.helicobacter.com

réalisée en Allemagne qui utilisait le PFGE et la RFLP pour comparer les souches des membres d'une même famille, a montré que seuls 10 enfants sur 18 avaient une souche identique à celle de leur mère et aucun n'avait une souche identique à celle de leur père (Tindberg, 2002). Il est intéressant de noter que, même lorsque les mères avaient une souche de génotype différent de celui de leurs enfants, 82% des enfants d'une même fratrie avaient des souches identiques (Kivi, *et al.*, 2003). Cette observation suggère que l'acquisition d'une infection pourrait survenir à l'extérieur d'une famille et que la souche sera par la suite transmise entre les enfants. Cela survient surtout lorsque ces derniers vivent dans des conditions de promiscuité prolongée avec d'autres enfants. Dans une étude réalisée par Raymond, *et al.* (2004), une analyse du polymorphisme des gènes *glmM* et *hspA* au sein du génome de *H. pylori* isolés de l'estomac des membres d'une famille indique une transmission intrafamiliale. Plusieurs mécanismes tels que les phénomènes de mutation, les recombinaisons intragéniques et l'acquisition d'allèles étrangers peuvent augmenter la diversité génétique des souches au sein d'une famille (Raymond, *et al.*, 2004). Un typage génomique de l'ADN a révélé que la même souche ou des souches semblables ont été identifiées dans au moins 2/3 des membres d'une famille, montrant ainsi une transmission intrafamiliale ou une source commune d'infection (Bamford, *et al.*, 1993).

L'existence d'une transmission oro-orale ou féco-orale est discutée. En effet, des bactéries viables n'ont été isolées que très exceptionnellement à partir d'extraits de la bouche (salive, dents) ou de selles de patients infectés. Si la présence d'ADN de *H. pylori* a été détectée par amplification génique dans des prélèvements d'eaux usées, aucune culture bactérienne n'a été obtenue à partir de ces extraits. La voie féco-orale pourrait néanmoins intervenir lors des cas de transits intestinaux très rapides, associés à des diarrhées, à partir desquelles il a été possible de cultiver la bactérie (Mitchell, *et al.*, 2001). Des expériences de laboratoire ont montré que des formes coccoïdes de *H. pylori* étaient présentes jusqu'à une semaine dans de l'eau contaminée artificiellement et conservée à +4°C, ce qui laisse supposer la possible persistance de ces formes dans l'environnement (Hulten, *et al.*, 1996; Fan, *et al.*, 1998). Ces formes coccoïdes viables et non cultivables pourraient être une source de contamination, peut être par l'intermédiaire du biofilm présent dans tous les systèmes de stockage de l'eau (Bunn, *et al.*, 2002). Elles sont incapables de se diviser en condition de culture usuelle mais elles maintiennent un métabolisme basal avec cependant une forte diminution de l'ATP intracellulaire (Sorberg, *et al.*, 1996). Certains auteurs pensent qu'il s'agit de formes de dégénérescence. L'absence de virulence chez le porcelet gnotobiotique infecté expérimentalement (Eaton, *et al.*, 1995) et les modifications structurales et

métaboliques observées lors de la conversion en forme coccoïde (Kusters, *et al.*, 1997; Sorberg, *et al.*, 1996) seraient en faveur de cette hypothèse. D'autres suggèrent qu'il s'agit de formes de résistance quand le milieu est appauvri. Elles pourraient représenter ainsi une forme de transmission de l'infection. Des études portant sur différentes activités cellulaires semblent également supporter l'hypothèse qu'il s'agirait de formes de résistance aux traitements antibiotiques (Costa, *et al.*, 1999; Mizoguchi, *et al.*, 1999 ;Nilsson, *et al.*, 2002).

Toute infection de l'estomac par cette bactérie entraîne une inflammation de la muqueuse se traduisant par une gastrite histologique qui reste le plus souvent asymptomatique. Il n'existe donc pas de porteurs véritablement sains de *H. pylori*. Approximativement 90 à 95 % des ulcères duodénaux et 70 à 75 % des ulcères gastriques sont associés à une infection à *H. pylori* (Covacci, *et al.*, 1999). Il a été estimé que le risque, pour un patient infecté par *H. pylori*, de développer un ulcère peptique est de 10 % (Parsonnet, 1995b). Enfin, *H. pylori* a été classée depuis 1994 parmi les agents carcinogènes de classe I par l'Organisation Mondiale de la Santé. Il s'agit de la première bactérie carcinogène reconnue (Azuma, *et al.*, 2002). L'infection à *H. pylori* est associée à deux types de néoplasies : les adénocarcinomes et, beaucoup plus rarement, les lymphomes de type MALT (Mucosal Associated Lymphoïde Tissue). Une infection à *H. pylori* est observée chez 90 % des patients ayant un lymphome du MALT (Konturek, *et al.*, 2000). L'évaluation du risque de développer un cancer gastrique pour un patient infecté par *H. pylori* s'élève, selon les études, à 1 à 4 % tout au long de la vie (Kuipers, 1999). Ce risque est toutefois multifactoriel et dépend des facteurs associés à la bactérie et de ceux liés à l'hôte. Parmi les facteurs bactériens notons la présence d'une cytotoxine vacuolisante *vacA* et d'un *cag*-PAI fonctionnel (Covacci, *et al.*, 1999) alors que l'accroissement de la prolifération cellulaire liée à des pro-oncogènes, l'hypergastrinémie avec hyperexpression de la cyclooxygénase-2 (Konturek, *et al.*, 2003a, Konturek, *et al.*, 2003b), le polymorphisme de certains gènes impliqués dans la réponse inflammatoire chez l'hôte codant pour l'IL-1 β (El-Omar, *et al.*, 2000), l'IL-8 (Crabtree, *et al.*, 1999) et TFN α (Buruccoa, non publié) sont considérés comme des marqueurs prédictifs d'une évolution sévère de l'infection, comme le sont également un certain nombre de facteurs nutritionnels (Konturek, *et al.*, 2003a). La dichotomie cancer gastrique et ulcère duodéal est actuellement mieux comprise. Une gastrite localisée principalement au niveau antrale est associée à une hypergastrinémie et à une hyperchlorhydrie, et peut entraîner une métaplasie gastrique au niveau duodéal puis un ulcère duodéal. Dans ce cas, un effet protecteur vis-à-vis du développement d'un cancer gastrique a été mis en évidence. Par opposition, une pangastrite (infection de la partie antrale et fundique de l'estomac) est accompagnée d'une

hypochlorhydrie liée à la diminution de la sécrétion acide. L'évolution de l'infection vers le cancer suit une progression séquentielle, appelée « cascade de Correa », allant de la pangastrite vers la gastrite atrophique, la métaplasie intestinale précurseur de la dysplasie, puis la transformation maligne (Konturek, *et al.*, 2003a; Kauser, *et al.*, 2004) (voir figure 3).

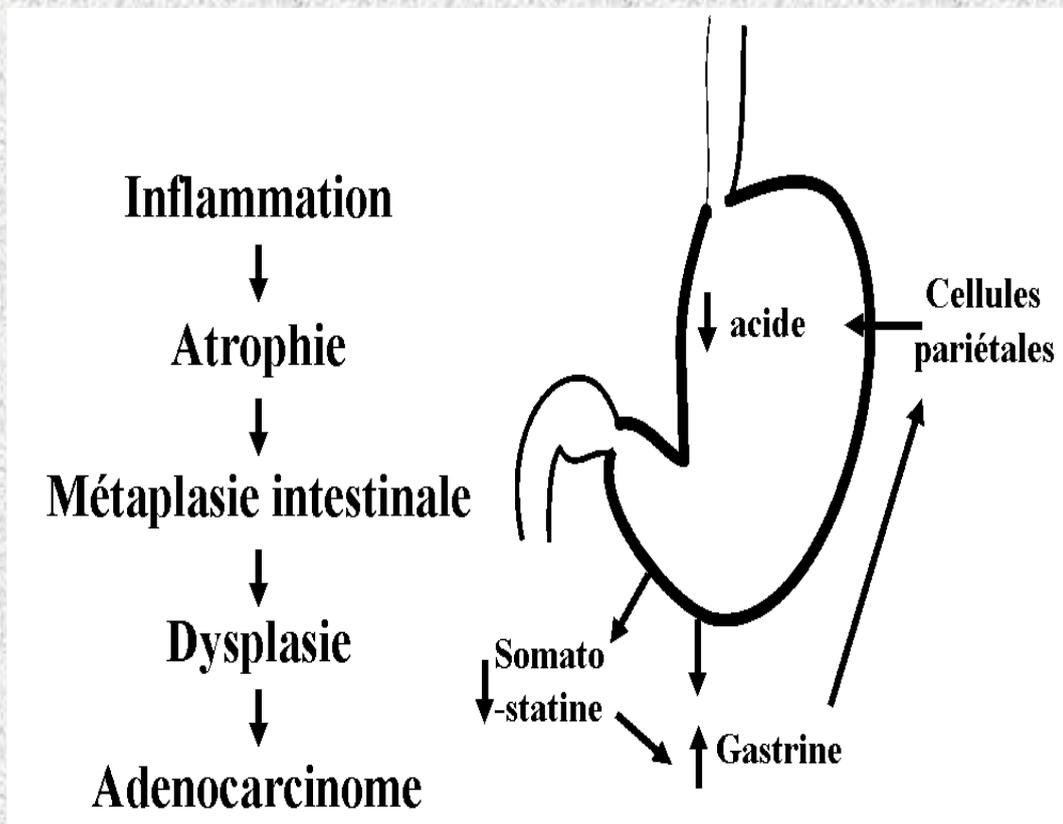


Figure 3. Pathogenèse du cancer gastrique (*Helicobacter pylori* persistence: Biology and disease, John Atherton, Wolfon Digestive Diseases Center and Institute of Infection, Immunity and Inflammation -University of Nottingham, UK)

Les lésions de gastrite chronique ou ulcéreuse sont classiques et le cancer de l'estomac fait partie des 5 cancers les plus fréquents dans le monde. Les incidences mondiales les plus élevées de cancers gastriques sont observées en Asie de l'Est (particulièrement en Chine, en Corée et au Japon) et en Amérique du Sud (particulièrement au Chili, en Equateur et au Pérou)³. Toutefois, dans d'autres pays du monde, des valeurs assez élevées ont été rapportées (Voir Tableau II)

³ Les données sur l'incidence des cancers sont obtenues sur le site suivant : Globocan 2002, <http://www-dep.iarc.fr>. L'IARC (International Agency for Research on Cancer) est un des départements de l'OMS. Dernier visite le 05/01/2007.

Tableau II. Pays dont l'incidence annuelle estimée du cancer gastrique est la plus élevée sur chaque continent, pour 100 000 hommes et femmes⁴.

Continent	Incidence annuelle estimée pour 100 000	
	Hommes	Femmes
Afrique	17,8 (Congo)	19,5 (Mali)
Asie	69,7 (Corée Nord et Sud)	26,8 (Corée Nord et Sud)
Amérique	46,1 (Chili)	30,6 (Pérou)
Europe	41,9 (Bélarussie)	16,9 (Bélarussie)

L'énigme africaine décrite par certains auteurs montre une forte prévalence de l'infection par *H. pylori* associée à une incidence basse des maladies gastro-duodénales liées à l'infection par cette bactérie, en particulier le cancer gastrique (Campbell, *et al.*, 2001; Cataldo, *et al.*, 2004). L'incidence de ce cancer dans certains pays d'Afrique ainsi que son ordre de fréquence par rapport aux autres cancers sont rapportés dans le tableau III.

Une revue de la littérature réalisée sur l'ensemble des études endoscopiques prospectives en Afrique suggère que la survenue de manifestations cliniques graves associées à la présence de *H. pylori* est similaire à celle observée dans les pays industrialisés (Nonaka, *et al.*, 2005). Le mythe de l'énigme africaine serait dû à la constitution d'échantillons biaisés non représentatifs de la population générale, dans des pays où l'accès aux soins reste difficile et l'espérance de vie relativement faible.

Tableau III. Incidence annuelle estimée, pour 100 000 hommes et femmes, du cancer gastrique et son ordre de fréquence sur quelques pays d'Afrique⁵.

Pays	Incidence annuelle estimée pour 100000		Ordre de fréquence	
	Hommes	Femmes	Homme	Femme

⁴ Globocan 2002, <http://www-dep.iarc.fr>

⁵ Globocan 2002, <http://www-dep.iarc.fr>

Algérie	5,9	3,1	3 (Poumon : 16,9)	6 (Sein : 23,5)
Ethiopie	6,9	3,0	6 (Œsophage : 28,1)	11 (Col Utérin : 35,9)
Gambie	2,4	2,1	4 (Foie : 45,6)	4 (Col Utérin : 28,8)
Nigeria	1,8	2,0	9 (Prostate : 23,3)	
Madagascar	7,4	5,5	5 (Foie : 21,1)	7 (Sein : 31,2)
Sénégal	5,2	31,1	3 (Foie : 30,8)	6 (Col Utérin : 42,7)
				5 (Col utérin : 26,2)

Les facteurs de virulence de *H. pylori* sont multiples mais le rôle de ces facteurs *in vivo* est souvent difficile à appréhender. Très rapidement, *H. pylori* quitte l'acidité extrême de la lumière gastrique pour atteindre le mucus, son principal site de colonisation, grâce à sa morphologie spiralée et à la présence de flagelles (4-7 engainés unipolaires) qui lui confèrent une grande mobilité supérieure aux autres bactéries. *H. pylori* est également sensible, comme les autres bactéries, à l'acidité gastrique mais il survit aux pH acides grâce à l'effet neutralisant de l'ammoniac libéré lors de la dégradation de l'urée par l'uréase. Celui-ci tamponne l'acidité du milieu suffisamment longtemps pour permettre à la bactérie d'atteindre, à travers le mucus, les cellules de la muqueuse gastrique, là où le pH est voisin de la neutralité. (Mégraud and Lamouliatte, 1996). L'uréase, chez *H. pylori*, représente 6 à 10 % des protéines totales de la bactérie. *H. pylori* peut adhérer aux cellules à l'aide de multiples adhésines telles que BabA dont le récepteur cellulaire est l'antigène Lewis b, mais aussi les adhésines SabA, AlpA, AlpB (Ilver, *et al.*, 1998).

Les facteurs de pathogénicité, à l'origine des lésions de la muqueuse gastrique, ne sont pas encore totalement élucidés, mais l'inflammation chronique et son intensité en sont une composante importante. Il semble que l'uréase joue un rôle important du fait de l'action cytotoxique de l'ammoniac (Mégraud and Lamouliatte, 1996). Deux autres facteurs de pathogénicité semblent également importants, la cytotoxine vacuolisante VacA et le *cag*-PAI. Bien que toutes les souches de *H. pylori* n'aient pas une activité cytotoxique, elles possèdent

presque toutes le gène *vacA* codant la cytotoxine du même nom. Le gène *vacA* est sujet à un polymorphisme au niveau de : (i) la région "s" codant pour la séquence signale de la protéine (l'allèle s1 fonctionnel, subdivisé en s1a, s1b, s1c et l'allèle non fonctionnel s2), et (ii) la région "m" située au milieu du gène (allèles m1 et m2 subdivisé en m2a et m2b). Ce mosaïsme se traduit *in vitro*, par des niveaux d'activité différents de la toxine. De nombreux effets de VacA ont été rapportés *in vitro* : (i) formation de vacuoles intracellulaires, (ii) perturbation du trafic intracellulaire, (iii) altération des jonctions intercellulaires (Papini, *et al.*, 1998a, Papini, *et al.*, 1998b), (iv) activité pro-apoptotique par stimulation de la libération de cytochrome c par les mitochondries de lignées de cellules épithéliales (Galmiche, *et al.*, 2000) et (vi) blocage de l'activation des lymphocytes (Gebert, *et al.*, 2003). Plusieurs études ont montré que les infections gastriques avec les souches de *H. pylori* contenant les allèles *vacA* de type s1 sont associées à un risque plus élevé de développer la maladie ulcéreuse que ne le sont les souches portant l'allèle s2 (Atherton, *et al.*, 1995; Van Doorn, *et al.*, 1999). Le *cag*-PAI est un locus de 40kb contenant 27 gènes impliqués dans la biogenèse d'un appareil de sécrétion de type IV (TFSS : type four secretion system). Cet îlot est inséré dans le gène chromosomique *glr* codant la glutamate racémase et est impliqué dans plusieurs processus majeurs, tous dépendants de la fonctionnalité de l'appareil de sécrétion : (i) un réarrangement du cytosquelette des cellules épithéliales associé à la formation de structures en pédestales et un allongement cellulaire en "bec de colibri" (Segal, *et al.*, 1996), (ii) l'induction de la production d'IL8, qui est une cytokine pro-inflammatoire (Crabtree, *et al.*, 1999), (iii) la sécrétion et la translocation de la protéine CagA dans la cellule gastrique puis sa phosphorylation sur des résidus tyrosine (Segal, *et al.*, 1999), (iv) l'expression des proto-oncogènes c-fos et c-jun (Segal, *et al.*, 2000). La protéine CagA est injectée via le TFSS dans les cellules épithéliales gastriques (Odenbreit, *et al.*, 2000; Azuma, *et al.*, 2004) mais aussi dans les cellules phagocytaires (Odenbreit, *et al.*, 2001). Après sa translocation, la protéine CagA est phosphorylée par les tyrosine-phosphorylases cellulaires c-Src sur des motifs caractérisés par une succession de 5 acides aminés : Acide Glutamique-Proline-Isoleucine-Tyrosine-Alanine appelée EPIYA (Stein, *et al.*, 2002). Les motifs de phosphorylation EPIYA sont classés en EPIYA -A, -B, -C et -D en fonction de la séquence d'acides aminés qui les entourent (Azuma, *et al.*, 2004; Panayatopoulou, *et al.*, 2007). Ces séquences répétées ont été identifiées dans la région 3' du gène *cagA*. Les motifs EPIYA -A et -B, sont présents dans presque toutes les protéines CagA, et ce, quelle que soit l'origine géographique des patients chez qui elles ont été isolées (Azuma, *et al.*, 2004). Le motif EPIYA -C existe en nombre variable (1 à 3), par duplication d'une séquence de 34 acides aminés contenant un motif

EPIYA (Argent, *et al.*, 2004; Azuma, *et al.*, 2004). De façon prédominante, les souches isolées en Europe, en Amérique du Nord et en Afrique possédant un *cag*-PAI fonctionnel, secrètent une protéine CagA de type « EPIYA A-B-C », tandis que celles isolées en Asie de l'Est secrètent une protéine CagA de type « EPIYA A-B-D » (Azuma, *et al.*, 2004, Yamaoka, *et al.*, 2000). CagA, sous sa forme phosphorylée (CagA-P), interagit alors avec la tyrosine phosphatase SH-2 entraînant la déphosphorylation des tyrosines de plusieurs protéines cellulaires (Higashi, *et al.*, 2002) à l'origine du dérèglement des phosphorylations intracellulaires et d'un réarrangement du cytosquelette. Via la région EPIYA mais de façon indépendante de la phosphorylation, CagA peut recruter la protéine cellulaire Grb2 et activer ainsi la voie des kinases Ras/Mek/Erk qui conduit aux modifications morphologiques et à la prolifération des cellules (Mimuro, *et al.*, 2002). La stimulation de cette cascade de kinases pourrait expliquer le mécanisme CagA-dépendant d'activation de la transcription des proto-oncogènes *c-fos* et *c-jun* (= complexe AP1) (Meyer-ter-Vehn, *et al.*, 2000). De façon indépendante de la protéine CagA, le TFSS induit une cascade de signalisation mal connue menant à la sécrétion par l'épithélium gastrique de chimiokines telles que l'IL-8, l'ENA-78, le GM-CSF (pour "granulocyte-monocyte colony-stimulating factor") et le TNF α "Tumor Necrosis Factor α " (Foryst-Ludwig and Naumann, 2000; Rieder, *et al.*, 2001). L'étude de l'inactivation de 27 gènes de l'îlot *cag*-PAI a révélé que 18 gènes sont essentiels pour la translocation de CagA parmi lesquels 14 sont requis pour l'induction de la synthèse d'IL8 (Fischer, *et al.*, 2001; Kauser, *et al.*, 2004). Cette activité biologique de *cag*-PAI est illustrée par la dans la figure ci-dessous.

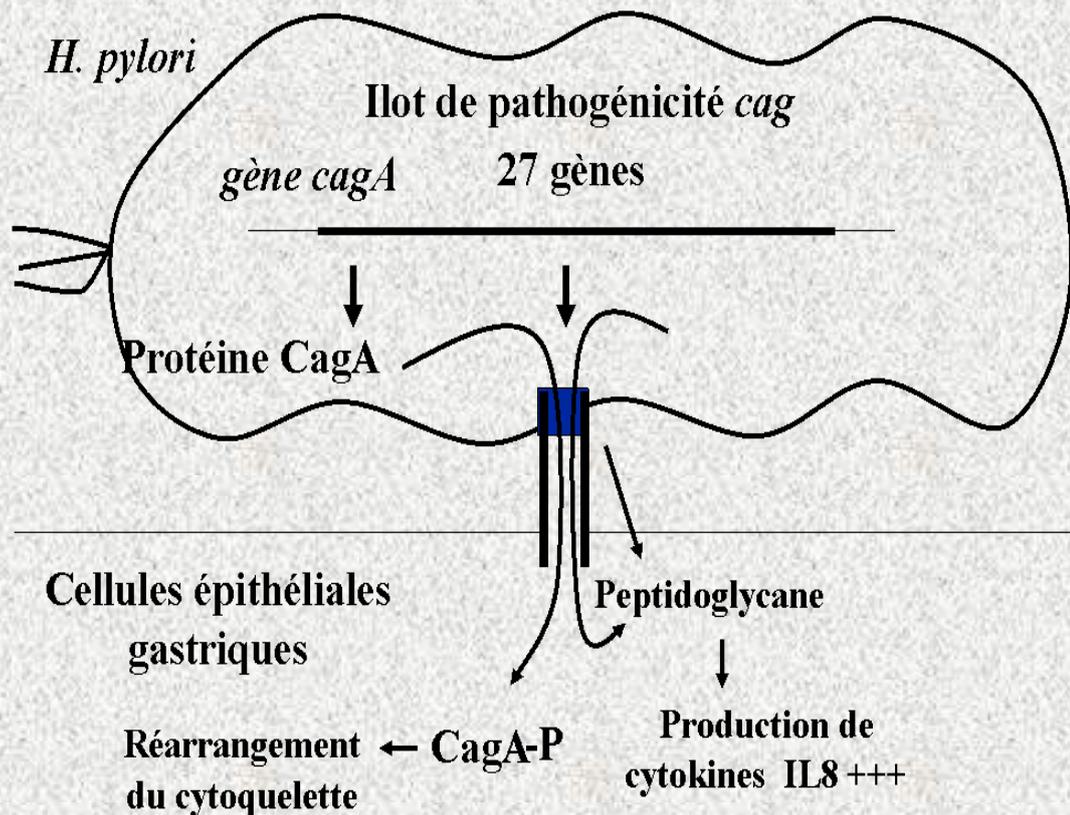


Figure 4. Activité biologique du *cag*-PAI (*Helicobacter pylori* persistence: Biology and disease, John Atherton, Wolfon Digestive Diseases Center and Institute of Infection, Immunity and Inflammation -University of Nottingham, UK)

En occident, de nombreuses données montrent une corrélation entre une infection par des bactéries possédant un *cag*-PAI fonctionnel, c'est-à-dire contenant la totalité des gènes de l'îlot, et la survenue d'ulcères peptiques ou de cancers gastriques (Covacci, *et al.*, 1999); Ces corrélations ne sont toutefois pas retrouvées pour les souches asiatiques qui possèdent quasiment toutes un *cag*-PAI qu'elles soient ou non associées à une pathologie sévère. Les souches sécrétant une protéine CagA de type EPIYA A-B-D sont associées de façon significative à une gastrite chronique active sévère et à une atrophie gastrique contrairement aux souches ne possédant pas de *cag*-PAI fonctionnel ou sécrétant une protéine CagA de type A-B-C (Azuma, *et al.*, 2004). Chez les souches sécrétant une protéine CagA de type EPIYA A-B-C, l'augmentation du nombre de motifs EPIYA a été associée au degré de phosphorylation de la protéine CagA et à une activité biologique augmentée en terme d'élongation des cellules AGS (Argent, *et al.*, 2004).

H. pylori possède un génome circulaire relativement petit d'environ 1,65 mégabases (Mb). Le séquençage complet du génome de deux souches de *H. pylori* (souche 26695, issue d'une gastrite et J99, issue d'un ulcère duodénal) a montré l'existence d'une macrodiversité (divergence dans l'organisation des gènes, présence ou absence d'un gène) et d'une

microdiversité (fort polymorphisme intragénique). Bien que la plupart des gènes soient hautement conservés, approximativement 6 % des gènes de chacun de ces deux génomes ne sont pas retrouvés dans l'autre. Les différences majeures d'organisation des gènes observées entre les deux génomes séquencés proviennent de mécanismes d'inversion ou de transposition de fragments d'ADN (Alm, *et al.*, 1999; Alm and Trust, 1999).

Une analyse de génomique comparative consistant à étudier la distribution des gènes, à l'aide de puces à ADN, dans le génome des deux souches d'*H. pylori* séquencées et dans le génome de 15 autres souches d'*H. pylori* d'origine caucasienne, a montré que sur 1643 gènes analysés, 1281 gènes (gènes ubiquistes) étaient présents dans toutes les souches et formaient le « core » génomique de l'espèce *H. pylori*. Chaque souche possède entre 168 et 275 gènes qui lui sont spécifiques, soit entre 12 et 18 % des gènes du génome. Ces gènes « souches spécifiques » ou « non-ubiquistes » codent majoritairement pour des protéines de fonctions inconnues (56 %), des systèmes de restriction-modification (10 %) ou des transposases (4 %). Dans le génome des souches d'*H. pylori* séquencées, la plupart de ces gènes non-ubiquistes sont localisés dans 2 grandes régions, le *cag*-PAI et la zone de plasticité (PZ), caractérisées par un contenu en guanine et cytosine (GC %) différent de celui du reste du génome. D'après l'étude de Salama, *cag*-PAI est principalement transmis sous la forme d'un bloc unique de 27 gènes, tandis que PZ contient de multiples endonucléases, suggérant des phénomènes de recombinaison, insertion et délétion (Salama, *et al.*, 2000).

A côté de cette macrodiversité génomique, le génome d'*H. pylori* présente une microdiversité. Elle se traduit par une variabilité de la séquence nucléotidique tout au long du génome et est le reflet d'un fort taux de mutations spontanées. Kansau *et al.* (1996), ont montré que la séquence nucléotidique d'un fragment de 294 paires de base interne au gène *glmM* était unique à chaque souche étudiée et pouvait être utilisée comme marqueur d'identification moléculaire.

Du fait des conséquences majeures sur la santé humaine, l'éradication d'*H. pylori* est préconisée dans bon nombre d'indications. Les traitements antibiotiques utilisés au début en monothérapie se sont révélés inefficaces et la nécessité d'utiliser une association de deux antibiotiques est vite apparue pour (i) augmenter l'efficacité thérapeutique car la diffusion des antibiotiques au site de l'infection est limitée et (ii) éviter la sélection de bactéries résistantes. De plus, les antibiotiques ayant une activité optimale à pH neutre, l'addition d'un composé antisécrétoire s'est révélée nécessaire et les inhibiteurs de pompe à protons (IPP) ont été retenus. La combinaison IPP – antibiotiques proposée lors des conférences de consensus tenues de par le monde est : clarithromycine (500 mg x 2/j), amoxicilline (1g x 2/j) et IPP à

double dose administrée durant au moins 7 jours. (Megraud, *et al.*, 2000). Toutefois une revue de la littérature montre une résistance de *H. pylori* à certains antibiotiques.

L'objectif général de ce travail est (i) la mise en place d'un réseau de compétence pour l'étude des pathologies gastro-duodénales liées à *H. pylori* associant microbiologistes, anatomo-pathologistes et gastroentérologues au Sénégal, (ii) une étude de la pathologie gastro-duodénale associée à l'infection par *H. pylori* chez des patients examinés en milieu hospitalier, (iii) une étude bactériologique avec culture, identification et étude de la sensibilité aux antibiotiques de *H. pylori*, (iv) une étude de la polyclonalité de l'infection chez un même patient et enfin, (iv) une étude de la diversité de la région 3' du gène *cagA* et de son lien avec la pathologie gastro-duodénale associée. Ce projet s'intègre dans une collaboration entre l'Institut Pasteur de Dakar, l'Institut Pasteur de Paris et plusieurs Instituts du Réseau International des Instituts Pasteur.

Ma contribution personnelle dans ce projet a consisté à :

- participer physiquement à la mise en place de l'étude à l'Institut Pasteur de Dakar :

(i) culture, antibiogramme, extraction de l'ADN,
(ii) mise au point des techniques de biologie moléculaire nécessaires à l'étude de la diversité génétique de l'extrémité 3' du gène *cagA* et de la clonalité de l'infection,

(iii) lien entre le laboratoire de microbiologie médicale de l'Institut Pasteur et le service d'Hépatogastro-entérologie du CHU Le Dantec,

- participer à l'analyse des résultats.

Chapitre 2 :

Matériels et

méthodes

2.1 Inclusion des patients et isolement des souches

44 patients ont été inclus dans l'étude : 28 hommes et 16 femmes. L'âge variait entre 20 et 92 ans.

Les patients ont été recrutés lors des consultations et hospitalisations menées par les médecins gastroentérologues de l'hôpital Aristide Le Dantec de Dakar.

Le recrutement a été fait sur la base de certains critères :

Critères d'inclusion

- Patients âgés de plus de 18 ans, présentant des lésions macroscopiques lors de l'endoscopie digestive et susceptible de bénéficier de l'éradication de *H. pylori*.
- Patients ayant donné leur consentement éclairé pour participer à l'étude.

Critères d'exclusion

- Patients ayant reçu des médicaments anti-inflammatoires pendant plus de 7 jours consécutifs au cours des 4 dernières semaines.
- Patients ayant reçu une antibiothérapie de plus de 4 jours consécutifs au cours des 4 dernières semaines.
- Patients ayant pris des inhibiteurs de la pompe à protons (IPP) au cours des deux dernières semaines.
- Patients présentant une pathologie dont le diagnostic est évident endoscopiquement et n'est pas en relation avec une infection à *H. pylori* (ex : hémorragies digestives dues à la rupture de varices oesophagiennes).

Vingt neuf souches de *H. pylori* ont pu être incluses dans l'étude. Les informations concernant l'origine ethnique des patients, ainsi que les pathologies associées à l'infection à *H. pylori* (gastrite sans atrophie ni métaplasie ou dysplasie, « G » - ulcère peptique sans atrophie ni métaplasie ou dysplasie : ulcère duodéal, « UD » - ulcère gastrique, « UG » - gastrite avec atrophie et/ou métaplasie sans dysplasie, « M » - gastrite avec dysplasie, « D » - ulcère duodéal avec métaplasie, « UDM » - ulcère gastrique avec métaplasie, « UGM » - ulcère gastrique avec dysplasie et / métaplasie, « UGDM » - adénocarcinome, « A ») ont été collectées. Ces différents paramètres sont présentés dans tableau IV.

H. pylori a été isolé chez 62% des hommes et 38% des femmes avec une prévalence légèrement plus importante chez les patients de moins de 40 ans.

Tableau.IV: Répartition des pathologies gastro-duodénales associée à la présence de *H. pylori* selon les ethnies (44 patients).

Légende

- M : Gastrite avec atrophie et/ou métaplasie sans dysplasie;
 A: Adénocarcinome ;
 UDM : Ulcère Duodénal avec Métaplasie;
 UGM : Ulcère Gastrique avec Métaplasie ;
 UD: Ulcère Duodénal sans atrophie ni métaplasie ni dysplasie ;
 UG: Ulcère Gastrique sans atrophie ni métaplasie ni dysplasie.

Ethnies	Pathologies											Total
	G	UD	UG	UDM	UGM	UGDM	D	M	A			
Wolofs	1	1		6		1	1	6	1			17
Poullars		1		3				2	2			6
Diola				1				1	1			3
Sérères	1			1		1		1				4
Manding						1						1
Lébou			1				1					2
Sarakholé								1				1
Poullar/ Lébou								1				1
Wolof/ Bambara		1										1
Wolof/ Poullar				1								2
Wolof/ Sérère								- 1				1
Maure/ Toucouleur								1				1
Manding/ Peulh/ Bainouck								1				1
Poullar/ Bambara/ Manding/ Diola			1									1
Total	2	3	3	12	2	1	2	15	4	4	44	44

2.2 Culture, isolement et identification des souches de *H. pylori*

Un total de 8 biopsies gastriques a été réalisé chez des patients présentant des lésions macroscopiques, lors de l'endoscopie digestive, susceptibles de bénéficier de l'éradication de *H. pylori*,

Deux biopsies antrales et 2 biopsies fundiques ont été fixées en formol tamponné à 10% pour le diagnostic histopathologique. Deux biopsies antrales et 2 biopsies fundiques, ont été placées dans de l'eau physiologique (NaCl à 9‰) pour le diagnostic microbiologique.

Pour la culture bactériologique, les biopsies ont été broyées puis ensemencées sur une gélose Mueller Hinton additionnée de 10% de sang de cheval frais défibriné et une gélose Columbia supplémentée d'un cocktail antibiotique (Supplément sélectif pour *Helicobacter pylori*: SR0147, Oxoid). Les milieux ont été incubés en atmosphère microaérophile (5% O₂, 10% CO₂, 85% N₂) à 37°C pendant un maximum de 12 j ours. L'identification microbiologique a été réalisée sur l'aspect des colonies, la morphologie des bactéries après coloration de Gram, la synthèse d'une oxydase, d'une catalase et d'une uréase (Annexe 1).

2.3 Extraction de l'ADN génomique

Cinq extractions ont été menées parallèlement et indépendamment. Chaque extraction a été réalisée à partir d'une anse de 10µl, pleine de culture bactérienne, à l'aide du kit d'extraction QIAamp™ DNA Minikit (250) Cat. No 51306, (Qiagen) de façon à obtenir 200 µl de solution d'ADN à la concentration de 15 à 50 µg/ml. Dix microlitres de chaque solution d'ADN ont été déposés sur un gel d'agarose à 1,5%. Après migration électrophorétique de 45mn à 120V, l'intensité de la bande a permis de vérifier la quantité d'ADN extrait. L'ADN extrait a été « poolé » (volume total : 1000 µl) puis dilué au 1/20^e en vue des différentes amplifications (Annexe 2).

2.4. Etude du *cag*-PAI

2.4.1 Procédure moléculaire

L'étude moléculaire de *cag*-PAI repose sur plusieurs étapes résumées dans la figure ci-dessous (figure 5) et les différentes amorces utilisées sont répertoriées dans le tableau VI.

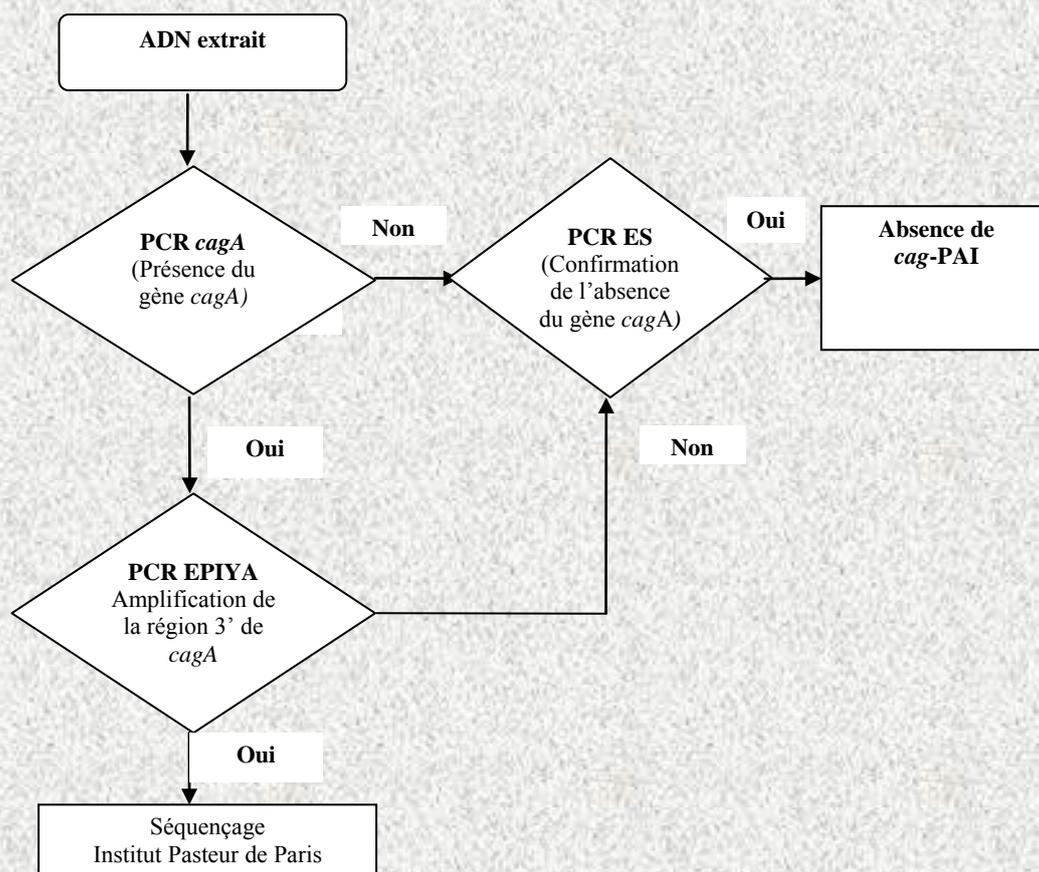


Figure 5. Procédure moléculaire des différentes étapes dans l'étude du *cag*-PAI.

2.4.2. Recherche du gène *cagA*, marqueur de la présence de *cag*-PAI (PCR *cagA*)

Les amorces CagA-F et CagA-R (Tableau VI) ont été utilisées, ainsi que les concentrations expérimentales finales suivantes: Tampon 1X Taq Eurobio sans MgCl₂ (Tris-HCl 10 m M, pH 9,0, K Cl 50 m M) ; 1,5mM de MgCl₂ ; 0,5µM d'Amorces ; 200 µM de désoxynucléique (A, T, C, G) à 1,25mM pour chaque nucléotide ; 1,5U de Taq polymérase ; et 1 µl d'ADN dilué au 1/20^e (soit environ 50ng d'ADN) pour un volume total de 50µl.

Les Amplifications ont été réalisées en utilisant un thermocycleur de type AB Applied Biosystems 2720 avec les paramètres suivants : 9 mn de pré-dénaturation à 94°C suivie de 40 cycles de [30s à 94°C ; 45s à 50°C ; 45s à 72°C] et une incubation finale à 72°C pendant 5 mn (Annexe 3).

Les amplicons ont été révélés par une lecture sous UV après la migration électrophorétique (Annexe 4).

Une confirmation de l'absence du gène *cagA* a été réalisée par la PCR ES en cas de non amplification de ce gène.

Tableau VI : Liste des amorces utilisées

PCR	Gène	Nom amorce	Sequene (5'-3')	Nombre de nucléotides	Nombre pb
PCR <i>cagA</i>					
(amplification du gène <i>cagA</i>)					
	<i>cagA</i>	<i>cagA-F</i>	TTG ACC AAC AAC CAC AAA CCG AAG	24n	183
		<i>cagA-R</i>	CTT CCC TTA ATT GCG AGA TTC C	22n	
PCR ES					
(confirmation de l'absence du gène <i>cagA</i>)					
	<i>cagA</i>	<i>cagA-2</i>	ACA TTT TGG CTA AAT AAA CGC TG	23n	360
		<i>cagA-25</i>	TCA TGC GAG CGG CGA TGT G	19n	
PCR EPIYA					
(amplification de la region 3' du gène <i>cagA</i>)					
	<i>cagA</i>	<i>cagA2530S</i>	GTT AAR AAT RGT GTR AAY GG Où R = A or G et Y = T or C	*20n	
		<i>cagA3000AS</i>	TTT AGC TTC TGA TAC CGC	18n	
RAPD					
	Nom amorce		Sequene (5'-3')		Nbre nucléotides
Random Amplified Polymorphic DNA					
	RAPD		AGT TCA GCC AC		11 n

2.4.3 Confirmation de l'absence du gène *cagA* (PCR ES)

Cette PCR est appliquée sur les souches dont le gène *cagA* n'a pas été détecté par la PCR CagA.

Les amorces CagA-2 et CagA-25 (tableau VI) ont été utilisées. Ce sont des amorces spécifiques aux régions bordants le *cag*-PAI et vont donc permettre d'avoir une amplification chez les souches à *cagA* négatif.

Les concentrations expérimentales suivantes ont été utilisées :

Tampon 1X Taq Eurobio sans MgCl₂ (Tris-HCl 10 mM, pH 9,0, KCl 50 mM) ; 1,5mM de MgCl₂ ; 0,5µM d'Amorces ; 200 µM de désoxynucléique (A, T, C, G) à 1,25mM pour chaque nucléotide ; 1,5U de Taq polymérase ; et 1 µl d'ADN dilué au 1/20^e (soit environ 50ng d'ADN) pour un volume total de 50µl.

Les Amplifications ont été réalisées en utilisant un thermocycleur de type AB Applied Biosystems 2720 avec les paramètres suivants : 5mn de pré-dénaturation à 94°C pour activer la Taq polymérase suivie de 35 cycles de [1mn à 94°C ; 1mn à 57°C ; 1mn à 72°C] et une incubation finale à 72°C pendant 5mn (Annexe 3).

Les amplicons ont été révélés sous UV après une migration électrophorétique (Annexe 4)

2.4.4. Étude de la diversité de la région 3' du gène *cagA*

La PCR EPIYA a été appliquée sur les souches ayant le gène *cagA*

Les amorces CagA-2530S et CagA-3000AS (Tableau VI) ont été utilisées. Les concentrations expérimentales suivantes ont été utilisées :

Tampon 1X Taq Eurobio sans MgCl₂ (Tris-HCl 10 mM, pH 9,0, KCl 50 mM) ; 1,5mM de MgCl₂ ; 0,5µM d'Amorces ; 200 µM de désoxynucléique (A, T, C, G) à 1,25mM pour chaque nucléotide ; 1,5U de Taq polymérase ; de l'eau Eurobio (GAUEU00F-01) ; et environ 50 ng d'ADN pour un volume total de 50µl.

Les Amplifications ont été réalisées en utilisant un thermocycleur de type AB Applied Biosystems 2720 avec les paramètres suivants : 5mn de pré dénaturation à 94°C suivie de 35 cycles de [5 mn à 94°C ; 30s à 94°C ; 45s à 50°C ; 45s à 72°C] et une incubation finale à 72°C pendant 5 mn (Annexe 3).

La révélation des produits de la PCR a été faite sous UV après la migration électrophorétique (Annexe 4).

2.4.4.1. Amplification de la région 3' du gène *cagA*

En se basant sur les séquences peptidiques des protéines CagA présentes dans la base GenBank, des séquences conservées bordant la région 3' de la protéine CagA contenant les motifs EPIYA ont été identifiées. Des amorces dégénérées ont été synthétisées (position 582 453 à 582 977 du génome de la souche *H. pylori* 26695) pour l'amplification de cette région (Panayotopoulou, *et al.*, 2007). Les amorces 2530S et 3000AS ont été utilisées.

Les Amplifications ont été réalisées en utilisant un thermocycleur de type AB Applied Biosystems 2720 avec les paramètres suivants : 5mn de pré dénaturation à 94°C suivie de 35 cycles de [5 mn à 94°C; 30s à 94°C ; 45s à 50°C ; 45s à 72°C] et une incubation finale à 72°C pendant 5 mn.

2.4.4.2. Séquencage des amplicons

Après contrôle de la taille et de la concentration des produits PCR (minimum 20 ng/μl), 2 μl des produits d'amplification purifiés ont ensuite été séquencés à l'aide du kit Big Dye™ Terminator (V.1.1.). L'ensemble des réactions de séquence ont été réalisées à la Plateforme technique de l'Institut Pasteur de Paris.

2.4.4.3. Identification des motifs EPIYA

L'alignement multiple des séquences protéiques générées a été réalisé par le logiciel Clustal W.

2.4.4.4. Construction d'un arbre phylogénétique

Les étapes suivantes ont permis sa création :

- Chercher dans la banque de données de séquences Genbank les séquences connues similaires par blast avec la séquence protéique de la souche 26695 (position 582 453 à 582 977 du génome séquencée de la souche *H. pylori* 26695)⁶,
- Réaliser l'alignement multiple des séquences protéiques par le logiciel Clustal W,
- Construire l'arbre phylogénétique par le logiciel Applied Math en utilisant la méthode de Neighbor Joining.

⁶ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>

2.5. Etude de la clonalité des souches de *H. pylori* isolées de biopsies gastriques chez un même patient par RAPD (Random Amplified Polymorphism DNA)

2.5.1. Isolement et subculture de 5 colonies des primocultures antrale et fundique

A partir de 5 colonies isolées des primocultures antrale et fundique, des subcultures ont été réalisées. Après 48 heures d'incubation, 200µl d'ADN de chaque subculture a été extrait à l'aide du kit d'extraction QIAamp™ DNA Minikit (250) Cat. No 51306, (Qiagen) avec une concentration finale comprise entre 15 et 50 µg/ml.

2.5.2. Mise au point de la RAPD pour les souches isolées

La PCR RAPD a été réalisée selon les conditions décrites par Kansau *et al.* (1996) : Tampon 1X Taq Eurobio sans MgCl₂ (Tris-HCl 10 mM, pH 9,0, KCl 50 mM) ; 4 mM de MgCl₂ ; 3µM d'Amorces ; 400 µM de désoxynucléique (A, T, C, G) à 1,25mM pour chaque nucléotide ; 2,5 U de Taq polymérase ; et 1 µl d'ADN dilué au 1/20° (soit environ 50 ng d'ADN) pour un volume total de 50 µl (Annexe 5).

Les Amplifications ont été réalisées en utilisant un thermocycleur de type AB Applied Biosystems 2720 avec les paramètres suivants : 45 cycles de [1 mn à 94°C ; 1 mn à 36°C ; 2 mn à 72°C] et une incubation finale à 72°C pendant 5 mn.

Le nombre important de bandes qui se chevauchaient sur les profils électrophorétiques n'offrait pas une bonne lisibilité. Les paramètres suivants ont donc été testés.

- la température d'hybridation : 36° C ; 37° C ; 38° C ; 39°C ; 40° C et 41° C
- la concentration de MgCl₂ : 4 mM ; 3 mM ; 2 mM.

Les meilleurs profils ont été obtenus pour une température d'hybridation de 38° C avec comme concentration de MgCl₂, 3 mM.

2. 6. Sensibilité des souches aux antibiotiques

La sensibilité des souches aux antibiotiques a été déterminée, dans cette étude, par la méthode d'Elipsometer test (E-test ; AB Biodisk, Solna, Swenden) pour l'amoxicilline, la clarithromycine et le métronidazole et par la méthode de diffusion par disque pour la ciprofloxacine.

Après ensemencement de géloses Mueller-Hinton à 10% de sang de cheval par écouvillonnage à partir d'une suspension bactérienne de 3 Mac Ferland, les bandelettes E-test et le disque chargé ont été placés sur les géloses, puis incubés en atmosphère microaéroophile à 37°C pendant 72 heures.

La sensibilité a été déterminée pour les E-test par lecture de la valeur de la CMI (Concentration Minimale Inhibitrice) correspondant à l'intersection des 2 ellipses où l'inhibition est complète, y compris les microcolonies et les colonies isolées, et par la mesure du diamètre d'inhibition pour le disque (Annexe 5).

Les souches sont considérées comme résistantes à l'amoxicilline, à la clarithromycine et au métronidazole si la valeur lue est inférieure respectivement à 0,5 µg/ml, à 1 µg/ml et à 8 µg/ml. Une souche a été considérée comme résistante à la ciprofloxacine (5µg) si le diamètre de diffusion était inférieur à 20 mm (CA-SFM, 2007)

Chapitre 3 :

RESULTATS

3.1 Propriétés associées aux souches de *H. pylori* incluses dans l'étude

L'étude a porté sur 44 patients : 28 hommes et 16 femmes, dont l'âge variait entre 20 et 92 ans. Ces patients sont d'origines ethniques diverses, à majorité Wolof (Tableau IV). La culture a été positive chez 29 patients, soit une sensibilité de 66 % (antre et fundus : 22 ; antre : 1 ; fundus : 6).

La répartition des pathologies gastro-duodénales associées à la présence de *H. pylori*, déterminée après l'analyse histopathologie des biopsies, est la suivante : 1 Gastrite sans atrophie ni métaplasie ni dysplasie (G), 6 Gastrites avec atrophie et/ou Métaplasie (M), 3 Ulcères Duodénaux sans atrophie ni métaplasie ni dysplasie (UD), 2 Ulcères Gastriques sans atrophie ni métaplasie ni dysplasie (UG), 11 Ulcères Duodénaux avec métaplasie (UDM), 2 Ulcères Gastriques avec métaplasie (UGM), 1 Dysplasie (D), 1 Ulcère Gastrique avec Dysplasie et Métaplasie (UGDM) et 2 Adénocarcinomes (A) (Tableau VI).

Sur les 15 patients dont la culture a été négative, *H. pylori* a été retrouvé pour 4 patients au cours de l'examen histologique avec comme pathologie une Dysplasie (D) et 3 Gastrites avec atrophie et/ou Métaplasie (M). L'un des patients présentant une Gastrite avec atrophie et/ou Métaplasie (M) avait subi un traitement d'éradication avant l'étude. Ce qui porte à 33 le nombre de patients infectés par *H. pylori*, soit un taux de 75%.

La répartition des pathologies chez ces patients est la suivante : 9 gastrites avec atrophie et/ou Métaplasie (M), une Gastrite sans atrophie ni métaplasie ni dysplasie (G), un Ulcère Duodéal avec Métaplasie (UDM), une Dysplasie (D), un Ulcère Gastrique sans atrophie ni métaplasie ni dysplasie (UG) associé à une nécrose tissulaire très avancée et 2 cas d'Adénocarcinome (A) dont l'un est associé à une tumeur antrale (Tableau VI).

Tableau VI. Répartition des pathologies gastro-duodénales associées à la présence de *H. pylori*.

	Pathologies gastro-duodénales									Total
	G	UD	UG	UDM	UGM	UGDM	D	M	A	
Présence <i>Hp</i>	1	3	2	11	2	1	2	9	2	33
Absence <i>Hp</i>	1	0	1	1	0	0	0	6	2	11
Total	2	3	3	12	2	1	2	15	4	44

3.2. Amplification du gène *cagA*

Le gène *cagA*, marqueur de la présence de *cag*-PAI, a été amplifié sur 18 des 28 souches isolées par la PCR *CagA*, soit une prévalence de 64,3% (figure 6)



Figure 6. Profil électrophorétique d'une PCR « *cagA* » sur gel d'agarose à 1,5% des souches de *H. pylori*. (Pm) : Marqueur de poids moléculaire (*Biolabs*) à 100pb ;

Colonnes (1) : souche 44 ; (2) : souche 45 ; (3) : souche 46 ; (4) : souche 47 ; (5) : souche 48 ; (6) : souche 49 ; (7) souche 8 ;(8) : souche 52 ; (9) Témoin négatif

L'absence de l'îlot de pathogenicité *cag*-PAI a été confirmée chez les 10 autres souches par la PCR Empty Side « ES » (figure 7).

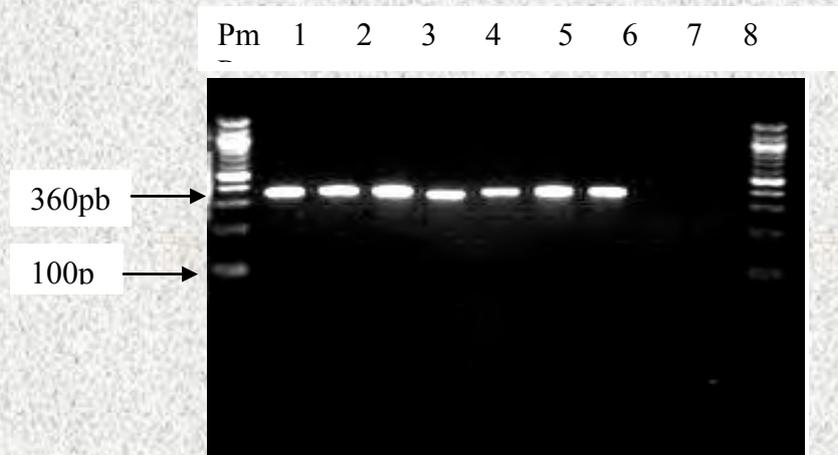


Figure 7. Profil électrophorétique sur gel d'agarose à 1,5% d'une PCR « ES » des souches de *H. pylori* *cagA* négatives.

(Pm) : Marqueur de poids moléculaire (*Biolabs*) à 100pb ;

Colonnes (1) : souche 4 ; (2) : souche 5 ; (3) : souche 24 ; (4) : souche 25 ; (5) : souche 35 ; (6) : souche 38 ; (7) souche 42 ; (8) Témoin négatif

Aucun lien n'a pu être montré entre la sévérité de la pathologie gastro-duodénale et la présence du gène *cagA*.

3.3. Amplification de la région 3' du gène *cagA* codant pour les motifs EPIYA

3.3.1. Amplification de la région 3' du gène *cagA*

La région 3' du gène *cagA* a été amplifiée avec succès pour 16 souches sur 18 en utilisant la PCR EPIYA, avec une seule bande d'amplification après migration électrophorétique. Les séquences de ces amplicons se situaient entre 436 et 520 paires de base (figure 8).



Figure 8. Profil électrophorétique d'une PCR EPIYA des souches de *H. pylori* présentant le gène *cagA*.

(Pm) : marqueur de poids moléculaire à 200 pb ;

Colonnes (1) : souche 3 ; (2) : souche 9 ; (3) : souche 10 ; (4) : souche 21 ; (5) : souche 22 ; (6) : souche 26 ; (7) : souche 27 ; (8) : souche 32 ; (9) : souche 33 ; (10) : souche 34 ; (11) : souche 36 ; (12) : souche 39 ; (13) : souche 40 ; (14) : souche 41 ; (15) : souche 43 ; (16) : souche 44

3.3.2. Diversité du gène *cagA*, nombre et type de motifs EPIYA

Les amplicons ont été séquencés et les séquences peptidiques déduites ont été alignées avec le logiciel CLUSTAL W (figure 6).

Trois types de motif EPIYA ont été obtenus :

EPIYA -A (**EPIYA**QVNNKTTGQ) ;

EPIYA -B (**EPIY(A/T)**QVAKKV(T/S/N)(Q/A/K)KI) ;

EPIYA-C (**EPIYATI(D/E)**DLG(G/E)(S/P))

Aucune des souches ne présentait le type asiatique EPIYA-D (**EPIYATIDFDEANQAG**).

Tableau VII : Alignement des séquences peptidiques des souches de *H. pylori* isolées chez 16 patients avec les 3 souches de référence totalement séquencées (26695, HPAG1, J99).

```

03 -----LAQNFSDIKKELNEKFKNFNNNNN-GLKN
10 -----MEATALAKNFSDIKKELNEKFKNFNNNNN-GLKN
34 -----GLSGIEATALAKNFSDIKKELNEKFKNFNNNNN-GLKN
22 -----EATALAKNFSDIKKELNEKFKNFNNNNN-GLKN
27 -----GLSGIEATALAKNFSDIKKELNEKFKNFNNNNN-GLKN
26 -----GLSGIEATALAKNFSDIKKELNEKFKNFNNNNN-GLKN
33 -----IEATALAKNFSDIKKELNEKFKNFNNNNN-GLKN
09 -----GLSGMEATALAKNFSDIKKELNEKFKNFNNNNN-GLKN
32 -----GLSGIEATALAKNFSDIKKELNEKFKNFNNNNN-GLKN
36 -----GLSGIEATALAKNFSDIKKELNEKFKNFNNNNN-GLKN
43 -----GLSGIEATALAKNFSDIKKELNEKFKNFNNNNN-GLKN
41 -----GYALSGIEATALAKNFSDIKKELNEKFKNFNNNNN-GLKN
44 -----GLSGIEATALAKNFSDIKKELNEKFKNFNNNNN-GLKN
39 -----GLSGIEATALAKNFSDIKKELNEKFKNFNNNNN-GLKN
40 -----GLSGIEATALAKNFSDIKKELNEKFKNFNNNNN-GLKN
21 -----GLSGIEATALAKNFSDIKKELNEKFKNFNNNNN-GLKN
PCR-PROTref26695 VKNSVNTLVGNLSGIEATALAKNFSDIKKELNEKFKNFNNNNN-GLKN
PCR-PROTrefHPAG1 VKNGVNTLVGNLSGIEATALAKNFSDIKKELNEKFKNFNNNNN-GLKN
PCR-PROTrefJ99   VKNGVNTLVGNLSKAEATLSKNFSDIKKELNAKLGNFNNNNN-GLN

```

```

03 -----GKDKGPEE-----PIYTQVAKKVT
10 -----GKDKGPEE-----PIYTQVAKKVT
34 -----GKDKGPEEPIYAQVNKKKTGQVASPEEPIYAQVAKKVT
22 -----GKDKGPEE-----PIYAQVNKKKT
27 -----GKDKGPEE-----PIYAQVNKKKT
26 -----GKDKGPEE-----PIYAQVNKKKT
33 -----GKDKGPEE-----PIYAQVNKKKT
09 -----GKDKGPEE-----PIYAQVNKKKT
32 -----GKDKGPEE-----PIYAQVNKKKT
36 -----GKDKGPEE-----PIYAQVNKKKT
43 -----GKDKGPEE-----PIYAQVNKKKT
41 -----STE-----PIYAQVNKKKT
44 -----GGE-----PIYAQVNKKKT
39 -----SGE-----PIYAQVNKKKT
40 -----SGE-----PIYAQVNKKKT
21 -----STE-----PIYAQVNKKKT
PCR-PROTref26695 -----STE-----PIYAKVNKKKT
PCR-PROTrefHPAG1 EPIYAKVNKKKTGQVASPEE-----PIYAKVNKKKT
PCR-PROTrefJ99   -----STE-----PIYTQVAKK--

```

```

03 QKIDQLNQAASGFGGVGQAGFPLKRHDKVEDLSK--VGGVGQAG-FPLKR
10 QKIDQLNQAASGFGGVGQAGFPLKRHDKVEDLSK--VGGVGQAG-FPLKR
34 QKIDQLNQAASGFGGVGQAGFPLKRHDKVEDLSK--VGGVKQAG-FPLKR
22 GQVASPEEPI--YAQVAKK--VTQKIDQLNQAAS-GFGGVGQAG-FPLKR
27 GQVASPEEPI--YAQVAKK--VTQKIDQLNQAAS-GFGGVGQAG-FPLKR
26 GQVASPEEPI--YAQVAKK--VTQKIDQLNQAAS-GFGGVGQAG-FPLKR
33 GQVASPEEPI--YAQVAKK--VSAKIDQLNQAAS-GFGGVGQAG-FPLKR
09 GQVASPEEPI--YAQVAKK--VTKKIDQLNQAAS-GFGGVGQAG-FPLKR
32 GQVASPEEPI--YAQVAKK--VNAKINQLNQAAS-GFGGVGQAG-FPLKR
36 GQVASPEEPI--YAQVAKK--VNAKINQLNQAAS-GFGGVGQAG-FPLKR
43 GQVASPEEPI--YAQVAKK--VNAKINQLNQAAS-GFGGVGQAG-FPLKR
41 GQVASPEEPI--YAQVAKK--VSAKINQLNQAAS-GFGGVGQAG-FPLKR
44 GQVASPEEPI--YAQVAKK--VNAKINQLNQAAS-GFGGVGQAG-FPLKR
39 GQVASPEEPI--YAQVAKK--VSAKIDQLNQAAS-GFSGVGQAG-FPLKR
40 GQVASPEEPI--YAQVAKK--VSAKIDQLNQAAS-GFSGVGQAG-FPLKR

```

21 GQVASPEEPI--YAQVAKK--VTQKIDQLNQAAS-GFGGVGQAG-FPLKR
 PCR-PROTref26695 GQVASPEEPI--YTQVAKK--VNAKIDRLNQIAS-GLGGVQQAAGFPLKR
 PCR-PROTrefHPAG1 GQVASPEEPI--YTQVAKK--VNAKIDRLNQIAS-GLGGVQQAAGFPLKR
 PCR-PROTrefJ99 -----VKAKIDRLDQIAS-GLGDVQQAASFLLKR

Tableau VII : Alignement des séquences peptidiques des souches de *H. pylori* isolées chez 16 patients avec les 3 souches de référence totalement séquencées (26695, HPAG1, J99) (suite et fin).

03 HDKVEDLSKVGRSVSP EPIYATIDDLGGSFPLKRSAKVDDL SKVGLSRNQ
 10 HDKVEDLSKVGRSVSP EPIYATIDDLGGSFPLKRSAKVDDL SKVGLSRNQ
 34 HDKVDDL SKVGRSVSP EPIYATIEDLGESFPLRRSAKVEDLSKAGLSRNQ
 22 HDKVDDL SKVGRSVSP EPIYATIDDLGGSFPLRRRAKVEDLSKVGLSREQ
 27 HDKVDDL SKVGRSVSP EPIYATIDDLGGSFPLKRSAKVEDLSKVGRSREQ
 26 HDKVDDL SKVGRSVSP EPIYATIDDLGGSFPLRRSAKVEDLSKVGLSRNQ
 33 HAKVDDL SKVGRSVSP EPIYATIDDLGGSFPLKRSAKVEDLSKVGLSREQ
 09 HANVEDLSKVGRSVSP EPIYATIDDLGGSFPLRRSAKVDNLSKVGLSRNQ
 32 HDKVEDLSKVGRSVSP EPIYATIDDLGGPFPLKHKAKVEDLSKVGLSRNQ
 36 HDKVDDL SKVGRSVSP EPIYATIDDLGGPFPLKHKAKVEDLSKAGLSRNQ
 43 HDKVEDLSKVGRSVSP EPIYATIDDLGGSFPLRRSAKVEDLSKVGLSRNQ
 41 HDKVEDLSKVGRSVSP EPIYATIDDLGGSFPLKRSAKVEDLSKVGLSRNQ
 44 HDKVDDL SKVGRSVSP EPIYATIDDLGGSFPLKRSTKVEDLSKVGLSRNQ
 39 HDKVDDL SKVGRSVSP EPIYATIDDLGGSFPLRRSAKVEDLSKVGLSRNQ
 40 HDKVDDL SKVGRSVSP EPIYATIDDLGGSFPLRRSAKVEDLSKVGLSRNQ
 21 HDKVDDL SKVGRSVSP EPIYATIDDLGGSFPLRRSAKVDXLSKVGLSREQ
 PCR-PROTref26695 HDKVDDL SKVGLSASP EPIYATIDDLGGPFPLKRHDKVDDL SKVGRSRNQ
 PCR-PROTrefHPAG1 HDKVDDL SKVGRSVSP EPIYATIDDLGGPFPLKRHDKVDDL SKVGLSRNQ
 PCR-PROTrefJ99 HDKVDDL SKVGLSANHEPIYATIDDLGGPFPLKRHDKVDDL SKVGLSREQ

03 E-----
 10 E-----
 34 E-----
 22 E-----
 27 E-----
 26 E-----
 33 E-----
 09 ELTQKIDD-----
 32 E-----
 36 E-----
 43 ELTQK-----
 41 ELTQK-----
 44 EL-----
 39 ELTQ-----
 40 ELTQK-----
 21 EXTQK-----
 PCR-PROTref26695 ELAQKIDNLNQAVSEAK
 PCR-PROTrefHPAG1 ELAQKIDNLNQAVSEAK
 PCR-PROTrefJ99 KLTQKIDNLNQAVSEAK

La taille des amplicons chez les souches présentant un motif EPIYA de type ABC est de 450 pb (\pm 25 paires de base) sauf pour 1 souche avec une taille égale à 520 pb. Pour les 2 souches présentant un motif EIPYA de type BC, la taille était également de 450 pb (\pm 25 paires de base) (tableau VIII).

Tableau VIII. Différents type de motifs de phosphorylation de la région 3' du gène *cagA* et pathologies associées chez les souches isolées.

Légende

M : Gastrite avec atrophie et/ou métaplasie sans dysplasie; A: Adénocarcinome ; UDM: Ulcère Duodénal avec Métaplasie; UGM: Ulcère Gastrique avec Métaplasie ; UD: Ulcère Duodénal sans atrophie ni métaplasie ni dysplasie ; UG: Ulcère Gastrique sans atrophie ni métaplasie ni dysplasie.

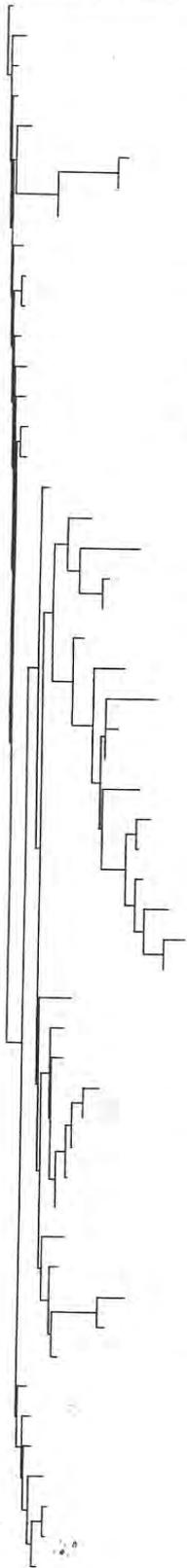
No Souche	Nombre de paires de base	Motif EPIYA	Pathologie
03	436	BC	M
10	451	BC	A
34	520	ABC	UDM
22	440	AB C	UDM
27	457	ABC	UDM
26	454	ABC	M
33	442	ABC	UG
09	475	A BC	A
32	454	ABC	M
36	453	ABC	UD
43	465	ABC	UDM
41	456	ABC	D
44	441	ABC	UDM
39	447	ABC	UD
40	451	ABC	UDM
21	450	ABC	UGM

Aucun lien entre la sévérité de la pathologie gastroduodénale et l'extrémité 3' du gène *cagA* n'a pu être mis en évidence.

3.3.3. Analyse phylogénétique

L'analyse phylogénétique de la région 3' du gène *cagA* de souches isolées de patients originaires de différentes régions du monde a montré que les souches du Sénégal se groupaient dans le même cluster et de façon séparée des autres souches (figure 9).

20 60 80 100



- Sénégal 27
- Sénégal 21
- Sénégal 22
- Sénégal 26
- Sénégal 09
- Sénégal 03
- Sénégal 10
- Sénégal 34
- Sénégal 33
- Sénégal 39
- Sénégal 40
- Sénégal 43
- Sénégal 41
- Sénégal 44
- Sénégal 36
- Sénégal 32
- Grèce 1
- Colombie 3
- Grèce 2
- Inde 41
- Kazakhstan 1
- Grèce 3
- Italie 1
- Costa Rica 2
- Colombie 69
- Grèce 4
- Italie 3
- Italie 4
- Alaska 15
- Italie 5
- Italie 329
- Costa Rica 1
- Japon 1
- Colombie 2
- Italie 329
- Etats Unis 35
- Kasakhstan 3
- Inde 91
- Alaska 18
- Alaska 17
- Thailande 7W
- Colombie 26
- Colombie 23
- Colombie 1987
- Colombie 1
- Colombie 1
- Etats Unis 1
- Alaska 13
- Angleterre 26695
- Etats Unis 2
- Alaska 1
- Alaska 12
- France HPAG1

Figure 9. Arbre phylogénétique de souches d'*H. pylori* isolées de patients d'origines géographiques diverses basé sur l'alignement des séquences peptidiques de l'extrémité C-terminale de la protéine CagA (souche identifiée par le pays dans lequel vit le patient et son identifiant).

3.4. Etude de la clonalité des souches de *H. pylori* isolées chez un même patient

Une PCR RAPD a été réalisée chez 3 patients choisis au hasard parmi les 28 présentant une infection par *H. pylori*.

Pour l'un des patients les clones qui ont été amplifiés présentent le même profil RAPD tandis que les 2 autres patients présentaient une multiclonalité de l'infection avec respectivement 2 et 6 clones (Figure 9).

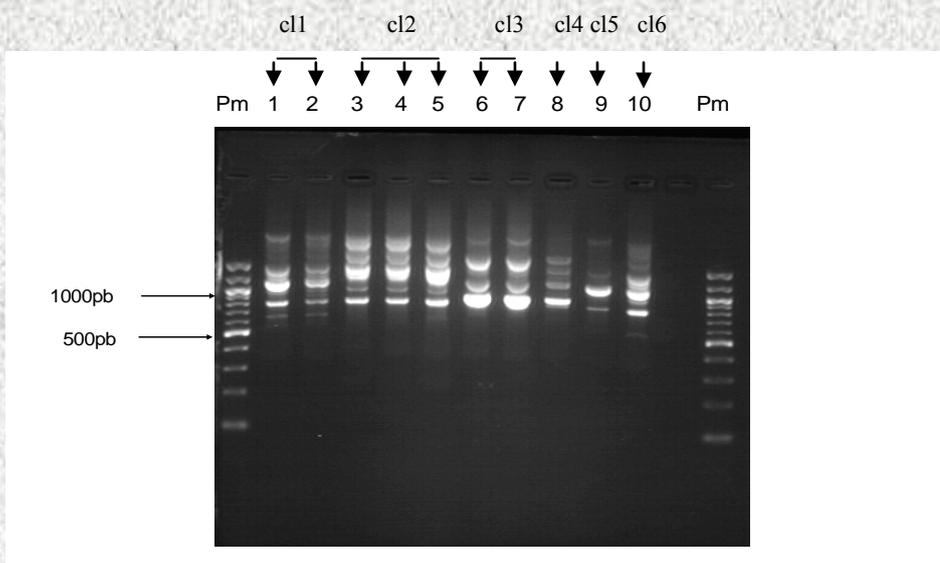


Figure 10. Profil électrophorétique d'une PCR RAPD sur gel d'agarose à 2% des 6 clones (cl) de *H. pylori* isolés chez un même patient (n°43).

Les isolats ont été isolés dans 2 régions différentes de l'estomac : antre (a) et fundus (f).

(Pm) : Marqueur de poids moléculaire (*Biolabs*) à 100 pb,

Colonnes (1) : a1, (2) : a4, (3) : f1, (4) : f3, (5) : f5, (6) : a2, (7) : a5, (8) : f4, (9) : a3, (10) : f2

3.5. Sensibilité des souches de *H. pylori* aux antibiotiques

La sensibilité aux différents antibiotiques a été testée sur 23 des 28 souches isolées (Tableau IX).

Aucune résistance à l'amoxicilline et à la clarithromycine n'a été trouvée. Par contre une résistance de 8,7 % et 60,9 % a été trouvée respectivement pour la ciprofloxacine et le métronidazole.

Tableau IX. Sensibilité de 23 souches aux antibiotiques testés.

Antibiotiques	Sensible	Résistante
---------------	----------	------------

Amoxicilline	23 (100 %)	0
Clarithromycine	23 (100 %)	0
Métronidazole	9 (39,1%)	14 (60,9%)
Ciprofloxacine	21 (91,3%)	2 (8,7%)

Chapitre 4 :

Discussion

Plus de la moitié de la population mondiale est infectée par *H. pylori* avec une forte prévalence dans les pays en voie de développement (Kausser, *et al.*, 2004). Dans cette étude, *H. pylori* était présent chez 75% des patients. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus dans une étude réalisée d'Octobre à Décembre 1995 au CHU Le-Dantec par Mbengue *et coll.*, où la prévalence de l'infection était estimée à 82,8% sans aucun facteur de risque (niveau socio-économique, sexe, âge, ethnie et lieu d'habitation urbain ou rural) (Mbengue, *et al.*, 1997). Ce taux de prévalence élevé au Sénégal reflète le bas niveau d'hygiène, la pauvreté et la promiscuité dans lesquels vivent la majorité des sénégalais (Mbengue, *et al.*, 1997).

L'infection à *H. pylori* est dans la plupart des cas asymptomatique mais une inflammation chronique de la muqueuse gastrique est toujours présente et peut évoluer vers des pathologies sévères comme l'ulcère gastrique ou duodénal (10 à 20%), l'adénocarcinome (1 à 2 %) ou un lymphome de type MALT (1 %) (Burucoa, *et al.*, 1999; Salama, *et al.*, 2007; Kusters, *et al.*, 2006). Tous les patients inclus dans cette étude, sauf un, présentaient une pathologie sévère. Toutefois, le recrutement a été biaisé puisque les biopsies n'ont été réalisées que sur des sujets présentant des lésions macroscopiques à l'endoscopie digestive, susceptibles de bénéficier d'une éradication d'*H. pylori*. L'étude d'Octobre à Décembre de 1995 le confirme. Ce travail avait porté sur 134 patients présentant des troubles dyspeptiques. 73,9% des patients présentaient une gastrite chronique non spécifique associée dans 86,9% des cas à *H. pylori*. Seulement 23,9% des patients présentaient une pathologie sévère telle qu'un ulcère duodénal (18,7 % des patients), un ulcère gastrique (2,2 %) ou un cancer gastrique (4,6%) (Mbengue, *et al.*, 1998). Dans notre étude, 4 patients présentaient un cancer gastrique (8,2 %) dont 2 hébergeaient la bactérie. Au Sénégal, l'incidence du cancer de l'estomac est estimée à 5,2 pour 100 000 hommes et 3,1 pour 100 000 femmes⁷. Le rôle de *H. pylori* dans la genèse du cancer gastrique est reconnu depuis 1994 et cette bactérie a été classée comme agent carcinogène de classe I. Pour 2 patients présentant un cancer, *H. pylori* n'a pas été retrouvé au niveau de l'estomac. A un stade avancé du cancer, les propriétés anatomo-physiologiques de l'estomac sont modifiées et la flore bactérienne intestinale le colonise, rendant ainsi difficile la culture et l'isolement de *H. pylori*. L'énigme africaine décrite par certains auteurs montre une forte prévalence de l'infection par *H. pylori* associée à

⁷ Globocan 2002, <http://www-dep.iarc.fr>

une incidence faible des maladies gastro-duodénales liées à l'infection par *H. pylori* (Campbell, *et al.*, 2001; Cataldo, *et al.*, 2004). Une revue de la littérature réalisée sur l'ensemble des études endoscopiques prospectives en Afrique suggère que la survenue de manifestations cliniques graves associées à la présence de *H. pylori* est similaire à celle observée dans les pays industrialisés (Nonaka, *et al.*, 2005). Le mythe de l'énigme africain serait dû à la constitution d'échantillons biaisés non représentatifs de la population générale, dans des pays où l'accès aux soins reste difficile et l'espérance de vie relativement courte.

Le *cag*-PAI est un facteur de virulence majeur de *H. pylori*. Le gène *cagA* a été utilisé comme marqueur de sa présence et est retrouvé chez 64,3 % des souches isolées. Très peu d'études ont recherché en Afrique la présence du gène *cagA*. Dans l'une d'entre elles, réalisée en Afrique du Sud, 95% des souches présentaient le gène *cagA* (Kidd, *et al.*, 1999). Au Nigeria, le gène *cagA* était présent chez 93% des souches (Smith, *et al.*, 2002). Gressmann *et al.* (2005), avancent l'hypothèse que le *cag*-PAI est présent dans presque toutes les souches originaires de patients d'Afrique de l'Ouest ; ce qui n'est pas confirmé par notre étude. Le *cag*-PAI ne peut être fonctionnel que si l'ensemble des 27 gènes le composant est présent (Kusters *et al.*, 2006). Nous n'avons pas étudié l'intégralité des gènes le composant mais uniquement la présence du gène *cagA* comme marqueur de sa présence. Le gène *cagA* peut donc être présent mais le *cag*-PAI est incomplet et donc non fonctionnel. Une étude menée par Kauser *et al.* (2004), sur des souches d'origines géographiques diverses a montré que le *cag*-PAI était incomplet dans la majorité des souches : 42,9 % des souches japonaises, 81,4 % des souches péruviennes et 88 % des souches indiennes. Dans cette même étude, peu de souches européennes et africaines présentaient un *cag*-PAI complet. Ces résultats ne sont pas confirmés par un travail réalisé par Linz de l'Institut Max Planck de Berlin. Sur 40 souches d'origines géographiques diverses, le *cag*-PAI a été séquencé dans sa totalité et était toujours complet lorsqu'il était présent (Linz, en cours de publication). Dans l'étude de Kauser *et al.* (2004), les gènes composant le *cag*-PAI ont été mis en évidence par amplification, or l'absence d'amplification de certains gènes pourrait être due à l'extrême diversité génétique de *H. pylori* et à l'utilisation d'amorces non parfaitement complémentaires de la région à amplifier. Dans un travail réalisé à l'Institut Pasteur de Paris, la composition génétique du *cag*-PAI a été étudiée par microarray contenant l'ensemble des gènes du *cag*-PAI sur 4 souches issues de patients sénégalais. Elle a confirmé l'hypothèse émise par Linz, à savoir que lorsque le *cag*-PAI est détecté, l'ensemble des gènes sont présents (Breurec., 2004). Le gène *cagA* apparaît donc être un bon marqueur de la présence d'un *cag*-PAI complet chez les souches sénégalaises. Lorsque le gène *cagA* était absent, une confirmation de l'absence du

cag-PAI a été réalisée en utilisant des amorces spécifiques des gènes bordant les régions adjacentes du *cag*-PAI.

En occident, de nombreuses données montrent une corrélation entre une infection par des bactéries possédant un *cag*-PAI fonctionnel, c'est-à-dire contenant la totalité des gènes de l'îlot, et la survenue d'ulcères peptiques ou de cancers gastriques (Parsonnet, 1995a). Ces corrélations ne sont toutefois pas retrouvées pour les souches asiatiques qui possèdent quasiment toutes un *cag*-PAI qu'elles soient ou non associées à une pathologie sévère (Azuma, *et al.*, 2002). En Afrique, très peu de travaux ont porté sur les corrélations entre le *cag*-PAI et la pathologie gastro-duodénale. Sur notre recrutement, une corrélation entre la présence de *cagA* et la pathologie gastro-duodénale associée n'a pu être mise en évidence du fait d'un échantillonnage limité et des pathologies gastro-duodénales presque toujours sévères. Nous sommes à la moitié de la durée d'inclusion et nous espérons avoir un nombre suffisant de patients à la fin de l'étude ainsi qu'un panel de pathologies gastro-duodénales suffisamment varié pour mettre en évidence une corrélation.

La protéine CagA est une protéine immunogénétique de 128 à 140 kDa. La variabilité de sa longueur est due à une répétition d'une séquence de 5 acides aminés au niveau de l'extrémité 3' du gène *cagA* (Azuma, *et al.*, 2002). L'étude de l'extrémité 3' du gène *cagA* est réalisée en collaboration avec le laboratoire de microbiologie médicale de l'Institut Pasteur d'Athènes dirigée Panayotopoulou qui ont mis au point la PCR EPIYA. Un des objectifs est de valider la PCR EPIYA sur des souches d'origines géographiques diverses et de proposer une stratégie de typage du motif EPIYA selon le nombre de paires de bases de produit d'amplification. Dans l'étude réalisée par Panayotopoulou *et al.* (2007) sur des souches isolées de patients grecs, une longueur de 470 ou 570 paires de base étaient respectivement prédictives d'un motif EPIYA de type ABC et ABCC. Nos résultats ne confirment pas ces travaux puisque des motifs EPIYA de type ABC et BC présentaient une taille de 450 (\pm 25) paires de base et qu'un motif EPIYA de type ABC présentait une taille de 520 paires de base. Ces résultats sont préliminaires et demandent à être confirmés. Les souches isolées présentaient un motif EPIYA de type Western CagA Specific Sequence « WSS » caractérisé par les motifs EPIYA -A, -B et -C, identique à celui retrouvé chez les souches occidentales. Aucune souche ne présentait le type Eastern CagA Specific Sequence « ESS » ou motif EPIYA -A, -B et -D (Azuma, *et al.*, 2002), (Argent, *et al.*, 2004). Les souches sécrétant une protéine CagA de type EPIYA -A, -B, -D sont associées de façon significative à une gastrite chronique active sévère et à une atrophie gastrique en comparaison des souches ne possédant pas de *cag*-PAI fonctionnel ou sécrétant une protéine CagA de type -A, -B, -C (Azuma, *et al.*,

2002). Chez les souches sécrétant une protéine CagA de type EPIYA -A, -B, -C, l'augmentation du nombre de motifs EPIYA a été associée au degré de phosphorylation de la protéine CagA et à une activité biologique augmentée en terme d'élongation de cellules AGS (Argent, *et al.*, 2004). En Afrique du Sud, en Chine et en Grèce, une corrélation entre le nombre de motifs EPIYA et la pathologie a été mise en évidence : le nombre de motifs EPIYA (4 à 6) était significativement plus élevé dans le génome de souches associées à un cancer gastrique (Argent, *et al.*, 2004, Panayotopoulou, *et al.*, 2007). Dans notre travail, les souches isolées des patients cancéreux présentaient respectivement 2 et 3 motifs EPIYA. Aucune corrélation entre le nombre et/ou le type de motifs de phosphorylation et la pathologie gastroduodénale n'a pu être mise en évidence. Toutefois nos résultats sont préliminaires et demandent à être confirmés.

Une étude de génétique des populations, basée sur une analyse du polymorphisme de 7 gènes de ménage (*atpA*, *efp*, *mytY*, *ppa*, *trpC*, *ureI* et *yphC*) et du gène *vacA* chez 370 souches de *H. pylori* isolées de patients originaires de 27 groupes géographiques, ethniques et linguistiques différents, a permis de classer les souches en 4 groupes génétiques : hpEurope, hpAfrica2, hpAfrica1 (subdivisé en hspSAfrica et hspWAfrica) et hpEastAsia (subdivisé en hspAmerind, hspEAsia, hspMaori) et de retracer les mouvements des populations humaines au cours des grandes migrations (Falush, *et al.*, 2003). En augmentant le nombre de souches à 769 issues de patients originaires de 51 groupes géographiques, ethniques et linguistiques différents, 2 nouveaux groupes génétiques ont été identifiés et désignés hpAsia2 chez des patients originaires du nord de l'Inde, du Bangladesh, de la Thaïlande, des Philippines et de l'Asie du Sud-Est et hpNEAfrica prédominant chez des sujets originaires d'Ethiopie, de Somalie, du Soudan et du Nord du Nigéria (Linz, *et al.*, 2007). Dans l'étude de Falush, *et al.* (2003), 5 souches d'*H. pylori* isolées de patients sénégalais ont été incluses dans l'analyse de génétique de population. Elles appartenaient toutes au groupe génétique hpAfrica1, sous population hspWAfrica. L'analyse phylogénétique réalisée à partir de la séquence amplifiée EPIYA classe les souches sénégalaises de cette étude dans un cluster différent des autres souches originaires d'Asie, d'Amérique et d'Europe, dont les séquences sont présentes dans la base de données Genbank. L'analyse du polymorphisme génétique de l'extrémité 3' du gène *cagA* pourrait constituer un moyen beaucoup plus simple que celle reposant sur 7 gènes de ménage pour typer des souches d'origines géographiques différentes et pourrait être utilisée comme signature épidémiologique des souches sénégalaises.

H. pylori présente la plus importante diversité génétique qui ait été décrite pour une bactérie (Suerbaum, *et al.*, 1998). La plupart des études s'intéressant à la clonalité de

l'infection ont étudié la transmission intrafamiliale de *H. pylori* (Owen et Xerry 2003; Raymond, *et al.*, 2004 ; Kivi *et al.*, 2007). La souche J99, isolé chez un patient Afro-Américain souffrant d'ulcère duodéal, a été la 2^{ème} souche de *H. pylori* dont le génome fut séquencé dans sa totalité. Sept ans après, des biopsies gastriques ont été réalisés chez ce même patient et la diversité génétique des clones isolés a été comparée à celle de la souche J99. La RAPD et l'analyse du polymorphisme de 4 gènes montraient un lien clonal entre les différents isolats. En revanche, l'analyse par puce à ADN montrait une différence en termes de contenu génétique. Différents mécanismes ont contribué à cette variabilité génétique: l'acquisition horizontale d'ADN (transfert de matériel génétique intra- ou inter-espèce), l'excision d'ADN et des mutations ponctuelles. La compétence naturelle de *H. pylori*, la facilité de cette bactérie à effectuer des recombinaisons, un système de réparation moins complet que celui d'*Escherichia coli* et des systèmes d'élimination des recombinaisons peu efficaces contribuent également à la diversification du génome de *H. pylori* (Suerbaum, *et al.*, 1998 ; Wang, *et al.*, 1999). Il présente une structure panmictique, c'est-à-dire une très faible limite à la recombinaison (Suerbaum, *et al.*, 1998). Cette monoclonalité de l'infection semble être fréquente dans les pays développés. Dans l'étude de Raymond *et al.* (2004), sur une famille maghrébine composée des 2 parents et de 4 enfants, l'analyse du polymorphisme des 2 gènes de ménage, *hspA* et *glmM*, sur 10 clones isolés des primocultures antrales et fundiques a montré une importante diversité génétique avec la présence de 11 allèles pour *hspA* et de 6 allèles pour *glmM*. L'analyse phylogénétique a permis de les regrouper au sein de 4 complexes clonaux (A, B, C et D). Le père présentait une infection mixte : les clones isolés différaient de ceux des autres membres de la famille et formaient 2 complexes nommés B et D. Chez un de ses enfants, en plus d'un clone apparenté au complexe clonal A, un clone appartenant au complexe clonal C a été retrouvé et présentait les allèles *hspA* et *glmM* qui sont typiques aux souches africaines. La multiclonalité de l'infection a été confirmée par RAPD, RFLP, PFGE et par ribotyping. La mère et 3 enfants présentaient une infection par un clone unique appartenant au complexe A (Raymond, *et al.*, 2004). Une étude similaire a été réalisée par Kivi *et al.* (2007) dans une famille sud américaine. Les clones isolés de chacun des patients présentaient le même profil RAPD, sauf pour la mère qui hébergeait une souche supplémentaire. Cette multiclonalité de l'infection chez la mère a été confirmée par l'analyse de la séquence du gène *hsdS5* chez les 2 clones mis en évidence par RAPD. La multiclonalité de l'infection semble être fréquente dans les pays en voie de développement (Berg *et al.*, 1997 ; Raymond, *et al.*, 2004 ; Kivi, *et al.*, 2007). Ce qui semble confirmer les résultats de notre étude : sur les 3 patients étudiés par RAPD, 2 présentaient plusieurs clones. Une des

principales conséquences de la polyclonalité de l'infection à *H. pylori* est la difficulté à mettre en évidence une corrélation entre la pathologie gastro-duodénale et un clone isolé. La pathologie gastro-duodénales observée est elle la conséquence physiopathologique d'une infection liée à un ou plusieurs clones au niveau de l'estomac, à un « super » clone ayant évolué et acquis de façon horizontale du matériel génétique lors d'une infection mixte ?

De nombreuses études ont rapporté la sensibilité de *H. pylori* aux antibiotiques. Aucun consensus n'existe à ce jour sur la technique de référence à utiliser en routine (Picot, *et al.*, 2002). Nous avons retenu 2 méthodes, l'E-test pour l'amoxicilline, la clarithromycine et le métronidazole, la méthode de diffusion en milieu gélosé pour la ciprofloxacine. Les avantages de l'E-test sont la détermination directe de la CMI et une adaptation aux bactéries à pousse lente comme *H. pylori*. Une bonne corrélation a été trouvée par différentes études entre les méthodes que nous avons utilisées et la méthode de référence (la méthode de détermination des CMI par dilution en milieu solide) sauf pour le métronidazole où le taux de résistance était surestimé de 10 à 20 % (Megraud, *et al.*, 2000). Cette surestimation pourrait s'expliquer par le potentiel Redox puisque les milieux utilisés pour la détermination des CMI par dilution en milieu solide sont en général préparés de façon extemporanée. Ils ont donc une probabilité plus forte d'avoir un potentiel Redox bas (Megraud, *et al.*, 2000).

Aucune résistance n'a été trouvée à l'amoxicilline. Ce résultat est comparable à celui observé par Seck. (2001) au CHU Le-Dantec. C'est également le cas de la plupart des études faites de par le monde où cette résistance est, soit nulle, soit inférieure à 1%, indiquant ainsi, que l'amoxicilline ne pose pas un problème majeur de résistance. Aucune souche résistante n'a été trouvée en France, seulement des souches de sensibilité diminuée (0,25 - 0,5 mg/l) (Megraud, *et al.*, 2000). En Italie, un taux de résistance de 0,2% a été rapporté (Toracchio and Marzio, 2003), alors qu'aux Etats-Unis, une résistance de 1,4 % a été trouvée (Meyer, *et al.*, 2002). Néanmoins, un taux de résistance très élevé a été rapporté dans certains pays. C'est le cas au Bangladesh avec 6,6 % (Nahar, *et al.*, 2004).

Ces forts taux de résistance pour l'amoxicilline, doivent être considérés avec circonspection tant que les souches n'ont pas été étudiées par un centre de référence reconnu.

Pour la clarithromycine, aucune résistance n'a été trouvée même si deux souches présentaient une sensibilité diminuée. Dans une étude multicentrique réalisée en Europe en 1998, le taux global de résistance à la clarithromycine était de 9,9 %. Elle est estimée à 9,3 %

en Europe Centrale et de l'Est mais elle semble être plus importante au Sud de l'Europe avec un taux 18 % (Megraud, *et al.*, 2000). Au Canada, la résistance a été estimée à 3 % et à 7,8 % à la Réunion (Picot, *et al.*, 2002). Aux Etats-Unis, elle atteint 10 à 15 % sur la base des tests réalisés lors d'essais cliniques et ceci quelle que soit la région étudiée (Meyer, *et al.*, 1997; Laine, *et al.*, 1998). Une étude prospective menée de 1998 à 2002 dans 11 centres médicaux des Etats-Unis a confirmé ces résultats ; la résistance à la clarithromycine y était de 12,9 % (Duck, *et al.*, 2004). Cette résistance est très élevée au Pérou (50 %) (Picot, *et al.*, 2002). En ce qui concerne l'Extrême Orient, la résistance à la clarithromycine est plus élevée au Japon (11 à 13 %) qu'à Hong Kong (4,5 %) (Megraud, *et al.*, 2000) ou en Corée (5- 6 %) (Kim, *et al.*, 2001) (Eun, *et al.*, 2003). A notre connaissance, aucune étude n'a été réalisée en Afrique. Le facteur de risque essentiel de la résistance à la clarithromycine est la consommation de macrolides, surtout dans les traitements des infections respiratoires (Megraud, *et al.*, 2000; Picot, *et al.*, 2002).

Le pourcentage de résistance au métronidazole est très élevé (environ 61%) et conforte les résultats de Seck. (2001), (90 %). Dans l'étude multicentrique européenne de 1998, la prévalence globale de la résistance au métronidazole était de 33,1%, sans différence significative entre le nord et le sud, mais avec une prévalence significativement plus basse en Europe centrale et orientale (29,2%) (Megraud, *et al.*, 2000). Cette résistance était de 39,4 % à la Réunion, 32 % au Canada, 20 % en Australie, 20 % aux Etats-Unis et 84 % en République Démocratique du Congo (ex Zaïre) (Picot, *et al.*, 2002).

Comme pour les autres antibiotiques, la prévalence de la résistance dépend de la pression de sélection. Elle est très élevée (50 à 80%) dans les pays en voie de développement, où le métronidazole est très utilisé pour traiter certaines parasitoses intestinales. Dans les pays développés, les souches isolées chez les femmes sont en général plus résistantes que celles isolées chez les hommes du fait des traitements gynécologiques à base de métronidazole (Megraud, *et al.*, 2000).

Nous avons trouvé un taux de résistance de 8,7 % à la ciprofloxacine. Ce taux est élevé comparé au taux de résistance en Europe où il est inférieur à 1 %. Dans une étude réalisée en France sur une population où 56% des sujets étaient d'origine africaine, la résistance y était très élevée avec un taux de 40 % (Megraud, *et al.*, 2000). A la Réunion, elle était de 6,4 % (Picot, *et al.*, 2002).

L'émergence croissante des résistances à certains antibiotiques favorise de plus en plus l'inefficacité des trithérapies adoptées pour l'éradication d'*H. pylori*, d'où la nécessité de réaliser une surveillance épidémiologique de la résistance en Afrique. Nos résultats confortent

le schéma thérapeutique recommandé lors des conférences de consensus internationales : IPP à double dose associé à la clarithromycine (500 mg x 2/ j) et à l'amoxicilline (1 g x 2/ j) pendant au moins 7 jours, qui peut être utilisé comme traitement de 1ere intention au Sénégal.

Conclusion et Perspectives

La prévalence de l'infection à *H. pylori* dans la population incluse est de 75%. Elle est comparable à celle estimée lors d'études précédentes menées au Sénégal et dans la plupart des pays en voie de développement. Cette prévalence élevée reflète le bas niveau d'hygiène lié à la pauvreté dans laquelle vive la majorité des sénégalais. Tous les patients inclus dans cette étude sauf un présentaient une pathologie gastroduodénale sévère. Cependant, le recrutement n'est pas représentatif des patients présentant une infection à *H. pylori* puisque les biopsies gastriques ont été réalisées chez des sujets présentant des lésions macroscopiques à l'endoscopie digestive, susceptibles de bénéficier d'une éradication de la bactérie. L'analyse des résultats d'études antérieures menées au Sénégal indique que la probabilité de survenue de manifestations gastroduodénales cliniques graves associées à la présence de *H. pylori* est similaire à celle observée dans les pays industrialisés.

Le *cag*-PAI est un facteur de pathogénicité majeur chez *H. pylori* puisqu'il est impliqué dans plusieurs processus physiopathologiques majeurs, notamment la sécrétion et la translocation de la protéine CagA dans la cellule gastrique. Il s'agit de la première étude au Sénégal sur le rôle joué par le *cag*-PAI dans les pathologies gastro-duodénales. Le gène *cagA*, marqueur de la présence du *cag*-PAI, était présent chez 64,3% des souches. L'étude de l'extrémité 3' du gène *cagA* a mis en évidence des motifs de phosphorylation EPIYA de type EPIYA -A, -B, -C ou Western CagA Specific Sequence « WSS », identiques à ceux retrouvés dans les souches occidentales. Aucune souche ne sécrétait une protéine CagA de type « EPIYA -A, -B, -D » ou Eastern CagA Specific Sequence « ESS ». Les motifs EPIYA -A et -B étaient présents dans presque toutes les protéines CagA et le motif EPIYA -C était toujours présent mais de façon unique. Aucun lien entre la présence du gène *cagA*, le nombre et le type de motifs de phosphorylation au niveau de l'extrémité 3' du gène *cagA* et la pathologie gastroduodénale associée n'a été mis en évidence. Cependant, les résultats sont intermédiaires, puisque nous sommes à la moitié de la durée d'inclusion des patients et des conclusions définitives ne pourront être tirées qu'à la fin de cette période.

La clonalité de l'infection chez un même patient a été très peu étudiée de part le monde. Il semble qu'elle soit clonale dans les pays à haut niveau d'hygiène et polyclonale dans les pays en voie de développement. Nos résultats confirment cette hypothèse puisque sur les 3 patients testés par RAPD, 2 patients présentaient une infection mixte. *H. pylori* présente la plus importante diversité génétique jamais décrite pour une bactérie. Différents mécanismes ont généré la variabilité génétique de *H. pylori* : l'acquisition horizontale d'ADN lors d'infections mixtes (transfert de matériel génétique intra- ou inter-espèce), l'excision d'ADN et des mutations ponctuelles. Une des principales conséquences de la

polyclonalité de l'infection à *H. pylori* est la difficulté à mettre en évidence une corrélation entre la pathologie gastroduodénale et un clone isolé. La pathologie gastroduodénale observée est-elle la conséquence physiopathologique d'une infection liée à un ou plusieurs clones au niveau de l'estomac, à un « super » clone ayant évolué et acquis de façon horizontale du matériel génétique lors d'une infection mixte ?

Le traitement de l'infection à *H. pylori* actuellement recommandé est une trithérapie de 7 jours associant un inhibiteur puissant de l'acidité gastrique (inhibiteur de la pompe à protons à double dose) et deux antibiotiques, le plus souvent l'amoxicilline et la clarithromycine. Aucune résistance n'a été mise en évidence à la clarithromycine et à l'amoxicilline dans notre étude. En revanche, un taux de résistance élevé a été noté pour le métronidazole, expliqué par sa forte consommation pour le traitement d'infections bactériennes et parasitaires. Le schéma thérapeutique préconisé par toutes les conférences de consensus internationales paraît s'adapter à la situation sénégalaise : IPP à double dose associé à la clarithromycine (500 mg x 2/j) et à l'amoxicilline (1 g x 2/j) pendant au moins 7 jours.

Ce projet s'intègre dans une étude multicentrique associant plusieurs Instituts du Réseau International des Instituts Pasteur (Sénégal, Algérie, Madagascar, Cambodge, Grèce, Nouvelle-Calédonie), l'Institut Louis Malardé de Tahiti, l'Institut Pasteur de Paris, l'Institut Max Planck de Berlin, la Faculté de Médecine d'Hanovre et leurs laboratoires partenaires dans le monde. Des travaux antérieurs ont étudié la diversité génétique de plus de 1000 souches de *H. pylori* isolées de patients originaires de toutes les régions du monde. L'analyse du polymorphisme génétique de ces souches a permis de retracer les anciennes migrations humaines, à savoir la migration vers l'Australie (60 000 ans avec JC), la migration vers le continent américain à partir de la Sibérie et de l'Asie du Sud-Est (4500 ans avant JC) et l'expansion des Polynésiens dans le Pacifique (4500 ans avant JC). L'échantillon restreint de souches issues d'Afrique et de Polynésie n'a pas permis d'explorer leurs diversités génétiques et de préciser réellement les migrations humaines dans ces parties du monde. L'analyse du polymorphisme génétique de 9 gènes de ménage chez les souches isolées au cours de cette étude permettra de compléter les données disponibles en analysant des souches de *H. pylori* isolées de patients originaires de Grèce, du Cambodge, de Mélanésie, de Micronésie, de Polynésie, d'Algérie, du Cameroun (pygmées), d'Afrique Australe (groupe linguistique Khoi-San) et de Madagascar. Elle permettra d'identifier de nouveaux groupes et sous-groupes génétiques et de documenter les migrations humaines en Afrique et en Polynésie. Un projet de séquençage complet de 5 génomes de *H. pylori* associés à des lésions de dysplasie sévère ou d'adénocarcinome

gastrique et représentatifs des différents groupes génétiques identifiés sera soumis à un appel d'offre en 2008.

REFERENCES

- Alm, R. A., L. S. Ling, D. T. Moir, B. L. King, E. D. Brown, P. C. Doig, D. R. Smith, B. Noonan, B. C. Guild, B. L. deJonge, G. Carmel, P. J. Tummino, A. Caruso, M. Uria-Nickelsen, D. M. Mills, C. Ives, R. Gibson, D. Merberg, S. D. Mills, Q. Jiang, D. E. Taylor, G. F. Vovis, and pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature*. 397(6715):176-180.
- Alm, R. A. and T. J. Trust. 1999. Analysis of the genetic diversity of *Helicobacter pylori*: the tale of two genomes. *J Mol Med*. 77(12):834-846.
- Argent, R. H., M. Kidd, R. J. Owen, R. J. Thomas, M. C. Limb, and J. C. Atherton. 2004. Determinants and consequences of different levels of CagA phosphorylation for clinical isolates of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology*. 127(2):514-523.
- Atherton, J. C. 2006. The pathogenesis of *Helicobacter pylori*-induced gastro-duodenal diseases. *Annu Rev Pathol*. 1:63-96.
- Atherton, J. C., P. Cao, R. M. Peek, Jr., M. K. Tummuru, M. J. Blaser, and T. L. Cover. 1995. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. Association of specific *vacA* types with cytotoxin production and peptic ulceration. *J Biol Chem*. 270(30):17771-17777.
- Azuma, T. 2004. *Helicobacter pylori* CagA protein variation associated with gastric cancer in Asia. *J Gastroenterol*. 39(2):97-103.
- Azuma, T., A. Yamakawa, S. Yamazaki, K. Fukuta, M. Ohtani, Y. Ito, M. Dojo, Y. Yamazaki, and M. Kuriyama. 2002. Correlation between variation of the 3' region of the *cagA* gene in *Helicobacter pylori* and disease outcome in Japan. *J Infect Dis*. 186(11):1621-1630.
- Azuma, T., S. Yamazaki, A. Yamakawa, M. Ohtani, A. Muramatsu, H. Suto, Y. Ito, M. Dojo, Y. Yamazaki, M. Kuriyama, Y. Keida, H. Higashi, and M. Hatakeyama. 2004. Association between diversity in the Src homology 2 domain-containing tyrosine phosphatase binding site of *Helicobacter pylori* CagA protein and gastric atrophy and cancer. *J Infect Dis*. 189(5):820-827.
- Bamford, K. B., J. Bickley, J. S. Collins, B. T. Johnston, S. Potts, V. Boston, R. J. Owen, and J. M. Sloan. 1993. *Helicobacter pylori*: comparison of DNA fingerprints provides evidence for intrafamilial infection.
- Berg, D. E., R. H. Gilman, J. Lelwala-Guruge, K. Srivastava, Y. Valdez, J. Watanabe, J. Miyagi, N. S. Akopyants, A. Ramirez-Ramos, T. H. Yoshiwara, S. Recavarren, and R. Leon-Barua. 1997. *Helicobacter pylori* populations in Peruvian patients. *Clin Infect Dis*. 25(5):996-1002.
- Breurec. 2004. Etude de la distribution des gènes non-ubiquistes de *Helicobacter pylori* dans le génome de souches cliniques d'ethnies et d'origines géographiques diverses. Diplôme d'études approfondies de Microbiologie option Bactériologie Médicale, Université de Paris VII, Paris.
- Bunn, J. E., W. G. MacKay, J. E. Thomas, D. C. Reid, and L. T. Weaver. 2002. Detection of *Helicobacter pylori* DNA in drinking water biofilms: implications for transmission in early life. *Lett Appl Microbiol*. 34(6):450-454.
- Burucoa, C., V. L'Homme, and J. L. Fauchere. 1999. Performance criteria of DNA fingerprinting methods for typing of *Helicobacter pylori* isolates: experimental results and meta-analysis. *J Clin Microbiol*. 37(12):4071-4080.
- Campbell, D. I., B. F. Warren, J. E. Thomas, N. Figura, J. L. Telford, and P. B. Sullivan. 2001. The African enigma: low prevalence of gastric atrophy, high prevalence of chronic inflammation in West African adults and children. *Helicobacter*. 6(4):263-267.

- Cataldo, F., J. Simpure, P. Greco, D. Ilboudo, and S. Musumeci. 2004. *Helicobacter pylori* infection in Burkina Faso: an enigma within an enigma. *Dig Liver Dis.* 36(9):589-593.
- Clemens, J., M. J. Albert, M. Rao, S. Huda, F. Qadri, F. P. Van Loon, B. Pradhan, A. Naficy, and A. Banik. 1996. Socio-demographic, hygienic and nutritional correlates of *Helicobacter pylori* infection of young Bangladeshi children. *Pediatr Infect Dis J.* 15(12):1113-1118.
- Costa, K., G. Bacher, G. Allmaier, M. G. Dominguez-Bello, L. Engstrand, P. Falk, M. A. de Pedro, and F. Garcia-del Portillo. 1999. The morphological transition of *Helicobacter pylori* cells from spiral to coccoid is preceded by a substantial modification of the cell wall. *J Bacteriol.* 181(12):3710-3715.
- Covacci, A., J. L. Telford, G. Del Giudice, J. Parsonnet, and R. Rappuoli. 1999. *Helicobacter pylori* virulence and genetic geography. *Science.* 284(5418):1328-1333.
- Crabtree, J. E., D. Kersulyte, S. D. Li, I. J. Lindley, and D. E. Berg. 1999. Modulation of *Helicobacter pylori* induced interleukin-8 synthesis in gastric epithelial cells mediated by *cag* PAI encoded VirD4 homologue. *J Clin Pathol.* 52(9):653-657.
- Dominici, P., S. Bellentani, A. R. Di Biase, G. Saccoccio, A. Le Rose, F. Masutti, L. Viola, F. Balli, C. Tiribelli, R. Grilli, M. Fusillo, and E. Grossi. 1999. Familial clustering of *Helicobacter pylori* infection: population based study. *Bmj.* 319(7209):537-540.
- Duck, W. M., J. Sobel, J. M. Pruckler, Q. Song, D. Swerdlow, C. Friedman, A. Sulka, B. Swaminathan, T. Taylor, M. Hoekstra, P. Griffin, D. Smoot, R. Peek, D. C. Metz, P. B. Bloom, S. Goldschmidt, J. Parsonnet, G. Triadafilopoulos, G. I. Perez-Perez, N. Vakil, P. Ernst, S. Czinn, D. Dunne, and B. D. Gold. 2004. Antimicrobial resistance incidence and risk factors among *Helicobacter pylori*-infected persons, United States. *Emerg Infect Dis.* 10(6):1088-1094.
- Eaton, K. A., C. E. Catrenich, K. M. Makin, and S. Krakowka. 1995. Virulence of coccoid and bacillary forms of *Helicobacter pylori* in gnotobiotic piglets. *J Infect Dis.* 171(2):459-462.
- El-Omar, E. M., M. Carrington, W. H. Chow, K. E. McColl, J. H. Bream, H. A. Young, J. Herrera, J. Lissowska, C. C. Yuan, N. Rothman, G. Lanyon, M. Martin, J. F. Fraumeni, Jr., and C. S. Rabkin. 2000. Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer. *Nature.* 404(6776):398-402.
- Ernst, P.B. and B.D.Gold. 2000. The disease spectrum of *Helicobacter pylori*: the immunopathogenesis of gastroduodenal ulcer and gastric cancer. *Annu Rev Microbiol.* 54:615-640.
- Eun, C. S., D. S. Han, J. Y. Park, Y. C. Jeon, J. S. Hahm, K. S. Kim, and J. O. Kang. 2003. Changing pattern of antimicrobial resistance of *Helicobacter pylori* in Korean patients with peptic ulcer diseases. *J Gastroenterol.* 38(5):436-441.
- Falush, D., T. Wirth, B. Linz, J. K. Pritchard, M. Stephens, M. Kidd, M. J. Blaser, D. Y. Graham, S. Vacher, G. I. Perez-Perez, Y. Yamaoka, F. Megraud, K. Otto, U. Reichard, E. Katzowitsch, X. Wang, M. Achtman, and S. Suerbaum. 2003. Traces of human migrations in *Helicobacter pylori* populations. *Science.* 299(5612):1582-1585.
- Fan, X.G., A. Chua, T.G. Li and Q.S. Zeng. 1998. Survival of *Helicobacter pylori* in milk and tap water. *J Gastroenterol. Hepatol.* 13:1096-1098.
- Fischer, W., J. Puls, R. Buhrdorf, B. Gebert, S. Odenbreit, and R. Haas. 2001. Systematic mutagenesis of the *Helicobacter pylori cag* pathogenicity island: essential genes for CagA translocation in host cells and induction of interleukin-8. *Mol Microbiol.* 42(5):1337-1348.
- Foryst-Ludwig, A. and M. Naumann. 2000. p21-activated kinase 1 activates the nuclear factor kappa B (NF-kappa B)-inducing kinase-Ikappa B kinases NF-kappa B pathway and

- proinflammatory cytokines in *Helicobacter pylori* infection. *J Biol Chem.* 275(50):39779-39785.
- Frenck, R. W., Jr. and J. Clemens. 2003. *Helicobacter* in the developing world. *Microbes Infect.* 5(8):705-713.
- Fukuda, Y., T. Tomita, K. Hori, K. Tamura, T. Shimoyama, and T. Nishigami. 2001. [The history of *Helicobacter pylori*]. *Rinsho Byori.* 49(2):109-115.
- Galmiche, A., J. Rassow, A. Doye, S. Cagnol, J. C. Chambard, S. Contamin, V. de Thillot, I. Just, V. Ricci, E. Solcia, E. Van Obberghen, and P. Boquet. 2000. The N-terminal 34 kDa fragment of *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin targets mitochondria and induces cytochrome c release. *Embo J.* 19(23):6361-6370.
- Gebert, B., W. Fischer, E. Weiss, R. Hoffmann, and R. Haas. 2003b. *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin inhibits T lymphocyte activation. *Science.* 301(5636):1099-1102.
- Glynn, M. K., C. R. Friedman, B. D. Gold, B. Khanna, L. Hutwagner, N. Iihoshi, C. Revollo, and R. Quick. 2002. Seroincidence of *Helicobacter pylori* infection in a cohort of rural Bolivian children: acquisition and analysis of possible risk factors. *Clin Infect Dis.* 35(9):1059-1065.
- Goodwin, C., J. Armstrong, T. Chilvers, M. Peter, M. D. Collins, L. Sly, W. McConnell, and W. E. S. Harper. 1989. Transfer of *Campylobacter pyloridis* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen. nov. as *Helicobacter pylori* comb. nov. and *Helicobacter mustelae* comb. nov., respectively. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 39:397-405.
- Gottrand, F. and D. Turck. 1995. [*Helicobacter pylori* infection in children]. *Arch Pediatr.* 2(6):573-579.
- Gressmann, H., B. Linz, R. Ghai, K. P. Pleissner, R. Schlapbach, Y. Yamaoka, C. Kraft, S. Suerbaum, T. F. Meyer, and M. Achtman. 2005. Gain and Loss of Multiple Genes During the Evolution of *Helicobacter pylori*. *PLoS Genet.* 1(4):e43.
- Gueneau, P. and S. Loiseaux-De Goër. 2002. *Helicobacter*: molecular phylogeny and the origin of gastric colonization in the genus. *Infect Genet Evol.* 1:215-223.
- Higashi, H., R. Tsutsumi, A. Fujita, S. Yamazaki, M. Asaka, T. Azuma, and M. Hatakeyama. 2002a. Biological activity of the *Helicobacter pylori* virulence factor CagA is determined by variation in the tyrosine phosphorylation sites. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99(22):14428-14433.
- Higashi, H., R. Tsutsumi, S. Muto, T. Sugiyama, T. Azuma, M. Asaka, and M. Hatakeyama. 2002. SHP-2 tyrosine phosphatase as an intracellular target of *Helicobacter pylori* CagA protein. *Science.* 295(5555):683-686.
- Hulten, K., S. W. Han, H. Enroth, P. D. Klein, A. R. Opekun, R. H. Gilman, D. G. Evans, L. Engstrand, D. Y. Graham, and F. A. El-Zaatari. 1996. *Helicobacter pylori* in the drinking water in Peru. *Gastroenterology.* 110(4):1031-1035.
- Ilver, D., A. Arnqvist, J. Ogren, I. M. Frick, D. Kersulyte, E. T. Incecik, D. E. Berg, A. Covacci, L. Engstrand, and T. Boren. 1998. *Helicobacter pylori* adhesin binding fucosylated histo-blood group antigens revealed by retagging. *Science.* 279(5349):373-377.
- Israel, D. A., N. Salama, U. Krishna, U. M. Rieger, J. C. Atherton, S. Falkow, and R. M. Peek, Jr. 2001. *Helicobacter pylori* genetic diversity within the gastric niche of a single human host. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98(25):14625-14630.
- Kansau, I., J. Raymond, E. Bingen, P. Courcoux, N. Kalach, M. Bergeret, N. Braimi, C. Dupont, and A. Labigne. 1996. G enotyping of *Helicobacter pylori* isolates by sequencing of PCR products and comparison with the RAPD technique. *Res Microbiol.* 147(8):661-669.

- Kauser, F., A. A. Khan, M. A. Hussain, I. M. Carroll, N. Ahmad, S. Tiwari, Y. Shouche, B. Das, M. Alam, S. M. Ali, C. M. Habibullah, R. Sierra, F. Megraud, L. A. Sechi, and N. Ahmed. 2004. The *cag* pathogenicity island of *Helicobacter pylori* is disrupted in the majority of patient isolates from different human populations. *J Clin Microbiol.* 42(11):5302-5308.
- Kidd, M., A. J. Lastovica, J. C. Atherton, and J. A. Louw. 1999. Heterogeneity in the *Helicobacter pylori vacA* and *cagA* genes: association with gastroduodenal disease in South Africa? *Gut.* 45 (4):499-502.
- Kim, J. J., R. Reddy, M. Lee, J. G. Kim, F. A. El-Zaatari, M. S. Osato, D. Y. Graham, and D. H. Kwon. 2001. Analysis of metronidazole, clarithromycin and tetracycline resistance of *Helicobacter pylori* Isolates from Korea. *J Antimicrob Chemother.* 47(4):459-461.
- Kivi, M., S. Rodin, I. Kupersmidt, A. Lundin, Y. Tindberg, M. Granstrom, and L. Engstrand. 2007. *Helicobacter pylori* genome variability in a framework of familial transmission. *BMC Microbiol.* 7:54.
- Kivi, M., Y. Tindberg, M. Sorberg, T. H. Casswall, R. Befrits, P. M. Hellstrom, C. Bengtsson, L. Engstrand, and M. Granstrom. 2003. Concordance of *Helicobacter pylori* strains within families. *J Clin Microbiol.* 41(12):5604-5608.
- Konturek, P. C., J. Kania, J. W. Konturek, A. Nikiforuk, S. J. Konturek, and E. G. Hahn. 2003a. *H. pylori* infection, atrophic gastritis, cytokines, gastrin, COX-2, PPAR γ and impaired apoptosis in gastric carcinogenesis. *Med Sci Monit.* 9(7):SR53-66.
- Konturek, P. C., S. J. Konturek, T. Starzyska, K. Marlicz, W. Bielanski, P. Pierzchalski, E. Karczewska, A. Hartwich, K. Rembiasz, M. Lawniczak, W. Ziemiak, and E. C. Hahn. 2000. *Helicobacter pylori*-gastrin link in MALT lymphoma. *Aliment Pharmacol Ther.* 14(10):1311-1318.
- Konturek, P. C., K. Rembiasz, S. J. Konturek, J. Stachura, W. Bielanski, K. Galuschka, D. Karcz, and E.G. Hahn. 2003b. Gene expression of ornithine decarboxylase, cyclooxygenase-2, and gastrin in atrophic gastric mucosa infected with *Helicobacter pylori* before and after eradication therapy. *Dig Dis Sci.* 48(1):36-46.
- Kuipers, E. J. 1999. *Helicobacter pylori* and gastric cancer. *Aliment Pharmacol Ther.* 14:3-11.
- Kusters J. G., Vliet V, Arnoud H. M., Kuipers E.J. 2006. Pathogenesis of *Helicobacter pylori*. *Infection. Clinical microbiology.* 19(3):449 - 490.
- Kusters, J. G., M. M. Gerrits, J. A. Van Strijp, and C. M. Vandembroucke-Grauls. 1997. Coccoid forms of *Helicobacter pylori* are the morphologic manifestation of cell death. *Infect Immun.* 65(9):3672-3679.
- Laine, L., L. Suchower, J. Frantz, A. Connors, and G. Neil. 1998. Low rate of emergence of clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* with amoxicillin co-therapy. *Aliment Pharmacol Ther.* 12(9):887-892.
- Linz, B., F. Balloux, Y. Moodley, A. Manica, H. Liu, P. Roumagnac, D. Falush, C. Stamer, F. Prugnolle, S. W. van der Merwe, Y. Yamaoka, D. Y. Graham, E. Perez-Trallero, T. Wadstrom, S. Suerbaum, and M. Achtman. 2007. An African origin for the intimate association between humans and *Helicobacter pylori*. *Nature.* 445(7130):915-918.
- Maherzi, A., A. Bouaziz Abed, C. Fendri, F. Oubich, C. Koubaa, J. L. Fauchere, and S. Bousnina. 2003. [*Helicobacter pylori* infection: prospective study for asymptomatic Tunisian children]. *Arch Pediatr.* 10(3):204-207.
- Makrithathis, A., E. Pasching, K. Schutze, M. Wimmer, M. L. Rotter, and A. M. Hirschl. 1998. Detection of *Helicobacter pylori* in stool specimens by PCR and antigen enzyme immunoassay. *J Clin Microbiol.* 36(9):2772-2774.
- Mbengue, M., M. L. Diouf, J. M. Dangou, M. M. Ka, A. Ba-Seck, M. F. Ndiaye, T. Moreira-Diop, P. D. Ndiaye, and O. Bao. 1997. [Frequency of *Helicobacter pylori* infection in symptomatic patients in Senegal]. *Med Trop (Mars).* 57(3):256-258.

- Mbengue, M., M. L. Diouf, J. M. Dangou, M. M. Ka, A. Ba-Seck, M. F. Ndiaye, T. Moreira-Diop, P. D. Ndiaye, and O. Bao. 1998. Gastrites chroniques et *Helicobacter pylori* à Dakar. *Acta Endoscopica* 28 (3):298-309
- Megraud, F., J. Freney, F. Renaud, W. Hansen, and e. Bollet. C. 2000. Précis de bactériologie clinique. *ESKA ed.* 2000.
- Mégraud, F. and H. Lamouliatte. 1996. *Helicobacter pylori*. Vol. 1. *Elsevier ed.* 1996
- Meyer-ter-Vehn, T., A. Covacci, M. Kist, and H. L. Pahl. 2000. *Helicobacter pylori* activates mitogen-activated protein kinase cascades and induces expression of the proto-oncogenes c-fos and c-jun. *J Biol Chem.* 275(21):16064-16072.
- Meyer, J. M., S. Ryu, S. L. Pendland, and L. H. Danziger. 1997. In vitro synergy testing of clarithromycin and 14-hydroxyclearithromycin with amoxicillin or bismuth subsalicylate against *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother.* 41(7):1607-1608.
- Meyer, J. M., N. P. Silliman, W. Wang, N. Y. Siepmann, J. E. Sugg, D. Morris, J. Zhang, H. Bhattacharyya, E. C. King, and R. J. Hopkins. 2002. Risk factors for *Helicobacter pylori* resistance in the United States: the surveillance of *H. pylori* antimicrobial resistance partnership (SHARP) study, 1993-1999. *Ann Intern Med.* 136(1):13-24.
- Mimuro, H., T. Suzuki, J. Tanaka, M. Asahi, R. Haas, and C. Sasakawa. 2002. Grb2 is a key mediator of *Helicobacter pylori* CagA protein activities. *Mol Cell.* 10(4):745-755.
- Mitchell, H. M., K. Mascord, S. L. Hazell, and G. Daskalopoulos. 2001. Association between the IgG subclass response, inflammation and disease status in *Helicobacter pylori* infection. *Scand J Gastroenterol.* 36(2):149-155.
- Mizoguchi, H., T. Fujioka, and M. Nasu. 1999. Evidence for viability of coccoid forms of *Helicobacter pylori*. *J Gastroenterol.* 34 Suppl 11:32-36.
- Nahar, S., A. K. Mukhopadhyay, R. Khan, M. M. Ahmad, S. Datta, S. Chattopadhyay, S. C. Dhar, S.A. Sarker, L. Engstrand, D. E. Berg, G. B. Nair, and M. Rahman. 2004. Antimicrobial susceptibility of *Helicobacter pylori* strains isolated in Bangladesh. *J Clin Microbiol.* 42(10):4856-4858.
- Nilsson, H. O., J. Blom, W. Abu-Al-Soud, A. A. Ljungh, L. P. Andersen, and T. Wadstrom. 2002. Effect of cold starvation, acid stress, and nutrients on metabolic activity of *Helicobacter pylori*. *Appl Environ Microbiol.* 68(1):11-19.
- Nonaka, L., S. R. Connell, and D. E. Taylor. 2005. 16S rRNA Mutations That Confer Tetracycline Resistance in *Helicobacter pylori* Decrease Drug Binding in *Escherichia coli* Ribosomes. *J Bacteriol.* 187(11):3708-3712.
- Odenbreit, S., B. Gebert, J. Puls, W. Fischer, and R. Haas. 2001. Interaction of *Helicobacter pylori* with professional phagocytes: role of the cag pathogenicity island and translocation, phosphorylation and processing of CagA. *Cell Microbiol.* 3(1):21-31.
- Odenbreit, S., J. Puls, B. Sedlmaier, E. Gerland, W. Fischer, and R. Haas. 2000. Translocation of *Helicobacter pylori* CagA into gastric epithelial cells by type IV secretion. *Science.* 287(5457):1497-1500.
- Owen, R. J. and J. Xerry. 2003. Tracing clonality of *Helicobacter pylori* infecting family members from analysis of DNA sequences of three housekeeping genes (*ureI*, *atpA* and *ahpC*), deduced amino acid sequences, and pathogenicity-associated markers (*cagA* and *vacA*). *J Med Microbiol.* 52(Pt 6):515-524.
- Panayotopoulou, E. G., D. N. Sgouras, K. Papadakis, A. Kalliaropoulos, G. Papatheodoridis, A. F. Mentis, and A. J. Archimandritis. 2007. Strategy to characterize the number and type of repeating EPIYA phosphorylation motifs in the carboxyl terminus of CagA protein in *Helicobacter pylori* clinical isolates. *J Clin Microbiol.* 45(2):488-495.
- Papini, E., B. Satin, M. de Bernard, M. Molinari, B. Arico, C. Galli, J. R. Telford, R. Rappuoli, and C. Montecucco. 1998a. Action site and cellular effects of cytotoxin VacA produced by *Helicobacter pylori*. *Folia Microbiol (Praha).* 43(3):279-284.

- Papini, E., B. Satin, N. Norais, M. de Bernard, J. L. Telford, R. Rappuoli, and C. Montecucco. 1998b. Selective increase of the permeability of polarized epithelial cell monolayers by *Helicobacter pylori* vacuolating toxin. *J Clin Invest.* 102(4):813-820.
- Parsonnet, J. 1995a. Bacterial infection as a cause of cancer. *Environ Health Perspect.* 103 Suppl 8:263-268.
- Parsonnet, J. 1995b. The incidence of *Helicobacter pylori* infection. *Aliment Pharmacol Ther.* 9 Suppl 2:45-51.
- Picot, S., G. Sapin, A. Michault, B. Faulques, J. P. Becquart, C. Simac, C. Amat, and E. Ancelin-Malbreil. 2002. [Antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* in Reunion Island: therapeutic consequences]. *Bull Soc Pathol Exot.* 95(2):66-70.
- Raymond, J., J. M. Thiberg, C. Chevalier, N. Kalach, M. Bergeret, A. Labigne, and C. Dauga. 2004. Genetic and transmission analysis of *Helicobacter pylori* strains within a family. *Emerg Infect Dis.* 10(10):1816-1821.
- Rieder, G., W. Einsiedl, R. A. Hatz, M. Stolte, G. A. Enders, and A. Walz. 2001. Comparison of CXC chemokines ENA-78 and interleukin-8 expression in *Helicobacter pylori*-associated gastritis. *Infect Immun.* 69(1):81-88.
- Salama, N. R., G. Gonzalez-Valencia, B. Deatherage, F. Aviles-Jimenez, J. C. Atherton, D. Y. Graham, and J. Torres. 2007. Genetic analysis of *Helicobacter pylori* strain populations colonizing the stomach at different times postinfection. *J Bacteriol.* 189(10):3834-3845.
- Salama, N. R., K. Guillemin, T. K. McDaniel, G. Sherlock, L. Tompkins, and S. Falkow. 2000. A whole-genome microarrays reveals genetic diversity among *Helicobacter pylori* strains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97(26):14668-14673.
- Seck, A. 2001. Maladie ulcéreuse gastro-duodénale et *Helicobacter pylori*: Profil de sensibilité des souches de *H. pylori* isolées à Dakar. Pharmacie, Université Cheikh Anta Diop, Dakar.(110)
- Segal, E. D., J. Cha, J. Lo, S. Falkow, and L. S. Tompkins. 1999. Altered states: involvement of phosphorylated CagA in the induction of host cellular growth changes by *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96(25):14559-14564.
- Segal, E. D., J. Cha, J. Lo, and H. L. Pahl. 2000. *Helicobacter pylori*. *J Biol Chem.* 96(21):16064-16072.
- Segal, E. D., S. Falkow, and L. S. Tompkins. 1996. *Helicobacter pylori* attachment to gastric cells induces cytoskeletal rearrangements and tyrosine phosphorylation of host cell proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93(3):1259-1264.
- Smith, S. I., C. Kirsch, K. S. Oyedeji, A. O. Arigbabu, A. O. Coker, E. Bayerdoffer, and S. Miehle. 2002. Prevalence of *Helicobacter pylori vacA*, *cagA* and *iceA* genotypes in Nigerian patients with duodenal ulcer disease. *J Med Microbiol.* 51(10):851-854.
- Solnick, J. V., L. M. Hansen, D. R. Canfield, and J. Parsonnet. 2001. Determination of the infectious dose of *Helicobacter pylori* during primary and secondary infection in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *Infect Immun.* 69(11):6887-6892.
- Solnick, J. V. and D. B. Schauer. 2001. Emergence of diverse *Helicobacter* species in the pathogenesis of gastric and enterohepatic diseases. *Clin Microbiol Rev.* 14(1):59-97.
- Sorberg, M., M. Nilsson, H. Hanberger, and L. E. Nilsson. 1996. Morphologic conversion of *Helicobacter pylori* from bacillary to coccoid form. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 15(3):216-219.
- Stein, M., F. Bagnoli, R. Halenbeck, R. Rappuoli, W. J. Fantl, and A. Covacci. 2002. c-Src/Lyn kinases activate *Helicobacter pylori* CagA through tyrosine phosphorylation of the EPIYA motifs. *Mol Microbiol.* 43(4):971-980.

- Suerbaum, S., Smith, J.M., Bapumia, K., Morelli, G., Smith, N.H., Kunstmann, E., Dyrek, I. and Achtman, M. 1998. Free recombination within *Helicobacter pylori*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95: 12619-12624.
- Tindberg, Y. 2002. [Intrafamilial transmission of *Helicobacter pylori* infection]. *Lakartidningen.* 99(25):2848-2849.
- Toracchio, S. and L. Marzio. 2003. Primary and secondary antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* strains isolated in central Italy during the years 1998-2002. *Dig Liver Dis.* 35(8):541-545.
- Van Doorn, L. J., C. Figueiredo, F. Megraud, S. Pena, P. Midolo, D. M. Queiroz, F. Carneiro, B. Vanderborgh, M. D. Pegado, R. Sanna, W. De Boer, P. M. Schneeberger, P. Correa, E. K. Ng, J. Atherton, M. J. Blaser, and W. G. Quint. 1999. Geographic distribution of *vacA* allelic types of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology.* 116(4):823-830.
- Vincent, P., F. Gottrand, P. Pernes, M. O. Husson, M. Lecomte-Houcke, D. Turck, and H. Leclerc. 1994. High prevalence of *Helicobacter pylori* infection in cohabiting children. Epidemiology of a cluster, with special emphasis on molecular typing. *Gut.* 35(3):313-316.
- Wang, G., Humayun, M.Z., and Taylor, D.E. (1999). Mutation as an origin of genetic variability in *Helicobacter pylori*. *Trends Microbiol.* 7: 488-493.
- Wang, J. T., J. C. Sheu, J. T. Lin, T. H. Wang, and M. S. Wu. 1993. Direct DNA amplification and restriction pattern analysis of *Helicobacter pylori* in patients with duodenal ulcer and their families. *J Infect Dis.* 168(6):1544-1548.
- Yamaoka, Y., M. S. Osato, A. R. Sepulveda, O. Gutierrez, N. Figura, J. G. Kim, T. Kodama, K. Kashima, and D. Y. Graham. 2000. Molecular epidemiology of *Helicobacter pylori*: separation of *H. pylori* from East Asian and non-Asian countries. *Epidemiol Infect.* 124(1):91-96.

ANNEXES

Annexe 1. Culture, antibiogramme et isolement de *Helicobacter pylori*

1. Objet

Décrit la culture, l'isolement, l'identification des souches de *Helicobacter pylori*(Hp) à partir de biopsies gastriques.

2. Moyens

- L'incubation peut être réalisée en sachet individuel ou en jarre selon l'organisation définie sur chaque site.
- Les milieux à utiliser pour la culture de *H. pylori* peuvent être modifiés selon la situation locale à condition de respecter les règles suivantes :
 - Ne pas utiliser de sang de mouton
 - Possibilité d'utiliser du sang de cheval laqué (Oxoid SR048C), du sang humain ou du sang équin frais défibriné. Le sang frais défibriné utilisé pour la fabrication des milieux doit dater de moins d'une semaine et les géloses à 10% de sang frais ne doivent pas dater de plus de 4 jours.
 - Des géloses commerciales existent mais ont l'inconvénient d'être chères (Pylori-gélose, Biomérieux, 10 boîtes, réf. 43263, 44 euros).
- Les fournisseurs et prix sont donnés à titre indicatif.

2.1. Matériel technique

2.1.1. Petit matériel à usage unique

Nom
Etuve 37°C
Incubation en jarre
GENbox Couvercle Jar 2.5l (Biomérieux, réf. 96129, 26 euros)
GENbox Couvercle Jar 7l (Biomérieux, réf. 96130, 44 euros)

2.1.2. Milieux pour ensemencement et identification

Nom
Gélose Helicobacter « maison » boîte 90 mm
Bouillon coeur-cervelle 5 ml
Milieu urée-indole (Biomérieux, 10 X 10 ml, réf. 55752, 22 euros)

2.2. Réactifs

Nom
Portagerm Pylori (Biomérieux, 8 flacons, réf. 42041, 17 euros)
gélose de base Sang n°2 (Oxoid, CM 271 B, 500 g, réf. 05452, 56 euros)
Supplément sélectif pour <i>Helicobacter pylori</i> (1 flacon pour 500 ml de milieu) (Oxoid, SR147E, 10 flacons réf. 52822, 67 euros)
Sang de cheval laqué (Oxoid SR 048C, 100 ml, réf. 05851, 23.2 euros) ou sang de cheval frais défibriné
Cœur Cervelle (bouillon) (Oxoid CM225B, 500 g, réf. 51871, 58.10 euros)
Mueller-Hinton (milieu déhydraté) (Biorad, 500g, réf. 64884 ou 5 kg, réf. 64888)

2.3. Préparation

2.3.1. Gélose Helicobacter « maison »

2.3.1.1. Composition :

Sang n°2 (gélose de base) (Oxoid CM271B).....	20 g
Eau distillée.....	448 ml
Supplément sélectif pour <i>Helicobacter pylori</i> (Oxoid SR147E)	2 ml
Sang de cheval laqué (Oxoid SR048C) ou de cheval frais défibriné.....	50 ml

pH=7,4

2.3.1.2. Préparation

- Verser 20 grammes de poudre dans 448 ml d'eau distillée
- Chauffer jusqu'à complète dissolution.
- Ajuster le pH.
- Stériliser à l'autoclave 115°C pendant 20 minutes.
- Laisser refroidir à une température de 56°C.
- Ajouter stérilement:
 - 50 ml de sang de cheval,
 - 1 flacon de supplément sélectif pour H. pylori
(Préalablement reconstitué avec 2 ml d'eau distillée)
- Bien mélanger
- Les milieux seront coulés en géloses épaisses (12 mm) en boîtes de Pétri (Φ 90 mm)
- Conserver à +4°C les milieux pendant un maximum de 1 semaine.

2.3.2. Gélose MH à 10% de sang de cheval frais

2.3.2.1. Composition

2.3.2.1.1. Milieu Mueller-Hinton

Mueller-Hinton (milieu déshydraté) (Biorad).....	35 g
Eau distillée.....	1000 ml

2.3.2.1.2. Milieu MH à 10% de sang de cheval

Milieu Mueller-Hinton	450 ml
Sang de cheval laqué (Oxoid SR048C) ou sang de cheval frais défibriné	50 ml

2.3.2.2. Préparation

Du milieu MH, à l'avance :

- Verser 35 grammes de poudre de MH dans 1 litre d'eau distillée
- Chauffer jusqu'à complète dissolution.
- Répartir en flacons stériles de 450 ml
- Stériliser à l'autoclave 121°C pendant 15 minutes.

Au moment de l'emploi :

- Faire fondre au bain-marie bouillant
- Laisser refroidir à une température de 56°C.

- Ajouter stérilement 50 ml de sang de cheval par flacon de 450 ml
- Les milieux seront coulés en boîtes de Pétri en gélose épaisse (12 mm) (Φ 90 mm) à la demande.

2.3.3. Bouillon Cœur-Cerveille

2.3.3.1. Composition

Cœur Cerveille (bouillon) (Oxoid réf. CM 225B).....	37 g
Eau distillée.....	1000 ml

2.3.3.2. Préparation

- Verser la poudre dans l'eau distillée.
- Bien mélanger.
- Stériliser à l'autoclave pendant 20 minutes à 115°C.

3. Modalités

3.1. Recueil des biopsies pour mise en culture

- Prélèvement si possible de 3 fragments biopsiques
- Pour éviter la dessiccation, les biopsies seront déposées dans un flacon à bouchon vissé stérile presque totalement rempli de sérum physiologique.
- L'acheminement des biopsies au laboratoire doit obéir à certaines règles :
 - à température ambiante - délai < 1 heure,
 - à + 4°C - délai maximum = 24 heures,

En cas d'impossibilité de conserver la biopsie à +4°C, le transport au laboratoire s'effectuera dans un milieu de transport Portagerm Pylori (Biomérieux, réf. 42041)

3.2. Préparation de la biopsie gastrique

- Prendre une lame, l'identifier, la flamber et la laisser refroidir en la déposant sur la Paillasse
- Prendre une anse plastique stérile
- Prélever la biopsie et la déposer sur le couvercle d'une boîte de pétri
- La couper avec un scalpel

3.3. Examen microscopique

- Prendre un fragment de biopsie avec une anse plastique stérile et la frotter sur la lame
- Effectuer une coloration de Gram après fixation à la flamme.
- Lecture à immersion, grossissement x 100 : rechercher les bacilles à Gram négatif incurvés ou légèrement spiralés dans les zones riches en cellules. Observer plusieurs champs, les bacilles sont parfois rares ou groupés en "bancs de poissons".

3.4. Test à l'urée

- Mettre le bout restant dans un tube à hémolyse contenant 0.3 ml de milieu urée-indole.
- Incuber à 37°C.
- Si le milieu ne vire pas dans les 5 minutes (la couleur passe du jaune-orange au rose par alcalinisation du milieu), effectuer une lecture à 2 heures et une autre lecture à 24 heures.
- Après 2 heures, le test est très spécifique mais de sensibilité limitée, alors qu'après 24 heures, c'est l'inverse.

- Il faut 10^5 bactéries/biopsie pour faire virer l'indicateur

3.5. Broyage

- Mettre une biopsie à l'aide de l'anse plastique stérile dans un tube eppendorf 1.5 ml
- Broyer à l'aide d'un bâtonnet
- Ajouter 0.2 ml de bouillon BCC avec une pastette stérile.
- Dilacérer la biopsie avec 10 ou 15 rotations énergiques, puis quelques mouvements antéropostérieurs
- Récupérer le mélange avec une pastette, notamment les bulles

3.6. Cultures

3.6.1. Milieux à ensemercer

La croissance de *H. pylori* s'effectue sur milieu gélosé additionné de sang de cheval ou humain (7 à 10 %). Le sang de mouton n'est pas adapté.

- Utiliser toujours un milieu non sélectif et un milieu sélectif
 - * non sélectif : gélose MH à 10 % de sang de cheval
 - * sélectif : gélose Helicobacter « maison »

3.6.2. Ensemencement

- Ensemencer 2 à 3 gouttes du broyat obtenu sur chaque gélose et effectuer un isolement Selon la technique des quadrants.

3.7. Conservation des biopsies gastriques après broyage et ensemencement

- Conservation à - 80°C.

3.8. Incubation

En enveloppe individuelle :

- Incuber les milieux à 37°C en micro-aérobiose au moyen de sachets générateurs d'atmosphère micro-aérobie.
- Fermer à l'aide d'une barrette et par thermosoudage si possible

En jarre :

- Incuber les milieux à 37°C en micro-aérobiose durant 10 jours (réalisée en jarre au moyen de sachets générateurs d'atmosphère micro-aérobie.
- Mettre un indicateur de microaérophilie.
- Changer les sachets tous les 2 jours lors de l'observation des cultures.
- Dans la jarre en microaérobiose, intercaler toutes les 4 boîtes, une boîte de pétri contenant de l'eau afin d'assurer un niveau d'humidité adéquat, les Helicobacters craignant particulièrement la dessiccation.

3.9. Lecture

- Les boîtes sont gardées 8 jours en cas d'examen direct négatif, 12 jours en cas d'examen direct positif ou de test uréase positif mais il faut les examiner (sans ouvrir le sachet) chaque jour à partir du 3^{ème} jour car certaines cultures dégénèrent rapidement.
- Repérer les colonies rondes, bombées et brillantes apparaissant habituellement au bout de 3 ou 4 jours.

Tous les tests suivants devront tenir compte de l'évolution rapide de *Helicobacter pylori* des formes coccoïdes non cultivables et de ce fait, il faudra utiliser des cultures jeunes (2 à 3 jours maxima de subculture).

3.10. Identification des souches de *Helicobacter pylori*:

- Les colonies sont petites (0,5 µm) ou en nappes, brillantes, non hémolytiques
- Oxydase et catalase (+)
- Uréase (+++), la mise en suspension d'une pointe de pipette de colonies dans quelques gouttes de milieu urée-indole fait virer le milieu au rose en quelques minutes
- A la coloration de Gram, les bactéries sont Gram négatif, spiralées ou arquées en forme de U ou de O. Dans les cultures âgées, des formes coccoïdes non subcultivables apparaissent. Une coloration à la fuschine pure peut remplacer la coloration de Gram. Aucun diagnostic différentiel n'est à envisager. *H. pylori* est la seule bactérie retrouvée dans l'estomac humain avec *H. heilmannii* (ex *Gastrospirillum hominis*) qui ne pousse pas dans ces conditions.

3.11. Repiquage d'une colonie

3.11.1. Généralités

Les bactéries du genre *Helicobacter* sont des bactéries très sensibles à la chaleur et à l'oxygène (ne pas laisser les boîtes sur la paille en l'absence d'atmosphère microaérobie).

Dès que les colonies apparaissent sur les géloses (Φ 1.5 mm) ne plus incuber les boîtes à 37°C au risque de voir les populations bactériennes se transformer en bactéries coccoïdes non cultivables.

Le caractère clonal de l'ADN extrait est primordial. Il faut réaliser une subculture en repiquant une et une seule colonie de la primo-culture sur une gélose au sang. Cette subculture permettra ensuite de réaliser des subcultures pour l'extraction d'ADN (mais aussi la congélation et l'antibiogramme).

3.11.2. Les primo-cultures de la biopsie fundique et de la biopsie antrale sont positives

- Si les primo-cultures des biopsies fundiques et antrales sont positives, réaliser l'extraction d'ADN et l'antibiogramme uniquement à partir de la primo-culture de la biopsie antrale.
- Réaliser une subculture en repiquant une et une seule colonie de la primo-culture de la biopsie antrale sur une gélose au sang de la façon suivante :
 - Prendre 1 colonie à l'aide d'une pipette pasteur stérile et la suspendre dans un tube eppendorf 1.5 ml contenant 50 µl de Bouillon Cœur-Cerveau (BCC).
 - Homogénéiser
 - Prendre la totalité de la suspension à l'aide d'une pastette, la déposer sur une gélose MH à 10% de sang et ensemercer la moitié de cette gélose.
 - Incuber 24-48 heures à 37°C en microaérophilie.
 - Prendre la boîte du r repiquage à 24-48 heures, s'assurer que la subculture est pure macroscopiquement.
 - Vérifier par un Gram que la souche bactérienne contient moins de 10% de formes coccoïdes.

- Avec un écouvillon stérile imbibé de BCC, récupérer l'ensemble de la subculture, mettre en suspension dans 700 µl de BCC.
 - Ensemencer 6 géloses MH à 10 % de sang:
 - 2 pour la congélation (congélation en DOUBLE),
 - 1 pour l'antibiogramme,
 - 3 pour l'extraction.
- En parallèle, réaliser 2 subcultures à partir d'une vingtaine de colonies si possibles isolées respectivement de la primo-culture de la biopsie fundique et de la biopsie antrale:
- Prendre 20 colonies à l'aide d'une pipette pasteur stérile et la suspendre dans un tube eppendorf 1.5 ml contenant 100 µl de Bouillon Cœur-Cerveille (BCC).
 - Homogénéiser
 - Prendre la totalité de la suspension à l'aide d'une pastette, la déposer sur une gélose MH à 10% de sang et ensemencer la totalité de la gélose.
 - Incuber 24-48 heures à 37°C en microaérophilie.
 - Prendre la boîte du repiquage à 24-48 heures, s'assurer que la subculture est pure macroscopiquement.
 - Vérifier par un Gram que la souche bactérienne contient moins de 10% de formes coccoïdes.
 - Congeler à -80°C de façon séparée ces 2 subcultures (MO HP 003 A).

La subculture étant une étape délicate, la congélation de la subculture réalisée à partir de 20 colonies isolées de la primo-culture de la biopsie antrale pourra être utilisée en cas d'absence ou de dégénérescence en forme coccoïde de la première subculture. Décongeler (MO HP 003A) et repartir d'une colonie.

3.11.3. Seule une primo-culture est positive, soit à partir de la biopsie fundique, soit à partir de la biopsie antrale

- Réaliser une subculture en repiquant une et une seule colonie de la primo-culture de la biopsie gastrique sur une gélose au sang de la façon suivante :
- Prendre 1 colonie à l'aide d'une pipette pasteur stérile et la suspendre dans un tube eppendorf 1.5 ml contenant 50 µl de Bouillon Cœur-Cerveille (BCC).
 - Homogénéiser
 - Prendre la totalité de la suspension à l'aide d'une pastette, la déposer sur une gélose MH à 10% de sang et ensemencer la moitié de cette gélose.
 - Incuber 24-48 heures à 37°C en microaérophilie.
 - Prendre la boîte du repiquage à 24-48 heures, s'assurer que la subculture est pure macroscopiquement.
 - Vérifier par un Gram que la souche bactérienne contient moins de 10% de formes coccoïdes.
 - Avec un écouvillon stérile imbibé de BCC, récupérer l'ensemble de la subculture, mettre en suspension dans 700 µl de BCC.
 - Ensemencer 6 géloses MH à 10 % de sang:
 - 2 pour la congélation (congélation en DOUBLE),
 - 1 pour l'antibiogramme,
 - 3 pour l'extraction.
- En parallèle, réaliser 1 subculture à partir d'une vingtaine de colonies si possible de la primo-culture de la biopsie gastrique sur une gélose au sang de la façon suivante :

- Prendre 20 colonies à l'aide d'une pipette pasteur stérile et la suspendre dans un tube eppendorf 1.5 ml contenant 100 µl de Bouillon Cœur-Cerveille (BCC).
- Homogénéiser
- Prendre la totalité de la suspension à l'aide d'une pastette, la déposer sur une gélose MH à 10% de sang et ensemencer la totalité de la gélose.
- Incuber 24-48 heures à 37°C en microaérophilie.
- Prendre la boîte du repiquage à 24-48 heures, s'assurer que la subculture est pure macroscopiquement.
- Vérifier par un Gram que la souche bactérienne contient moins de 10% de formes coccoïdes.
- Congeler à -80°C ces 2 subcultures.

La subculture étant une étape délicate, la congélation de la subculture réalisée à partir de 20 colonies isolées de la primo-culture de la biopsie gastrique pourra être utilisée en cas d'absence ou de dégénérescence en forme coccoïde de la première subculture. Décongeler et repartir d'une colonie.

Annexe 2. Extraction de l'ADN des souches de *Helicobacter pylori*

1. Objet

Décrit l'extraction d'ADN des souches de *Helicobacter pylori* isolées à partir de biopsies gastriques.

2. Moyens

2.1. Matériel technique

2.1.1. Petit matériel à usage unique

Nom
Ensemenceur plastique (Bioblock p445, Greiner bio-one, 10 µl, 600 par carton, emballage unitaire, N1784X, 68.60 euros)
Tubes Eppendorf 1.5 ml stériles (Microtube Eppendorf safe-lock 1.5ml, Catalogue Magasin Général, réf fournisseur 0030 120 086, code IP 70560, X 1000, 23.75 euros)

2.1.2. Matériel réutilisable

Nom
Bain-marie
Vortex
Congélateur -20°C ou -80°C
Microcentrifugeuse

2.2. Réactifs

Nom
QIAamp DNA Mini Kit (250) (Qiagen, 250 extractions, réf. 51306)
Éthanol absolu (Sigma réf. E7023, 500 ml, 37.96 euros)

3. Modalités

Les tampons AW1 et AW2 sont fournis concentrés. Ne pas oublier d'ajouter la quantité appropriée d'éthanol (96 à 100%) indiquée sur le flacon.

3.1. Vérification de la qualité de la subculture

-Vérifier par un Gram que la souche bactérienne contient moins de 10% de formes coccoïdes

3.2. Extraction d'ADN

Préparation réalisée sous forme de 5 extractions menées parallèlement et indépendamment les étapes *1 à 9*

1 – Récupérer à partir d'une boîte de gélose au sang, 1 anse stérile pleine d'une subculture fraîche de *H. pylori*. Travailler stérilement sans gants. Resuspendre les bactéries dans 180 µl de tampon ATL. Vortexer, puis centrifuger 1 sec 8000 tr/mn pour collecter l'ensemble du matériel au fond du tube.

2- A partir de cette étape, travailler avec gants pour éviter les problèmes de contamination.

- 3- Ajouter 20 µl de protéinase K (20 mg/ml). Vortexer puis incuber à 55°C jusqu'à lyse complète du culot soit environ 45 minutes (Noter que si la lyse est trop rapide, <30 minutes, c'est que la quantité de bactéries récoltée est insuffisante).
- 4- Centrifuger 1 sec. 8000 trs/mn
- 5- Ajouter 200 µl de tampon AL. Vortexer, centrifuger 1 sec, et incuber 10 min à 70°C. Centrifuger 1 sec. 8000 trs/mn
- 6- Ajouter 200 µl d'éthanol 100 % froid. Vortexer.
- 7- Transvaser sur une mini-colonne du Kit et centrifuger 1 min. à 8000 rpm.
- 8- Changer le tube contenant l'éluat et placer la colonne dans un tube propre. Ajouter sur la colonne 500 µl de tampon AW1 et centrifuger 1 min. à 8000 rpm.
- 9- Changer à nouveau le tube contenant l'éluat et placer la colonne dans un tube propre. Ajouter 500 µl de tampon AW2 et centrifuger 3 min. à 14 000 rpm.
- 10- Placer la colonne dans un tube propre. Eluer 1 fois avec 200 µl de tampon AE : attendre 1 min et centrifuger 1 min à 8000 rpm.*
- 11- Pooler les 5 X 200 µl d'ADN chromosomique (1 ml) et les conserver à -80°C.

3.3. Contrôle de la qualité de l'ADN préparé

Pour s'assurer de la qualité des préparations, celles-ci doivent présenter une concentration comprise entre 15 et 50 µg/ml, c'est-à-dire que le dépôt de 1 à 5 µl de la solution doit donner une bande chromosomique clairement visible en UV sur gel d'agarose 2% contenant du bromure d'éthidium.

3.4. Codage des échantillons d'ADN

D	_0_ _1_	_ _ _ _	_
Lettre*	N° Service	N° Patient	a si ADN Hp isolé de l'antré f si ADN Hp isolé du fundus

* A (IP Algérie) C (IP Cambodge) D (IP Dakar) G (IP Grèce) M (IP Madagascar)

+ Nom, Prénom, date de naissance

3.5. Conservation

L'ADN est conservé à -80°C.

Annexe. 3. Etude de la diversité génétique de l'extrémité 3' du gène cagA

1. Objet

Décrire les différentes étapes de l'étude de l'extrémité 3' du gène cagA.

2. Références

Akopyants NS, Clifton SW, Kersulyte D, Crabtree JE, Youree BE, Reece CA, Bukanov NO, Drazek ES, Roe BA, Berg DE. Analyses of the *cag* pathogenicity island of *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol*. 1998 Apr; 28(1):37-53.

van Doorn LJ, Figueiredo C, Sanna R, Pena S, Midolo P, Ng EK, Atherton JC, Blaser MJ, Quint WG. Expanding allelic diversity of *Helicobacter pylori vacA*. *J Clin Microbiol*. 1998 Sep; 36(9):2597-603.

Panayotopoulou EG, Sgouras DN, Papadakos K, Kalliaropoulos A, Papatheodoridis G, Mentis AF, Archimandritis AJ. Strategy to Characterize the Number and Type of Repeating EPIYA Phosphorylation Motifs in the Carboxyl Terminus of CagA Protein in *Helicobacter pylori* Clinical Isolates. *J Clin Microbiol*. 2007 Feb; 45(2):488-95.

3. Moyens utilisés

3.1. Matériel technique

31.1. Petit matériel à usage unique

Nom
Tubes PCR, à choisir selon le thermocycleur
Tubes Eppendorf 0,5 ml stériles
Tubes Eppendorf 1,5 ml stériles
Cônes à filtre 10 µl (à choisir selon la marque de pipette)
Cônes à filtre 100 µl (à choisir selon la marque de pipette)
Cônes à filtre 200 µl (à choisir selon la marque de pipette)

3.1.2. Matériel réutilisable

Nom
Portoirs tubes Eppendorf (paillasse)
Vortex
Pipette automatique P1000
Pipette automatique P200
Pipette automatique P20
Réfrigérateur
Machine à glace
Congélateur -20°C ou -80°C

3.2. Réactifs

Nom
Eau distillée stérile
Amorces
dNTP Mix 100mM, solution 4 X 25 μ mol (Catalogue Magasin Général, Eurobio Réf. GAEMPCR11-5D code IP 96063, <u>1 flacon à commander</u> , 60 euros)
Tampon 10 X (Eurobio)
MgCl ₂ (Eurobio)
Eurobluetaq 5 UI/ μ l (Eurobio Réf. GAETAQ02-4D, 250 U, <u>1 flacon à commander</u>)
Eau PPI (Pharmacie)
Glace

3.2.1. Préparation

3.2.1.1. Amorces

Les amorces sont préparées en eau distillée stérile à une concentration de 100 pmol/ μ l (solution mère). Le volume d'eau est à ajuster en fonction de la quantité d'amorce contenue dans le tube reçu. Une fois la solution mère prête, la solution d'emploi est préparée en eau distillée stérile à la concentration de 5 pmol/ μ l. Le volume préparé de solution d'emploi est cependant variable et sera ajusté par chaque utilisateur en fonction du nombre de tests à effectuer. Les solutions mères et d'emploi seront congelées à - 20 °C.

3.2.1.2. dNTP à 1,25 mM

80 μ L du mélange de dNTP Mix 100mM reçu sont mélangés avec 1520 μ L d'eau distillée stérile. Aliquoter en tubes Eppendorf sous un volume de 100 μ l. Conserver à - 20°C.

4. Modalités

Plusieurs étapes existent: l'extraction de l'ADN à partir de souches bactériennes, la préparation du ou des mélanges réactionnels, l'amplification de l'ADN, la séparation et la révélation des produits amplifiés.

4.1. Mélanges réactionnels pour PCR

Le mélange réactionnel est spécifique d'une PCR donnée.

Préparer un mélange réactionnel d'amplification "MIX PCR" selon les conditions suivantes

	(Solution d'emploi)	PCR cagA	PCR ES	PCR EPIYA
Tampon Taq Eurobio sans Mgcl ₂	10X	1X	1X	1X
Mgcl ₂ Eurobio	50 mM	1.5 mM	1.5 mM	1.5 mM
Amorces	5 pmol/ μ l	0.5 μ M	0.5 μ M	0.5 μ M
dNTP Eurobio (A, T, C, G)	1.25 mM	200 μ M	200 μ M	200 μ M
Eau ppi				
Eurobio Taq Polymerase (Eurobio)	5U/ μ l	1.5 U	1.5 U	1.5 U
Répartir sous (μ l)		49	49	49
Volume d'ADN dilué Au 1/20° (μ l)		1	1	1

- Prévoir un nombre d'échantillons pour réaction d'amplification égal à $N + 1 + t + 1$
 - N : nombre de souches à tester
 - 1 : témoin négatif
 - t : nombre de témoins positifs
 - 1 : volume de sécurité
- Identifier chaque tube (numéro de la souche dans la série)
- Homogénéiser le(s) "MIX PCR" au vortex. Répartir le(s) "MIX PCR" dans chacun des tubes PCR pour réaction d'amplification.

4.2. Amplification proprement dite

- Dans le(s) tube(s) PCR contenant le "MIX PCR" (à l'exception des témoins négatifs et positifs), ajouter 1 μ l d'ADN à tester (en solution au 1/20). Pour le témoin négatif remplacer l'ADN par de l'eau distillée stérile et pour le(s) témoin(s) positif(s), ajouter l'ADN des souches de référence.
- Mettre les tubes dans le thermocycleur homologué.
- Sélectionner le programme d'amplification adéquat.

PCR CagA (amplification du gène *cagA*) (Van Doorn *et al*, 1998)

Nombre de cycles	T °C	Temps	
40	1	94	
		94	9 mn
		50	30 s
		72	45 s
1	72	45 s	
1	72	5 mn	

PCR ES (Confirmation de l'absence de l'îlot de pathogénicité *cagA*) (Akopyants *et al*, 1998)

Nombre de cycles	T °C	Temps	
35	1	94	
		94	5 mn
		57	1 mn
		72	1 mn
1	72	1 mn	
1	72	5 mn	

PCR EPIYA (Etude de l'extrémité 3' du gene *cagA*) (Panagiotopoulou *et al*, 2006)

Nombre de cycles	T °C	Temps	
35	1	94	
		94	5 mn
		50	30 s
		72	45 s
1	72	45 s	
1	72	5 mn	

- Lorsque le programme est terminé, les amplifiats peuvent être testés immédiatement ou conservés à 4°C pendant 24 heures avant l'électrophorèse permettant la séparation et la révélation des fragments amplifiés.

4.3. Séparation et révélation des produits d'amplification

Les produits d'amplification sont séparés par électrophorèse

5.8. Interprétation des résultats et contrôle de qualité

Le témoin négatif (tube sans ADN) ne doit montrer aucune amplification.

Pour les PCR *cagA* et ES : Les souches dont les amplifiats présentent une bande de taille identique à celle du témoin seront considérées positives pour la présence du gène *cagA* (PCR *cagA*) ou de « l'empty-site » (PCR ES). Les souches présentant une absence d'amplification ou l'amplification d'un fragment de taille différente de celle du témoin seront considérées comme négatives pour le gène *cagA* (PCR *cagA*) ou pour « l'empty-site » (PCR ES).

Pour l'ADN témoin :

Les PCR *cagA* et ES sont deux PCR très robustes et les amorces utilisées sont très spécifiques. Les ADN témoins sont des ADN de patients ayant donné une amplification pour ces 2 PCR.

Pour la PCR EPIYA, l'ADN témoin pour la PCR *cagA* sera utilisée.

5. Rendu des résultats sur les feuilles de paillasse

Noter les résultats de la manipulation sur les fiches PCR, coller la photo sur la fiche correspondante.

Après validation par le biologiste, saisir les résultats dans la base de données Access.

6. Envoi des amplicons à séquencer à l'Institut Pasteur de Paris

A la fin de l'étude, les amplicons à séquencer seront envoyés à l'Institut Pasteur de Paris (Réfèrent : JM Thiberge, mail : jmthiber@pasteur.fr) sous carboglace directement dans les tubes ayant servis à réaliser l'amplification.

Pour avoir un séquençage de bonne qualité, il est primordial d'obtenir un signal d'amplification propre (absence de bandes parasites, une bande d'amplification) et d'intensité fort après migration électrophorétique sur gel d'agarose. L'envoi des amplicons à l'UPBM sera accompagné de la photo du gel d'agarose.

7. Commentaires

Toutes les manipulations concernant la PCR doivent être effectuées dans des locaux prévus à cet effet, en prenant toutes les précautions pour éviter les contaminations tout en maintenant l'ensemble des réactifs dans de la glace fondante pendant la manipulation.

Annexe 4. Electrophorèse en champ continu des produits PCR

1. Objet

Décrit la préparation et la conservation des gels, l'électrophorèse et la révélation des produits PCR

2. Moyens utilisés

2.1. Matériel technique

2.1.1. Petit matériel à usage unique

Nom	Stock
Pellicule photo Cones à filtre 10 µl Parafilm	

2.1.2. Matériel réutilisable

Nom	Stock
Portoirs tubes Eppendorf (paillasse) Vortex Pipette automatique P10 Réfrigérateur Congélateur -20°C ou -80°C Générateur Four micro-ondes Film de paraffine	

2.2. Réactifs

Nom	Stock
Eau distillée stérile Trisma base (cf MO SA 008) Acide borique (Sigma réf. B6768, 500 g, PM=61.83 gr, <u>1 flacon à commander</u> , 25.76 euros) EDTA (cf MO SA 008) Tampon TBE 10 X Tampon TBE 0,5 X Agarose (Catalogue Magasin Général, Invitrogen réf. 15510019, code IP 52170, 100 g, <u>1 flacon à commander</u> , 47 euros)	
Tampon de charge (Sigma réf. G2526, 5ml, <u>1 flacon à commander</u> , 9.76 euros)	
Bromure d'éthidium (BET) (Catalogue Magasin Général, Eurobio réf. GEPBETO2.AF, code IP 99025, 5 X 5ml, <u>1 flacon à commander</u> , 30 euros) Marqueur de poids moléculaire (100 Base Pair ladder Catalogue Magasin Général, Biolabs réf. N3231S, code IP 99215, 100µg, <u>1 flacon à commander</u> 45.50 euros)	

2.1.2. Préparation

- Tampon TBE 10X (pH 8,0)

Tris base	108 g
Acide borique	55 g
EDTA (Na ₂ EDTA, 2H ₂ O)	9.3 g
Eau distillée qsp	1 000 ml

Dissoudre. Ajuster le pH à 8,0. Répartir en flacon à vis. Autoclaver 20 minutes à 110°C. Se conserve à température du laboratoire.

- Tampon TBE 0.5X (pH 8,0)

Ajouter 25ml de Tampon TBE 10X (pH 8,0) dans 475 ml d'eau distillée. Se conserve à température du laboratoire.

- Marqueur de poids moléculaire

Marqueur PM	40 µl
Tampon TAE 0.5X	10 µl
Tampon de charge	10 µl

Conservation à +4°C.

3. Modalités

3.1. Préparation des gels d'agarose

Les fragments d'ADN sont séparés par électrophorèse en champ continu. La concentration du gel d'agarose est de 1.5%.

- Préparer le support gel adéquat dans le système de coulage
- Peser l'agarose dans un flacon stérile de 250 mL
- Ajouter le tampon TBE 0,5 X
- Faire fondre 2 mn dans le four à microondes
- Laisser refroidir à environ 60°C
- Ajouter 1 goutte de BET
- Mélanger délicatement et couler sur le support gel
- Installer immédiatement les peignes adéquats
- Laisser solidifier 30 minutes en fonction de la dimension du gel sur la paillasse
- Enlever les peignes et poser le gel et son support dans la cuve (conservation du gel à + 4°C maximum 3 j dans papier aluminium)
- Remplir la cuve avec du tampon de migration TBE 0,5X. Le niveau du tampon doit être de 5 mm au dessus du niveau du gel

3.2. Dépôt des échantillons

- Sur un morceau de parafilm posé sur la paillasse, déposer N (N = nbre d'amplifiat à tester) gouttes de 2 μ L de tampon de charge. Mélanger pour chaque amplifiat à tester, 2 μ l de tampon de charge et 7 μ L d'amplifiat. Changer d'embout pour chaque amplifiat. Reprendre 7 μ L du mélange et le déposer dans un puits selon l'ordre défini à l'avance et noté sur la fiche PCR.
- Prévoir un puits pour le marqueur de poids moléculaire
- Fermer le couvercle de la cuve
- Brancher les électrodes au générateur de tension

3.3. Séparation et révélation des produits d'amplification (PCR)

- Afficher les paramètres choisis pour la migration sur le générateur
- Pour la séparation des produits de PCR, faire migrer à 120 V olts pendant 45 minutes minimum.
- Après la migration arrêter le générateur, débrancher les électrodes, ouvrir le couvercle, sortir le gel avec le support gel
- Observer sous rayons UV et photographier le gel sans le support. Si nécessaire poursuivre la migration jusqu'à l'obtention d'une bonne séparation des fragments attendus pour les témoins positifs.
- Jeter le gel dans le container prévu à cet effet, nettoyer l'appareil photo et la cuve à électrophorèse.

Annexe 5. RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)

1. Objet

Décrire les différentes étapes de la réalisation du typage génomique de souches d'Hp par RAPD

2. Références

Kansau I, Raymond J, Bingen E, Courcoux P, Kalach N, Bergeret M, Braimi N, Dupont C, Labigne A. Genotyping of *Helicobacter pylori* isolates by sequencing of PCR products and comparison with the RAPD technique. *Res Microbiol.* 1996 Oct; 147(8):661-9.

3. Moyens utilisés

3.1. Matériel technique

3.1.1. Petit matériel à usage unique

Nom
Tubes PCR, à choisir selon le thermocycleur
Tubes Eppendorf 0,5 ml stériles
Tubes Eppendorf 1,5 ml stériles
Cônes à filtre 10 µl (à choisir selon la marque de pipette)
Cônes à filtre 100 µl (à choisir selon la marque de pipette)
Cônes à filtre 200 µl (à choisir selon la marque de pipette)

3.1.2. Matériel réutilisable

Nom
Portoirs tubes Eppendorf (paillasse)
Vortex
Pipette automatique P1000
Pipette automatique P200
Pipette automatique P20
Réfrigérateur
Machine à glace
Congélateur -20°C ou -80°C

3.2. Réactifs

Nom
Eau distillée stérile
Amorces
dNTP Mix 100mM, solution 4 X 25 µmol (Catalogue Magasin Général, Eurobio Réf. GAEPCR11-5D code IP 96063, <u>1 flacon à commander</u> , 60 euros)
Tampon 10 X (Eurobio)
MgCl ₂ (Eurobio)
Eurobluetaq 5 UI/µl (Eurobio Réf. GAETAQ02-4D, 250 U, <u>1 flacon à commander</u>)
Eau PPI (Pharmacie)
Glace

3.2.1. Préparation

3.2.1.1. Amorces

L'amorce est préparée en eau distillée stérile à une concentration de 100 pmol/μl (solution mère). Le volume d'eau est à ajuster en fonction de la quantité d'amorce contenue dans le tube reçu. Une fois la solution mère prête, la solution d'emploi est préparée en eau distillée stérile à la concentration de 30 pmol/μl. Le volume préparé de solution d'emploi est cependant variable et sera ajusté par chaque utilisateur en fonction du nombre de tests à effectuer. Les solutions mères et d'emploi seront congelées à - 20 °C.

4.2.1.2. dNTP à 1,25 mM

80 μL du mélange de dNTP Mix 100mM reçu sont mélangés avec 1520 μL d'eau distillée stérile. Aliquoter en tubes Eppendorf sous un volume de 100 μl. Conserver à - 20°C.

4. Modalités

Plusieurs étapes existent: l'extraction de l'ADN à partir de souches bactériennes, la préparation du ou des mélanges réactionnels, l'amplification de l'ADN, la séparation et la révélation des produits amplifiés.

4.1. Extraction de l'ADN

Voir le mode opératoire de l'annexe 2.

4.2. Contrôle de l'ADN

Voir le mode opératoire de l'annexe 2.

4.3. Amorces

RAPD	Nom amorce	Sequence (5'-3')	Nb nucléotides
Random Amplified Polymorphic DNA	RAPD	AGT TCA GCC AC	11 n

4.4. Mélanges réactionnels pour PCR

Préparer un mélange réactionnel d'amplification "MIX PCR" selon les conditions suivantes

	Conc. Solution d'emploi	RAPD
tampon Taq Eurobio sans MgCl2	10X	1X
MgCl2 Eurobio	50 mM	4 mM
amorces	5 pmol/μl	3 μM
dNTP Eurobio (A, T, C, G)	1.25 mM	400 μM
eau ppi		
Euroblue Taq polymerase (Eurobio)	5U/μl	2.5 U
Répartir sous (μL)		49
Volume d'ADN dilué au 1/20 (μl)		1

- Prévoir un nombre d'échantillons pour réaction d'amplification égal à N + 2

N : nombre de souches à tester

1 : témoin négatif

1 : volume de sécurité

- Identifier chaque tube (numéro de la souche dans la série)
- Homogénéiser le(s) "MIX PCR" au vortex. Répartir le(s) "MIX PCR" dans chacun des tubes PCR pour réaction d'amplification.

4.5. Amplification proprement dite

- Dans le(s) tube(s) PCR contenant le "MIX PCR" (à l'exception des témoins négatifs et positifs), ajouter 1 µl d'ADN à tester (en solution au 1/20). Pour le témoin négatif remplacer l'ADN par de l'eau distillée stérile et pour le(s) témoin(s) positif(s), ajouter l'ADN des souches de référence.
- Mettre les tubes dans le thermocycleur homologué.
- Sélectionner le programme d'amplification adéquat.

Nombre de cycles	T °C	Temps
45	94	1 mn
	36	1 mn
	72	2 mn
1	72	5 mn

- Lorsque le programme est terminé, les amplifiats peuvent être testés immédiatement ou conservés à 4°C pendant 24 heures avant l'électrophorèse permettant la séparation et la révélation des fragments amplifiés.

4.6. Séparation et révélation des produits d'amplification

Les produits d'amplification sont séparés par électrophorèse selon l'annexe 4.

4.7. Interprétation des résultats et contrôle de qualité

Le témoin négatif (tube sans ADN) ne doit montrer aucune amplification.

Cette technique consiste à réaliser une amplification avec des amorces définies de façon aléatoire et une température d'hybridation basse. Si les 2 sites d'hybridation sont suffisamment proches, l'amplification est possible. Une variabilité du génome de souches de *H. pylori* sera détectée par un polymorphisme du nombre et de la longueur des fragments d'ADN amplifiés. Cette technique a l'avantage d'être rapide et discriminante. En revanche, sa faible reproductivité nécessite de réaliser le typage moléculaire des souches que l'on veut comparer au cours de la même réaction d'amplification.

5. Rendu des résultats sur les feuilles de paillasse

Noter les résultats de la manipulation sur les fiches PCR, coller la photo sur la fiche correspondante.

Après validation par le biologiste, saisir les résultats dans la base de données Access.

6. Commentaires

Toutes les manipulations concernant la PCR doivent être effectuées dans des locaux prévus à cet effet, en prenant les précautions nécessaires pour éviter les contaminations tout en maintenant l'ensemble des réactifs dans de la glace fondante pendant la manipulation.

Annexe 6. Antibiogramme des souches de *Helicobacter pylori*

1. Objet

Décrit la réalisation de l'antibiogramme d'*Helicobacter pylori* isolé à partir de biopsies gastriques.

2. Modalités

2.1. Vérification de la qualité de la subculture

Vérifier par un Gram que la souche bactérienne contient moins de 10% de formes coccoïdes

2.2. Réalisation d'une suspension très riche à 3 Mac Farland

- Inoculum de 3 Mc Farland d'une subculture jeune en eau physiologique.
- Comparer par rapport au standard à 3 Mac Farland

2.3. Ensemencement par écouvillonnage

Ensemencer par écouvillonnage 4 boîtes de gélose au sang.

- Plonger un écouvillon stérile dans la suspension
- Le sortir et le presser légèrement sur les parois du tube
- Ensemencer la boîte en frottant l'écouvillon sur la surface et en tournant la boîte 3 fois de 60° afin d'assurer une bonne distribution de l'inoculum.
- Laisser sécher les boîtes 10 à 15 minutes à 37°C
- Déposer les bandelettes E-test avec une pince à raison d'une bandelette par boîte :
 - amoxicilline
 - clarithromycine
 - métronidazole

NB : La zone d'inhibition pouvant être très grande, il est important de placer l'extrémité de la bandelette portant les initiales de l'antibiotique testé, au contact du rebord de la boîte.

- Déposer un disque de ciprofloxacine.
- Incuber en micro-aérophilie à 37°C pendant 3 jours.

2.4. Lecture

Après 72 h d'incubation à 35-37° C en microaérobiose et après 4 jours pour détecter les doubles populations.

2.5. Interprétation

Concentration critique :

- E-test métronidazole CMI 8 µg/ml
- E-test clarithromycine CMI 1 µg/ml
- E-test amoxicilline CMI 0.5 µg/ml

Si CMI inférieur à CMI limite, rendre la souche sensible

Si CMI supérieur ou égal à la CMI limite, rendre la souche résistante.

Pour la ciprofloxacine, le diamètre minimal inhibiteur est de **20 mm**.

La souche est par conséquent résistante pour les spectres de diamètre inférieur à 20 mm.

Titre : Etude de la fréquence de l'infection par *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) des patients présentant une pathologie gastro-duodénale, de la sensibilité des souches aux antibiotiques et de la variabilité de la région 3' du gène *cagA*.

Prénom et Nom du candidat : Cheikh FALL

Nature du mémoire : Diplôme d'études approfondies en Biologie Animale

Soutenu le : 15 février 2008

JURY

Président :	Mr. Ngor FAYE	Maître de conférences (FST)
Membres :	Mr. Mouhamadou MBENGUE	Professeur agrégé (FMPOS)
	Mr. Mbacké SEMBENE	Maître de conférences (FST)
	Mr. Malick FALL	Maître Assistant (FST)
	Mr. Sebastian BREUREC	Biologiste (IPD)

Résumé

Très peu d'études ont été réalisées au Sénégal sur *Helicobacter pylori* (*H. pylori*). L'objectif de ce travail a été d'élargir nos connaissances sur la diversité de la pathologie gastro-duodénale humaine induite par *H. pylori*, sur la sensibilité des souches aux antibiotiques, sur la polyclonalité de l'infection chez un même patient, et sur le lien entre la diversité de la région 3' du gène *cagA* et la pathologie gastro-duodénale associée.

La prévalence de l'infection à *H. pylori* chez 44 patients était de 75%, ce qui est comparable à celle estimée lors d'études précédentes menées au Sénégal. Tous les patients sauf un, présentaient une pathologie gastroduodénale sévère. Cependant, le recrutement n'est pas représentatif des patients présentant une infection à *H. pylori* puisque les biopsies gastriques ont été réalisées uniquement chez des sujets présentant des lésions macroscopiques à l'endoscopie digestive. Le gène *cagA*, marqueur de la présence de l'îlot de pathogénicité *cag*, facteur de pathogénicité majeur, était présent chez 64,3% des souches. L'étude de l'extrémité 3' du gène *cagA* a mis en évidence des motifs de phosphorylation EPIYA de type -A, -B, -C, identiques à ceux retrouvés dans les souches occidentales. Aucun lien entre la présence du gène *cagA*, le nombre et le type de motifs de phosphorylation au niveau de l'extrémité 3' du gène *cagA* et la pathologie gastroduodénale associée n'a été mis en évidence. La clonalité de l'infection chez un même patient a été très peu étudiée de par le monde. Il semble qu'elle soit clonale dans les pays à haut niveau d'hygiène et polyclonale dans les pays en voie de développement. Nos résultats confirment cette hypothèse puisque sur les 3 patients testés par RAPD, 2 patients présentaient une infection mixte. Le taux de résistance à la clarithromycine et à l'amoxicilline était nul mais élevé pour le métronidazole (61%). Le schéma thérapeutique préconisé par toutes les conférences de consensus internationales paraît s'adapter à la situation sénégalaise : inhibiteurs de la pompe à protons à double dose, associé à la clarithromycine (500 mg x 2/ j) et à l'amoxicilline (1 g x 2/ j) pendant au moins 7 jours.

Les résultats présentés sont intermédiaires puisque nous sommes à la moitié de la durée d'inclusion des patients et des conclusions définitives ne pourront être tirées qu'à la fin de cette période.

Mots clefs : *Helicobacter pylori*, prévalence, *cagA*, extrémité 3', clonalité, sensibilité

